

固相誘導体化法

メタボローム分析前処理 お試しキット

試薬調製 & 前処理フロー & 操作説明

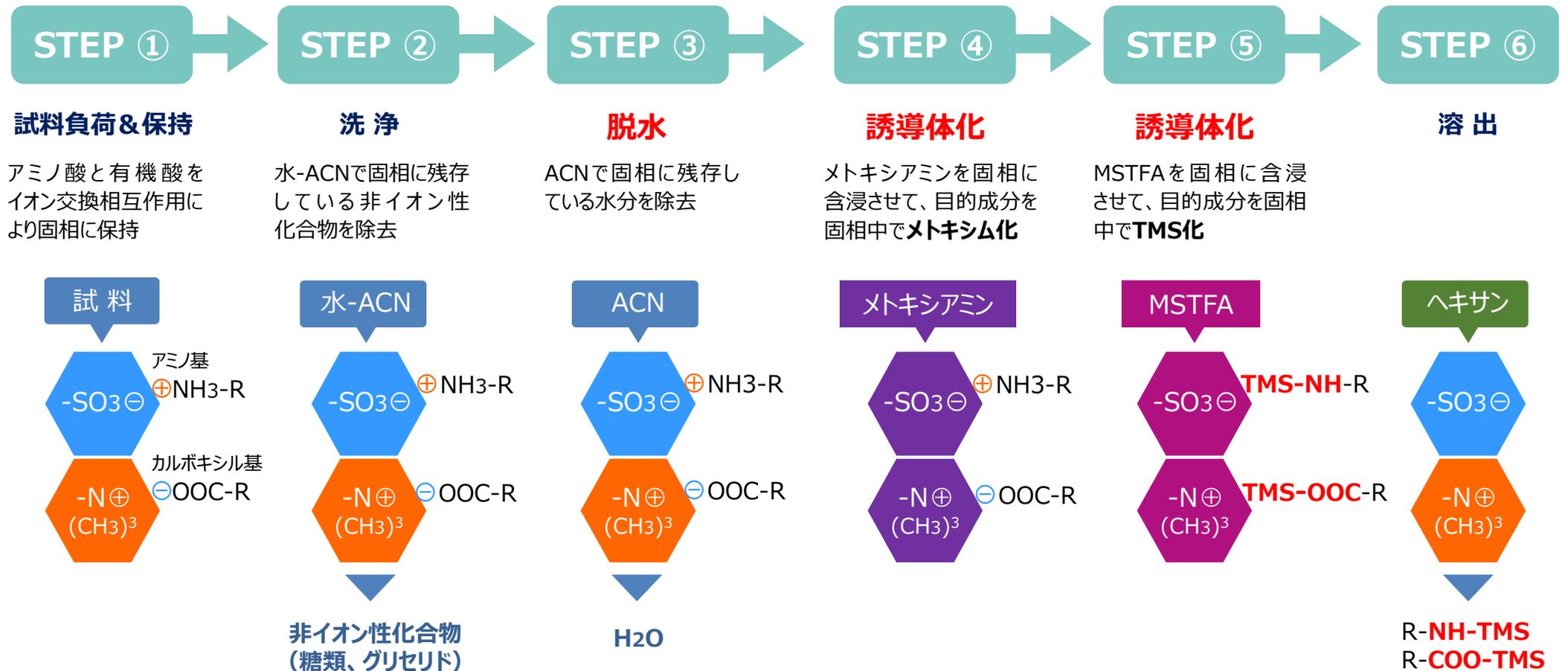


株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

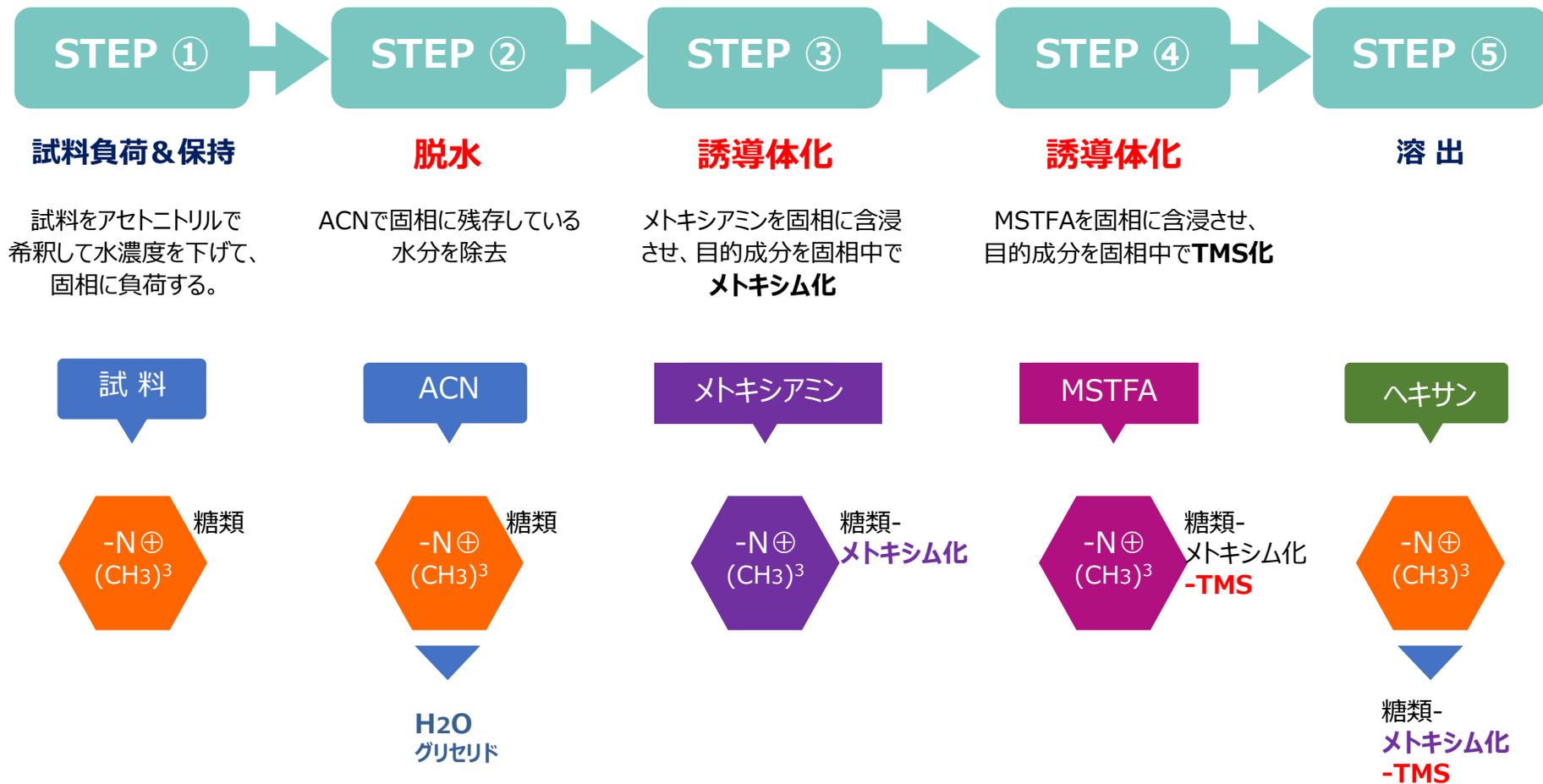
AiSTI SCIENCE

固相誘導体化法：アミノ酸・有機酸



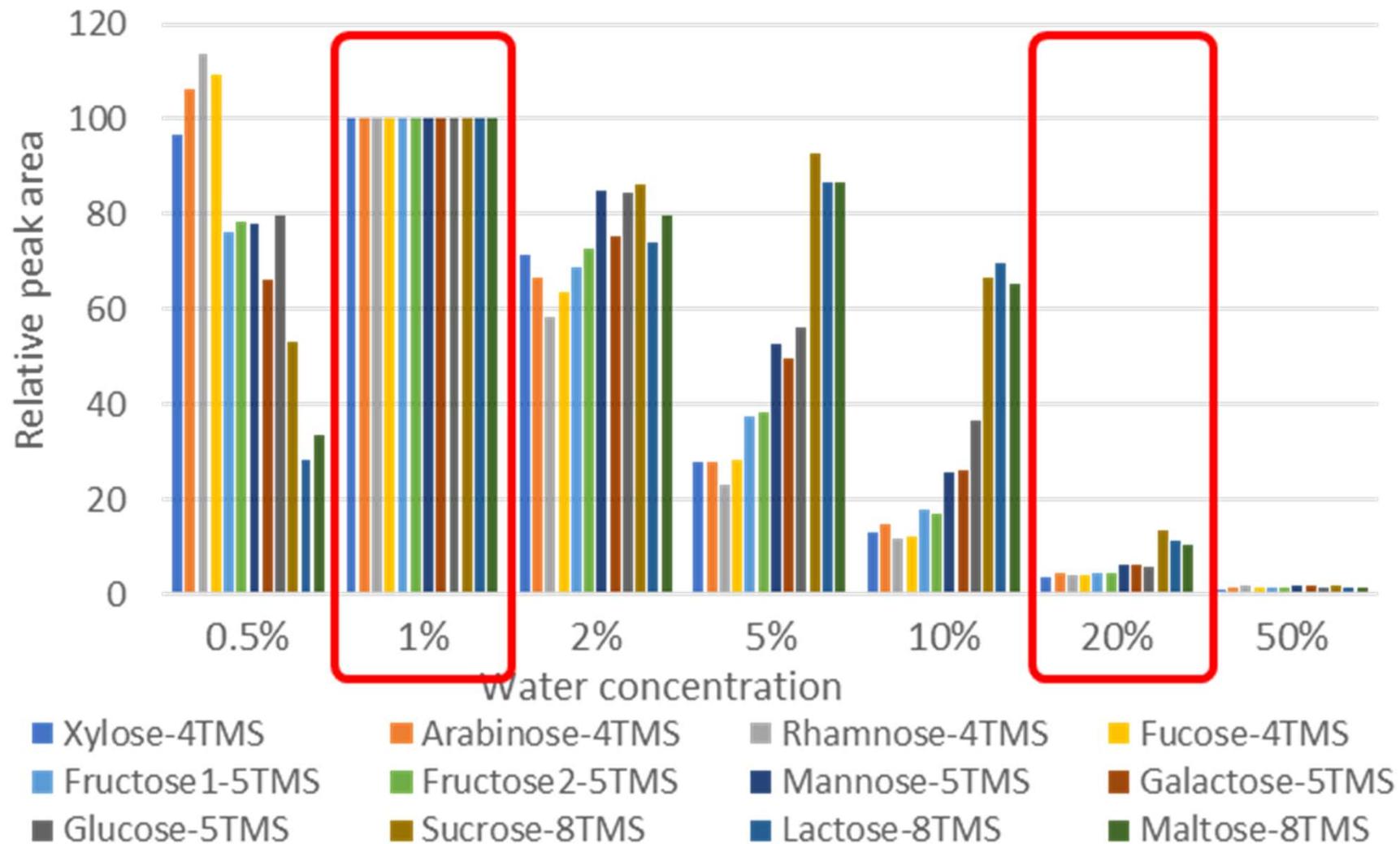
特許登録：(株)アイスティサイエンス

固相誘導体化法：糖類



特許登録：（株）アイスティサイエンス

試料負荷時の水濃度と糖類の保持



メタボロームお試しキット

同梱物

- チップボックス&プレート 1個
- 1mLルアーチップシリンジ 2本
- お試し用 Presh-SPEカートリッジ 10個 or 20個

※ 廃液受け皿、マイクロピペット、
ピペットチップ等は
ご自身でご用意ください



代用品について

- チップボックス
 - 市販の200 μ L用チップボックスであれば対応可能（穴径が6～7mmのもの）

- 1mLルアーチップシリンジ
 - 径が大きくなるほど操作が固くなり難しくなります
 - プランジャ先端に潤滑剤が塗られている場合は洗浄してから使用すること（お試しキットに付属のシリンジは洗浄処理済みです）

