

Megazyme

D-乳酸(迅速法) / L-乳酸分析法

D-LACTIC ACID (D-LACTATE)
(Rapid)
and
L-LACTIC ACID (L-LACTATE)
ASSAY PROCEDURE

K-DLATE 01/20

K- DLATE
(用手法 50 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

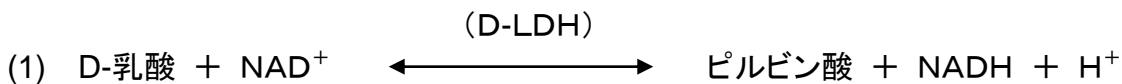
はじめに - INTRODUCTION -

D-および L-乳酸は多くの食品や飲料に含まれています。D-/L-乳酸は乳酸菌により生産され、ヨーグルトやチーズなどの多くの発酵乳製品、さらには酢漬けの野菜、および干し肉や魚肉にも含まれており、自然界に広く存在します。L-乳酸は、酸味が好まれる食品や飲料に添加物として (E270)、また不揮発性の酸味料として広く使用されています。一方、卵産業では L-乳酸は品質指標であり、200mg/kg 以上存在すると汚染または孵化時の腐敗を示します。

同様に、牛乳とフルーツジュースの品質は、D-および L-乳酸含有量測定により評価できます。ワイン産業では、マロラクティック発酵の経過は L-リンゴ酸の低下並びに L-乳酸の増加を追跡することによりモニターします。また D-乳酸の生成はワインの劣化を示します。化学工業では D-乳酸と L-乳酸が共にポリ乳酸や生分解性ポリマーなどの化合物の製造原料であり、化粧品および医薬品においても利用されています。

原理 - PRINCIPLE -

D-乳酸定量には2つの酵素反応が必要です。まずNAD⁺の存在下、D-乳酸デヒドロゲナーゼ (D-LDH) により D-乳酸(塩)が酸化され、ピルビン酸が生成します(1)。

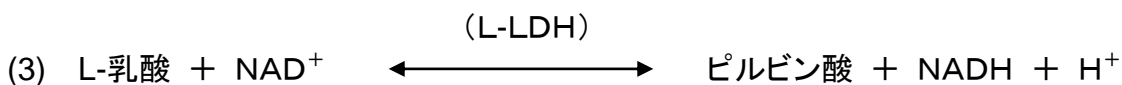


しかし反応(1)の平衡は、D-乳酸とNAD⁺側に大きくシフトしているため、生成物のピルビン酸を「捕捉」するために追加の反応が必要となります。これには大過剰量の D-グルタミン酸の存在下、D-グルタミン酸/ピルビン酸トランスアミナーゼ (D-GPT) により、ピルビン酸を D-アラニンと 2-オキソグルタル酸に変換する方法を用います(2)。



上記の一連の反応において生じるNADH量は D-乳酸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。

L-乳酸(塩)も同様の一連の反応により、NAD⁺の存在下、L-乳酸デヒドロゲナーゼ (L-LDH) (3) によりピルビン酸に酸化されます。



ピルビン酸は大過剰量の D-グルタミン酸の存在下、D-GPTにより再び「捕捉」されます(2)。標準分析法では D-乳酸と L-乳酸の測定は逐次反応による個別に定量する方法ですが、同時に反応させて一括定量することも可能で、この場合反応時間を大幅に短縮することができます。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法は D-乳酸と L-乳酸に対して特異性が高いです。D-乳酸リチウム (MW=96.0) の分析では 96% (w/w) の値が、L-乳酸リチウムでは 98% (w/w) の値が得られるはずですが。

吸光度差の最小値は 0.005 です。これは最大サンプル量 1.50mL を用いた場合、分析試料中の濃度 0.107mg/L (またはサンプル量 0.10mL の場合、1.60mg/L) に相当します。検出限界は最大サンプル量 1.50mL を用いた場合、分析試料中の濃度 0.214mg/L で、吸光度差 0.010 に相当します。

この分析は0.5~30 μ gのD-/L-乳酸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1.50mLを用いた場合、D-/L-乳酸濃度0.107~0.214mg/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 -

