

Megazyme

コハク酸(塩)分析法

SUCCINIC ACID (SUCCINATE) ASSAY PROCEDURE

K-SUCC 05/20

K-SUCC
(用手法 20 回分)
(自動分析法 270 回分)
(マイクロプレート法 200 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

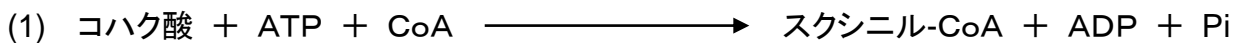
はじめに - INTRODUCTION -

コハク酸は全ての植物および動物材料に含まれているジカルボン酸で、クエン酸サイクルにおける中心的な代謝産物です。コハク酸の濃度は、ワイン、醤油、大豆粉、果汁、乳製品(チーズなど)を含む多数の食品や飲料の製造でモニターされています。リンゴの熟成プロセスはコハク酸の低下レベルで確認することができます。卵および卵製品中でコハク酸が **5mg/kg** を超えると、微生物汚染の疑いがあります。コハク酸は、食品および飲料業界における香味料としての用途とは別に、染料、薬物、香水、ラッカー、写真薬品やクーラントの製造など、他の多くの非食品用途にも使用されています。

原理 - PRINCIPLE -

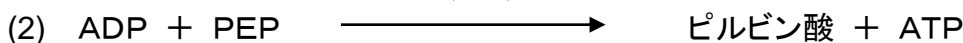
ATP並びにCoAの存在下、コハク酸(塩)はスクシニル-CoAシンテターゼ(SCS)によりスクシニル-CoAに変換され、同時にADPと無機リン(Pi)を生じます(1)。

(SCS)



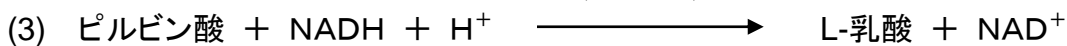
次にADPとホスホエノールピルビン酸存在下、ピルビン酸キナーゼ(PK)はピルビン酸とATPを生成します(2)。

(PK)



生成したピルビン酸は、還元型NADHの存在下、L-乳酸デヒドロゲナーゼ(L-LDH)によりL-乳酸に還元され、同時にNAD⁺が生成します(3)。

(L-LDH)



この反応で生じるNAD⁺量はコハク酸量と化学量論的に同一です。NADHの消費量は340nmの吸光度の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 -

市販のコハク酸の分析では、約 100%(w/w)の回収率が得られるはずですが、スクシニル-CoAシンテターゼはコハク酸以外にイタコン酸にも反応します。しかし食品中のイタコン酸濃度は非常に低いため、分析結果に影響しません。

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、分析試料中のコハク酸濃度 0.128mg/L(サンプル量 0.10mL を用いた場合、2.56mg/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、分析試料中のコハク酸濃度 0.256mg/L で、吸光度差 0.010 に相当します。

この分析は 0.8~40μg のコハク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、コハク酸濃度約 0.128~0.256mg/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 -

コハク酸の変換が分析法で定義された時間(約5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20 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コハク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 20 検体(自動分析法 270 検体/マイクロプレート法 200 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(8mL, pH 8.4)。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:($\times 2$) NADHと安定剤。-10°C以下で2年以上安定です。
- ボトル3:($\times 2$) ATP、PEPおよびCoA。-10°C以下で2年以上安定です。
- ボトル4: ピルビン酸キナーゼとL-乳酸デヒドロゲナーゼ懸濁液、0.55mL。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル5: スクシニルCoAシンテターゼ懸濁液(0.55mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル6: コハク酸(約 2g)。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 2.4mL に溶解します。
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)。
必要になるまで2本目は決して溶解しないで下さい。
3. ボトル3の内容物を蒸留水 2.4mL に溶解します。適量ずつポリプロピレン容器に分注し冷凍保存します。-10°C以下で2年以上安定です。使用中は冷蔵又は氷冷にて保管願います。必要になるまで2本目は決して溶解しないで下さい。
- 4,5. 付属のボトル4, 5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。

6. コハク酸約 200mg を精度 0.1mg で精秤し、1L 容メスフラスコに入れます。攪拌して溶解し、蒸留水で定容します。10mL 程度ずつポリプロピレン製チューブに小分けして-10℃以下で保存します。4℃で2年以上安定です。

