

GC/MSによる水中短鎖脂肪酸の簡易分析

中川 裕貴

ユーザーベネフィット

- ◆ 煩雑な誘導体化などの前処理を省略し水試料をGCMSに導入することが可能です。
- ◆ 特殊な消耗品を使用せずに、標準のセプタムやスプリット用インサートを使用できます。
- ◆ 新しい差動排気型ターボ分子ポンプが搭載されているため、水試料の測定を安定して行えます。

■はじめに

C6以下の脂肪酸は短鎖脂肪酸と呼ばれ雨水などの環境中に存在するだけでなく、飲むサプリメントや機能性食品として身近なものになっています。人体の腸内細菌により生成される脂肪酸の95%がC2-C4といわれており、これらの短鎖脂肪酸が腸内の環境を弱酸性にすることで悪玉菌の増殖を防いだり腸内の炎症を抑えたりします。唾液、呼気、尿中の短鎖脂肪酸もヒトの健康状態を把握するために分析されており、糞便なども水蒸気蒸留法によって前処理されたのち水中短鎖脂肪酸として分析されています¹⁾。

本報ではGCMS-QP2020 NXを用いて誘導体化や不活性処理、また特別な消耗品を使用することなく水中に存在する短鎖脂肪酸を測定した結果を報告します。

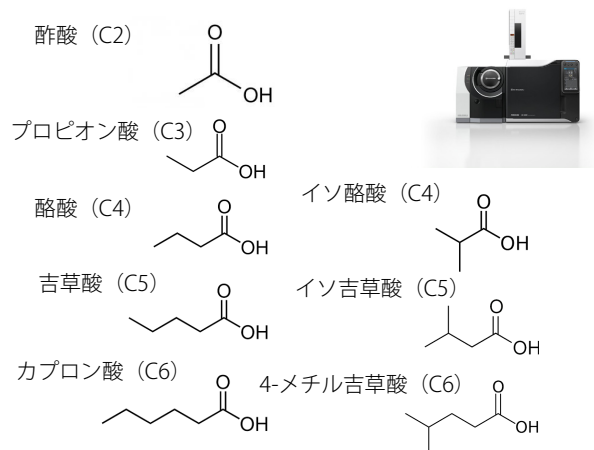


図1 分析対象化合物の構造一覧

■装置システムと分析条件

10 mMの揮発性有機酸mix標準液 (MilliporeSigma、P/N: CRM46975) を4、10、40、100 μMに純水で希釈しました。分析対象外のC1とC7も含まれていたため10 μMを数倍希釈してTICで分離を確認しました。

表1 装置システム

GC-MS	: GCMS-QP2020 NX
オートインジェクタ	: AOC-20i Plus
オートサンプラ	: AOC-20s Plus
分析カラム	: SH-Rtx™-WAX (60m × 0.25 mm I.D., df=0.5 μm) P/N: G3903-63010
ガラスインサート	: スプリット用不活性処理済みインサート ウール付

表2 GC-MSの分析条件

GC	
気化室温度	: 240 °C
注入モード	: スプリット
スプリット比	: 5
キャリアガス	: ヘリウム
制御モード	: 線速度一定 (34 cm/s)
カラムオープン温度	: 80 °C (2分) → (40 °C/分) → 200 °C → (25 °C/分) → 240 °C (2分) 合計 8.60分
パージ流量	: 3.0 mL/分
試料注入量	: 1 μL
MS	
イオン源温度	: 200 °C
インターフェイス温度	: 240 °C
測定モード	: SIM
測定イオン (m/z)	: 図3参照

