

Megazyme

酢酸分析法

(アセチル CoA 合成酵素法)

ACETIC ACID

ASSAY PROCEDURE

K-ACET 04/18

K-ACET

(用手法 53 回分*)

* 半量で分析すると検体数は2倍

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

酢酸(塩)は、様々な食品や飲料だけでなく紙、医薬品、工業製品などの他の多くの材料に含まれています。ワイン製造では重要な品質パラメーターの1つであり、醸造工程を通して測定されます。本キット(**K-ACET**)は、アセチルコエンザイムA合成酵素(ACS)が凍結乾燥粉末ではなく、非常に安定性が高く、かつすぐに使用できる硫酸アンモニウム懸濁液として供給されるため、試薬の保存性が大幅に向上しています。また特に赤ワインに含まれるタンニンの影響を防ぐためにポリビニルピロリドン(PVP)もキットに組み込まれています。

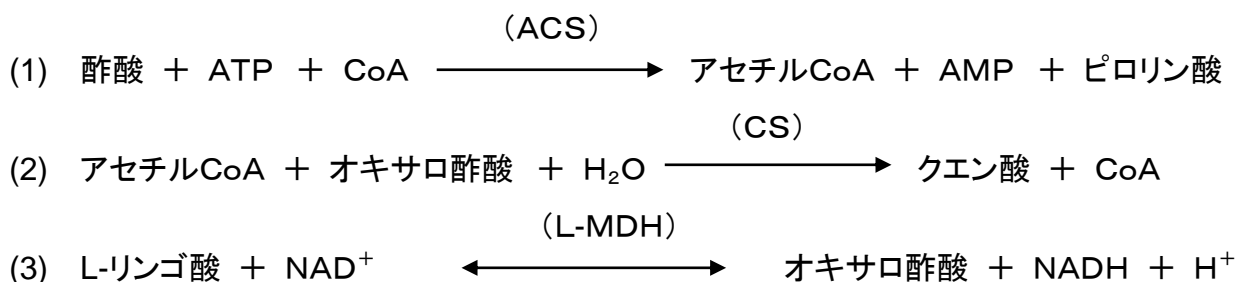
本キットは用手法が推奨ですが、自動分析用に2つの追加キットが用意されています。

K-ACETAF は、定量直線性を 30 $\mu\text{g/mL}$ まで拡張し(最終反応で)、また試薬も安定化されていますので他社製品に見られるような調製試薬の劣化(吸光度の増加)が大幅に解消されています。

K-ACETAK は、酢酸キナーゼを用いた新規測定法です。本法では試薬の劣化が生じず吸光度は酢酸量に応じて化学量論的に変化するため、優れた定量直線性が実現します($R^2 > 0.999$)。双方の自動分析装置法キットのブックレットもご用意可能ですので、日本バイオコンまでご用命ください。

原理 - PRINCIPLE -

アデノシン-5'-三リン酸(ATP)およびコエンザイムA(CoA)の存在下、アセチル-コエンザイムAシンターゼ(ACS)は酢酸(塩)をアセチルCoAに変換し、アデノシン-5'-一リン酸(AMP)およびピロリン酸を生成します(1)。クエン酸シンターゼ(CS)は、アセチルCoAの存在下、オキサロ酢酸をクエン酸に変換します(2)。反応(2)に必要なオキサロ酢酸は、 NAD^+ 存在下、L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(L-MDH)によりL-リンゴ酸から形成され、同時にNADHが生成します(3)。



定量はNADHの生成に基づく 340nm の吸光度増加により測定します。上記の反応は平衡反応であるため、酢酸量は4ページの数式を使用して算出する必要があります。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法は酢酸に対して特異性が高いです。

吸光度差の最小値は 0.005 です。これは最大サンプル量 2.0mL を用いた場合、分析試料中の酢酸濃度 0.07mg/L に相当します(または 0.1mL 使用時 1.4mg/L)。検出限界は最大サンプル量 2.0mL を用いた場合、分析試料中の酢酸濃度 0.14mg/L で吸光度差 0.010 に相当します。

この分析は 0.3~20 μg の酢酸濃度間で直線性を示します。同一サンプルを2本1組で分析した場合、吸光度のバラつきは 0.005~0.010 の範囲で発生し、これは最大サンプル量 2.00mL を用いた場合、酢酸濃度 0.07~0.14mg/L に相当します。各種サンプルの再現性データが Beutler によって公開されており、cv 値が 0.6~2.8% の範囲であることが示されています¹。

サンプル調製中にサンプルが希釈される場合、結果に希釈係数 F を掛ける必要があります。サンプル調製時、例えば 10g/L を秤量する場合、0.02~0.05g/100g の誤差が生じます。

