

二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究

第一編

二価鉄誘導脂質過酸化反応溶液中の二価鉄の定量

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：山本道夫教授）

橋 本 啓 二

（昭和56年12月9日受稿）

Key words: 鉄定量

脂質過酸化反応

緒 言

近年、脂質過酸化物は、種々の代謝調節¹⁾、細胞毒としての働き^{2,3,4,5)}、放射線障害^{6,7,8)}、細胞分裂機構⁹⁾、老化加齢現象^{9,10)}等における重要な因子としての役割が注目されている。しかし生体内における脂質過酸化反応の機序には不明な点も多く、反応機構の解明をすることは重要なことである。ミトコンドリアにおける二価鉄(Fe(II))誘導脂質過酸化反応は、脂質過酸化物形成機構の解析の一環として究明され^{11,12,13)}又、生体膜機能解明の一手法として多用されている^{14,15)}。Fe(II)誘導脂質過酸化反応では反応初期に誘導期(lag)が存在し^{11,13,15,16)}、種々の添加剤によるlagの変化—延長、短縮などから反応の阻害促進が検討されている。このlagの長さはFe(II)濃度に関係し、高濃度で延長され¹¹⁾、又、三価鉄(Fe(III))の存在下でlagは短縮されることが報告されているが^{7,11)}、Fe(II)の経時的変化の報告はみられない。この点に注目して、Fe(II)の消長とFe(II)誘導脂質過酸化反応のlagとの関係に検討を加えることは、反応機序の解明に何らかの示唆を与えるものと考えた。脂質過酸化反応におけるFe(II)濃度の消長とlagの関係を検討するためには、溶液中のFe(II)濃度の経時的変化の観察が必要であり、Fe(II)の選択的定量が必要であると思われる。そこで著者はFe(II)の高感度かつ選択的な比色定量試薬として最近報告されたニトロソフェノール試薬を用い、反応

液中のFe(II)濃度測定が可能であることを明らかにしたので報告する。

実験材料及び方法と結果

試薬：発色試薬はドータイト Nitroso-PSAP [2-Nitroso-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)phenolhydrochloride] (和光純薬工業K.K) 34 mgを1N HClに溶かし、水を加えて100mlとし、1 mM原液として使用した。鉄試薬は二価鉄イオン(Fe(II))として硫酸第一鉄アンモニウム塩(片山化学工業KK)を、三価鉄イオン(Fe(III))として硫酸第二鉄アンモニウム塩(半井化学薬品KK)を使用直前に水に溶解し使用した。還元剤として塩酸ヒドロキシルアミン(片山化学工業KK)を用いた。

その他の薬品としてトリクロル酢酸(TCA)、KCL、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウムは和光純薬工業KK製を、苛性ソーダ、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンは片山化学工業KK製を、塩酸は半井化学薬品KK製を使用した。

使用した試薬はすべて特級で、水は蒸留脱イオン水を使用した。

吸光度、吸収曲線の測定：Nitroso-PSAPによる鉄の定量はNitroso-PSAPとFe(II)の錯体による吸収波長OD752nm^{17,19)}を用いた。この波長帯はNitroso-PSAPのみではほとんどみられない。分光光度計は島津分光光度計(UV-200型)を用いた。

実験1：報告された Nitroso-PSAPによる鉄の定量においては還元剤が用いられている¹⁹⁾。鉄の酸化度合の検討を目的とする実験のためには、還元剤があつては当然使用できない。実験1では、還元剤の添加、非添加における吸光度変化を測定液中1.6~2.0 μ M 鉄濃度範囲について検討した。

(方法) 1 mM Nitroso-PSAP 0.5mlに0.2 Mpi-buffer (pH7.0) 2.5ml,還元剤として1 mMNH₂OH·HCl を加え、水を加えて総量 4.9 ml に調整し、これに吸光度測定時の終末濃度が各濃度になるように別に調整した Fe(II)液を0.1 ml 加え総量5.0ml とし、すばやく混合し、OD 752nmの吸光度測定を開始した。(実験1のa)

対照として還元剤のかわりに水を使用して同様操作測定し、Fe(II)定量における還元剤の影響を比較した。(実験1のb)

