

SOAC 分析法 (プレートリーダー測定法)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
若木 学
石川 (高野) 祐子

1. 方法の概要

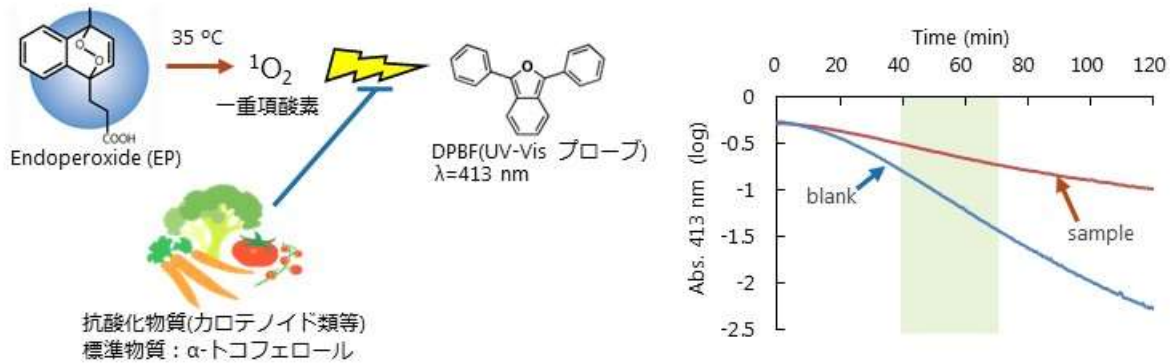


図 1. SAOC 法の原理と DPBF の吸光度変化

食品、特に生鮮物は、季節や天候の影響を受けやすく個体差が大きいことが知られている。そのため、これらの外的変動要因による影響の解析、あるいは異なる測定機関において得られた抗酸化能評価値の比較やデータベースの作製などを行うためには、妥当性の確認された、すなわち研究室間での分析誤差が一定の範囲内であることが確認された分析法が必要である。本プロトコールは、AOAC の室間共同試験のハーモナイズドプロトコールに準じて実施した室間共同試験 (配布試料: 抗酸化物質溶液 3 種、農作物抽出物 3 種) の結果、すべての試料で分析法の妥当性判断の指標である $0.5 < \text{HorRat} \leq 2$ を満たしたものである³⁾。

2. 実験

2.1 実験器具

- 三角フラスコ (300 mL、または 500 mL) (褐色、もしくは透明をアルミホイルで覆ったもの)
日本工業規格 (JIS R3503:1994) で規定されているもの又はそれに準ずるもの。
- ビーカー (10 mL、20 mL、50 mL)
日本工業規格 (JIS R3503:1994) で規定されているもの又はそれに準ずるもの。
- メスシリンダー (300 mL、または 500 mL)
日本工業規格 (JIS R3503:1994) で規定されているもの又はそれに準ずるもの。
- 全量フラスコ (10 mL、20 mL) (褐色、もしくは透明をアルミホイルで覆ったもの)
JIS 規格 (JIS R3505:1994) で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの。
- 全量ピペット (1 mL、2 mL、3 mL) (褐色、もしくは透明いずれも可)

JIS 規格 (JIS R3505:1994) で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの。

- eVol[®]XR デジタルシリンジ (SGE Analytical Science)
- 1 mL eVol シリンジ
- 5 mL マイクロピペッター
- パスツールピペット (ガラス製、90 mm 長)
- 葉さじ (ステンレス製もしくはプラスチック製のもの)
- 電子天秤 0.01mg の計量が可能なもの。
- 超音波洗浄機
- メジューム瓶 (500 mL、または 1 L) 褐色のガラス製のもの。
- 24 穴マルチプレート
24 穴マルチプレート (石英硝子蓋付き) (アイテックサイエンス株式会社、製品番号: 16010700)、
コロナ 24 ウェルガラスプレート (コロナ電気株式会社、製品番号: CRN-2629)、又は蓋付きでクロ
ロホルム耐性のある 24 穴マルチプレート
- マイクロプレートリーダー
24 穴マルチプレートに対応し、庫内の温度が 35 ° C で調節可能であり、吸光度 (413 ± 12 nm)
の変化が 30 秒おきに 120 分間測定可能なもの。
- アルミホイル 市販品でよい。

