

Megazyme

アスパルテーム分析法

ASPARTAME ASSAY PROCEDURE

K-ASPTM 08/18

K-ASPTM
(用手法 50 回分*)
(自動分析法 500 回分)
(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

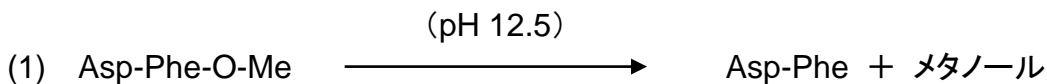
はじめに - INTRODUCTION -

アスパルテームは、L-アスパラギン酸とL-フェニルアラニンメチルエステル(Asp-Phe-O-Me)から成るジペプチド甘味料です。通常の食品中に見られるジペプチドに似た構造でありながらショ糖の200倍の甘さを示すことから1980年代初頭から低カロリーの炭酸飲料やその他の食品に広く用いられてきました。一方、L-フェニルアラニンを含有するため、フェニルケトン尿症患者にとっては厳しく監視されるべき物質です。

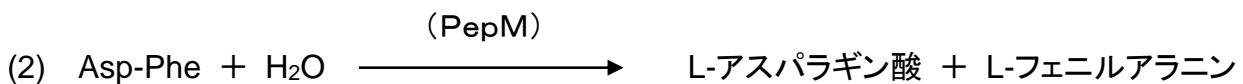
この甘味料のL-アスパラギン酸、L-フェニルアラニン、メタノールの3成分が深刻な健康問題を引き起こすと考える人もいますが、現段階ではそのような主張を裏付ける証拠はありません。

原理 - PRINCIPLE -

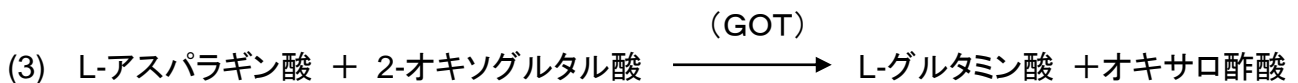
アスパルテームの検出には、最初に高いpHでL-フェニルアラニン残基からメチル基を除去(1)した後、3つの酵素反応が必要です。



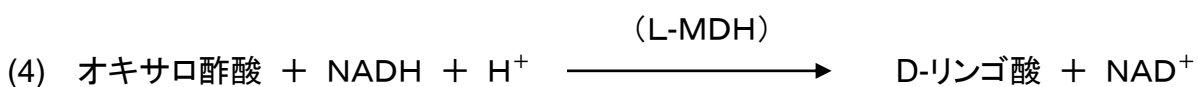
メチル基の除去後、生成物アスパルテーム酸は、特異的なジペプチダーゼ(PepM)により加水分解され、L-アスパラギン酸とL-フェニルアラニンが遊離します(2)。



次にL-アスパラギン酸は、2-オキソグルタル酸の存在下、グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)によりオキサロ酢酸およびL-グルタミン酸に変換されます(3)。



最後にオキサロ酢酸はNADHの存在下、L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(L-MDH)によりL-リンゴ酸およびNAD⁺に変換されます(4)。



この反応で生じるNAD⁺量はアスパルテーム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 -

この測定法はアスパルテームとその分解物であるアスパルテーム酸およびアスパラギン酸に対して特異性が高いです。酵素の添加順序により、抽出物中の遊離アスパラギン酸はPepMによるジペプチドの加水分解前に測定されます。さらに、遊離アスパルテーム酸(脱メチル化アスパルテーム)は、サンプルを脱メチル化せずに分析することで定量することができます。

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、分析試料中のアスパルテーム濃度0.29 mg/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、分析試料中のアスパルテーム濃度0.57 mg/Lで、吸光度差0.010に相当します。

この分析は 10~150 μg のアスパルテーム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、アスパルテーム濃度 0.29~0.57 mg/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 -

アスパルテーム酸の変換が分析法で定義された時間(約5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アスパルテーム酸(1.0mL中に約80 μg)を加えることで確認することができます。吸光度が有意に減少すれば、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アスパルテーム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(12 mL, pH 8.0)。保存剤として 2-オキシグルタル酸と 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:(×2)** NADHと安定化剤。-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とグルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ懸濁液(1.1mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル4:** ペプチダーゼM懸濁液(1.1mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル5:** アスパルテーム標準品粉末(約 1g、有姿当たり約 2.5%w/w のアスパルテーム含有。正確な濃度はバイアルラベルに記載)。

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(必要になるまで2本目は決して溶解しないで下さい)。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)。

- 3,4. 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. アスパルテーム標準品粉末 0.40g を50°Cの蒸留水 80mL に溶解します。室温に戻し100mL に定容して混合します。40mL を分取し攪拌しながら 1M NaOH を滴下してpH 12.5に調整し、10分間攪拌して脱メチル化します。1M HClでpHを約8.0に調整し、pH 電極を最小量の水で洗浄回収します。溶液を 50mL メスフラスコに移し、定容し混合します。この溶液 1.0mL を分析に使用します。
10mL ずつ小分けにし、冷凍保存します。-10°C以下で2年以上安定です。