D-/L-乳酸の変換が分析法で定義された時間内(D-乳酸で約5分、L-乳酸で約10分)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D-/L-乳酸混合物(0.1mL中にそれぞれ約15 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D-/L-乳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 -

50検体のD-乳酸とL-乳酸を逐次分析できる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:(2本)** 緩衝液(25mL, pH 10.0) + D-グルタミン酸。
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:(2本)** NAD⁺。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル3:** D-グルタミン酸/ピルビン酸トランスアミナーゼ懸濁液(2.2mL)。
4°Cで2年以上安定です。
- ボトル4:** L-乳酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(1.1mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル5:** D-乳酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(1.1mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル6:** D-/L-乳酸標準液(5mL、それぞれ0.15mg/mL)。
防腐剤として0.02%(w/v)のアジ化ナトリウム含有。
密封条件下、4°Cで2年以上安定です。

試薬溶液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS (SUPPLIED) -

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。

NOTE: 反応速度を速くするために、このキットでは飽和濃度に近い D-グルタミン酸が採用されています。従って長期間保管した場合、D-グルタミン酸が僅かながらボトルの底に結晶化する可能性があります。これは無視しても分析に影響を及ぼしませんが、温水中で時折り振り混ぜながら、溶液が透明になるまで加温することで再溶解することが出来ます。

2. ボトル2の1本の内容物を蒸留水 5.5mL に溶解します。
4°Cで約4週間または-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)。
2本目のボトルは必要となるまで溶解しないで下さい。
- 3,4,5. 付属のボトル3, 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: D-/L-乳酸標準液は、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。
D-/L-乳酸濃度は、NADHの吸光係数から直接算出します(4ページ)。

機器(推奨):

1. 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、1mL)
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⁺ 0.1mL 分注用)
- 25 mL Combitip® (緩衝液1 0.5mL 分注用)
5. 分析用天秤
6. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
7. 340nm に設定した分光光度計
8. ボルテックスミキサー
9. ワットマン No.1 濾紙(9cm 径)

A. 分析手順 (D-乳酸分析)

- MANUAL ASSAY PROCEDURE (for D-lactic acid) -

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	2.24 mL
サンプル溶液	D-乳酸 0.5~30µg (サンプル液量を 0.1~1.5mL 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)	1.60 mL	1.50 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 ⁺)	0.10 mL	0.10 mL
懸濁液3 (D-GPT)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、試薬添加の約3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 (D-LDH)	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)。 5分後も反応が終了していない場合、1分間の吸光度変化がなくなるまで1分間隔で吸光度を測定する** (6ページ、図1)。		

* 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。

** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合は、吸光度(ブランクとサンプル)を懸濁液5の添加時間から外挿する。

† 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(サンプル溶液の項参照)

算出法 (D-乳酸分析)

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_{D-lac} を求めます。

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

D-乳酸の濃度は、以下のように計算することができます:。

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

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

Mw = D-乳酸の分子量

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。

D-乳酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.24 \times 90.1}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{D-lac} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.3204 \times \Delta A_{D-lac} \quad [\text{g/L}]$$

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。

D-乳酸含量

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

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 (L-乳酸分析)

- MANUAL ASSAY PROCEDURE (for L-lactic acid) -

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	2.24 mL
サンプル溶液	L-乳酸 0.5~30µg (サンプル液量を 0.1~1.5mL 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)	1.60 mL	1.50 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 ⁺)	0.10 mL	0.10 mL
懸濁液3 (D-GPT)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、試薬添加の約3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 (L-LDH)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約10分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 10分後も反応が終了していない場合、5分間の吸光度変化がなくなるまで5分間隔で吸光度を測定する** (6ページ、図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。

** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合は、吸光度(ブランクとサンプル)を懸濁液4の添加時間から外挿する。

† 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(サンプル溶液の項参照)

算出法 (L-乳酸分析)

