

Megazyme

ギ酸(塩)分析法

FORMIC ACID (FORMATE) ASSAY PROCEDURE

K-FORM 10/20

K-FORM
(用手法 25 回分)
(自動分析法 220 回分)
(マイクロプレート法 250 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 -

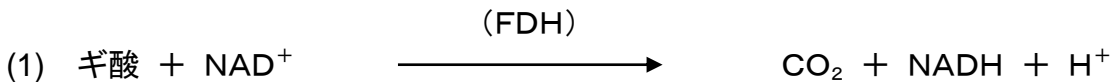
ギ酸は細胞代謝の一般的な中間体であり、通常の生理的代謝産物として尿中に排泄されます。ギ酸はメチオニン、セリン、グリシンなどのアミノ酸、およびメタノールやアセトンや他の有機物質の分解生成物として生成されます。

ギ酸は弱酸で、無色の揮発性有機酸(HCOOH)です。ギ酸は天然では蟻とソープツリーの果実中に存在し、テレピンの大気酸化の副産物としても形成されます。主な市販製品はギ酸ナトリウムであり、一酸化炭素と水酸化ナトリウムを高温高压下で反応させることにより製造されます。ギ酸は皮革製造時の pH 制御に、また酸性染色で使用されます。

ギ酸の主な用途は防腐剤で(E236)、家畜飼料の抗菌剤として使用されます。新鮮な干し草または他のサイレージに噴霧すると、特定の腐敗プロセスを阻止し、飼料の栄養価をより長く保持するため、牛の冬期飼料の保存用に広く使用されています。家禽産業ではサルモネラ菌殺菌のために飼料に添加されることがあります。果汁や漬物では酵母に対する防腐効果があります。また一部の養蜂家は Varroa ダニに対する殺ダニ剤としてギ酸を使用しています。またある種のギ酸エステルは、人工香料または香水原料として使われています。

原理 - PRINCIPLE -

NAD⁺の存在下、ギ酸はギ酸デヒドロゲナーゼ(FDH)により二酸化炭素(CO₂)に酸化され、同時にNADHが生成します(1)。



この反応で生じるNADH量はギ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 -

この測定法はギ酸に対して特異性が高いです。酢酸、プロピオン酸、アスコルビン酸やオキサロ酢酸には反応しません。

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、分析試料中のギ酸濃度0.0466mg/L(または試料0.1mL当たり0.932mg/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、分析試料中のギ酸濃度0.0932mg/Lで、吸光度差0.010に相当します。

ギ酸は保存中に二酸化炭素と水に分解します。そのため市販品のギ酸を分析すると100%以下の結果が予想されます。ギ酸の揮発性についても考慮が必要です。

この分析は0.4~20μgのギ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、ギ酸濃度0.0466~0.0932mg/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 -

ギ酸の変換が分析法で定義された時間(約12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ギ酸(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ならずです。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ギ酸を添加することによって確認することができます。

ギ酸デヒドロゲナーゼはアジ化ナトリウムで阻害を受けますので、測定試薬やサンプルに混入がないように注意が必要です。

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 25 検体(自動分析法 220 検体/マイクロプレート法 250 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:(\times 2) 緩衝液(凍結乾燥粉末、pH 7.6)。4 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。

ボトル2: NAD $^{+}$ 。-10 $^{\circ}$ C以下で2年以上安定です。

ボトル3: ギ酸デヒドロゲナーゼ(1.4mL)。4 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。

ボトル4: ギ酸ナトリウム(約 2g)。4 $^{\circ}$ 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. ボトル1の1本を蒸留水 4mL に溶解します。-10 $^{\circ}$ C以下で2年以上安定です。必要になるまで2本目を溶解しないで下さい。
2. ボトル2の内容物を蒸留水 5.2mL に溶解します。適量ずつポリプロピレン容器に分注し冷凍保存します。溶解後は-10 $^{\circ}$ C以下で2年以上安定です。使用中は冷蔵又は氷冷にて保管願います。
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。4 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。
4. 1L 容メスフラスコにギ酸ナトリウム 148mg (MW=68.08)を 0.1mg 単位で精秤します。蒸留水で定容し、十分に混合します。これがギ酸 0.1 g/L 標準液です。適量ずつポリプロピレン容器に分注し、-10 $^{\circ}$ C以下で保存します。1年間は安定です。

