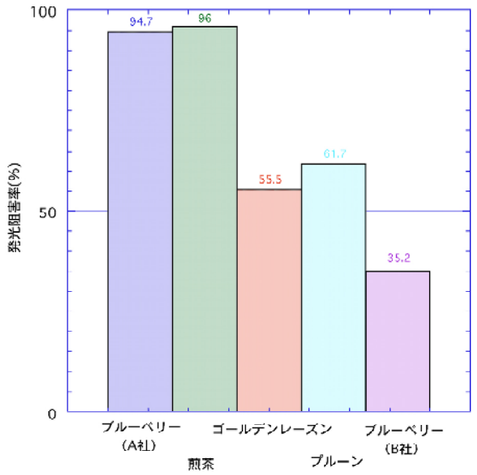
その他の抗酸化能測定例
ドライフルーツの抗酸化能(ベリー類)

ベリー類にはアントシアニンなどの色素が多く含まれています。 アントシアニンは抗酸化能を持つといわれています。そこでいろんなベリーの抗酸化能をMPECを用いて発光測定により測定・比較しました。

抗酸化能の評価はスーパーオキシド生成系 （ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼの系など） において、 素材の添加/未添加の発光量を計測します （AB-2270のようなルミノメータを使用）。 発光の阻害率が大きいほど、 抗酸化能が高いことが分かります。

右のグラフは、 O_2^-生成系を用いた、 ドライフルーツ(ベリー類)の抗酸化能測定(発光阻害率%)です。 グラフのバーが高いほど抗酸化能が高いことを示しています。



$0.1=10^{-1}$	deci	d	one	tenth of
$0.01=10^{-2}$	centi	c	one	hundredth of
$0.001=10^{-3}$	milli	m	one	thousandth of
$0.000\,001=10^{-6}$	micro	μ	one	millionth of
$0.000\,000\,001=10^{-9}$	nano	n	one	billionth of
$0.000\,000\,000\,001=10^{-12}$	pico	p	one	trillionth of
$0.000\,000\,000\,000\,001=10^{-15}$	femto	f	one	quadrillionth of
$0.000\,000\,000\,000\,000\,001=10^{-18}$	ATTO	a	one	quintillionth of

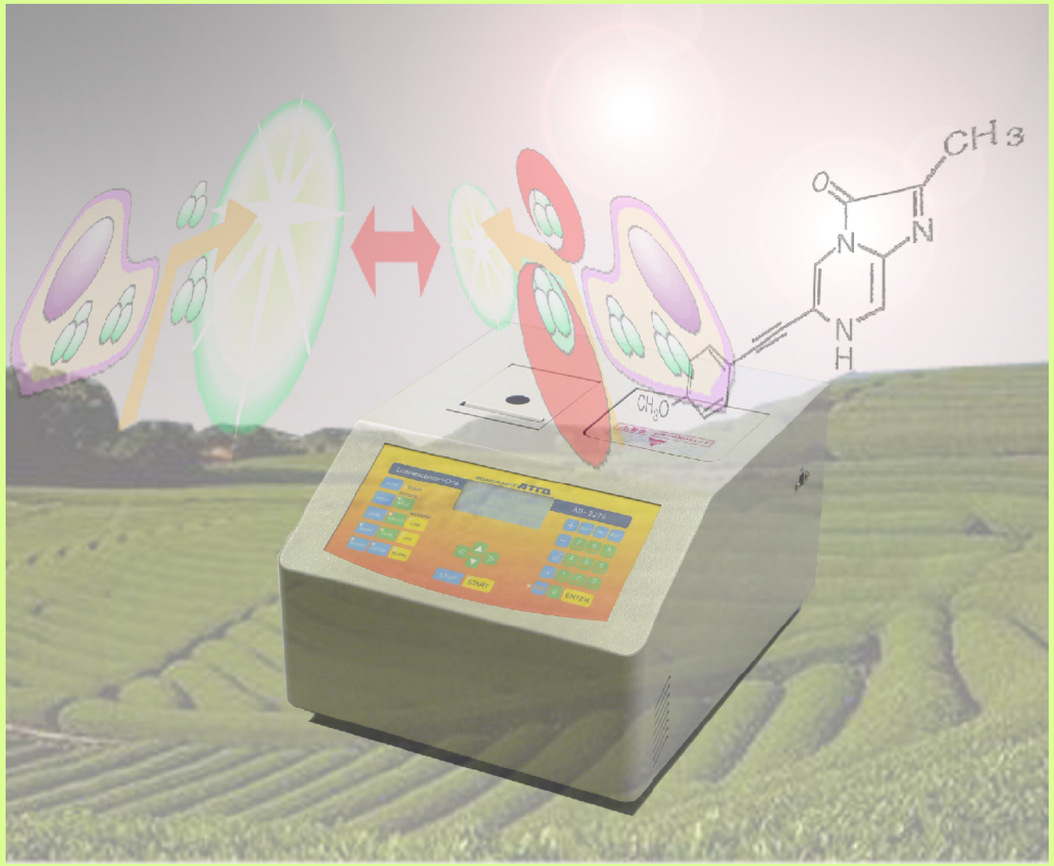
アトー株式会社
生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品
●ペリスタポンプ
●クロマトグラフ
●電気泳動分析機器
●DNA分析機器
●画像分析システム
●発光分析装置
●バイオ研究機器
●医療分析装置