(結果) 還元剤使用の場合(実験1のa)の結果は、表1-aに、使用しない場合(実験1のb)を表1-bに示す。各々の0.5分測定値におけるFe(II)濃度とOD752の関係を図1に示す。本実験の条件下では、還元剤の有無にかかわらず実験に用いた鉄濃度範囲では混合直後では直線関係が得られ、堀口等の報告の如く¹⁹⁾、 4.2×10^4 の分子吸光係数が得られ定量が可能なが示された。しかし、両群とも室温放置した時、時間経過とともに、Nitroso-PSAPと鉄(II)の錯体によって発生したOD752nmの吸光度(図5)は変化した。表1-a, 1-bに示す如く短時間内では、若干増加の傾向がみられたが、その後減少した。3時間値では還元剤無添加の場合55%~90%値に低下し、著しい退色が観察された。還元剤添加群において、Fe(II)が低濃度ではごく僅か退色がみられたにすぎず20 μ Mの高濃度でも非添加での55%値に対し、85%値にとどまった。

実験2：次にFe(II)誘導脂質過酸化反応を測定(Hunter等¹¹⁾の方法)する条件下でFe(II)の定量が可能か否かに関する実験を行なった。通常、反応液として0.15M KCl-0.01M Tris HCl buffer pH7.4(KT液)が用いられ、反応停止液として溶液2 ml に対して0.5mlの40%T-

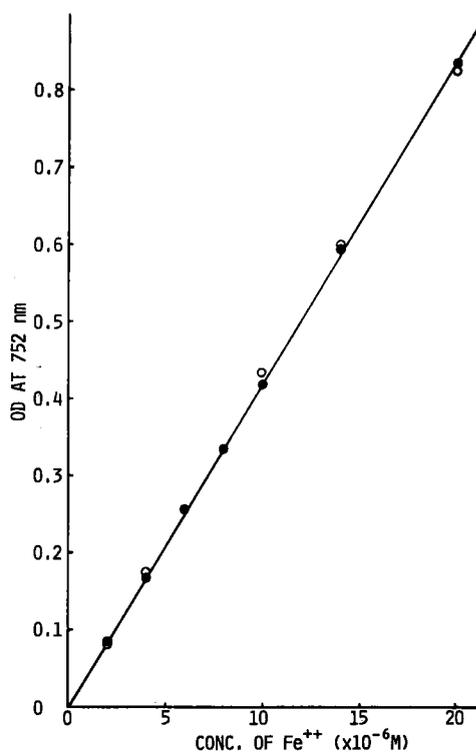


Fig. 1 Working curve obtained at 0.5 minuit after mix of various concentrations of Fe⁺⁺ with (○—○) and without (●—●) reductant.

Table 1のa Change of absorbancy in the solution after mix of various concentrations of Fe⁺⁺ with reductant.

Conc. of Fe ⁺⁺ (x10 ⁻⁶ M)	OD at 752 nm				
	min-0.5	min-15	min-30	hour-1	hour-3
2	0.088	0.087	0.087	0.085	0.087
4	0.177	0.175	0.174	0.172	0.171
6	0.265	0.261	0.261	0.257	0.256
8	0.338	0.334	0.332	0.330	0.328
10	0.436	0.430	0.426	0.423	0.425
14	0.602	0.590	0.587	0.582	0.574
20	0.822	0.775	0.755	0.727	0.697

CA液が加えられる^{11,12)}。

(方法) 0.3M KCl-0.02M Tris-HCl buffer (2倍濃度のKT液) 1 mlに40% TCA0.5 mlを加えた液に吸光度測定時の終末濃度がそれぞれの濃度になるようにFe(II)液を加え、さらに水を加えて総量2.5mlとした。これをA液とする。次に1 mM Nitroso-PSAP 0.5ml, 0.2 M Pi-

Table 1(b) Change of absorbancy in the solution after mix of various concentrations of Fe^{++} with-out reductant.

