

分析結果報告書

平成 20 年 5 月 14 日
第 S0711806 号

ご依頼いただきましたリードアップ抗酸化能の分析結果について下記報告致します。

株式会社同仁グローバル
熊本県上益城郡益城町田原 2081-25
熊本テクノリサーチパーク



1. 依頼者 : マイクロブ・システムズ
2. 検体 : 土壌菌活性剤 リードアップ Lot.7I13
3. 受付番号 : K07112258
4. 検体性状 : 微黄色澄明液体
5. 分析項目 : 抗酸化能分析
6. 分析結果 : 100mmol/L Trolox と同等の抗酸化能を認める。
7. 測定日 : 平成 20 年 4 月 2 日
8. 測定方法 : ESR 法 (日本電子製「電子スピン共鳴装置 JES-FA100」使用)
9. 備考 : 実験詳細を別紙に添付

以上

リードアップ抗酸化能分析

2008/05/14

(株)同仁グローバル
品質保証室 鍋島哲二

1. 概要

現在、抗酸化能測定としては、その検体の還元能で測定する方法、SOD など酵素阻害で測定する方法、遺伝子の損傷を見る方法などがある。

これら現法の問題点は、全てが還元方法であり酸化を制御する作用機序の根本にある活性酸素(フリーラジカル)の挙動を直接測定しているものではない。現在、活性酸素(フリーラジカル)の挙動を直接測定するには、ESR(電子スピン共鳴法)を用いる以外に方法はない。

同仁グローバルは、株式会社同仁化学研究所、熊本大学医学薬学研究部薬物治療学分野 佐藤圭創先生と共同開発した、全血など生体成分でも、素材でも同じ方法で測定できる「ESR による抗酸化能測定方法」(特許出願中)を用い、今回分析を行った。

2. 原理

ラジカル発生酵素で発生させた活性酸素をリノール酸にトラップさせ、リードアップで補足するか DPPMPO で補足させるかを分析する。

検体に抗酸化能があれば DPPMPO がラジカルを補足する前にラジカルを補足する。このため、抗酸化能を持つ既知の標準物質(ここでは、Trolox)と比較して、どの程度ピークが小さくなったかで抗酸化能が測定できる。

3. 検体

K07112258 土壌菌活性剤 リードアップ Lot.7I13

4. 分析結果

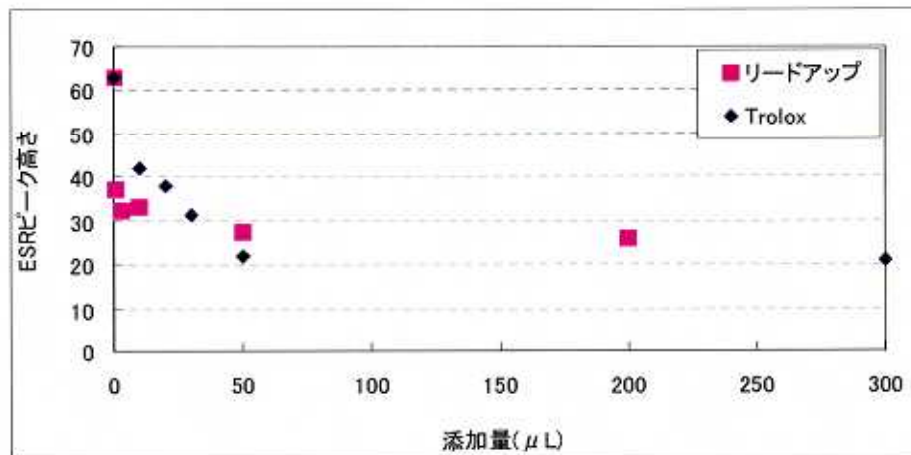
リードアップ Lot.7I13 100mmol/L Trolox と同等の抗酸化能を認める。

5. 実験

実験の手順概要は以下のとおり。

- 1) 遠沈管にラジカル発生酵素(Xanthine oxidase)、緩衝溶液を加えた。
- 2) これに既知量の Trolox 若しくはリードアップを加えた。
- 3) 純水にて各サンプルの体積を合わせた。
- 4) リノール酸及び DPPMPO を加えた後、ヒポキサンチン(補酵素)を加え反応開始した。
- 5) 室温にて 40 分インキュベートした後に反応停止した。
- 6) ラジカルを補足した DPPMPO を有機溶媒で抽出し有機層を ESR でラジカル測定した。
- 7) ESR ピークの減少を見ることで抗酸化能を求め Trolox と比較した。