2.2 試薬

- クロロホルム JIS 規格 (JIS K 8322:2006) 以上のもの。
- エタノール (99.5%) JIS 規格 (JIS K 8101:2006) 以上のもの。
- 重水 (99.9%) CAS number: 7789-20-0
- 窒素ガス 純度 99.99%以上のもの。
- EP (Endoperoxide)
Endoperoxide (50 mg) ワケンビーテック社製、カタログ番号: EP50S、または 4-メチル-1,4-エ
テノー-2,3-ベンゾジオキシン-1 (4H) -プロピオン酸 (20 mg)、和光純薬、製品番号: 137-17891
- DPBF (Diphenylisobenzofuran) CAS number: 5471-63-6
- (±)- α -トコフェロール CAS number: 10191-41-0

2.3 調製

2.3.1 測定溶媒 (クロロホルム/エタノール/重水=50/50/1) の調製

- ① クロロホルム約 240 mL を三角フラスコ (褐色もしくはアルミホイルで覆ったもの) へ入れ、窒素ガスをパスツールピペットにより吹き込み 15 min バブリングする (脱酸素)。
- ② エタノール約 240 mL を別の三角フラスコ (褐色もしくはアルミホイルで覆ったもの) へ入れ、窒素ガスを①と同様に 15 min バブリングする (脱酸素)。
- ③ メスシリンダーを用いて、①のクロロホルム 200 mL、②のエタノール 200 mL を量り取り、メジューム瓶 (500 mL) へ移す。
- ④ 5 mL マイクロピペッターで重水 4 mL を③のメジューム瓶へ添加する。
- ⑤ 窒素ガスをパスツールピペットより吹き込み、①と同様に 15 min バブリングする (脱酸素)。(冷暗

所にて数日間保管可能)

2.3.2 DPBF 溶液の調製

DPBF solution#1 の調製 (約 1.8 mmol/L DPBF 溶液)

- ① 薬さじで DPBF 約 5 mg (0.01 mg 単位で重量記録) を 10 mL 容の全量フラスコへ量り取る。
- ② ①の粉末状態で使用直前まで-20 ° C で保管する。
- ③ 使用時に、①へ測定溶媒を半分程度加え、超音波洗浄機に数秒かけ、粉末が溶解したことを確認する。
- ④ 測定溶媒で③を 10 mL に定容する。
- ⑤ ④の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。(調製後、-20 ° C 保管で当日中なら使用可能。使用時は必ず室温に戻す。)

DPBF solution#2 の調製 (約 0.18 mmol/L DPBF 溶液) ※用時調製

- ① 1 mL 全量ピペットで DPBF solution#1 1 mL を量り取る。
- ② 10 mL 容の全量フラスコへ①を移し、測定溶媒で 10 mL に定容する。
- ③ ②の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。

2.3.3 EP 溶液の調製 (約 16 nmol/L EP 溶液) ※用時調製

- ①薬さじで EP 約 4 mg (0.01mg 単位で重量記録) を 10 mL 容の全量フラスコへ量り取る。(*4 mg より少なくならないようにする)
- ② ①の粉末状態で使用直前まで-20 ° C で保管する。
- ③ 使用時に、①へ測定溶媒を半分程度加え、超音波洗浄機に数秒かけ、粉末が溶解したことを確認する。
- ④ 測定溶媒で③を 10 mL に定容する。
- ⑤ ④の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。

2.3.4 α -Tocopherol (α -Toc) 溶液の調製

α -Toc solution#1 の調製 (約 15 mmol/L α -Toc 溶液)

- ① 薬さじで α -Toc 約 129 mg (0.01mg 単位で重量記録) を 10 mL ビーカーに量り取る。
- ② ①のビーカーに測定溶媒を入れ、パスツールピペットのピペッティング操作により α -Toc を溶解させ、20 mL 容の全量フラスコへ移す。
- ③ ②を繰り返して、測定溶媒で 20 mL に定容する。
- ④ ③の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。(調製後、-20 ° C 保管で当日中なら使用可能。使用時は必ず室温に戻す。)

