

Application News

No. C168

LC/MS

SPF および抗生剤投与マウス糞便試料中の短鎖脂肪酸・有機酸（3-NPH 誘導体）分析

ヒトの腸内には数百種類以上の腸内細菌が生息しています。その姿を顕微鏡で観察すると、まるで群生している「お花畑」のように見えることから、腸内フローラとも呼ばれています。腸内細菌は難消化性糖類を主なエネルギー源として、酢酸・プロピオン酸・酪酸といったいわゆる短鎖脂肪酸を産生しています。近年、この短鎖脂肪酸が体内に吸収されることで自己免疫疾患¹⁾や肥満・糖尿病をはじめとする生活習慣病と関連していることが報告されており、短鎖脂肪酸と疾患との関連を理解するために、また腸内細菌と宿主との代謝活動をより深く理解するためにも、短鎖脂肪酸の定量分析への要望が高まっています。

一般に短鎖脂肪酸は揮発性が高く、親水性も高いため、通常の逆相系での LC/MS 分析は困難です。また一般的な GC/MS 法で広く使われている誘導体化法では、試料を乾固させる必要があり、揮発成分を失う可能性があります。そこで水溶液中での誘導体化による分析が実施されており¹⁾、本稿ではカルボン酸を 3-ニトロフェニルヒドラジン (3-NPH) で誘導体化することにより、C2~C5 の短鎖脂肪酸 (6 成分) と乳酸、ピルビン酸、コハク酸などの有機酸 (16 成分) を合わせて分析しています。分析にあたっては LC/MS/MS メソッドパッケージ【短鎖脂肪酸】に登録されている MRM トランジションおよび分析メソッドを用いました (表 1)。

2-ニトロフェニルヒドラジンによる誘導体化法は以前から知られていますが、脂肪酸を主な分析対象としていました。本稿では 2-NPH ではなく、3-NPH を利用することにより、短鎖脂肪酸のみならず、有機酸も効率よく誘導体化を行い、短鎖脂肪酸・有機酸を合わせた分析に対応しています。

登録されている MRM トランジションは 3-NPH 誘導体をもとに最適化されています。また 3-NPH はケトン体とも反応するため、カルボニル基を有するピルビン酸、オキサロ酢酸などはカルボン酸だけではなく、カルボニル基も誘導体化した MRM トランジションとして設定されています。

ここでは生理的な腸内細菌叢の存在する SPF (Specific Pathogen Free) マウスと、抗生剤投与による腸内細菌叢が著しく減少したマウス糞便を試料として、短鎖脂肪酸あるいは有機酸分析を行いました。それぞれのマウスから糞便資料を回収、秤量した後、エタノールで懸濁してから遠心分離により上清を回収しました。この上清を 3-NPH による誘導体化に供しました。3-NPH 誘導体化にあたっては、図 1 に示すように触媒にピリジン、縮合剤にカルボジイミドを使用して、室温・30 分間にて反応させました。反応後、ギ酸を含むメタノール溶液にて希釈した後、LCMS™-8060 による一斉分析を行いました。

T. Nakanishi

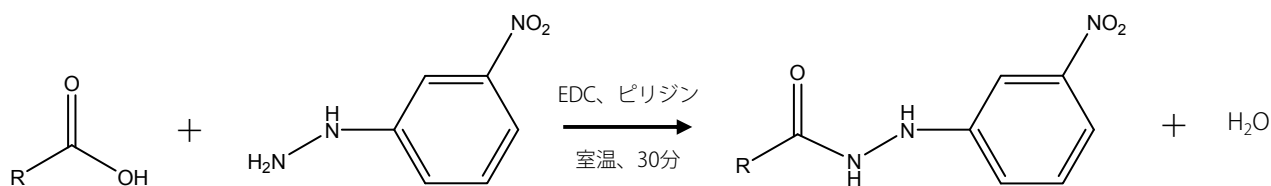


図 1 3-ニトロフェニルヒドラジン (3-NPH) による誘導体化反応

表 1 HPLC 条件と MS 条件

HPLC 条件

分析カラム	: Mastro C18 (2.1 mmI.D.×150 mmL、3 μm)
移動相 A	: 0.1% ギ酸-水
移動相 B	: アセトニトリル
タイムプログラム	: グラジエント
流速	: 0.35 mL/min.
注入量	: 3 μL
カラムオープン温度	: 40 °C

MS 条件 (LCMS-8060)

イオン化法	: ESI (Positive/Negative)
ネブライズガス流量	: 2.0 L/min.
ドライイングガス流量	: 10.0 L/min.
ヒーティングガス	: 10.0 L/min.
DL 温度	: 250 °C
ヒートブロック温度	: 400 °C
インターフェース温度	: 300 °C
CID ガス圧	: 270 kPa

図 2 は SPF マウスおよび抗生剤投与マウス糞便試料から抽出された短鎖脂肪酸および有機酸（3-NPH）の MRM クロマトグラムです。短鎖脂肪酸やコハク酸がそれぞれの糞便試料において特徴的な変動を示していることが確認できます。このことは抗生剤投与による腸内細菌の減少が、糞便中の短鎖脂肪酸の減少につながっていることを示唆しています。

次に標準品混合溶液の誘導体化を行い、検量線を作成して、それぞれの糞便試料抽出液の短鎖脂肪酸および有機酸濃度を決定しました。この値から糞便重量あたりにおける短鎖脂肪酸/有機酸量（nmol/mg）をグラフにプロットしたのが図 3 です（各個体に対して n=3 の繰り返し分析）。ここでは測定した 22 成分のうち、短鎖脂肪酸 6 成分と代表的な有機酸 4 成分の定量結果を示しています。赤色のグラフで示した短鎖脂肪酸の結果からは、SPF マウスに比べて抗生剤投与マウスにおける短鎖脂肪酸量（nmol/mg）が大きく減少していることが確認できます。