Conc. of Fe^{++} ($\times 10^{-6}M$)	OD at 752 nm				
	min-0.5	min-15	min-30	hour-1	hour-3
2	0.092	0.098	0.096	0.092	0.084
4	0.170	0.175	0.168	0.163	0.151
6	0.263	0.264	0.257	0.248	0.224
8	0.338	0.335	0.327	0.315	0.278
10	0.414	0.409	0.397	0.381	0.328
14	0.600	0.578	0.553	0.516	0.414
20	0.832	0.760	0.695	0.619	0.454

buffer 2.5ml, 1 N NaOH 0.6ml, 水をこの順に加え、総量 4 mlとし、これを B 液とした。B 液 4 ml に A 液 1 ml を加え総量 5 ml とし、すばやく混和し、OD 測定を開始した。

(結果) $Fe(II)$ 濃度による OD の変化を表 2 に示す。このうち 0.5 分値を図 2 に示す。TCA 液存在下で $Fe(II)$ 濃度と OD の間に直線関係が得られたが、分子吸光係数は $E_{752} = 3.14 \times 10^4$ で実験 1 で得られた係数に対して約 75% に低下した。又、実験 1 と同様に室温放置する時は、時間経過とともに、Nitroso-PSAP と鉄(II)錯体による OD752 の吸光度は変化した。表 2 に示す如く、

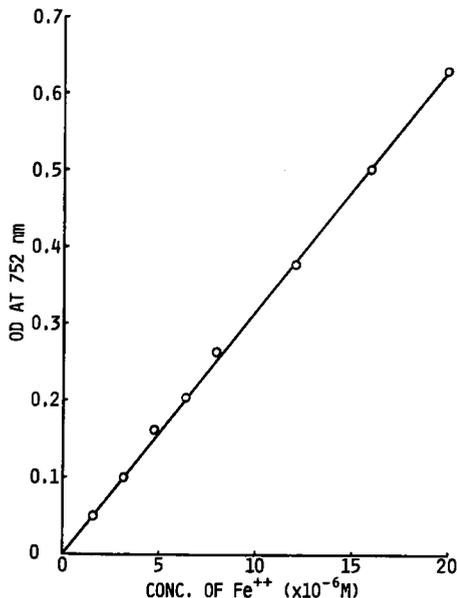


Fig. 2 Working curve obtained at 0.5 minuits after mix of various concentrations of Fe^{++} (in TCA-solution) into Nitroso-PSAP (in alkaline-solution).

Table 2 Change of absorbancy in the solution after mix of various concentrations of Fe^{++} (in TCA-solution) into Nitroso-PSAP (in alkaline-solution)

Conc. of Fe^{++} ($\times 10^{-6}M$)	OD at 752 nm				
	min-0.5	min-15	min-30	hour-1	hour-3
1.6	0.046	0.051	0.054	0.055	0.054
3.2	0.098	0.099	0.102	0.104	0.102
4.8	0.159	0.162	0.167	0.165	0.160
6.4	0.200	0.202	0.205	0.203	0.198
8.0	0.266	0.267	0.270	0.267	0.258
12.0	0.376	0.378	0.376	0.367	0.335
16.0	0.504	0.503	0.495	0.477	0.419
20.0	0.644	0.630	0.608	0.574	0.477

$Fe(II)$ が1.6, 3.2 μM の低濃度では混合後1時間までは時間の経過に伴い120~105%に増加し、その後退色傾向がみられた。又、20 μM の高濃度では、混合直後より退色がみられ、時間の経過とともに退色し、混合3時間では、74%の吸光度しか示さず著しい退色がみられた。このようにその退色は $Fe(II)$ 濃度が大きいほど著しかった。

実験 3 : $Fe(II)$ 誘導脂質過酸化反応は $Fe(II) \rightarrow Fe(III)$ の変化に伴ってひきおこされると考えられている²⁰⁾。そこで Nitroso-PSAP と $Fe(III)$ との反応をみる実験を行なった。すなわち実験 2 の $Fe(II)$ 液を $Fe(III)$ 液に換えて、同じように実験を行なった。

(方法) 2 倍濃度の KT 液 1 ml に 40% TC A 液 0.5 ml を加えたのち吸光度測定時の終末濃度がそれぞれの濃度になるように $Fe(III)$ 液を加え、さらに水を加えて総量 2.5 ml にした。これを A' 液とする。前述の B 液 4 ml に A' 液 1 ml を加え総量 5 ml とし、すばやく混和し、OD 測定を開始した。

(結果) $Fe(III)$ 濃度と OD の関係を表 3 に示す。0.5 分値と 15 分値を図 3 に示す。時間の経過に伴い OD は僅かに上昇した。3 時間後では各濃度において 5~8.5 倍と著明な増加がみられたものの、0.5 分値が 0.004~0.013 と非常に低値で、 $Fe(III)$ 濃度が 20 μM でも僅か 0.013 であり、混合直後では、ほとんどその発色は $Fe(II)$ 定量実験の誤差範囲内に入るものと考えた。

