

## Application News

# シングル四重極質量分析計を用いた糞便中の短鎖脂肪酸・有機酸の分析

服部 考成、柴山 泰子

### ユーザーベネフィット

- ◆ シングル四重極LC-MSで、糞便に含まれる短鎖脂肪酸・有機酸を高感度に分析できます。
- ◆ マルチオミクス解析パッケージを用いることで、容易に多変量解析まで行うことができ、サンプルに特徴的に含まれる成分を簡単に見つけることができます。

### はじめに

ヒトの腸内には、約1000種類、およそ100兆個もの腸内細菌が生息すると言われています。近年、これら腸内細菌が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになりつつあり、腸内細菌叢に関する研究が注目されています。医学分野では、腸内細菌叢と大腸がん等疾患との関係、薬効や免疫系へ及ぼす影響等、また食品分野では機能性食品に含まれる乳酸菌の保健効果の検証等が行われています。腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸をはじめとした代謝物は、宿主へ何らかの影響を与えると考えられ、そのため、腸内細菌研究において代謝物を分析することは重要です。

本アプリケーションニュースでは、シングル四重極LC-MSを用い、糞便に含まれる短鎖脂肪酸・有機酸を分析した事例をご紹介します。アミノ酸や核酸系の代謝物も含む一斉分析法 (Application News No.01-00600-JP) と組み合わせることで網羅的な分析が可能となりますので、合わせてご活用下さい。

### サンプル

試料であるサル糞便の詳細を表1に、採取地点の概略図を図1に示します。A地点、B地点、C地点から、計5頭分を採取しました。採取現場で凍結し、分析まで-80℃で冷凍保管しました。詳細は、土田らの参考文献をご参照下さい。

表1 試料の詳細

サンプル名	採取場所	サル	凍結処理までの経過
S1	A地点	不明	半日~1日経過
S2	B地点	4歳 オス	排泄直後
S3	B地点	2歳 オス	排泄直後
S4	C地点	大人 メス	排泄直後
S5	C地点	大人 メス	排泄直後

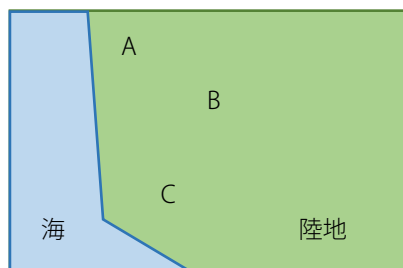


図1 採取地点の概略図

### 前処理

図2の手順で糞便から成分を抽出し、その後、ODSカラムへの保持とMS検出における感度向上を目的に短鎖脂肪酸・有機酸を誘導体化しました。誘導体化では、抽出液に3-ニトロフェニルヒドラジン (誘導体化試薬)、ピリジン (触媒)、1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (縮合剤)、2-エチル酪酸 (内部標準物質)

を添加し、室温で30分間反応させました。反応後、ギ酸を含むメタノール水溶液で5倍希釈しました。

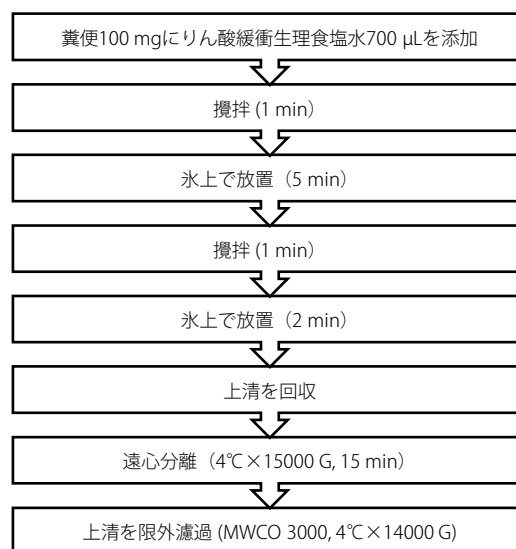


図2 糞便の前処理方法 (抽出)

