

Megazyme

尿素／アンモニア分析法

(迅速法)

ブドウ果汁とワインを含む各種試料中の
尿素とアンモニアの迅速定量法

UREA/AMMONIA

(*Rapid*)

ASSAY PROCEDURE

(For the rapid assay of urea and ammonia in all
samples, including grape juice and wine)

K-URAMR 10/18

K-URAMR
(用手法 50 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 -

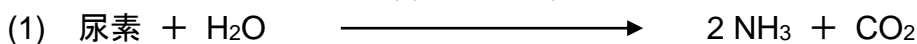
尿素とアンモニアは天然に広く存在する化合物です。尿素は尿中で最も一般的な有機物であり、そしてアンモニアは微生物によるタンパク質代謝の最終産物として生成されるので、これらの分析物は果汁、牛乳、チーズ、肉およびシーフードのような食品の品質指標として利用されています。炭酸アンモニウムは、即席パン、クッキー、マフィンなどの焼き菓子で酵母の発酵促進剤として使用されます。他のキットとは異なり、本キットはブドウ果汁やワインに含まれるタンニンによる阻害を受けないグルタミン酸デヒドロゲナーゼが採用されています。ワイン業界では、アンモニアの定量は酵母資化性窒素(YAN)算出に重要です。YANは遊離アンモニウムイオン、遊離アミノ酸由来の一級アミノ窒素およびL-アルギニン側鎖の、変動の大きな3成分からなっています¹。

YANを正確に測定するには、3成分を全て定量する必要があります。これにはメガザイムのL-アルギニン/尿素/アンモニア測定キット(**K-LARGE**)および一級アミノ態窒素測定キット(**K-PANOPA**)を使用することができます。尿素測定は、ワイン製品中において発がん物質であるエチルカルバメート(EC)形成抑止に有効な方法です。

原理 - PRINCIPLE -

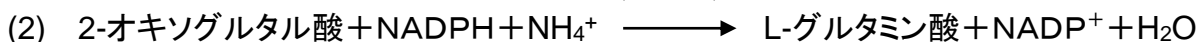
尿素はウレアーゼによりアンモニア(NH₃)と二酸化炭素(CO₂)に分解されます。

(ウレアーゼ)



グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GIDH)と還元型NADPHの存在下、アンモニア(アンモニウムイオン NH₄⁺として)は2-オキソグルタル酸と反応してL-グルタミン酸とNADP⁺を生じます(2)。

(GIDH)



この反応で生じるNADP⁺量はアンモニア量と化学量論的に同一です。尿素1モル当たり、2モルのNADPHを消費します。NADPH消費量は340nmの吸光度の減少により測定されます²。

特異性、感度、直線性と精度

- SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法は尿素とアンモニアに対して特異性が高いです。試薬グレードのアンモニアや硫酸アンモニウムの分析ではほぼ100%の分析値が得られます。

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、分析試料中のアンモニア濃度0.018mg/L(または尿素濃度0.031mg/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、分析試料中のアンモニア濃度0.071mg/L(または尿素濃度0.1258mg/L)で、吸光度差0.020に相当します。

この分析は分析当たり0.2~7μgのアンモニア(0.3~14μgの尿素)間で直線性を示します(図1、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2.00mLを用いた場合、アンモニア濃度約0.018~0.035mg/L(または尿素濃度0.031~0.063mg/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 -

尿素とアンモニアの変換が分析法で定義さ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アンモニア (0.1mL 中に約 4 μ g; 提供外の試薬) または尿素 (0.1mL 中に約 7 μ g) を加えることで確認することができます。吸光度が有意に減少するのが認められるはずです。

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ならずです。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アンモニアまたは尿素を添加することによって確認することができます。

アルカリ性の緩衝液中では、タンパク質断片が徐々にアンモニアを放出する可能性があり、これがゆっくりとしたクリーブ反応に繋がる可能性があります。しかし本測定法は非常に早く完了するので、これは問題にはなりません。果汁中のタンニン他社製のアンモニアおよび尿素/アンモニア測定キットに採用されているウシ肝臓GIDHを著しく阻害します。しかし、**K-URAMR** キットに採用されている酵素はこの影響を受けません (図2、8ページ)。

