

Megazyme

ピルビン酸(塩)分析法

PYRUVIC ACID (PYRUVATE) ASSAY PROCEDURE

K-PYRUV 10/20

K-PYRUV
(用手法 100 回分*)
(自動分析法／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 -

ピルビン酸(塩)は、様々な生化学的代謝経路で中心的な役割を果たすアルファケト酸です。ピルビン酸は発酵生産品、特に黒ビールに大量に含まれています。またワイン、果物(リンゴなど)、チーズにも含まれています。ピルビン酸塩は、体重制御に関する各種栄養補助食品の有効成分です。また血液および尿中のピルビン酸濃度は、特定の症状における有用な臨床マーカーです。

原理 - PRINCIPLE -

還元型NADHの存在下、D-乳酸デヒドロゲナーゼ(D-LDH)は、ピルビン酸(塩)をD-乳酸とNAD⁺に変換します(1)。



この反応で生じるNAD⁺量はピルビン酸量と化学量論的に同一です。NADH量は340nmの吸光度減少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 -

この測定法はピルビン酸に対して特異性が高いです。

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、分析試料中のピルビン酸濃度0.0985mg/Lに相当します(またはサンプル量0.1mL当たり1.97mg/L)。

検出限界は最大サンプル量2.00mLを用いた場合、分析試料中のピルビン酸濃度0.394mg/Lで、吸光度差0.020に相当します。

この分析は0.3~40μgのピルビン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、これは最大サンプル量2.00mLを用いた場合、ピルビン酸濃度0.0986~0.197mg/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 -

ピルビ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ピルビン酸(0.1mL中に約20μg)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ピルビ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(22mL、pH 7.4)、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: NADH。-10°C以下で2年以上安定です。
- ボトル3: D-乳酸デヒドロゲナーゼ懸濁液(2.2mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル4: ピルビン酸標準液(5mL、0.20mg/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に蒸留水 10.5mL を加え、内容物を溶解します。4°Cで約4週間または-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。密封条件下、4°Cで2年以上安定です。

NOTE: ピルビン酸標準液は、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障害が疑われる場合にのみ使用します。
ピルビン酸濃度は、NADH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® [NADH溶液(溶液2) 0.2mL 分注用]
- 25 mL Combitip® (蒸留水 2.5mL 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、GF/A ガラス繊維濾紙(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	2.82 mL
サンプル溶液	ピルビン酸 0.3~40.0µg (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）	2.50 mL	2.40 mL [†]
サンプル溶液	-	0.10 mL [†]
ボトル1（緩衝液）	0.20 mL	0.20 mL
ボトル2（NADH）	0.10 mL	0.10 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3（D-LDH）	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（A₁-A₂）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。

ピルビン酸濃度は、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 = ピルビン酸の分子量

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。

ピルビン酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.82 \times 88.06}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.3942 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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。

ピルビン酸含量

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

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. ピルビ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ピルビ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
ボトル1 (緩衝液)	7.7 mL
ボトル2 (NADH)	3.8 mL
蒸留水	73.2 mL
総液量	84.7 mL

R2 試薬調製

組成	液量
ボトル3 (D-LDH)	0.7 mL
蒸留水	7.7 mL
総液量	8.4 mL

分析法

R1:	0.250 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	減少
直線性	サンプル量 0.01mL 時、ピルビン酸約 0.4g/L まで

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

NOTE :

1. ピルビ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ピルビ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℃
最終反応液量	0.282 mL
直線性	サンプル量 0.01~0.20 mL 時、ピルビン酸で 0.1~4 µg/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	0.250 mL	0.240 mL [†]	0.240 mL
サンプル溶液	-	0.010 mL [†]	-
標準液	-	-	0.010 mL
ボトル1 (緩衝液)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
ボトル2 (NADH)	0.010 mL	0.010 mL	0.010 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3 (D-LDH)	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)。 分後も反応が終了していない場合、分間の吸光度変化がなくなるまで 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

† 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ピルビン酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.3~40 μ g の範囲である必要があります。従って試料溶液のピルビン酸が 0.003~0.40g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定ピルビン酸濃度(g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.40	希釈不要	1
	0.40~4.0	1 + 9	10
	4.0~40	1 + 99	100
	> 40	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 ワイン、果汁)は、2M NaOH を用い溶液の pH を 7.4 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 7.4 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D-LDH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砕し、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。
- 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。