実験 4 : $Fe(II)$ 定量における $Fe(III)$ 混在の影響を調べる実験を行なった。

(方法) 2 倍濃度の KT 液 1 ml に 40% TC-

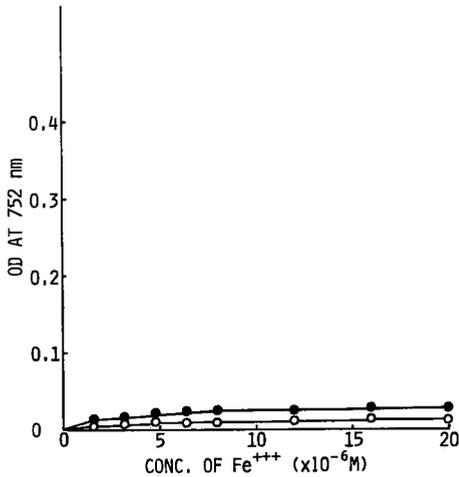


Fig. 3 Working curve obtained at 0.5 (○—○) and at 15 (●—●) minutes after mix of various concentrations of Fe⁺⁺⁺.

Table 3 Change of absorbancy in the solution after mix of various concentrations of Fe⁺⁺⁺

Conc. of Fe ⁺⁺⁺ (x10 ⁻⁶ M)	OD at 752 nm				
	min-0.5	min-15	min-30	hour-1	hour-3
1.6	0.004	0.013	0.018	0.026	0.031
3.2	0.007	0.015	0.022	0.034	0.042
4.8	0.009	0.020	0.027	0.039	0.050
6.4	0.009	0.024	0.030	0.042	0.058
8.0	0.007	0.024	0.031	0.044	0.060
12.0	0.011	0.024	0.031	0.043	0.059
16.0	0.013	0.028	0.037	0.050	0.065
20.0	0.012	0.026	0.035	0.047	0.060

A液0.5mlを加えたのち吸光度測定時の終末濃度がそれぞれの濃度によるようにFe(III)液を加え、次いで吸光度測定時の終末濃度が8μMになるようにFe(II)液を加え、さらに水を加えて総量2.5mlとした。これをA'液とする。前述のB液4mlにA'液1mlを加え総量5mlとし、すばやく混和し、OD測定を開始した。

(結果) Fe(III)濃度と8μMFe(II)のODの関係を表4に示す。この0.5分値と15分値を図4に示す。Fe(III)存在下でも一定濃度のFe(II)に対するODは一定の値を示し、Fe(III)存在下の定量が可能なが示された。

実験5：前記実験群の各溶液の蒸留水に対する吸光曲線を図5に示す。

図5には、1：Fe(II)定量試薬のみ、2：Fe(II)にて発色させたもの(実験1)、3：Fe(II)定

量試薬にTCA液を加えたもの(実験2)、4：TCA存在下でFe(II)にて発色させたもの(実験2)の吸収曲線を示した。

定量試薬吸収曲線は420nmにピークがみられ、

Table 4 Change of absorbancy in the solution after mix of Fe⁺⁺ (8μM) with various concentrations of Fe⁺⁺⁺.

Conc. of Fe ⁺⁺⁺ (x10 ⁻⁶ M)	OD at 752 nm				
	min-0.5	min-15	min-30	hour-1	hour-3
0	0.266	0.267	0.265	0.259	0.243
1.6	0.254	0.259	0.258	0.256	0.239
3.2	0.260	0.260	0.262	0.261	0.246
4.8	0.260	0.261	0.258	0.251	0.225
6.4	0.251	0.257	0.258	0.257	0.245
8.0	0.255	0.261	0.261	0.261	0.245
12.0	0.266	0.269	0.269	0.266	0.248
16.0	0.249	0.254	0.253	0.248	0.224
20.0	0.257	0.261	0.262	0.259	0.240

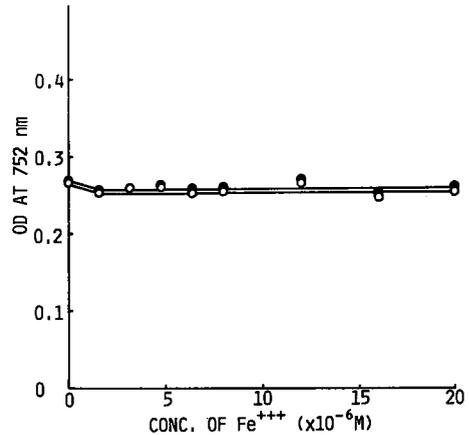


Fig. 4 Working curve obtained at 0.5 (○—○) and at 15 (●—●) minutes after mix of Fe⁺⁺ (8μM) with various concentrations of Fe⁺⁺⁺.

