

## プレート配置例

### ● 安定性試験(0 時間)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A											
	B											
	C				ST(0)	ST(0)	ST(0)					
	D											
NAL	E											
	F				ST(0)	ST(0)	ST(0)					
	G											
	H											

### ● 5 サンプル 1 溶媒種 (アセトニトリル) の場合

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1
	B	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2
	C	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3
	D	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4
NAL	E	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1
	F	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2
	G	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3
	H	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4

### ● 17 サンプル 1 溶媒種 (アセトニトリル) の場合

#### 1 プレート目

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	サンプル11
	B	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	サンプル11
	C	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	サンプル11
	D	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	CC-11
NAL	E	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	サンプル11
	F	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	サンプル11
	G	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	サンプル11
	H	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	CC-11

#### 2 プレート目

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A	サンプル13	サンプル14	サンプル15	サンプル16	サンプル17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1
	B	サンプル13	サンプル14	サンプル15	サンプル16	サンプル17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2
	C	サンプル13	サンプル14	サンプル15	サンプル16	サンプル17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3
	D	CC-13	CC-14	CC-15	CC-16	CC-17	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4
NAL	E	サンプル13	サンプル14	サンプル15	サンプル16	サンプル17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1
	F	サンプル13	サンプル14	サンプル15	サンプル16	サンプル17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2
	G	サンプル13	サンプル14	サンプル15	サンプル16	サンプル17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3
	H	CC-13	CC-14	CC-15	CC-16	CC-17	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4

## ●10 サンプル 2 溶媒種の場合

### 1 プレート目

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	-	-
	B サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	-	-
	C サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	-	-
	D CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	-	-
NAL	E サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	-	-
	F サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	-	-
	G サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7	サンプル8	サンプル9	サンプル10	-	-
	H CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	-	-

### 2 プレート目

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A RC-A	RC-B	RC-B	RC-C (溶媒1)	RC-C (溶媒2)	PC	-	-	-	-	std1	std5
	B RC-A	RC-B	RC-B	RC-C (溶媒1)	RC-C (溶媒2)	PC	-	-	-	-	std2	std6
	C RC-A	RC-B	RC-B	RC-C (溶媒1)	RC-C (溶媒2)	PC	-	-	-	-	std3	std7
	D -	-	-	-	-	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std4	-
NAL	E RC-A	RC-B	RC-B	RC-C (溶媒1)	RC-C (溶媒2)	PC	-	-	-	-	std1	std5
	F RC-A	RC-B	RC-B	RC-C (溶媒1)	RC-C (溶媒2)	PC	-	-	-	-	std2	std6
	G RC-A	RC-B	RC-B	RC-C (溶媒1)	RC-C (溶媒2)	PC	-	-	-	-	std3	std7
	H -	-	-	-	-	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std4	-

### プレート内容

#### サンプル

NAC および NAL と被験物質の反応液。被験物質 : NAC または NAL = 50 : 1 で反応させ、各被験物質の NAC および NAL に対する反応性を評価する。組成…被験物質溶液(1mM 溶液) : NAC または NAL 溶液(6.667  $\mu$  M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

#### PC(Positive control 陽性対照)

組成…陽性対照溶液(1mM Phenylacetaldehyde アセトニトリル溶液) : NAC または NAL 溶液(6.667  $\mu$  M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

#### RC(参照コントロール Reference control)

RC-A : HPLC 装置の適格性を確認するためのコントロール。被験物質溶液の代わりにアセトニトリルを添加した溶液について、標準液検量線に対して適切な NAC および NAL の濃度を算出できるかを確認する。

組成…アセトニトリル : NAC または NAL 溶液(6.667  $\mu$  M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

RC-B : 分析時間中の反応液の安定性を確認するためのコントロール。被験物質溶液の代わりにアセトニトリルを添加した溶媒について、分析開始時と終了時に n=3 ずつ測定し、値のばらつきを確認する。

組成…アセトニトリル : NAC または NAL 溶液(6.667  $\mu$  M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

RC-C : 各サンプルの NAC および NAL の減少率を算出するためのコントロール。被験物質溶液の代わりに被験物質を溶解している溶媒を添加した溶液について n=3 ずつ測定し、NAC および NAL の減少率の算出に用いる。被験物質によって溶媒が異なる場合はそれぞれの溶媒に対するコントロールを調製する。

組成…被験物質溶解溶媒\* : NAC または NAL 溶液(6.667  $\mu$  M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

\*陽性対照がアセトニトリル溶液のため、アセトニトリルを添加した RC-C は必ず調製する。

#### CC(Co-elution control 共溶出コントロール)

被験物質が NAC または NAL と共溶出していないか確認するためのコントロール。被験物質が 281nm で吸収があるかどうか、また溶出時間が NAC または NAL と同じではないか(共溶出する可能性はないか)を確認する。

組成…被験物質溶液(1mM) : NAC Buffer または NAL Buffer = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

#### ST(安定性試験 Stability test)

調製した 6.667  $\mu$  M NAC 溶液および NAL 溶液の安定性を確認するための試験。調製時(ST0)と調製 24 時間後(ST24)における NAC、NAL の残存率を測定する。

