

Megazyme

D-フラクトース、 D-グルコース分析法

D-FRUCTOSE and D-GLUCOSE ASSAY PROCEDURE

K-FRUGL 04/18

K-FRUGL

(用手法 110 回分*) *半量で分析すると検体数は2倍
(自動分析法、マイクロプレート法 1100 回分)

日本バイオコン株式会社

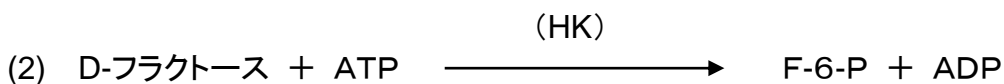
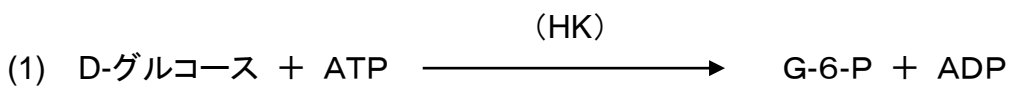
はじめに - INTRODUCTION -

D-グルコースおよび D-フラクトースは、ほとんどの植物製品中に存在します。食品では蜂蜜、ワイン、ビールなどのほか、パン、ペストリー、チョコレート、キャンディーなどの固形食品に多量に含まれています。ワイン業界では D-グルコースと D-フラクトース含量は両者を併せて良く総還元糖量とも称されますが、重要な品質パラメータの1つであり、ワイン醸造プロセスの各段階でモニターされています。

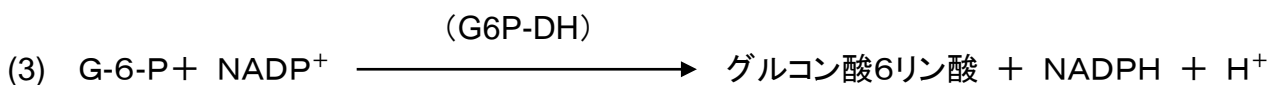
本キットではこれらの糖を別々に測定することも(3ページの「A」参照)、同時に測定することもできます(5ページの「B」参照)。自動分析法の手順は7ページ(「C」)に、マイクロプレートによる単独または同時測定法の手順は7~8ページ(「D」および「E」)にそれぞれ記載されています。

原理 - PRINCIPLE -

D-グルコースと D-フラクトースはアデノシン-5'-三リン酸(ATP)の存在下、酵素ヘキソキナーゼ(HK)の作用により、グルコース6リン酸(G-6-P)とフラクトース6リン酸(F-6-P)に変換され、同時にアデノシン-5'-二リン酸(ADP)が生成します(1)、(2)。

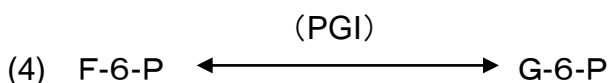


次にNADP⁺の存在下、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(G6P-DH)により、G-6-Pはグルコン酸6リン酸に酸化され、同時にNADPHが生成します(3)。



この反応で生成するNADPH量は、D-グルコースの量と化学量論的に同一です。NADPH量は 340nm における吸光度の増加により測定できます。

反応(3)の完了後、F-6-Pはホスホグルコースイソメラーゼ(PGI)の作用によりG-6-Pに変換されます(4)。



生成したG-6-Pは、NADP⁺存在下、グルコン酸6リン酸とNADPHを生成し、D-フラクトース量と化学量論的に等しい吸光度の増加が認められます。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法は D-グルコースと D-フラクトースに対して特異性が高いです。

吸光度差の最小値は 0.010 です。これは最大サンプル量である 2.00mL を用いた際の試料中濃度 0.332 mg/L に相当します。検出限界は最大サンプル量である 2.00mL を用いた際の試料中濃度 0.663 mg/L で、吸光度差 0.020 に相当します。

この分析は 4~80μg の D-グルコースまたは D-フラクトース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である 2.00mL を用いた際、D-グルコースまたは D-フラクトース 0.166 ~ 0.332mg/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 -

D-グルコースと D-フラクトースからの転換反応が分析法に定められた時間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 D-グルコースと D-フラクトースの標準液 (0.1mL 中にそれぞれ約 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 D-グルコースと D-フラクトース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 -