■本　社 〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-32 ☎(03)3814-4861(代表) 📠(03)3814-4868
◆技術サービス ☎(03)3814-4794(代表) 📠(03)3814-4856
■技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) 📠(03)5818-7563
（東京都許可 医療機器製造業）
■大阪支店 〒530-0054 大阪市北区南森町2-1-7 ☎(06)6365-7121(代表) 📠(06)6365-7125

■URL http://www.atto.co.jp/ ■本 社 e-mail: info@atto.co.jp ■大阪支店 e-mail: osaka@atto.co.jp

ATTO Technical Manual



ATTO発光試薬「MPEC」を用いた

抗酸化能測定のコツ

ATTO Corporation
1-5-32 Yushima Bunkyo-ku Tokyo 〒 113-0034
TEL 03-3814-4861 FAX 03-3814-4868
URL http://www.atto.co.jp e-mail info@atto.co.jp

ATTO Corporation（Osaka）
2-1-7 Minami-Morimachi Kita-ku Osaka City 〒 530-0054
TEL 06-6365-7121 FAX 06-6365-7125

はじめに

生物は、酸素を利用して活動している限り生体内における酸素障害の危険性を取り除くことはできません。例えば最近話題の臓器移植などの場合、取り出した臓器が一時的な低酸素状態となり、再び正常に機能し始める時に、高酸素状態になることによって障害が起こります（虚血 / 再灌流）。これは、高酸素状態により酸素ラジカルが生成され、組織を攻撃するためといわれています。また、発ガンのメカニズムにおいても、酸素ラジカルによる遺伝子損傷も関与しているとされています。障害の原因となる酸素ラジカルにはスーパーオキシドアニオンラジカル（O_2^-）、一重項酸素（$^1O_2$）、過酸化水素（H_2O_2）およびヒドロキシルラジカル（・OH）があります。近年はこれらの酸素ラジカルを消去する能力、つまり「**抗酸化力**」を持つ物質の探索が注目されています。

ここでは酸素ラジカルの中のスーパーオキシドアニオンラジカル（以下 O_2^-）を消去する物質の能力：「**抗酸化能**」を化学発光を用いて測定する方法をご紹介します。

測定原理

抗酸化能は、O_2^- 生成系と使った基準となる発光反応（発光基質の酸化により発生：ブランク）と、測定対象物質存在下における発光阻害（ブランクと比べた発光量減少度）を確認することにより、測定対象物質の抗酸化能の測定（発光基質の測定対象物質による酸化阻害率）が可能となります。（図 1）

実際の測定では、O_2^- 生成系に Hypoxanthine（ヒポキサンチン）－ Xanthine oxidase（キサンチンオキシダーゼ）の系をブランクとして使用します。生成した O_2^- と発光基質との反応による化学発光をルミノメータにて測定します。