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_{L-lac}を求めます。

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

L-乳酸の濃度は、4ページのD-乳酸測定法と同様にして計算します。

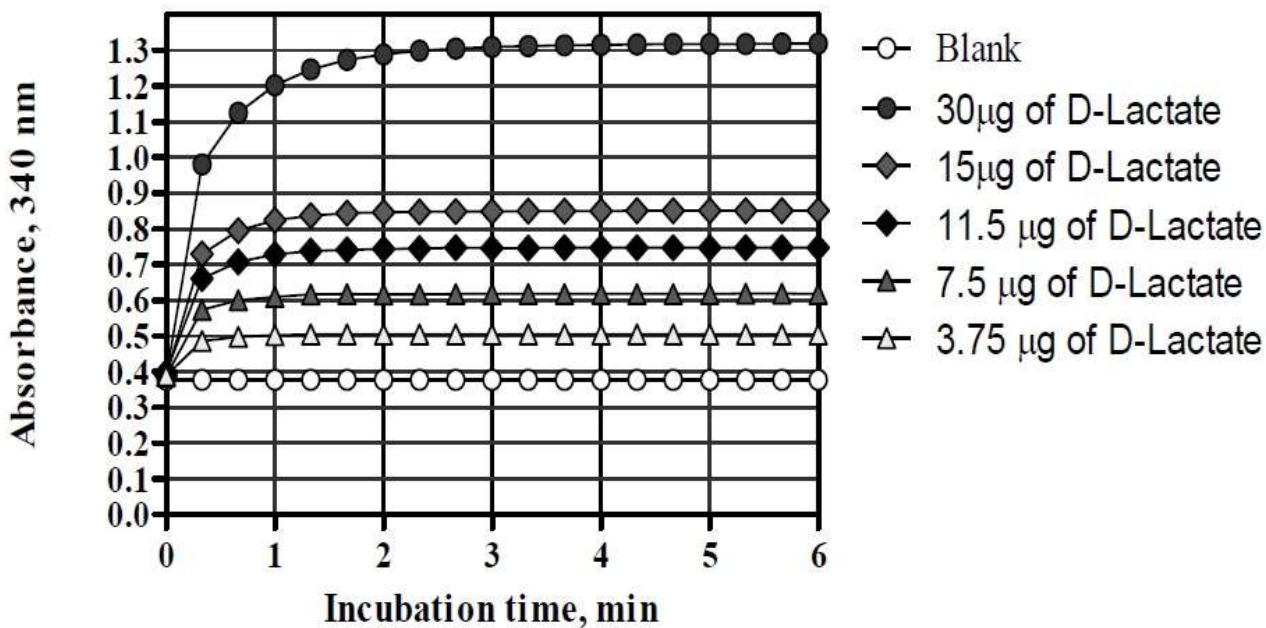


図1. NAD^+ 存在下、D-乳酸 3.75~30 μg と D-乳酸デヒドロゲナーゼ + D-グルタミン酸 / ピルビン酸トランスアミナーゼ反応による 340nm の吸光度増加