試薬調製

※手動固相誘導体化用

準備する溶媒

固相前処理に使用

- 超純水
- アセトニトリル/水 (1/1)
- 特級アセトニトリル
- 特級ヘキサン

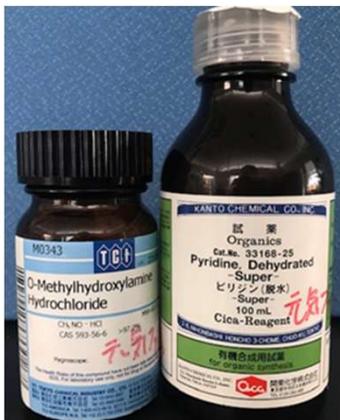
誘導体化試薬調製に使用

- 脱水ピリジン

メトキシアミン溶液の調製方法

- 保管原液（10%メトキシアミン/ピリジン/20%アセトニトリル）の調製：用事調製
 1. 1.5mLのエッペンチューブにメトキシアミン 100 mgを量り取ります。
 2. アセトニトリルを 200 μ L、ピリジンを 800 μ L加えます。
 3. サーマミキサーにて、37 $^{\circ}$ C/1000rpmで 5 分間振とうします。
 4. 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。
 5. 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（0.5%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 950 μ L入れ、先の10%メトキシアミン溶液を 50 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