このピークも鉄存在下では増加する。Nitroso-PSAPとFe(II)の錯体によって示されるならかな752nm前後のピークは、Nitroso-PSAP試薬のみではTCAの有無にかかわらず認められない。分子吸光係数の低下のみらたTCA存在下の752nmのピークについてshiftはみられずTCA存在下の吸光曲線の変化は認め得なかった。

考 察

従来、溶液中の鉄濃度を測定する方法は、種

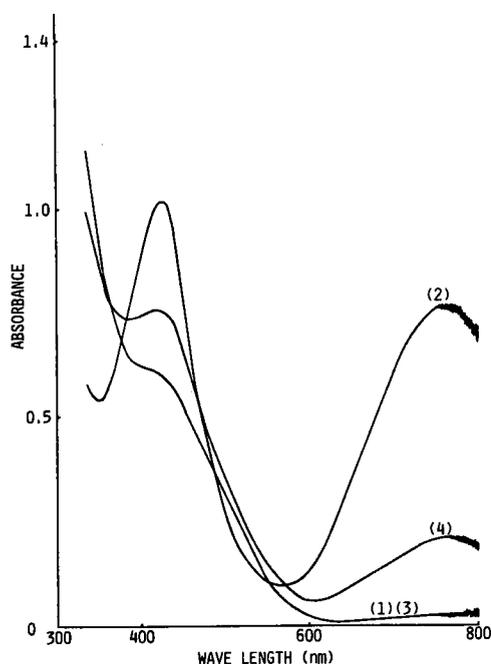


Fig. 5 Absorption spectra of Nitroso-PSAP and iron complexes (1): Nitroso-PSAP (2): Nitroso-PSAP-Fe(II) complex (3): Nitroso-PSAP in TCA solution (4): Nitroso-PSAP-Fe(II) complex in TCA solution

lag が延長する^{11,13}。又、Fe(III)の共存において反応の変化(lagの短縮)が認められているが^{24,25}そのメカニズムについては不明の点が多い。そこで著者は、ミトコンドリアのFe(II)誘導による脂質過酸化反応の解析の一環として、反応開始におけるlagの状態と、反応液中のFe(II)濃度の変化とを比較検討する目的のため還元剤を使用せずに Nitroso-PSAPを用いて反応液中のFe(II)のみが定量可能か否かについて検討を行なった。

Nitroso-PSAP・Fe(II)錯化合物の吸収波長は752 nm 前後になだらかなピークとしてみられるがその吸収度測定を行なって Fe(II)の定量を試みた。その定量に還元剤を使用したときその添加順序を本実験の如く施行すると混合直後から吸光度の変化、即ち退色が徐々にはじまり、経時的に進行し、その程度は Fe(II)が高濃度になるほどその割合は大きかったが表1-aに示す如く低濃度においては反応混合後3時間でもその退色度は小さい。Fe(II)の検量線を混合直後0.5分値でグラフにすると図1の如く実験濃度範囲内では直線の検量線が得られ、その分子吸収係数を求めると 4.2×10^4 であり、この値は Nitro-