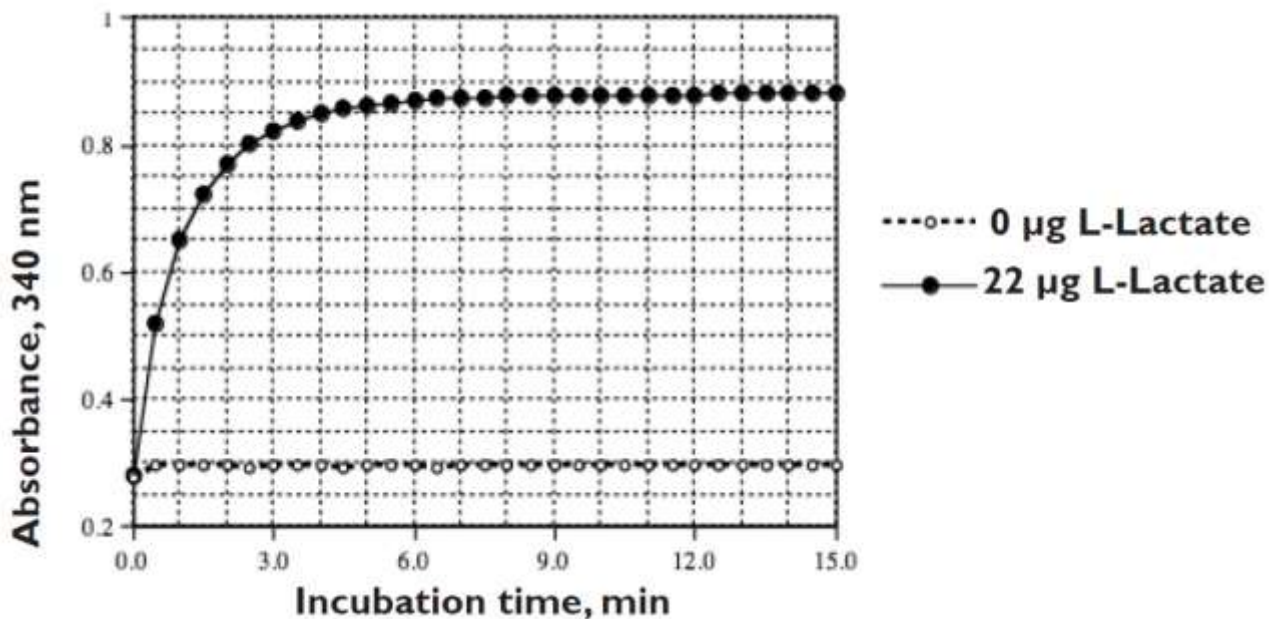


図2. NAD^+ 存在下、L-乳酸 22 μg と L-乳酸デヒドロゲナーゼ + D-グルタミン酸 / ピルビン酸トランスアミナーゼ反応による 340nm の吸光度増加

C. 分析手順 (逐次分析法)

- MANUAL ASSAY PROCEDURE (for sequential assay) -

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 2.24 mL (D-乳酸)、2.26 mL (L-乳酸)
 サンプル溶液 総乳酸 0.5~30 μ g (サンプル液量を 0.1~1.5mL 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)	1.60 mL	1.50 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 ⁺)	0.10 mL	0.10 mL
懸濁液3 (D-GPT)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、試薬添加の約3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 (D-LDH)	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)。 5分後も反応が終了していない場合、1分間の吸光度変化がなくなるまで1分間隔で吸光度を測定する** (10ページ、図3)。		
懸濁液4 (L-LDH)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約10分)後、反応液の吸光度測定 (A ₃)。 10分後も反応が終了していない場合、5分間の吸光度変化がなくなるまで5分間隔で吸光度を測定する** (10ページ、図3)。		

* 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。

** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合は、吸光度(ブランクとサンプル)を懸濁液4または5の添加時間から外挿する。

† 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(サンプル溶液の項参照)

算出法 (逐次分析)

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_{D-lac} を求めます。次にブランクとサンプルの吸光度差 (A₃-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_{L-lac} を求めます。

十分に正確な結果を得るには、 ΔA_{D-lac} 、 ΔA_{L-lac} は少なくとも 0.100 の吸光度差が必要です。

D-乳酸の濃度は、以下のように計算することができます。

$$c = \frac{V \times Mw}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D-lac} \quad [g/L]$$

L-乳酸の濃度は、以下のように計算することができます。

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

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

Mw = 乳酸の分子量

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。

D-乳酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.24 \times 90.1}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{D-lac} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.3204 \times \Delta A_{D-lac} \quad [\text{g/L}]$$

L-乳酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.26 \times 90.1}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{L-lac} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.3232 \times \Delta A_{L-lac} \quad [\text{g/L}]$$

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。

D-乳酸/L-乳酸含量

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

D. 分析手順（総乳酸量分析法）

- MANUAL ASSAY PROCEDURE (for total lactic acid) -

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	2.26 mL
サンプル溶液	総乳酸 0.5~30μg（サンプル液量を 0.1~1.5mL 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）	1.60 mL	1.50 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 ⁺ ）	0.10 mL	0.10 mL
懸濁液3（D-GPT）	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、試薬添加の約3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（D-LDH）	0.02 mL	0.02 mL
懸濁液4（L-LDH）	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了（約10分）後、反応液の吸光度測定（A ₂ ）。		
10分後も反応が終了していない場合、5分間の吸光度変化がなくなるまで5分間隔で吸光度を測定する**（10ページ、図4）。		

- * 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。
- ** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合は、吸光度(ブランクとサンプル)を懸濁液4と5の添加時間から外挿する。
- † 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(サンプル溶液の項参照)

