

-H-ORAC 法標準作業手順書の配付にあたって(必読)-

農産物・食品抽出液等の抗酸化能測定に関する標準作業手順書
親水性酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) 測定法

農産物・食品の抗酸化能評価に関しては、多種多様な原理に基づく測定法が報告されていますが、妥当性確認が完了した測定法はこれまでに報告がありませんでした。また、異なる測定法を用いた評価(分析)値を相互に比較することは困難です。

そこで、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構(以下 農研機構)食品研究部門(旧 食品総合研究所)では、農研機構 九州沖縄農業研究センター、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所(旧 国立健康・栄養研究所)、太陽化学株式会社との共同研究により、現在広く抗酸化能の評価に用いられている酸素ラジカル吸収能(Oxygen radical absorbance capacity: ORAC)評価法の改良および妥当性確認^{*1}を行い、農産物・食品抽出液等の抗酸化能評価に広く利用していただけるよう、標準作業手順書を作成し、公開することに致しました。

農産物・食品には親水性抗酸化物質と親油性抗酸化物質が含まれ、ORAC 法では前者の抗酸化能を Hydrophilic (H)-ORAC、後者の抗酸化能を親油性 Lipophilic (L) -ORAC として評価し、通常合算して抗酸化能としています。本手順書は、野菜・果物等の抗酸化能への寄与が大きいと考えられる H-ORAC の評価を行うものです。L-ORAC の標準作業手順書については、別項にて公開しております。また、ORAC 法による農産物・食品の抗酸化能測定にあたっては、試料からの抗酸化物質の抽出が必要ですが、その方法に関しては、論文として公表しております^{*2}。

なお、本標準作業手順書に従って行われた室間共同試験の結果は *Analytical Sciences* 誌^{*3}に報告されておりますので、本報告もご参照下さい。論文等の作成の際にはこちらを引用していただければありがたいと思います。また、本標準作業手順書に示されている H-ORAC の評価を行うに当たっては、測定法の性能の検証とその分析値の信頼性を確保するための内部品質管理が必要です^{*4}。

合わせてお送りするエクセルファイルは、本標準作業手順書に基づいて測定されたプレートリーダーの蛍光強度の値をコピー・ペーストするだけで、2段階目測定のための希釈倍率の計算、本測定における ORAC 値等を自動計算できるテンプレートファイルになっております。一枚目のシートに実験内容を入力し、二枚目のシートに測定結果をコピー・ペーストしてお使いいただけます。

希釈倍率計算用のファイルでは測定結果のシートにダミーデータが入っております。このデータから希釈倍率が自動で計算されます。このとき、始めに作成した 10 倍希釈液の量

が極端に少なくなならないよう、希釈倍率によっては使用量が固定されています。

また、ORAC 決定用のファイルでは、希釈倍率計算用ファイルで計算された低希釈倍率の値を実験内容入力シートに記入し、測定結果をコピー・ペーストすることで、レポートシートに ORAC 値が計算されてきます。

本標準作業手順書ならびにエクセルテンプレートの 2 次配付 (改変を含む) ならびに転載を禁止いたします。改変された場合には、農研機構はその測定結果の妥当性について保証することはできません。

また、本手順書の利用は利用者の責任で行っていただくことを前提としております。そのため、本手順書の使用あるいは本手順書に準拠して得られた測定結果について発生したトラブル、利用者又は第三者に生じた損害等については利用者の責任でご対応をお願いします。農研機構は、それらについて損害賠償その他一切の責任を負いません。

本標準作業手順書に関する、個別のご質問等につきましては nfri_kinou-sop@naro.affrc.go.jp までお問い合わせ下さい。

*1 分析法の妥当性確認：分析法の妥当性確認(Method Validation)とは、試験に用いる分析法が意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、客観的な証拠を用意することである (ISO/IEC 17025)。化学分析法では、一般に、室間再現相対標準偏差が国際的に合意された判断基準に照らし合わせて許容される範囲に収まること(Horwitz 修正式による予測室間相対標準偏差との比である HorRat が 2 以下)で確認される。

*2 Watanabe J. *et. al.*, *J. Food Sci.* **79**(9), C1665-71, (2014)

*3 Watanabe J. *et. al.*, *Analytical Sciences*, **28**(2), 159-165, (2012)

*4 安井明美編：最新版食品分析法の妥当性確認ハンドブック、サイエンスフォーラム社 (2012)

H-ORAC 分析法標準作業手順書

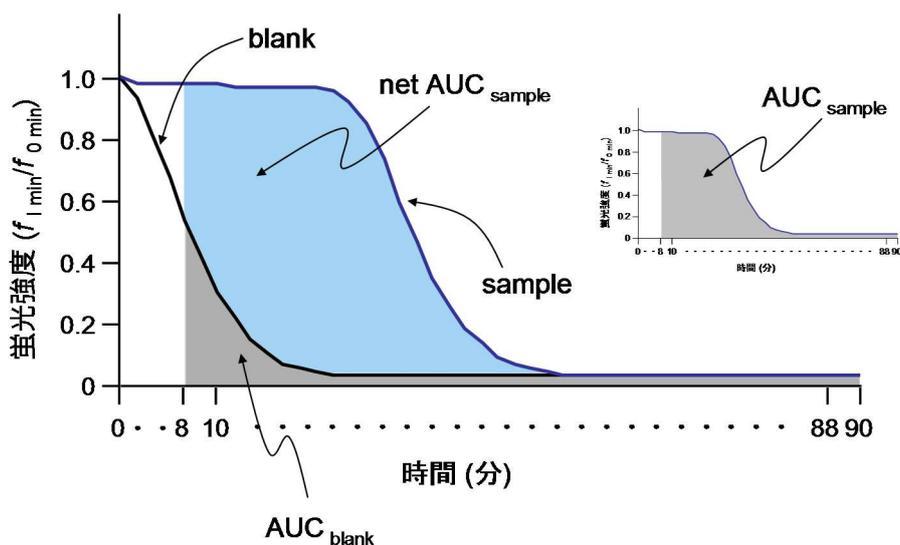
渡辺 純(農研機構食品研究部門)