サーモミキサーにて振とう

1検体に付き 5 μ L使用

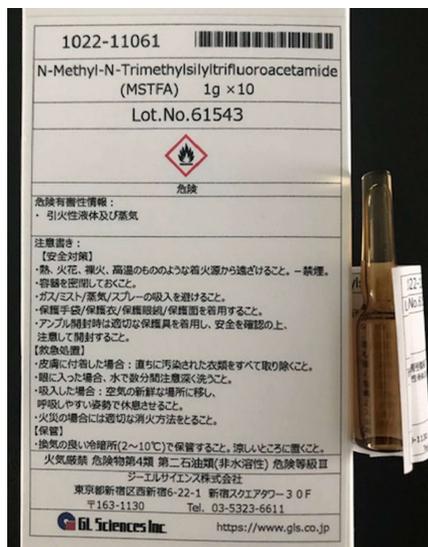
MSTFAの調製方法

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）を全量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。

（冷蔵保存すると取り出した際に凝結により水分が混入する可能性があるため）



MSTFA
 ジーエルサイエンス
 Cat.No. 1022-11061
 1g × 10本

・ 冷蔵で保管



保管用

使用量：25 μ L/1検体

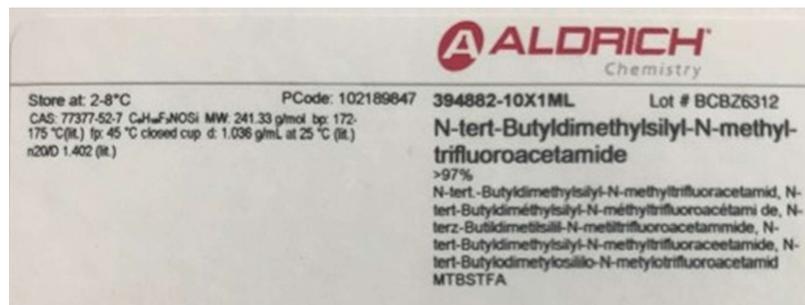
MTBSTFAの調製方法

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。

(冷蔵保存すると取り出した際に凝結により水分が混入する可能性があるため)



使用量：25 μ L/1検体

MTBSTFA
シグマアルドリッチ
394882-10X1ML

冷蔵保管

アミノ酸有機酸混合標準溶液の調製方法

1.5mLガラスバイアル

—	アセトニトリル 800 μL
—	2.5 nmol/ μL アミノ酸(0.1N HCl)混合溶液 80 μL
—	2 nmol/ μL 有機酸混合溶液 100 μL
—	0.1N NaOH水 100 μL

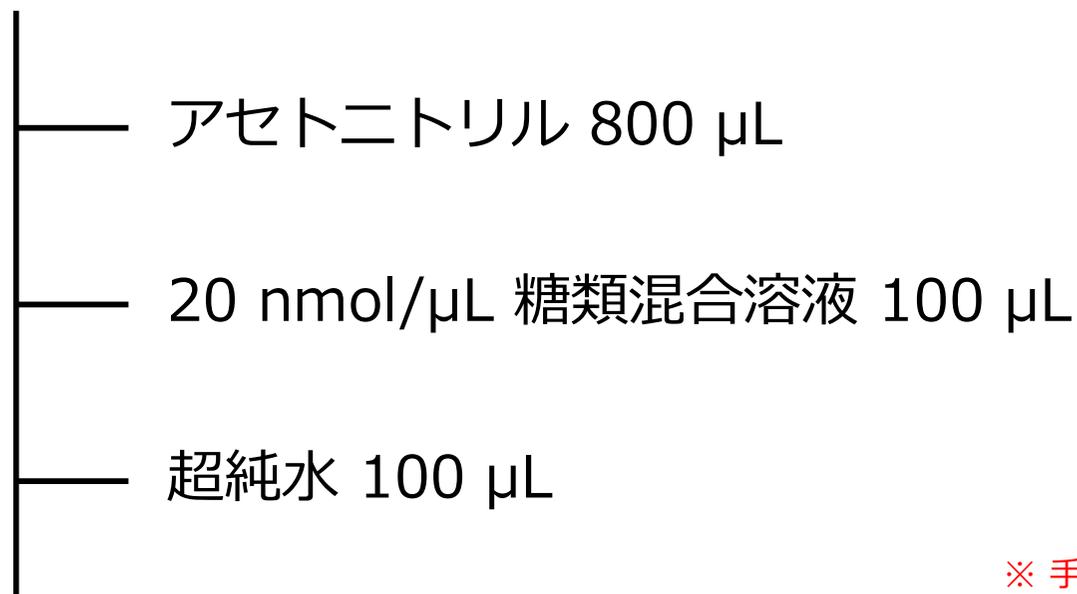
混合スタンダード 0.2 nmol/ μL
 1 mL (pH 8~9)

※ 手動前処理の場合、溶出液の一部しか導入できないため
 自動前処理の10倍濃度で行います

※ カルボン酸を保持するためにpHを調整しています

糖類混合標準溶液の調製方法

1.5mLガラスバイアル



混合スタンダード 2.0 nmol/ μL
1 mL

※ 手動前処理の場合、溶出液の一部しか導入できないため
自動前処理の10倍濃度で行います

※ 検液のアセトニトリル濃度80%での濃度です
事前に希釈しアセトニトリル濃度99%で行う場合は
0.1 nmol/ μL としてください

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/μL



有機酸混合標準溶液
1 nmol/μL = μmol/mL

各成分200μmol/mLを調製

200μmol/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/μL

[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](#)

200nmol/μLの各成分をそれぞれ25μL採取し、
5mLで定容すれば、1nmol/μL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

0.1M

まずは1M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

1M NaOH

5mL遠沈チューブ

- ├ 超純水 4.5mL
- └ 1N NaOH 0.5mL

0.1N NaOH

前処理フロー

固相誘導体化法（アミノ酸・有機酸）

試料 50 μ L (約 50 mg)

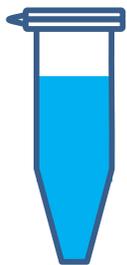
添加：水 150 μ L

添加：ACN 800 μ L

インキュベーション (37°C, 30 min)

遠心分離 (14000 rpm, 5 min)

試料抽出液



【抽出液が酸性の場合】

pHが7ぐらいになるように0.1NのNaOH水溶液を10~100 μ L適宜添加して調製して下さい。

特に**スタンダード**は酸性になっている場合が多いですので注意です。

試料抽出液 50 μ L

Presh-SPE **ACXs**
(アミノ酸と有機酸を保持)