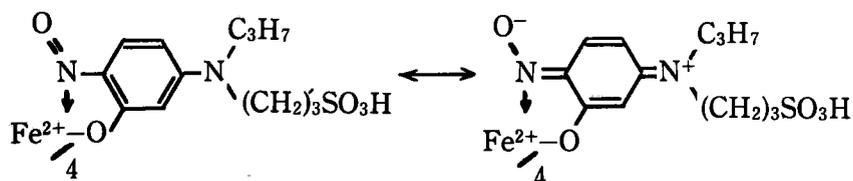


Fig. 6 Resonance structure of Fe(II) complex of Nitroso-PSAP

種報告されているか^{21,22}、その比色定量法^{21,22,23}は発色剤が Fe(II)や Fe(III)と反応し錯化合物を形成する性質を利用している。そのため Fe(III)を還元剤を用いて Fe(II)に還元し、既存の Fe(II)と同時に定量するものが多い²³。著者が本実験で用いた Nitroso-PSAP は Fe(II)の高感度かつ選択的な比色試薬の中でも水溶性の高いものとして開発されたが¹⁷、通常の定量法では還元剤を用いている^{18,19}。一方、ミトコンドリアのFe(II)誘導による脂質過酸化反応においては、Fe(II)添加後 lag (誘導期) がみられ^{11,13,15,16}、その反応の開始は濃度に依存し、高濃度 Fe(II)で

so-PSAP 開発者の報告¹⁹と一致している。本実験では、還元剤として塩酸ヒドロキシルアミンを使用した。堀口等は還元剤にアスコルビン酸を使用し、24時間後でも退色はみられないと報告している¹⁹。

一方、還元剤を使用しない場合には表1-bの如く錯体の発色の割合は時間の経過に伴いその退色度が著しい。発色調製液と Fe(II)を含む液の混合後初期15分値までは発色の進行がみられるもののその量は少なかったが、その後著しい退色が観察された。特に Fe(II)が高濃度の場合退色は著明で、 $20 \mu\text{M}$ の時、3時間後には約

半分に退色した。しかし、混合直後の検量線は測定濃度範囲内で還元剤添加のものと変わらず、したがって分子吸光係数は 4.2×10^4 が得られた。

還元剤の有無にかかわらず、その吸光度変化がみられることは Nitroso-PSAP-Fe(III) の化学的安定度起因するものと考えられる。ニトロソ化合物と金属イオンの錯化合物には図6の様な構造が考えられており¹⁸⁾、使用する還元剤の種類により錯化合物のとり得る構造が異なることが考えられるが、松原²⁶⁾によると Bath ophenanthroline 等の発色剤を用いた場合、還元剤が使用されていなかったり、還元力が不足している時には、発色剤を加えることにより Fe(III) の還元が進行し、時間の経過とともに発色量が増加するため充分な量の還元剤が必要であるという。Fe(III) による発色の増加は本実験でも示された。また、岡等²¹⁾の報告によれば Fe(II) 液のニトロソ R 塩での発色は時間とともに吸光度に変化がみられ、これは、Fe(II)-ニトロソ R 塩錯化合物に組成が 1 : 2 : 1 : 3 のものがあり、光線や加温によりあまり安定でない 1 : 2 化合物、準安定な 1 : 3 化合物、安定な 1 : 4 化合物へと変化するためと考えられている²¹⁾。

いずれにせよ本実験においては、発色直後は溶液中の Fe(II) 濃度と Fe(II)-Nitroso-PSAP 錯化合物による発色量との間には、還元剤の有無にかかわらず使用した濃度範囲内では直線性がみられ、その分子吸光係数は 4.2×10^4 であり、還元剤なしでも混合直後では Fe(II) の比色定量に Nitroso-PSAP が使用に耐えうることが明らかである。

次いで脂質過酸化反応液中の Fe(II) の定量が可能か否かを検討した。脂質過酸化反応の時間的経過を実験する際、その反応を停止するため TCA を用いる¹¹⁾。各種の Fe(II) 濃度を TCA に加えたものを Nitroso-PSAP 発色反応液と混合し、吸光度変化を追った時、TCA 無添加の場合と同様の退色がみられたが、混合直後の検量線は実験に用いた濃度範囲内では直線性が得られた。しかし、Nitroso-PSAP-Fe(II) 錯体の分子吸光係数値は TCA 存在下では、 3.14×10^4 と計算され凡そ 25% 低値が得られた。

