

Megazyme

アセトアルデヒド分析法

ACETALDEHYDE

ASSAY PROCEDURE

K-ACHYD 01/20

K-ACHYD

(用手法 50 回分*)

(自動分析法／マイクロプレート法 500 回分)

* 半量で分析すると検体数は2倍

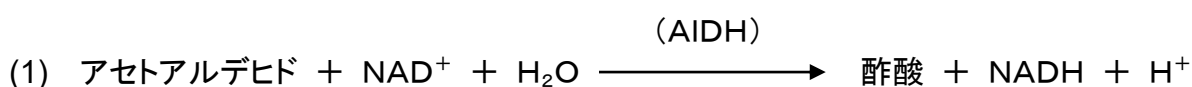
日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

アセトアルデヒドは多くの代謝プロセスで生成されるため、全ての生物で発生する物質です¹。発酵工程が拘わる食品や飲料の生産時にはアセトアルデヒドの濃度がかなり上昇します。アセトアルデヒドは、ワインでは最大 100mg/L まで、ビールでは 20mg/L まで検出されます。ヒト血液中のアセトアルデヒドは、食品や飲料から摂取されるエタノールに起因します。極度のエタノール摂取は、肝臓アルコールデヒドロゲナーゼによるエタノール酸化より生じるアセトアルデヒド中毒に繋がる可能性があります。

原理 - PRINCIPLE -

アセトアルデヒドはNAD⁺存在下、アルコールデヒドロゲナーゼ(AIDH)により酢酸に定量的に酸化されます(1)。



この反応で生じるNADH量はアセトアルデヒド量と化学量論的に同一です。NADH量は340nmの吸光度の増加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 -

AIDHはアセトアルデヒド以外のアルデヒドにも作用しますが、速度は遅いです。ここに記載の分析条件では、アセトアルデヒドとプロピオンアルデヒドが定量的に変換され、反応時間が20分まで延長されるとグリコアルデヒドに変換されます。ベンズアルデヒドとグリセルアルデヒドが存在するとサンプル由来のクリープ現象を引き起こす可能性があり、この場合AIDHの添加時まで外挿する必要があります。

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、分析試料中のアセトアルデヒド濃度 0.044mg/L に相当します。検出限界は最大サンプル量 2.00mL を用いた場合、分析試料中のアセトアルデヒド濃度 0.176mg/L で、吸光度差 0.020 に相当します。

この分析は 0.5~20 μ g のアセトアルデヒド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、アセトアルデヒド濃度約 0.044~0.088mg/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 -

動物抽出物中の物質は分析に影響しません。但し植物材料のポリフェノールは反応速度を低下させる可能性があります。アルコールは、高濃度の場合にのみ影響します。この分析はアスコルビン酸や二酸化硫黄などの還元物質の影響を受けません。

アセトアルデヒドの変換が分析法で定義された時間(約3~4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 (0.1mL 中に約 5 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アセトアルデヒド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 50 検体 (自動分析法 / マイクロプレート法 500 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 (12mL, pH 9.0)。防腐剤として 0.02% w/v 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: NAD⁺。凍結乾燥粉末。-10°C 以下で5年以上安定です。

ボトル3: アルデヒドデヒドロゲナーゼ溶液 (2.75mL)。-10°C 以下で2年以上安定です。

ボトル4: アセトアルデヒド標準品粉末。アセトアルデヒドアンモニア三量体 (約 2g)。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 12mL 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. 付属のボトル3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。-10°C 以下で2年以上安定です。
4. アセトアルデヒドアンモニア三量体約 80mg (アセトアルデヒド約 50mg に相当) を蒸留水 1L に溶解します。分析当日に調製しメジウム瓶にて密封保管します
(2ページの「安全性」、9ページの「サンプル取扱い上の留意点」を参照)。

NOTE: アセトアルデヒド標準液は、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。

アセトアルデヒド濃度は、NADHの吸光係数から直接算出します(4ページ)。

機器 (推奨):

1. メスフラスコ (50mL、100mL)
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、200μL)

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1、NAD⁺溶液各 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(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) 註> キュベット蓋が必要です
反応温度	約 25°C
反応最終容量	2.55 mL
サンプル溶液	アセトアルデヒド 0.5~20.0µg (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)	0.20 mL	0.20 mL
溶液2 (NAD ⁺)	0.20 mL	0.20 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:		
溶液3 (AIDH)	0.05 mL	0.05 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約3~4分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 4分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間 隔で吸光度を測定する**。		

* 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。

** 吸光度 A₂が増加し続ける場合は、吸光度を溶液3の添加時間から外挿する。
(MegaCalc™を利用すると便利です)

† 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(A₂-A₁)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。

アセトアルデヒド濃度は、以下のように計算することができます。

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

ここで:

- V = 最終反応液量 (mL)
Mw = アセトアルデヒドの分子量
 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。

アセトアルデヒド濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.55 \times 44.05}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0.1783 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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。

アセトアルデヒド含量

$$= \frac{\text{アセトアルデヒド濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

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*TMを使用することで簡単に計算できます。

B. 分析手順 (自動分析法) - AUTO-ANALYSER ASSAY PROCEDURE -

NOTE:

1. アセトアルデヒドの自動分析手順は、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アセトアルデヒド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。