リードアップを加え、ピーク高さを Trolox と比較した例を以下に示す。



6. 結果

実験は、2 回行い夫々比較した。

結果、実験 1 回目はリードアップ 3 μL を加えると、10mmol/L Trolox 30 μL を加えたときと同等のピーク減少が見られ、実験 2 回目においてはリードアップ 10 μL 加えた際は、10mmol/L Trolox 100 μL を加えたときと同等のピーク減少が見られた。

このため、10mmol/L Trolox の 10 倍量程度のピーク減少が見られるため 100mmol/L Trolox と同等の抗酸化能が認められる。

これ以上リードアップを加えても Trolox ほどのピーク減少は見られず、純水でのピーク高さに比べおよそ半量のところでピークの減少が止まっていることが問題となっている。これに関しては系中に加えた酵素 (Xantine Oxidase) 量が多く、多量のラジカルが存在するため、一旦ラジカルを補足したリードアップからラジカルを放出するという逆反応が起こっているのではないかと考えており、現在、酵素量を含め、実験系に加える各試薬の添加量の最適化を行っている所である。

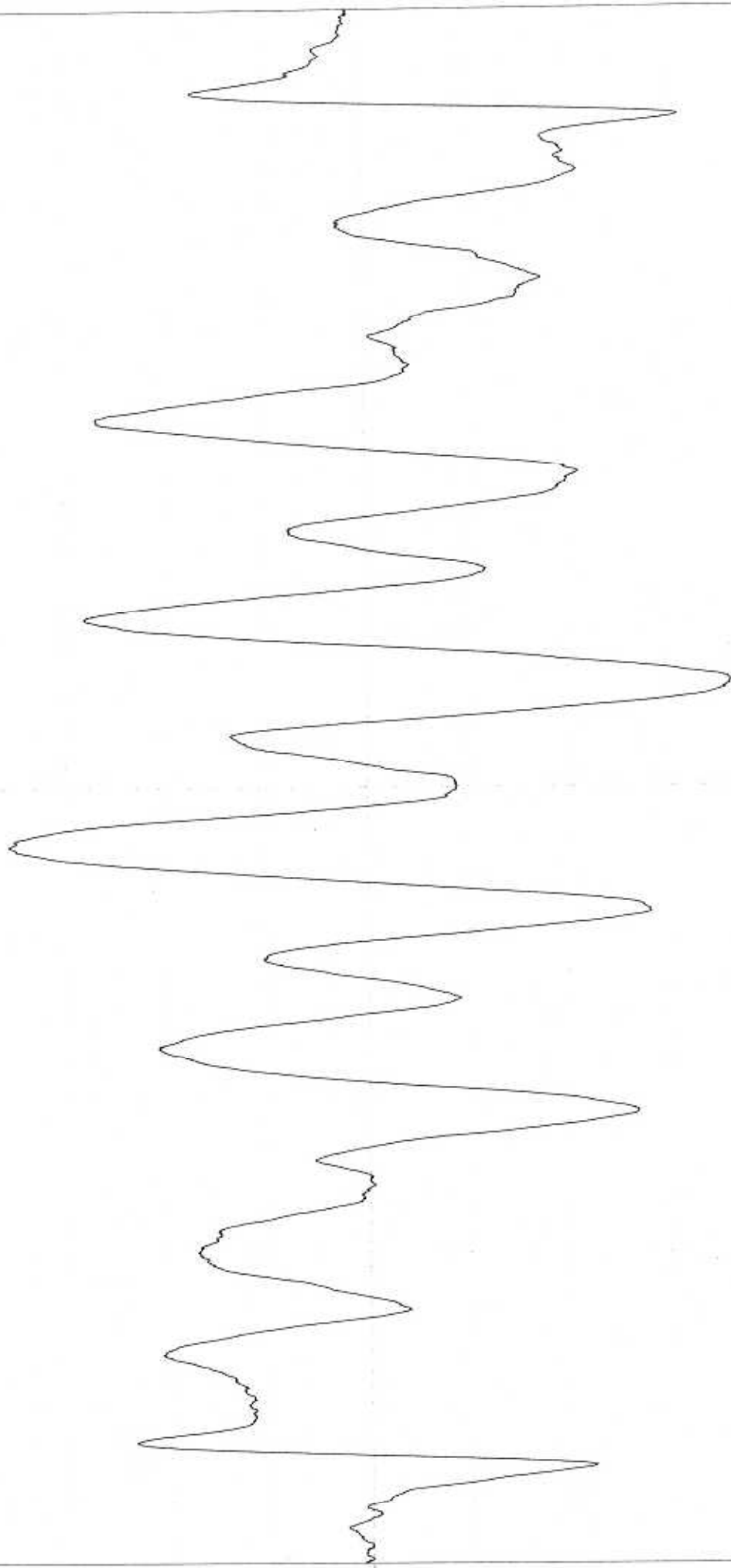
7. 最後に

食材、素材そのものの抗酸化能測定に際しては、濃度依存性がないものが多くあり、これまでの方法では「抗酸化能無し」と判定されています。本法 ESR 法で分析した場合、低濃度で抗酸化能を示し、その後は抗酸化能の濃度依存性を示さない場合も、ラジカル発生量を生体内と同じ低濃度にする事で、抗酸化能が顕著になる場合があります。

