

使用説明書

高速液体クロマトグラフィ用

エステル型長鎖・短鎖脂肪酸分析用ラベル化試薬

● はじめに

本試薬は、乳製品、油脂等の食品中および血小板、肥満細胞、脳組織等の生体試料中のエステル型脂肪酸(短鎖および長鎖脂肪酸)を選択的かつ高感度で、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、試料のケン化用試薬および、ラベル化試薬です。

本試薬使用の利点は、試料から脂肪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利点として挙げられます。

* 参考文献: J.Chromatogr., 321, 165(1985) / J.Chromatogr., 523, 235(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 S	5 mL	10 mL
試薬 Ae	10 mL	20 mL
試薬 B	10 mL	20 mL
試薬 C	10 mL	20 mL
試薬 D	200 mL	400 mL

※ 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脂肪酸

<短鎖脂肪酸(溶出順)>

乳酸、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、n-酪酸、イソ吉草酸、n-吉草酸、2-エチル酪酸、イソカプロン酸、n-カプロン酸など

<長鎖脂肪酸(溶出順)>

カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、エイコサペンタエン酸、リノレン酸、ミリスチン酸、ドコサヘキサエン酸、パルミトレイン酸、アラキドン酸、リノール酸、リノエライジン酸、エイコサトリエン酸、パルミチン酸、ドコサテトラエン酸、オレイン酸、エライジン酸、エイコサジエン酸、マルガリン酸、ドコサトリエン酸、ステアリン酸、エイコセン酸、ドコサジエン酸、アラキジン酸、エルシン酸など

● ラベル化に必要な器具、試薬類

<器具>

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

<試薬>

n-ヘキサン、メタノール、エーテル(短鎖脂肪酸のクリーンアップ時のみ必要)

● 内部標準液について

測定対象となる脂肪酸により、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。

● 長鎖脂肪酸分析の試料のケン化とラベル化手順

1. 共栓付試験管に試料(例としてエタノール、含水エタノールまたは水溶液で濃度 5×10^{-3} M 以下に調製したもの 100 μ L、牛乳 10 μ L、加糖練乳とアイスクリーム 2 mg、ヨーグルト 10 mg、油脂類 0.5 mg、総モル数は 4 μ mol 以下)、内部標準液 200 μ L および試薬 S 100 μ L を加え、80°C で 20 分間ケン化する。
2. 試薬 Ae 200 μ L および試薬 B 200 μ L を加え、密栓して振り混ぜた後、60°C で 20 分間放置する。
3. 試薬 C 200 μ 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 4 mL、n-ヘキサン 5 mL 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 3 分程度、遠心分離は 3000 r.p.m. で 5 分程度)。上層(ヘキサン層)の大部分を駒込ピペット等を用いてスピッツ管に移し採り、ヘキサンを蒸発させた後(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 μ L に溶解する。

※4 のステップは、脂肪酸ヒドラジドを 10 倍程度濃縮・精製できるため 生体試料中のきわめて微量の脂肪酸測定に際しては必要ですが、牛乳等の乳製品や油脂中の脂肪酸測定で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(4 mm 径タイプ/ 型番:XQDUO04)で、ろ過した後 2~20 μ L を採り、高速液体クロマトグラフ(HPLC)によって分析する。

● 長鎖脂肪酸分析の HPLC 条件例

Column : YMC-Pack FA (脂肪酸分析専用カラム)
 250 $\times$ 6.0 mm I.D. (250 $\times$ 4.6 mm I.D.)
 Eluent : アセトニトリル / メタノール / 水 (75/11/14, V/V/V)
 pH 4~5 (0.01 N 塩酸又は 1% TFA で調整)
 Flow rate : 1.2 mL/min
 Detection : UV at 230 nm 又は 400 nm
 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牛乳中の長鎖脂肪酸の 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。

分析対象となる脂肪酸の種類によって、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、230 nm では 400 nm の約 4 倍の検出感度が得られますが、クリーンアップ操作(ステップ 4)を行わない試料の測定に際しては、400 nm での検出の方が安定したベースラインが得られます。