用手法で 110 検体分析用のキット (自動分析法並びにマイクロプレート法では 1,100 検体分) 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 (15mL, pH7.6) に防腐剤として 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: NADP⁺、ATPおよびPVP。-10°C以下で5年以上安定です。

ボトル3: ヘキソキナーゼとグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ懸濁液、2.25mL。
4°Cで2年以上安定です。

ボトル4: ホスホグルコースイソメラーゼ懸濁液 (2.25mL)。4°Cで2年以上安定です。

ボトル5: D-グルコース+ D-フラクトース標準液 (5mL、各 0.2mg/mL)。
4°Cで2年以上安定です。

試薬溶液／懸濁液の調製

1. 付属のボトル1の内容物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 12mL に溶解します。4°Cで1年以上安定または-10°C以下で2年以上安定です。凍結の際は凍結／融解の繰り返しを避けるため、適量ずつ小分けにしてポリプロピレンチューブに保存して下さい。
- 3&4. 付属のボトル3と4の内容物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年以上安定しています。
5. 付属のボトル5の内容物を使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。

NOTE: D-グルコースと D-フラクトース標準液は、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。D-グルコースと D-フラクトース濃度は、NADPHの吸光係数から直接算出します (4ページ)。

機器(推奨):

1. メスフラスコ(50mL、100mL および 500mL)
2. 使い捨てプラスチックキュベット(1cm 光路、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ト。例 Eppendorf Multipette®
 - 5.0mL Combitip® (緩衝液 0.1mL、NADP⁺/ATP溶液 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. ワットマン No.1(9cm) 濾紙

A. 分析手順 (用手法) - D-グルコースと D-フラクトース - - MANUAL ASSAY PROCEDURE; D-FRUCTOSE AND D-GLUCOSE -

| | |
|--------|---|
| 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 | 2.32 mL(D-グルコース)、2.34 mL(D-フラクトース) |
| サンプル溶液 | D-グルコースと D-フラクトース 4~80µg (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) | 2.10 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 (NADP ⁺ /ATP) | 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 (HK/G6P-DH) | 0.02 mL | 0.02 mL |
| 混合*し、反応継続。反応終了(約5分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 5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**。 さらに追加: | | |
| 懸濁液4 (PGI) | 0.02 mL | 0.02 mL |
| 混合*し、反応継続。反応終了(約8~10分)後、反応液の吸光度測定(A ₃) | | |

* 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 A₂ が増加し続ける場合は、試料中の着色物質または酵素の影響による可能性がある。これらの干渉物質は、試料調製中に除去できる可能性がある。

† 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_{glc} を求めます。次にブランクとサンプルの吸光度差 ($A_3 - A_2$) 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_{fru} を求めます。

十分に正確な結果を得るには、 ΔA_{glc} 並びに ΔA_{fru} は少なくとも 0.100 の吸光度差が必要です。

D-グルコースおよび D-フラクトースの濃度は、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 = D-グルコースおよび D-フラクトースの分子量

ϵ = 340nm における NADPH 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。

D-グルコースでは以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.32 \times 180.16}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{glc} \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.6634 \times \Delta A_{glc} \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

D-フラクトースでは以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.34 \times 180.16}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{fru} \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.6692 \times \Delta A_{fru} \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

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。

D-グルコース含量

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

D-フラクトース含量

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

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-CalTM** を使用することで簡単に計算できます。

B. 分析手順（用手法） - 還元糖 - - MANUAL ASSAY PROCEDURE; TOTAL REDUCING SUGARS -

ワイン業界では、D-グルコースとD-フラクトースの合計量は、酵母がエタノールに変換可能な糖の総量であることから重要な品質パラメータとされています。その他の多くのケースでもこれらの単糖を区別する必要はないため、以下の簡便で迅速な手順により一括定量することが可能です。

追加の準備作業

ボトル3と4を静かに振って、ゴム栓に付着した可能性のある酵素を落とします。ピペットでボトル4 (PGI) の全量をボトル3 (HK/G6P-DH) に移します。ゴム栓をして、軽く振り混ぜて酵素を混合します。このHK/G6P-DH/PGI混合物はそのまま使えます。