コンディショニング
水 100 μ L
水-ACN(1/1) 100 μ L

洗浄：水-ACN(1/1) 100 μ L (糖類を洗浄)

洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果) \times 2回

誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)
0.5% (5 mg/mL)メトキシアミン溶液 5 μ L, 5分

誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)
MSTFA 25 μ L, 1分

溶出 (誘導体化試薬を直接バイアルへ溶出)

溶出：ヘキサン 100 μ L

検液 (バイアル)

測定：GC/MS スプリットレス注入 1 μ L (サンプリング時間1分)

固相誘導体化法（アミノ酸）

試料 50 μ L (約 50 mg)

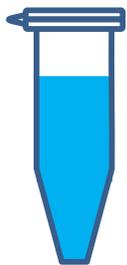
— 添加：水 150 μ L

— 添加：ACN 800 μ L

— インキュベーション (37°C, 30 min)

— 遠心分離 (14000 rpm, 5 min)

試料抽出液



試料抽出液 50 μ L

Presh-SPE **CXs** (アミノ酸を保持)

— コンディショニング

— 水 100 μ L

— 水-ACN(1/1) 100 μ L

— 洗浄：水-ACN(1/1) 100 μ L (糖類を洗浄)

— 洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果) \times 2回

— 誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)

— 0.5% (5 mg/mL)メトキシアミン溶液 5 μ L, 5分

— 誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)

— MSTFA 25 μ L, 1分

— 溶出 (誘導体化試薬を直接バイアルへ溶出)

— 溶出：ヘキサン 100 μ L

検液 (バイアル)

測定：GC/MS スプリットレス注入 1 μ L (サンプリング時間1分)

固相誘導体化法（有機酸）

試料 50 μ L (約 50 mg)

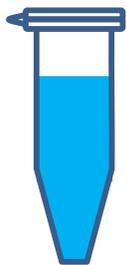
添加：水 150 μ L

添加：ACN 800 μ L

インキュベーション (37°C, 30 min)

遠心分離 (14000 rpm, 5 min)

試料抽出液



【抽出液が酸性の場合】

pHが7ぐらいになるように0.1NのNaOH水溶液を10~100 μ L適宜添加して調製して下さい。

特に**スタンダード**は酸性になっている場合が多いですので注意です。

試料抽出液 50 μ L

Presh-SPE **AXs** (有機酸を保持)

コンディショニング

水 100 μ L

水-ACN(1/1) 100 μ L

洗浄：水-ACN(1/1) 100 μ L (糖類を洗浄)

洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果) \times 2回

誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)

0.5% (5 mg/mL)メトキシアミン溶液 5 μ L, 5分

誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)

MSTFA 25 μ L, 1分

溶出 (誘導体化試薬を直接バイアルへ溶出)

溶出：ヘキサン 100 μ L

検液 (バイアル)

測定：GC/MS スプリットレス注入 1 μ L (サンプリング時間1分)

固相誘導体化法（糖類）

試料 50 μL (約 50 mg)

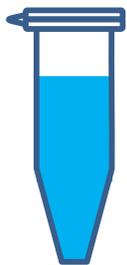
添加：水 150 μL

添加：ACN 800 μL

インキュベーション (37°C, 30 min)

遠心分離 (14000 rpm, 5 min)

試料抽出液



ACN 100 μL

試料抽出液 5 μL
(ACNと固相上部で混合)

Presh-SPE **AXs** (糖類を保持)

コンディショニング
水 100 μL
ACN 100 μL

洗浄：ACN 100 μL (脱水効果) $\times 2$ 回

誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)
10% (100 mg/mL)メトキシアミン溶液 5 μL , 5分

誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)
MSTFA 25 μL , 1 min

溶出 (誘導体化試薬を直接バイアルへ溶出)

溶出：ヘキサン 100 μL

検液 (バイアル)

測定：GC/MS スプリットレス注入 1 μL (サンプリング時間1分)

固相誘導体化法（短鎖・長鎖脂肪酸）

試料 50 μ L (約 50 mg)

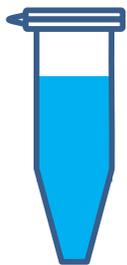
添加：水 150 μ L

添加：ACN 800 μ L

インキュベーション (37°C, 30 min)

遠心分離 (14000 rpm, 5 min)

試料抽出液



【抽出液が酸性の場合】

pHが7ぐらいになるように0.1NのNaOH水溶液を10~100 μ L適宜添加して調製して下さい。

特に**スタンダード**は酸性になっている場合が多いですので注意です。

試料抽出液 50 μ L

Presh-SPE **AXs** (有機酸を保持)

コンディショニング

水 100 μ L

水-ACN(1/1) 100 μ L

洗浄：水-ACN(1/1) 100 μ L (糖類を洗浄)

洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果) \times 2回

誘導体化試薬を含浸 (固相誘導体化反応)

MSTFAまたは**MTBSTFA** 25 μ L, 1分

※ギ酸、酢酸、プロピオン酸対象の場合はMTBSTFA推奨

溶出 (誘導体化試薬を直接バイアルへ溶出)

溶出：ヘキサン 100 μ L

検液 (バイアル)

測定：GC/MS スプリットレス注入 1 μ L (サンプリング時間1分)

固相誘導体化法（疎水性成分）

試料 50 μ L (約 50 mg)