長鎖脂肪酸分析

標準品

牛乳中の長鎖脂肪酸

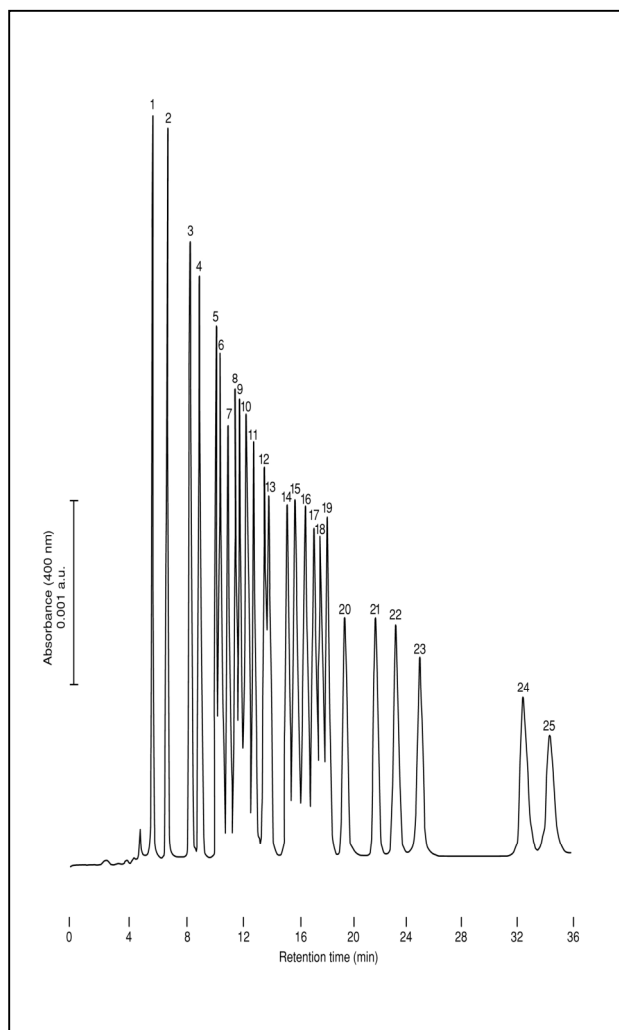


Fig.1

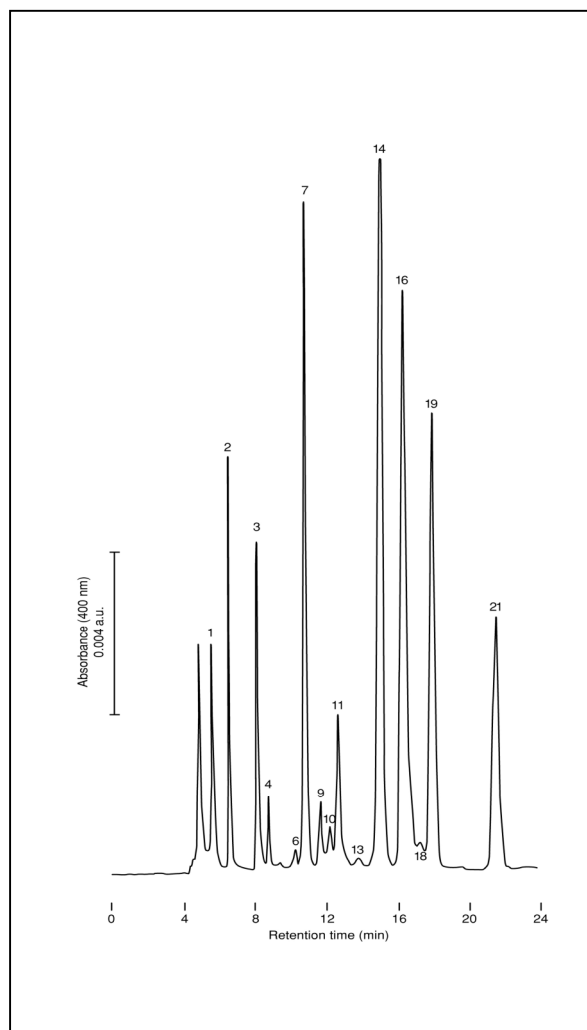


Fig.2

Fig.1 Chromatogram of the 2-nitrophenylhydrazides of a synthetic mixture of 25 fatty acids obtained with visible detection.