阻害 - INTERFERENCE -

酢酸エステル(酢酸エチルなど)は酢酸と同時に存在することが多いです。酢酸エチルは分析条件でゆっくりと分解され、「クリープ現象」の原因となります。酢酸エステルの影響はA₂分析値をACS添加時に外挿することにより除外できます。またその計算は16分~20分の吸光度を測定し、エクセルベースの MegaCalc™ を使えば簡単です。

(メガザイムHPよりダウンロード可能です。もしくは日本バイオコンまでお問い合わせ下さい)

補正した A₂ 値を元に酢酸濃度を求めます。総酢酸塩濃度(エステルを含む)は、反応が終点に達するまで(吸光度値が安定するまで)測定することで定量できます。

酢酸の変換が分析法で定義された時間(約10~12分)以内に完了している場合、一般に阻害が生じていないと結論付けることができます。また反応終了時のキュベットに酢酸(0.1mL 中に約10μg)を加えることで確認することができます。吸光度が有意に増加すれば、阻害が生じていないことを示します。

試料中の妨害物質の存在は、内部標準を加えることにより確認することができます。標準品の量的な回収が可能ははずです。サンプルの取り扱いおよび抽出におけるロス回収実験、すなわち抽出工程の最初にサンプルに酢酸を添加することによって確認することができます。

安全性 - SAFETY -

すべての化学物質に適用される一般的な安全対策を遵守する必要があります。この製品の安全な使用および取扱いの詳細、SDSについては日本バイオコンまでお問い合わせ下さい。

キット - KITS -

53 検体分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

ボトル1: 緩衝液(30mL、pH 8.4)+ L-リンゴ酸。保存料として 0.02%w/v のアジ化ナトリウム含有。4°Cで2年以上安定です。

ボトル2:(2本) NAD⁺、ATP、PVP、CoA。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル3: L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ+クエン酸シンターゼ懸濁液、1.1mL。
4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: アセチルコエンザイムAシンターゼ懸濁液(1.1mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル5: 酢酸標準液(5mL、0.10mg/mL)。4°Cで2年以上安定です。

試薬溶液／懸濁液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. 付属のボトル1をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。
2. ボトル2の内容物を蒸留水 5.5mL に溶解します。適量ずつポリプロピレン容器に分注し冷凍保存します。-10°C以下で2年以上安定です。使用中は冷蔵又は氷冷にて保管願います。**2本目の容器**は必要になるまで**決して溶解しない**で下さい。
- 3,4. 付属のボトル3, 4をそのまま使用して下さい。最初に開封する前に、ゴム栓に付着した可能性のある酵素を混合するためボトルを振って下さい。その後、ボトルを直立させて保管します。**使用前にボトルを軽く振り混ぜて下さい**。4°Cで2年以上安定です。
5. 付属のボトル5をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。

NOTE: 酢酸標準液は、使われる分光光度計の精度やサンプル中の妨害物質による阻害が疑われる場合にのみ使用します。
 酢酸濃度は、NADHの吸光係数から直接算出します(4ページ)。

機器(推奨):

1. ガラス試験管(丸底、16×100mm)
2. 使い捨てプラスチック製キュベット(光路 1cm、3.0mL)。紫外部対応のもの
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(20μL、100μL)
4. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
 - 5.0mL Combitip® (NAD⁺/ATP/PVP/CoA溶液各 0.2mL 分注用)
 - 25 mL Combitip® (蒸留水 2.0mL、緩衝液 0.5mL 分注用)
5. 分析用天秤
6. 340nm に設定した分光光度計
7. ボルテックスミキサー
8. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
9. ワットマンNo. 1濾紙(9cm 径)

分析手順 - ASSAY PROCEDURE -

波長: 340nm
 キュベット 光路 1cm (ガラスもしくはプラスチック)
 反応温度 約 25°C
 反応最終容量 2.84 mL
 サンプル溶液 酢酸 0.3~20.0μg (サンプル液量を 0.10~2.00mL とした場合)

空気を対照(レファレンス側にセルを入れない)、または水を対照に分析

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル
蒸留水 (約25°C)	2.10 mL	2.00 mL [†]
サンプル溶液	-	0.10 mL [†]
溶液1 (緩衝液)	0.50 mL	0.50 mL
溶液2 (NAD ⁺ /ATP/PVP/CoA)	0.20 mL	0.20 mL
混合*し、試薬添加の約3分後、反応液の吸光度測定(A ₀) 次に以下のものを添加し反応開始:		
懸濁液3 (L-MDH/CS)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、試薬添加の約4分後、反応液の吸光度測定(A ₁)。 次に以下のものを添加し反応継続:		
懸濁液4 (ACS)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約12分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 12分後も反応が終了していない場合、20分まで4分ごとの吸光度変化を測定し、Mega-Calc™を用いてクリープ現象の処理を行なう。		