NOTE: コハク酸標準液は、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。
コハク酸濃度は、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、12mL 容、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、200μL)
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、NADH、ATP/PEP/CoA溶液各 0.2mL 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. ボルテックスマキサー
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 2.74 mL
 サンプル溶液 コハク酸 0.8~40 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℃)	2.10 mL	2.00 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 (NADH)	0.20 mL	0.20 mL
溶液3 (ATP/PEP/CoA)	0.20 mL	0.20 mL
懸濁液4 (PK/L-LDH)	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5 (SCS)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約6分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 6分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する**。		

- * 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。
- ** 吸光度 A_2 が減少し続ける場合は、吸光度を懸濁液5の添加時間から外挿する。
- † 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 ($A_1 - A_2$) 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。

コハク酸の濃度は、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 = コハク酸の分子量
- 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。

コハク酸濃度は以下の通り

$$c = \frac{2.74 \times 118.09}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.5136 \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

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。

コハク酸含量

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

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*™ 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. コハク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コハク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	20.55 mL
溶液1 (緩衝液)	2.40 mL
溶液2 (NADH)	2.40 mL
溶液3 (ATP/PEP/CoA)	2.40 mL
懸濁液4 (PK/L-LDH)	0.24 mL
総液量	27.99 mL

R2 試薬調製

組成	液量
蒸留水	3.55 mL
懸濁液5 (SCS)	0.26 mL
総液量	3.81 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6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、コハク酸 343mg/L まで

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

NOTE :

1. コハク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コハク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 0.274 mL

直線性 サンプル量 0.01~0.20 mL 時、コハク酸で 0.1~4 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)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液2 (NADH)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液1 (ATP/PEP/CoA)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
溶液2 (PK/L-LDH)	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5 (SCS)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約6分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 6分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2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

** この「クリープ」現象がブランクより大きい場合、試料の吸光度は懸濁液5の添加から外挿する

† 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(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コハク酸の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.8~40µg の範囲である必要があります。従って試料溶液のコハク酸が 0.008~0.40g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定コハク酸濃度 (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

- a) **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。
- b) **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 8.4 近くにまで上げ、室温で30分間放置する必要があります。
- 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 8.4 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。
- d) **着色した試料:** 反応液にSCS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:** 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) 白ワイン中のコハク酸の定量

サンプルの前処理は不要です。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(b) 赤ワイン中のコハク酸の定量

サンプル 25mL を 100mL 容ビーカーに分取し、1M NaOH で pH を 7~8 に調整します。蒸留水で 50mL に定容し、PVPP 0.5g を追加して5分間攪拌し、懸濁液の一部を Whatman No.1 (9cm) 濾紙で濾過します。通常、1 : 2 倍希釈とサンプル量 0.1mL で十分です。

(c) 全卵中のコハク酸の定量

ホモジナイズした全卵約 5g を 50mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水 25mL と *n*-オクタノール 1滴を加えます。混合し、沸騰水浴(約 100℃)で15分間煮沸します。20~25℃まで冷却し、Carrez I 溶液 5mL、Carrez II 溶液 5mL、NaOH 溶液(100mM) 10mL を慎重に加え、それぞれ添加後に混合します。メスフラスコを定容し、混合、濾過します。通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2~1.0mL で十分です。

(d) 全卵粉末中のコハク酸の定量

全卵粉末約 1g を 50mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水 30mL と *n*-オクタノール1滴を加えます。以下、(c)の全卵分析と同様に処理します。

(e) チーズ中のコハク酸の定量

チーズ約 5g を 100mL 容メスフラスコに精秤し、蒸留水約 80mL を加え、60℃で15分間加温します。加温中、フラスコを数回振り混ぜます。20~25℃まで冷却し、100mL に定容します。脂肪を分離する際は、フラスコを冷蔵庫または氷上に約20分間放置、下層の水層の一部を遠心分離します。通常、希釈は不要でサンプル量 1.0mL で十分です。

(f) 醤油中のコハク酸の定量

醤油 5mL を 100mL 容メスフラスコに加え、蒸留水で定容後、200mL ビーカーに溶液を移し、活性炭 4g を加えて2分間攪拌します。懸濁液の一部を Whatman GF/A ガラス繊維濾紙で濾過します。通常、希釈は不要で、サンプル量 1.0mL で十分です。

