

はじめに

近年、体内の抗酸化力低下が様々な疾患の発症や健康障害に関与していることが示唆されており、抗酸化活性を有する食品（抗酸化食品）への期待が増えています。島村ら¹⁾は安定ラジカルであるDPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)を用いた抗酸化活性評価法が、測定施設間差の少ない方法であることを報告しています。DPPH Antioxidant Assay Kitは上記測定法に準拠した抗酸化活性を簡便に測定できる製品です。本キットでは測定対象の抗酸化活性を抗酸化物質 Trolox を基準とした Trolox 等価活性 (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity : TEAC) として測定します。本キットに含まれるDPPHおよびTroloxはエタノールに溶かすだけで使用でき、煩雑な秤量操作や吸光度調整が不要です。また、96穴マイクロプレート対応ですので、多検体の測定が可能です。

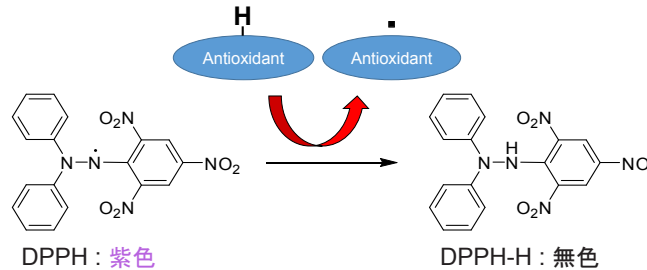


図 1. DPPH Antioxidant Assay Kit 測定原理

内容

	100 tests	500 tests
DPPH Reagent	x 1	x 5
Trolox Standard	1 mg x 1	1 mg x 5
Assay Buffer	11 mL x 1	55 mL x 1

保存条件

- 0 - 5 °Cで保存してください。

必要なもの (キット以外)

- エタノール (99.5%)
- プレートリーダー (517 nm 付近)
- 96 穴 マイクロプレート
- 10 mL メスフラスコ
- インキュベーター (25°C)
- マルチチャンネルピペット
- マイクロピペット
- 超音波洗浄機

使用上のご注意

- ・キット中の試薬は室温に戻してからご使用ください。
- ・DPPH Reagent 及び Trolox Standard は各 1 本につき 100 tests 相当量になります。
- ・輸送中の振動等により、内容物がアシストチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、ご注意ください。
- ・正確な測定値を得るために、一つの測定試料につき複数 (n=3 以上) のウェルをご使用ください。

溶液調製

DPPH working solution の調製

1. DPPH Reagent 1 本に 1 mL 程度のエタノールを加え、超音波で 60 秒処理する。
2. 調製した溶液全量を 10 mL メスフラスコに移す。
3. チューブに再度 1 mL 程度のエタノールを加え、超音波で 60 秒処理する。
4. 右図例①のようにエタノール溶液に着色が見られる際には、2 および 3 の操作を再度行い、例②のようにチューブ内のエタノール溶液が着色しなくなるまで繰り返す。
5. 溶液を移した 10 mL メスフラスコにエタノールを加え 10 mL に定容する。

- * DPPH は溶けづらいため、超音波処理を推奨しています。
- * 溶け残りが測定に影響を与える恐れがあります。必ずチューブ内に溶け残りが無いことを確認してください。
- * DPPH working solution は保存できません。その日のうちにお使い下さい。

Trolox Standard solution の調製

1. Trolox Standard 1 本に 1 mL 程度のエタノールを加えボルテックスや超音波を用いて内容を完全に溶解させる。
 2. 1 で調製した溶液全量を 10 mL メスフラスコに移し (適宜洗いこみを行う)、エタノールで 10 mL に定容する。
 3. 2 で調製した 100 µg/mL Trolox Standard solution を 80, 60, 40, 0 µg/mL の濃度になるようにエタノールで希釈する。
- * Trolox Standard solution は保存できません。その日のうちにお使い下さい。

