

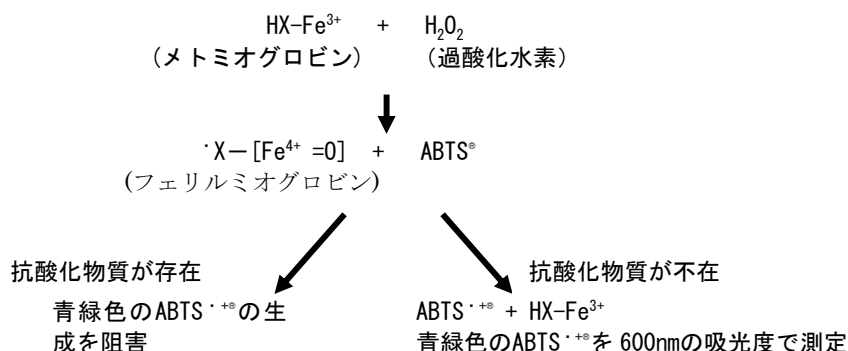
抗酸化能測定キット TAS (Total Antioxidant Status) キットQ&A

三洋貿易株式会社

【原理・一般】

◆ 抗酸化能を測定する TAS キットの原理は？

酸化触媒酵素ペルオキシダーゼ（メトミオグロビン）と過酸化水素 H_2O_2 によって、ABTS^{••}試薬[2, 2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)]がラジカル化されABTS^{••}が生成されます。このラジカルABTS^{••}は、安定的で青緑色をしており、600nmの吸光度で測定することが出来ます。検体中に抗酸化物質が含まれると、この青緑色のABTS^{••}の生成を阻害します。抗酸化物質の濃度に比例してこの青緑色の物質の生成が阻害されます。



◆ 各キットは何検体使用でき

	Product No.	マニュアル方式	オート方式
抗酸化能測定TASキット	NX2332	50 検体	250 検体
SOD 測定RANSODキット	SD125	55 検体	585 検体

オート方式はCobas Fara の仕様を元に算出しています。

◆ 各キットの保存条件は？

抗酸化能測定TASキット	+ 2 ~ 8 °C
SOD 測定RANSODキット	+ 2 ~ 8 °C

◆ 濁ったサンプルを測定できるのでしょうか？

TASキットは吸光度で抗酸化能を測定します。従って、一般的に濁ったサンプルは適しません。サンプルの前処理や希釈を工夫する必要があります。

◆ 抗酸化能をどのような単位で表わすのでしょうか？

TASキットでは、Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) をスタンダードとして使用しています。従って、表わされる抗酸化能はTrolox 等量ということになります。

◆ 測定できる抗酸化物質濃度は？

TASキットでは、0~2.5mmol/L Trolox 等量を希釈すること無しに測定できます。多くのサンプルで、希釈せずに測定することが出来ます。

◆ TASキットの感度は？

測定感度は、測定される抗酸化物質の種類によって変化します。何故なら、特定のサンプルに含まれるすべての抗酸化物質の抗酸化能をTASキットは測定するからです。しかしながら、製造元では感度下限を0.1mmol/Lと定義しています。

◆ 日常製品検査で使用されていますか？

TASキットは多くの国で、日常の製品検査で使用されています。例を挙げれば、スイス、オーストリア、インド、韓国などがあります。

◆ マイクロタイタープレートを使用して測定が出来ますか？

マルチチャンネルピペットを使用したサンプル添加方法では、列方向で添加の時間差が発生します。抗酸化反応では、反応時間が非常に重要なので、一般的にはマイクロタイタープレートの使用を勧めません。マイクロタイタープレートを使用する場合は、各ウェルのサンプル添加からOD値測定までの時間を同一にする必要があります。抗酸化反応は停止せず連続しているので、反応の停止点でOD値測定をすることは出来ません。

◆ アルコールはTASキットの測定を阻害しますか？

アルコールはTASキットの測定を阻害しません。また、アルコール自身は抗酸化反応を引き起こしません。アルコールは、測定される物質の抗酸化レベルに対して何ら影響を与えないので、水で溶けない物質に対する最も適した溶剤です。他の溶剤も使用することが出来ます。しかし、その溶剤自身が持ち合わせている反応が許容内であることを確認する為に、その溶剤自身をTASキットで測定する必要があります。

◆ エタノールはTASキットの測定を阻害しますか？

サンプルの前処理に使われる 100%エタノールはTASキットの測定を阻害しません。どのような溶剤を使用したときでも、サンプルの測定結果に何ら関与していないことを確かめる為に、溶剤自身を測定する必要があります。そして、サンプルの測定結果から差し引く必要があります。