沖 智之(同上 九州沖縄農業研究センター)

竹林 純(国立健康・栄養研究所)

1. 方法の概要

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) は米国国立老化研究所の Cao らによって確立された抗酸化能評価法であり¹⁾、広く食品の抗酸化能評価に使用されている。ORAC は、ラジカル発生剤である AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride) より発生したペルオキシラジカルによって、標識物質である Fluorescein が分解される過程を、Fluorescein の蛍光強度を経時的に測定することで追跡する²⁾。X 軸に測定開始後の時間を、Y 軸にその時間の Fluorescein の蛍光強度をとったグラフを作成し、蛍光強度の軸と時間軸とグラフの軌跡によって囲まれた面積 (Area Under Curve:AUC) を算出する (図1)。



$$AUC = (0.5 \times f_{8 \text{ min}} + f_{10 \text{ min}} + f_{12 \text{ min}} + f_{14 \text{ min}} + \dots + f_{88 \text{ min}} + 0.5 \times f_{90 \text{ min}}) / f_{0 \text{ min}} \times 2$$

$f_{i \text{ min}}$: 測定 i 分後の Fluorescein の蛍光強度

図1 AUC、net AUC の算出方法

この AUC は被験試料の抗酸化能によって異なり、この AUC の違いを標準物質として Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) を用いて相対的に評価する。具体的には、標準物質である Trolox または被験試料を添加した際の AUC から抗酸化物質非存在下の AUC を差し引いた net AUC を求める。Trolox 添加時の net AUC に対する被験試料添加時の net AUC の相対値を得て、被験試料の濃度を考慮して Trolox 当量 (Trolox

Equivalent:TE) として示す。このため ORAC は抗酸化物質による活性酸素種への阻害効果を時間とその度合いの両方で評価することができる。

食品にはポリフェノールをはじめとする親水性抗酸化物質と、トコフェロールをはじめとする親油性抗酸化物質が含まれる。ORAC 法による食品の抗酸化能評価の際は、親水性抗酸化物質と親油性抗酸化物質に分けて抽出し、これらを H-ORAC および L-ORAC として評価する³⁾。高速溶媒抽出装置を用い、食品乾燥粉末からヘキサン-ジクロロメタン (1:1) を用いて親油性抗酸化物質を、メタノール-水-酢酸 (MWA) を用いて親水性抗酸化物質を連続的に抽出する方法は、筆者らの方法⁴⁾を参考にされたい。本プロトコールは、食品の MWA 抽出液の抗酸化能を H-ORAC 法で測定する妥当性確認のされた測定法である⁵⁾。

2. 実験

2.1 器具

- ・ ビーカー (200 mL, 500 mL, 1 L)

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。

- ・ 三角フラスコ (100 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。

- ・ 全量ピペット (1 mL, 25 mL)

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。

- ・ 全量フラスコ (10 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL)

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。

- ・ メスシリンダー (10 mL, 20 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL)

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

- ・ メジューム瓶 (1 L) ガラス製のもの。
- ・ 薬さじ ステンレス製もしくはプラスチック製のもの。
- ・ 薬包紙
- ・ コニカルチューブ (15 mL, 50 mL) ポリプロピレン製のもの。
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ ポリプロピレン製のもの。
- ・ 96 ウェルマイクロプレート

ポリスチレン製の平底で、仕切りも含めて全てが透明なもの。推奨:FALCON 社製 35-3072。

- ・ プッシュボタン式液体用微量体積計 (マイクロピペッター, 200 μ L, 1 mL, および 100 μ L, 300 μ L の多チャンネル (8 連または 12 連) マイクロピペッター、100 μ L, 300 μ L の多チャンネルマイクロピペッターは 200 μ L の多チャンネルマイクロピペッターで代用可能)

JIS 規格 (JIS K0970-1989) で規定されているものまたはそれに準ずるもの。

- ・ 電子天秤 0.1 mg の計量が可能なもの。
- ・ マイクロプレートリーダー

96 ウェルマイクロプレートに対応し、庫内の温度が 37 ± 2 °C で調節可能であり、蛍光強度 (励起波

長 485±20 nm、検出波長 530±25 nm) の変化が 2 分おきに 90 分間測定可能なもの。自動分注機が付き、プレート底面からの蛍光検出が可能な機種が望ましい。

- ・ 恒温槽 水を入れて 37 °C で温度制御が可能なもの。
- ・ マグネットスターラー 回転制御機能を搭載するもの。
- ・ 回転子 PTFE にてコートされたもの。
- ・ 温度計 JIS 規格 (JIS B7411:1997) で規定されているものまたはそれに準ずるもの。
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ マイクロプレート用ミキサー (マイクロプレートリーダーに内蔵されている場合は不要)
- ・ アルミホイル 市販品で良い。
- ・ 安全ピペッター 同等の機能を有する機器でも良い。
- ・ マイクロプレート用シール リアルタイム PCR 測定用のもの。推奨:タカラバイオ社製 NJ500。

