

Megazyme

L-グルタミン酸(塩)分析法

L-GLUTAMIC ACID (L-GLUTAMATE) ASSAY PROCEDURE

K-GLUT 04/18

K-GLUT
(用手法 60 回分*)
(自動分析法 700 回分)
(マイクロプレート法 600 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

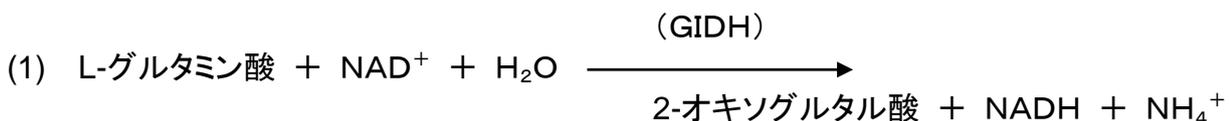
はじめに - INTRODUCTION -

20種類あるアミノ酸の中でも最も代表的な L-グルタミン酸(塩)はチーズ、牛乳、肉、魚、トウモロコシ、トマト、マッシュルーム、大豆、甜菜などの食品に天然で含まれています。遊離形では、L-グルタミン酸は食品の主要な肉様風味増強成分です。L-グルタミン酸は遊離 L-グルタミン酸を増加させる従来の調理方法、またはグルタミン酸ナトリウム(MSG)の補填により食品の嗜好性を向上させます。

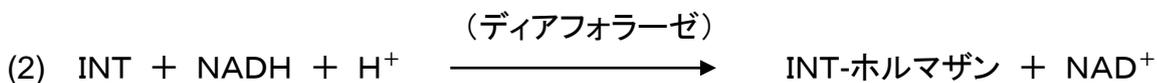
食品添加物(E621)としてMSGの加工食品への過剰な使用は、「中国料理店症候群」(CRS)の症状を引き起こします。頭痛、吐き気、喘鳴、および体温の上昇などが遊離 L-グルタミン酸による神経興奮特性に起因すると考えられています。CRSの発症は速く、摂取後僅か30~60分で生じますが、一般に症状は約2~3時間後に治まります。アメリカ人の約15%がMSGに敏感だと云われています。

原理 - PRINCIPLE -

NAD⁺存在下、L-グルタミン酸はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)により酸化され、2-オキソグルタル酸、還元型NADHおよびアンモニウムイオン(NH₄⁺)を生成します(1)。



しかし、この脱アミノ化反応の平衡はグルタミン酸生成側に傾いているため、ディアフォラーゼによる追加反応が必要で、これによりNADHとヨードニトロテトラブリンウムクロリド(INT)からINT-ホルマザン生成物を還元生成し、その結果 L-グルタミン酸を迅速に定量します(2)。



この反応で生じるINT-ホルマザン量は L-グルタミン酸量と化学量論的に同一です。INT-ホルマザン量は492nm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 L-グルタミン酸に対して特異性が高いです。D-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン酸などには反応しません。

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L-グルタミン酸濃度0.054mg/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L-グルタミン酸濃度0.214mg/Lで、吸光度差0.020に相当します。

この分析は0.4~20μgのL-グルタミン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、これはサンプル量0.10mLを用いた場合、L-グルタミン酸濃度1.07~2.14mg/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 -

高濃度の L-アスコルビン酸、システインまたは亜硫酸塩が存在するとINTと反応し非酵素的な「クリープ」現象を引き起こし分析に影響します。これらの化合物は、以下の方法で過酸化水素とアルカリで処理して除去する必要があります。

必要に応じて希釈した試料を秤量またはピペットで 50mL 容メスフラスコに分取します。蒸留水約 40mLを加え、次に 2M KOH 1mLと 30%v/v 過酸化水素 0.01mLを添加します。溶液を約 70°Cで10分間加熱し、20~25°Cに冷却後、1M 硫酸で約 pH 8.6 に調整します。蒸留水で定容、混合、濾過し分析に供します。

NH₄⁺イオンはGIDH反応の生成物であるため(1ページの(1)参照)、サンプルに大量に存在すると L-グルタミン酸変換率が低下します。従って、5mM 以上の NH₄⁺イオンが存在する場合は、次のように除去することをお勧めします。

NaOH で試料の pH を約 9.0 に上げ、60°Cで30分間加熱します。生成した水酸化アンモニウムは NH₃ ガスと水に分解し、アンモニウム塩は溶液から急速に失われます。

L-グルタミン酸の変換が分析法で定義された時間(約8~10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 L-グルタミン酸(0.1mL中に約10μg)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 L-グルタミン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、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 60 検体(自動分析法 700 検体/マイクロプレート法 600 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(35mL、pH 8.6)。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:(×2) NAD⁺ +INT。4°Cで2年以上安定です。

ボトル3: ディアフォラーゼ懸濁液(3.1mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: グルタミン酸デヒドロゲナーゼ溶液(3.1mL)。-10°C以下で2年以上安定です。