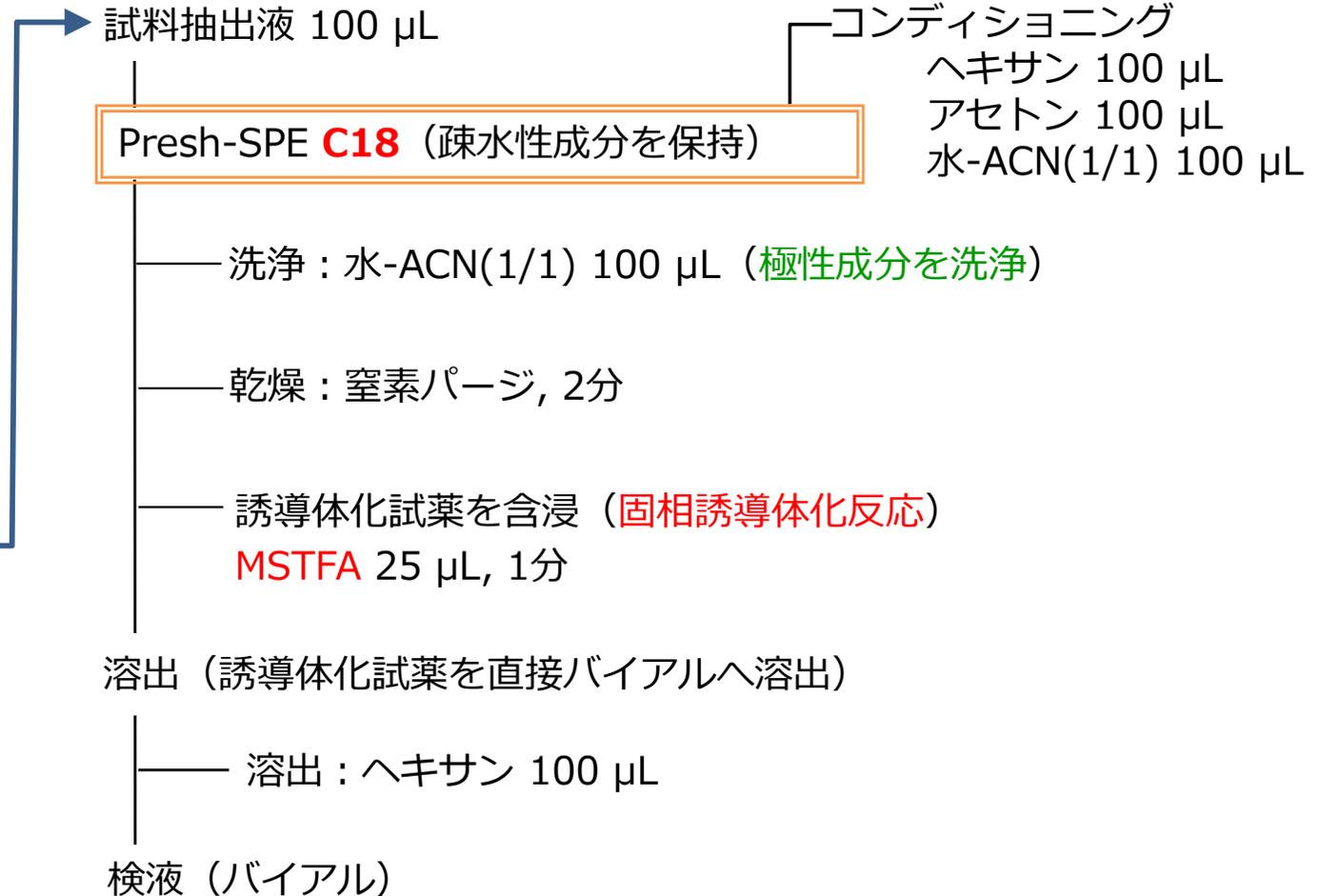
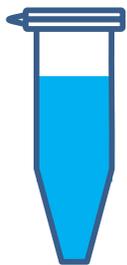
— 添加：水 150 μ L

**抽出条件については
検討中**

— インキュベーション (37°C, 30 min)

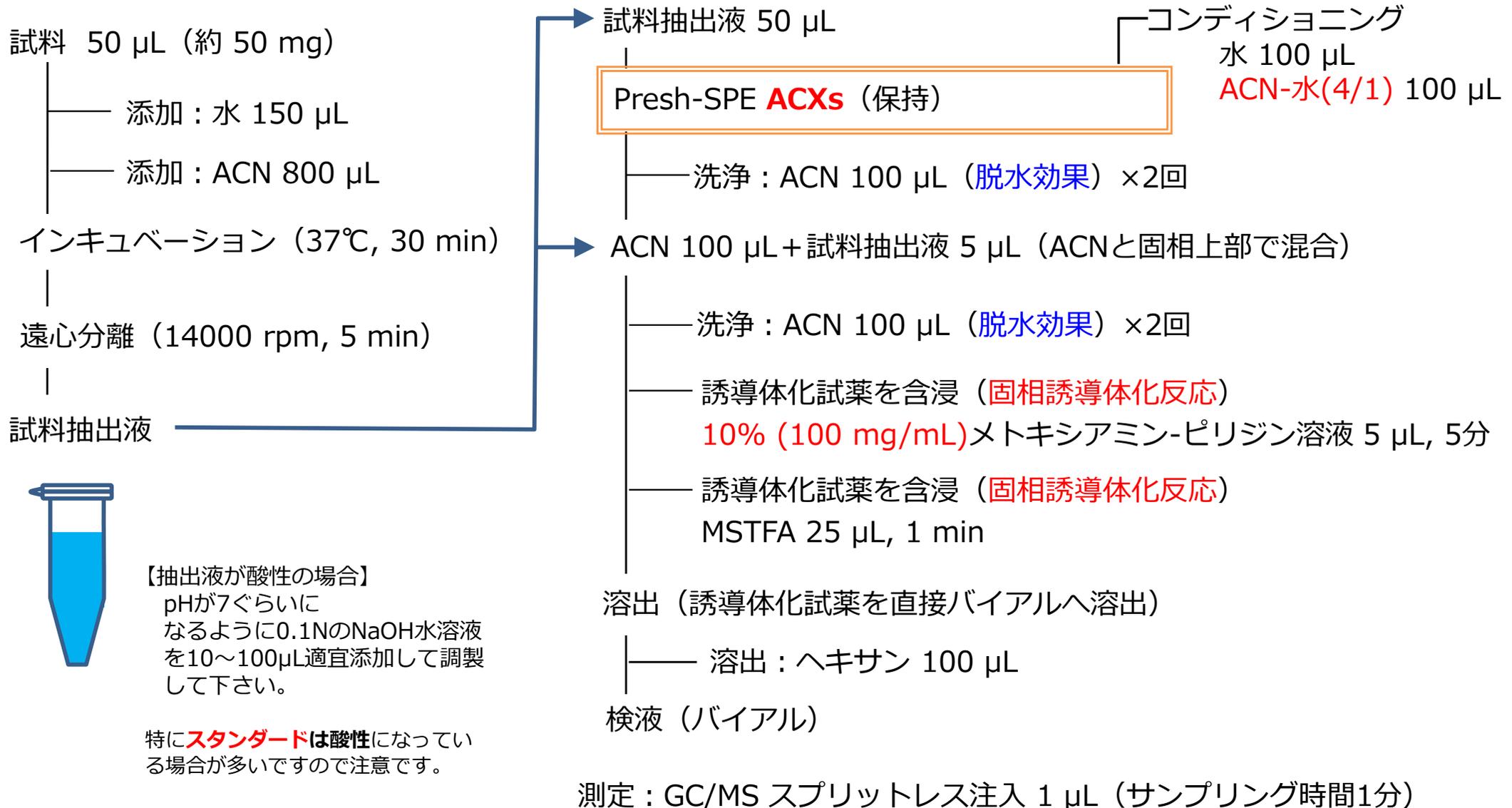
— 遠心分離 (14000 rpm, 5 min)

