

# Megazyme

---

## D-リンゴ酸(塩)分析法

### D-MALIC ACID (D-MALATE) ASSAY PROCEDURE

K-DMAL 04/20

K-DMAL  
(用手法 100 回分\*)  
(自動分析法 1100 回分)  
(マイクロプレート法 1000 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**

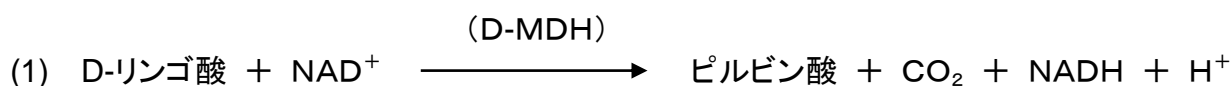
## はじめに - INTRODUCTION -

自然界では、リンゴ酸は基本的に全て L 体で生成されます(例外は、D-リンゴ酸を生成する特殊な微生物です)。搾りたてのフルーツジュースには検出限界レベル(約 10mg/L)の D-リンゴ酸が含まれています。リンゴ酸は産業的には無水マレイン酸の水和により D-/L-ラセミ混合物として製造され、酸味料および風味増強剤として食品用クエン酸に代替することができます。フレーバーフルーツ飲料、ジュース、ワイン等に使われています。ジュースまたはワインから D-リンゴ酸が検出されると、これが添加されたことを示しています。

D-/L-リンゴ酸のジュースまたはワインへの使用に関する法的状況は国によって異なります。

## 原理 - PRINCIPLE -

D-リンゴ酸(塩)はNAD<sup>+</sup>の存在下、D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(D-MDH)によりオキサロ酢酸に酸化されます。次にD-MDHはオキサロ酢酸をピルビン酸と二酸化炭素に変換します(1)。



この連続反応で生じるNADH量は D-リンゴ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。

## 特異性、感度、直線性と精度

### - SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

D-MDHは D-リンゴ酸を急速に酸化しますが、L-酒石酸にも僅かに作用します。D-MDHに同濃度の D-リンゴ酸と L-酒石酸を作用させた場合(分析当たり各 40 $\mu$ g)、D-リンゴ酸との反応は影響されず5分以内に完了し、また L-酒石酸の変換による吸光度の影響は僅かです(D-リンゴ酸の3%以下)。一方 L-酒石酸が過剰に存在する場合は、赤ワインと白ワインの D-リンゴ酸の測定例を参考にして下さい[サンプル調製例(a)、7ページ]。

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、分析試料中の濃度 0.13mg/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、分析試料中の濃度 0.26mg/L で、吸光度差 0.010 に相当します。

この分析は 0.5~40 $\mu$ g の D-リンゴ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、D-リンゴ酸濃度 0.13~0.26mg/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-リンゴ酸の変換が分析法で定義された時間(約6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 D-リンゴ酸(0.1mL中に約 20 $\mu$ 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必ずです。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-リンゴ酸を添加することによって確認することができます。

赤ワイン中のタンニンは、僅かですが阻害を引き起こす可能性がありますので、その可能性がある場合は内部標準法等により確認する必要があります。またD-MDHを除いたサンプルブランクを測定し、非酵素的な吸光度の緩やかな増加(クリープ現象)がみられる場合は、以下の計算式を使用します。

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{試料}} - (A_2 - A_1)_{\text{試薬 BL}} - (A_2 - A_1)_{\text{試料}}$$

吸光度測定の精度は、内部標準を添加し分析することで評価できます。  
これには付属の D-リンゴ酸標準液を用います

## 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 100 検体(自動分析法 1100 検体、マイクロプレート法 1000 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(25mL, pH 8.0)。保存剤として 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:(2本)** NAD<sup>+</sup>。-10°C以下で5年以上安定です。

**ボトル3:** D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(2.2mL)。  
4°Cで2年以上、-10°C~-15°Cで4年以上安定です。

**ボトル4:** D-リンゴ酸標準液(5mL, 0.2mg/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 11mL 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)。  
必要となるまで2本目のボトルは溶解しないで下さい。
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。4°Cで2年以上、-10°C~-15°Cで4年以上安定です。
4. 付属のボトル4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-リンゴ酸標準液は、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-リンゴ酸濃度は、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)
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<sup>+</sup>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)
反応温度	約 25°C
反応最終容量	2.42mL
サンプル溶液	D-リンゴ酸 0.5~40µg (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)	2.00 mL	1.00 mL <sup>†</sup>
サンプル溶液	-	1.00 mL <sup>†</sup>
溶液1 (緩衝液)	0.20 mL	0.20 mL
溶液2 (NAD <sup>+</sup> )	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 <sub>1</sub> ) 次に以下のものを添加し反応開始:		
懸濁液3 (D-MDH)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約6分)後、反応液の吸光度測定(A <sub>2</sub> )。 6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。