* プラスチック製スパテルで攪拌するか、キュベット蓋またはパラフィンフィルムでキュベットに蓋をして穏やかに反転させる。

† サンプル量はサンプルと蒸留水添加量合計の範囲で変更可能(サンプル溶液の項参照)

算出法（用手法）

サンプルの吸光度 (A_2) が最初の急速増加の後、緩慢に増加する場合、16、20分後に追加で吸光度の読取りを行い、この「クリープ」速度を計算に加味します。なお Mega-Calc™ を用いると、自動的に補正された A_2 値が得られます。

Mega-Calc™ を使用しないで算出する場合は、まずブランクとサンプル双方の吸光度差 ($A_1 - A_0$) および ($A_2 - A_0$) を算出します。定量に至る反応 (3) は平衡反応であるため、測定された吸光度差と酢酸濃度間に直線的な比例関係は生じないため、 ΔA は以下の式を使用して計算する必要があります。

$$\Delta A = \left[(A_2 - A_0)_{\text{試料}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{試料}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{試料}}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{\text{Bl}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{Bl}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{Bl}}} \right]$$

十分に正確な結果を得るには、 ΔA は少なくとも 0.100 の吸光度差が必要です。

酢酸濃度は、以下のように計算することができます。

$$c = \frac{V \times M_w}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

M_w = 酢酸の分子量

ϵ = 340nm における NADH の分子吸光係数 = 6,300 (L/mol/cm)

d = 光路 (cm)

v = サンプル液量 (mL)

ここでは 0.1mL の例を示します。サンプル量により計算式に補正が必要です。

酢酸濃度は以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.84 \times 60.05}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.2707 \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

サンプルを調製中に希釈した場合は、計算結果に希釈係数 F を乗じる必要があります。固体および半固体サンプルを秤量後分析する場合、含有量 (g/100g) は、秤量値から以下のように算出されます。

酢酸含量

$$= \frac{\text{酢酸濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト (www.megazyme.com) の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme Mega-Calc™ を使用することで簡単に計算できます。

サンプルの調製 - SAMPLE PREPARATION -

1. サンプル希釈

キュベット中に添加される酢酸量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.3~20 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液の酢酸濃度が 0.003~0.20g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定酢酸濃度(g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.20	希釈不要	1
	0.20~2.0	1 + 9	10
	2.0~20	1 + 99	100
	> 20	1 + 999	1000

サンプル吸光度 ΔA の値が低すぎる(例えば<0.100)場合、サンプル量を増やすか、希釈度を下げます。またはサンプルと蒸留水添加量の合計が 2.10mL となるよう、キュベットに添加するサンプル量を 2.00mL まで増やし、計算式のサンプル量を変える方法もあります。

2. サンプルの取扱い

酢酸は揮発性であるため、酸の状態のままサンプルを乾燥または加熱する場合には注意が必要です。酢酸の揮発性は、酢酸を塩の状態(酢酸ナトリウムや酢酸カリウムなど)に変換すれば最小限に抑えることができます。これは乾燥または加熱の前に、1M NaOH または KOH によりサンプルの pH を約 7.5 に調整すれば良いです。

3. サンプルの清澄化

a. 試薬

Carrez I 溶液: ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム $\{K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$ (Sigma P9387 または同等品) 3.60g を 100mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

Carrez II 溶液: 硫酸亜鉛($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma Z4750 または同等品) 7.20g を 100mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

水酸化ナトリウム(100mM NaOH): NaOH 4g を 1L の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

b. 手順

100mL 容メスフラスコに液状試料をピペットで添加、もしくはサンプルを適切量精秤します。蒸留水 60mL を加え、Carrez I 液 5mL、Carrez II 液 5mL および 100mM NaOH 溶液 10mL を順に注意深く加え、添加後にそれぞれ攪拌します。定容後混合し、濾過します。

4. 一般的な注意事項

- 液状試料:** 透明で僅かに着色した程度の、中性に近い液状試料はそのまま分析に使用できます。
- 酸性試料:** 酸性試料 0.1mL 以上を希釈なしで使用する場合(例 ワイン、果汁)は、2M NaOH を用い溶液の pH を 8.4 近くにまで上げ、室温で30分間放置する必要があります。
- 炭酸ガス:** ビールのように炭酸ガスを含む試料は、2M NaOH を用い溶液の pH を 8.4 近くにまで上げ、穏やかに攪拌するか、ガラス棒で攪拌して炭酸ガスを除きます。