リードアップの抗酸化能は、現在のところ 100mmol/L Trolox と同等と思われますが、検討後再測定した場合には抗酸化能力の絶対値に関しては評価方法も含め、今後、低濃度での分析結果を詳細にするため分析手法詳細が変わることもあります。

以上

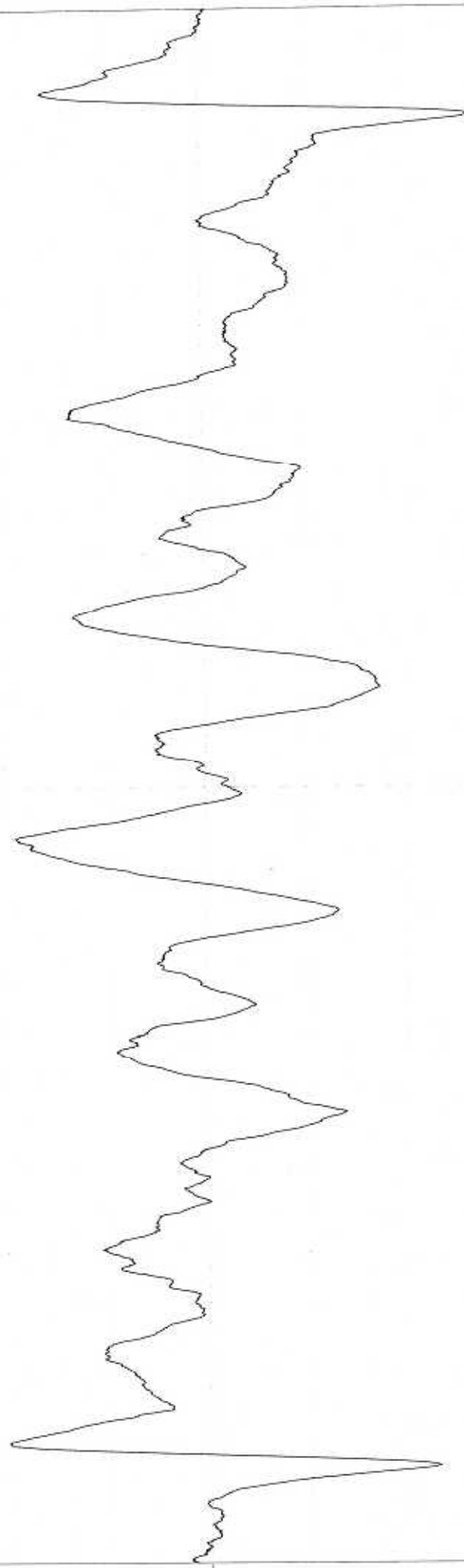
チャート1 純水での ESR ピーク



330.500 [mT] 335.500 [mT] 340.500 [mT]

FREQ=9422.651000 [MHz] FIELD CENTER=335.500[mT] Width=±= 5.000[mT] MOD:Fq=100.00[kHz] Width= 0.3000[mT] TIME CONSTANT=CHI=0.3, CH2=0.03[s] PHASE=CHI=0.00, CH2=0.00 [deg]
 POWER=40.000000 [mW] SWEEP TIME= 2.0[min] ACCUM: 1 AMPLITUDE=CHI=1000.0, CH2=2.0 RECEIVER MODE=CHI=1st, CH2=2nd Mn. 352

チャート2 リードアツブ3μL添加時の ESR ピーク



330,500 [mT] 335,500 [mT] 340,500 [mT]
FREQ=9422.673000 [MHz] FIELD CENTER=335.500[mT] Width+/-= 5.000[mT] MOD:Fq=100.00[kHz] Width= 0.3000[mT] TIME CONSTANT-CH1=0.3, CH2=0.03[s] PHASE-CH1=0.00, CH2=0.00 [deg]
POWER=40.000000 [mW] SWEEP TIME= 2.0[min] ACCUM: 1 AMPLITUDE-CH1=1000.0, CH2=2.0 RECEIVER MODE-CH1=1st, CH2=2nd Min. 352