

Megazyme

L-リンゴ酸(塩)分析法

L-MALIC ACID (L-MALATE) ASSAY PROCEDURE

K-LMAL-58A/K-LMAL-116A 04/20

K-LMAL
(用手法 58 / 116 回分*)
(マイクロプレート法 580 / 1160 回分)

* 半量で分析すると検体数は2倍

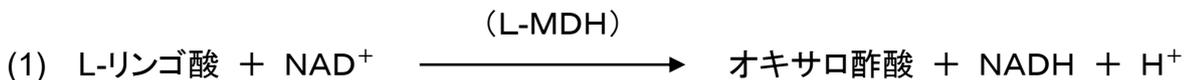
日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

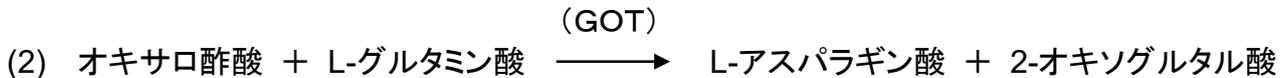
L-リンゴ酸 (L-リンゴ酸塩) はクエン酸回路の構成要素として、全ての生物に存在します。ワイン、ビール、パン、果物および野菜製品の製造から化粧品、医薬品に至るまで、その定量は非常に重要です。これは果物中に存在する酸の中で重要なものであり、ワイン中に含まれる酸の中で最も多く存在します。ワイン醸造においてマロラクティック発酵時、L-乳酸とともに L-リンゴ酸量をモニターします。また L-リンゴ酸は食品保存料 (E296) および風味増強化合物として多くの用途があり、低カロリー飲料の製造などに用いられています。このブックレットでは、L-リンゴ酸の定量のための分光光度法 (用手法) とマイクロプレート法について記載しています。一方 L-リンゴ酸のハイスループット分析用に開発されたキットは、自動分析用に最適化されています。これらのキットには長期間安定な従来型のキット (製品 **K-LMALAF** を参照) と、便利な「液状型」試薬キット (製品 **K-LMALQR** を参照) が含まれます。これらの L-リンゴ酸分析手順の詳細についてはそれぞれのブックレットを参照して下さい (日本バイオコンまでお問合せ下さい)。

原理 - PRINCIPLE -

L-リンゴ酸の検出には2つの酵素反応が必要です。最初の反応では、L-リンゴ酸はNAD⁺存在下、L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (L-MDH) によりオキサロ酢酸に酸化されます (1)。



しかし反応 (1) の平衡は L-リンゴ酸と NAD⁺ 側に大きく傾いているので、NADH 生成物を「捕捉する」ため、大過剰の L-グルタミン酸の存在下、グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) によりオキサロ酢酸を L-アスパラギン酸と 2-オキソグルタル酸に変換します (2)。



この連続反応で生じる NADH 量は L-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。

この原理に基づく分析法は、IFU、AIJN、MEBAK、OIV により推奨されており、また AOAC インターナショナルにより承認されています。この方法は、多くの国の食品法および欧州の規制に含まれています。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法は L-リンゴ酸に対して特異性が高いです。D-リンゴ酸、L-乳酸、L-アスパラギン酸および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、分析試料中の濃度 0.12mg/L (サンプル量 0.10mL を用いた場合、2.49mg/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 0.25mg/L で、吸光度差 0.010 に相当します。

この分析は 0.5~30μg の L-リンゴ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-リンゴ酸濃度 2.49~4.98mg/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 -

L-リンゴ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L-リンゴ酸(0.1mL中に約 15 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-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。

サンプル中のポリフェノール(タンニン)による阻害を防ぐために、ポリビニルピロリドンがキットに組み込まれています。

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 58/116 検体(マイクロプレート法 580/1160 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。

58 検体用キット (K-LMAL-58A)

ボトル1: 緩衝液(6mL, pH 10.0)。L-グルタミン酸および保存剤として 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: NAD⁺ + PVP。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル3: グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ懸濁液(1.25mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: L-リンゴ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: L-リンゴ酸標準液(5mL, 0.15mg/mL)。4°Cで2年以上安定です。

116 検体用キット (K-LMAL-116A)

ボトル1: 緩衝液(12mL, pH 10.0)。L-グルタミン酸および保存剤として 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⁺ + PVP。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル3: グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ懸濁液(2.5mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(2.5mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル5: L-リンゴ酸標準液(5mL, 0.15mg/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 6mL 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**(116 検体用のみ)。

- 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℃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。密封条件下、4℃で2年以上安定です。

NOTE : L-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。
L-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. 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)
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⁺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℃
反応最終容量	2.34mL
サンプル溶液	L-リンゴ酸 0.5~30μg (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)	0.10 mL	0.10 mL
溶液2 (NAD ⁺ /PVP)	0.10 mL	0.10 mL
懸濁液3 (GOT)	0.02 mL	0.02 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4 (L-MDH)	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(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。

L-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 = L-リンゴ酸の分子量

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。

L-リンゴ酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.34 \times 134.09}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.4980 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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-リンゴ酸含量

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

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)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(マイクロプレート法) - MICROPLATE ASSAY PROCEDURE -

NOTE:

1. L-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 L-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	0.234 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、L-リンゴ酸 0.1~3μg/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 (NAD ⁺ /PVP)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 mL
懸濁液3 (GOT)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 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4 (L-MDH)	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 L-リンゴ酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.5~30 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液の L-リンゴ酸が 0.005~0.30g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定 L-リンゴ酸濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.3	希釈不要	1
	0.3~3.0	1 + 9	10
	3.0~30	1 + 99	100
	> 30	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 9.0 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 9.0 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L-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。

