

使用説明書

高速液体クロマトグラフィ用 ヒドロキシカルボン酸分析用ラベル化試薬

● はじめに

本試薬は、尿などの生体試料中、あるいはその他の試料中のヒドロキシカルボン酸を選択的にかつ高感度に、高速液体クロマトグラフィにより分析するため三輪(福岡大・薬)*らにより開発された試薬ラベル化試薬です。

本試薬使用の利点は、試料からヒドロキシカルボン酸を抽出することなく、直接試薬をラベル化できるため操作が簡単なこと、抽出に際して生じるエステル型ヒドロキシカルボン酸の分解や試料の損失の心配がないことです。

また、ラベル化した試料の HPLC 分析では、紫外および可視部において、蛍光ラベル化法に比較し、同等またはそれ以上の感度と選択性を有しており、かつ、短時間で分離分析できることなどが挙げられます。

* 参考文献: Anal. Biochem., 185, 17(1990)

● ラベル化試薬内容物

名称	内容量	
	50 検体分	100 検体分
試薬 A	10mL	20mL
試薬 B	10mL	20mL
試薬 C	10mL	20mL
試薬 D	200mL	400mL
試薬 E	10mL	20mL

※ 試薬の保管はすべて冷蔵保管です。

※ 保証期限は出荷後 3 ヶ月です。

● 本試薬でラベル化可能なヒドロキシカルボン酸(溶出順)

グリコール酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、乳酸、3-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸、2-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシイソ吉草酸、3-ヒドロキシ-2-エチルプロピオン酸、2-ヒドロキシ-2-メチル酪酸、2-ヒドロキシイソ吉草酸、2-ヒドロキシイソカプロン酸、2-ヒドロキシ-3-メチル吉草酸など

● ラベル化に必要な器具、試薬類

<器具>

共栓付試験管(10mL 容)、駒込ピペット(2mL)又はトランスピペット、スピッツ管 (2mL 容)、マイクロピペット(10~200 μ L) 恒温槽、ポルテックスミキサー、遠心機

<試薬>

エタノール(試料が尿の場合)、メタノール、n-ヘキサン、エーテル

● 内部標準液について

測定対象となるヒドロキシカルボン酸により、使用する内部標準液が異なります。分析例に示されるクロマトグラムを参考にして適当な内部標準を選択し、 5×10^{-3} M 程度で調製して下さい。

● ヒドロキシカルボン酸分析のラベル化の手順

I. 尿等、他の夾雑物質を含む試料中のヒドロキシカルボン酸の測定手順

1. ヒドロキシカルボン酸を含有する試料(エタノール、含水エタノールまたは水溶液で濃度 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 以下に調整したものが適当、総モル数は $4 \mu\text{mol}$ 以下) $100 \mu\text{L}$ を共栓付試験管に入れる。但し尿の場合は、尿 $200 \mu\text{L}$ に試薬 E $100 \mu\text{L}$ とエタノール 1mL を加えた後、溶媒を完全に留去し(窒素気流中で行うと良い。これは揮発性のカルボン酸を除くためである。)、残渣に水 $100 \mu\text{L}$ を加える。
2. 内部標準液 $200 \mu\text{L}$ を加え、続いて試薬 A $200 \mu\text{L}$ および試薬 B $200 \mu\text{L}$ を順次加え、密栓して振り混ぜた後、この試験管を 60°C で 20 分間放置する。
3. 試薬 C $200 \mu\text{L}$ を加え(琥珀色から紫色に変化する)、密栓し振り混ぜた後、再び 60°C で 15 分間放置後、室温まで冷却する。
4. 上記の試験管に試薬 D 4mL 、n-ヘキサン 4mL を加え、密栓して十分振り混ぜた後、遠心分離する(ポルテックスミキサーで 2 分程度、遠心分離は 3000r.p.m. で 5 分程度)。上層の大部分(ヘキサン層)を駒込ピペット等により除去する。再び下層(水層)に n-ヘキサン 4mL を加え、同様の操作を行った後、下層(水層) 3mL 程度を残すように上層(ヘキサン層)を駒込ピペット等により除去する。
5. 上記の試験管(水層)にエーテル 4mL を加え、十分振り混ぜ、遠心分離の後、上層(エーテル層)の大部分を駒込ピペット等で採り、スピッツ管に入れる。再び下層(水層)にエーテル 4mL を加え、同様の操作を行った後、上層(エーテル層)の大部分を同じスピッツ管に移し、エーテルを蒸発させる(火気のない所で行って下さい。窒素気流下で行うと速やかに実施できます)。残渣をメタノール $200 \mu\text{L}$ に溶解する。
6. 上記のメタノール溶液を YMC Duo-Filter(4mm 径タイプ/ 型番: XQDUO04) でろ過した後 $2 \sim 20 \mu\text{L}$ を採り、高速液体クロマトグラフ(HPLC)によって分析する。