試料抽出液



測定：GC/MS スプリットレス注入 1 μ L (サンプリング時間1分)

固相誘導体化法 (アミノ酸・有機酸・糖類)



操作説明

液体の入れ方（洗浄、試料負荷）

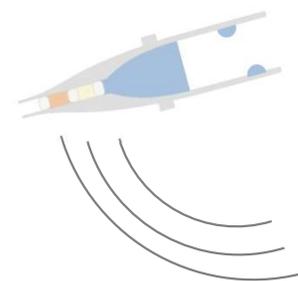


ポイント：壁面に水を付着させない！

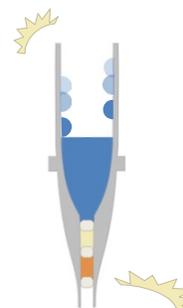
水が残っていると誘導体化反応が阻害されてばらつきの原因となります



チップを壁面に接触させず、
液滴を落とすように入れる



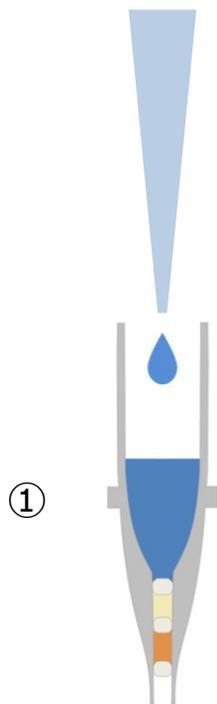
軽く振って
遠心力で落とす



振動を加えて
下に落とす

糖類分析時の希釈方法

固相カートリッジに
アセトニトリル 100 μ Lを入れる



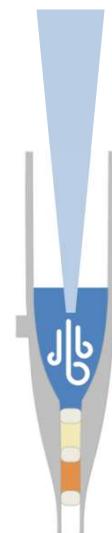
アセトニトリル80%の試料 5 μ Lを
固相上のアセトニトリルと混合 (ピペッティング)



アセトニトリル99%の検液として通液

※ 事前に希釈して 100 μ L入れる操作でも可能

②

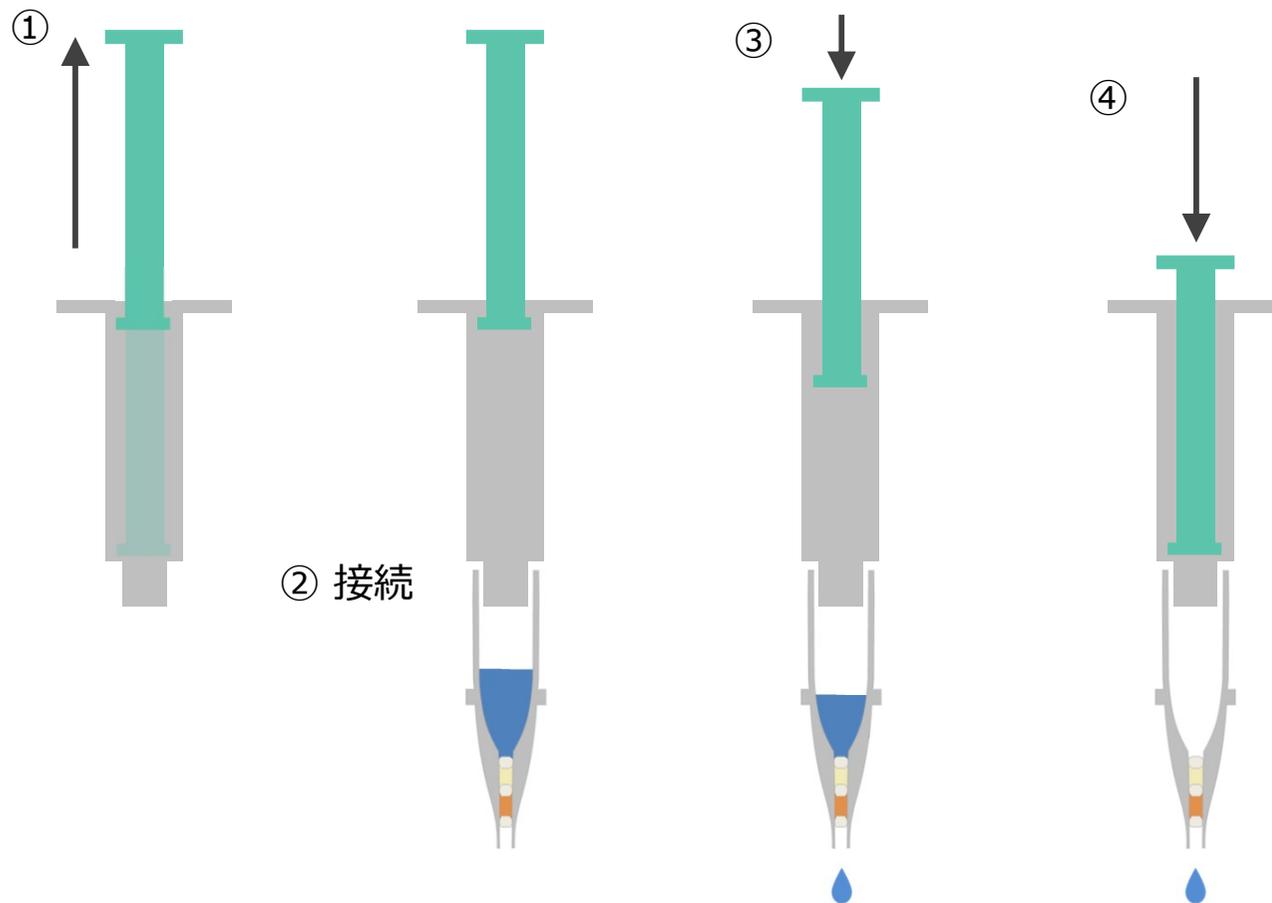


通液時の操作 (シリンジの使い方)

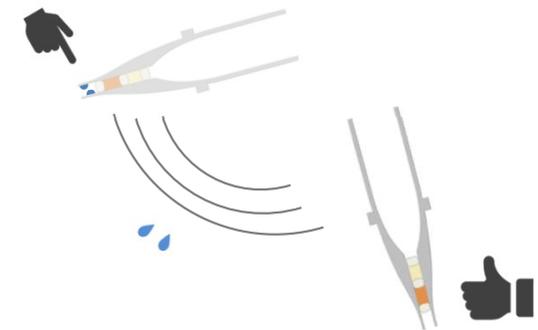
プランジャを最大まで引いてから
液体の入った固相に接続する

規定の目盛りまでゆっくり押し
5~10秒待機後、完全に押し切る

シリンジで液体を
直接吸わないこと!