一方、SPF マウスにおける直鎖短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸、酪酸、吉草酸）と分岐短鎖脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸）では、個体において産生比が異なることが確認できます。このことは各個体における腸内フローラの違いによる影響も考えられます。

また青色のグラフで示した有機酸では、コハク酸に関して抗生剤投与マウスにおいて顕著に高い値が確認されました。短鎖脂肪酸および有機酸は腸内細菌の活動と深く関係しており、抗生剤投与や無菌飼育のように腸内細菌叢が減少/存在しない条件では、非常に特徴的な短鎖脂肪酸・有機酸量の変動が見られます。

このように 3-NPH 誘導体を分析対象とする LC/MS/MS メソッドパッケージ【短鎖脂肪酸】を用いることで、一般的な逆相 LC/MS 分析にて、短鎖脂肪酸・有機酸の定量分析が行えます。

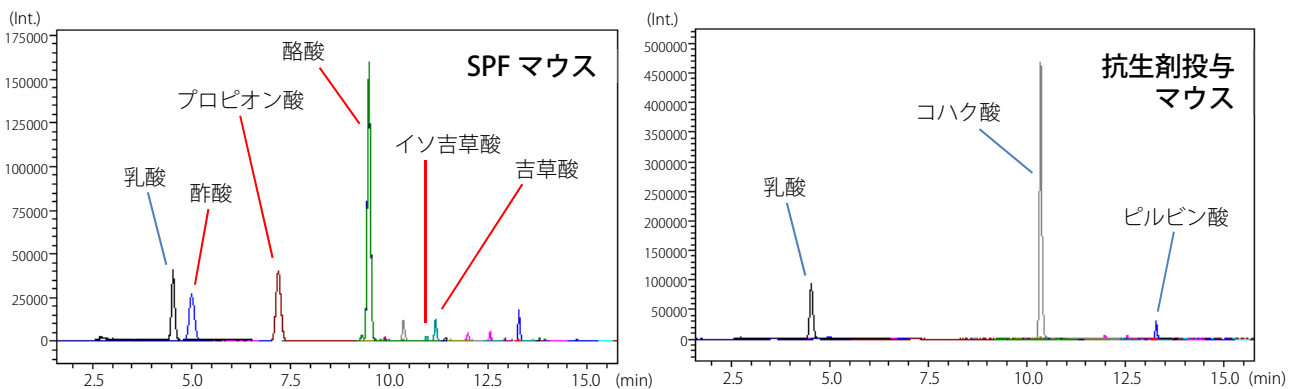


図 2 SPF マウスと抗生剤投与マウス糞便試料における短鎖脂肪酸および有機酸（3-NPH）の MRM クロマトグラム

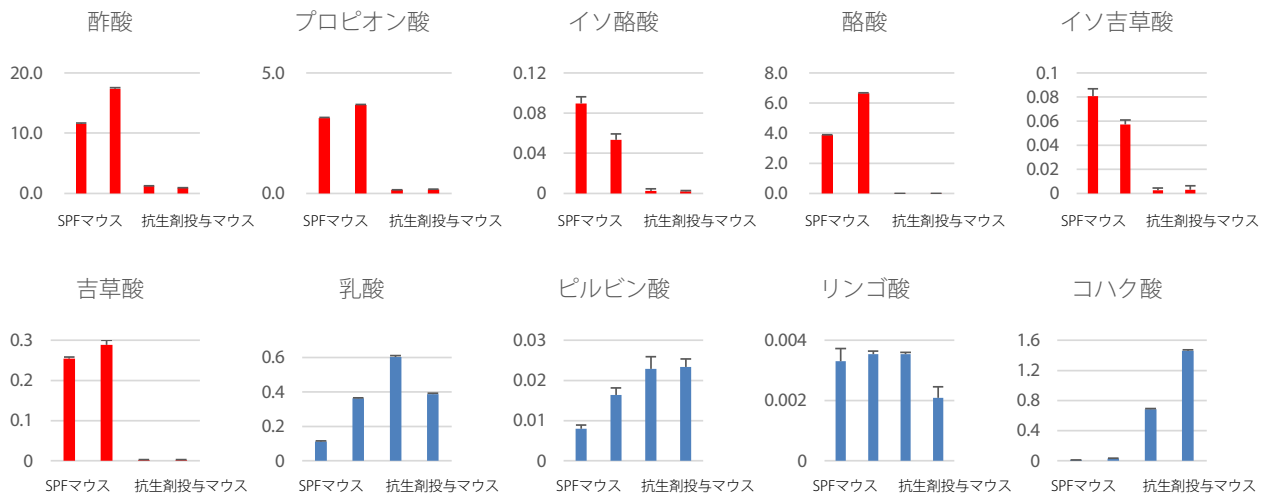


図 3 SPF マウスおよび抗生剤投与マウス糞便試料中の短鎖脂肪酸（6 成分）と有機酸（4 成分）の糞便重量あたりの比較（縦軸：nmol/mg）

* 本稿で紹介しました分析試料は、慶應義塾大学医学部医化学教室の杉浦悠毅先生、末松誠先生よりご提供いただきました。

参考文献

- 1) *Gut Microbes*, 5(3):333-9. 2014. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived *Clostridia*. Narushima S, Sugiura Y, Oshima K, Atarashi K, Hattori M, Suematsu M, Honda K.

LCMS は、株式会社 島津製作所の商標です。

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：2018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。