

Megazyme

酢酸分析法

(酢酸キナーゼ・マニュアル法)

ACETIC ACID

*(Rapid, Manual, Simple and
End-Point AK/PTA Format)*

ASSAY PROCEDURE

K-ACETRM 04/20

K-ACETRM

(用手法 72 回分*、マイクロプレート法 720 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

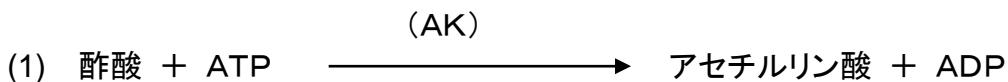
はじめに - INTRODUCTION -

天然に広く存在し、かつ食品、飲料、その他の材料での重要性から、酢酸は最も測定された分析対象の1つと言えます。但し他の一般的な測定対象とは異なり、酢酸の酵素法による定量には大きな制限がありました。例えばアセチルコエンザイムA合成酵素(ACS)法では試薬が不安定、反応が遅い、キュベット反応中の試薬の多段階の添加/吸光度読取りが必要なこと、さらには複雑な計算が必要なことなどです。メガザイムが開発した酢酸分析キット(**K-ACET**)はACS分析系を再構築し、用手法における試薬安定性の問題を改善しましたが、分析操作自体は依然として多段階反応で時間が掛かる測定法でした。

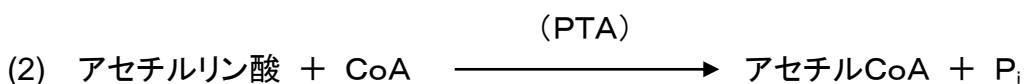
そこでメガザイムは酢酸キナーゼ(AK)とホスホトランスアセチラーゼ(PTA)を採用した本キット(**K-ACETRM**)を開発し、用手法における一連の制限を解決しました。ACS測定系とは異なり、本測定法は迅速(約4分)で、試薬安定性の問題はありません。操作が簡単で直線性が増大し、酢酸濃度に応じて化学量論的に吸光度が変化します(つまり他の酵素キットと同様に、複雑な計算式を使うことなく、生の吸光度データから簡単に算出できます)。**K-ACETRM**は2年以上の安定性を有しており、主要酵素成分をすぐに使用できる硫酸アンモニウム懸濁液として供給しています。ワイン(特に赤ワイン)に含まれるタンニンの影響を防ぐために、ポリビニルピロリドン(PVP)がキットに組込まれています。緩衝液のpH(7.4)は、従来のACS系のpH(8.4)よりも大幅に低いため、クリーブ反応の原因となるエステル其自然加水分解も最小限に抑えられます。

原理 - PRINCIPLE -

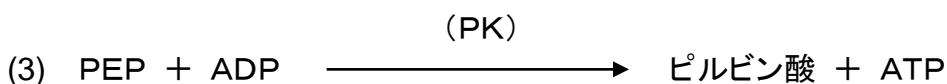
ATPの存在下、酢酸キナーゼ(AK)は、酢酸(塩)をアセチルリン酸とADPに変換します(1)。



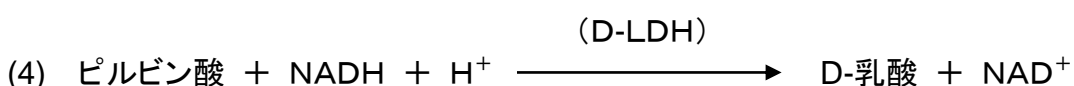
この反応は、コエンザイムA(CoA)存在下、ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)により、アセチルリン酸がアセチルCoAと無機リン酸に変換されることにより、大幅に加速されます(2)。



(1)で生成したADPは、ホスホエノールピルビン酸(PEP)存在下、ピルビン酸キナーゼ(PK)によりATPとピルビン酸に再変換されます(3)。



NADH存在下、D-乳酸デヒドロゲナーゼ(D-LDH)によりピルビン酸はD-乳酸に還元され、同時にNAD⁺が生成します(4)。



この反応で生じるNAD⁺量は酢酸量と化学量論的に同一です。NADH量は340nmの吸光度の減少により測定されます。

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 2.00mL を用いた場合、分析試料中の酢酸濃度 0.063mg/L に相当します(またはサンプル量 0.1mL の場合、1.27mg/L)。検出限界は最大サンプル量 2.00mL を用いた場合、分析試料中の酢酸濃度 0.254mg/L で、吸光度差 0.020 に相当します。

この分析は 0.3~25 μ g 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 0.063~0.127mg/L に相当します。

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 -

酢酸の変換が分析法で定義された時間(約4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 10 μ g)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 -

用手法 72 検体(マイクロプレート法 720 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(24mL、pH 7.4)、防腐剤として 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:** NADH、ATP、PEP、PVP。凍結乾燥粉末。-10°C以下で2年以上安定です。
- ボトル3:(2本)** CoA、凍結乾燥粉末。-10°C以下で2年以上安定です。
- ボトル4:** D-乳酸デヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、ピルビン酸キナーゼ懸濁液(1.5mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル5:** 酢酸キナーゼ懸濁液(1.5mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル6:** 酢酸標準液(5mL、0.10mg/mL)。密封条件下、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 15mL に溶解します。
4°Cで約4週間安定または-10°C以下で2年以上安定です
(凍結／融解の繰り返しを避けるため、ポリプロピレンチューブに小分けして凍結します)。
3. ボトル3の1本を蒸留水 0.8mL に溶解し、-10°C以下で保存します。一度溶解した試薬は-10°C以下で2年以上安定です。必要になるまで、2本目のボトルは溶解しないで下さい。