算出法 (総乳酸)

ブランクとサンプルの吸光度差 ($A_2 - A_1$) 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_{lac} を求めます。

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

総乳酸の濃度は、以下のように計算することができます。

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

ここで:

- V = 最終反応液量 (mL)
- Mw = 乳酸の分子量
- 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。

総乳酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.26 \times 90.1}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{lac} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.3232 \times \Delta A_{lac} \quad [\text{g/L}]$$

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。

総乳酸含量

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

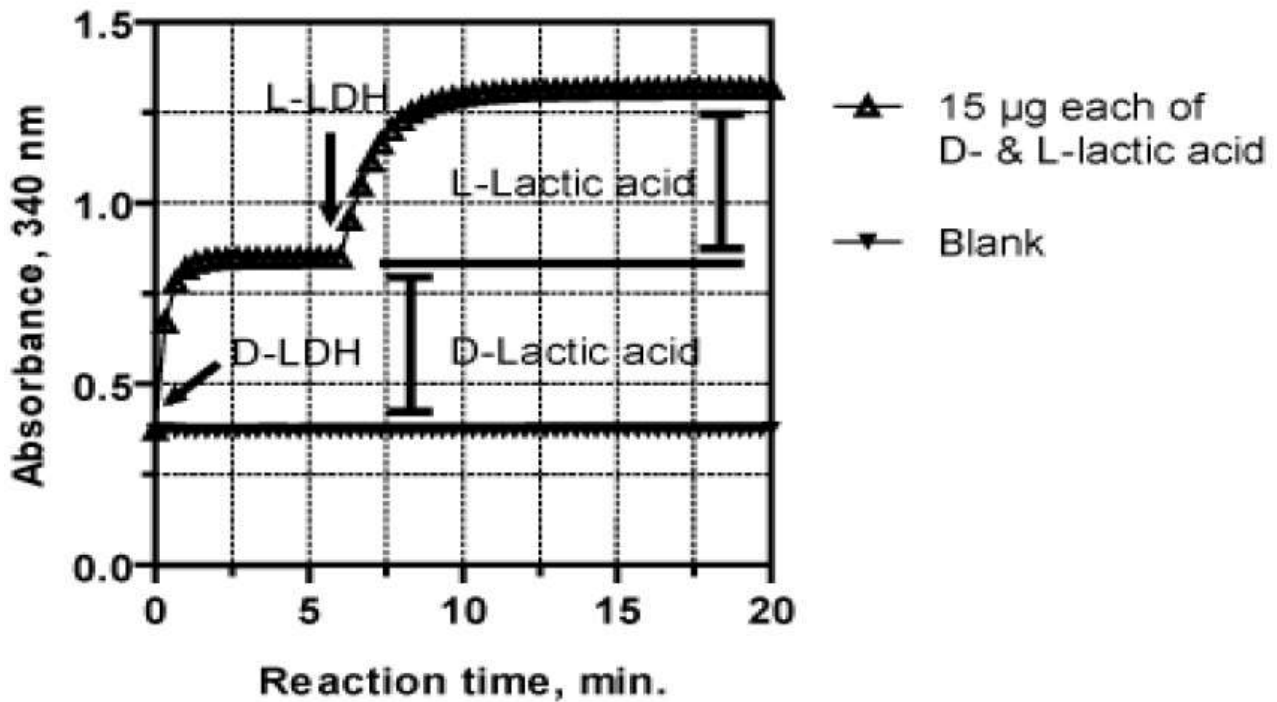


図3. D-／L-乳酸定量の逐次分析

D-およびL-乳酸をそれぞれ15 μ g(総乳酸を30 μ g)に対し、NAD⁺並びにD-グルタミン酸／ピルビン酸トランスアミナーゼ存在下、D-LDH、続いてL-LDHを逐次反応させ、340nmの吸光度増加を測定(光路長1cm、25 $^{\circ}$ C)。

