

Application News

No. M273

ガスクロマトグラフィー質量分析

GC-MS による生体試料中の短鎖脂肪酸の分析

短鎖脂肪酸は、酢酸など古くから私たちの生活にもなじみの深い化合物で、昨今では腸内細菌叢中の有用成分としても注目されていますが、一方で定量分析の難しい化合物としても知られてきました。一般的には LC-MS ではぎ酸や酢酸などは移動相に含まれているため、低濃度の定量はできません。また GC-MS では水酸基の誘導体化を行う必要がありますが、多くの誘導体化工程ではサンプル中に存在する水分を乾固させることが必要で、短鎖脂肪酸の多くはこのときに揮発してしまうことが問題となります。

そこで、水やメタノール中でもカルボン酸とアミンの縮合反応を進行させることができる縮合剤、4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride (DMT-MM)を用いて短鎖脂肪酸をアミンで誘導体化し、GC-MS で分析を行いました。また、当誘導体化を用いて分析した場合の分析システムの定量性についての評価を行いました。

T. Sakai

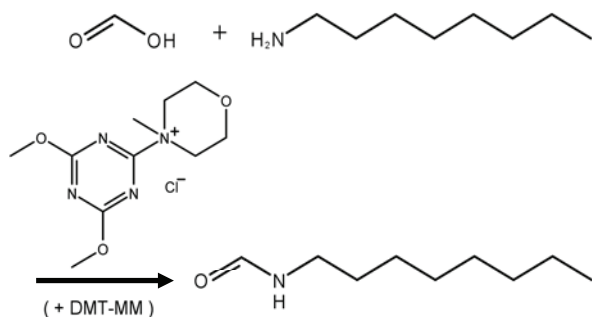


図1 ぎ酸と n-オクチルアミンの縮合反応

試料

ヒト標準血漿（コージンバイオ：正常ヒト血漿・プール EDTA-2Na (12271450)）を前処理し、標準添加法にて各脂肪酸の濃度を測定しました。

サンプル 50 μ L
↓
短鎖脂肪酸混合水溶液 10 μ L を、終濃度 0 - 100 μ mol/L となるよう添加
↓
酢酸-d4 水溶液を、終濃度 10 μ mol/L となるよう添加
↓
メタノール 250 μ L を添加
(除タンパク処理)
↓
30 秒間高速振盪した後、25 $^{\circ}$ C、16000 G で 3 分間遠心
↓
上清を 180 μ L 回収
↓
DMT-MM と n-オクチルアミンそれぞれ 100 mmol/L のメタノール溶液を 20 μ L 添加
↓
9 時間常温で静置の後、分析

図2 ヒト標準血漿の前処理

分析条件

分析条件は表 1 のとおりです。

表 1 測定条件

GC	
Column	: BPX-5 (30 m \times 0.25 mm I.D. 0.25 μ m)
Carrier Gas	: He
Injection Port Temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Carrier Gas Control	: Linear Velocity (39.0 cm/sec)
Injection Mode	: Split (30:1)
Oven Temp.	: 60 $^{\circ}$ C (2 min) \rightarrow 15 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 330 $^{\circ}$ C (5 min)
MS	
Ion Source Temp.	: 200 $^{\circ}$ C
Interface Temp.	: 280 $^{\circ}$ C
Measurement Mode	: MRM
Roop Time	: 0.3 sec