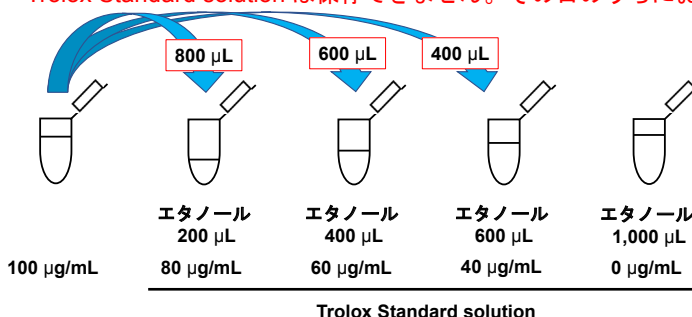
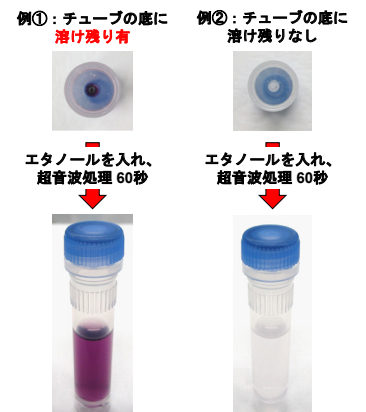


図 2. Trolox Standard solution 希釈調製例



- ・本キットでは Trolox およびサンプルが DPPH ラジカルを 50% 消去する濃度（50% 阻害濃度：IC₅₀）を基に TEAC を算出します。
- ・測定サンプルの IC₅₀ を算出する際には必ずプロットした回帰線（X 軸：サンプル濃度、Y 軸：ラジカル消去率）に直線性がある最適濃度域で行う必要があります。
- ・はじめて測定されるサンプルの場合は IC₅₀ を算出するための最適濃度域予測のため必ず以下をご検討下さい

表 1. 各ウェルに加える溶液

	サンプル	Blank 1	Blank 2
サンプル溶液	20 μL	-	-
サンプル溶媒	-	20 μL	20 μL
エタノール	-	-	100 μL
Assay Buffer	80 μL	80 μL	80 μL
DPPH working solution	100 μL	100 μL	-

	1	2	3	4	5	6
A	Sample x 1/10 ⁷	Blank 1				
B		1/10 ⁶	Blank 2			
C		1/10 ⁵				
D		1/10 ⁴				
E		1/10 ³				
F		1/10 ²				
G		1/10				
H	Sample					

図 3. プレートレイアウト例（n=3 の場合）

- * Blank 1：サンプルの全発色、Blank 2：サンプル溶媒ブランク
- * サンプルに着色が見られる場合には別途サンプルブランクを希釈ごとにご準備ください。
サンプルブランク組成：サンプル 20 μL + Assay Buffer 80 μL + エタノール 100 μL

最適濃度域の確認

1. サンプルの最高濃度を基準に 10 倍希釈を繰り返し、4 種類以上の広い濃度域でサンプルを準備する。
2. 調製したサンプルを各ウェルに 20 μL ずつ入れる。
3. Blank 1 および Blank 2 のウェルにサンプルの抽出・希釈に使用した溶媒を 20 μL ずつ入れる。
4. 各ウェルに Assay Buffer 80 μL を加える。
5. Blank 2 のウェルにエタノール 100 μL を加え、ピペティングまたはプレートミキサーでよく混ぜる。
6. サンプルおよび Blank 1 のウェルに DPPH working solution 100 μL を加え、ピペティングまたはプレートミキサーでよく混ぜる。
- * DPPH working solution を加えるとすぐに反応が進行します。ウェル間のタイムラグをできるだけ少なくするためにマルチチャンネルピペットの使用を推奨しています。
- * DPPH working solution は後述する抗酸化活性測定でも使用します。マルチチャンネルピペット用のリザーバーを使用される際には、揮発による濃度変化を避けるため必要量のみ DPPH working solution を入れてください。
7. プレートに 25 °C、暗所で 30 分間インキュベートする。
8. プレートリーダーで 517 nm 付近の吸光度を測定する。
* 517 nm の吸光度を測定できない場合は、500 nm 以上のできるだけ近い波長で測定してください。
9. 測定サンプルのラジカル消去率を下記の計算式により求める。

