

Megazyme

リン酸分析法

PHOSPHATE ASSAY PROCEDURE

K-PHOS 09/19

K-PHOS
(用手法 100 回分)
(自動分析法 400 回分)

日本バイオコン株式会社

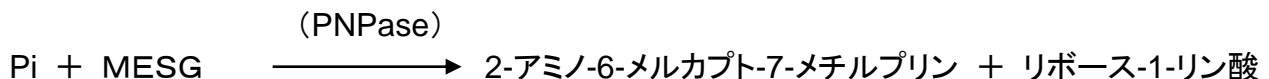
はじめに - INTRODUCTION -

無機リン酸化合物は賞味期限を延長し、また呈味呈色を改善するために食品にしばしば加えられる添加物です。その結果、リン酸塩は冷凍肉、加工肉、加工チーズ、コーラ、シリアル、ベーカリーなどの高度加工された便利な食品に頻繁に認められます。またリン酸塩は水質評価の重要なパラメーターでもあり、リン酸塩が過剰になると富栄養化状態になり、藻類が過度に成長する可能性があります。

伝統的に無機リン酸塩は、モリブデン試薬の錯化によるモリブデンブルー（モリブデン青）の生成を使用して検出されてきました¹。またこの反応は、無数のUV吸収を有する中間体が形成されることから、近年「ブラックボックス」と言われるようになってきました。この方法の問題点として反応時間が長く、重金属が必要であり、そして各分析ごとにリン酸検量線を測定する必要があることが挙げられます。1992年にWebbはリン酸塩の測定のための非常に優れた方法を公開しました²が、メガザイムはその方法をさらに最適化し、モリブデン青法の全ての問題を克服しました。

原理 - PRINCIPLE -

リン酸定量法は遊離無機リン酸塩の存在下、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNPase) による2-アミノ-6-メルカプト-7-メチルプリンリボヌクレオシド (MESG) の2-アミノ-6-メルカプト-7-メチルプリンおよびリボース-1-リン酸への変換に基づきます。この反応により、UV吸収の最大値が330nmから360nmにシフトします。分析法の原理を図1(6ページ)に示します。



特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

吸光度差の最小値は0.03です。これは最大サンプル量0.7mLを用いた場合、分析試料中のリン酸濃度0.49mg/L(またはサンプル量0.1mLを用いた場合、3.43mg/L)に相当します。検出限界は最大サンプル量0.7mLを用いた場合、分析試料中のリン酸濃度0.16mg/Lで、吸光度差0.01に相当します。

この分析は0.1~10 μ gのリン酸濃度間で直線性を示します(図2、7ページ)。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0.7mLを用いた場合、リン酸濃度約0.08~0.16mg/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 -

リン酸の変換が分析法で定義された時間(約20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5 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は回収実験、すなわち抽出工程の最初にサンプルにリ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 400 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(20mL、pH 7.6)。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) MESG。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル3: PNPase 懸濁液(1mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: リン酸標準液(5mL、0.05mg/mL)。保存剤として 0.02%w/v アジ化ナトリウム含有。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1本の内容物を蒸留水 5mL に溶解します。1mL ずつポリプロピレンチューブに分注し冷凍保存します。溶解後は決して再凍結しないで下さい。-10°C以下で2年以上安定です。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タンパク質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。4°Cで2年以上安定です。

NOTE: リン酸標準液は、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。
リン酸濃度は、MESGの吸光係数から直接算出します(3ページ)。

機器(推奨):

1. 使い捨て 5mL 容ポリプロピレン試験管
2. 使い捨てプラスチック製セミマイクロキュベット(光路 1cm、1.5mL)。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 0.2mL、MESG溶液各 0.1mL 分注用)
 - 25 mL Combitip® (MESG粉末溶解時、蒸留水 5.0mL 分注用)

5. 分析用天秤
6. 360nm 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)

A. 分析手順 (用手法) - MANUAL ASSAY PROCEDURE -

波長:	360nm
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	22°C
反応最終容量	1.01 mL
サンプル溶液	リン酸 0.1~10µg (サンプル液量を 0.1~0.7mL 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22°C)	0.70 mL	0.60 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 (MESG)	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 (PNPase)	0.01 mL	0.01 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約20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、かつ1.0を越えないことが必要です。

リン酸の濃度は、以下のように計算することができます。

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

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

Mw = リン酸の分子量

ε = 360nm におけるMESGの分子吸光係数 = 8,400 (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。

リン酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{1.01 \times 94.97}{8400 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0.114 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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。

リン酸含量

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

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. リ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リ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
蒸留水	12.5 mL
溶液1(緩衝液)	5.0 mL
溶液2(MESG)	2.5 mL
総液量	20 mL

R2試薬調製

組成	液量
蒸留水	12.5 mL
懸濁液3(PNPase)	5.0 mL
総液量	17.5 mL

分析法

R1:	0.200 mL
試料	0.025 mL
R2:	0.025 mL
反応温度と時間	約22°C反応で約20分
波長	360nm

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 0.025mL 時、リン酸約 0.1g/L まで

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リン酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.1~10 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液のリン酸が 0.001~0.10g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定リン酸濃度 (g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.1	希釈不要	1
	0.1~1.0	1 + 9	10
	1.0~10.0	1 + 99	100
	> 10.0	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 0.70mL となるよう、キュベットに添加するサンプル量を増やし、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 7.5 近くにまで上げ、室温で30分間放置する必要があります。

- c) **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 7.5 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。
- d) **着色した試料**: 反応液に PNPase を添加しない、試料ブランクが必要な場合があります。
- e) **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**: Carrez 試薬を用いて除タンパクします。

付録 - APPENDIX -

A. 測定原理／リン酸検出法 - Assay Principle - Phosphate detection -

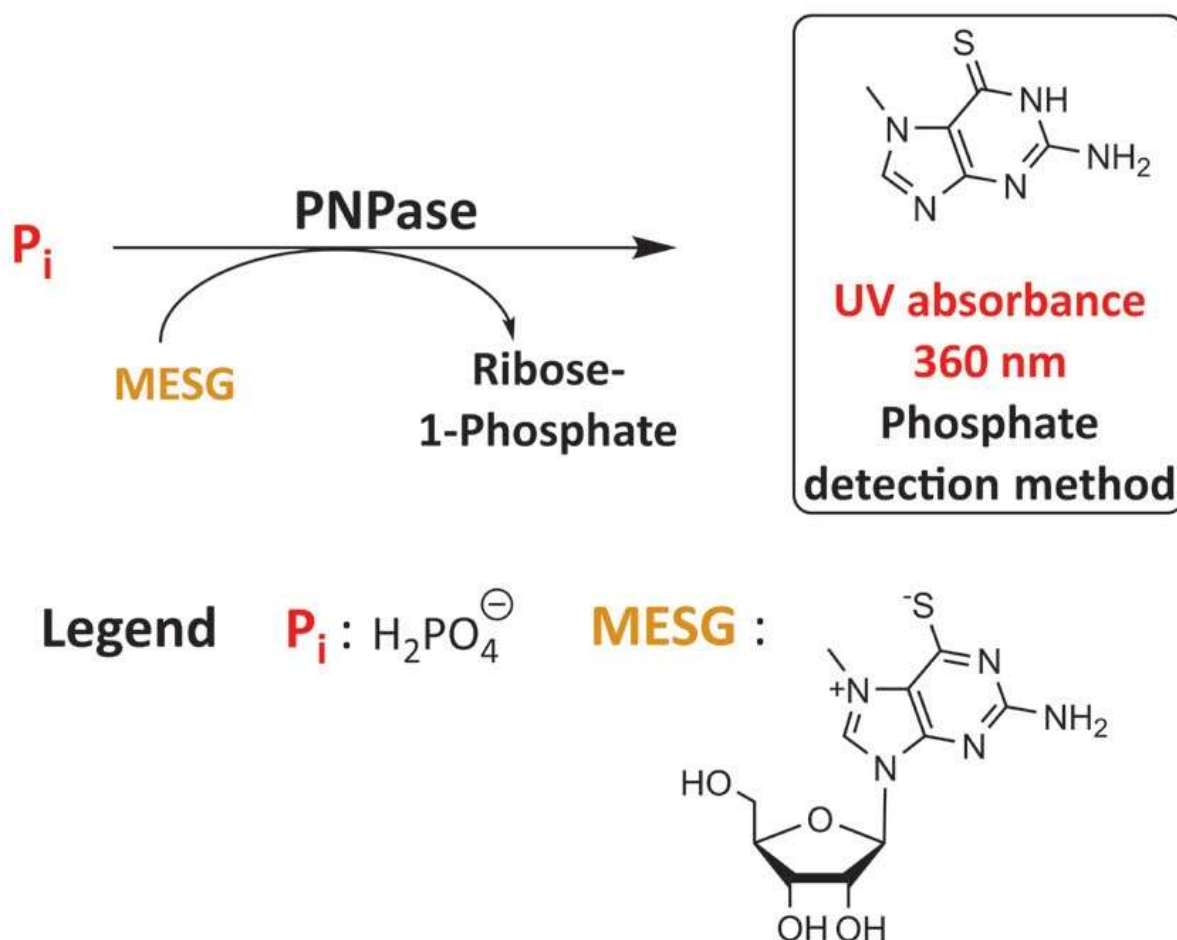


図1. リン酸検出法の概略

B. 分析の直線性 - Linear range of assay -

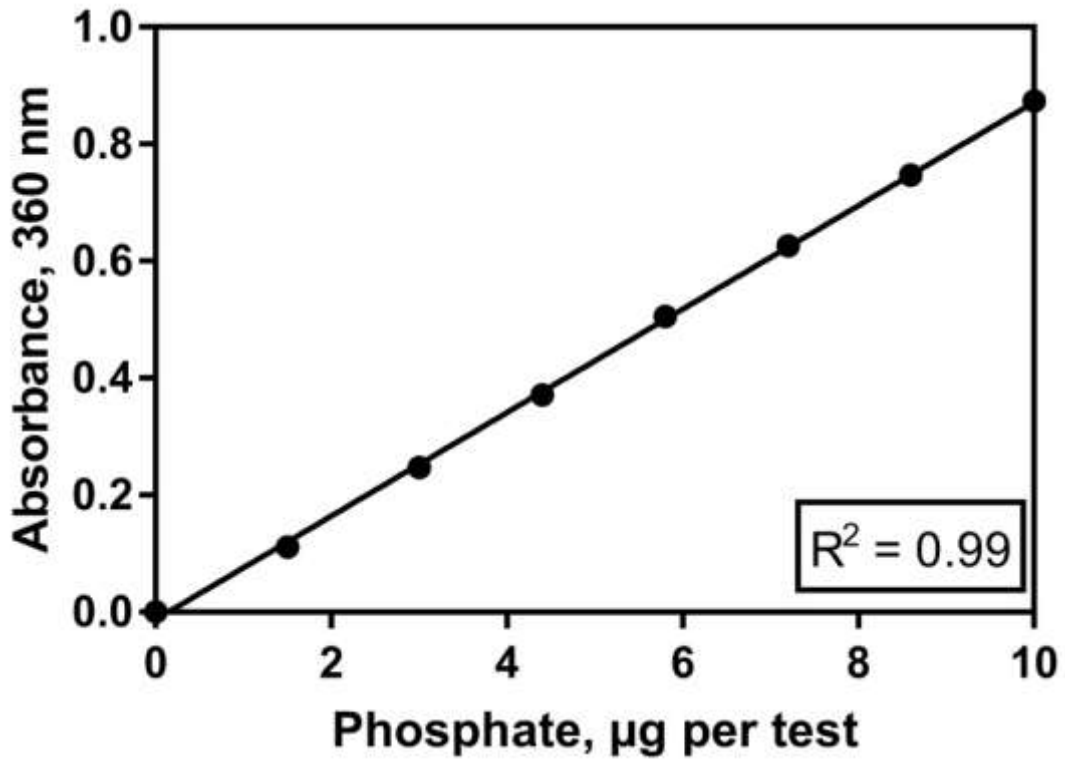


図2. リン酸測定法の直線性

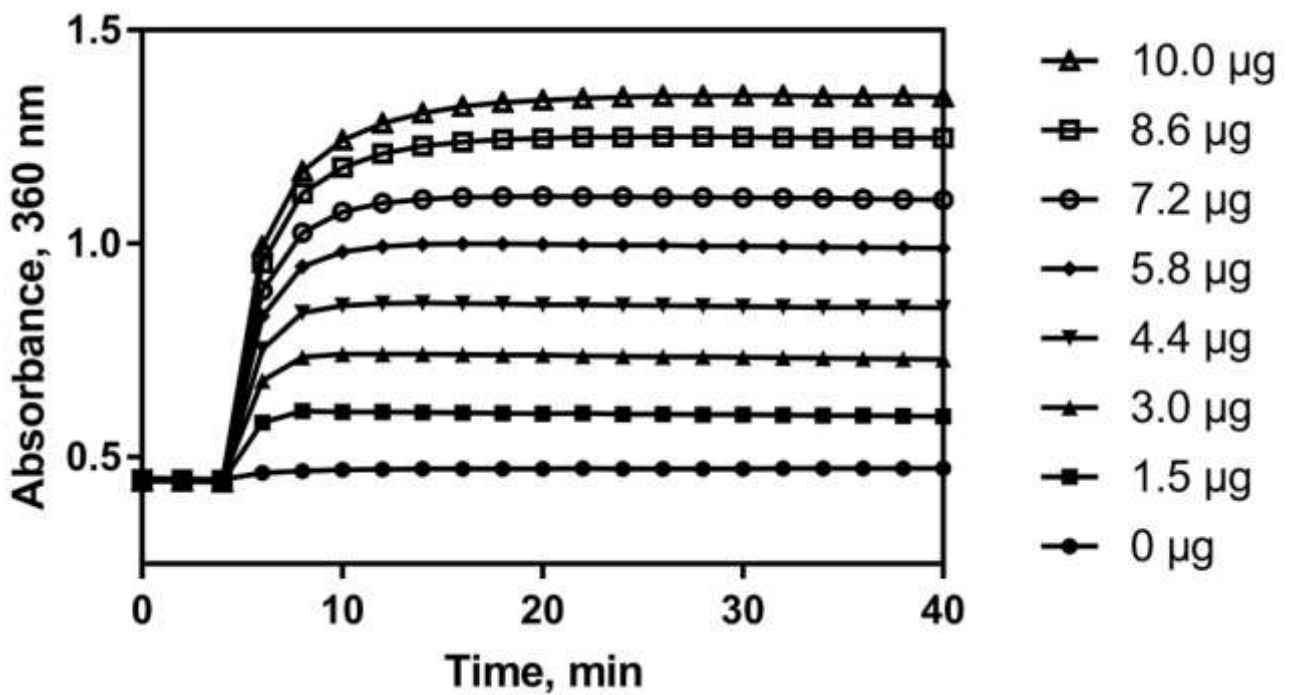


図3. リン酸 0~10µgとの反応による 360nm 吸光度の増加

文献 - REFERENCES -

1. McKie, V. A. & McCleary, B. V. (2016). A Novel and Rapid Colorimetric Method for Measuring Total Phosphorus and Phytic Acid in Foods and Animal Feeds. *J. AOAC Int.*, **99**, 738-743.
2. Webb, M.R. (1992). A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *PNAS*, **89**, 4884-7.

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