α -Toc solution#2 の調製 (約 1.5 mmol/L α -Toc 溶液) ※用時調製

- ① 1mL 全量ピペットで α -Toc solution#1 1mL を量り取る。
- ② 10 mL 容の全量フラスコへ①を移し、測定溶媒で 10 mL に定容する。
- ③ ②の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。

2.3.5 サンプル測定液の調製

サンプル測定液#2 (0.6 倍希釈溶液) の調製 ※用時調製

- ① サンプル原液の入ったバイアルを転倒混和して均一な溶液にする。
- ② 3 mL 全量ピペットでサンプル原液 (サンプル測定液#1) 6 mL (3 mL×2 回) を量り取る。
- ③ 10 mL 容の全量フラスコへ②を移し、測定溶媒で 10 mL に定容する。
- ④ ③の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。

サンプル測定液#3 (0.3 倍希釈溶液) の調製 ※用時調製

- ① サンプル原液の入ったバイアルを転倒混和して均一な溶液にする。
- ② 3 mL 全量ピペットでサンプル原液 3 mL を量り取る。
- ③ 10 mL 容の全量フラスコへ②を移し、測定溶媒で 10 mL に定容する。
- ④ ③の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。

サンプル測定液#4 (0.2 倍希釈溶液) の調製 ※用時調製

- ① サンプル原液の入ったバイアルを転倒混和して均一な溶液にする。
- ② 2 mL 全量ピペットでサンプル原液 2 mL を量り取る。
- ③ 10 mL 容の全量フラスコへ②を移し、測定溶媒で 10 mL に定容する。
- ④ ③の全量フラスコにふたをして、転倒混和して均一な溶液にする。

2.4 吸光度経時変化の測定

- ① マイクロプレートリーダー、付属するコンピューターなどを起動し、マイクロプレートリーダー庫内を 35 ° C に加温する。
- ② 24 穴マルチプレートを氷上にアルミホイル、キムタオルの順に敷いた上におく。(測定溶媒が揮発しやすいため、以降の操作は氷上にて行う。)
- ③ eVol[®]XR デジタルシリンジの設定を行う (Repeat dispense, Dispense; 300 μ L, Last Dispense; 40 μ L, Count; 3, Asp Speed; 3, Disp Speed; 4 *吸引の速さ設定は目安。正確な量を量り取れない場合は適宜速さを調節する。))
- ④ 測定溶媒を 10 mL ビーカーに移し、プレートレイアウト (図 2) に従い、A1、B6、および C1 に 300 μ L ずつ、D2-5 に 600 μ L ずつ、D1 および 6 に 900 μ L ずつ eVol[®]XR デジタルシリンジで分注する。(測定溶媒は揮発しやすいため、以後の操作は石英板で蓋をしながら行う。)
- ⑤ α -Toc solution#2 を 20 mL ビーカーに移し、1 mL の α -Toc solution#2 を吸引することでシリンジ内を共洗いする。その後、プレートレイアウト (図 2) に従い、A2、B5、C2、および D5 に 300 μ L ずつ eVol[®]XR デジタルシリンジで分注する。分注後、測定溶媒で 2 回以上シリンジ内を洗浄する。
- ⑥ プレートレイアウト (図 2) に従い、サンプル溶液を 300 μ L ずつ eVol[®]XR デジタルシリンジで分注する。種類の異なるサンプル溶液、あるいは同一の試料でもより低希釈倍率のサンプル溶液を取り扱う際は、測定溶媒で 2 回以上シリンジ内を洗浄し、吸引するサンプル溶液で共洗いする。