2.2 試薬

- ・ 水 JIS 規格 (JIS K0557:1998) で規定されているクラス A3 以上のもの。
- ・ リン酸水素二カリウム JIS 規格 (JIS K9017:1992) 以上のもの。
- ・ リン酸二水素カリウム JIS 規格 (JIS K9007:2008) 以上のもの。
- ・ メタノール JIS 規格 (JIS K8891:2006) 以上のもの。
- ・ 酢酸 JIS 規格 (JIS K8355:2006) 以上のもの。
- ・ Fluorescein sodium salt

CAS number: 518-47-8、Sigma-Aldrich 社製、製品番号:F6377-100G。

- ・ Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

CAS number: 53188-07-1、Sigma-Aldrich 社製、製品番号:238813-1G。

- ・ AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride)

CAS number: 2997-92-4、和光純薬工業(株)社製、製品番号:017-11062、あるいは 017-21332。

2.3 調製

2.3.1 Assay buffer (75 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4)) の調製

A 液 (75 mmol/L リン酸水素二カリウム溶液)

- ① 薬さじでリン酸水素二カリウム 6.53 g を薬包紙へ量り取る。
- ② ①のリン酸水素二カリウムを 500 mL ビーカーに移す。
- ③ ①の薬包紙に残ったリン酸水素二カリウムを少量の水で洗う。洗液は②のビーカーに入れる。
- ④ ②のビーカーに約 300 mL の水を入れ、マグネットスターラーを用いて攪拌、溶解する。
- ⑤ 500 mL 全量フラスコへ④の溶液を移し、水で 500 mL に定容する。
- ⑥ ⑤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。

B 液 (75 mmol/L リン酸二水素カリウム溶液)

- ① 薬さじでリン酸二水素カリウム 5.10 g を薬包紙へ量り取る。
- ② ①のリン酸二水素カリウムを 500 mL ビーカーに移し、約 300 mL の水を入れ、マグネットスターラーを用いて攪拌、溶解する。
- ③ 500 mL 全量フラスコへ②の溶液を移し、水で 500 mL に定容する。
- ④ 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。

Assay buffer

- ① 1 L ビーカーに 500 mL に定容した A 液を全て移す。
- ② 100 mL メスシリンダーで B 液 155 mL を量り取る。
- ③ ①のビーカーに②の B 液を加え、マグネットスターラーを用いて攪拌、混和する。
- ④ ③の溶液をメジューム瓶に移し、蓋をして、4 °C 以下で冷蔵保存する。
- ⑤ Assay buffer は室温に 30 分以上静置してから使用する。別途指示がある場合は、必要量をコニカルチューブに移し、37°C に設定した恒温槽中で 30 分以上加温してから使用する。

2.3.2 メタノール-水-酢酸 (MWA) 溶液の調製

- ① 100 mL メスシリンダーでメタノール 90 mL を量り取る。
- ② 100 mL 三角フラスコに①のメタノールを移す。
- ③ 10 mL メスシリンダーで水 9.5 mL を量り取る。
- ④ ②の三角フラスコに③の水を移す。
- ⑤ 1 mL マイクロピペッターで酢酸 0.5 mL を量り取る。
- ⑥ ④の三角フラスコに⑤の酢酸を移し、攪拌、混和する。

※ MWA 溶液は用時調製する。

2.3.3 希釈 buffer

- ① 10 mL メスシリンダーで MWA 溶液を 10 mL 量り取る。
- ② 100 mL 三角フラスコに①の MWA 溶液を移す。
- ③ 100 mL メスシリンダーで assay buffer を 90 mL 量り取る。
- ④ ③の assay buffer を②の 100 mL 三角フラスコに移し、攪拌、混和する

※ 希釈 buffer は用時調製する。

2.3.4 Fluorescein (FL) 溶液の調製

FL stock solution #1 の調製 (1.2 mmol/L FL 溶液)

- ① 薬さじで FL sodium salt 90 mg を薬包紙へ量り取る。
- ② ①の FL sodium salt を 200 mL ビーカーに移す。
- ③ 200 mL メスシリンダーで Assay buffer 200 mL を量り取る。
- ④ ③の Assay buffer を②のビーカーへ移し、ビーカーをアルミホイルで遮光した後、マグネッ

トスターラーを用いて攪拌、溶解する。

- ⑤ 15 mL コニカルチューブに分注し、暗所にて 4 °C以下で冷蔵保存する（数ヶ月は保管可能）。

FL stock solution #2 の調製 (6.0 μmol/L FL 溶液)

- ① 10 mL メスシリンダーで Assay buffer 10 mL を量り取る。
- ② 15 mL コニカルチューブに①の Assay buffer を移す。
- ③ 200 μL マイクロピペッターで FL stock solution #1 を 50 μL 量り取る。
- ④ ②のコニカルチューブへ③の FL stock solution #1 を移し、攪拌、混和する。
- ⑤ 暗所にて 4 °C以下で冷蔵保存する（数ヶ月は保管可能）。

FL working solution の調製 (110.7 nmol/L FL 溶液)

- ① 50 mL メスシリンダーで、37°Cに設定した恒温槽中で 30 分以上加温した Assay buffer 25 mL を量り取る。
- ② 50 mL コニカルチューブに①の Assay buffer を移す。
- ③ 1 mL マイクロピペッターで FL stock solution #2 を 470 μL 量り取る。
- ④ ②のコニカルチューブへ③の FL stock solution #2 を移し、攪拌、混和する。
- ⑤ アルミホイルで④のコニカルチューブを遮光し、使用まで 37°Cに設定した恒温槽中で加温する。
- ⑥ FL working solution は測定ごとに調製する。

2.3.5 Trolox 溶液の調製

Trolox stock solution の調製 (500 μmol/L Trolox 溶液)