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 -

各 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 (18mL, pH 8.0) + 2-オキソグルタル酸。
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:** NADPH。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル3:** グルタミン酸デヒドロゲナーゼ懸濁液 (1.1mL)。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル4:** ウレアーゼ溶液 (2.7mL)。-10°C以下で2年以上安定です。
- ボトル5:** 尿素標準粉末 (約 2g)。室温で2年以上安定です。

試薬溶液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS -

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 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/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。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。ボトルを直立させて保管します。
-10°C以下で2年以上安定です。
5. 尿素約 70mg を精秤して 1L メスフラスコに加え、蒸留水で十分に攪拌して溶解後、定容します。使用直前に用意します。この溶液は-10°C以下で約3ヶ月安定です。

NOTE: 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。

アンモニア/尿素濃度は、NADPHの吸光係数から直接算出します (4ページ)。

機器(推奨):

1. 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®(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®
- 12.5mL Combitip® (NADPH溶液; 溶液2 0.5mL 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. 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、および GF/A ガラス繊維濾紙(9cm 径)

分析手順 - 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 | 2.62 mL(アンモニア) 2.67 mL(尿素) |
| サンプル溶液 | アンモニア 0.2~7.0μg (または尿素 0.3~14.0μg) (サンプル液量を 0.10~2.0mL 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) | 0.30 mL | 0.30 mL |
| 溶液2 (NADPH) | 0.20 mL | 0.20 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 (GIDH) | 0.02 mL | 0.02 mL |
| 混合*し、約5分後、反応液の吸光度測定(A ₂)。次に以下のものを添加。 | | |
| 溶液4 (ウレアーゼ) | 0.05 mL | 0.05 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 ₃)。 5分後も反応が終了していない場合、吸光度変化がなくなるまで1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。実際の反応例を図3(8ページ)に示す。

† 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 $\Delta A_{\text{アンモニア}}$ を求めます。

次にブランクとサンプルの吸光度差(A_2-A_3)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 $\Delta A_{\text{尿素}}$ を求めます。

十分に正確な結果を得るには、 $\Delta A_{\text{アンモニア}}$ と $\Delta A_{\text{尿素}}$ は少なくとも 0.100 の吸光度差が必要です。

アンモニアと尿素的濃度は、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 = アンモニアまたは尿素的の分子量

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。

アンモニア濃度は以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.62 \times 17.03}{6300 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta A_{\text{アンモニア}} \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.07082 \times \Delta A_{\text{アンモニア}} \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

尿素的濃度は以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.67 \times 60.06}{6300 \times 1.0 \times 0.1 \times 2} \times \Delta A_{\text{尿素}} \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.1273 \times \Delta A_{\text{尿素}} \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

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-Cal*™ を使用することで簡単に計算できます。

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。

アンモニア含量

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

尿素的含量

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

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尿素(アンモニア)量(すなわち、試料 0.1mL 中)は、0.3~14 μ g (0.2~7 μ g)の範囲である必要があります。従って試料溶液の尿素(アンモニア)濃度が0.02~0.14g/L(0.01~0.08g/L)の範囲に入るよう、濃度を調整します。

| 希釈表 | 推定尿素(アンモニア)濃度 (g/L) | 水による希釈 | 希釈度 (F) |
|-----|---------------------|--------|---------|
| | < 0.14 (< 0.07) | 希釈不要 | 1 |
| | 0.14~1.4 (0.07~0.7) | 1 + 9 | 10 |
| | 1.4~14 (0.7~7.0) | 1 + 99 | 100 |

サンプル吸光度 $\Delta A_{\text{アンモニア}}$ 、 $\Delta A_{\text{尿素}}$ 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

Carrez 試薬は回収率が大幅に低下するため、本目的では除タンパク質に使用できません。代替法として過塩素酸またはトリクロロ酢酸を使用します
[h)タンパク質を含有する試料を参照]。

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 8.0 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 8.0 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GIDH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。
- 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。
- 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 $^{\circ}$ 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。
- 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 で中和します。または以下の例(b)に示したようにトリクロロ酢酸を用います。