- ⑦ 2.3.2 に従い、 -20°C で保存しておいた DPBF を用いて DPBF solution#1 を調製し、さらに DPBF solution#2 を調製する。2.3.3 に従い、 -20°C で保存しておいた EP を用いて EP 溶液の調製を行う。
- ⑧ DPBF solution#2 を 10 mL ビーカーに移し、A-C 列のすべてのウェルに 300 μL ずつ eVol[®]XR デジタルシリンジで分注する。分注後、測定溶媒で 2 回以上シリンジ内を洗浄する。
- ⑨ EP 溶液を 10 mL ビーカーに移し、A-C 列のすべてのウェルに 300 μL ずつ eVol[®]XR デジタルシリンジで分注する。
- ⑩ 24 穴マルチプレートに石英板をのせて蓋をし、ウェルにかからない様にプレートと石英板とをセロテープ等で固定する。(測定中マイクロプレートリーダー庫内で蓋がずれないようにとめておく。蓋がずれない仕様のプレートを用いる場合は不要。)
- ⑪ ⑩の 24 穴マイクロプレートを 35°C に加温したマイクロプレートリーダーに移し、413 nm の吸光度を 30 秒間隔で 240 回 (120 分間) 測定する。(移動させる際、蓋に溶液がつかないように、傾けたり、液面を波立たせたりしないよう注意する。)

	1	2	3	4	5	6	
A	B	STD	Sample 1 #4 ($\times 0.2$)	Sample 1 #3 ($\times 0.3$)	Sample 1 #2 ($\times 0.6$)	Sample 1 #1 (原液)	B …ブランク
B	Sample 2 #1 (原液)	Sample 2 #2 ($\times 0.6$)	Sample 2 #3 ($\times 0.3$)	Sample 2 #4 ($\times 0.2$)	STD	B	STD …スタンダード (α -Toc solution#2)
C	B	STD	Sample 3 #4 ($\times 0.2$)	Sample 3 #3 ($\times 0.3$)	Sample 3 #2 ($\times 0.6$)	Sample 3 #1 (原液)	Sample …サンプル
D	B	Sample 3 #1 (原液)	Sample 2 #1 (原液)	Sample 1 #1 (原液)	STD	B	背景なし …吸光度補正用ウェル

図 2. SOAC 法測定時における 24 穴マイクロプレートのレイアウト

2.5 解析処理 (半減期を用いた解析)

以下の解析処理は、SOAC 法解析ファイルを用いて自動で解析できる。

2.5.1 時間変化曲線のベースライン補正

サンプル測定液#1-4 の吸光度は、サンプル由来の吸光度と DPBF 由来の吸光度の和になっている。よって、DPBF のみの吸光度に補正するためにサンプル由来の吸光度を引き算する。

サンプル測定液 #1 の吸光度補正

$$(\text{サンプル測定液 \#1 の吸光度補正值}) = \text{吸光度 (サンプル測定液 \#1)} - \text{吸光度 (ブランク)}$$

サンプル測定液 #2 の吸光度補正

$$(\text{サンプル測定液 \#2 の吸光度補正值}) = \text{吸光度 (サンプル測定液 \#2)} - \text{吸光度 (サンプル測定液 \#1 の吸光度補正值)} \times 0.6 - \text{吸光度 (ブランク)}$$

サンプル測定液 #3 の吸光度補正

(サンプル測定液 #3 の吸光度補正值) = 吸光度 (サンプル測定液 #3) - 吸光度 (サンプル測定液 #1 の吸光度補正值) × 0.3 - 吸光度 (ブランク)

サンプル測定液 #4 の吸光度補正

(サンプル測定液 #4 の吸光度補正值) = 吸光度 (サンプル測定液 #4) - 吸光度 (サンプル測定液 #1 の吸光度補正值) × 0.2 - 吸光度 (ブランク)

2.5.2 半減期の算出

X 軸に測定開始後の時間を、Y 軸に DPBF の吸光度をとった対数グラフを作成し、開始後 40 分から 70 分までの傾きを算出し、DPBF の減衰速度 S を得る。

半減期は

$$t_{1/2} = \ln 2 / S \quad \dots \text{式 1}$$

で得られる。

2.5.3 Relative SOAC value の算出

式 1 を用いてブランク、標準物質、および各希釈倍率のサンプル測定液の半減期を算出し、式 2 より Relative SOAC value を算出する。4 濃度のサンプル測定結果につき、各々 Relative SOAC value を算出し、4 つの平均値をそのサンプルの Relative SOAC value とする。Relative SOAC value の単位は「mol α Toc /g または mol α Toc/mol」である。