ブランク（目的物質を添加しない状態）の発光積算値（a）と、測定対象物質（サンプル）を添加した場合の発光積算値（b）を測定し、次の式から阻害率を算出します。

阻害率(%)＝ 1-(b)/(a)× 100

阻害率が大きい程、目的物質の抗酸化力が高いということが推測できます。

試薬の調製

測定に用いる試薬の調製法です。

● KH_2PO_4 Buffer

組成：0.1M KH_2PO_4,0.05mM EDTA,NaOH,pH7.5
（100mL 調製する場合）

KH_2PO_4(FW136.09)	1.3609g
EDTA･2Na(FW372.24)	0.0019g

蒸留水約 90mL に溶かし、NaOH で pH7. 5 に調整後、100mL にメスアップします。

● Hypoxanthine 溶液

組成：3.6mM Hypoxanthine/KH_2PO_4
（50mL 調製する場合）

KH_2PO_4(FW136.09)	0.6805g
EDTA･2Na(FW372.24)	0.001g
Hypoxanthine(FW136.1)	0.0245g

Hypoxanthine はアルカリでないと溶解しないため適当な NaOH 溶液（例えば NaOH を 2 粒程度を蒸留水に溶解したもの）であらかじめ溶解しておきます。
Hypoxanthine が溶解したら蒸留水を加え、50mL にメスアップします。
使用時は KH_2PO_4 Buffer で 5 倍希釈・室温に戻します。
（例）
Hypoxanthine 溶液 200 μ L　KH_2PO_4 Buffer 800 μ L

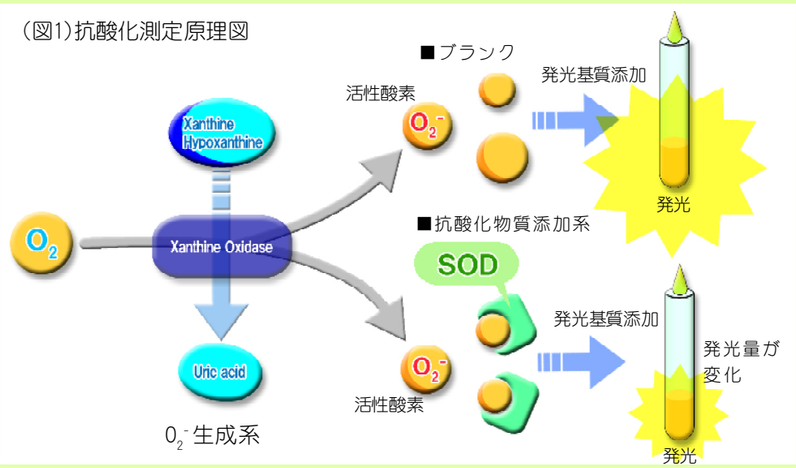
● Xanthine Oxidase 溶液

100 μ g/mL（約 0.1unit）に調製します。ここでは Sigma 社 Xanthin Oxidase（品番 X-4500）を用いています。
（容器表記） 20mgProt./mL 1unit/mg 1mL の場合
（例） 容器から 5 μ L　KH_2PO_4 Buffer 995 μ L

● MPEC（発光試薬）

購入後、 バイアルにアルコールを 5mL 入れ、 3.6mM に調製、 ストック溶液とします。使用時に蒸留水にて希釈し、300 μ M に調製します。
（例）（MPEC ストック溶液 125 μ L）＋（蒸留水 1375 μ L）
※ポイント：MPEC が溶けにくい場合は、他のバイアルに移し、アルコール量を増やして溶解してください（共洗い必要）。

（図1）抗酸化測定原理図



基準となる
発光強度

強度差が小さい時
→抗酸化力弱

強度差が大きい時
→抗酸化力強

実際の測定例

すでに抗酸化能が知られているエピガロカテキンガレート（EGCG）およびクロロゲン酸（Chl）の抗酸化能測定を AB-2270 型ルミネッセンサー Octa を用いて行いました。