註> この処理を実施後、このキット試薬混合物では D-グルコースおよび D-フラクトースを個別に測定することはできないことに留意して下さい。

操作

| | |
|--------|--|
| 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 | 2.34 mL (D-グルコース + D-フラクトース) |
| サンプル溶液 | D-グルコース + D-フラクトース 4~80µg (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) | 2.10 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 (NADP ⁺ /ATP) | 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+4 (HK/G6P-DH/PGI) | 0.04 mL | 0.04 mL |
| 混合*し、反応継続。反応終了 (約10分) 後、反応液の吸光度測定 (A _{glc+fru})。 10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 A₂ が増加し続ける場合は、試料中の着色物質または酵素の影響による可能性がある。これらの干渉物質は、試料調製中に除去できる可能性がある。

† 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

ブランクとサンプルの吸光度差 (A_{glc+fru} - 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_{glc+fru} を求めます。十分に正確な結果を得るには、ΔA_{glc+fru} は少なくとも 0.100 の吸光度差が必要です。

D-グルコースとD-フラクトースの合計濃度は、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 = D-グルコースおよびD-フラクトースの分子量

ϵ = 340nm におけるNADPH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。

D-グルコース+D-フラクトースでは以下の通り

$$c = \frac{2.34 \times 180.16}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{glc+fru} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0.6692 \times \Delta A_{glc+fru} \quad [\text{g/L}]$$

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。

C. 分析手順(自動分析法) - 還元糖 -

- AUTO-ANALYSER ASSAY PROCEDURE; TOTAL REDUCING SUGARS -

このキットで 254.1 mL の試薬の調製が可能です(0.222mL/分析、1155 検体分に相当)。試薬の調製は以下の通り:

R1 試薬調製

| 組成 | 液量 |
|-----------------------------|---------|
| 溶液1(ボトル1; 緩衝液) | 1.0 mL |
| 溶液2(NADP ⁺ /ATP) | 1.0 mL |
| 懸濁液4(ボトル4; PGI)* | 0.2 mL |
| PVP (10g/L)** | 1.0 mL |
| 蒸留水 | 18.0 mL |
| 総液量 | 21.2 mL |

R2 試薬調製

| 組成 | 液量 |
|------------------------|--------|
| 蒸留水 | 1.9 mL |
| 懸濁液3(ボトル3; HK/G6P-DH)* | 0.2 mL |
| 総液量 | 2.1 mL |

* 使用前に軽く攪拌 ** ポリビニルピロリドン…溶解促進剤。不要なら蒸留水に代替

分析法

| | |
|----------|---------------------------------------|
| R1: | 0.200 mL |
| 試料 | ~ 0.002 mL |
| R2: | 0.020 mL |
| 反応温度と時間 | 25°Cで10分、37°Cで5分 |
| 波長 | 340nm |
| 調製試薬の安定性 | 冷蔵にて7日間以上 |
| 定量法 | エンドポイント法 |
| 反応方向 | 増加 |
| 直線性 | 反応液中 D-グルコース+D-フラクトースで最大 108 µg/mL まで |

D. 分析手順（マイクロプレート法） - 還元糖 -

- MICROPLATE ASSAY PROCEDURE; TOTAL REDUCING SUGARS -

NOTE:

1. D-グルコースと D-フラクトース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 D-グルコースと D-フラクトース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 | 0.234 mL |
| 直線性 | サンプル量 0.01~0.20 mL 時、 D-グルコースと D-フラクトースで 0.1~8 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 | 標準液 |
|---|----------|-----------------------|----------|
| 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（NADP ⁺ /ATP） | 0.010 mL | 0.010 mL | 0.010 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+4（HK/G6P-DH/PGI） | 0.004 mL | 0.004 mL | 0.004 mL |
| 混合*し、反応継続。反応終了（約10分）後、反応液の吸光度測定（A ₂ ）。 10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 50~100 μ L 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3+4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)

$$\text{g/L} = \frac{\Delta A_{\text{試料}}}{\Delta A_{\text{標準液}}} \times \text{g/L 標準液} \times F$$

註> g/L 標準液 = グルコース 0.2g/L + フラクトース 0.2g/L = 0.4 g/L

サンプルが調製作業中に希釈されている場合、得られた分析値に希釈率 F を乗じます。

E. 分析手順(マイクロプレート法) - D-グルコースとD-フラクトース(逐次法) - - MICROPLATE ASSAY PROCEDURE; D-GLUCOSE AND D-FRUCTOSE (Sequential) -

NOTE:

