

Megazyme

D-イソクエン酸(塩)分析法

D-ISOCITRIC ACID (D-ISOCITRATE) ASSAY PROCEDURE

K-ISOC 11/19

K-ISOC
(用手法 100 回分)
(自動分析法 1000 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

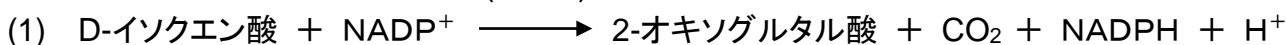
はじめに - INTRODUCTION -

D-イソクエン酸は、ほとんどのフルーツジュースに含まれる有機酸です。果物製品の信頼性と品質評価のための多成分分析手順の重要なマーカーです。一部の果汁において高いクエン酸／イソクエン酸比は、クエン酸を添加する指標として使用できます。

原理 - PRINCIPLE -

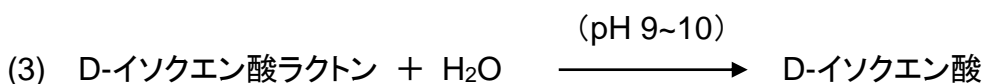
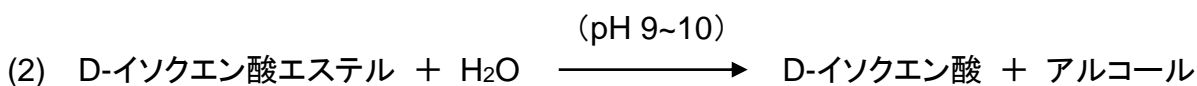
D-イソクエン酸はNADP⁺の存在下、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(ICDH)により、2-オキソグルタル酸および二酸化炭素に酸化され、還元型のNADPHが生成します(1)。

(ICDH)



この反応で生じるNADPH量はD-イソクエン酸量と化学量論的に同一です。NADPH量は340nmの吸光度の増加により測定されます。

結合型D-イソクエン酸は、アルカリ加水分解によって遊離した後(2)(3)、(1)式に基づき定量されます。



特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法はD-イソクエン酸に対して特異性が高いです。D-リンゴ酸、L-乳酸、L-アスパラギン酸、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-イソクエン酸濃度0.177mg/L(またはサンプル量0.1mLを用いた場合、3.54mg/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-イソクエン酸濃度0.354mg/Lで、吸光度差0.010に相当します。

この分析は1~80μgのD-イソクエン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-イソクエン酸濃度0.177~0.354mg/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-イソクエン酸の変換が分析法で定義された時間(約3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-イソクエン酸(0.1mL中に約30μg)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は回収実験、すなわち抽出工程の最初にサンプルに D-イソクエ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 100 検体(自動分析法/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(12mL、pH 7.6)。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:** NADP⁺。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル3:** イソクエン酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(2.1mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル4:** D-イソクエン酸標準液(5mL、0.3mg/mL。0.02%アジ化ナトリウム含有)。-10°C以下で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 10.2mL 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)。
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年以上安定です。
4. 付属のボトル4をそのまま使用して下さい。-10°C以下で2年以上安定です。

NOTE : D-イソクエン酸標準液は、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。
D-イソクエン酸濃度は、NADPHの吸光係数から直接算出します(3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)。紫外外部対応のもの
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(20μL、100μL)
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、NADP⁺溶液各 0.1mL 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	2.32 mL
サンプル溶液	D-イソクエン酸 1.0~80 µg (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)	0.10 mL	0.10 mL
溶液2 (NADP ⁺)	0.10 mL	0.10 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3 (ICDH)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約3分)後、反応液の吸光度測定 (A 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。

† 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(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。

D-イソクエン酸の濃度は、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 = D-イソクエン酸の分子量

ε = 340nm におけるNADPH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-イソクエン酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.32 \times 192.10}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0.7074 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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-イソクエン酸含量

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

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-イソクエ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 D-イソクエ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)	2.2 mL
溶液2(NADP ⁺)	2.2 mL
蒸留水	39 mL
総液量	43.4 mL

R2試薬調製

組成	液量
懸濁液3(ICDH)	0.41 mL
蒸留水	4.70 mL
総液量	5.11 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3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-イソクエン酸約 0.8g/L まで

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

NOTE :

1. D-イソクエ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D-イソクエ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:	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°C
最終反応液量	0.232 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、D-イソクエン酸で 0.1~8 µg/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	0.200 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)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
溶液2 (NADP ⁺)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 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3 (ICDH)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約3分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。			

