

使用説明書

高速液体クロマトグラフィ用 ジ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ジ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法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料ラベル化試薬です。

本試薬使用の利点は、試料からジカルボン酸を抽出することなく、直接試料をラベル化できるため操作が簡単なことと、抽出に際して生じるエステル型ジ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.,170,301(1988) / 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	60mL	120mL

※ 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ジカルボン酸

マロン酸、コハク酸、メチルマロン酸、グルタル酸、メチルコハク酸、アジピン酸、3-メチルグルタル酸、エチルマロン酸、ピメリン酸、3-メチルアジピン酸、3,3-ジメチルグルタル酸、スベリン酸など

● 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(10～200μL)
恒温槽、ボ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、エーテル

● 内部標準液について

測定対象となるジカルボン酸により、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。

● ジ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ジカルボン酸の測定手順

1. ジ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 $200 \sim 500 \mu\text{L}$ に試薬E $100 \sim 200 \mu\text{L}$ とエタノール $1 \sim 2 \text{mL}$ 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 、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(ボ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(エーテル層)を駒込ピペット等により除去する。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、下層(水層) 3mL 程度を残すように上層(エーテル層)を駒込ピペット等により除去する(不揮発性のモノカルボン酸を除くため)。
5. 上記の試験管(水層)に試薬E 1mL 、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ジ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 と試薬E 1mL を加えた後、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(ボ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、ジ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ジ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。

● ジカルボン酸分析の HPLC 条件

Column	: YMC-Pack CA (ジカルボン酸分析専用カラム) 250 × 4.6mm I.D.
Eluent	: アセトニトリル / 0.005M KH_2PO_4 (12/88, V/V) とアセトニトリル / 0.005M Na_2HPO_4 (12/88, V/V) とを混合し、 pH7 とする。この溶液にカウンターイオンとして臭化テトラメチルアンモニウムを 0.005M となる様に加えて溶かす。
Flow rate	: 1.2mL/min
Detection	: UV at 230nm 又は 400nm
Temperature	: 40°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ジカルボン酸の 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。

分析対象となるジ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ジ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。

ジカルボン酸分析

標準品

健康者尿

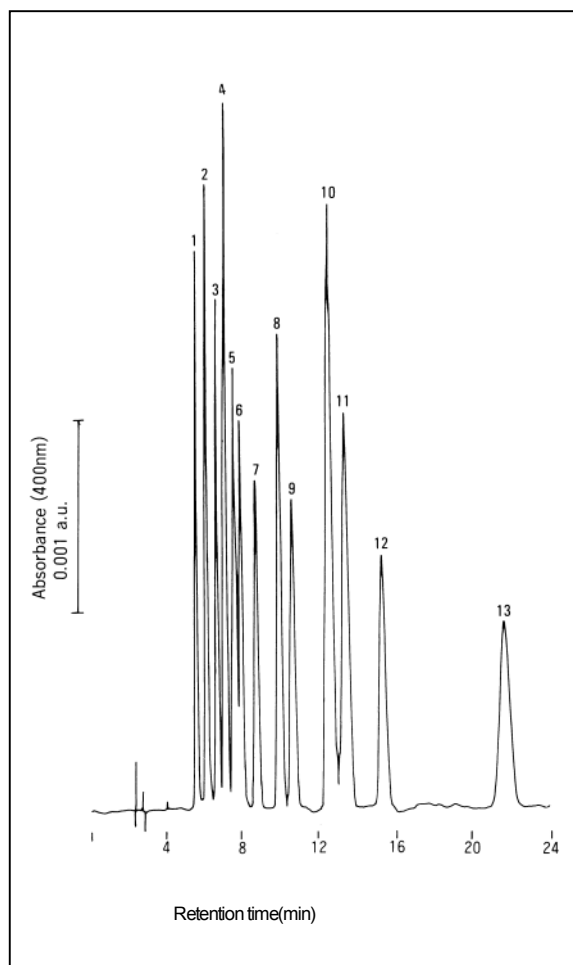


Fig.1

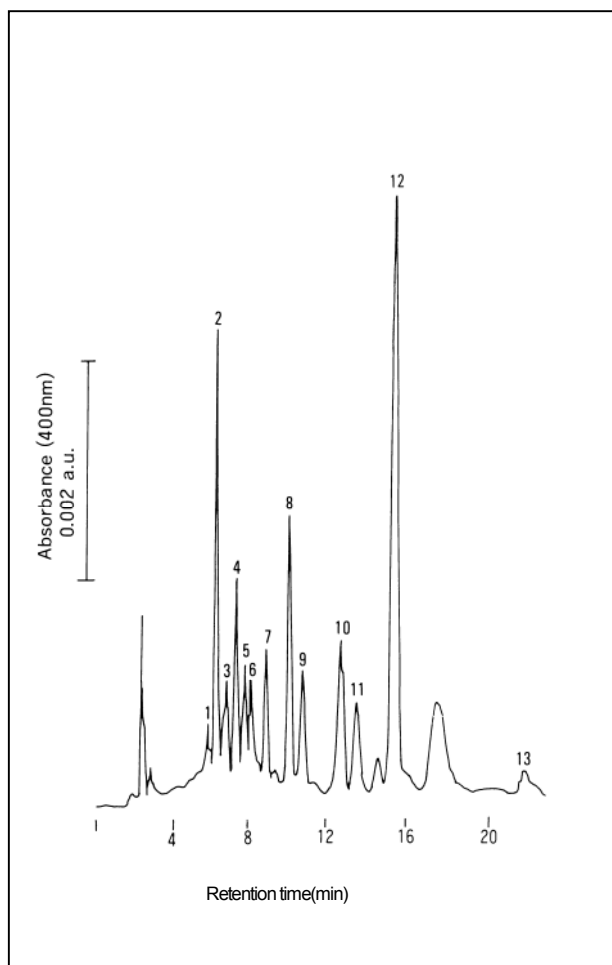


Fig.2

Fig.1 Chromatogram of the 2-nitrophenylhydrazides of a standard mixture of 12 dicarboxylic acids obtained with visible detection.

peak No.		peak No.	
1	malonic acid	8	3-methylglutaric acid
2	succinic acid	9	ethylmalonic acid
3	methylmalonic acid	10	pimelic and 3-methyladipic acid
4	glutaric acid	11	3-methyladipic acid
5	methylsuccinic acid	12	3,3-dimethylglutaric (I.S.)
6	methylsuccinic acid	13	suberic acid
7	adipic acid		

Each peak corresponds to 100 pmol.

Fig.2 Chromatogram of the derivatized dicarboxylic 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。