ボトル5: L-グルタミン酸標準液(5mL、0.10mg/mL)。0.02%w/v アジ化ナトリウム溶液 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℃で2年以上安定です。
2. ボトル2の内容物を蒸留水 6.5mL に溶解します。適量ずつポリプロピレンチューブに小分けし、遮光容器に入れ-10℃以下で保存します。溶解後は-10℃以下で12ヶ月以上以上安定です。使用中は冷蔵にて管理願います。
必要になるまで2本目は決して溶解しないで下さい。
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℃で2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。ボトルを直立させて保管します。
-10℃以下で2年以上安定です。
5. 付属のボトル5をそのまま使用して下さい。4℃で2年以上安定です。

NOTE : L-グルタミン酸標準液は、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。

L-グルタミン酸濃度は、INT-ホルマザン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)
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(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®
 - 5.0 mL Combitip® (NAD⁺ / INT溶液各 0.2mL 分注用)
 - 12.5mL Combitip® [緩衝液1(ボトル1) 0.5mL 分注用]
 - 25 mL Combitip® (蒸留水 2.0mL 分注用)
5. 分析用天秤
6. 492nm 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:	492nm
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℃
反応最終容量	2.90 mL
サンプル溶液	L-グルタミン酸 0.4~20μg (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)	0.50 mL	0.50 mL
溶液2 (NAD ⁺ /INT)	0.20 mL	0.20 mL
懸濁液3 (ディアフォーラーゼ)	0.05 mL	0.05 mL
混合*し、試薬添加の約2分後、反応液の吸光度測定(A ₁)。さらに2分後、吸光度を確認し、吸光度の変化が0.010を越える場合はサンプルの前処理が必要です(2ページの「阻害」を参照)。次に以下のものを直ちに添加し反応開始:		
溶液4 (GIDH)	0.05 mL	0.05 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約8~10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、2分間の吸光度変化がなくなるか増加が一定になるまで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。

** 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溶液4(GIDH)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)

NOTE: INT及びINTを含む反応系は光に敏感です。そのため反応は分光光度計の蓋を閉じた状態でキュベット内で実施する等、暗所で行う必要があります。

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。

L-グルタミン酸の濃度は、以下のように計算することができます。

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

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

M_w = L-グルタミン酸の分子量

ε = 492nmにおけるINT-ホルマザンの分子吸光係数 = 19,900 (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。

L-グルタミン酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.90 \times 147.13}{19900 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.2144 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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。

L-グルタミン酸含量

$$= \frac{\text{L-グルタミン酸濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

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. L-グルタミン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 L-グルタミン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
溶液1(緩衝液)	6.0 mL
溶液2(NAD ⁺ /INT)	2.4 mL
懸濁液3(ディアフォーラーゼ)	0.6 mL
蒸留水	20.6 mL
総液量	29.6 mL

R2 試薬調製

組成	液量
溶液4(GIDH)	0.6 mL
蒸留水	3.1 mL
総液量	3.7 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10分
波長	492nm
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、L-グルタミン酸約 0.16g/L まで

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

NOTE:

1. L-グルタミン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L-グルタミン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:	492nm
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	0.290 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、L-グルタミン酸で 0.1~2μg/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)	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL
溶液2 (NAD ⁺ /INT)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
懸濁液3 (ディアフォラーゼ)	0.005 mL	0.005 mL	0.005 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4 (GIDH)	0.005 mL	0.005 mL	0.005 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約8~10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、2分間の吸光度変化がなくなるか増加が一定になるまで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

† 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 L-グルタミン酸の量(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 L-グルタミン酸が 0.004~0.2g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定 L-グルタミン酸濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.20	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 8.6 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 8.6 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GIDH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。

- f) **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°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

(a) 醤油中の L-グルタミン酸の定量

醤油の L-グルタミン酸濃度は一般に、希釈表による希釈を除きサンプル処理せずに測定可能です。通常、1 : 500 倍希釈とサンプル量 0.2mL で十分です。

(b) 肉抽出物、スープとブイヨン濃縮物中の L-グルタミン酸の定量

粉末サンプルの場合、試料の平均的な部分約 1g、また懸濁液の場合は 1mL を 100mL 容メスフラスコに精秤します。蒸留水 70 mL を加え、70°C で10分間加温して、L-グルタミン酸を抽出します。冷却し、蒸留水で定容します。Whatman No.1 濾紙で濾過し、希釈表に従って希釈します。通常、1 : 5 倍希釈とサンプル量 0.2mL で十分です。

(c) 果物および野菜製品中の L-グルタミン酸の定量

野菜や果物(例 トマト)を約 2cm 角に細断し、キッチンブレンダーでホモジナイズします。試料の平均的な部分約 1g を 100mL 容メスフラスコに精秤し、50mL の蒸留水を加えて10分間抽出します。蒸留水で定容し混合後、Whatman No.1 濾紙で濾過します。通常、希釈は不要で、最大 0.5mL のサンプル量が必要です。

(d) トマトジュース中の L-グルタミン酸の定量

トマトジュースを充分攪拌後、100mL 容メスフラスコに約 1g を精秤し、蒸留水で定容します。混濁液を Whatman No.1 濾紙で濾過し、希釈表に従って希釈します。通常、1 : 100 倍希釈とサンプル量 0.2mL で十分です。

文献 - REFERENCES -

Beutler, H. O. (1990). L-Glutamate, Colorimetric Method with Glutamate Dehydrogenase and Diaphorase. In *“Methods of Enzymatic Analysis”* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VIII, pp. 369-376, 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