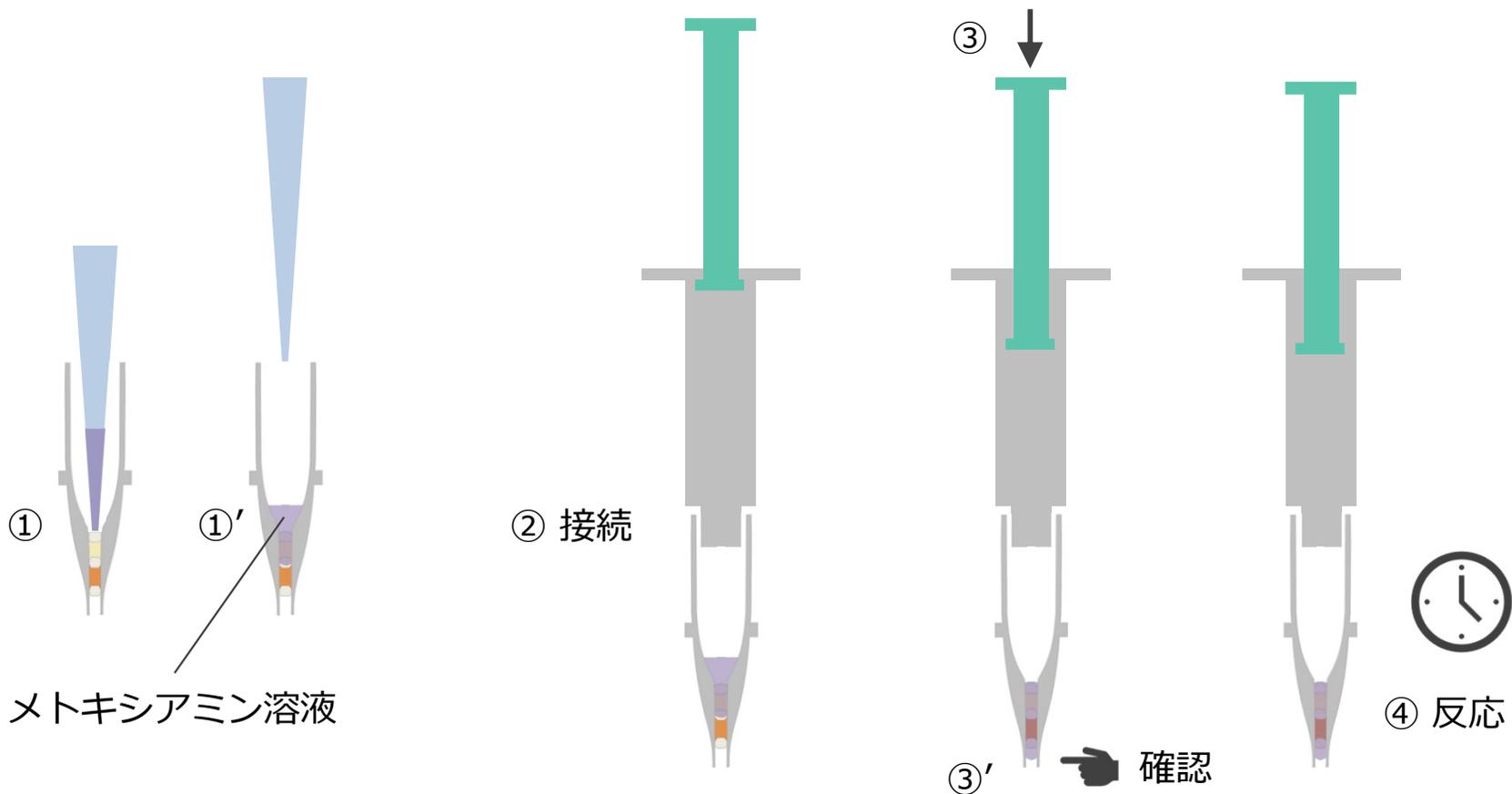
誘導体化前に軽く振って
先端の液滴を落とす



メトキシアミン含浸時の操作

ピペットチップの先端を固相に当てて
誘導体化試薬を染み込ませる
(この段階では固相全体に回らない)

シリンジをわずかに押し込み、
固相全体に誘導体化試薬を送る
(カートリッジ先端に滲み出るまで)



MSTFA含浸時の操作



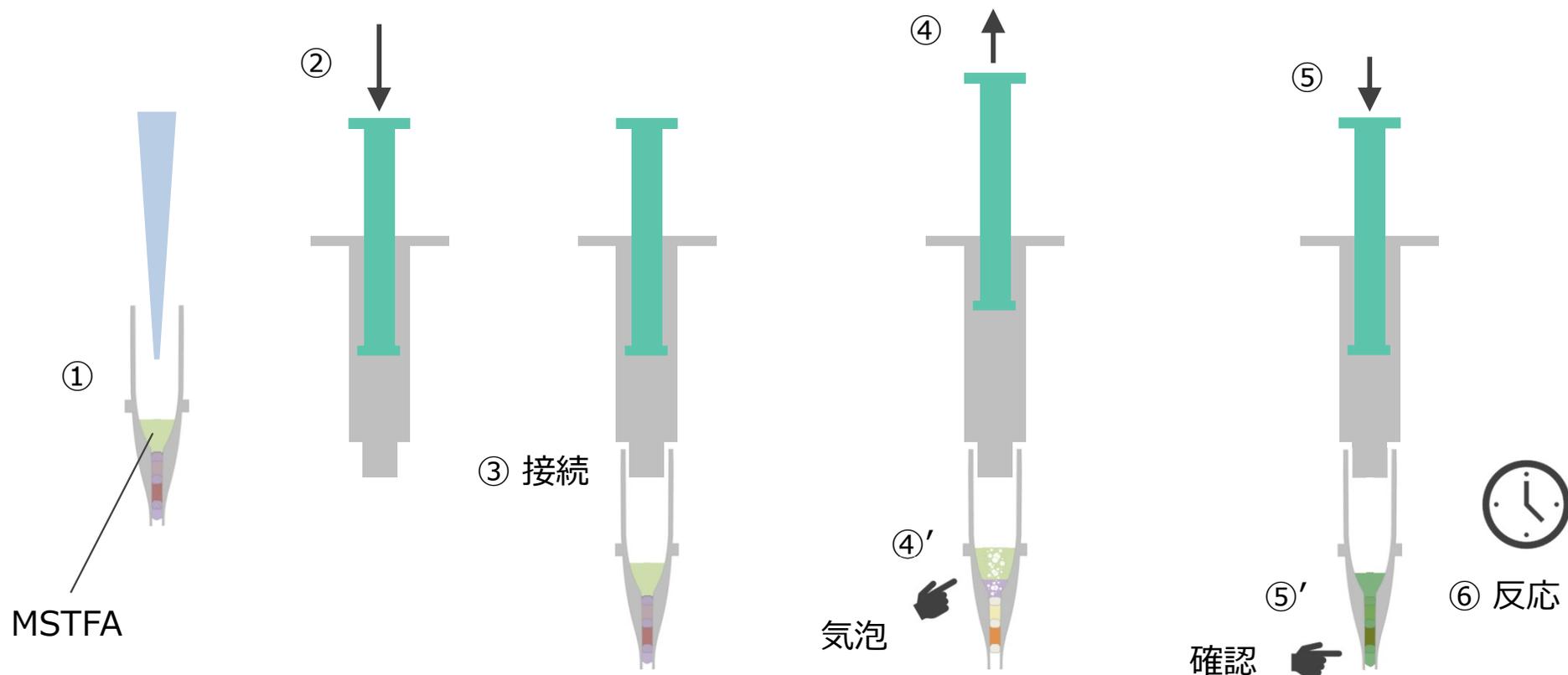
ポイント：試薬をしっかりと混ぜる！

固相の中にあるメトキシアミン溶液とMSTFAを入れ替えましょう

固相上に誘導体化試薬を入れ、
プランジャを半分押し込んだシリンジと
固相カートリッジを接続する

気泡が出るまで
ゆっくりプランジャを引き、
試薬を混ぜる（3秒待つ）

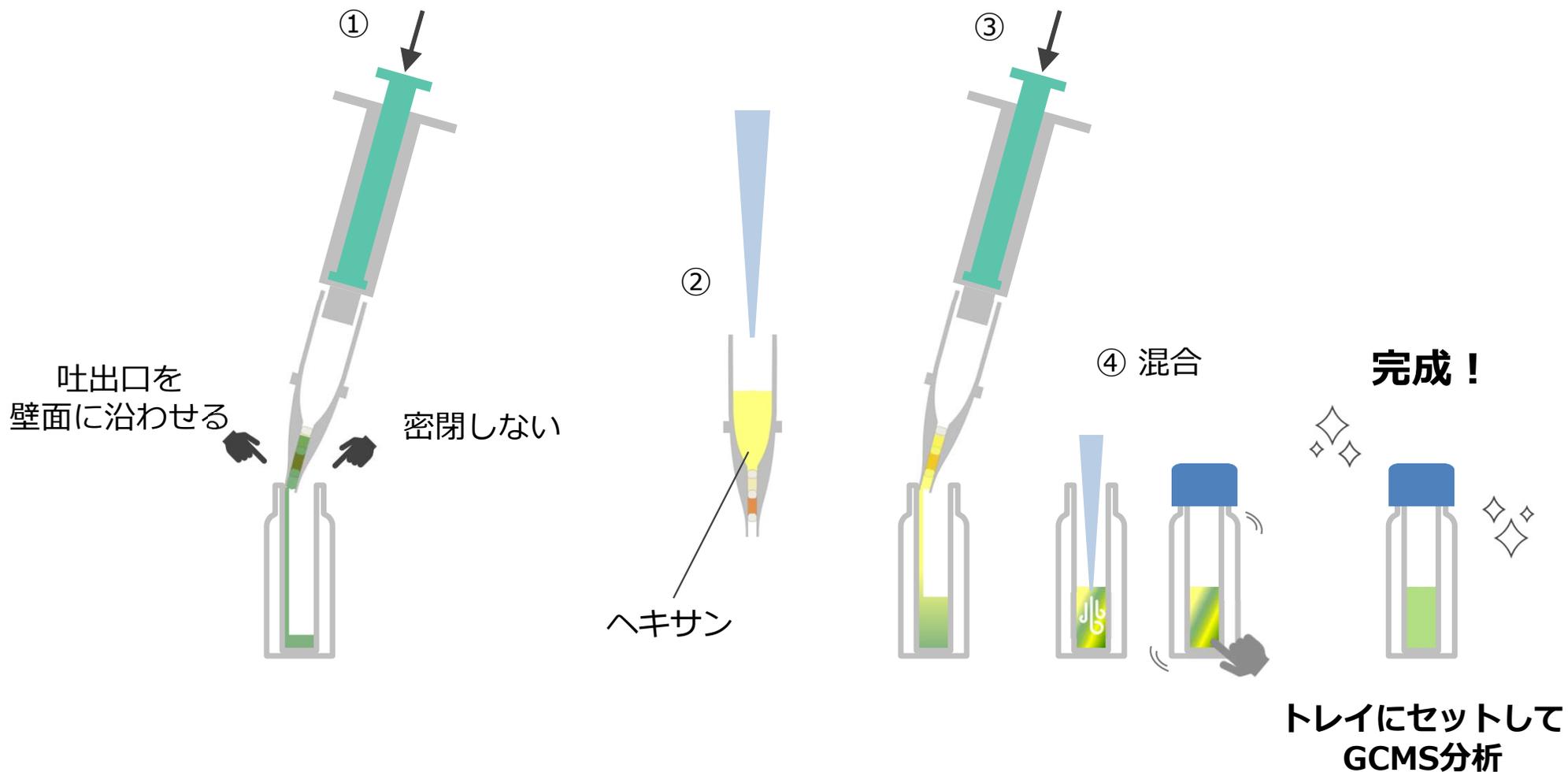
ゆっくり押し込み
試薬を固相全体に
染み込ませ反応させる



溶出時の操作

誘導体化試薬を
インサート入りバイアルに溶出

ヘキサンを固相カートリッジに入れ
インサート入りバイアルに溶出後、
タッピングやピペティングで混合



GCMS分析条件例

注入口	推奨条件1	推奨条件2	例
インジェクター	標準インジェクター		標準インジェクター
注入口	標準注入口		LVI-S250 (AiSTI Science)
インサート	スプリットレス用	スプリット用	スパイラルインサート
注入口温度	280℃		280℃
パーシ流量	3.0 mL/分		3.0 mL/分
注入量	1 μ L		1 μ L
GC			
注入モード	スプリットレス	スプリット(1:10)	スプリットレス (高圧注入 150 kPa, 1分)
カラム流量	1.0 mL/分		1.0 mL/分
分析カラム	汎用5%フェニル系カラム		VF-5ms, 0.25 mm i.d. \times 30 m, df=0.25 μ m
オープン温度	初期温度100℃ (2分)		100℃ (2分) -10℃/分-320℃ (4分) , 計28分
MS			
データ採取開始時間	誘導体化試薬溶出後から		3.2分
データ取得モード	指定なし		Scan (m/z 70-600)