【脂溶性サンプル・化粧品サンプル】

◆ 脂溶性サンプルに使用できますか？

脂溶性サンプルその物は、TASキットの試薬と十分に混合しないので、使用には適しません。しかしながら、アルコール等の溶剤で希釈を行うことによって測定することが出来ます。

◆ 化粧品の最終製品の測定に使用できますか？

化粧品の最終製品の組成は、多岐に及んでおり、組成を考慮に入れて検討する必要があります。幾つかの物はアルコールで希釈することによって測定することが出来ます。TASキットを使用した文献では、イソプロピルアルコールでサンプルを1%に希釈して測定することによって、抗酸化能が測定できると報告されています。多くの乳化剤がブレンドされた最終製品と、その中から抗酸化物質を除いた物の抗酸化能を測定し、ベース組成の抗酸化バックグラウンドを差し引いています。(E Pelle et al, Estee Lauder Research Laboratories, Journal of Cosmetic Science)

【飲料・ミルク・植物 サンプル】

◆ お茶の測定の方法は？

お茶の抗酸化能は、茶葉の種類によって非常に大きく違いがあります。また、茶のたて方によっても大きく違います。抗酸化能は煎じる時間にも影響を受けます。一般論ですが、イングリッシュティーの場合、5g/lの茶葉を沸騰した水に5分煎じると、10-20mmol/Lの抗酸化能が示されます。

◆ ワインはどの様に分析するのでしょうか？

一般的なガイドラインとして、白ワインは希釈無しで測定することが出来ます。一方、赤ワインは希釈する必要があります。10倍～20倍希釈で通常行われます。希釈を行う場合には、理想的には測定レンジの中心に結果値が得られるようにします(約 1.0-2.0mmol/L)。得られた値は、希釈倍率を掛け換算する必要があります。

◆ 赤ワインが樽の中で酸化熟成される時、抗酸化能は上がるのでしょうか？又は落ちますか？

ワインの熟成期間では、抗酸化能は落ちると予期されます。酸化過程そのものでは、抗酸化物質は減少し、ワインは熟成します。フェノール類は重合して、樽底に沈降します。抗酸化能は抗酸化物質に比例しますので、ワイン熟成期では低下します。

◆ ミルクを測定することは出来ますか？

現在のところ、確立された測定方法はありませんが、下記の方法をお勧めします。

ミルクをそのまま、又は段階希釈を行い、最も直線的な結果が得られる 1-2mmol/L になるように調整します。もし、得られた結果の再現性が無い場合には、サンプルの前処理をする必要があります。遠心分離 (5000rpm, 10 分) を行い、固形物を分離します。上澄みをそのまま、又は段階希釈をしてサンプルとして使用します。理想的な濃度の 1-2mmol/L になるように希釈を設定します。もし結果が、タンパク質量に関係があると思われる場合は、タンパク質分析を行います。脱タンパク処理は強い酸化剤を伝統的に使用しているので、歪められた結果を得ることがあります。

◆ 植物抽出物の測定は出来ますか？

はい。下記方法をお勧めします。

まず、植物を液体窒素で凍らせます。その後、グラインダーで粉末になるまで磨り潰します。その粉末に 70% エタノールを添加し (0.5 g の粉末に対して 30ml)、その後 15 分沸騰させます。ロータリーエバポレーターでメタノールを取り除き、蒸留水でサンプルボリュームを調整します。その後、遠心分離します (5000rpm, 5 分)。もし、上記設備を持ち合わせていない場合は下記のようにしてください。まず、植物を細かく切り刻み、ホモジナイズしてください。その後 70% メタノールを添加し、遠心分離して固形物を取り除いてください。

メタノール又はエタノールは測定に影響を与えません。もし他の溶剤を使用する場合は、溶剤自身が抗酸化反応に影響を与えないことを確認する為に、溶剤自身を TAS キットで測定してください。蒸留水を使用して希釈を行い、TAS キットの測定レンジの中心に結果値が得られるようにします (約 1.0-2.0mmol/L)。

◆ フルーツ抽出サンプルの前処理は？

柑橘系果物の場合、果汁を絞るかジューサーを使用して抽出してください。また、ブルーベリーなどの農作物は、氷の上で 9500rpm で 2 回 15 秒ホモジナイズしてください。その後遠心分離 (9500rpm) し、上澄みを TAS キットの測定に使用します。もし測定する果物が、果汁を多く含有していない場合は蒸留水を加えた上でホモジナイズしてください。また、ホモジナイズ後の上澄みは必要に応じて希釈してください。その際は、TAS キットの測定レンジの中心に結果値が得られるようにします (約 1.0-2.0mmol/L)。