D-グルコースとD-フラクトースの逐次測定は、吸光度を光路長 1cm の値に換算する機能を有するマイクロプレートリーダーに限り可能です。

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 | 0.234 mL |
| 直線性 | サンプル量 0.01~0.20 mL 時、 D-グルコースと D-フラクトースで 0.1~8 μ g/ウェル |

| ピペットでキュベットに添加 | ブランク | サンプル | 標準液 |
|---|----------|-----------------------|----------|
| 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 (NADP ⁺ /ATP) | 0.010 mL | 0.010 mL | 0.010 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 (HK/G6P-DH) | 0.002 mL | 0.002 mL | 0.002 mL |
| 混合*し、反応継続。反応終了(約5分)後、反応液の吸光度測定(A ₂)。 5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**。 | | | |
| 懸濁液4 (PGI) | 0.002 mL | 0.002 mL | 0.002 mL |
| 混合*し、反応継続。反応終了(約8~10分)後、反応液の吸光度測定(A ₃)。 | | | |

- * 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 50~100 μ L 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3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)

光路長 1cm の値に変換後、用手法手順(3ページ)の計算法を適用するか、メガザイムの *Mega-Calc*TM を使用して計算します。

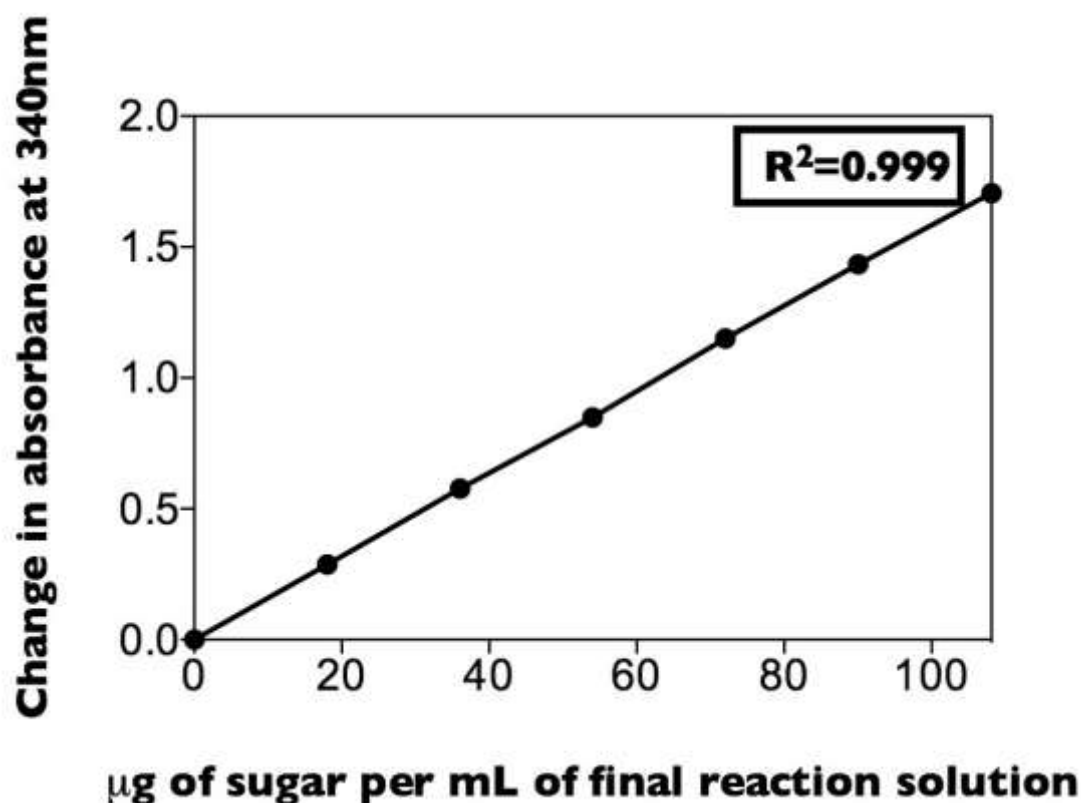


図 1. K-FRUGL キットによる分析の直線性

これは光路長 4.6mm のキュベットを用い、25°Cで10分間分析を行った結果を示す。

サンプルの調製 (用手法 A と B)

