

使用説明書

高速液体クロマトグラフィ用 長鎖・短鎖脂肪酸分析用ラベル化試薬

● はじめに

本試薬は、血清、尿などの生体試料中や乳製品・油脂製品・調味料・清涼飲料水などの食品試料、あるいはその他の試料中の短鎖および長鎖の脂肪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薬ラベル化試薬です。

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、抽出に際して生じるエステル型脂肪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: J.Chromatogr.,321,165(1985) / J.Chromatogr.,416,237(1987)

● 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	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、クロトン酸、イソ酪酸、n-酪酸、チグリン酸 DL-2-メチル酪酸、3-メチルクロトン酸、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、ジホモ-γ-リノレン酸、パルミチン酸、ドコサテトラエン酸、オレイン酸、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 μL)
恒温槽、ポ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。

● 長鎖脂肪酸分析のラベル化手順

1. 遊離脂肪酸を含有する試料(エタノール、含水エタノールまたは水溶液で濃度 5×10^{-3} M 以下に調製したものが適当、総モル数は 4 μmol 以下) 100 μL (但し、血清の場合は 50 μL でよい)を共栓付試験管に入れる。
2. 内部標準液 200 μL を加え、続いて試薬 A 200 μL および試薬 B 200 μL 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 μL 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 μL 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 血清等、他の夾雑物質を含む試料中の遊離長鎖脂肪酸の測定に際しては必須ですが、長鎖脂肪酸しか含有しない試料について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 μL 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 × 6.0 mm I.D. (250 × 4.6 mm I.D.)
 Eluent : アセトニトリル / 水 (85/15, V/V)
 pH 4~5 (0.01N 塩酸又は 1% TFA で調製)
 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健康者血清中の長鎖脂肪酸の 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、血清試料では時としてラウリン酸やミリストレイン酸の分析が妨害されることがあります。