サンプルのラジカル消去率 (%) = (A_{CS}-A_S)/A_{CS} x 100

A_{CS}: Blank 1 - Blank 2
A_S: 測定サンプルの吸光度 - Blank 2 もしくはサンプルブランク（着色が見られる場合）

10. 横軸に測定サンプル濃度、縦軸にラジカル消去率をプロットし回帰線を算出する。
11. 求めた回帰線より測定サンプルのラジカル消去率 50% を含む最適濃度域を確認する。

実験例

抗酸化物質の最適濃度域の確認および IC₅₀ の算出

抗酸化物質である没食子酸の最適濃度域の確認を行った。

- ・まず、最高濃度 1000 μg/mL を基準とし、0.001 - 1000 μg/mL の濃度域で回帰線を算出した。
- ・得られた回帰線より 10 - 100 μg/mL の濃度域がラジカル消去率 50% を含むことが確認できたので、再度 100 μg/mL を基準として 5 - 100 μg/mL の濃度域で回帰線を算出し、IC₅₀ を求めた。

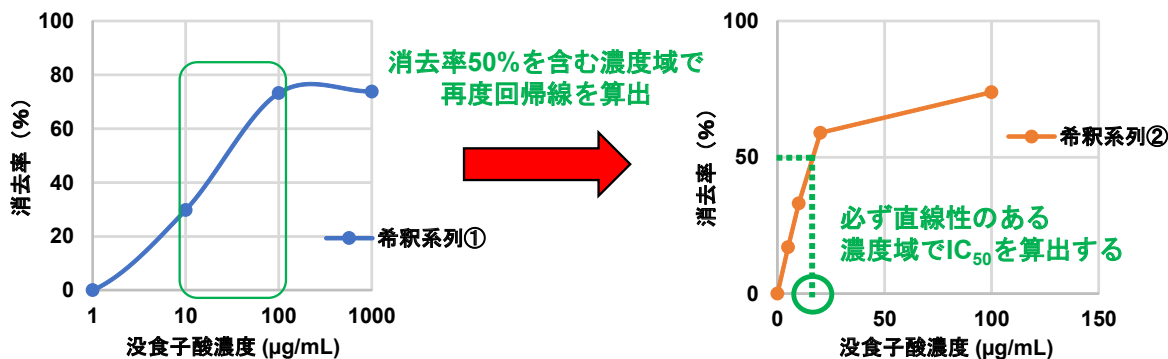


図 4. 没食子酸の検討例
希釈系列①：0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100, 1000 μg/mL 希釈系列②：5, 10, 20, 100 μg/mL

表 2. 各ウェルに加える溶液

	サンプル	Trolox standard	Blank 1	Blank 2	Blank 3
サンプル溶液	20 μL	-	-	-	-
サンプル溶媒	-	-	20 μL	20 μL	-
エタノール	-	-	-	100 μL	120 μL
Trolox Standard solution	-	20 μL	-	-	-
Assay Buffer	80 μL	80 μL	80 μL	80 μL	80 μL
DPPH working solution	100 μL	100 μL	100 μL	-	-

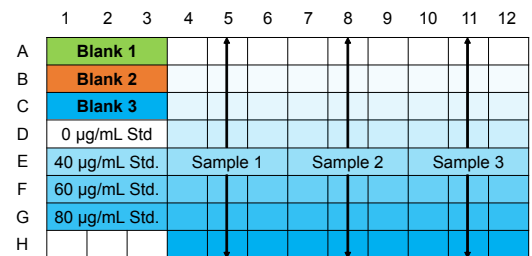


図 5. プレートレイアウト例 (n=3 の場合)

- * Blank 1: サンプルの全発色、Blank 2: サンプル溶媒ブランク、Blank 3: エタノールブランク
- * サンプルに着色が見られる場合には別途サンプルブランクを希釈ごとにご準備ください。
サンプルブランク組成: サンプル 20 μL + Assay Buffer 80 μL + エタノール 100 μL