サンプルの調製例

(a) ワイン中のピルビン酸の定量

白ワインの場合、0.20mL を分析に用います。酸含量の少ない試料では最大 2.0mL まで使用できます。ピルビン酸を約 0.2g/L 含有する赤ワインの場合、脱色せずにそのまま試料 0.10mL を分析します。ピルビン酸濃度が 0.1 g/L 未満の赤ワインの場合、試料 10mL あたり PVPP 0.2g を添加し、5分間攪拌して脱色します。一定量を Whatman No.1 濾紙で濾過し、pH を約 7.4 に調整します。その後濾過分取サンプルの2倍液量に調整します。分析では最大 2.0mL の試料を用い、希釈とサンプル量を考慮して算出します。

通常、希釈は不要で、サンプル量は白ワインは 0.2mL、赤ワインは 0.1mL で十分です。

(b) 果汁(リンゴなど)中のピルビン酸の定量

高濃度のピルビン酸(約 0.5g/L)を含有する果汁の場合、試料の一定量を等量の蒸留水で希釈し、分析に 0.1mL を用います。試料量を増やしたい場合は、分析前に試料の pH を約 7.4 に調整します。着色果汁は、6ページの「一般的な注意事項(e)」の説明に従い脱色し、分析には 0.10~2.00mL の試料を用います(0.1mL 以上の試料を用いる場合は、pH 7.4 に調整します)。通常、希釈は不要で、サンプル量は 0.1mL で十分です。

(c) ビール中のピルビン酸の定量

濾過またはガラス棒で5分間攪拌することにより、ビールを脱気し、そのまま分析します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(d) チーズ中のピルビン酸の定量

摺りおろしたチーズを約 2g、100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水 60mL を加え、フラスコを約60℃で20分間、時折振とうしながら加温します。フラスコを20~25℃に冷却後、定容します。フラスコを4℃で30~60分間保持後、溶液の一部を Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。分析には透明な濾液を用います。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.5mL で十分です。

(e) 栄養補助食品中のピルビン酸の定量

一般に、栄養補助食品中のピルビン酸濃度の測定は、以下のように測定します。試料の平均的な部分約 5g を 100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水約 60mL を加えた後、内容物を完全に溶解または懸濁するまで攪拌し、蒸留水で定容します。混合し、必要に応じ Whatman No.1 濾紙で濾過します。分析には透明な濾液を使用し、必要に応じて希釈表に従って希釈します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(f) 全血試料中のピルビン酸の定量

a. 試薬

濃 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) 30g を 200mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

濃 Carrez II 溶液: 硫酸亜鉛 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma Z4750 または同等品) 60g を 200mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

b. 手順

全血試料 1mL を約80°Cで20分間加熱します。マイクロ遠心チューブで 13,000×g、10分間遠心分離し、上清を回収します。濃 Carrez 試薬 II 20μL を添加して十分に混合し、次に濃 Carrez 試薬 I 20μL を添加して十分に混合します。サンプルを 13,000×g、10分間再度遠心し、上清を回収します。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。

NOTE: 清澄上清の最終容量は、元試料の約 1/4 量になります。
従って、分析に必要な上清液量を勘案して出発試料の液量を決めて下さい。

(g) 生体組織試料中のピルビン酸の定量

生体組織の平均的な部分 5g を精秤し、100mL 容メジウム瓶に入れます。1M 過塩素酸 20mL を添加し、Ultra-turrax® や Polytron® ホモジナイザー (または同等のもの) を使用して2分間ホモジナイズします。40mL 容ガラスビーカーに全量を移し、2M KOH を用いて pH をおよそ 8.0 に調整します。100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します (脂肪含有層が「標線より上」にあり、水面が「標線上」にあることを確認する)。20分間氷冷して過塩素酸カリウムを沈殿させ、脂肪層があれば分離します。適量のサンプルを 13,000×g で10分間遠心するか、あるいは Whatman® No.1 濾紙で濾過し、最初の 3~5 mL を捨てた後の濾液を回収して得た清澄上清を分析に用います。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。

NOTE: 使用する出発材料の量や容量は、試料の分析対象物含量に応じて適宜調整して下さい。

(h) 尿や血清など体液試料中のL-フコースの定量

一部の体液試料では、希釈以外の前処理なしで直接分析が可能なものがあります。そうでない場合、過塩素酸またはトリクロロ酢酸の何れかによる除タンパクが必要になることがあります。

等量の氷冷した1M過塩素酸を混合しながら添加し、除タンパクします。試料の一部を 1,500×g で10分間遠心分離するか、あるいは Whatman® No.1 濾紙で濾過し、最初の 3~5mL を捨てた後の濾液を回収して得た清澄上清を分析に用います。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。あるいは、過塩素酸の代わりに 50% (w/v) のトリクロロ酢酸を使用します。

文献 - REFERENCES -

Lamprecht, W. and Heinz, F. (1988). Pyruvate. "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VI, pp. 570-577, 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