II. 夾雑物質を含まない試料中のヒドロキシカルボン酸の測定手順

1~3 は前述の通り。

4. 上記の試験管に試薬 D 4mL 、エーテル 4mL を加え密栓して十分振り混ぜた後、遠心分離する(ポルテックスミキサーで 2 分程度、遠心分離は 3000r.p.m. で 5 分程度)。上層(エーテル層)の大部分を採りスピッツ管に移す。再び下層(水層)にエーテル 4mL を加え、同様の操作を行った後、上層の大部分を同じスピッツ管に移し採る。エーテルを蒸発させた後(火気のない所で行って下さい。窒素気流下で行うと速やかに実施できます)残渣をメタノール $200 \mu\text{L}$ に溶解する

※4 のステップは、ヒドロキシカルボン酸ヒドラジドを 10 倍程度濃縮・精製できるため 試料中の極めて微量のヒドロキシカルボン酸の測定に際しては必要ですが、その他の場合は省略することも可能です。

5. 3 で得られた溶液、または上記のメタノール溶液を YMC Duo-Filter(4mm 径タイプ/ 型番: XQDUO04) で、ろ過した後 $2 \sim 20 \mu\text{L}$ を採り、高速液体クロマトグラフ(HPLC)によって分析する。

● ヒドロキシカルボン酸分析の HPLC 条件

Column	: YMC-Pack FA(ヒドロキシカルボン酸分析専用カラム) 250 × 6.0mmI.D. (250 × 4.6mmI.D.)
Eluent	: メタノール/アセトニトリル/水 (40/5/55,V/V/V) pH4~5(0.01N 塩酸で調整)
Flow rate	: 1.2mL/min (1mL/min)
Detection	: UV at 230nm 又は 400nm
Temperature	: 35°C

※流速については分析するサンプルの状況によって調整して下さい。

代表的な分析例として、次頁に標準品および健康者尿中のヒドロキシカルボン酸の 2-ニトロフェニルヒドラジドのクロマトグラムを示します。

分析対象となるヒドロキシカルボン酸の種類によって、必要に応じて移動相の組成、流速または温度を変更して下さい。

検出波長に関しては、230nm では 400nm の約 4 倍の検出感度が得られますが、尿などの生体試料中のヒドロキシカルボン酸の測定に際しては、400nm での検出をお薦めします。