長鎖脂肪酸分析

標準品

健康者血清

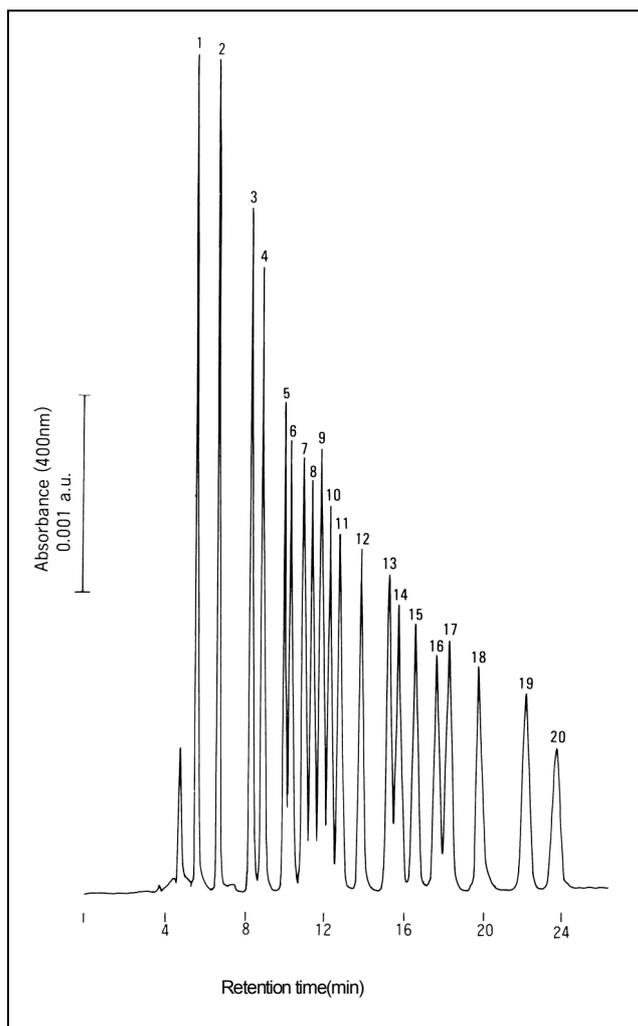


Fig.1

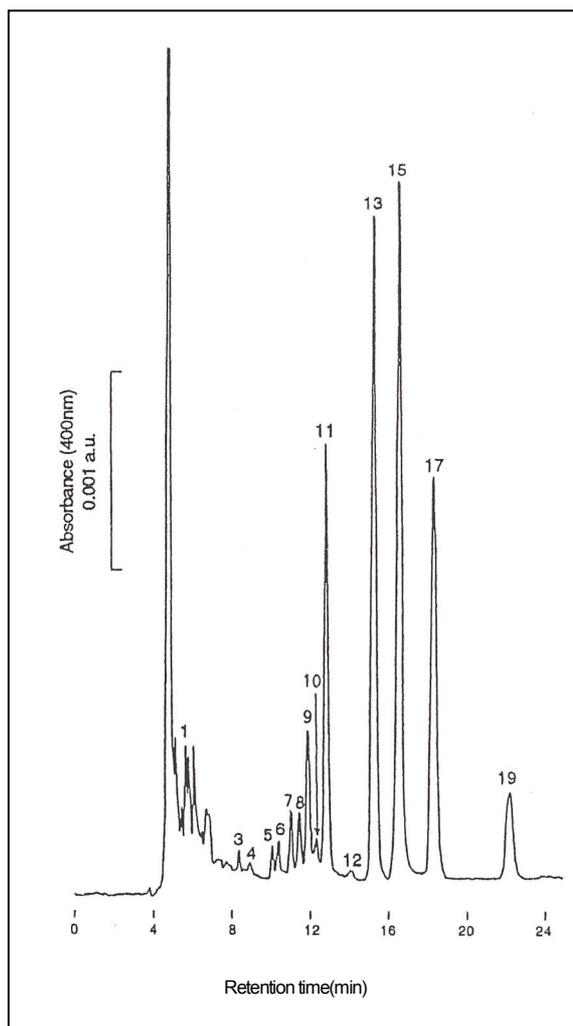


Fig.2

Fig.1 Chromatogram of the 2-nitrophenylhydrazides of a synthetic mixture of 20 fatty acids obtained with visible detection.

peak No.		peak No.	
1	caprylic(C8:0) acid	11	linoleic(C18:2) acid
2	capric(C10:0) acid	12	dihomo- γ -linolenic(C20:3) acid
3	lauric(C12:0) acid	13	palmitic(C16:0) acid
4	myristoleic(C14:1) acid	14	docosatetraenoic(C22:4) acid
5	eicosapentaenoic(C20:5) acid	15	oleic(C18:1) acid
6	linoleic(C18:3) acid	16	eicosadienoic(C20:2) acid
7	myristic(C14:0) acid	17	margaric(C17:0) acid (I.S.)
8	docosahexaenoic(C22:6) acid	18	docosatrenoic(C22:3) acid
9	palmitoleic(16:1) acid	19	stearic(C18:0) acid
10	arachidonic(C20:4) acid	20	eicosenoic(C20:1) acid

Each peak corresponds to 150 pmol.

Fig.2 Chromatogram of the derivatized LCFA (long-chain fatty acids) in serum from a normal subject.

Each peak number corresponds to that in fig.1.

● 短鎖脂肪酸分析のラベル化の手順

I. 血清等、他の夾雑物質を含む試料中の遊離短鎖脂肪酸の測定手順

1. 遊離脂肪酸を含有する試料(エタノール、含水エタノールまたは水溶液で濃度 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 以下に調製したものが適当、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。
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 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、別の共栓付試験管に入れる。これに水 3 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によりスピッツ管に移し採り、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。
6. 上記のメタノール溶液を YMC Duo-Filter (4 mm 径タイプ/ 型番: XQDU004) 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 $200 \mu\text{L}$ 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遊離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: XQDU004) 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。

● 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) 250×6.0mm I.D. (250×4.6 mm I.D.)
Eluent :	アセトニトリル/メタノール/水 (30/16/54, V/V/V) pH 4～5 (0.01 N 塩酸又は 1% TFA で調製)
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健常者血清中の短鎖脂肪酸の 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。チグリ酸のピークは、時として血清中の夾雑物質のピークと重なることがあります。