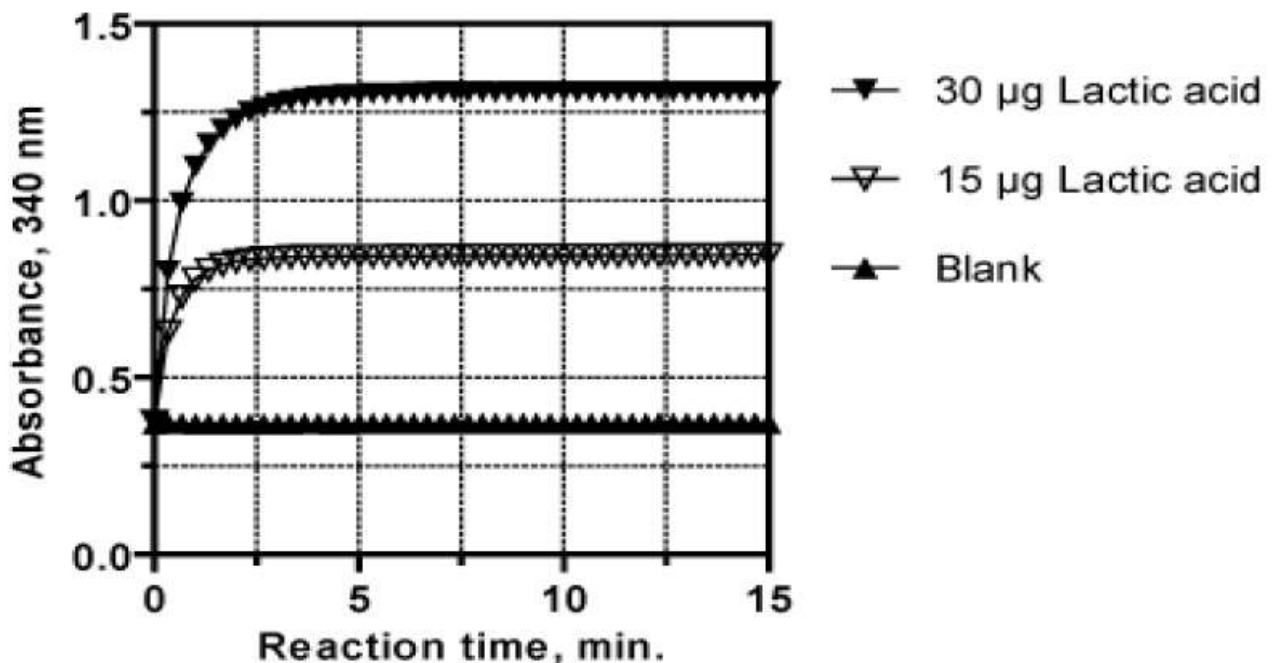


図4. 総乳酸量の定量

D-およびL-乳酸をそれぞれ15 μ g(総乳酸を30 μ g)に対し、NAD⁺並びにD-グルタミン酸／ピルビン酸トランスアミナーゼ存在下、D-LDHとL-LDHを同時に反応させ、340nmの吸光度増加を測定(光路長1cm、25 $^{\circ}$ C)。

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 D-/L-乳酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.5~30 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液の D-/L-乳酸が 0.005~0.30g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定 D-/L-乳酸濃度(g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.30	希釈不要	1
	0.30~3.0	1 + 9	10
	3.0~30	1 + 99	100
	> 30	1 + 999	1000

サンプル吸光度 ΔA_{D-lac} 、 ΔA_{L-lac} 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 1.60mL となるよう、キュベットに添加するサンプル量を 1.50mL 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

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。

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。
- 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 10 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 10 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D-LDH(またはL-LDH)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。
- 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 $^{\circ}$ 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**: 等容量の氷冷した 1M 過塩素酸を混合しながら加えて除タンパクします。1,500g で10分間遠心分離し、上清を 1M KOH で中和します。または Carrez 試薬を用いて清澄化します。

サンプルの調製例

試薬

濃 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) 30g を 200mL の蒸留水に溶解します。室温で保存して下さい。

濃 Carrez II 溶液: 硫酸亜鉛 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma Z4750 または同等品) 60g を蒸留水 200mL に溶解します。室温で保存して下さい