NOTE : ギ酸標準液は、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。

ギ酸濃度は、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、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® (NAD⁺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(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	2.55 mL
サンプル溶液	ギ酸 0.04~2.0μg (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5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3 (FDH)	0.05 mL	0.05 mL
混合**し、反応継続。反応終了(約12分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)		

* 溶液内でピペッティングを繰り返してから分注する

** 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。

† 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 ($A_2 - A_1$) 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 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。

ギ酸の濃度は、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 = ギ酸の分子量

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。

ギ酸濃度は以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.55 \times 46.03}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.1863 \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

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。

ギ酸含量

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

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト (www.megazyme.com) 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. ギ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ギ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	22.2 mL
溶液1(緩衝液)	2.5 mL
溶液2(NAD ⁺)	2.5 mL
総液量	27.2 mL

R2試薬調製

組成	液量
蒸留水	2.30 mL
懸濁液3(FDH)	0.51 mL
総液量	2.81 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12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、ギ酸約 0.183g/L まで

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

NOTE:

1. ギ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ギ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	0.255 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、ギ酸 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5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3 (FDH)	0.005 mL	0.005 mL	0.005 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約12分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 12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、試料の吸光度は懸濁液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)

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

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ギ酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.4~20 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液のギ酸が 0.004~0.20g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定ギ酸濃度(g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.2	希釈不要	1
	0.2~2.0	1 + 9	10
	2.0~20	1 + 99	100
	> 20	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FDH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。

- 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

(a) ワイン中のギ酸の定量

赤ワインの場合、ポリプロピレン試験管にサンプル 5mL を取り、木炭 100mg を加えます。1分間反転させて混合し、Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。白ワインの場合、前処理なしでそのまま分析します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(b) 果汁中のギ酸の定量

濃色果汁の場合、ポリプロピレン試験管にサンプル 5mL を取り、木炭 100mg を加えます。1分間反転させて混合し、Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。酸度が強い果汁の場合、1M 水酸化カリウムを使用し pH 7～8 に調整します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(c) 食酢中のギ酸の定量

200mL 容ビーカーに食酢 50mL を加え、1M 水酸化カリウムで pH 7～8 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。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(d) 漬物中のギ酸の定量

試料を濾過し液を回収します。脂肪の分離が必要な場合、溶液を4℃で20分間保持します。最初の数 mL を捨て、水層の一部を濾過します。必要に応じて、希釈表に従って濾液を希釈します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(e) 果物および野菜製品中のギ酸の定量

果物または野菜約 50g に蒸留水 100mL を加え、電動ブレンダーでホモジナイズします。懸濁物を約15分間攪拌後、250mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容後良く混合します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(f) 魚および肉製品中のギ酸の定量

均質化した試料の平均的な部分約 5g を 50mL 容ビーカーに精秤します。1M 過塩素酸 20mL を加え、Polytron®ホモジナイザーなどで10分間ホモジナイズします。2M 水酸化カリウム溶液で pH を約 8 に調整後、100mL 容メスフラスコに全量移し、脂肪層が「標線より上」にあり、水面が「標線上」にあることを確認して蒸留水で定容します。Whatman No.1 (9 cm) 濾紙で濾過します。最初の数 mL を廃棄し、透明または僅かに濁った程度の溶液を分析に用います。ギ酸量の算出には密度 0.98g/cm³を考慮して下さい。通常希釈は不要で、サンプル量 0.5mL で十分です。

(g) パン製品中のギ酸の定量

ホモジナイズまたは粉碎したサンプル約 5g を 100mL 容メスフラスコに精秤します。蒸留水約 75mL を加え、20～25℃で15分間抽出します。蒸留水で定容し、Whatman No.1 (9 cm) 濾紙で濾過します。通常希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(h) 蜂蜜中のギ酸の定量

蜂蜜約 10g を 100mL 容メスフラスコに精秤します。蒸留水で定容し、完全に混合後そのまま分析に用います。通常希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(i) ジャム中のギ酸の定量