測定試料の調製

EGCG、Chl は、 蒸留水を用いて 10mM に調製し、 さらに希釈して用いました。

装置（AB-2270 ルミネッセンサー Octa）の設定

ここでは BASIC モードで行いました設定は以下の通りです。

① Tubetype 55mm
② Multicolor OFF
③ P-Int 50 μ L
（内蔵ポンプでの分注量、 ここでは Hypoxanthin 溶液）
④ Analysis Time　60 秒
⑤ Result Format　Integral（積算表示）
⑥ Integral Time　0 ～ 60 秒 （全時間積算）
⑦ Print Kinetic　OFF（数字のみの印字）

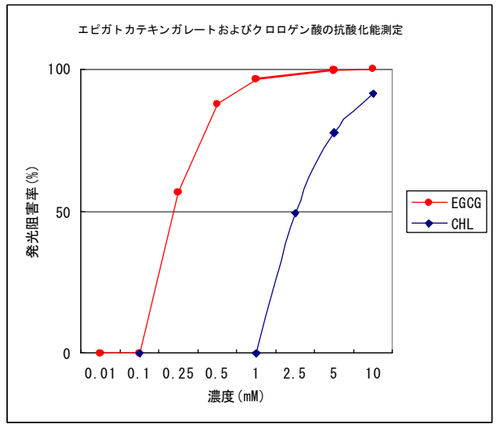
測定

（a）試料（EGCG,Chl）を添加しない状態の測定
①試験管チューブに MPEC を 10 μ L 分注します
② Xanthine Oxidase 溶液を 60 μ L 分注します
③ KH_2PO_4 Buffer を 180 μ L 分注します
④装置にセットし内蔵ポンプを用いて Hypoxanthine 溶液を 50 μ L 分注し 1 分間の発光積算値を測定します。

（b）試料（EGCG,Chl）を添加した状態の測定
①試験管チューブに MPEC を 10 μ L 分注します
②試料を 10 μ L 分注します
③ Xanthine Oxidase 溶液を 60 μ L 分注します
④ KH_2PO_4 Buffer を 170 μ L 分注します
⑤装置にセットし内蔵ポンプを用いて Hypoxanthine 溶液を 50 μ L 分注し 1 分間の発光積算値を測定します。

測定結果

下図（図 2）の通り、EGCG および Chl の濃度依存的な発光阻害を確認することができました。

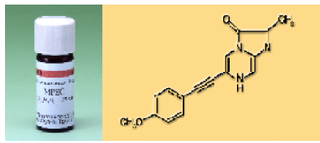


（図 2）測定結果

関連製品の紹介

スーパーオキシド検出用の発光試薬

■ MPEC（エムペック）



物質名称:2- メチル -6 -p- メトキシフェニルエチニルイミダゾピラジノン
MW:279.1008

この試薬は、 スーパーオキシド （O_2^-）と反応して発光します。アトールミネッセンサーシリーズと合わせてご使用ください。

型式	名称	価格
AB-2950	MPEC（エムペック）	5,000

■ CLETA-S（クレタ-S）

CLETA-S はスーパーオキシド （O_2^-）消去能を測定するキットです。 試薬調整なしで測定可能です。

型式	名称	価格
AB-2970	CLETA-S（クレタ-S）	¥20,000

ルミノメータシリーズ

■ルミネッセンサー Octa(AB-2270)

試験管（φ 12mm × 55mm） 内にサンプルをいれ、 一本ずつ測定します。 測定結果はすぐにプリントアウトすることが可能です。

型式	名称	価格
AB-2270	ルミネッセンサーOcta（オクタ）	¥1,200,000

■フェリオス(AB-2350)

マイクロプレート（96/384）内のサンプルを測定します。多検体の発光検出を効率的に行うことが可能です。 インキュベーション機能などもありますので、 発光試薬にあわせた測定条件を設定することが可能です。 条件入力等はパーソナルコンピュータで行います。

型式	名称	価格
AB-2350	Phelios（フェリオス）	¥2,900,000

価格にはパーソナルコンピューターは含まれません

ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY