

Megazyme

フィチン酸(塩)／ 総リン量分析法

PHYTIC ACID (PHYTATE) / TOTAL PHOSPHORUS

Measured as phosphorus released by phytase
and alkaline phosphatase

ASSAY PROCEDURE

K-PHYT 05/19

K-PHYT
(用手法 50 回分)

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

フィチン酸(フィチン酸塩;ミオイノシトール 1,2,3,4,5,6-ヘキサキスリン酸塩)は、イノシトールの主な供給源であり、また植物種子中の貯蔵リンとして総リン量の約70%を占めています。単胃動物ではフィチン酸の脱リン酸化に特異的な酵素フィターゼを体内に有さず、この形態のリンは利用できないため、穀物中にフィチン酸が豊富にあることは、食品および動物飼料業界の大きな懸念事項です。さらにフィチン酸には強いキレート特性があり、各種ミネラル(Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 $\text{Fe}^{2+/3+}$ など)、タンパク質、アミノ酸などの必須栄養素の有効利用を妨げています²。そのため無機リン酸塩を補充すると糞便中のリン濃度が増加し、その結果水資源の富栄養化が引き起こされます。言い換えれば、商業的なフィターゼの利用がますます一般的になりつつあり、無機リン酸塩の使用と、それに関連する環境問題を減らすことができます。

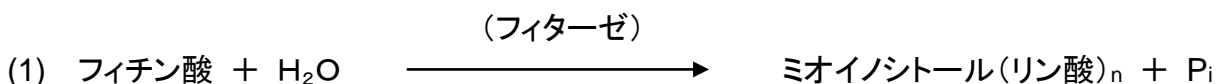
現在、フィチン酸の簡便な定量分析法は市販されておらず、測定は概して複雑であり、一般に受け入れられているAOAC法 986.11 には制限があります³。分析ごとに、面倒な陰イオン交換による精製が必要であり、一番の問題は精製された測定対象が全てフィチン酸と仮定していることです。この前提は、フィチン酸が総イノシトールリン酸の97%以上を占める加工前の穀物では成り立ちますが、加工食品や飼料の場合、含有するリン酸度の低いミオイノシトールリン酸(IP_3 、 IP_4 、 IP_5)がフィチン酸と同じ挙動を示すため、フィチン酸含有量の過大評価に繋がります^{4, 5}。

フィチン酸を低級ミオイノシトールリン酸と分別精製して測定することが困難であることから、メガザイムは食品および飼料サンプル中の総「利用可能なリン」量を測定する簡単で定量的な方法(**K-PHYT**)を開発しました。多数検体の処理が可能で、面倒な陰イオン交換精製を必要としません¹。この方法では、イノシトールリン酸の酸抽出の後、フィチン酸(IP_6)および低級ミオイノシトールリン酸(IP_2 、 IP_3 、 IP_4 、 IP_5)に特異的なフィターゼで処理します。さらに最後にアルカリホスファターゼにより、フィターゼの作用に比較的抵抗性があるミオイノシトールリン酸(IP_1)からリン酸を遊離します。遊離した全リン酸は、改良した比色法により測定され、サンプル 100g あたりのリンのグラム数で示されます^{6, 7}。

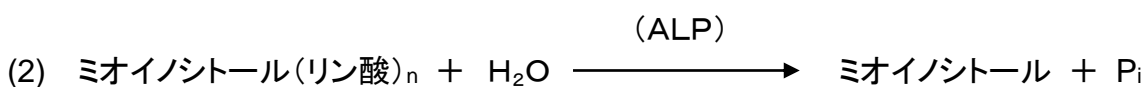
アルカリホスファターゼは、ミオイノシトールリン酸以外のモノリン酸エステルからもリン酸を遊離しますが、**K-PHYT** を使用し各種のサンプルを分析した結果、ミオイノシトールリン酸以外のモノリン酸エステルから遊離するリン量は僅かであることが示されました。

原理 - PRINCIPLE -

フィターゼはフィチン酸(フィチン酸塩、ミオイノシトールヘキサキスリン酸)をミオイノシトール(リン酸)_nと無機リン酸(Pi)に加水分解します(1)。



アルカリホスファターゼ(ALP)はミオイノシトール(リン酸)_nにさらに作用し、ミオイノシトールと無機リン酸(Pi)にまで加水分解します(2)。



無機リン酸(Pi)はモリブデン酸アンモニウムと反応して 12-モリブドリン酸を形成し、酸性条件下でモリブデンブルー(モリブデン青)に還元されます(3、4)。



(4) 12-モリブドリン酸 + 硫酸 / アスコルビン酸 \longrightarrow モリブデンブルー

この反応で形成されるモリブデンブルー量は、サンプル中に存在する Pi 量に比例し、655nm の吸光度の増加によって測定されます。Pi は、リン標準液を用いた検量線からリンとして定量します(6~7ページを参照)。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法は、フィターゼおよびアルカリホスファターゼによりフィチン酸、ミオイノシトール(リン酸)_n およびリン酸エステルから「利用可能なリン」として遊離されるリンの測定に特異的です。

このキットは、遊離型またはフィターゼ / アルカリホスファターゼで遊離されるミオイノシトールそのものを測定することはできません。必要な場合は別途ミオイノシトール分析キット(**K-INOSL**)を参照して下さい。

吸光度差の最小値は 0.005 です。これは分析試料 100g 中のリン濃度約 2.82mg/100g(またはフィチン酸濃度として約 10mg/100g)に相当します。検出限界は分析試料 100g 中のリン濃度約 11.29mg/100g(またはフィチン酸濃度として約 40mg/100g)で、吸光度差 0.020 に相当します。

この分析は約 0.5~7.5 μ g のリン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、これはリン濃度約 2.82~11.29mg/100g(またはフィチン酸濃度として約 10~40mg/100g)に相当します。

食品分析における標準的な分析結果は表2(9ページ)に示しました。

阻害 - INTERFERENCE -

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フィチ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 -

50 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(25mL、pH 5.5)。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: フィターゼ懸濁液(1.2mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル3: 緩衝液(25mL、pH 10.4)、MgCl₂、ZnSO₄ 含有。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4: アルカリホスファターゼ懸濁液(1.2mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル5: リン標準液(24mL、50 μ g/mL)。保存剤として 0.02%w/v アジ化ナトリウム含有。4 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。

ボトル6: オート麦標準品粉末(5g; リン含有量はボトル参照)。室温で5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 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。
2. 付属のボトル2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 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。
3. 付属のボトル3をそのまま使用して下さい。4 $^{\circ}$ 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。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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ Cで2年以上安定です。
6. オート麦粉末標準品を使用する場合、標準分析手順のサンプル抽出工程で 1g を 0.66M 塩酸 20mL で抽出します(4ページのセクションA参照)。4 $^{\circ}$ Cで1週間安定です。

NOTE: オート麦粉末標準品抽出物は、ボトル表示値の誤差 10%以内の分析値が得られるはずですが、この標準品抽出物は、サンプル中に阻害物質の存在が疑われる場合、スパイク試験として直接使用することもできません。この場合、標準品抽出物から遊離したリン濃度は、総リン量で算出する必要があります [g/100g] (7ページ参照)。

試薬溶液の調製 (供給外)

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS (NOT SUPPLIED) -

1. 発色試薬:

溶液A. 10% w/v アスコルビン酸／1M 硫酸 : 100mL

- ・アスコルビン酸(Sigma #95210 または同等品) 10g を蒸留水 90mL に加えます。
- ・濃硫酸(Sigma #258105 または同等品) 5.35mL を加え、アスコルビン酸を溶解します。蒸留水で 100mL に定容します。4 $^{\circ}$ Cで1週間安定です。

溶液B. 5% w/v モリブデン酸アンモニウム : 25mL

モリブデン酸アンモニウム(Sigma #277908 または同等品) 1.25g を蒸留水 20mL に溶解し、25mL に定容します。4 $^{\circ}$ Cで1ヶ月安定です。

必ず溶液Aに溶液Bを添加して下さい。5部の溶液Aに対し、1部の溶液Bを混合します(例えば溶液A 5mLに溶液Bを1mL添加)。ブランクと標準を含めた分析サンプル数当たり0.6mLが必要です。分析当日に調製して下さい。

必要量: 溶液A=サンプル数 \times 0.5 (mL)。溶液B=サンプル数 \times 0.1 (mL)。

2. 50% w/v トリクロロ酢酸 : 100mL

トリクロロ酢酸(Sigma #T6399 または同等品) 50g を蒸留水 60mL に加えて溶解します。蒸留水で 100mL に定容します。4 $^{\circ}$ Cで6か月以上安定です。

3. 0.66M 塩酸 : 1L

塩酸(Sigma #258148 または同等品) 54.5mL を蒸留水 945.5mL に加えて攪拌します。室温にて保存します。

4. 0.75M 水酸化ナトリウム : 200mL

水酸化ナトリウム顆粒(Sigma #795429 または同等品) 6g を蒸留水 180mL に加えて溶解します。蒸留水で 200mL に定容します。室温にて保存します。

5. フィチン酸

精製フィチン酸標準品が必要な場合は、以下の製品をお勧めします。
フィチン酸二カリウム塩(Sigma #P5681)。

機器(推奨):

1. ガラスビーカー (100mL)
2. 使い捨て 1.5mL ポリプロピレン製マイクロ遠心チューブ (例; Sarstedt #72.690.550)
3. 使い捨て 13mL 容ポリプロピレン試験管 (例; Sarstedt #60.541.685)
4. 使い捨てプラスチック製マイクロキュベット(光路 1cm、1.5mL)。
5. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman®(100 μ L、1mL)
6. 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、緩衝液2、発色試薬各 0.5mL、トリクロロ酢酸 0.3mL 分注用)
7. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
8. 分析用天秤
9. 655nm に設定した分光光度計
10. ボルテックスミキサー
11. 恒温水槽(40°C調整)
12. マイクロ遠心機 (13,000rpm 対応のもの)

標準分析法 - STANDARD ASSAY PROCEDURE -

A. サンプルの抽出 - A. SAMPLE EXTRACTION -

1. サンプル約 1g を 100mL 容ガラスビーカーに精秤します。0.66M 塩酸 20mL を加え、ビーカーをアルミホイルで覆い、室温で最低3時間(好ましくは一晩)激しく攪拌します。
2. 抽出物約 1mL を 1.5mL マイクロ遠心チューブに移し、13,000rpm で10分間遠心します。遠心後直ちに得られた抽出物の上清 0.5mL を別の 1.5mL マイクロ遠心チューブに分取し、0.75M 水酸化ナトリウム溶液 0.5mL を加えて中和します。中和後のサンプルを次の酵素的脱リン酸化反応手順に進めます。

B. 酵素的脱リン酸化 - ENZYMATIC DEPHOSPHORYLATION REACTION -

反応容器: マイクロ遠心チューブ(1.5mL)

反応温度 約40°C

反応容量 1.39 mL

ピペットでマイクロ遠心チューブに添加	遊離リン	総リン
蒸留水	0.62 mL	0.60 mL
溶液1 (緩衝液)	0.20 mL	0.20 mL
サンプル抽出液	0.05 mL	0.05 mL
懸濁液2 (フィターゼ)	-	0.02 mL
ボルテックスミキサーで混合し、40°Cで10分反応。 10分後、次に以下のものを添加し反応継続:		
蒸留水	0.02 mL	-
溶液3 (緩衝液)	0.20 mL	0.20 mL
懸濁液4 (ALP)	-	0.02 mL
ボルテックスミキサーで混合し、40°Cで15分反応。 15分後、次に以下のものを添加し反応停止:		
トリクロロ酢酸 (50% w/v)	0.30 mL	0.30 mL
反応停止液を 13,000rpm、10分遠心分離します。遠心後、決して攪拌しないで下さい。上清を分取し、リンの比色定量に供します(セクションC)。		

C. リンの比色定量(用手法)

- COLOURIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS:MANUAL FORMAT -

NOTE: 分析する一連のサンプルと同時に、同バッチの発色試薬でリンの検量線を同時に作成する必要があります(次のセクションDを参照)。

波長: 655nm

キュベット 光路 1cm (ガラスもしくはプラスチック、1.5mL セミマイクロセル)

反応温度 約40°C

反応最終容量 1.5 mL

サンプル溶液 リン 0.5~7.5 µg (サンプル液量 1.00mL)

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

ピペットでマイクロ遠心チューブに添加	サンプル
サンプル溶液、またはリン標準液	1.00 mL
発色試薬	0.50 mL
ボルテックスミキサーで混合し、40°Cで1時間反応。1時間後、攪拌しうち 1mL をセミマイクロセルに分取し、655nm の吸光度(A ₆₅₅)を3時間以内に測定。	

D. リン標準曲線の作成 - PREPARATION OF PHOSPHORUS CALIBRATION CURVE: -

次表に記載したリン標準液系列を作製し、リンの比色定量に用います(上記セクションC参照)。4°Cで1週間安定です。

13mL 容ポリプロピレン 試験管に添加	標準0 (0 µg)	標準1 (0.5µg)	標準2 (2.5µg)	標準3 (5µg)	標準4 (7.5µg)
蒸留水 (mL)	5.00	4.95	4.75	4.50	4.25
リン標準液(溶液5) (mL)	-	0.05	0.25	0.5	0.75
総液量 (mL)	5.00				

算出法

A. リン標準曲線

- 各リン標準液(標準0~4)の吸光度(A_{655})を測定します。標準0(ブランク)の吸光度を、標準1~4の吸光度から差し引いてそれぞれ $\Delta A_{標準n}$ を算出します(表1に例を示します)。
- 各標準液(標準1~4)について、以下の式でMを算出します。

$$M_{標準n} = \text{リン} (\mu\text{g}) / \Delta A_{標準n} \quad [(\mu\text{g}) / \Delta A]$$

- 5つのM値の平均を取ります

$$\text{平均M} = (M_{標準1} \sim M_{標準4} \text{の合計}) / 4 \quad [(\mu\text{g}) / \Delta A]$$

この「平均M」を元に試料中のリン量をセクションBで算出します。

算出例: リン検量線を用いた算出例を表1に、標準的な検量線を図1に示します。

表1. 標準的なリン検量線を用いた算出例

リン標準液	リン (µg)	A_{655}	ΔA	M [µg/ΔA]
標準0	0	0.046	0.000	-
標準1	0.5	0.144	0.098	5.102
標準2	2.5	0.543	0.497	5.030
標準3	5.0	1.040	0.994	5.030
標準4	7.5	1.537	1.491	5.030
平均M	-	-	-	5.075

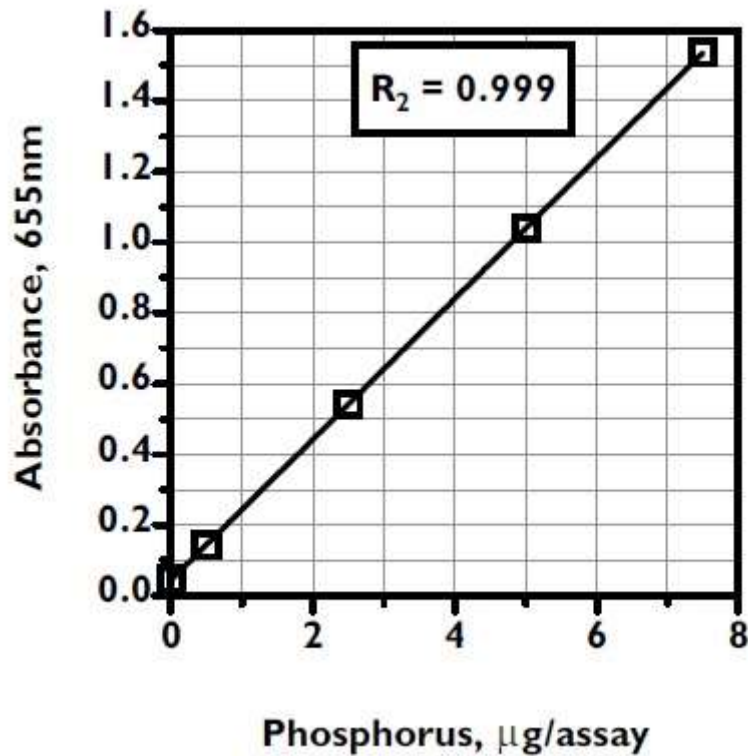


図1. K-PHYT 分析法によるリン検量線の直線性 光路長:1cm

B. リン／フィチン酸含量

「遊離リン」と「総リン」サンプルの両方の吸光度 (A_{655}) を測定します。「総リン」サンプルの吸光度から「遊離リン」サンプルの吸光度を差引き、 ΔA を得ます。

リン濃度は、以下のように計算することができます。

$$c = \frac{\text{平均}M \times 20 \times F}{10,000 \times 1.0 \times v} \times \Delta A \quad [\text{g}/100\text{g}]$$

ここで:

- 平均M = リン酸標準液検量線から求められた平均値 ($\mu\text{g}/\Delta A$)
- 20 = 元の抽出容量 (mL)
- F = 希釈率
- ΔA = サンプルの吸光度差
- 10,000 = $\mu\text{g}/\text{g}$ から $\text{g}/100\text{g}$ に換算
- 1.0 = サンプル秤量値 (g)
- v = 定量分析時のサンプル液量 (mL)

リン含量は以下の通り

$$c = \frac{\text{平均}M \times 20 \times 55.6}{10,000 \times 1.0 \times 1.0} \times \Delta A \quad [\text{g}/100\text{g}]$$

$$= 0.1112 \times \text{平均}M \times \Delta A \quad [\text{g}/100\text{g}]$$

フィチン酸含量は以下の通り

$$c = \text{リン酸 [g/100g]} \div 0.282 \quad [\text{g/100g}]$$

NOTE :

1. サンプルの吸光度 (A_{655}) が 0.100 以下、もしくはまたは標準4の吸光度を超える場合は、以下の「改良サンプル抽出法」を参照して下さい。
2. フィチン酸含有量の計算は、測定されたリンの量がフィチン酸からのみによるものであり、フィチン酸のリン含量が 28.2%と仮定しています。
3. 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-Cal*™を使用することで簡単に計算できます。

考察:

改良サンプル抽出法

- a) **サンプル吸光度 (A_{655}) が標準4を超える場合:** サンプル吸光度 (A_{655}) が標準4の吸光度より高い場合、**サンプル 1g** に対し **0.66M 塩酸 100mL** を使用して再分析します。
この場合、元のサンプル抽出液量[mL]は 100 になります。

従って、リン濃度は以下の通り

$$c = \frac{\text{平均M} \times 100 \times 55.6}{10,000 \times 1.0 \times 1.0} \times \Delta A \quad [\text{g/100g}]$$
$$= 0.556 \times \text{平均M} \times \Delta A \quad [\text{g/100g}]$$

- b) **サンプル吸光度 (A_{655}) が 0.100 を下回る場合:** サンプル吸光度 (A_{655}) が 0.100 以下の場合、以下の抽出表を参考にサンプル抽出工程に使用するサンプル量(g)を調整して再分析します。

抽出表

サンプル吸光度	推奨サンプル量 (g)
0.03~0.05	4.0
0.05~0.10	2.5

分析例:

標準分析法により $A_{655} = 0.07$ の結果が得られた場合、抽出工程でサンプル 2.5g を用いて再分析することを推奨します。この例の場合、計算時のサンプル重量(g/100g)は 2.5 になります。

従って、リン濃度は以下の通り

$$c = \frac{\text{平均M} \times 20 \times 55.6}{10,000 \times 2.5 \times 1.0} \times \Delta A \quad [\text{g/100g}]$$
$$= 0.04448 \times \text{平均M} \times \Delta A \quad [\text{g/100g}]$$

フィチン酸含量の算出は前述の通りです。

表2. **K-PHYT** による食品サンプルの代表的な分析例

試料	総リン量 (g/100g)	フィチン酸量 (g/100g)
大麦粉末 (#60301)	0.105	0.371
麦芽粉末 (#61001)	0.131	0.465
オート麦粉末 (#00101)	0.499	1.771
小麦粉末 (#70201)	0.029	0.103
アメリカ長粒米	0.049	0.174
ケロッグオリジナル「オールブラン」	0.453	1.608
うずら豆(挽割り)	0.214	0.758
赤うずら豆(挽割り)	0.181	0.643
オドラムズ・ペーカリーの全粒粉	1.008	3.575
大豆ミール (#51101)	0.512	1.815

全てのサンプルは **K-PHYT** 標準分析法に基づき、光路長 1cm セルにてリンを比色定量した

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. Cosgrove, D. J. (1980). Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology. *"Studies in Inorganic Chemistry"*, Vol. 4. Elsevier Scientific Publishing Company, The Netherlands.
3. Association of Official Analytical Chemists. (2000). Cereal Foods. *"AOAC Official Methods of Analysis"*. 17th ed. **32**, 57-58.
4. Kasim, B. A. & Edwards Jr, H. M. (1998). The Analysis for Inositol Phosphate Forms in Food Ingredients. *J. Sci. Food Agric.*, **76**, 1-9.
5. Lehrfeld, J. & Morris, E. R. (1992). Overestimation of Phytic Acid in Foods by the AOAC Anion-Exchange Method. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2208-2210.
6. Fiske, C. H. & Subbarow, Y. (1925). The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400.
7. Lowry, O. H. & Lopez, J. A. (1946). The Determination of Inorganic Phosphate in the Presence of Labile Phosphate Esters. *J. Biol. Chem.*, **162**, 421-428.

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