松原は²⁶⁾、Fe(II) 液に TCA を加えた場合、両

者は結合し発色をおこすが、この時の発色は淡く、Fe 定量発色に要する最少必要量の実験から Fe(II)-TCA 錯化合物は無視し得ると報告している。一方、堀口等¹⁹⁾によると、Nitroso-PSAP の Fe(II) との反応発色における至適 pH は 5.5 ~ 9.5 である。一方、脂質過酸化反応液は停止液として TCA を用いるため反応停止時強酸性になっており、これを中和するため Nitroso-PSAP 液中に NaOH 液を加えた。Nitroso-PSAP はアルカリで徐々に分解し¹⁸⁾、Fe(II) はアルカリでは不安定で Fe(III) に変化し水酸化鉄を形成する。したがって実験 2.3.4.5. では、試薬を加える順序が変わると Fe(II)-Nitroso-PSAP 錯体の吸光度と Fe(II) 濃度の間に直線関係がみられない場合もあり、再現性も安定しない。しかしこの場合にも 24 時間後には吸光度は低下するものの発色が安定し直線関係が得られた。従って本実験では、pH の影響をさげ、水酸化鉄形成による Fe(II) 濃度と Fe(II)-Nitroso-PSAP 錯体の直線関係阻害をさけるため、試薬は実験直前に調整し、試薬を加える順序も方法に述べたの如く一定にして行なった。本実験においては、TCA を加えても発色の 752nm 前後の吸光曲線のピークには変化はみられず、Fe(II) 濃度と Fe(II)-Nitroso-PSAP 錯体との間に前述の如く直線性が得られ、TCA 存在下でも Fe(II) の定量は可能であると考えた。しかし、TCA 存在下の分子吸光係数の低下の原因は更に究明を要する。

次に還元剤が存在しない場合に Fe(II) 誘導脂質過酸化反応は Fe(II) から Fe(III) への変化によって反応が開始されるとされている²⁰⁾。そこで、上記条件下での Fe(III) と Nitroso-PSAP の結合発色度を調べたところ、混合発色開始後ではごく僅かの発色がみられ、その後時間的経過とともに増加した。Nitroso-PSAP 自体に弱い還元能力があり¹⁷⁾、その影響が考えられるが、Fe(III) 濃度と発色量の関係は表 3 の如く Fe(III) の増加にもかかわらず吸光度はわずかに上昇しているのみで、Fe(III) は発色開始直後では Fe(II) の発色に対して無視得ると結論した。この点を確める目的で Fe(III) 存在下で Fe(II) の定量か否かについて検討した。その結果は、表 4 の如く Fe(III) の濃度に関係なく Nitroso-PSAP-Fe(II) によ

る発色の吸光度は一定で、短時間内の時間経過に伴う吸光度変化はわずかであった。

したがって Fe(III) が共存する場合には、前述の Fe(II) のみの退色ならびに Fe(III) のみの吸光度の増加と合わせて、少なくとも発色調整試薬との混合直後に比色定量することが要求される。

結 論

鉄定量に用いられる Nitrosoaminophenol 誘導体のうち、水溶性高感度比色試薬である Nitroso-PSAP を用いて Fe(II) 誘導の脂質過酸化反応液中の Fe(II) の選択的定量に関する実験を行ない以下の結果を得た。