- ① 薬さじで Trolox 100 mg を薬包紙へ量り取る（測り込み量は 0.1 mg 単位で記録する）。
- ② 200 mL ビーカーに①の Trolox を移す。
- ③ ②のビーカーに Assay buffer 約 180 mL を加え、マグネットスターラーを用いて攪拌、溶解する。
- ④ 200 mL 全量フラスコへ③の溶液を移し、Assay buffer で 200 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。
- ⑥ 安全ピペッターを装着した 25 mL 全量ピペットで⑤の溶液 25 mL を量り取る。
- ⑦ 100 mL 全量フラスコへ⑥の溶液を移し、Assay buffer で 100 mL に定容する。
- ⑧ ⑦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。
- ⑨ 200 μL マイクロピペッターで 1.5 mL マイクロチューブに 100 μL ずつ分注し、-20 °C以下で保存する（数ヶ月は保管可能）。

Trolox 標準溶液の調製

- ① 1 mL マイクロピペッターで希釈 buffer を 900 μ L を量り取る。
- ② Trolox stock solution の入った 1.5 mL マイクロチューブに①の溶液を移し、ボルテックスミキサーで攪拌、混和する (Trolox 標準溶液;STD1)。
- ③ 1 mL マイクロピペッターで希釈 buffer を 500 μ L を量り取る。
- ④ 1.5 mL マイクロチューブに③の希釈 buffer を移す。
- ⑤ 1 mL マイクロピペッターで②の溶液 500 μ L を量り取る。
- ⑥ ④のマイクロチューブに⑤の溶液を移し、攪拌、混和する(2 倍希釈 Trolox 標準溶液; STD2)。
- ⑦ ③～⑥の操作を繰り返し、4 倍希釈 Trolox 標準溶液 (STD3) と 8 倍希釈 Trolox 標準溶液 (STD4) を調製する。
- ⑧ Trolox 標準溶液は測定ごとに調製する。

$$\text{各希釈段階の Trolox 標準溶液の濃度 } (\mu\text{mol/L}) = \frac{W}{250.29} \times \frac{125}{DF} \times 0.97$$

W = 秤量した Trolox (mg) ; 250.29 = Trolox の分子量 ; DF = 希釈倍率 ;
0.97 = Trolox の純度 (97 %の場合)

2.3.6 AAPH 溶液 (8.6 mg/mL, 31.7 mmol/L) の調製

- ① 20 mL メスシリンダーで 37°C に設定した恒温槽中で 30 分以上加温した Assay buffer 15 mL を量り取り、50 mL コニカルチューブに移す。
- ② ①の assay buffer は、使用まで 37°C に設定した恒温槽中で加温する。
- ③ 葉さじで AAPH 129 mg を葉包紙へ量り取る。
- ④ 測定直前に③の AAPH を②の加温した Assay buffer の入ったコニカルチューブに入れ、ボルテックスミキサーで攪拌、溶解する。

2.4 サンプル溶液の ORAC 予測値の算出

2.4.1 サンプル希釈溶液の調製

- ① サンプル原液をアルミホイルで遮光して常温に戻す。
- ② ①のサンプル原液をボルテックスミキサーで攪拌、混和する。
- ③ 安全ピペッターを装着した 1 mL 全量ピペットでサンプル原液 1 mL 量り取る。
- ④ 10 mL 全量フラスコへ③の溶液を移し、Assay buffer で 10 mL に定容する(10 倍希釈溶液)。
- ⑤ ④の 10 倍希釈溶液を希釈 buffer でさらに 5, 25, 125 倍希釈する(それぞれ 50, 250, 1250 倍希釈溶液)。希釈には、マイクロピペッターあるいは多チャンネルマイクロピペッターを用いる。
- ⑥ 2.4.3 解析処理においてサンプル溶液の net AUC が検量線の上限を超え、ORAC 値

が計算できなかった場合は、以下のように希釈倍率をかえたサンプル希釈溶液を調製する。なお、再測定は④の 10 倍希釈溶液調製当日中に行う。希釈に用いた 10 mL 全量フラスコはアルミホイルで遮光し、再測定まで室温で保存する。また、希釈に用いた 10 mL 全量フラスコ内の希釈溶液を 15mL コニカルチューブに移し、蓋をしてアルミホイルで遮光して保存してもよい。

- (1) 安全ピペッターを装着した 1 mL 全量ピペットで④の 10 倍希釈溶液 1 mL 量り取る。
- (2) 10 mL 全量フラスコへ(1)の溶液を移し、希釈 buffer で 10 mL に定容する(100 倍希釈溶液)。
- (3) (1)と(2)の操作を繰り返し、1,000 倍希釈溶液を調製する。
- (4) (3)の 1,000 倍希釈溶液を⑤と同様の操作で、さらに 5, 25, 125 倍希釈して測定に用いる(それぞれ 5,000, 25,000, 125,000 倍希釈となる)。
- (5) それでもサンプル溶液の net AUC が検量線の上限を超え、ORAC 値が計算できなかった場合は、(1)から(3)の操作を繰り返すことにより、順次さらに 100 倍, 10,000 倍・・・希釈したもの(それぞれ試料溶液の 100,000, 10,000,000 倍希釈となる)を⑤と同様の操作で 5, 25, 125 倍希釈して測定に用いる。