- d) **着色した試料**: 反応液にACSを添加しない、試料ブランクが必要な場合があります。
- e) **強く着色した試料**: 強く着色した試料をそのまま分析する場合は、試料 10mL にPVPP (ポリビニルピロリドン) 0.2g を添加して前処理します。試験管を5分間激しく振とうし、Whatman No.1 濾紙で濾過します。
- f) **固体試料**: 固体試料を蒸留水中でホモジナイズまたは粉碎し、必要に応じて濾過します。
- g) **脂肪を含む試料**: 脂肪を含む試料は、脂肪の融点より高い温度の熱水(例 60°C)で、100mL 容メスフラスコ中で抽出します。室温に戻した後に定容します。氷上または冷蔵庫で15~30分間冷却し、脂肪を分離させて濾過します。濾液は最初の数 mL は廃棄し、透明な上清(僅かに白濁していても良い)を分析に使用します。または Carrez 試薬を用いて清澄化します。
- h) **タンパク質を含有する試料**: Carrez 試薬を用いて除タンパクします。

サンプルの調製例

(a) ワイン中の酢酸の定量

白ワインの場合は分析に 0.10mL を用います。酸含有量の低い試料では最大 2.0mL まで使用することが出来ます。酢酸を約 0.2g/L を含む赤ワインの場合、そのまま分析に 0.10mL を用います。酢酸濃度が 0.1g/L 未満の赤ワインの場合、サンプル 10mL あたりPVPP 0.2g を添加し、5分間攪拌して脱色します。一定量を Whatman No. 1 濾紙で濾過し、pH を約 8.4 に調整後、濾過分取サンプルの2倍液量に調整します。分析には最大 2.0mL のサンプルを用い、希釈とサンプル量を考慮して算出します。

試料液量が多い場合、ワインのアルコール濃度が高いと定量系の酵素活性が低下する可能性があります。そのような場合、反応時間を20分まで延長して吸光度測定を続け、反応が終了していることを確認します。通常、1:5 倍希釈とサンプル量 0.1mL で十分です。

(b) 果汁中の酢酸の定量

高濃度の酢酸(約 0.3g/L)を含有する果汁の場合、試料の一定量を等量の蒸留水で希釈し、分析に 0.1mL を用います。試料量を増やしたい場合は、分析前に試料の pH を約 8.4 に調整します。着色果汁は、6ページの「一般的な注意事項(e)」の説明に従い脱色し、分析には 0.10~2.00mL の試料を用います(0.1mL 以上の試料を用いる場合は、pH 8.4 に調整します)。通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.1mL で十分です。

(c) 食酢中の酢酸の定量

希釈表に従ってサンプルを希釈します。通常、1:500 希釈とサンプル量 0.1mL で十分です。

(d) サワードレッシングおよびソース中の酢酸の定量

液体成分から固形分を分離します。サンプル 1g を蒸留水 40mL に加え、100mL に定容します。4°Cで20分間保持し、脂質を分離します。水層の一部を濾過し、最初の数 mL を捨てて、清澄な液を回収します。必要に応じ希釈表に従って希釈します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(e) ビール中の酢酸の定量

濾過またはガラス棒で5分間攪拌してビールを脱気します。希釈せずにそのまま分析します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(f) ハードチーズ中の酢酸の定量

挽いたチーズ約 2g を 100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水 60mL を加えます。フラスコを約 60°C で 20 分間、時折振盪しながら加温します。フラスコを 20~25°C に冷却し、蒸留水で定容します。フラスコを 4°C で 30~60 分間保持して脂質を分離させた後、溶液の一部を Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。分析には透明な濾液を使用します。

通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(g) マヨネーズまたはヨーグルト中の酢酸の定量

サンプル約 5g を 100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水約 50mL を加えます。50~60°C の湯浴で 20 分間、時折攪拌しながら加熱します。フラスコを約 20°C に冷却し、蒸留水で定容します。次にフラスコを冷蔵庫に 30 分間放置して脂質を分離させた後、Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で溶液を濾過し、最初の数 mL は捨て、透明または僅かに白濁した程度の濾液を分析に用います。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