NOTE : アスパルテーム標準液は、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。
アスパルテーム濃度は、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、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(ボトル1)、NADH溶液各 0.2mL 分注用]
- 25 mL Combitip® (蒸留水 1.0~2.0mL 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 GF/A ガラス繊維濾紙(9cm 径)
10. ホットプレート付マグネティックスターラー

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	2.44 mL
サンプル溶液	アスパルテーム(アスパルテーム酸として) 10~150 µg (サンプル液量を 1.00mL 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)	2.00 mL	1.00 mL [†]
サンプル溶液	-	1.00 mL [†]
溶液1 (緩衝液混合物)	0.20 mL	0.20 mL
溶液2 (NADH)	0.20 mL	0.20 mL
懸濁液3 (L-MDH/GOT)	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開始:		
懸濁液4 (PepM)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約5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。

アスパルテームの濃度は、以下のように計算することができます。

$$c = \frac{V \times Mw}{\epsilon \times d \times v} \times \frac{50}{40} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

Mw = アスパルテームの分子量

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 1.0mL 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。

50/40 = 脱メチル化反応による希釈の補正

アスパルテーム濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.44 \times 294.31}{6300 \times 1.0 \times 1} \times \frac{50}{40} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.1425 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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。

アスパルテーム含量

$$= \frac{\text{アスパルテーム濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

計算例

アスパルテーム標準粉末は 0.4g を 100mL に溶解(即ち、4 g/L)し、そのうち 40mL を脱メチル化に用いるため

$$= \frac{\text{アスパルテーム濃度 [g/L サンプル液]}}{4 \text{ [g/L]}} \times 100 \quad [\text{g}/100\text{g}]$$

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 (自動分析法) - AUTO-ANALYSER ASSAY PROCEDURE -

NOTE:

1. アスパルテームの自動分析手順は、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スパルテーム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
溶液1 (緩衝液)	2 mL
溶液2 (NADH)	2 mL
懸濁液3 (L-MDH/GOT)	0.2 mL
蒸留水	16.5 mL
総液量	20.7 mL

R2試薬調製

組成	液量
懸濁液4 (PepM)	0.2 mL
蒸留水	2.4 mL
総液量	2.6 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5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	減少
直線性	サンプル量 0.01mL 時、アスパルテーム約 1.44g/L まで

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

NOTE :

1. アスパルテーム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スパルテーム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	0.244 mL
直線性	サンプル量 0.01mL 時、アスパルテームで 1~15 µg/ウェル

ピペットでウェルに添加	ブランク	サンプル	標準
蒸留水	0.200 mL	0.100 mL [†]	0.100 mL
サンプル溶液	-	0.100 mL [†]	-
標準液	-	-	0.100 mL
溶液1 (緩衝液)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液2 (NADH)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
懸濁液3 (L-MDH/GOT)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 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開始:			
懸濁液4 (PepM)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約5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)

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

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

キューベット中に添加されるアスパルテームの量(すなわち、試料 1.0mL 中)は、10~150 µg の範囲である必要があります。従って試料溶液のアスパルテームが 0.005~0.15 g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定アスパルテーム濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.15	希釈不要	1
	0.15~1.5	1 + 9	10
	1.5~15	1 + 99	100
	> 15	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 2.00mL 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. サンプルの清澄化

Carrez 試薬はサンプルの清澄化に良く使用されますが、アスパルテーム測定試料の清澄化には使用できません。これらの試薬は、PepMによるアスパルテーム酸の加水分解速度を低下させるだけでなく、試薬がアスパルテームの沈殿を引き起こすと考えられ、アスパルテームを50%も過小評価します。

例えば チョコレートのような高濃度の脂質を含有するサンプルの場合、木炭とクロロホルム処理の組み合わせにより水溶液/懸濁液を清澄化することができます(チョコレートの推奨手順を参照)。

3. 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。
- 着色した試料:** 反応液にPepMを添加しない、試料ブランクの測定が必要です。
- 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、Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。
- 固体試料:** 固体試料を蒸留水中でホモジナイズまたは粉碎し、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。またはクロロホルムを用いて清澄化します(チョコレート試料の手順を参照)。
- タンパク質を含有する試料:** 一般的に特に問題なくそのまま測定できます。

4. アスパルテームの脱メチル化

(a) サンプルの抽出

液状試料: 透明で僅かに着色した程度の、ほぼ中性の液体試料は、そのまま脱メチル化に使用できます。

固体試料: 粉末、キャンディー、ジャム、チョコレートなどの固体および半固体の試料はホモジナイズし、蒸留水でアスパルテームを抽出して濾過します(それぞれの分析例を参照)。