ヒドロキシカルボン酸分析

標準品

健常者尿

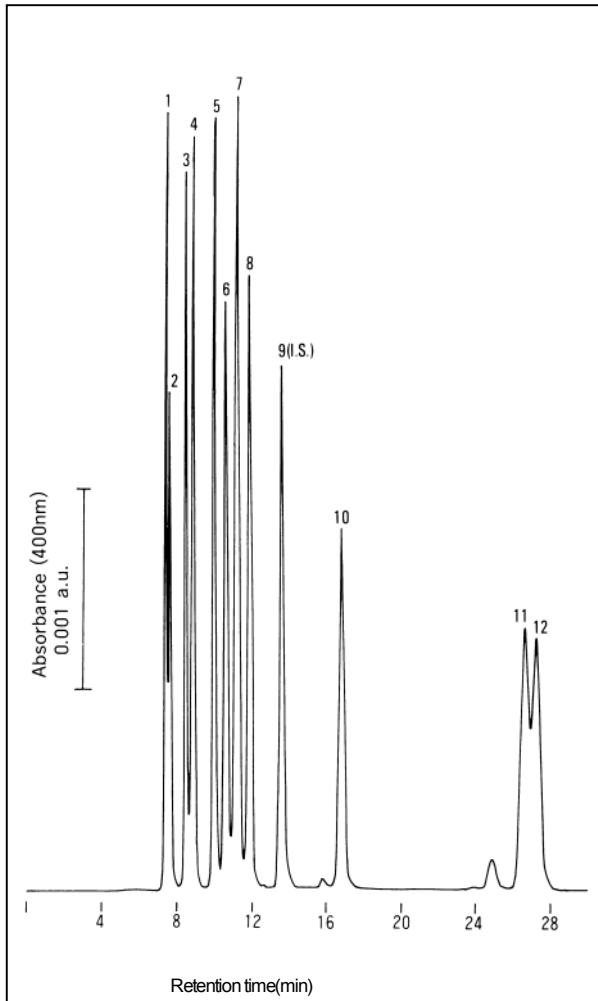


Fig.1

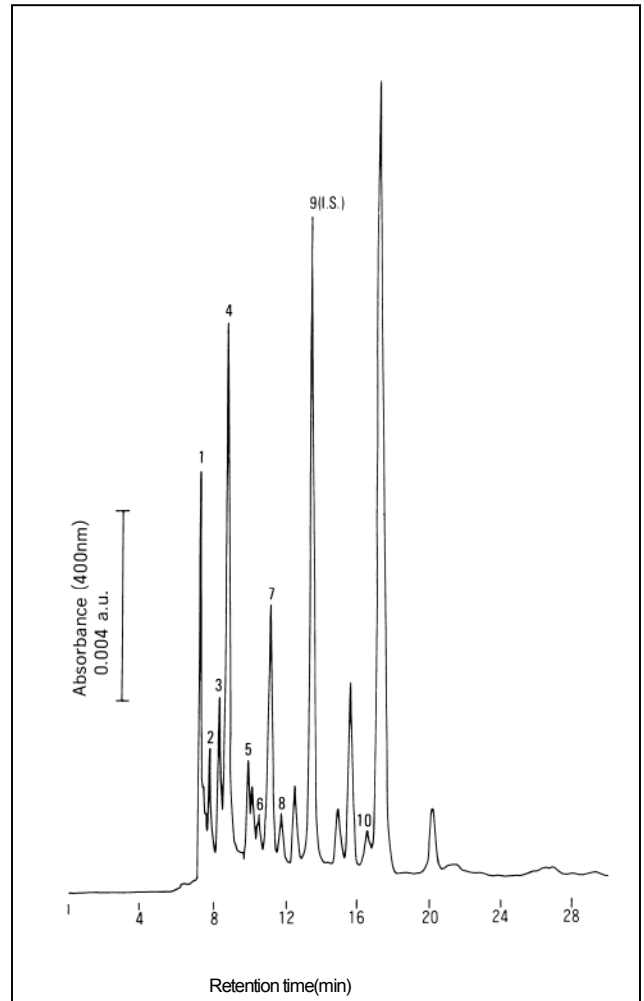


Fig.2

Fig.1 Chromatogram of the 2-nitrophenylhydrazides of a standard mixture of 13 hydroxycarboxylic acids obtained with visible detection.

peak No.		peak No.	
1	glycolic acid	7	2-hydroxybutyric and 3-hydroxyisovaleric acid
2	3-hydroxypropionic acid	8	3-hydroxy-2-ethylpropionic acid
3	lactic acid	9	2-hydroxy-2-methylbutyric acid(I.S.)
4	3-hydroxybutyric acid	10	2-hydroxyisovaleric acid
5	2-hydroxyisobutyric acid	11	2-hydroxyisocaproic acid
6	3-hydroxy-2-methylbutyric acid	12	2-hydroxy-3-methylvaleric acid

The amount of sample varied from 100 to 300 pmol of each acid.

Fig.2 Chromatogram of the derivatized hydroxycarboxylic acids in urine from a normal subject. Each peak number corresponds to that in fig.1.

●製品に破損があった場合、ご注文の品と異なる製品が届いた場合には、製品到着後2週間以内にご連絡ください。速やかに交換いたします。2週間を過ぎた製品は良品受領とさせていただきます。