短鎖脂肪酸分析

標準品

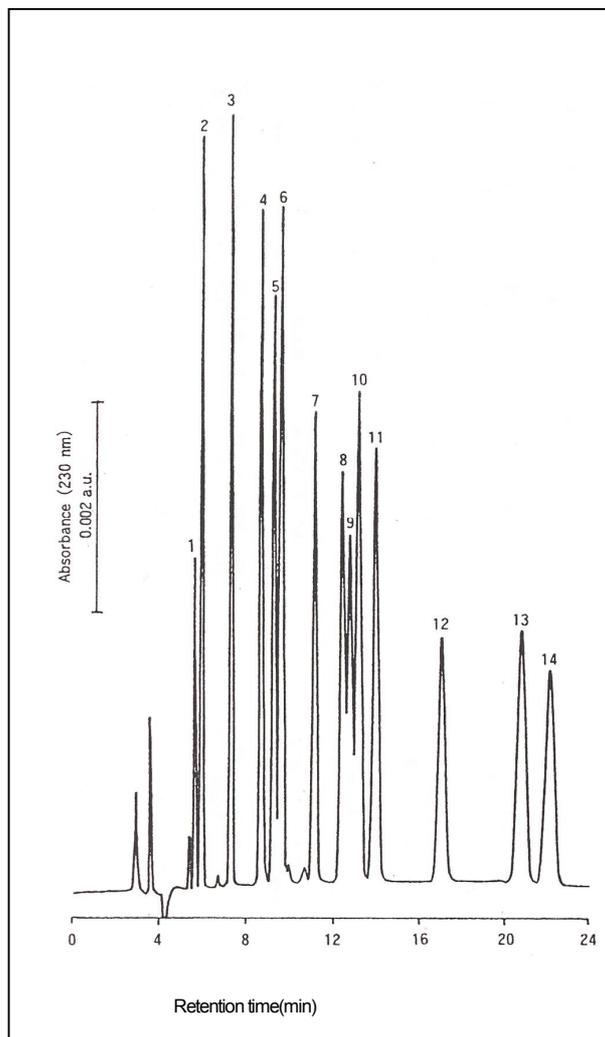


Fig.3

健康者血清

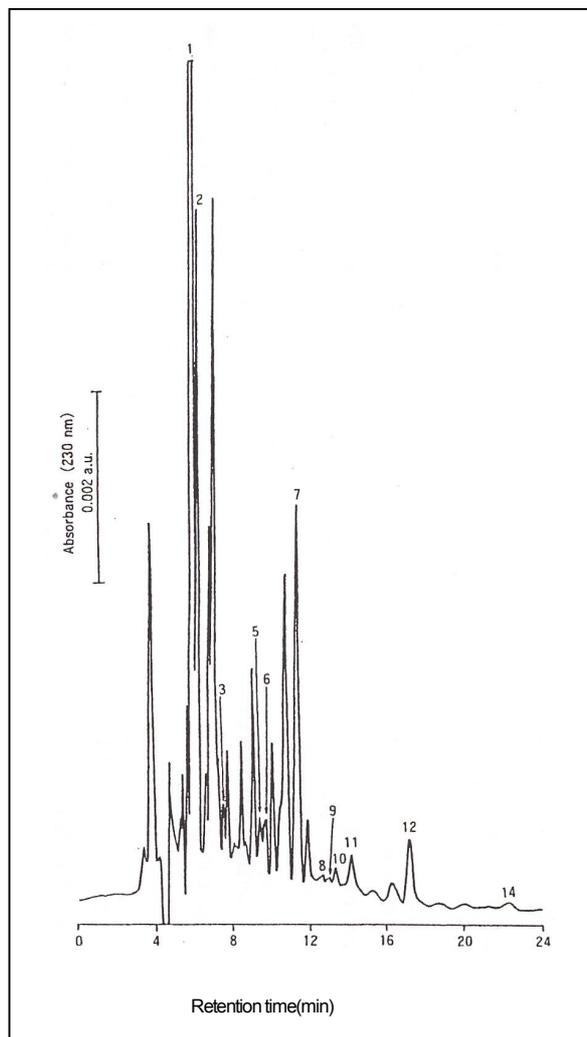


Fig.4

Fig.3 Chromatogram of the 2-nitrophenylhydrazides of a standard mixture of fourteen short-chain fatty acids obtained with UV detection.

peak No.		peak No.	
1	lactic acid	8	DL-2-methylbutyric acid
2	acetic acid	9	3-methylcrotonic acid
3	propionic acid	10	iso-valeric acid
4	crotonic acid	11	n-valeric acid
5	iso-butyric acid	12	2-ethylbutyric acid (I.S.)
6	n-butyric acid	13	iso-caproic acid
7	tiglic acid	14	n-caproic acid

Each peak corresponds to 100 pmol.

Fig.4 Chromatograms of the derivatized SCFA (short-chain fatty acids) in serum from a normal subject.

Each peak number corresponds to that 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させていただきます。