- 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℃)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) ワイン中の L-リンゴ酸の定量

白ワインおよび赤ワインの遊離 L-リンゴ酸濃度[F]は、一般的にサンプル処理なしで測定できます(希釈表による希釈を除く)。通常、1:10 希釈とサンプル量 0.1 mL で十分です。

(b) ワイン中の L-リンゴ酸とそのエステル化物の定量

白ワインおよび赤ワイン中の遊離およびエステル化 L-リンゴ酸[F+E]の両濃度は、次のように測定します。ワイン 20mL に 2M NaOH 6mL を加え、攪拌しながら30分間加熱し還流します。冷却後、1M 硫酸で溶液の pH 10 に注意しながら調整し、蒸留水で 50mL に定容します。その後、通常の手順に従って分析します。

この方法で得られるのは遊離およびエステル化 L-リンゴ酸の合計濃度[F+E]であり、エステル化 L-リンゴ酸濃度[E]は以下のように算出されます。

$$[E] = [F + E] - [F] \quad [g/L]$$

(c) フルーツジュース、濃縮果汁および関連飲料中の L-リンゴ酸の定量

透明な中性試料中の L-リンゴ酸濃度は、一般的にサンプル処理なしで定量できます(希釈表による希釈を除く)。混濁液では通常、希釈前に濾過するだけで充分です。着色試料は通常、適切な L-リンゴ酸濃度に希釈した後に分析します。一方、希釈せずに分析が必要な場合、脱色工程が必要な場合があります(ページ6、3. 一般的な注意事項、e) 強く着色した試料を参照)。通常、1:50 希釈とサンプル量 0.1 mL で十分です。

(d) ビール中の L-リンゴ酸の定量

ガラス棒で攪拌して二酸化炭素を除去し、必要ならば希釈します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(e) 固形食品中の L-リンゴ酸の定量

乳鉢と乳棒または電動ブレンダーを用い、固形食品約 10g をホモジナイズします。試料の平均的な部分約 2g を精秤し、蒸留水 40mL 中で必要に応じて60℃加熱しながら30分間抽出します。抽出液を 50mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。白濁液は濾過し、必要に応じて希釈します。

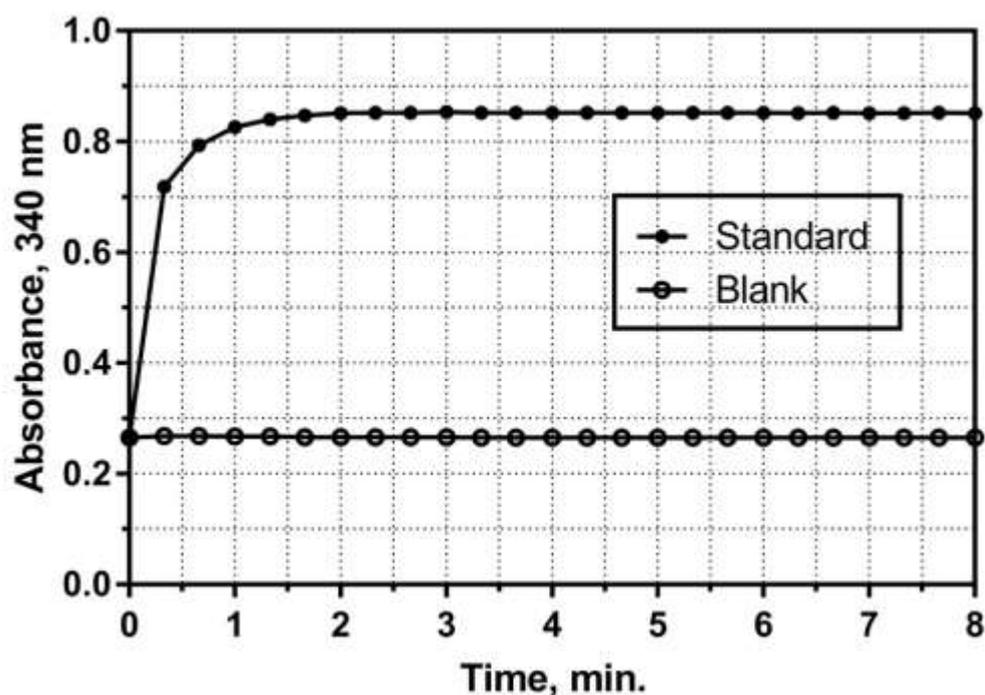


図1. NAD⁺存在下、L-リンゴ酸 30 μ g とL-リンゴ酸デヒドロゲナーゼの反応による 340nm 吸光度の経時変化

文献 - REFERENCES -

1. Mollering, H. (1985). L-Malate. *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VII, pp. 39-47, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
2. AOAC Official Methods of Analysis (2002). Method 993.05
"L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice", 17th ed., Chapter 37, p. 15.
3. Gorin, N. (1976). Differences in L-malate determined enzymatically or titrimetrically in golden delicious apples.
Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, **162**, 259-261.
4. Klopper, W. J., Angelino, S. A. G. F., Tuning, B. & Vermeire, H. A. (1986). Organic acids and glycerol in beer. *J. Inst. Brew.*, **92**, 225-228.
5. 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.

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