ホモジナイズしたサンプル約 20g を 100mL 容ビーカーに精秤し、約60℃の温水約 20mL を加えて混合します。次に Carrez I 溶液 2mL、Carrez II 溶液 2mL を加え、添加ごとに混合し 100mM NaOH 4mL を加え中和します。溶液を20～25℃に冷却後 100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。十分に混合し、Whatman No.1 (9cm) 濾紙で濾過します。通常希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

(j) タンパク質含有試料中のギ酸の定量

タンパク含有試料 20g に 30mM トリクロロ酢酸 40mL を加え1分間攪拌します。1M 水酸化カリウムで溶液を中和し、100mL 容メスフラスコに全量移します。蒸留水で定容し、Whatman No.1 (9cm) 濾紙で濾過します。分析には清澄液を必要に応じ希釈して用います。通常希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

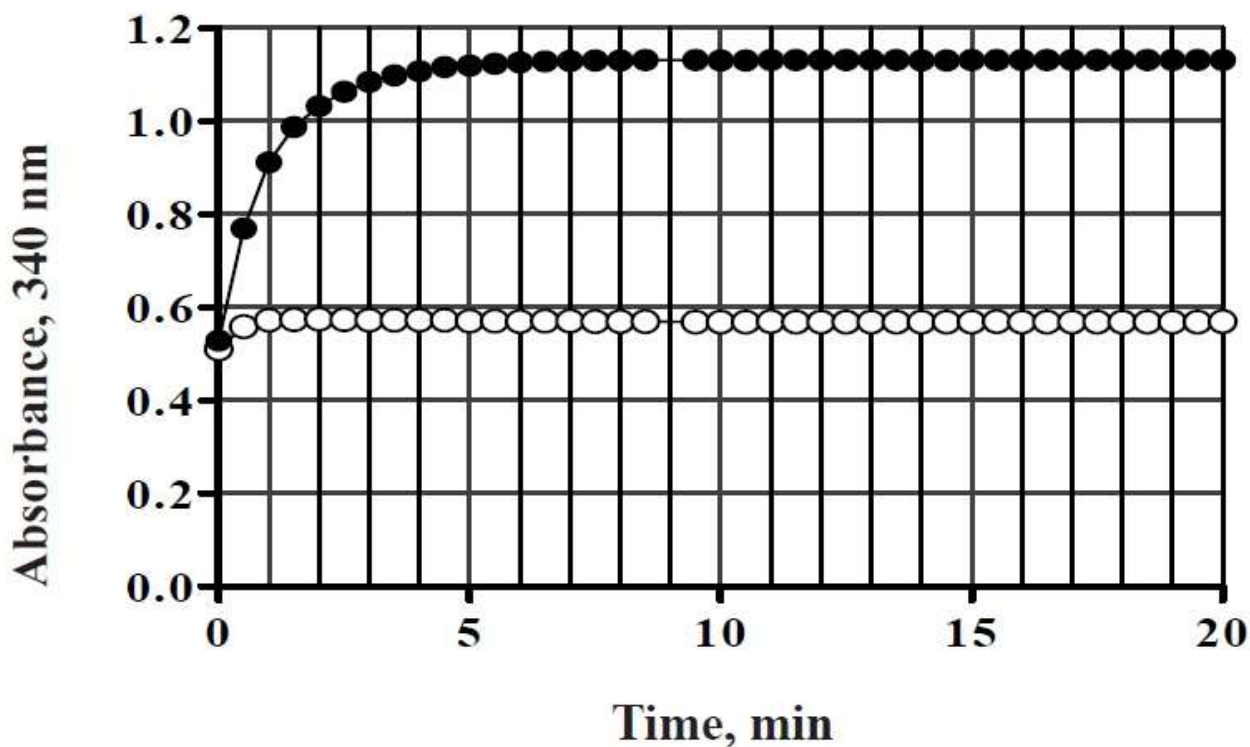


図1. NAD⁺存在下、ギ酸 10 μ g とギ酸デヒドロゲナーゼの反応による 340nm 吸光度の増加

文献 - REFERENCES -

Schaller, K. -H. & Triebig, G. (1988). Formate: Determination with Formate Dehydrogenase. "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol VI, pp. 668-672, 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