サンプルの調製例

(a) ブドウ果汁/果汁マスト/ワイン中の尿素とアンモニアの定量

一般的に、白と赤のブドウ果汁/果汁マストやワイン中の尿素とアンモニアの濃度はサンプル処理なしで測定可能です(必要に応じて、濾過や希釈表による希釈を除く)。

25 μ L 以上の赤ワインを分析する場合は、「一般的な注意事項 - (e) 強く着色した試料」で説明

されているように、PVPPでの脱色が必要な場合があります。
一般的には希釈は不要で、サンプル量 25~50 μ L で充分です。

(b) 牛乳中の尿素の定量

ガラス製試験管に牛乳 1mL と 0.3M トリクロロ酢酸 3mL を正確に添加して混ぜ合わせます。タンパク質を完全に沈殿させるために室温で5分間保持した後、2,000 $\times g$ で3分間室温で遠心します。分析には透明な上清を直接使用して下さい。

一般的には希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(c) 食肉及び食肉製品中の尿素及びアンモニアの定量

試料の平均的な部分約 5g を 100mL 容メジウム瓶に精秤します。1M 過塩素酸 20mL を添加し、Ultra-turrax®または Polytron®ホモジナイザー(または同等品)を使用して2分間ホモジナイズします。全量を 50mL ガラスビーカーに移し、2M KOH にて pH を約 8.0 に調整します。全量を 100mL 容メスフラスコに移し、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)。4 $^{\circ}$ C で20分間保持して過塩素酸カリウムを完全に沈殿させ、脂肪層を分離させます。濾過し、最初の 3~5 mL を捨て、透明な濾液を分析に使用します。

一般的には希釈は不要で、サンプル量 0.5mL で十分です。

(d) 水(例えばプール水)中の尿素およびアンモニアの定量

水の尿素およびアンモニア濃度は、一般的にサンプル処理なしで決定できます(希釈表による希釈を除く)。一般的には希釈は不要で、サンプル量は最大 2.0 mL が必要になります。

(e) パン製品中の尿素とアンモニアの定量

試料の平均的な部分約 10g を 100mL 容メジウム瓶に精秤します。1M 過塩素酸 20mL を添加し、Ultra-turrax®または Polytron®ホモジナイザー(または同等品)を使用して2分間ホモジナイズします。全量を 50mL ガラスビーカーに移し、2M KOH にて pH を約 8.0 に調整します。全量を 100mL 容メスフラスコに移し、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)。氷冷で20分間保持して過塩素酸カリウムを完全に沈殿させ、脂肪層を分離させます。濾過し、最初の 3~5 mL を捨て、透明な濾液を分析に使用します。

一般的には希釈は不要で、サンプル量 0.5mL で十分です。

(f) 果汁中の尿素とアンモニアの定量

果汁 25mL を 2M KOH を用い約 pH 8.0 に調整後、全量を 50mL 容メスフラスコに移し、蒸留水で定容します。溶液を 100mL ビーカーに移し、PVPP1g を加え、マグネティックスターラー上で2分間攪拌します。懸濁液の一部を濾過し、透明もしくは僅かに白濁した程度の溶液を分析に用います。一般的には希釈は不要で、サンプル量 0.1mL で十分です。

(g) リコリス(甘草)製品中の尿素とアンモニアの定量

サンプル約 3g を乳棒と乳鉢でホモジナイズし、試料の平均的な部分約 1g を 100mL 容メスフラスコに精秤します。蒸留水 60mL を加え、70 $^{\circ}$ C で10分間、または完全に溶解するまで加温します。室温に戻した後、蒸留水で定容します。濾過し、透明もしくは僅かに着色した程度の溶液を分析に用います。一般的には希釈は不要で、サンプル量 0.5mL で十分です。

(h) 全血試料中の尿素とアンモニアの定量

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。

(i) 生体組織試料中の尿素とアンモニアの定量

生体組織の平均的な部分約 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）。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させます。適量のサンプルを 13,000g 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。