(a) ワイン中の遊離 D-および L-乳酸の定量

白ワインおよび赤ワイン中の遊離 D-/L-乳酸濃度[F]の測定は、一般的に前処理不要です(希釈表による希釈を除く)。通常、1:10 希釈とサンプル量は 0.1 mL で十分です。

(b) ワイン中の遊離およびエステル化 D-および L-乳酸の定量

白ワインおよび赤ワイン中の遊離およびエステル化された D-/L-乳酸[F+E]の濃度は、次の方法で測定します。

ワイン 20mL に 2M NaOH 2mL を加え、15分間攪拌しながら還流します。冷却した後、1M硫酸で溶液の pH を 10.0 に注意深く調整し蒸留水で 100mL に定容します。その後、便宜希釈し、一般的な手順に従ってサンプルを分析します。

通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.1 mL で十分です。

得られた濃度は遊離およびエステル化 D-または L-乳酸の合計[F+E]であり、エステル化した D-または L-乳酸自体の濃度[E]は以下の式で算出できます。

$$[E] = [F+E] - [F] \quad [g/L]$$

(c) ビール中の D-および L-乳酸の定量

ビール中の D-または L-乳酸濃度は通常、ガラス棒で約1分攪拌して炭酸ガスを除くだけで測定できます。通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.2mL で十分です。

(d) ヨーグルトおよびミルク中の D-および L-乳酸の定量

ホモジナイズしたヨーグルト約 1g またはミルク 10g を、蒸留水 60mL 入りの 100mL 容メスフラスコに精秤します。Carrez I 試薬 2mL、Carrez II 試薬 2mL、100mM NaOH 溶液 4mL を順に加え、添加ごとに攪拌します。蒸留水で定容後、混合して濾過します。通常、希釈は不要で、サンプル量はヨーグルトの場合は 0.1mL、牛乳の場合は 1.0mL で十分です。

(e) チーズ中の D-および L-乳酸の定量

すりおろしたチーズ約 1g を、蒸留水約 70mL 入りの 100mL 容メスフラスコに精秤します。60°C で20分間、または完全に分散するまで時々振とうしながら加熱します。蒸留水で定容後、冷蔵庫(または氷水)に約20分間入れ、脂肪を分離して濾過します。

通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.1mL で十分です。

(f) 酢並びに酢含有液中の D-および L-乳酸の定量

酢やピクルス液の D-および L-乳酸濃度の定量は必要な場合の濾過、希釈表による希釈以外は一般的に前処理不要です。通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.1mL で十分です。

(g) ザワークラウトジュース中の D-および L-乳酸の定量

ザワークラウトジュースの D-または L-乳酸濃度は、必要な場合の濾過、希釈表による希釈以外は一般的に前処理不要です。通常、1 : 100 の希釈とサンプル量 0.1mL で十分です。

(h) 食肉製品中の D-および L-乳酸の定量

ホモジナイズしたサンプル約 5g を 1M 過塩素酸 20mL 入りのビーカーに精秤し、Ultra-turrax®(または同等のもの)で5分間ホモジナイズします。蒸留水約 40mL を加え、pH 試験紙を用い 2M KOH で pH を約 10.0 に調整します。内容物を 100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します(脂肪層が発生した場合、これが標線より上にあり、界面が標線上にあることを確認)。冷蔵庫(または氷水)に約20分間入れて脂肪の分離並びに過塩素酸カリウムを沈殿させます。濾過し、濾液の最初の数 mL を捨て、透明な、または僅かに白濁した程度の上清を分析に使用します。通常、1 : 2 で希釈し、サンプル量は 0.1mL で十分です。

(i) 液状全卵中の D-および L-乳酸の定量

全卵サンプルを激しく攪拌してホモジナイズし、約 10g を蒸留水約 20mL 入りの 50mL 容メスフラスコに精秤します。*n*-オクタノールを2滴加え、100°C 近くで時折り攪拌しながら15分間煮沸し、その後冷却します。次に濃 Carrez I 試薬 2mL、濃 Carrez II 試薬 2mL を順に添加し、添加後に混合します。0.1M NaOH で定容し、十分に混合してから濾過します。通常、希釈は不要で、サンプル量は汚染卵や孵化卵の場合 0.1mL、新鮮卵では 0.5mL で十分です。