(b) 脱メチル化

アスパルテーム含有液または抽出物 40mL を 100mL ビーカーに加えます。マグネチックスターラーを用い、約25℃にて pH メーターでモニターしながら 1M NaOH を滴下して溶液の pH を 12.5 に調整します。10分間反応後、1M HCl で pH を約 8.0 に調整します (pH 8.0 以下になった場合は、1M NaOH にて再調整します)。これによりアスパルテームはアスパルテーム酸に変換されます。溶液を 50mL 容メスフラスコに移して定容します。

この溶液が透明で僅かに着色している程度であれば、分析にそのまま使用できます。そうでない場合は、活性炭と濾過により脱色して下さい。

サンプルの調製例

(a) 炭酸飲料および果汁中のアスパルテームの定量

100mL ビーカーに炭酸飲料または果汁 40mL を追加します。マグネチックスターラーを用いて約25℃にて pH メーターでモニターしながら 1M NaOH を滴下して溶液の pH を 12.5 に調整します。10分間反応後、1M HCl で pH を約 8.0 に調整します (pH 8.0 以下になった場合は、1M NaOH にて再調整します)。pH 電極を少量 (数 mL) の水で洗浄して全ての試料溶液を回収し、50mL に定容して、完全に混合します。透明で僅かに着色した程度であれば、分析にそのまま使用できます。濁っている場合は濾過します。強く着色した溶液の場合、活性炭 0.1g を加えて脱色します。2分間攪拌し、Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。希釈表を用い、必要に応じて希釈します。分析には 1.0mL を使用します。

(b) 人工甘味料、キャンディー、ミント中のアスパルテームの定量

粉末または粉砕済みの固形物 2g を蒸留水 80mL に攪拌しながら溶解し、100mL に定容します。この溶液 40mL を上述の手順で脱メチル化し、50mL に定容します。必要に応じて濾過し、希釈表を用いて希釈します。分析には 1.0mL を使用します。

(c) チューインガム中のアスパルテームの定量

チューインガム試料の平均的な部分、約 4g を 100mL 容メジウム瓶に精秤します。トルエン 20mL と蒸留水 40mL を加え、ボトルに蓋をしてマグネチックスターラーで約 20 分間 (ガムが完全に分散するまで) スラリーを激しく攪拌します。密栓したポリプロピレン試験管にて 1,500 × g で遠心分離し、上層 (トルエン層) を注意深く取り除き、廃溶媒として廃棄します。下層 (水層) を 100mL 容メスフラスコに移し、蒸留水で定容します。マグネチックスターラーを用いて約25℃にて pH メーターでモニターしながら 1M NaOH を滴下して溶液の pH を 12.5 に調整します。10分間反応後、1M HCl で pH を約 8.0 に調整します (pH 8.0 以下になった場合は、1M NaOH にて再調整します)。pH 電極を少量 (数 mL) の水で洗浄して全ての試料溶液を回収し、50mL に定容して、完全に混合します。分析には 1.0mL を使用します。

(d) ジャム中のアスパルテームの測定。

アスパルテーム含有ジャム 20g を蒸留水 70mL 入りの 200mL ビーカーに加えます。約25℃で20分以上激しく攪拌して溶解させます。100mL 容メスフラスコに全量移し、定容します。200mL ビーカーに移し、活性炭 1g を加えます。2分間攪拌し、Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。濾液 40mL を 100mL ビーカーに分取し、マグネチックスターラーを用いて約25℃にて pH メーターでモニターしながら 1M NaOH を滴下して溶液の pH を 12.5 に調整します。10分間反応後、1M HCl で pH を約 8.0 に調整します (pH 8.0 以下になった場合は、1M NaOH にて再調整します)。pH 電極を少量 (数 mL) の水で洗浄して全ての試料溶液を回収し、50mL に定容して、完全に混合します。分析には 1.0mL を使用します。

(e) チョコレート中のアスパルテームの定量

チョコレート試料の平均的な部分、約 1g を 100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水 80mL を加えます。湯浴にて60℃、20分以上、攪拌しながらチョコレートを完全に分散させます。メスフラスコを定容後、溶液を 200mL ビーカーに移し、活性炭 2g を加え、2分間攪拌し、Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。濾液 40mL を 100mL ビーカーに分取し、9ページの記載に従いアスパルテームを脱メチル化し、50mL に定容します。この段階では、溶液はまだ僅かに濁っています。この濁りは、2つの手順のいずれかで取り除くことができます。

手順1: 溶液の一部を $12,000 \times g$ で10分間マイクロ遠心機で遠心分離します。

手順2: ガラス製遠心管(16×120mm)に溶液 5mL を分取し、クロロホルム 2mL を加え、ポルテックスミキサーで1分間激しく攪拌します。試験管に蓋をして、 $1,500 \times g$ で10分間遠心分離します。分析には、上(水)層 1.0mL を使用します。この溶液では、測定反応の完了に約12分掛かります(註>通常は約5分です)。吸光度にそれ以上の変化がなくなるまで、または吸光度の変化率が一定(クリープ速度)になるまで、反応を継続させます。

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