

Megazyme

D-3-ヒドロキシ酪酸(塩)分析法

D-3-HYDROXYBUTYRIC ACID (D-3-HYDROXYBUTYRATE)

ASSAY PROCEDURE

K-HDBA 04/18

K-HDBA

(用手法 60 回分*)

(自動分析法 740 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

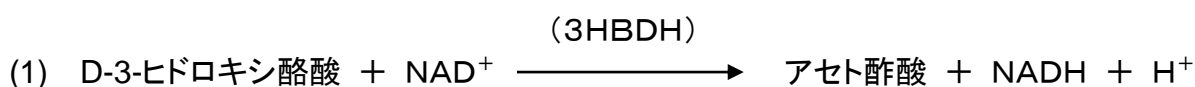
日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

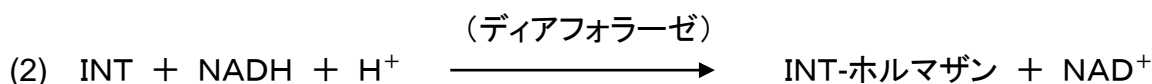
受精卵または孵卵では、D-3-ヒドロキシ酪酸濃度が微量レベルから 5 mg/kg(乾燥重量)以上に上昇し、腐敗卵では約 800 mg/kg に達することがあります。D-3-ヒドロキシ酪酸は約6日後から生じることから、この酸含量はその卵が新鮮であるか、または加工卵製品の製造時に新鮮であったかの指標として使用されます。また臨床化学では D-3-ヒドロキシ酪酸測定は糖尿病性ケトアシドーシス(酸性血症)の診断に用いられます。

原理 - PRINCIPLE -

D-3-ヒドロキシ酪酸の定量には2つの酵素反応が必要です。3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(3HBDH)による最初の反応では D-3-ヒドロキシ酪酸がアセト酢酸に酸化され、同時にNAD⁺がNADHに還元されます(1)。



但し本反応は平衡反応であるため、NADHとヨードニトロテトラゾリウムクロリド(INT)からINT-ホルマザン生成物を還元生成し、その結果 D-3-ヒドロキシ酪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 D-3-ヒドロキシ酪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 D-3-ヒドロキシ酪酸に対して特異性が高いです。L-乳酸、L-コハク酸、フマル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 D-3-ヒドロキシ酪酸濃度 0.037mg/L(またはサンプル量 0.10mL を用いた場合、0.74mg/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 D-3-ヒドロキシ酪酸濃度 0.074mg/L で、吸光度差 0.020 に相当します。

この分析は 0.4~12 μ g の D-3-ヒドロキシ酪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-3-ヒドロキシ酪酸濃度 0.037~0.074mg/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-3-ヒドロキシ酪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 (0.1mL 中に約 6 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-3-ヒドロキシ酪酸を添加することにより確認することができます。

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 8.0 に調整します。蒸留水で定容、混合、濾過し分析に供します。

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 740 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(1.25mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(1.25mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル5: D-3-ヒドロキシ酪酸標準液(5mL, 0.06mg/mL)。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 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°C以下で保存します。溶解後は-10°C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。
- 3,4. 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. 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 : D-3-ヒドロキシ酪酸標準液は、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-3-ヒドロキシ酪酸濃度は、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® (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®
 - 5.0 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	2.84 mL
サンプル溶液	D-3-ヒドロキシ酪酸 0.4~12μg (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℃)	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 (ディアフォラーゼ)	0.02 mL	0.02 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(1~2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:		
懸濁液4 (3HBDH)	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 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懸濁液4 (3HBDH) 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 ($A_2 - A_1$) 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。

D-3-ヒドロキシ酪酸の濃度は、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-3-ヒドロキシ酪酸の分子量
- 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。

D-3-ヒドロキシ酪酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.84 \times 104.1}{19900 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.1486 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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。

D-3-ヒドロキシ酪酸含量

$$= \frac{\text{3ヒドロキシ酪酸濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

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. D-3-ヒドロキシ酪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-3-ヒドロキシ酪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	52.6 mL
溶液1(緩衝液)	15.5 mL
溶液2(NAD ⁺ /INT)	6.2 mL
懸濁液3(ディアフォラーゼ)	0.62 mL
総液量	74.92 mL

R2試薬調製

組成	液量
蒸留水	8.75 mL
懸濁液4(3HBDH)	0.62 mL
総液量	9.37 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	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、D-3-ヒドロキシ酪酸約 99mg/L まで

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

NOTE:

1. D-3-ヒドロキシ酪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-3-ヒドロキシ酪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℃
最終反応液量	0.284 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、D-3-ヒドロキシ酪酸で 0.1~1.2µg/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 (ディアフォーラーゼ)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 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:			
懸濁液4 (3HBDH)	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 ₂)。 6分後も反応が終了していない場合、2分間の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

** 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4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 D-3-ヒドロキシ酪酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.4~12 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液の D-3-ヒドロキシ酪酸が 0.004~0.12g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定 D-3-ヒドロキシ酪酸濃度(g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.12	希釈不要	1
	0.12~1.2	1 + 9	10
	1.2~12	1 + 99	100
	> 12	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 赤ワイン、着色果汁)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3HBDH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2分間攪拌後、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°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) 全液卵中の D-3-ヒドロキシ酪酸の定量

ホモジナイズした全卵を 25mL 容メスフラスコに約 5g 精秤し、蒸留水 15mL と *n*-オクタノールを1滴加えて混合し、沸騰水浴(約 100°C)中で15分間煮沸します。20~25°Cに冷却し、Carrez I 液 1mL、Carrez II 液 1mL、100mM NaOH 溶液 2mL を注意深く加え、それぞれ添加後に混合します。メスフラスコを定容、混合して濾過し、濾液を分析に供します。通常、希釈は不要で、0.1~1.0mL のサンプル量で十分です。受精卵の場合、0.1mL が適切ですが、未受精卵の場合は 1.00mL が適切です。なお計算時には変更したサンプル液量を考慮して下さい。

D-3-ヒドロキシ酪酸の回収率は、25mL 容メスフラスコから卵試料液 5g を分取し、DL-3-ヒドロキシ酪酸一ナトリウム塩溶液(0.4 g/100mL) 1.0mL(D-3-ヒドロキシ酪酸 0.16 g/100mL)を加えて標準の手順に従ってサンプル抽出を進めて分析します。

(b) 卵製品中の D-3-ヒドロキシ酪酸の定量

卵製品(卵全体、卵白または卵黄)を 20~25°Cで慎重にホモジナイズします。サンプル 5g を 25mL 容メスフラスコに精秤し、「(a) 全液卵」の方法に従って処理します。

(c) 全卵粉末中の D-3-ヒドロキシ酪酸の定量

全卵粉末を 25mL 容メスフラスコに約 1 g に精秤し、蒸留水 15mL と *n*-オクタノールを1滴加えて混合します。沸騰した湯浴で15分間煮沸します。20~25°Cに冷却し、Carrez I 液 1mL、Carrez II 液 1mL、100mM NaOH 溶液 2mL を注意深く加え、それぞれ添加後に混合します。メスフラスコを定容、混合して濾過し、濾液を分析に供します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。なお計算時には変更したサンプル液量を考慮して下さい。

文献 - REFERENCES -

Kientsch-Engel, R. I. & Siess, E. A. (1990). D-(-)-3-Hydroxybutyrate and Acetoacetate. "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VIII, pp. 60-69, 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