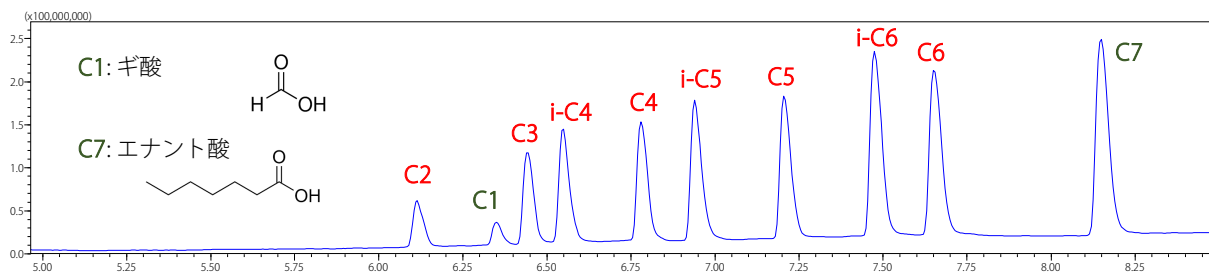


図2 TICクロマトグラム

■ 分析結果

図3に10 μM添加水を分析に供して得られたクロマトグラムを示します。

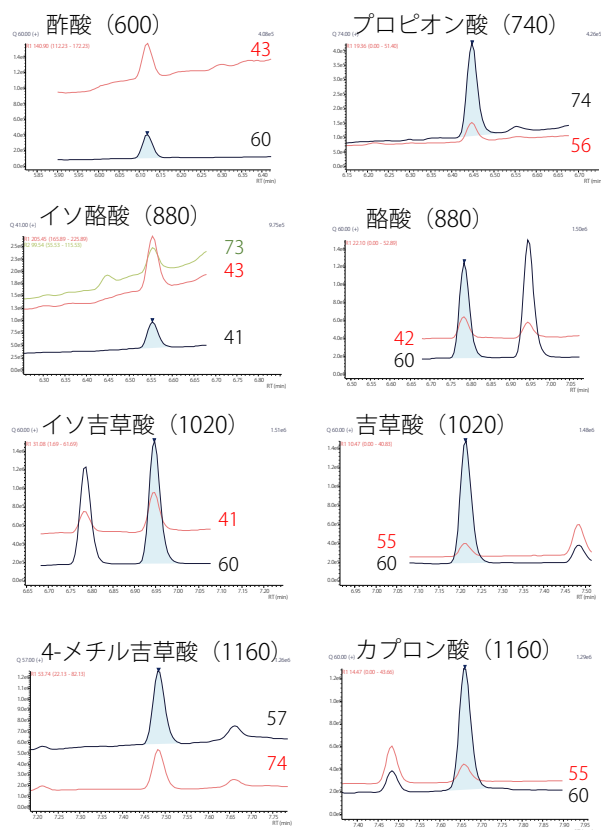


図3 10 μM添加水 (ng/mL変換値)

検量線は4、10、40、100 μMの4点を用いて作成しました(表3)。4 μMおよび100 μMをμg/mLに換算して示します。

表3 検量線の最小および最大濃度の濃度換算

化合物名	μg/mL変換	
	4 μM	100 μM
酢酸	0.24	6.0
プロピオン酸	0.30	7.4
イソ酪酸	0.35	8.8
酪酸	0.35	8.8
イソ吉草酸	0.41	10.2
吉草酸	0.41	10.2
4-メチル吉草酸	0.46	11.6
カブロン酸	0.46	11.6

GCMS-QPおよびGCMS-TQは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。Rtxは、Restek Corporationの米国およびその他の国における商標です。

再現性を確認するために7回連続で10 μM添加水を分析し面積値%RSDで示しました(表4)。全ての化合物において10%以下の結果が得られました。

表4 面積値再現性評価結果 (%RSD, n=7)

化合物名	% RSD
酢酸	6.0
プロピオン酸	4.4
イソ酪酸	3.9
酪酸	5.3
イソ吉草酸	5.1
吉草酸	6.9
4-メチル吉草酸	8.5
カブロン酸	9.2

表5 連続分析濃度

	酢酸	プロピオン酸	イソ酪酸
1	9.57	11.38	10.29
2	9.71	11.37	10.17
3	10.56	11.91	9.91
4	10.17	11.71	10.10
5	10.82	12.16	10.90
6	10.61	11.49	9.48
7	13.33	13.20	9.81

酢酸とプロピオン酸はBlank Subtraction法で定量しました(表5)。表4や5記載の値よりも精度が高い分析が必要な際には酢酸-d4などの安定同位体を内部標準として使用したり消耗品を変更する方法があります。また定量結果が高めにバイアスがかかる場合も同様に内部標準を使用することでより精度の高い結果が得られる可能性があります。

■ まとめ

水中短鎖脂肪酸はヒトの健康維持に重要な成分です。濃度が濃い場合は希釈、サンプルが固形物であったり濃縮が必要な場合は図4に示す水蒸気蒸留法などを用いることが過去に報告されています²⁾。

本報ではGCMS-QP2020 NXを用いてC2-C6の水中短鎖脂肪酸を誘導体化や内部標準を使用せず分析しました。カラム、シリッジ、ガラスインサートも標準的なものを使用しており、追加の不活性処理なども不要ですので取り組みやすい分析法となっています。

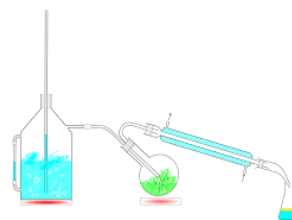


図4 水蒸気蒸留

- 1) J.B. Zijlstra, J.Beukema, B.G.Wolthers, B.M.Byrne, A.Groen and J.Dankert, Pretreatment methods prior to gas chromatographic analysis of volatile fatty acids from faecal samples, Volume 78, Issue 2, January 14th 1977, Pages 243-250, ISSN 0009-8981
- 2) D.C.Dyer, A new method of steam distillation for the determination of the volatile fatty acids, including a series of colorimetric qualitative reactions for their identification, J.Biol. Chem. 1917, 28:445-473