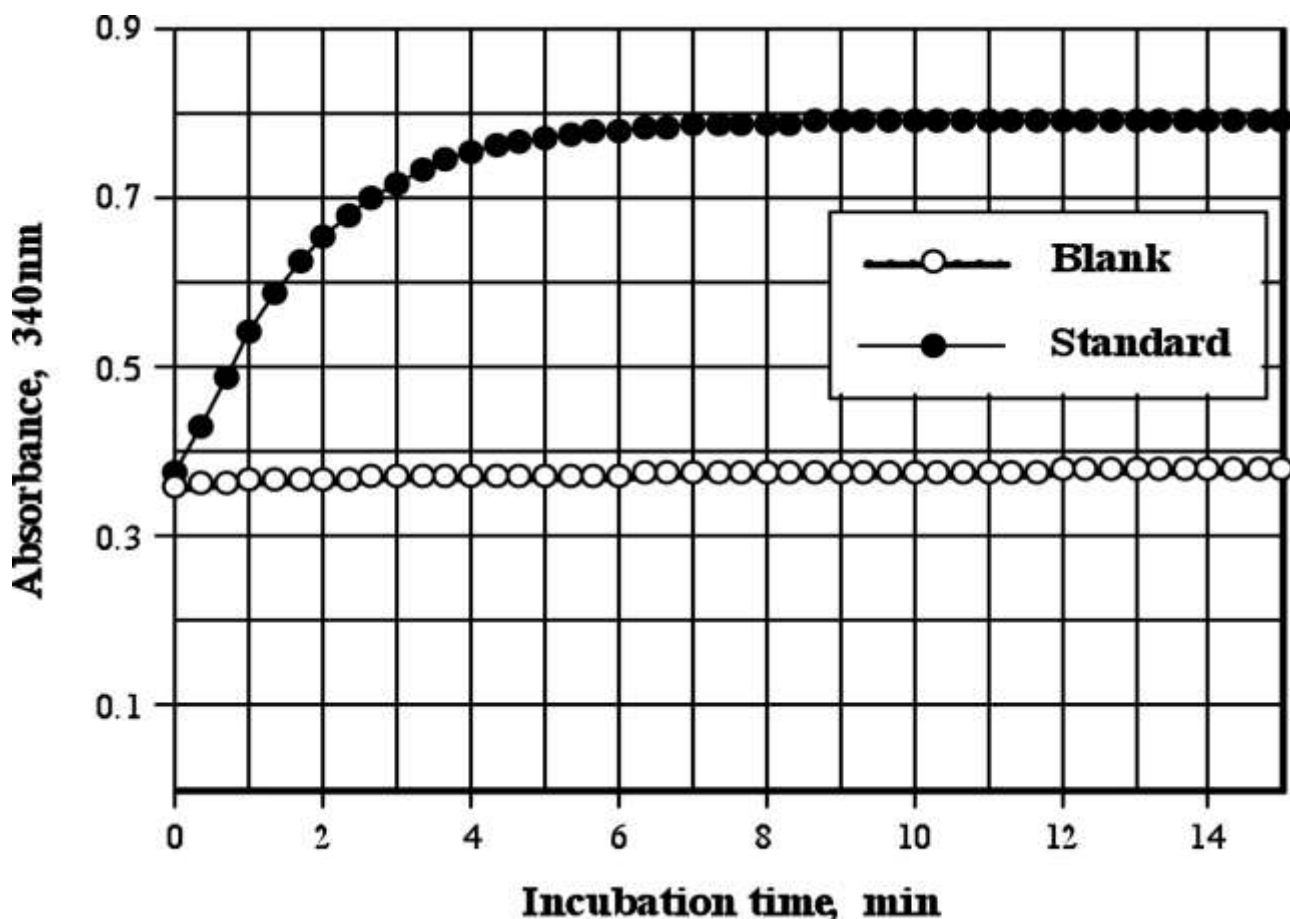


図1. NAD⁺存在下、酢酸 0~35 μ g と L-マレイン酸デヒドロゲナーゼ/クエン酸シンターゼ/アセチルCoA合成酵素の反応による 340nm 吸光度の増加

文献 – REFERENCES –

1. Beutler, H. O. (1988). Determination with Acetyl-CoA Synthetase. *“Methods of Enzymatic Analysis”* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VI, pp. 639-645, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
2. AOAC Official Methods of Analysis (2002). 17th ed., Chapter 32, pp. 47-48.
3. Green, A. (1971). *“Biochemistry of fruits and their products.”* (Hulme, C. H., ed.), Vol 2, Chapter 11, Academic Press, London and New York.
4. Chemistry of Winemaking (1964). Advances in Chemistry Series, 137, A. Dinsmoor Webb. American Chemical Society, pp. 136-137.
5. Rankine, B. (2002). Making good wine. Pan Macmillan Australia Pty. Ltd., Sydney, Australia.

日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル
TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)

E-mail : bj-megazyme@biocon.co.jp

Homepage : <http://www.biocon.co.jp>

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません