

自動前処理システム用試薬類の調製方法

- 試料からの抽出と希釈
- 各種溶媒のセット
- 各種誘導体化試薬、アルカンミックスの調製方法
- 消耗品について



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

試料からの抽出

【試料の採取・前処理に関して】

酵素反応による代謝物濃度の変動を防ぐため、**採取後は4℃以下で運搬、-30℃以下で保存**し可能な限り迅速に前処理を実施してください。

- 固体試料：凍結粉碎または凍結乾燥後ビーズショッカー等で破碎した試料を一定量取って抽出液を添加してください。
- 液体試料：遠心分離で得られた上清を分注し抽出液を添加してください。

固相誘導体化法ではアセトニトリルでの抽出が代表的です。その他の抽出方法として Bligh & Dyer法（メタノール/水/クロロホルム均一液液抽出）、アセトン抽出、メタノール抽出などがありますが、**メタノールのように水酸基を持つ溶媒は固相内に残存した場合に誘導体化試薬と反応する可能性があるため注意して使用してください。**

試料によって適切な抽出法は異なりますので、事前検討を実施してください。

試料からの抽出と希釈

【抽出液の希釈について】

- 有機酸・アミノ酸分析 : バイアル中溶媒/水比率**50～80%**となるように希釈
※ 一定量の水によってバイアルへのイオン吸着を抑制します。
- 糖類分析 : バイアル中溶媒比率**80%以上**となるように希釈
※ 水が多いと固相への保持が弱くなります。
- 脂肪酸分析 : バイアル中溶媒/水比率**50～80%**となるように希釈

有機酸や脂肪酸が対象で**試料のpHが酸性の場合は、pH 8～9 となるよう調整**してください。

(液量 1 mLに対し0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 μ L程度添加)

※ 酸性条件下ではpKaの高いカルボキシル基が非イオン型 ($-\text{COOH}$) となり固相への保持が弱くなるため。

バイアルに希釈した抽出液を0.5 mL以上移し入れ、

スリット有りPTFE/シリコンセプタムキャップでフタをしてトレイにセットしてください。

※ **スリット無しセプタムの使用はノズル破損の原因になります。**

各種溶媒

前処理に必要な溶媒量に足りているか確認する（その日の分析開始前に取り替えることが望ましい）。

準備する溶媒（送液部左側から順に1→6）

- シリンジ1用溶媒瓶：アセトニトリル（特級以上）
- シリンジ2用溶媒瓶：超純水
- シリンジ3用溶媒瓶：アセトニトリル/水（1/1）
- シリンジ4用溶媒瓶：アセトニトリル（特級以上）
- シリンジ5用溶媒瓶：ヘキサン（特級以上、10 ppm C22含有）
- シリンジ6用溶媒瓶：アセトニトリル（特級以上）

■ アセトニトリル/水（1/1）の調製

アセトニトリル50 mLおよび超純水50 mLをメスシリンダーで量り取り、溶媒瓶で混合する。

■ ヘキサン（10 ppm C22含有）の調製

ヘキサン 50 mLをメスシリンダーで量り取り、10000 ppm **C22**/トルエンを 50 μ L加え混合する。

※ クロマトグラムのC22を確認することで溶出液が正しく送液されているかチェックする目的での添加

溶媒瓶設置後、ソフトウェアから「溶媒の入れ替え」を実行し配管内のパージを行う。

送液時にLノズル、Sノズル、Eノズルから溶媒が垂直に吐出されていることを確認する。

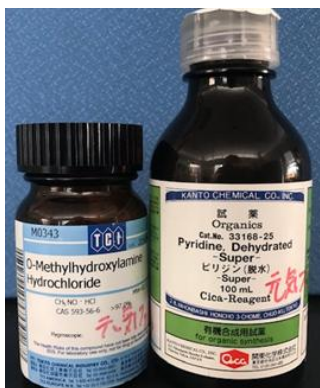
メトキシアミン/ピリジン溶液の調製方法

■ 保管原液（10%メトキシアミン/ピリジン）の調製：2週間毎に交換

1. 1.5mLのエッペンチューブにメトキシアミン 100 mgを入れ、
ピリジン-アセトニトリル（4/1）を 1 mL加えます（スムーズに溶解させるためアセトニトリルを添加）
2. 手で振とうし、メトキシアミンが完全に溶解していることを確認します。
3. しっかりと蓋を閉め室温で保管します（冷蔵で析出するため）。※糖類分析ではこちらを使用

■ 誘導体化溶液（2%メトキシアミン/ピリジン）の調製：用事調製

1. 1.5mLのバイアルにピリジンを 400 μ L入れ 先の保管原液(10%)を 100 μ L加えます。
2. ピペットで混合後、しっかりと蓋を閉めます。※アミノ酸・有機酸分析ではこちらを使用



メトキシアミン塩酸塩
東京化成工業
M0343 25g

ピリジン（脱水）
関東化学
Cat.No. 33168-25
100mL

MSTFAの調製方法

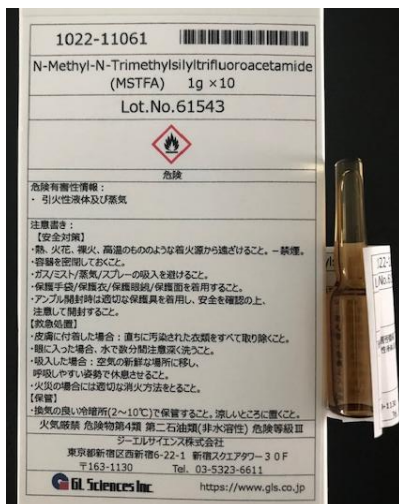
有機酸・アミノ酸、糖類用誘導体化試薬

■ 保管原液：2週間毎に交換

1. アンプルに入っているMSTFA（約 1 mL）をパスツールピペット等で全量をバイアルに入れ替えます。
2. しっかりと蓋を閉め**室温**で保管します。

■ 保管溶液（MSTFA-**ヘキサン(1/1)**）の調製：1週間毎に交換

1. 新しいバイアルにヘキサン 500 μ LとMSTFA 500 μ Lを入れ、よく混合します。
2. ピペットで混合後、適量をバイアルに分注し蓋を閉め**室温**で保管します。※開封後は使い切り



MSTFA
ジェールサイエンス
Cat.No. 1022-11061
1g $\times$ 10本

・ 冷蔵で保管



保管用

MTBSTFAの調製方法

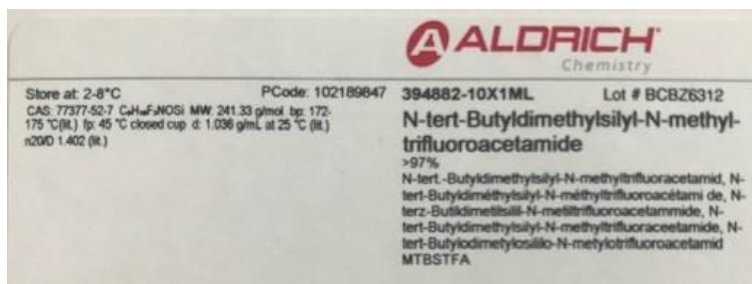
脂肪酸用誘導体化試薬

■ 保管原液：2週間毎に交換

1. アンプルに入っているMTBSTFAをパスツールピペット等でバイアルに入れ替えます。
2. しっかりと蓋を閉め室温で保管します。

■ 保管溶液（MTBSTFA-ヘキサン(1/3)）の調製：1週間毎に交換

1. バイアルにヘキサンを 750 μ L入れ 先の保管原液(MTBSTFA)を 250 μ L加えます。
2. ピペットで混合後、適量をバイアルに分注し蓋を閉め室温で保管します。※開封後は使い切り



MTBSTFA

シグマアルドリッチ

394882-10X1ML

冷蔵保管

アルカンミックスの調製方法

■原液：[n-アルカン混合標準溶液（林純薬工業、品番：99-056072）](#)

■保管・試験溶液：5 ppm アルカン/トルエンの調製

1. アンプルに入っている溶液 50 μL をバイアルに移し入れます。
2. トルエン 950 μL を移し入れよく混合し、しっかりと蓋を閉め冷蔵で保管します。
※ 気密瓶などにまとめて調製しても問題ありません。
3. 適量（100-200 μL ）をインサート入りバイアルに分注し蓋を閉め、
試薬トレイのD5にセットします。

※ トルエンを使用する理由

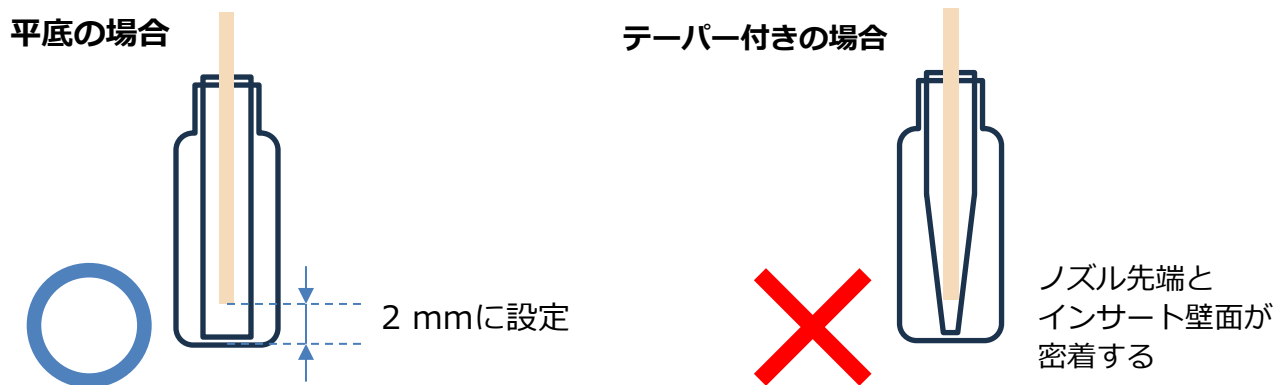
誘導体化物の溶出溶媒はヘキサンですが沸点の高い誘導体化試薬も含まれています。

誘導体化試薬を含んだ状態に近づけるため、沸点の高いトルエン（約110℃）を使用します。

少ない試薬量・試料量で分析する場合

平底バイアルインサートの使用

※ テーパー付き（すぼみのある）インサートは非推奨
（ノズル先端に密着して正常に液を吸引できないため）



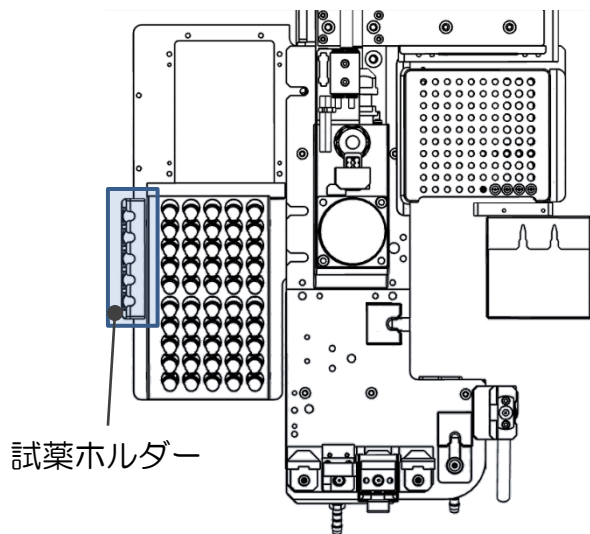
推奨品：

0.2mL ガラスインサート F-Bottom 100本入
（ジーエルサイエンス、06090866）

誘導体化試薬バイアルに使用した場合、約20検体処理可能

試薬セット位置

(本体俯瞰図)



※ 図はノーマルトレイの場合です。

※ アジレントトレイの場合は
左からD5、D4、D3、D2、D1
となります。

手前から奥に向かってD1-D5

D5

アルカンミックス
(保持指標計算用)

D4

MTBSTFA/ヘキサン=1/3
(短鎖脂肪酸分析用)

D3

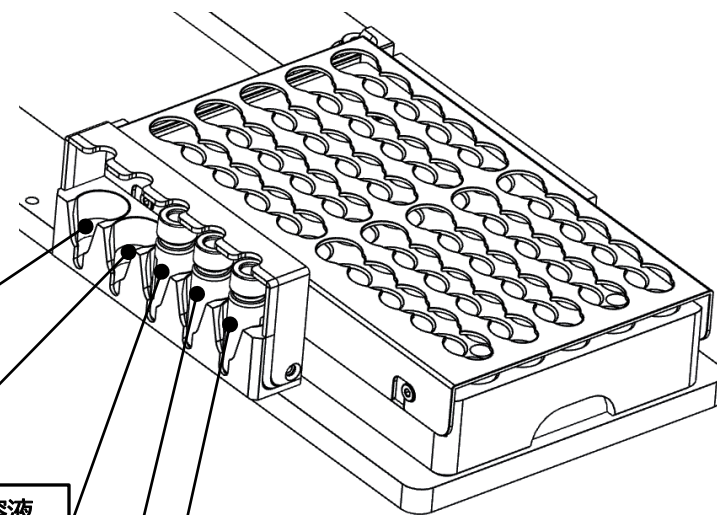
10%メトキシアミン/ピリジン溶液
(糖分析用)

D2

0.5%メトキシアミン/ピリジン溶液
(アミノ酸・有機酸分析用)

D1

MSTFA/ヘキサン=1/1



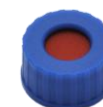
消耗品について：固相カートリッジ

- 有機酸・アミノ酸分析
→ Flash-SPE **ACXs**
- 糖類分析
→ Flash-SPE **ACXs** または **AXs**
- 脂肪酸分析
→ Flash-SPE **AXs**

消耗品について：バイアル、セプタム

キャップサイズ9-425のガラススクリーバイアルおよびセプタムキャップが使用可能です。
弊社試験に使用しておりますオリジナルバイアルの販売もごさいます。

- 1.5mL透明スクリーバイアル ラベル付き 100個入 (PD-1012-111)
- 1.5mL透明スクリーバイアル ラベル付き 1000個入 (PD-1012-112)
- 1.5mL褐色スクリーバイアル ラベル付き 100個入 (PD-1012-121)
- 1.5mL褐色スクリーバイアル ラベル付き 1000個入 (PD-1012-122)
- セプタム付スクリーキャップ 100個入 (PD-1011-111) ※試薬保管用
- セプタム付スクリーキャップ 1000個入 (PD-1011-112) ※試薬保管用
- スリット入セプタム付スクリーキャップ 100個入 (PD-1011-121)
- スリット入セプタム付スクリーキャップ 1000個入 (PD-1011-122)



混合スタンダードの調製方法

1.5mL用遠沈チューブ

- アセトニトリル-水 (1/1) 0.94 mL
- 2.5 nmol/ μ L アミノ酸(0.1N HCl)混合溶液 8 μ L
- 2 nmol/ μ L 有機酸混合溶液 10 μ L
- 0.1N NaOH水 25~50 μ L

混合スタンダード 0.02 nmol/ μ L
 1 mL (pH 7~8)

各混合標準溶液について

アミノ酸混合標準溶液
(0.1N HCl)
2.5 nmol/ μ L



[アミノ酸混合標準液, H型\(高濃度タイプ\)](#)
[Amino Acids Mixture Standard Solution, Type H\(High Range\)](#)
[019-28151](#)

有機酸混合標準溶液
1 nmol/ μ L= μ mol/mL

各成分200 μ mol/mLを調製

200 μ mol/mL=0.2mmol/mL
=1mmol/5mL
=MW mg/5mL

分子量 mgを 5 mLの溶媒で溶かすと200nmol/ μ L

200nmol/ μ Lの各成分をそれぞれ25 μ L採取し、
5mLで定容すれば、1nmol/ μ Lの混合標準溶液となる。

水酸化ナトリウム水溶液の調製方法

NaOH水
0.2M

まずは1Nを調製
50mL遠沈チューブ

- └ 超純水 50mL
- └ NaOH 2g

NaOH MW:40g
1N=1mol/L
=40g/L
=2g/50mL

1N NaOH

5mL遠沈チューブ

- └ 超純水 4 mL
- └ 1M NaOH 1 mL

0.2M NaOH

代表的な内部標準物質

- 保管原液：以下の希釈溶媒で 200 mmol/Lとなるよう調製し冷蔵保存
- アミノ酸：[ノルロイシン（東京化成、品番：N0303）](#)
 - 溶媒：200 mmol/L 塩酸アセトニトリル/水（1/9）
- 有機酸：[アジピン酸（富士フィルム和光純薬、品番：013-09932）](#)
 - 溶媒：アセトニトリル/水（1/1）
- 短鎖脂肪酸：[酢酸-d4（富士フィルム和光純薬/CIL、品番：536-74361/DLM-12-10）](#)
 - 溶媒：アセトニトリル/水（1/9）
- 中鎖脂肪酸：[ヘキサン酸-d11（富士フィルム和光純薬/CIL、品番：DLM-277-0.1）](#)
 - 溶媒：アセトニトリル/水（1/9）
- 糖類：[リビトール（富士フィルム和光純薬、品番：010-00942）](#)
 - 溶媒：アセトニトリル/水（1/9）

内部標準物質濃度の目安

アミノ酸・有機酸、脂肪酸：バイアル中濃度 0.02 mmol/L

糖類：バイアル中濃度 0.2 mmol/L

※ 試料によって適切な希釈倍率が異なるため、
希釈後に上記濃度となるよう添加濃度・添加量を調節してください。