(j) 尿や血清など体液試料中の尿素とアンモニアの定量

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。

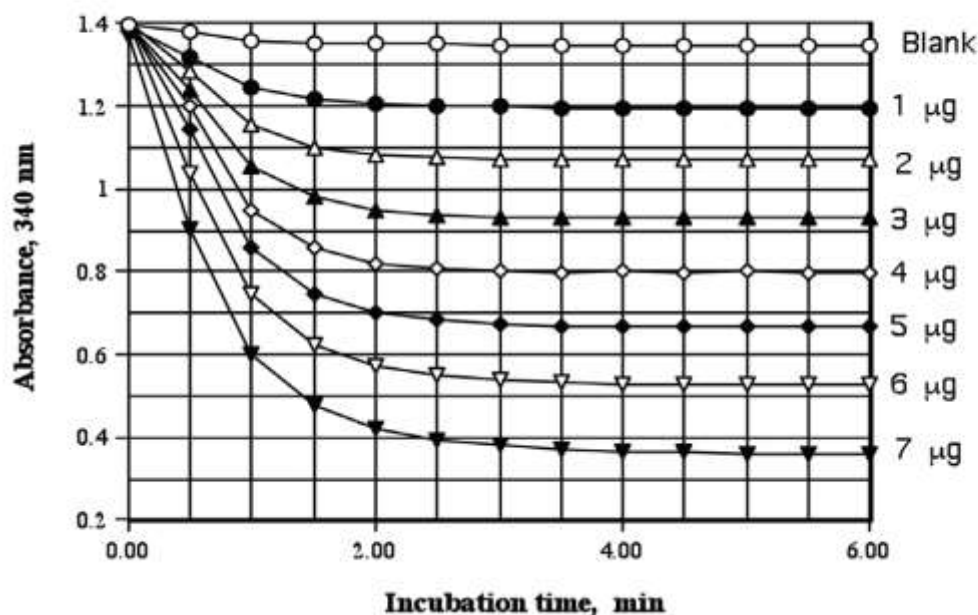


図1. NADPH存在下、アンモニア 1~7μgとグルタミン酸デヒドロゲナーゼの反応による 340nm の吸光度減少の経時変化

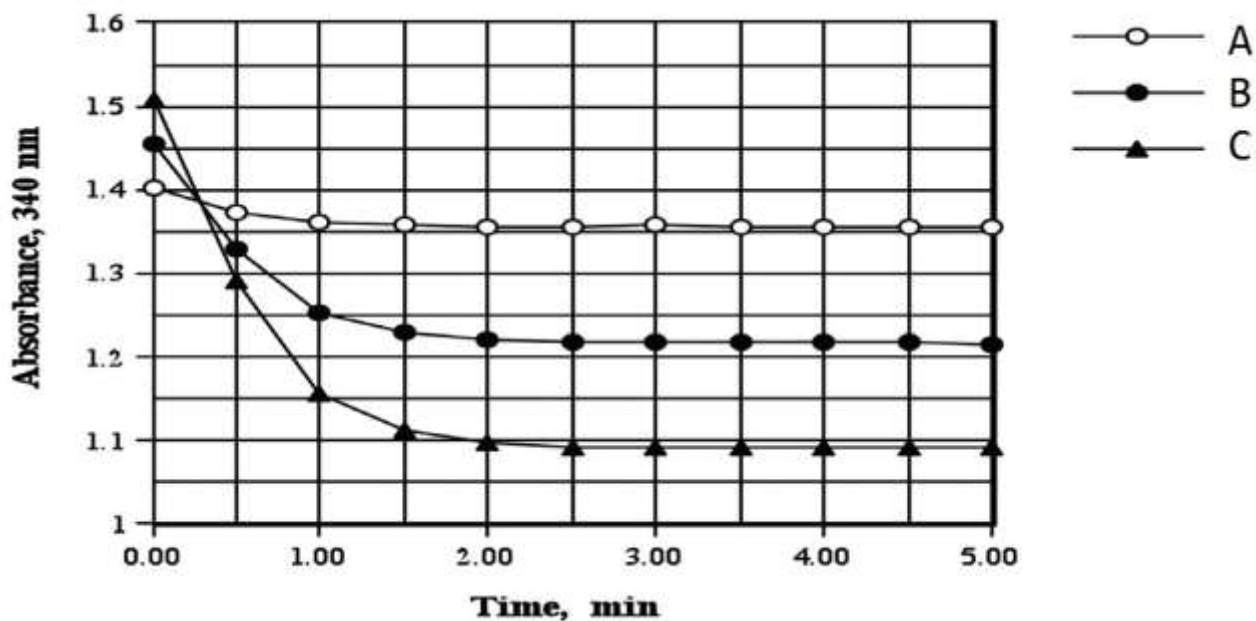


図2. NADPH存在下、赤マスト果汁とグルタミン酸デヒドロゲナーゼの反応による340nmの吸光度減少の経時変化
 A. ブランク、B. 赤マスト果汁 0.025mL、C. 赤マスト果汁 0.05mL

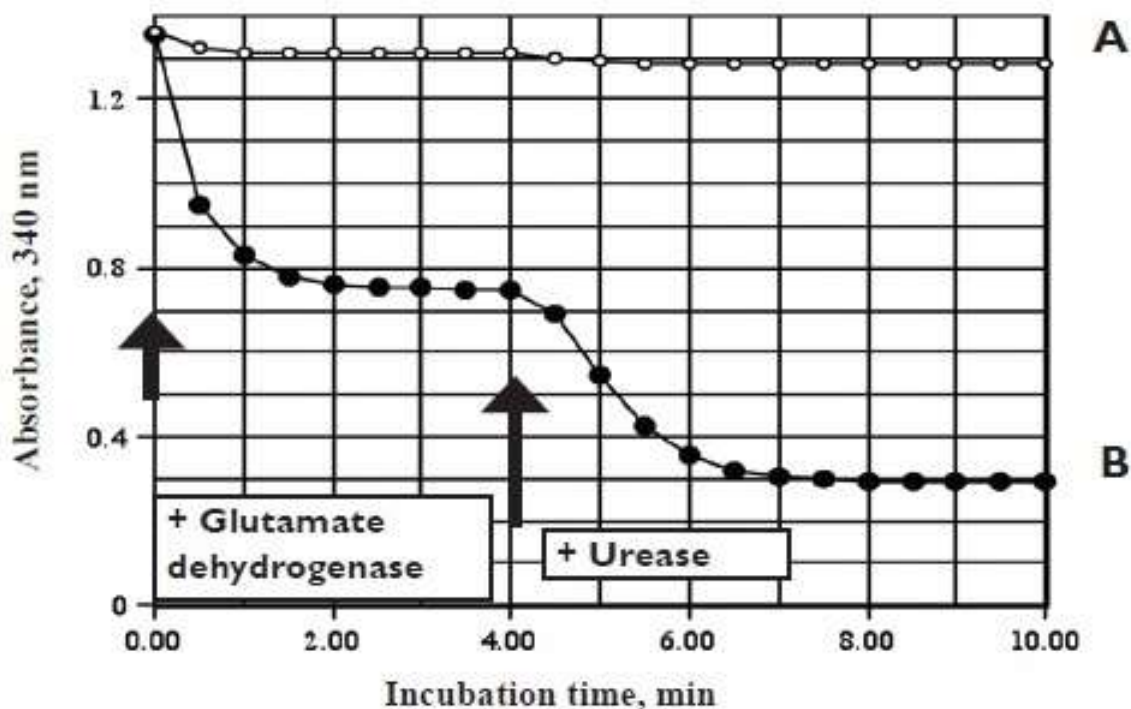


図3. NADPH存在下、尿素／アンモニア標準品とグルタミン酸デヒドロゲナーゼの反応による340nmの吸光度減少の経時変化
 A. ブランク、B. アンモニア 4μg+尿素 7μg。
 グルタミン酸デヒドロゲナーゼとウレアーゼは矢印の位置でそれぞれ添加

文献 - REFERENCES -

1. Martin, O., Brandriss, M. C., Schneider, G. & Bakalinsky, A. T. (2003). Improved anaerobic use of arginine by *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Env. Microbiol.*, **69**, 1623-1628.
2. Kerscher, L. & Ziegenhorn, J. (1990). Urea. "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VIII, pp. 444-453, 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