peak No.		peak No.	
1	caprylic(C8:0) acid	14	palmitic(C16:0) acid
2	capric(C10:0) acid	15	docosatetraenoic(C22:4) acid
3	lauric(C12:0) acid	16	oleic(C18:1,cis) acid
4	myristoleic(C14:1) acid	17	elaidic(C18:1,trans) acid
5	eicosapentaenoic(C20:5) acid	18	eicosadienoic(C20:2) acid
6	linoleic(C18:3) acid	19	margaric(C17:0) acid (I.S.)
7	myristic(C14:0) acid	20	docosatrienoic(C22:3) acid
8	docosahexaenoic(C22:6) acid	21	stearic(C18:0) acid
9	palmitoleic(16:1) acid	22	eicosenoic(C20:1) acid
10	arachidonic(C20:4) acid	23	docosadienoic(C22:2) acid
11	linoleic(C18:2) acid	24	arachidic(C20:0) acid
12	linoelaidic(C18:2) acid	25	erucic(C22:1) acid
13	eicosatrienoic(C20:3) acid		

Each peak corresponds to 150 pmol.

Fig.2 Long-chain fatty acid profile of milk. Peaks as in fig.1.

● 短鎖脂肪酸分析の試料のケン化とラベル化の手順

I. 長鎖脂肪酸等、他の夾雑物質を含む試料中の短鎖脂肪酸の測定手順

1. 共栓付試験管に試料(例としてエタノール、含水エタノールまたは水溶液で濃度 5×10^{-3} M 以下に調製したもの 100 μ L、牛乳 10 μ L、加糖練乳とアイスクリーム 2 mg、ヨーグルト 10 mg、油脂類 0.5 mg、総モル数は 4 μ mol 以下)、内部標準液 200 μ L および試薬 S 100 μ L を加え、80°C で 20 分間ケン化する。
2. 試薬 Ae 200 μ L および試薬 B 200 μ L を加え、密栓して振り混ぜた後、60°C で 20 分間放置する。
3. 試薬 C 200 μ 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 4 mL と n-ヘキサン 5 mL 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 3 分程度、遠心分離は 3000 r.p.m. で 5 分程度)。次いで上層の大部分を別の共栓付試験管に移した後、n-ヘキサン 5 mL を加え、密栓し十分振り混ぜ、遠心分離の後、下層(水層) 3 mL 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。(長鎖脂肪酸を除去する操作)
5. 上記の試験管(水層)にエーテル 5 mL 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、スピッツ管に移す。再び下層(水層)にエーテル 4 mL 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 μ L に溶解する。
6. 上記のメタノール溶液を YMC Duo-Filter (4 mm 径タイプ/ 型番: XQDUO04) でろ過した後 2~20 μ 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遊離短鎖脂肪酸の測定手順

1~3 は前述の通り。

4. 上記の試験管に試薬 D 4 mL、エーテル 4 mL 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 3000 r.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 4 mL 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 μ L に溶解する。

※4 のステップは、脂肪酸ヒドラジドを 10 倍程度濃縮・精製できるため 試料中の極めて微量の短鎖脂肪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 (4 mm 径タイプ/ 型番: XQDUO04) で、ろ過した後 2~20 μ L を採り、高速液体クロマトグラフ(HPLC)によって分析する。

● 短鎖脂肪酸分析の HPLC 条件

Column : YMC-Pack FA (脂肪酸分析専用カラム)
250 $\times$ 6.0 mm I.D. (250 $\times$ 4.6 mm I.D.)
Eluent : アセトニトリル / メタノール / 水 (30/20/50, V/V/V)
pH 4~5 (0.01 N 塩酸又は 1% TFA で調整)
Flow rate : 1.2 mL/min
Detection : UV at 230 nm 又は 400 nm
Temperature : 50°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牛乳中の短鎖脂肪酸の 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。

分析対象となる脂肪酸の種類によって、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、230 nm では 400 nm の約 4 倍の検出感度が得られますが、クリーンアップ操作(ステップ 4 および 5)を行わない試料の測定に際しては、400 nm での検出をお薦めします。