\*\* リンゴ果汁では5~6分で反応が終了するが、オレンジまたはグレープフルーツ果汁では10分、赤白ワインでは約12分を要する。

† 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（用手法）

サンプルの吸光度増加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3（D-MDH）の添加時間から外挿します。

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  $\Delta A$  を求めます。

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

D-リンゴ酸の濃度は、以下のように計算することができます。

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

### ここで：

V = 最終反応液量 (mL)

Mw = D-リンゴ酸の分子量

$\epsilon$  = 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-リンゴ酸濃度は以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.42 \times 134.09}{6300 \times 1.0 \times 1.0} \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.0515 \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

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。

### D-リンゴ酸含量

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

NOTE： 上記は、メガザイムウェブサイト ([www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)) の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*<sup>TM</sup> 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. D-リンゴ酸の自動分析手順は、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 D-リンゴ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。

### R1 試薬調製

組成	液量
蒸留水	45.6 mL
溶液1(緩衝液)	5.5 mL
溶液2(NAD <sup>+</sup> )	5.5 mL
総液量	56.6 mL

### R2 試薬調製

組成	液量
蒸留水	6.53 mL
懸濁液3(D-MDH)	0.55 mL
総液量	7.08 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6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、D-リンゴ酸約 0.38g/L まで

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

### NOTE :

1. D-リンゴ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 D-リンゴ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透明で底が平らなもの)

反応温度 約25℃  
 最終反応液量 0.242 mL  
 直線性 サンプル量 0.01~0.20 mL 時、D-リンゴ酸 0.1~4μg/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	0.210 mL	0.100 mL <sup>†</sup>	0.100 mL
サンプル溶液	-	0.100 mL <sup>†</sup>	-
標準液	-	-	0.100 mL
溶液1 (緩衝液)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液2 (NAD <sup>+</sup> )	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
混合*し、試薬添加の約5分後、反応液の吸光度測定(A <sub>1</sub> ) 次に以下のものを添加し反応開始:			
懸濁液3 (D-MDH)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約6分)後、反応液の吸光度測定(A <sub>2</sub> )。6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」がブランクのものより大きい場合は、ブランク、サンプルとも吸光度を懸濁液3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(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 D-リンゴ酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.5~40μg の範囲である必要があります。従って試料溶液の D-リンゴ酸が 0.005~0.40g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

推定 D-リンゴ酸濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
< 0.4	希釈不要	1
0.4~4.0	1 + 9	10
4.0~40	1 + 99	100

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 8.0 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 8.0 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D-MDH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°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:** 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

### (a) 赤白ワイン中の D-リング酸の定量

ワイン 25mL に水酸化カルシウム 125mg を加え、2分間攪拌します。1M KOH で pH7~8 に調整後、50mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。溶液を 100mL 容ビーカーに移し、PVPP 0.5g を加え、懸濁液をマグネチックスターラーで5分間攪拌します。溶液の一部を Whatman No.1 (9 cm) 濾紙で濾過し、無色透明な濾液 1.0~2.0mL を分析に供します。

約12分反応後、ブランクとサンプル双方の吸光度差 ( $A_2 - A_1$ ) を測定します。必要な場合、その後3分間隔で測定し、クリープ現象による吸光度増加分を求めます。



### (b) リンゴ果汁中の D-リンゴ酸の定量

リンゴ果汁 25mL を 2M KOH で pH 約7~8 に調整後、50mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。100mL 容ビーカーに移し、PVPP 0.5g を加え、懸濁液をマグネチックスターラーで5分間攪拌します。溶液の一部を Whatman No.1 (9cm) 濾紙で濾過し、無色透明な濾液 1.0~2.0mL を分析に供します。

約5~6分反応後、ブランクとサンプル双方の吸光度差 ( $A_2 - A_1$ ) を測定します。

### (c) 柑橘類果汁(グレープフルーツやオレンジなど)中の D-リンゴ酸の定量

果汁 25mL を 2M KOH で pH 約7~8 に調整後、50mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。100mL 容ビーカーに移し、PVPP 0.5g を加え、懸濁液をマグネチックスターラーで5分間攪拌します。溶液の一部を Whatman No.1 (9cm) 濾紙で濾過し、無色透明な濾液 1.0~2.0mL を分析に供します。

約10分反応後、ブランクとサンプル双方の吸光度差 ( $A_2 - A_1$ ) を測定します。

必要な場合、その後2分間隔で測定し、クリーブ現象による吸光度増加分を求めます。

### (d) 濃色果汁(チェリー、黒、赤スグリなど)の D-リンゴ酸の定量

果汁 25mL を 2M KOH で pH 約7~8 に調整後、100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。200mL 容ビーカーに移し、PVPP 1g を加え、懸濁液をマグネチックスターラーで5分間攪拌します。溶液の一部を Whatman No.1 (9cm) 濾紙で濾過し、無色透明な濾液 1.0~2.0mL を分析に供します。