組成…NAC または NAL 溶液(6.667  $\mu$  M) : アセトニトリル = 150  $\mu$  L : 50  $\mu$  L

## Plate layout

- Stability test 0 hour

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A											
NAL	B											
NAC	C				ST(0)	ST(0)	ST(0)					
NAL	D											
NAC	E											
NAL	F				ST(0)	ST(0)	ST(0)					
NAC	G											
NAL	H											

- For five test chemicals and one solvent (Acetonitrile)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NAC	A	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1	std.5
NAL	B	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2	std.6
NAC	C	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3	std.7
NAL	D	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4	-
NAC	E	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1	std.5
NAL	F	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2	std.6
NAC	G	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3	std.7
NAL	H	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4	-

- For 17 test chemicals and one solvent (Acetonitrile)

First plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NAC	A	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
NAL	B	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
NAC	C	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
NAL	D	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	CC-11	CC-12
NAC	E	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
NAL	F	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
NAC	G	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
NAL	H	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	CC-11	CC-12

Second plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NAC	A	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1	std.5
NAL	B	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2	std.6
NAC	C	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3	std.7
NAL	D	CC-13	CC-14	CC-15	CC-16	CC-17	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4	-
NAC	E	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.1	std.5
NAL	F	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.2	std.6
NAC	G	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C	PC	std.3	std.7
NAL	H	CC-13	CC-14	CC-15	CC-16	CC-17	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4	-

- For 10 test chemicals and two solvent

### First plate

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	-	-
	B	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	-	-
	C	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	-	-
	D	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	-	-
NAL	E	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	-	-
	F	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	-	-
	G	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	-	-
	H	CC-1	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-10	-	-

### Second plate

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NAC	A	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C Solvent 1	RC-C Solvent 2	PC	-	-	-	-	std.1	std.5
	B	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C Solvent 1	RC-C Solvent 2	PC	-	-	-	-	std.2	std.6
	C	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C Solvent 1	RC-C Solvent 2	PC	-	-	-	-	std.3	std.7
	D	-	-	-	-	-	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4	-
NAL	E	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C Solvent 1	RC-C Solvent 2	PC	-	-	-	-	std.1	std.5
	F	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C Solvent 1	RC-C Solvent 2	PC	-	-	-	-	std.2	std.6
	G	RC-A	RC-B	RC-B	RC-C Solvent 1	RC-C Solvent 2	PC	-	-	-	-	std.3	std.7
	H	-	-	-	-	-	ST(24)	ST(24)	ST(24)	-	-	std.4	-

### Sample

Reaction solution of NAC and NAL with test chemical. Evaluate reactivity of NAC or NAL with the test chemical at a ratio of 1 : 50 for the NAC/NAL with the test chemical.

Composition···Test Chemical Solution (1mM) : NAC Solution / NAL Solution (6.667 $\mu$ M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

**PC (Positive Control)** Composition···1mM Phenylacetaldehyde Acetonitrile Solution : NAC Solution or NAL Solution (6.667 $\mu$ M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

**RC(Reference Control)**

#### RC-A

Control for verifying validity of the HPLC system. Reference Control A is used to verify concentration of NAC and NAL from each calibration curve after addition of acetonitrile rather than test chemical.

Composition···Acetonitrile : NAC Solution or NAL Solution (6.667 $\mu$ M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

#### RC-B

Control for verifying stability of reaction solution under analysis. Reference Control B is used to verify variability (CV) of each three NAC/NAL peak areas in the solution after addition of acetonitrile rather than test chemical at the start of analysis and at the end of analysis. Composition···Acetonitrile : NAC Solution or NAL Solution (6.667 $\mu$ M) = 50 $\mu$ L : 150 $\mu$ L

#### RC-C

Control for calculating NAC and NAL depletion of each test chemical solution. To calculate depletion of NAC and NAL, measure three Reference Controls C after addition of solvent instead of test chemical. Prepare reference Control C for all solvents used to dissolve the test chemicals.

Composition···Acetonitrile\* and solvent used for dissolution of test chemical : NAC Solution or NAL Solution (6.667 $\mu$ M) = 50 $\mu$ L:150 $\mu$ L

\*Be sure to prepare acetonitrile addition RC-C.

#### CC (Co-elution Control)

Control for verifying whether or not test chemicals co-elute with NAC or NAL. The Co-elution Control is used to verify absorbance at 281nm and whether retention time of test chemical is equal to that of NAC or NAL.

Composition···Test Chemical Solution (1mM) : NAC Buffer or NAL Buffer = 50  $\mu$ L : 150 $\mu$ L

#### ST (Stability Test)

Test for NAC solution and NAL solution stability. Stability test is tested to the residual ratio of NAC solution and NAL solution at preparation (ST0) and 24 hours after preparation (ST24).

Composition···NAC Solution or NAL Solution (6.667  $\mu$ M) : Acetonitrile= 150  $\mu$ L : 50  $\mu$ L