2.4.2 蛍光強度経時変化の測定

- 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 37 °C に加温する。蛍光検出波長を励起波長 485±20 nm、検出波長 530±25 nm に、プレート底面側からの検出方向(プレート上部からの検出方向も可)に設定する。蛍光検出感度は、測定開始 0min の蛍光強度($f_{0 \text{ min}}$)がレンジの上限を超えない範囲でできるだけ高い値となるように設定する。
- ② プレートレイアウト(図 2)に従い、試料測定用プレートの A 列と H 列のすべての行、B 列から G 列までの第 1 行と第 12 行の各ウェルに 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで Assay buffer あるいは希釈 buffer 35 μL を分注する。
- ③ プレートレイアウト(図 2)に従い、Trolox 標準溶液を 200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで 35 μL ずつ各ウェルに分注する。STD1 は B 列 3 行、B 列 10 行、G 列 3 行、G 列 10 行に、STD2 は B 列 4 行、B 列 9 行、G 列 4 行、G 列 9 行に、STD3 は B 列 5 行、B 列 8 行、G 列 5 行、G 列 8 行に、STD4 は B 列 6 行、B 列 7 行、G 列 6 行、G 列 7 行に分注する。
- ④ Blank (B 列 2 行、B 列 11 行、G 列 2 行、G 列 11 行) には 200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで希釈 buffer を 35 μL ずつ分注する。
- ⑤ サンプル希釈溶液を 200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで 35 μL ずつ各ウェルに分注する。プレートレイアウト(図 2、希釈倍率は一例)を参考に、4 段階の希釈倍率の最大 10 サンプルのサンプル希釈溶液を

分注する。

- ⑥ プレートレイアウト (図 2) に示したサンプル希釈溶液分注用のウェルのうち、サンプル希釈溶液を加えなかったウェルには、200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで希釈 buffer を 35 μL ずつ分注する。
- ⑦ 300 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッター、もしくは自動分注装置を用いて⑥のマイクロプレートの各ウェルに FL working solution (115 μL) を分注し、振とう攪拌する (マイクロプレートリーダーにミキシング機能がついている場合は、マイクロプレートをマイクロプレートリーダーに移し、蛍光強度($f_{0 \text{ min}}$)測定の前までに振とう攪拌する)。

<多チャンネルマイクロピペッターを使用する場合>

- ⑧ ⑦のマイクロプレートにプレートシールで蓋をして、速やかに 37 $^{\circ}\text{C}$ に加温したマイクロプレートリーダーに移し、プレートリーダー内で 10 分以上加温する。
- ⑨ 蛍光強度を測定する($f_{0 \text{ min}}$)。
- ⑩ AAPH を Assay buffer に溶解し、AAPH 溶液を調製する。
- ⑪ マイクロプレートの蓋を外し、100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターを用いて、⑨のマイクロプレートの各ウェルに⑩で調製した AAPH 溶液を 50 μL 加える。全ウェルに添加後ピペッティング操作で溶液を混合する (プレートが室温に置かれる時間が少なくなるよう手早く行い、溶液の持ち込みが起らないようチップを交換する)。
- ⑫ ⑪のマイクロプレートにプレートシールで蓋をして、マイクロプレートを速やかにマイクロプレートリーダーに移し、蛍光強度の経時変化を 2 分間隔で 45 回 (90 分間) 測定する ($f_{2 \text{ min}} \sim f_{90 \text{ min}}$ 、ただし AAPH 溶液を注入後 2 分の蛍光強度を $f_{2 \text{ min}}$ する)。なお、マイクロプレートリーダーの蛍光検出波長、検出方向、および蛍光検出の感度は $f_{0 \text{ min}}$ 測定時と同一とすること。

<自動分注装置を使用する場合>

- ⑧ ⑦のマイクロプレート上面にプレートシールを貼り付け、速やかに 37 $^{\circ}\text{C}$ に加温したマイクロプレートリーダーに移す。
- ⑨ 蛍光強度を測定する($f_{0 \text{ min}}$)。
- ⑩ マイクロプレートをマイクロプレートリーダー庫内から取り出す。
- ⑪ AAPH を Assay buffer に溶解し、AAPH 溶液を調製する。
- ⑫ 37 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽の温水を入れたビーカーに、AAPH の入ったチューブを浸す。
- ⑬ 自動分注装置にビーカーごと AAPH の入ったチューブを取り付ける (図 3)。
- ⑭ 自動分注装置の流路を AAPH 溶液で満たす。
- ⑮ ⑩のマイクロプレートを 37 $^{\circ}\text{C}$ に加温したマイクロプレートリーダーに移し、10 分間加温する。
- ⑯ ⑮のマイクロプレートをマイクロプレートリーダー庫内から取り出し、手早くマイクロプレー

トに貼ってあるプレートシールを外す。

⑰ ⑯のマイクロプレートを 37 °C に加温したマイクロプレートリーダーに移し、自動分注装置を用いて、マイクロプレートの各ウェルに⑩で調製した AAPH 溶液を 50 μ L 加える。