約12~14分反応後、ブランクとサンプル双方の吸光度差 ( $A_2 - A_1$ ) を測定します。

必要な場合、その後2分間隔で測定し、クリーブ現象による吸光度増加分を求めます。

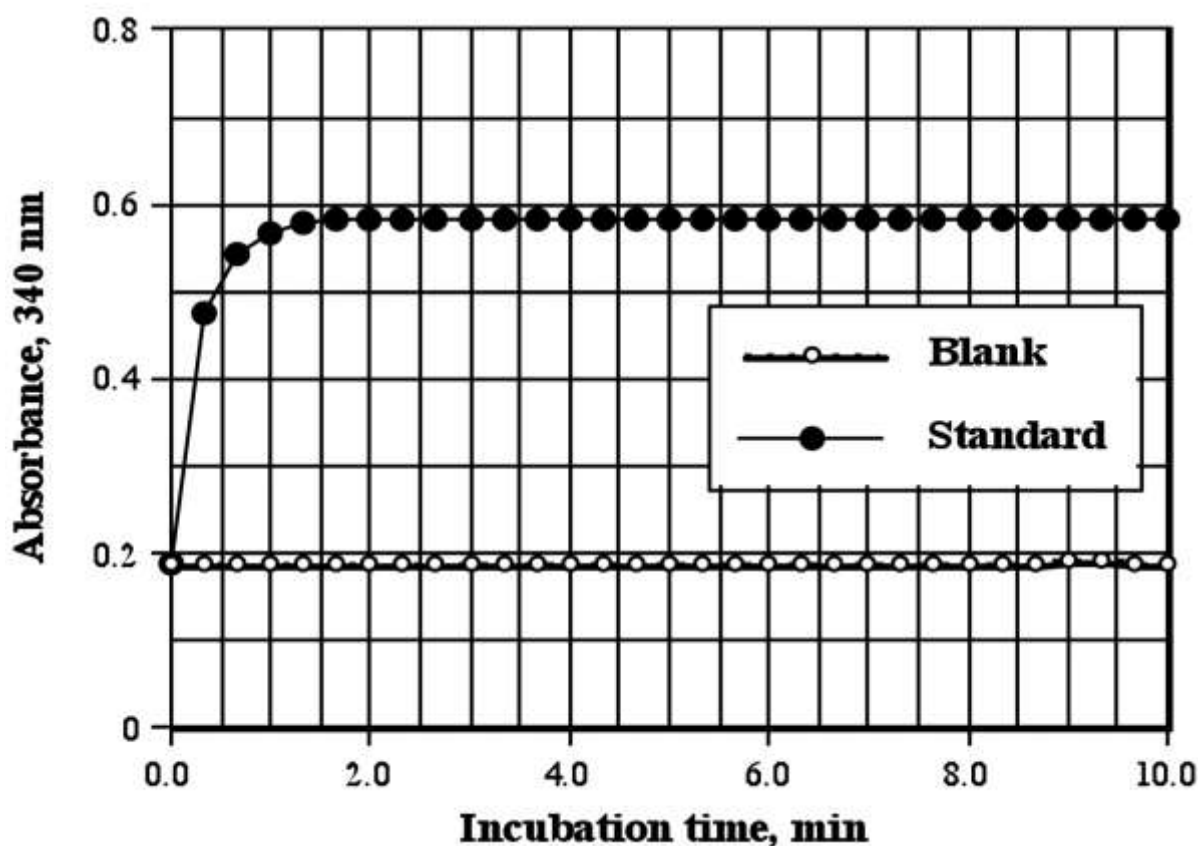


図1.  $\text{NAD}^+$  存在下、D-リンゴ酸 20 $\mu\text{g}$  と D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼの反応による 340nm 吸光度の経時変化

## 文献 - REFERENCES -

1. Beutler, H. O. & Ara, V. (1992). Enzymatic determination of D-malic acid in fruit juices. *Fruit Processing*, **2**, 140-141.
2. Hunger, Ch., Schuch, R. & Hortner, H. Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung und-forschung. Wien (1995). Enzymic determination of D-malic acid in wine and fruit juices. "Current Status and Future Trends in Analytical Food Chemistry". Proceedings of the Eighth European Conference on Food Chemistry (Euro. Food Chem. VIII), Vol. **3**, 715-718.
3. Elkins, E. R. & Freund, W. (1994). Detection of adulteration in apple juice by L-malic/total malic acid ratio: Collaborative Study. *J. AOAC Int.*, **77**, 411-415.
4. Rader, F. & Knichel, W. (1988). D-(+)-Malate. "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol **VII**, pp. 53-59, 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](mailto: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