- SAMPLE PREPARATION (Manual Formats A and B) -

1. サンプル希釈

キュベット中に添加される糖(D-グルコース+D-フラクトース)の量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、4~80µg の範囲である必要があります。従って試料溶液の が 0.04~0.8g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

| 希釈表 | 推定 D-グルコース+ D-フラクトース濃度(g/L) | 水による希釈 | 希釈度 (F) |
|-----|--------------------------------|---------|------------|
| | < 0.8 | 希釈不要 | 1 |
| | 0.8~8.0 | 1 + 9 | 10 |
| | 8.0~80 | 1 + 99 | 100 |
| | > 80 | 1 + 999 | 1000 |

サンプル吸光度 ΔA_{glc} または ΔA_{fru} 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。

サンプル中の D-グルコース量が D-フラクトースよりもはるかに多い(例えば、10倍高い)場合、D-フラクトース測定精度は下がります。この場合、酸素存在下でグルコースオキシダーゼ/カタラーゼ試薬により D-グルコース量を低減させます(12ページ参照)。

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(ワインまたはフルーツジュースなど)は、2M NaOH を用い溶液の pH を 7.6 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:** ビールのような相当量の炭酸ガスを含む試料は、2M NaOH を用い溶液の pH を 7.6 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。
- 着色試料:** 着色のある試料の場合、HK/G6P-DH を蒸留水に置き換えた試料ブランクも必要です。
- 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。
- 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。
- 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 試薬で清澄化する方法もあります。
- タンパク質を含有する試料:** Carrez 試薬で清澄化します。

サンプルの調製例 - SAMPLE PREPARATION EXAMPLES -

(a) ブドウ中の D-グルコースおよび D-フラクトースの定量

蒸留水 200mL を 500mL のメスシリンダーに加えます。容量が 400mL を少し越える程度まで、適切な量のブドウを加えます。そして 400mL を越えた液量分、蒸留水を追加します(例えば、測定された容量が 420mL の場合、蒸留水を 20mL 追加する)。これによりブドウの容量を2倍に希釈する形になります。水とぶどうをミキサー(例:キッチンミキサー)に移し、約3分間ホモジナイズしま

す。一部を Whatman No.1 濾紙(直径 15cm)を通して濾過します。最初の数 mL を捨て、次の約 20~30mL を分取します。必要に応じて濾液を希釈します。

一般的には、1 : 1000 倍希釈しサンプル量 0.1mL が適切です (すなわち、2000 倍希釈)。

(b) ブドウ果汁中の D-グルコースおよび D-フラクトースの定量

一般的には希釈するだけでそのまま分析を行うことができます。

一般的には、1 : 2000 倍希釈しサンプル量 0.1mL が適切です。

(c) 赤および白ワイン中の D-グルコースおよび D-フラクトースの定量

一般的には希釈するだけでそのまま分析を行うことができます。赤ワインで脱色が必要な場合は、11ページの「強く着色した試料」の手順に従って処理して下さい[一般的な注意事項(e)]。

一般的には、1 : 10 倍希釈しサンプル量 0.1mL が適切です。

(d) ジャム、その他野菜および果物製品中の D-グルコースおよび D-フラクトースの定量

ジャム類約 10g をミキサーでホモジナイズします。試料約 0.5g を精秤し、100mL 容メスフラスコに入れ、蒸留水 50mL を加えて混合して溶解させ、定容後混合し、濾過します。濾液の最初の 5 mL を捨て、分析には清澄な濾液をそのまま使用します。

一般的には希釈は不要でサンプル量 0.1~2.0mL が適切です。

(e) デザートおよびアイスクリーム中の D-グルコースおよび D-フラクトースの定量

約 1g のサンプルを精秤し、100mL 容メスフラスコに入れ、蒸留水 60mL を加え、時々振とうしながら約 50°C で 15 分間加温します。次にタンパク質を沈殿させるため、Carrez I 試薬 5mL、Carrez II 試薬 5mL および 100mM NaOH 溶液 10mL を順次添加し、混合します。蒸留水で定容して混合し、濾過します。分析には清澄か、僅かに濁っている程度の濾液を用い、希釈表に従って希釈します。一般的には希釈は不要でサンプル量 0.1~2.0mL が適切です。