全卵粉末の L-乳酸含有量測定の場合、全卵粉末約 2g を蒸留水 25mL 入りの 50mL 容メスフラスコに精秤し混合後、*n*-オクタノールを2滴加えます。濃 Carrez II 試薬を加えた後に 1M NaOH で pH 9.0 に調整し蒸留水で定容すること以外は上記工程と同様に進めます。通常、希釈は不要で、サンプル量は低品質の卵粉末の場合 0.1mL、高品質の卵粉末の場合 0.5mL で十分です。

(j) 野菜ジュース、フルーツジュース、類似飲料中の D-および L-乳酸の定量

D-/L-乳酸濃度が 0.35g/L 以下になるよう希釈します(希釈表を参照)。透明かつ中性の液体試料は通常前処理なしで測定できます。混濁液の場合は通常、希釈前に濾過すれば充分です。

着色野菜ジュース(トマトジュースなど)で脱色が必要な場合は、以下のようにします。

ホモジナイズしたサンプル約 5g を 60mL の蒸留水入りの 100mL 容メスフラスコに精秤します。次に Carrez I 試薬 2mL、Carrez II 試薬 2mL、0.1M NaOH 4mL を順に添加し、添加後に混合します。蒸留水で定容し、混合して濾過します。通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.1mL で十分です。

着色フルーツジュース(オレンジジュースなど)で脱色が必要な場合は、以下のようにします。

25mL の濾過済みサンプルを 2M NaOH で約 pH 10.0 に調整します。50mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。ビーカーに移し、PVPPを 1g を加え5分間激しく攪拌した後、Whatman No.1 (9 cm) の濾紙で濾過します。通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.1mL で十分です。

(k) 全血試料中の D-および L-乳酸の定量

全血サンプル 1mL をマイクロ遠心チューブで約80℃、20分間加熱した後、13,000×g で10分間遠心して上清を回収します。濃 Carrez 試薬 II 20μL を添加して十分に混合し、次に濃 Carrez 試薬 I 20μL を添加して十分に混合します。サンプルを再度 13,000×g で10分間遠心し、清澄な上清を回収します。必要に応じてサンプルを蒸留水で便宜希釈します。

NOTE： 清澄上清の最終容量は、元試料の約 1/4 量になります。
従って、分析に必要な上清液量を勘案して出発試料の液量を決めて下さい。

(l) 生体組織試料中の D-および L-乳酸の定量

生体組織の平均的な部分 5g を精秤し、100mL 容メジウム瓶に入れます。1M 過塩素酸 20mL を添加し、Ultra-turrax® や Polytron® ホモジナイザー (または同等のもの) を使用して2分間ホモジナイズします。50mL 容ガラスビーカーに全量を移し、2M KOH を用いて pH をおよそ 8.0 に調整します。100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します (脂肪含有層が「標線より上」にあり、水界面が「標線上」にあることを確認する)。20分間氷冷して過塩素酸カリウムを沈殿させ、脂肪層があれば分離します。適量のサンプルを 13,000×g で10分間遠心するか、あるいは Whatman® No.1 濾紙で濾過し、最初の 3~5 mL を捨てた後の濾液を回収して得た清澄上清を分析に用います。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。

NOTE： 使用する出発材料の量や容量は、試料の分析対象物含量に応じて
適宜調整して下さい。

(m) 尿や血清など体液試料中の D-および L-乳酸の定量

一部の体液試料では、希釈以外の前処理なしで直接分析が可能なものがあります。そうでない場合、過塩素酸またはトリクロロ酢酸の何れかをを用いた除タンパクが必要かも知れません。

等量の氷冷した1M過塩素酸を混合しながら添加し、除タンパクします。試料の一部を 1,500×g で10分間遠心分離するか、あるいは Whatman® No.1 濾紙で濾過し、最初の 3~5mL を捨てた後の濾液を回収して得た清澄上清を分析に用います。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。あるいは、過塩素酸の代わりに 50% (w/v) のトリクロロ酢酸を使用します。

文献

1. Noll, F. (1988). L-(+)-Lactate. "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VI, pp. 582-588, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
2. Gawehn, K. (1988). D-(-)-Lactate. "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VI, pp. 588-592, 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