【血液・血漿・細胞 サンプル】

◆ 人間の抗酸化能の値を教えてください？

働いているヨーロッパ人を母集団に採ると、1.30-1.77mmol/L Plasma です。この値は、年齢、性別、栄養価、母集団の地理的領域 等によって変わってきます。

◆ どのような抗酸化物質があるのでしょうか？

抗酸化能測定で対象となる主な抗酸化物質は、アスコルビン酸、プロテインチオール、ビリルビン、尿酸、 α -トコフェノール等があります。ラジカル連鎖反応を抑止するこれらの抗酸化物質は、酸化ストレス効果に対抗する役割を担うと考えられています。血漿の中には、トランスフェリンやセルロプラスミン等の非酵素的にラジカルを消去する抗酸化物質が含まれています。血漿の抗酸化能を測定した場合、これらの抗酸化物質が 90% 貢献します。残り 10% の貢献は、システイン、グルタチオン、 β -カロテン、ユビキノン (CoQ) 等があります。

◆ 尿、唾液を測定することは出来ますか？

より多くのサンプルを測定する必要性がありますが、出来ると言えます。例えば、ビタミン C は過剰に摂取されると、急速に尿から排出されます。また、唾液は直前に接種した食物によるコンタミネーションが起こります。尿サンプルは、しばしば希釈が必要になります。

◆ 培養細胞の抗酸化能を測定できますか？

現在のところ、確立された測定方法はありませんが、測定は可能です。下記の方法をお勧めします。

- ① 抗酸化能測定を行う 3 日以上前に、細胞を継代培養します。細胞はコンフルエントな状態に達した時に接種することが望めます。
- ② 培地を細胞から取り除きます。もし必要ならば培地を細胞に残してください。もし培地をすぐに分析する必要が無い場合は、凍結保存することをお勧めします (-70°C 又は液体窒素中で保存)。
- ③ 細胞を 2 回 0.9%NaCl 又は PBS で濯ぎます。
- ④ グラスピペットでフラスコ中の液体を取り除きます。その後、0.9%NaCl 又は PBS をフラスコに添加しま

す (0.5-1.0ml:T25 フラスコの場合)。セルスクレーパーを使用して、細胞をフラスコの生育面から剥がし取ります。

- ⑤ 接種された細胞を遠沈管に入れます。また、すべての細胞を集める為に、フラスコを少量の 0.9%NaCl または PBS で洗います。
- ⑥ 遠心分離 (1000rpm) を行い、上澄みを取り除きます。
- ⑦ 再度、0.9%NaCl または PBS を添加し遠心分離を行います。そして、上澄みを取り除きます。
- ⑧ もし、これらの細胞をすぐに分析する要が無い場合は、凍結保存することをお勧めします (-70℃又は液体窒素中で保存)。
- ⑨ 分析に先立ち、0.9%NaCl または PBS を少量添加します。そして、細胞を超音波破碎し、氷の上で保存します。
- ⑩ 最も直線的な結果が得られる 1-2mmol/L になるように、サンプル濃度を調整します。

◆ 破碎組織を測定できますか？

TAS を使用した破碎組織の測定は多くの施設で行われていますが、ヘモグロビンによる阻害を考慮に入れる必要があります。ヘモグロビンは TAS キットの測定を阻害します。高濃度の血液を含む組織では、TAS キットの測定に適しません。破碎組織を測定するには、サンプル前処理でプロテインアッセイを必要とする時もあります。また、上澄みのヘモグロビン濃度を測定し、TAS キットへの影響を検討する必要があります。組織の抗酸化能と重量は組織の種類によってさまざまですが、TAS キットの測定レンジの中心に結果値が得られるように希釈します (約 1.0-2.0mmol/L)。組織を破碎するときは、事前に生理食塩水で組織を洗い流し、組織表面の血液を取り除いてください。また、破碎はバッファー中で行ってください。

◆ クエン酸抗血液凝固処理されたチューブをサンプルに使用できますか？

クエン酸抗血液凝固処理されたチューブを使用することは適切とはいえません。クエン酸塩は抗凝血剤であるだけでなく、クエン酸サイクルを経て複雑な影響を与え、その幾つかは酸化に関与します。TAS キットは抗酸化物質間の相互作用等を含めた、全抗酸化能を測定します。従って、抗凝血剤を使用する場合は、抗酸化反応への影響を防ぐ為に出来るだけシンプルな物を使用してください。

◆ 抗凝血剤 EDTA (エチレンジアミン四酢酸) は測定に影響を与えますか？

EDTA は適切な濃度で添加されている場合は、TAS キットの測定に影響を与えません。もし、EDTA を血液に添加する場合は、指示された処方に従って添加してください。