⑱ ⑰のマイクロプレートをマイクロプレートリーダー庫内から取り出し、手早くマイクロプレート上面にプレートシールを貼り付ける。

⑲ ⑱のマイクロプレートを 37 °C に加温したマイクロプレートリーダーに移し、混合後、蛍光強度の経時変化を 2 分間隔で 45 回 (90 分間) 測定する ($f_{2 \text{ min}} \sim f_{90 \text{ min}}$ 、ただし AAPH 溶液を注入後 2 分の蛍光強度を $f_{2 \text{ min}}$ する)。なお、マイクロプレートリーダーの蛍光検出波長、検出方向、および蛍光検出の感度は $f_{0 \text{ min}}$ 測定時と同一とすること。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Blank	STD1	STD2	STD3	STD4	STD4	STD3	STD2	STD1	Blank	
C		Sample1 10倍 希釈	Sample2 10倍 希釈	Sample3 10倍 希釈	Sample4 10倍 希釈	Sample5 10倍 希釈	Sample6 10倍 希釈	Sample7 10倍 希釈	Sample8 10倍 希釈	Sample9 10倍 希釈	Sample10 10倍 希釈	
D		Sample1 50倍 希釈	Sample2 50倍 希釈	Sample3 50倍 希釈	Sample4 50倍 希釈	Sample5 50倍 希釈	Sample6 50倍 希釈	Sample7 50倍 希釈	Sample8 50倍 希釈	Sample9 50倍 希釈	Sample10 50倍 希釈	
E		Sample1 250倍 希釈	Sample2 250倍 希釈	Sample3 250倍 希釈	Sample4 250倍 希釈	Sample5 250倍 希釈	Sample6 250倍 希釈	Sample7 250倍 希釈	Sample8 250倍 希釈	Sample9 250倍 希釈	Sample10 250倍 希釈	
F		Sample1 1250倍 希釈	Sample2 1250倍 希釈	Sample3 1250倍 希釈	Sample4 1250倍 希釈	Sample5 1250倍 希釈	Sample6 1250倍 希釈	Sample7 1250倍 希釈	Sample8 1250倍 希釈	Sample9 1250倍 希釈	Sample10 1250倍 希釈	
G		Blank	STD1	STD2	STD3	STD4	STD4	STD3	STD2	STD1	Blank	
H												

図 2 ORAC 予測値算出用プレートのレイアウト(サンプルの希釈倍率はその一例)



図 3 自動分注装置への AAPH 溶液の取り付け例

2.4.3 解析処理

以下の解析処理は、「Template_H-ORAC_1st」の Microsoft エクセルシートを用いて自動で解析できる。

2.4.3.1 AUC の算出

下記の式に従い、Blank、Trolox 標準溶液ならびにサンプル希釈溶液の AUC を算出する。

$$\text{AUC} = (0.5 \times f_{8 \text{ min}} + f_{10 \text{ min}} + f_{12 \text{ min}} + f_{14 \text{ min}} + \dots + f_{88 \text{ min}} + 0.5 \times f_{90 \text{ min}}) / f_{0 \text{ min}} \times 2$$

$f_{8 \text{ min}}$ = 測定開始 8 分後の蛍光強度

$f_{10 \text{ min}} + f_{12 \text{ min}} + f_{14 \text{ min}} + \dots + f_{88 \text{ min}}$ = 測定開始 10 分後から 88 分後まで 2 分間隔で測定される蛍光強度の総和

$f_{90 \text{ min}}$ = 測定開始 90 分後の蛍光強度

$f_{0 \text{ min}}$ = FL 溶液添加後の蛍光強度

2.4.3.2 net AUC の算出

下記の式に従い、Trolox 標準溶液ならびにサンプル希釈溶液の net AUC を算出する。

$$\text{net AUC} = \text{AUC} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

AUC = Trolox 標準溶液ならびにサンプル希釈溶液の AUC

$\text{AUC}_{\text{blank}}$ = Blank での AUC の平均値

2.4.3.3 ORAC 予測値の算出

両対数グラフの X 軸に各 Trolox 標準溶液の濃度($\mu\text{mol/L}$) を、Y 軸に net AUC の平均値をとったグラフより、累乗近似式 ($y = a \cdot x^b$) を算出する。

STD1 の net AUC の平均値と STD4 の net AUC の平均値の間に収まったサンプル希釈溶液の net AUC を用いて、以下の計算方法からサンプルの ORAC 予測値を算出する。複数の希釈倍率で算出可能な場合は、それらの平均値とする。

$$\text{ORAC 予測値 } (\mu\text{mol TE/L}) = \sqrt[b]{\frac{\text{net AUC}}{a}} \times d$$

a, b = Trolox 標準溶液で作成した累乗近似式の a, b

net AUC = サンプル希釈溶液の net AUC

d = サンプル希釈溶液の希釈倍率

2.5 サンプル溶液の ORAC 値算出

2.5.1 サンプル希釈溶液の調製

- ① 測定は 3.4 サンプル溶液の ORAC 予測値の算出と同日中に行う。2.4.1 サンプル希釈溶液の調製において調製し、2.4.3 解析処理において 4 段階の希釈倍率のうち net

AUC が検量線範囲内に少なくとも 1 点が入った希釈倍率のサンプル希釈溶液のうち、最も希釈倍率の低いサンプル希釈溶液(10 倍あるいは 1,000 倍, 100,000 倍・・・の希釈溶液)を測定に用いる。

- ② **2. 4. 3. 3**で算出されたサンプル溶液の ORAC 予測値 ($\mu\text{mol TE/L}$) を 25 で除した値を有効数字 2 桁で丸めた値を求める。
- ③ ①で指定した希釈倍率の全量フラスコあるいは 15mL コニカルチューブに入ったサンプル希釈溶液を転倒混和する。
- ④ ③の溶液を希釈 buffer で②の値の倍率となるように希釈する。希釈にはマイクロピペッターを用い、③のサンプル希釈溶液を最低でも 40 μL 用いる。
- ⑤ ④の溶液を希釈 buffer で 2 倍希釈する。希釈には、マイクロピペッターあるいは多チャンネルマイクロピペッターを用いる。