(g) 全血試料中のコハク酸の定量

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℃で20分間加熱します。マイクロ遠心チューブで $13,000 \times g$ 、10分間遠心分離し、上清を回収します。濃 Carrez 試薬 II 20 μ L を添加して十分に混合し、次に濃 Carrez 試薬 I 20 μ L を添加して十分に混合します。サンプルを $13,000 \times g$ 、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。

(h) 生体組織試料中のコハク酸の定量

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。50mL 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。

(i) 尿や血清など体液試料中のコハク酸の定量

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) のトリクロ酢酸を使用します。

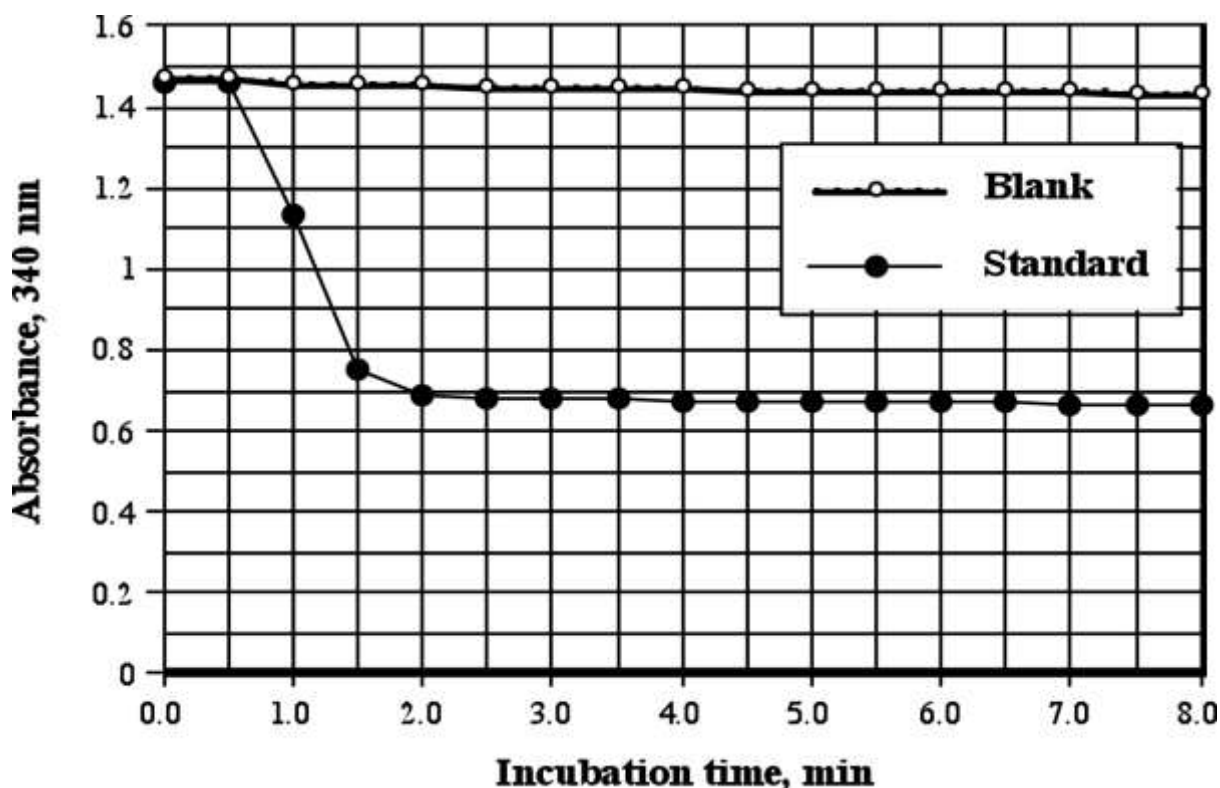


図1. NADH存在下、コハク酸 40 μ gとスクシニルCoAシンセターゼ、ピルビン酸キナーゼ、L-乳酸デヒドロゲナーゼの反応による 340nm 吸光度の減少

文献 - REFERENCES -

Beutler, H. O. (1989). Succinate. *“Methods of Enzymatic Analysis”* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VII, pp. 25-33, 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