(f) 固形食品中の D-グルコースおよび D-フラクトースの定量

植物材料を 0.5mm の篩に通します。パン、ペストリー、チョコレート菓子、キャンディなどの固形食品をミキサー、肉粉機または乳鉢で粉碎します。平均的な部分のサンプルを秤量し、蒸留水で抽出します(必要に応じて 60°C 加熱)。メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します。混合して濾過後、清澄な濾液を分析に用い、必要に応じて希釈表に従い希釈します。

一般的には希釈は不要でサンプル量 0.1~2.0mL が適切です。

(g) 蜂蜜中の D-グルコースおよび D-フラクトースの定量

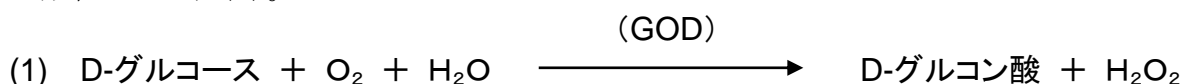
スパテルで蜂蜜を充分にかき混ぜます。粘液状または結晶性の蜂蜜 5-10g をビーカーに量り取り、約 60°C で 5 分間加熱し、スパテルで攪拌します(液状の蜂蜜の場合は攪拌する必要はありません)。放冷後、約 1g を精秤し、100mL 容メスフラスコに入れ少量の蒸留水で溶解した後、定容します。一般的には、1 : 10 倍希釈しサンプル量 0.1mL が適切です。

D-グルコースが過剰量存在する場合の

D-フラクトースの定量のための特別なサンプル調製法

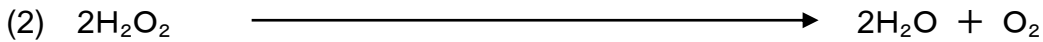
D-グルコースが過剰に存在する場合、サンプルはメガザイムのグルコースオキシダーゼ/カタラーゼ混合物(**E-GOXCA**)を用いて過剰の D-グルコースを除去する前処理を実施します。その方法は以下の通り。

D-グルコースは、空気中の酸素の存在下グルコースオキシダーゼ(GOD)により D-グルコン酸に酸化されます(1)。



次に過酸化水素はカタラーゼにより分解されます(2)。

(カタラーゼ)



試薬

1. リン酸緩衝液(300mM、pH7.6)+ 5mM MgCl₂

蒸留水 900mL にリン酸水素二ナトリウム二水和物 (Na₂HPO₄・2H₂O) 53.4g を加え、攪拌して溶解します。0.47g の MgCl₂(無水)を添加し、溶解します。1M NaOH(40g/L)で pH を 7.6 に調整し、蒸留水で 1L に定容します。メジウム瓶に入れ蓋をしっかり締めて4℃で保存して下さい。微生物汚染を防ぐためトルエンを 2 滴添加すればさらに長期間の保存が可能です。

2. グルコースオキシダーゼ(12,000U) +カタラーゼ(300,000U) (E-GOXCA)

バイアル1本の内容物を 5mM MgCl₂ 含有 300mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6) 20mL に溶解します。この溶液を 2.0mL ずつ小分けにして保存します。-10℃以下で3年以上安定です。

D-グルコースの酸化処理法

| ピペットで 25mL 容メスフラスコに添加 | 液量 |
|--|--------|
| 5mM MgCl ₂ 含有 300mM リン酸緩衝液 (pH 7.6) | 5.0 mL |
| サンプル溶液 (D-グルコース濃度 5mg/mL まで) | 5.0 mL |
| 酵素液 | 0.2 mL |

フラスコを約 25℃で加温し、混合物に1時間通気(O₂)します(図2参照)。この酸化反応により理論的には pH が低下しますが、リン酸緩衝液により D-グルコース濃度が 5mg/mL までには有意には低下しません。

反応後、グルコースオキシダーゼとカタラーゼを不活化するためにメスフラスコを沸騰水浴中で10分間煮沸、室温まで冷却後蒸留水で定容します。混合して濾過後、濾液を分析に供します。

D-フラクトースの測定には透明な溶液 0.5mL を使用します。残存 D-グルコースも通常通り分析します。



図2. グルコースオキシダーゼとカタラーゼによる D-グルコース酸化用通気装置

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