2.5.2 蛍光強度経時変化の測定

- 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 37 °C に加温する。**2. 4. 2**の①と同一の測定条件となるようにマイクロプレートリーダーを設定する。
- ② プレートレイアウト (図 4) に従い、試料測定用プレートの A 列と H 列のすべての行、B 列から G 列までの第 1 行と第 12 行の各ウェルに 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで Assay buffer あるいは希釈 buffer 35 μL を分注する。
- ③ プレートレイアウト (図 4) に従い、Trolox 標準溶液を 200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで 35 μL ずつ各ウェルに分注する。STD1 は B 列 3 行、B 列 10 行、G 列 3 行、G 列 10 行に、STD2 は B 列 4 行、B 列 9 行、G 列 4 行、G 列 9 行に、STD3 は B 列 5 行、B 列 8 行、G 列 5 行、G 列 8 行に、STD4 は B 列 6 行、B 列 7 行、G 列 6 行、G 列 7 行に分注する。なお、Trolox 標準溶液は、**3. 4. 5**に従って、新たに調製する(**2.4 サンプル溶液の ORAC 予測値の算出**で用いたものを再度用いないこと)。
- ④ Blank (B 列 2 行、B 列 11 行、G 列 2 行、G 列 11 行) には 200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで希釈 buffer を 35 μL ずつ分注する。
- ⑤ サンプル希釈溶液を 200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッターで 35 μL ずつ各ウェルに分注する。プレートレイアウト (図 4、希釈倍率は一例) を参考に、2 段階の希釈倍率の最大 10 サンプルのサンプル希釈液を、同一の試料溶液 (サンプルの種類と希釈倍が同一) はマイクロプレートの中心に対して点対称となるように、2 箇所ウェルに分注する。
- ⑥ プレートレイアウト (図 4) に示したサンプル希釈溶液分注用のウェルのうち、サンプル希釈溶液を加えなかったウェルには、200 μL のマイクロピペッター、もしくは 100 μL あるいは 200

μL の多チャンネルマイクロピペッターで希釈 buffer を 35 μL ずつ分注する。

- ⑦ 300 μL あるいは 200 μL の多チャンネルマイクロピペッター、もしくは自動分注装置を用いて⑥のマイクロプレートの各ウェルに FL working solution (115 μL) を分注し、振とう攪拌する (マイクロプレートリーダーにミキシング機能がついている場合は、マイクロプレートをマイクロプレートリーダーに移し、蛍光強度($f_{0\text{min}}$)測定の前までに振とう攪拌する)。
- ⑧ 3.4.2の⑧以降と同様の操作により、ウェルごとの蛍光強度変化を測定する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Blank	STD1	STD2	STD3	STD4	STD4	STD3	STD2	STD1	Blank	
C		Sample1 10倍 希釈	Sample2 10倍 希釈	Sample3 10倍 希釈	Sample4 10倍 希釈	Sample5 10倍 希釈	Sample6 10倍 希釈	Sample7 10倍 希釈	Sample8 10倍 希釈	Sample9 10倍 希釈	Sample10 10倍 希釈	
D		Sample1 20倍 希釈	Sample2 20倍 希釈	Sample3 20倍 希釈	Sample4 20倍 希釈	Sample5 20倍 希釈	Sample6 20倍 希釈	Sample7 20倍 希釈	Sample8 20倍 希釈	Sample9 20倍 希釈	Sample10 20倍 希釈	
E		Sample10 20倍 希釈	Sample9 20倍 希釈	Sample8 20倍 希釈	Sample7 20倍 希釈	Sample6 20倍 希釈	Sample5 20倍 希釈	Sample4 20倍 希釈	Sample3 20倍 希釈	Sample2 20倍 希釈	Sample1 20倍 希釈	
F		Sample10 10倍 希釈	Sample9 10倍 希釈	Sample8 10倍 希釈	Sample7 10倍 希釈	Sample6 10倍 希釈	Sample5 10倍 希釈	Sample4 10倍 希釈	Sample3 10倍 希釈	Sample2 10倍 希釈	Sample1 10倍 希釈	
G		Blank	STD1	STD2	STD3	STD4	STD4	STD3	STD2	STD1	Blank	
H												

図 4 ORAC 値算出用プレートのレイアウト(サンプルの希釈倍率はその一例)

2.5.3 解析処理

以下の解析処理は、「Template_H-ORAC_2nd」の Microsoft エクセルシートを用いて自動で解析できる。

2.5.3.1 AUC および net AUC の算出

2.4.3.1および2.4.3.2と同様に Trolox 標準液ならびにサンプル希釈溶液の net AUC を求める。

2.5.3.2 ORAC 値の算出

- ① 両対数グラフの X 軸に各 Trolox 標準溶液の濃度(μmol/L) を、Y 軸に net AUC の平均値をとったグラフより、累乗近似式 ($y = a \cdot x^b$) を算出する。
- ② ①の式より、20 μM Trolox に相当する net AUC を算出する。
- ③ 試料溶液ごとに、両対数グラフの X 軸に希釈倍率、Y 軸に net AUC の 2 点をプロットし、その 2 点を通る直線を引く。
- ④ ③の直線から、②の 20 μM Trolox に相当する net AUC に相当する希釈倍率を読み取る (図 5 を参照)。
- ⑤ ④の希釈倍率に 20 を乗じた値を試料溶液の ORAC 値とする。

但し、STD1 の net AUC 平均値と STD4 の net AUC 平均値の間に希釈倍率の異なった 2 つのサンプル希釈溶液の net AUC が 2 つとも当てはまらない場合は、2.4.1 で ORAC 予測値の算出に用いた最低希釈倍率の溶液(試料溶液の 10, 1000 あるいは 100,000・・・倍希釈溶液)を用いて、2.4 サンプル溶液の ORAC 予測値の算出からやり直す。希釈倍率の異なった 2 つのサンプル希釈溶液のうち net AUC が範囲内に 1 つしか当てはまらない場合は、STD1 の net AUC 平均値と STD4 の net AUC 平均値の間に入ったサンプル希釈溶液の net AUC と①の近似式から求めた値を ORAC 予測値とし、2.5.1 サンプル希釈溶液の調製からやり直す。なお、再測定は 2.4.1 で 10 倍希釈サンプル溶液を調製した当日中に行う。