短鎖脂肪酸分析

標準品

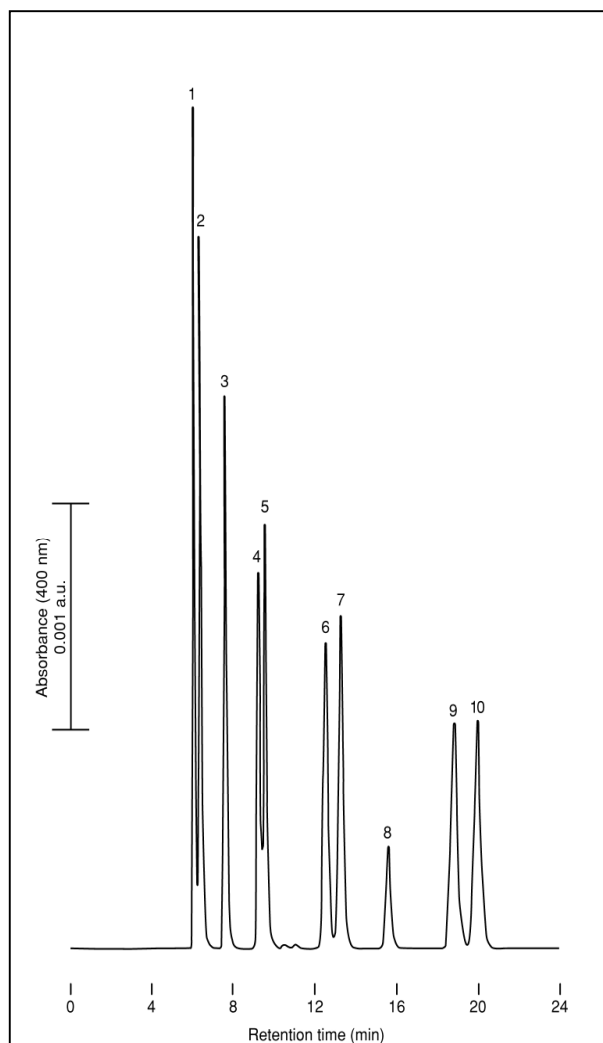


Fig.3

牛乳中の短鎖脂肪酸

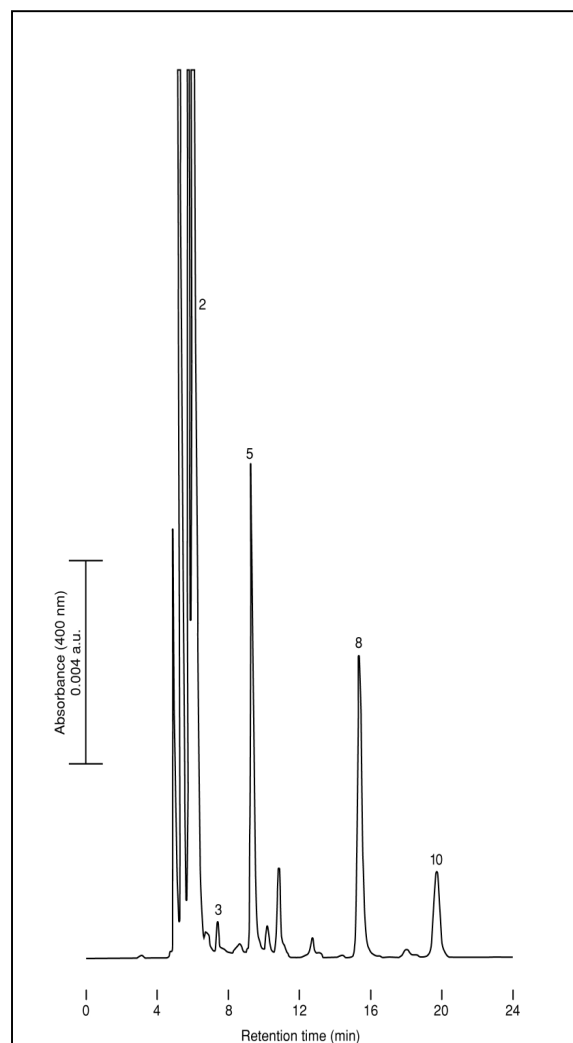


Fig.4

Fig.3 Chromatogram of the 2-nitrophenylhydrazides of a synthetic mixture of 10 fatty acids obtained with visible detection.

peak No.		peak No.	
1	lactic acid	6	iso-valeric acid
2	acetic acid	7	n-valeric acid
3	propionic acid	8	2-ethylbutyric acid(I.S.)
4	iso-butyric acid	9	iso-caproic acid
5	n-butyric acid	10	n-caproic acid

Each peak corresponds to 100 pmol.

Fig.4 Short-chain fatty acid profile of milk. peak as in fig.3.

●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。