1) 還元剤を使用しなくても Fe(II) の定量が

可能であり、分子吸収係数として 4.2×10^4 値を得た。

2) 脂質過酸化反応停止液である TCA の存在下でも一定の条件下では Fe(II) の定量が可能であり、分子吸収係数として 3.14×10^4 値を得た。

3) Fe(III) 共存下でも、その影響をうけることなく、Fe(II) の選択的定量が可能である。

謝 辞

稿を終るに当たり、御懇切なる御指導御校閲を頂いた山本道夫教授、並びに直接実験の御指導を頂いた山本剛禧博士、及び放射線医学教室の各位に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. Packey, L., Deamer, D.W. and Heath, R.L.: Regulation and deterioration of structure in membrane. *Adv. Geront. Res.* 2, 77—120, 1967.
2. Wills, E.D. and Wilkinson, A.E.: The effect of irradiation on lipid peroxide formation in subcellular fractions. *Radiat. Res.* 31, 732—747, 1967.
3. Horgan, V.J., Philpot, J.S., Porter, B.W. and Roddyn, D.S.: Toxicity of autoxidized squalens and linoleic acid, and of simpler peroxides, in relation to toxicity of radiation, *Biochem. J.* 67, 551—558, 1957.
4. Cortes, R. and Privett, O.S.: Toxicity of fatty ozonides and peroxides. *Lipids* 7, 715—721, 1972.
5. Wills, E.D.: Effect of unsaturated fatty acids and their peroxides on enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 7, 7—16, 1961.
6. 渡辺節生: ラット臓器の脂質過酸化反応におよぼす放射線照射の影響. 岡山医学会雑誌 85, 129—136, 1973.
7. 若林弘: X線全身照射のラット肝ミトコンドリアにおける脂質過酸化反応に関する研究. 岡山医学会雑誌 88, 185—196, 1976.
8. Barber, A.A. and Bernheim, F.: Lipid peroxidation; its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Adv. Geront. Res.* 2, 355—403, 1967.
9. Harman, D.: Free radical theory of aging: Effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF, mice. *J. Gerontol.* 23, 476—482, 1968.
10. Packer, L. and Smith, J.R.: Extension of the lifespan of cultured normal human diploid cells by vitamin E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4763—4767, 1974.
11. Hunter, F.E.Jr., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinstein, J. and Scott, A.: Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* 238, 828—835, 1963.
12. Mcknight, R.C., Hunter, F.E.Jr. and Ochlert, W.H.: Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* 240, 3439—3446, 1965.
13. Yamamoto, G., Tanabe, M., Wakabayashi, H., Hashimoto, G. and Yamamoto, M.: Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria. I. Effect of inorganic phosphate. *Acta Med. Okayama* 28, 299—310, 1974.

14. 後藤信行：腹水肝癌細胞 (AH-130) の脂質過酸化反応欠損とその機構。岡山医学会雑誌 **82**, 447—458, 1970.
15. Yamamoto, G., Tanabe, M., Hashimoto, G. and Yamamoto, M.: Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria. II. Relationship to incubation temperature. *Acta Med. Okayama* **30**, 291—301, 1965.
16. Utsumi, K., Yamamoto, G. and Inaba, K.: Failure of Fe^{2+} induced lipid peroxidation and swelling in the mitochondria isolated from ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 368—371, 1973.
17. 桐柴恭二, 本水昌二：コバルトの新しい比色試薬。分析化学 **22**, 1079—1087, 1973.
18. 斉藤幹彦, 堀口大吉, 喜納兼勇：新親水溶性ニトロソフェノール誘導体による微量鉄(II)の吸光光度定量。分析化学 **30**, 635—639, 1981.
19. 堀口大吉, 喜納兼勇, 斉藤幹彦：ニトロソフェノール誘導体の合成及び鉄(II)イオンの反応。日本分析化学会第29年会講演会要旨集 (3B21), 528, 1980.
20. 本城市次郎, 崔英哲：基礎放射線生物学, 南江堂, 東京, p201, 1966.
21. 日本化学会編：実験化学講座15, 分析化学(下), 丸善, 東京, p263, 1958.
22. 無機応用比色分析編集委員会編：無機応用比色分析 2, 共立出版KK, 1974.
23. 山村雄一：医化学実験法講座 3B, 中山書店, 東京, p376, 1973.
24. Wills, E.D.: Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acid. *Biochim. Biophys. Acta* **5510**, 238—251, 1964.
25. Fong, K.L., McCay, P.B. and Poyer, J.L.: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **248**, 7792—7797, 1973.
26. 松原高賢：生物学的材料特に血清並びに血液の鉄の定量法に関する研究。日本血液学会雑誌 **24**, 434—452, 1961.

Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation**Part I****Quantitative analysis of ferrous ion in
a system of ferrous ion-induced lipid peroxidation****Keizi HASHIMOTO****Department of Radiation Medicine, Okayama University****Medical School, Okayama, Japan****(Director: Prof. M. Yamamoto)**

The 2-nitroso-(N-propyl-N-sulfopropylamino)phenol(Nitroso-PSAP), one of the water-soluble derivatives of nitrosoaminophenol, is a very sensitive reagent for the spectrophotometric determination of Fe(II). Using Nitroso-PSAP reagent, the author investigated the conditions for determining Fe(II) quantitatively and selectively the system of Fe(II)-induced lipid peroxidation, and obtained the following results.

1) Fe(II) could be measured quantitatively without reductant. The Fe(II) complex had a molar absorptivity of $4.5 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 756 nm.

2) Fe(II) could be measured quantitatively in the TCA solution removed from the reaction medium for lipid peroxidation. The Fe(II) complex had a molar absorptivity of $3.14 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ at 756 nm.

3) Fe(II) could be measured quantitatively and selectively under conditions involving a mixture of Fe(II).