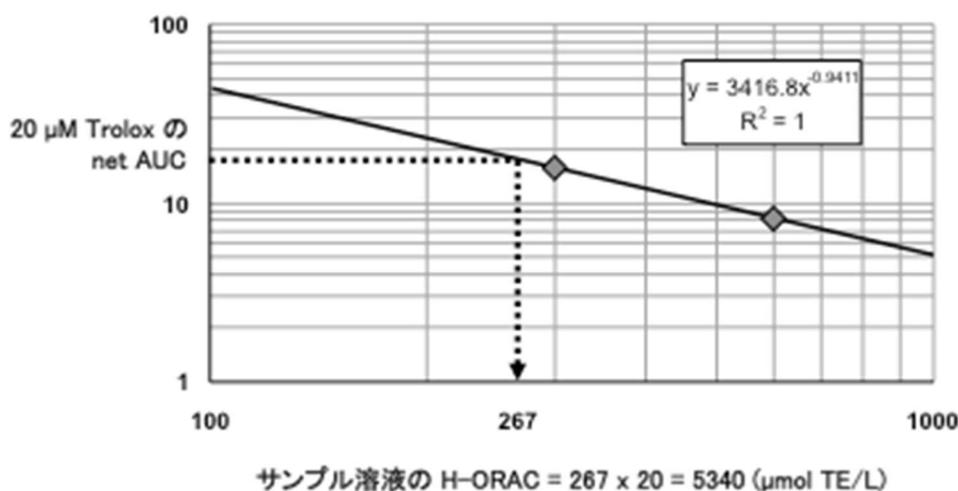


図 5 ORAC 値の算出方法

3. 品質管理

3.1 管理試料溶液(フェルラ酸 100 mg/100mL MWA 溶液の調製)

- ① 薬さじでフェルラ酸 100 ± 2 mg を薬包紙へ量り取る(測り込み量は 0.1 mg 単位で記録する)。
- ② 100 mL 三角フラスコに①のフェルラ酸を移す。
- ③ ②の三角フラスコに MWA 溶液 約 90 mL を加え、マグネットスターラーを用いて攪拌、溶解する。
- ④ 100 mL 全量フラスコへ③の溶液を移し、MWA 溶液で 100 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。

3.2 真度の確認

以下の試験を測定時ごとに実施する。ただし、分析の頻度が週 1 回を越える場合は、最低週 1 回実施する。

2.4 サンプル溶液の ORAC 予測値の算出以降の手順に従って、分析サンプルに加えて管理試料溶液の H-ORAC を測定する。管理試料溶液の H-ORAC 測定値を下式に従って3. 1①の測り込み量で補正した値が $17,552 \pm 1,864 \mu\text{mol TE/L}$ (室間共同試験での平均値 \pm 室間再現標準偏差の 2 倍)の範囲内であることを確認する。

管理試料の H-ORAC 補正值 ($\mu\text{mol TE/L}$) =

$$\text{管理試料の H-ORAC 測定値 } (\mu\text{mol TE/L}) \div \text{測り込み量} \times 100$$

3.3 精度の確認

以下の試験を 4 回の測定あたり 1 回実施する。ただし、分析の頻度が週 1 回を越える場合は、最低月 1 回実施する。

2.4 サンプル溶液の ORAC 予測値の算出以降の手順に従って、管理試料溶液の H-ORAC 測定を 5 反復以上、同一の測定プレートを用いて測定する。下式により求めた測定値の z スコア(z_i)が、いずれも 2 未満であることを確認する。

$$z_i = |x_i - \bar{x}| \div 757$$

z_i : 各測定値の z スコア, x_i : 各測定値の補正值 ($\mu\text{mol TE/L}$), \bar{x} : 測定値補正值の平均 ($\mu\text{mol TE/L}$), 757; 室間共同試験での中間標準偏差 ($\mu\text{mol TE/L}$)

4. 注意点

- ① AAPH はアゾ化合物のため、マスク、手袋を着用し、摂取しないように取扱いには注意する。
- ② 測定は温度によって大きな影響を受けるため、マイクロプレートリーダー庫内の温度が 37°C で安定するまで、温度管理を徹底する。
- ③ 全量ピペットを使用する際は、必ず安全ピペッターを装着して溶液を採取すること。
- ④ マイクロプレート用シールを貼付する際は、手袋を着用し、シールの接着面のうち試料・Trolox 標準液測定用のウェルに貼付される部分には触れないように注意する。また、ウェル上部に折れ目やゆがみがなく密着するようにする。

5. 後片付け

- ① 廃液は事業所の決まりに従って処理する。
- ② 全量フラスコ、全量ピペットは漬け洗いを行う。
- ③ その他の器具について適した方法で後片付けを行う。

【参考文献】

- 1) G, Cao, HM, Alessio, and RG, Cutler, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 303-311 (1993).
- 2) B, Ou, M, Hampsche-Woodill, and RL, Prior, Development and validation of an

- improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J Agric. Food Chem.*, **49**, 4619-4626 (2001).
- 3) RL, Prior, H, Hoang, L, Gu, X, Wu, M, Bacchiocca, L, Howard, M, Hampsche-Woodill, D, Huang, B, Ou, R, and Jacob R, Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples, *J Agric. Food Chem.*, **51**, 3273-3279 (2003).
 - 4) J, Watanabe, T, Oki, J, Takebayashi, and Y, Takano-Ishikawa, Extraction efficiency of hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid extraction and manual extraction, *J. Food Sci.*, **79**, C1665-C1671 (2014).
 - 5) J, Watanabe, T, Oki, J, Takebayashi, K, Yamasaki, Y, Takano-Ishikawa, A, Hino, and A, Yasui, Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts, *Anal. Sci.*, **28**, 159-165 (2012).