* 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 D-イソクエン酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、1.0~80 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液の D-イソクエン酸が 0.01~0.80g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定 D-イソクエン酸濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.8	希釈不要	1
	0.8~8.0	1 + 9	10
	> 8.0	1 + 99	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分量精秤します。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 7.6 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 7.6 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ICDH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 で中和し上清を適宜希釈して分析に供します。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) 果汁中の D-イソクエン酸の定量

濾過済サンプル 25mL を 2M NaOH にて pH 約 7.6 に調整します。全量を 50mL 容メスフラスコに移し定容します。PVPP 0.5g を加え5分間攪拌し、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 0.1mL で十分です。

(b) D-イソクエン酸およびその誘導体(総 D-イソクエン酸)の定量

濾過済サンプルまたは果汁 50mL を 100mL 三角フラスコに加え、1M NaOH で pH を約 11.0 に調整します(pH メーターで測定)。還元性物質が存在する場合は、過酸化水素水(30%v/v) 0.01mL を添加します。沸騰水浴で溶液を20分間煮沸し、pH 試験紙で pH を確認し、必要に応じて 1M NaOH で調整します。溶液を室温まで冷却し、pH を 1 M HCl で約 7.6 に調整します。蒸留水で 100mL に定容後、PVPP 0.5g を加えて5分間攪拌し、Whatman No.1(9cm)濾紙で濾過します。分析には清澄液を供します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

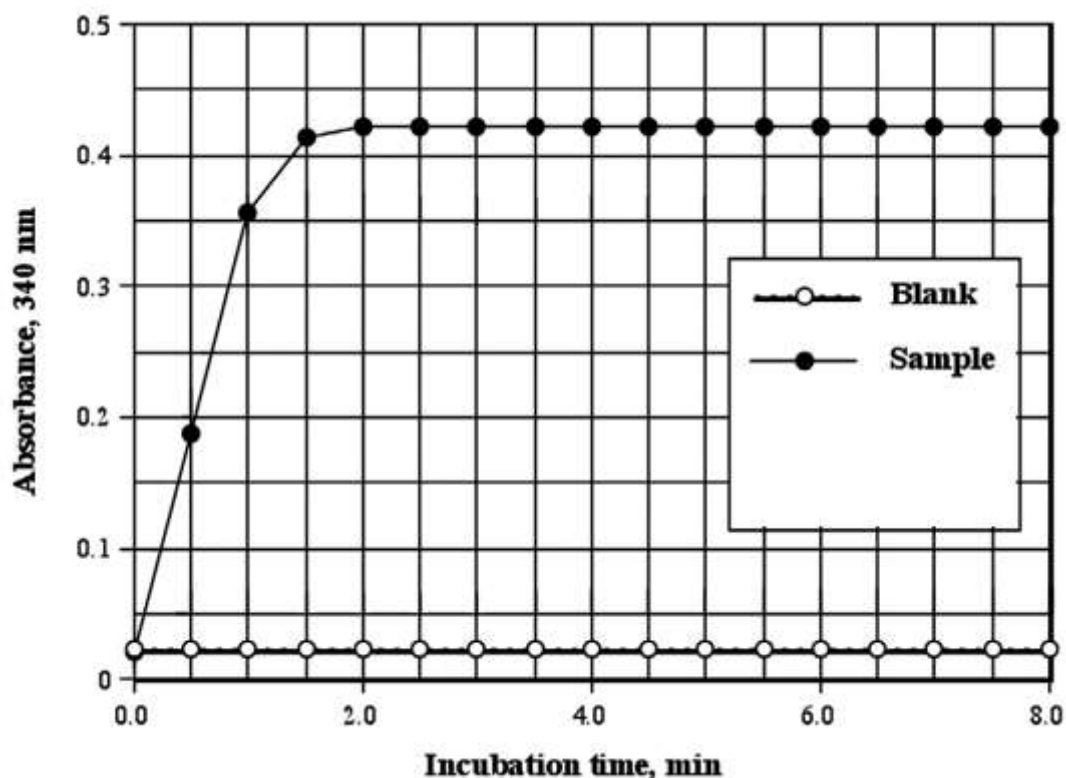


図1. NADP⁺存在下、D-イソクエン酸 30μg と D-イソクエン酸デヒドロゲナーゼの反応による 340nm 吸光度の経時変化

文献 - REFERENCES -

1. Beutler, H. O. (1989). D-Isocitrate. *"Methods of Enzymatic Analysis"* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VII, pp. 13-19, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
2. International Federation of Fruit Juice Producers (IFU, Methods of Analysis, no. 54-1984) (1984). Contained in *Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices* (1996). Edited by Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruit and Vegetables of the European Economic Community (AIJN).

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