結果

分析の結果、各脂肪酸誘導体の検量線は、いずれも良好な直線性を示し、ヒト標準血漿中の各種短鎖脂肪酸の濃度を測定することができました(表2)。

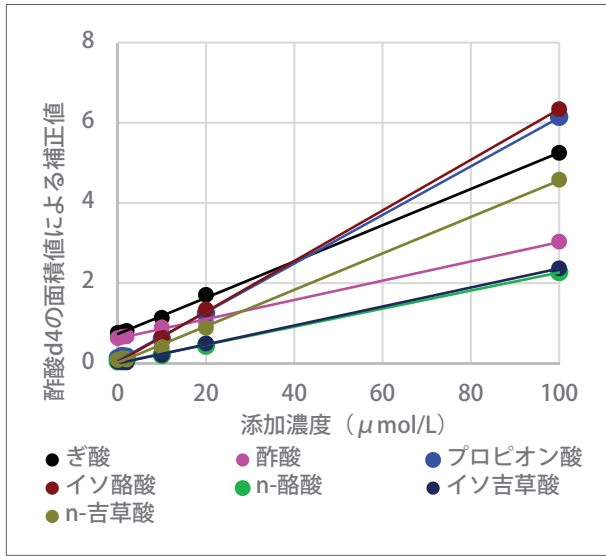


図3 各脂肪酸の検量線

表2 検量線の直線性と、ヒト標準血漿中濃度

化合物名	検量線の直線性 (R ² 値)	血漿中濃度 (μmol/L)
ぎ酸	0.9994	115.64
酢酸	0.9990	184.36
プロピオン酸	0.9996	8.02
イソ酪酸	0.9997	3.97
n-酪酸	0.9991	5.89
イソ吉草酸	0.9992	0.82
n-吉草酸	0.9991	3.25

結論

生体試料中のぎ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸の7種類の短鎖脂肪酸について、

- DMT-MMを用いてアミンで誘導体化する
- 酢酸 d4 を内部標準として用いて面積値を補正する

ことにより、GC-MS で定量的に分析することができました。

参考文献：

当内容につきましては、東レリサーチセンター The TRC News No. 115 (May 2012) に記載されている手法を元に、当社で実験・検証を行いました。

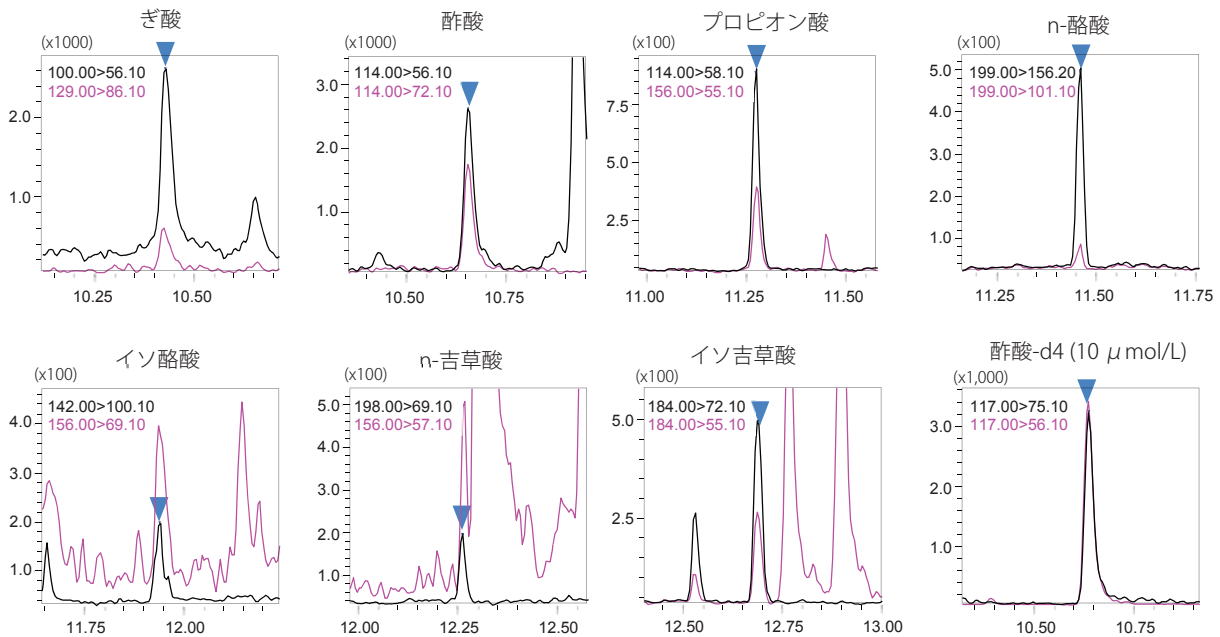


図4 1 μmol/Lスパイク試料のMRMクロマトグラム

注) 本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2017年3月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。