Relative SOAC value

$$= \left\{ (t_{1/2}^{\text{Sample}} - t_{1/2}^{\text{Blank}}) / (t_{1/2}^{\alpha\text{-Toc}} - t_{1/2}^{\text{Blank}}) \right\} \times \left\{ [\alpha\text{-Toc (mol/l)}] / [\text{Sample (g/l)}] \right\} \quad \dots \text{式 2}$$

2.5.4 解析ファイルを使用した計算

- ① SOAC 法解析ファイルの「実験内容を入力するシート」に必要事項を記入する。
- ② 「測定データ貼り付け用シート」に 2.4 の①で得られた測定結果を貼り付ける。
- ③ 「結果シート」の正否判定を確認し、「一次直線」、「Blank」、「STD」、および「真度確認」の項目で F 判定の場合は再測定、サンプルで F 判定の場合は原液希釈倍率を参考にして再測定を行う。

2.6 解析処理 (Stern-Volmer の式を用いた解析)

以下の解析処理は「計算シート」で行われている。

Stern-Volmer の式から標準物質およびサンプルの一重項酸素消去定数 k_0 は、X 軸に測定試料の濃度を、Y 軸にブランクと測定試料の減衰速度の比 ($S_{\text{blank}}/S_{\text{sample}}$) とした時の近似直線の傾きを算出し、それに測定溶媒中の一重項酸素消去定数 30300 を乗算することで求まる。SOAC 値は、サンプルの k_0 と標準物質の k_0 との比で算出される。

3. 実験精度の管理

分析が正しく行われているかの判断は、「結果シート」の成否判定を確認する。一次直線の項目においては、それぞれの近似直線の決定係数が 0.99 未満の場合に再測定を要求する。Blank および STD の項目においては、3 つのウェルから得られる半減期の相対標準偏差 RSD (%) が 10 以上の場合に再測定を要求する。また、真度確認においては、 α -トコフェロールの k_d が $1.11 \pm 0.34 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (室間共同試験での平均値 \pm 室間再現標準偏差の 2 倍) の範囲外である場合に再測定を要求する。

4. 注意点

- ① 有機溶媒を使用するので、手袋、マスク、保護メガネを着用し、作業はドラフト内で行う。
- ② 測定溶媒は揮発性が高いため、室内が高温にならないよう注意し、長時間使用しない時はふたをずる。
- ③ EP 試薬は、30 ° C 以上で分解が進むので、低温で取り扱う。溶媒の温度も低温を保つよう注意する。
- ④ 測定試料中のカロテノイドは光(紫外線)により分解が進むことから操作中はできる限り遮光する。
- ⑤ DPBF 溶液は光により分解が進むことから、溶解後は遮光し、速やかに測定を開始する。
- ⑥ プレートリーダーの種類によっては測定中に蓋が外れることがあるので初めて測定するには注意する。

5. 後片付け

24 穴マルチプレート、および石英板は測定溶媒で洗浄する。デジタルシリンジは測定溶媒そしてエタノールで洗浄する。使用した測定溶媒は、ハロゲン系有機溶媒として処理する。

【参考文献】

- 1) Ouchi, A., Aizawa, K., Iwasaki, Y., Inakuma, T., Terao, J., Nagaoka, S., and Mukai, K. (2010) Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. *J Agric Food Chem.*, 58, 9967-9978.
- 2) Takahashi, S., Iwasaki-Kino, Y., Aizawa, K., Terao, J., and Mukai, K. (2016) Development of Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method Using a Microplate Reader. *JAOAC Int.*, 99, 193-197.
- 3) Wakagi, M., Watanabe, J., Takahashi, S., Yasui, A., and Takano-Ishikawa, Y. (2017) Inter-laboratory validation study of a singlet oxygen absorption capacity assay method for determining the antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Food Sci Technol Res*, in press.