R1 試薬調製

組成	液量
蒸留水	48.68 mL
溶液1(緩衝液)	5.50 mL
溶液2(NAD ⁺)	5.50 mL
総液量	59.68 mL

R2 試薬調製

組成	液量
蒸留水	6.00 mL
溶液3(AIDH)	1.35 mL
総液量	7.35 mL

分析法

R1:	0.200 mL
試料	~ 0.01 mL
R2:	0.025 mL
反応温度と時間	37°C反応で約4分
波長	340nm
調製試薬の安定性	冷蔵にて2日間以上
定量法	エンドポイント法
反応方向	増加
直線性	サンプル量 0.01mL 時、アセトアルデヒド約 0.183g/L まで

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

NOTE:

1. アセトアルデヒド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アセトアルデヒド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°C
最終反応液量	0.255 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、 アセトアルデヒドで 0.1~2.0µg/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)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液2 (NAD ⁺)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 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:			
溶液3 (AIDH)	0.005 mL	0.005 mL	0.005 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)。4分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する**。			

* 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

** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合、試料の吸光度は溶液3の添加から外挿する

† 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(直線性の項参照)

算出法（マイクロプレート法）

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

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アセトアルデヒドの量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.5~20 μg の範囲である必要があります。従って試料溶液のアセトアルデヒドが 0.005~0.20g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定アセトアルデヒド濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.20	希釈不要	1
	0.20~2.00	1 + 9	10
	2.00~20	1 + 99	100
	20~200	1 + 999	1000
	> 200	1 + 9999	10000

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. サンプル取扱い上の留意点

- アセトアルデヒドは非常に揮発性が高い(沸点約20 $^{\circ}\text{C}$)ため、サンプルおよび標準品は全て密閉容器に保管する必要があります。
- 蒸発ロスを最小限に抑えるために、アセトアルデヒド含有液は常に緩衝液または水溶液に分注する必要があります。
- アセトアルデヒドは、大気中酸素により容易に酸化されます。そのため調製後極力速やかに分析することが不可欠です。標準溶液は、調製当日に使用する必要があります。
- アセトアルデヒドより揮発性が低く、容易に酸化または重合されないため、標準品にはアセトアルデヒドアンモニア三量体が適しています。

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分量精秤します。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 9.0 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 9.0 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AIDH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 100mL に活性炭 1g を添加して前処理します。試験管を2分間攪拌し、濾過します。
- 固体試料:** 固体試料を蒸留水中でホモジナイズまたは粉砕し、必要に応じて濾過します。
- 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。
- 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) 白ワイン中のアセトアルデヒドの定量

白ワインの pH を 2 M NaOH で約 9.0 に調整し、直ちに分析に供します (0.10-0.50mL)。ワインに亜硫酸塩が含まれている場合、「総アルデヒド」、すなわち遊離アセトアルデヒドと亜硫酸結合アセトアルデヒドの総量が測定されます。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(b) 赤ワイン中のアセトアルデヒドの定量

赤ワインは必要に応じて、分析前に以下の手順で脱色します: メジウム瓶に赤ワイン 25mL と PVPP (ポリビニルポリピロリドン) 0.5g を加えて密栓し約5分間攪拌後、懸濁液の一部を Whatman No. 1 濾紙で直ちに濾過します。濾液は別のメジウム瓶に回収し、回収後直ちに密栓します。分析には基本的に透明かつ無色の濾液を使用します。

通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(c) ビールおよびシャンパン中のアセトアルデヒドの定量

メジウム瓶中で 2M NaOH で pH を約 9.0 に上げ、穏やかに攪拌し、二酸化炭素の脱気を行います。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(d) 果汁、濃縮果汁および関連飲料中のアセトアルデヒドの定量

一般に、透明で中性の溶液のアセトアルデヒド濃度は希釈表による希釈と pH 約 9.0 調整を除き、そのまま測定可能です。一般に混濁液は希釈前に濾過が必要です。着色液は、通常、適切に希釈後分析すれば充分ですが、原液での分析が必要な場合、以下の手順で脱色する必要があります：メジウム瓶に赤ワイン 25mL と PVPP (ポリビニルポリピロリドン) 0.5g を加え密栓し、5 分間攪拌後、懸濁液の一部を Whatman No.1 濾紙で濾過し、別のメジウム瓶で回収後直ちに密封します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(e) 野菜製品中のアセトアルデヒドの定量

野菜製品をキッチャブレンダーでホモジナイズします。ホモジナイズ済サンプルを 100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水 60mL を加え、フラスコを密栓して激しく振盪しアセトアルデヒドを抽出します。メスフラスコを定容し、一定量を Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過し清澄液を得、メジウム瓶に回収後直ちに密封します。必要な場合 Carrez 試薬でさらに清澄化、また必要に応じて希釈し、0.10~0.50 mL のサンプル量を分析に供します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(f) ブランデーなどのリキュール中のアセトアルデヒドの定量

ブランデー類の前処理は不要です。通常、1 : 2 倍希釈とサンプル量 0.2mL で十分です。

文献 - REFERENCES -

Beutler, H. O. (1988). Acetaldehyde. *“Methods of Enzymatic Analysis”* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VI, pp. 606-613, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

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