NOTE : 試薬液を効率良く回収するために、溶解時にボトルを反転させないで下さい。またボトルは直立させて保管して下さい。

- 4,5. 付属のボトル4, 5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。
6. 付属のボトル6をそのまま使用して下さい。密封条件下、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障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®
(緩衝液 0.3mL、NADH/ATP/PEP/PVP溶液 0.2mL 分注用)
- 25 mL Combitip® (蒸留水 2.0mL 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、GF/A ガラス繊維濾紙(9cm 径)

A. 分析手順(用手法) - MANUAL 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	2.66 mL
サンプル溶液	酢酸 0.3~25.0μg (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)	0.30 mL	0.30 mL
溶液2 (NADH/ATP/PEP/PVP)	0.20 mL	0.20 mL
溶液3 (CoA)	0.02 mL	0.02 mL
溶液4 (D-LDH/PTA/PK)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、試薬添加の約2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開始:		
懸濁液5 (AK)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約4分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。		

* 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)

ブランクとサンプルの吸光度差(A₁-A₂)を測定します。サンプルの吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いてΔAを求めます。

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

$$c = \frac{2.66 \times 60.05}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.2535 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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

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

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。

B. 分析手順(マイクロプレート法) - MICROPLATE ASSAY PROCEDURE -

NOTE :

1. 酢酸のマイクロプレート分析手順は一点標準法または検量線法の何れかを使用します。
2. 一点標準法または検量線で測定される酢酸の一連の分析バッチごとに、同一ロットの試薬を用いて一度に分析する必要があります。

分析法

波長:	340nm
マイクロプレート	96穴 (ガラスまたはプラスチック製の底が平らなもの)
反応温度	約25℃
最終反応液量	0.266 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、酢酸 0.1~2.5μg/ウェル

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル	標準
蒸留水	0.210 mL	0.200 mL [†]	0.200 mL
サンプル溶液	-	0.010 mL [†]	-
標準液	-	-	0.010 mL
溶液1 (緩衝液)	0.030 mL	0.030 mL	0.030 mL
溶液2 (NADH/ATP/PEP/PVP)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液3 (CoA)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
溶液4 (D-LDH/PTA/PK)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、試薬添加の約2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開始:			
懸濁液5 (AK)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約4分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。			

* マイクロプレートリーダーの自動攪拌機能を使用、もしくは 50~100μL のピペッティング

† 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(直線性の項参照)

算出法 (マイクロプレート法)

$$g/L = \frac{\Delta A_{\text{試料}}}{\Delta A_{\text{標準}}} \times \text{標準 [g/L]} \times F$$

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。

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、0.3~25 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が 0.0003~0.25g/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)
	< 0.25	希釈不要	1
	0.25~2.5	1 + 9	10
	2.5~25	1 + 99	100
	> 25	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 7.4 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 7.4 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。
- 着色した試料:** 反応液にAKを添加しない、試料ブランクが必要な場合があります。
- 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 (ポリビニルポリピロリドン) 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℃)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 7.4 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 7.4 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 7.4 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℃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℃で20分間、時折振盪しながら加温します。フラスコを20~25℃に冷却し、蒸留水で定容します。フラスコを4℃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℃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℃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。

(h) 生体試料中の酢酸の定量

必要に応じ、生体試料を約80℃で20分間加熱し、分析に影響し得る酵素を失活性させます(または6ページの Carrez 試薬を使用して除タンパクします)。透明な上清を得て、必要に応じ希釈後分析に用います。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

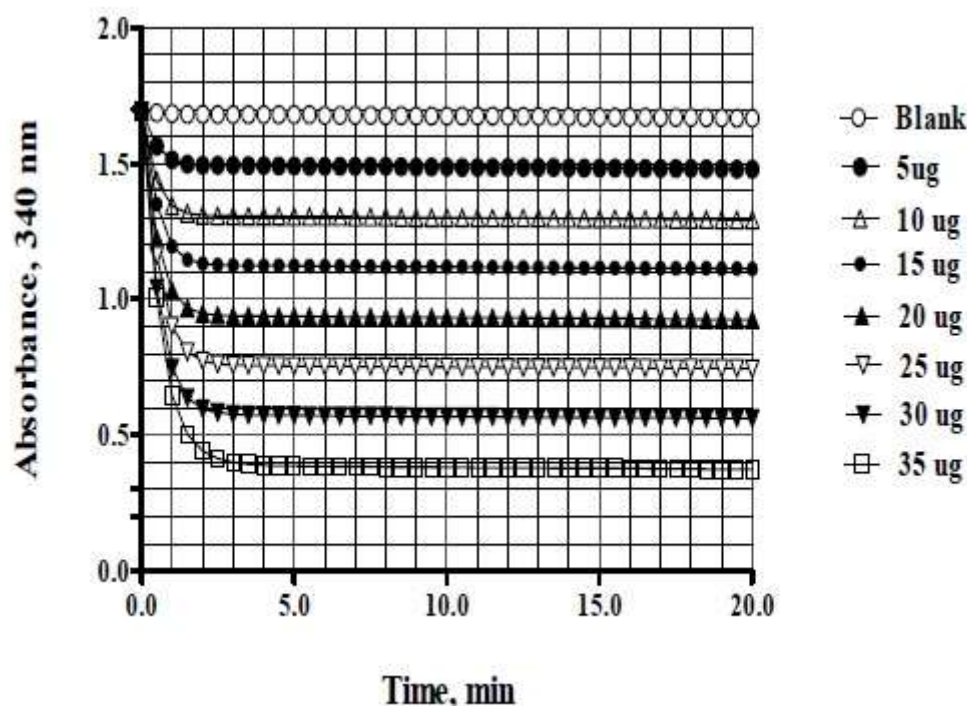


図1. NADH存在下、酢酸 0～35 μ g とAK/PTA系の酢酸キナーゼ反応による 340nm 吸光度の減少

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