(1) Trolox および測定サンプルのラジカル消去率の測定

1. 調製した 0, 40, 60, 80 μg/mL Trolox Standard solution を各ウェルに 20 μL ずつ入れる。
2. サンプル測定用の各ウェルに予備実験で得られた最適濃度域を基に 4 種類以上の異なる濃度に希釈したサンプル溶液を 20 μL ずつ入れる。
3. Blank 3 にエタノール 20 μL および Blank 1, Blank 2 にサンプルの抽出・希釈に使用した溶媒を 20 μL ずつ入れる。
4. 各ウェルに Assay Buffer 80 μL を加える。
5. Blank 2 および Blank 3 のウェルにエタノール 100 μL を加え、ピペティングまたはプレートミキサーでよく混ぜる。
6. Trolox, サンプルを入れたウェルおよび Blank 1 のウェルに DPPH working solution 100 μL を加え、ピペティングまたはプレートミキサーでよく混ぜる。
* DPPH working solution を加えるとすぐに反応が進行します。ウェル間のタイムラグをできるだけ少なくするためにマルチチャンネルピペットの使用を推奨しています。
7. プレートを 25 °C、暗所で 30 分間インキュベートする。
8. プレートリーダーで 517 nm 付近の吸光度を測定する。
* 517 nm の吸光度を測定できない場合は、500 nm 以上のできるだけ近い波長で測定してください。
9. Trolox および測定サンプルのラジカル消去率を下記の計算式により求める。

$$\text{Trolox のラジカル消去率 (\%)} = (A_C - A_R) / A_C \times 100$$

A_C: 0 μg/mL Std. の吸光度 - Blank 3
A_R: 80 ~ 40 μg/mL Std. の吸光度 - Blank 3

$$\text{サンプルのラジカル消去率 (\%)} = (A_{CS} - A_S) / A_{CS} \times 100$$

A_{CS}: Blank 1 - Blank 2
A_S: 測定サンプルの吸光度 - Blank 2 もしくはサンプルブランク (着色が見られる場合)

10. 横軸にそれぞれ Trolox 濃度および測定サンプル濃度、縦軸にラジカル消去率をプロットし回帰線を算出する。

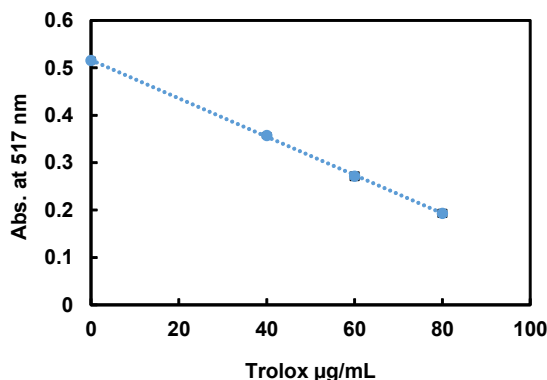


図 6. Trolox 処理による DPPH 吸光度変化

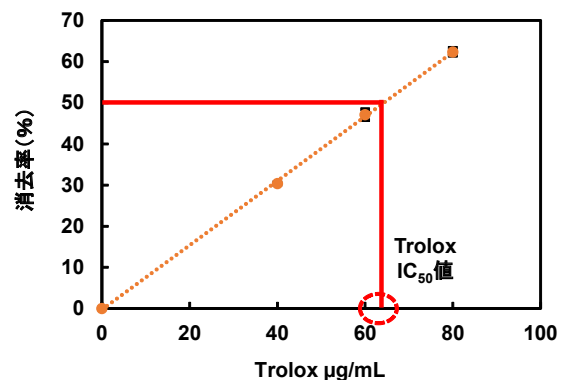


図 7. Trolox 処理によるラジカル消去率変化

(2) TEAC の算出

1. 試料の Trolox を基準とした抗酸化活性: TEAC を次式より求める。

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の IC}_{50} / \text{サンプルの IC}_{50}$$

参考文献

- 1) T. Shimamura et al., *Anal. Sci.*, 2014, 30, 717-721.

本製品は、高知大学農林海洋科学部 島村智子先生のご指導の下、製品化しました。

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
 熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202
 Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーダイヤル : 0120-489548
 フリーファックス : 0120-021557