### 装置、分析条件

分析には、図3に示すNexera™シリーズとLCMS-2050を組み合わせたシステムを使用しました。LCMS-2050は、コンパクトでありながら、使いやすさや性能面にも秀でたシングル四重極質量分析計です。ESI法とAPCI法、両方の長を有するイオン化である加熱型DUIS™を搭載し、質量範囲は  $m/z$  2-2000まで広い質量範囲を誇ります。そのため、短鎖脂肪酸・有機酸以外の代謝物の一斉分析にも有用です。



図3 Nexera™, LCMS™-2050システム

表2にHPLCおよびMSの分析条件を示します。LC/MS/MSメソッドパッケージ短鎖脂肪酸の分析条件を参考に、シングル四重極LC-MS用の分析系を構築しました。腸内細菌研究で重要とされる酢酸、プロピオン酸、酪酸等のC2~C5の短鎖脂肪酸（6成分）と乳酸、ピルビン酸、コハク酸等の中心代謝経路に関連した有機酸（16成分）を対象成分としました。

表2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera XR)	
Column	: Mastro 2 C18 (2.0 mmI.D. x 150 mmL, 3.0 μm)
Mobile phases	: A) 0.1% Formic acid in water B) Acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.35 mL/min
Injection volume	: 3 μL
[MS conditions] (LCMS-2050)	
Ionization	: ESI/APCI (DUIS), Positive and Negative mode
Mode	: SIM (23 events)
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 5.0 L/min
Desolvation temp.	: 500°C
DL temp.	: 200°C

## ■ 分析結果

S1-S5の混合抽出液を誘導体化し、その溶液を6回繰り返し替えし分析し、本法の再現性を確認しました。表3に示すように、20成分の短鎖脂肪酸・有機酸が検出され、保持時間、ピーク面積ともに良好な結果が得られました。

表3 再現性

Compound	%RSD, n=6	
	Retention time	Peak area
Lactic acid	0.084	0.8
beta-Hydroxybutyric acid	0.139	1.4
Acetic acid	0.074	0.6
Propionic acid	0.101	0.3
Isobutyric acid	0.053	0.9
Butyric acid	0.058	1.0
2-Hydroxyglutaric acid	0.029	4.8
Succinic acid	0.036	2.4
Isovaleric acid	0.024	0.8
Fumaric acid	0.030	2.8
Valeric acid	0.021	1.4
Maleic acid	0.012	2.4
2-Ethylbutyric acid	0.013	1.4
Glyoxylic acid	N.D.	N.D.
Pyruvic acid	0.006	1.9
2-Oxobutyric acid	N.D.	N.D.
alpha-Ketoglutaric acid	0.015	4.5
Glycolic acid	0.122	1.5
Malic acid	0.046	0.9
Malonic acid	0.020	2.8
Isocitric acid	N.D.	N.D.
Citric acid	0.012	1.9
Oxaloacetic acid	0.008	3.7

S1-S5のサル糞便を分析した結果、21成分の短鎖脂肪酸・有機酸が検出されました。検出された短鎖脂肪酸・有機酸の一覧を表4に示します。◎の成分は、同じサル糞便をLCで分析した際（Application News No. L555）に検出されなかった短鎖脂肪酸・有機酸です。LCでは感度が不足する成分も本法では検出できました。S3を分析した際に得られたマスクロマトグラムの一例を図4に示します。腸内細菌研究で重要とされる酢酸、プロピオン酸、酪酸も感度良く検出できました。また、イソ酪酸・酪酸、イソ吉草酸・吉草酸のような異性体もLCで十分に分離させているため、それぞれ個別に分析できます。

表4 検出成分

Compound	S1	S2	S3	S4	S5
Lactic acid	◎	◎	◎	◎	◎
beta-Hydroxybutyric acid	◎	◎	◎	◎	◎
Acetic acid	○	○	○	○	○
Propionic acid	◎	○	○	○	○
Isobutyric acid	◎	◎	◎	◎	◎
Butyric acid	◎	○	○	○	○
2-Hydroxyglutaric acid	◎	◎	◎	◎	◎
Succinic acid	◎	◎	◎	◎	◎
Isovaleric acid	◎	○	○	◎	◎
Fumaric acid	◎	◎	◎	◎	◎
Valeric acid	◎	○	○	○	○
Maleic acid	◎	◎	◎	◎	◎
Glyoxylic acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Pyruvic acid	◎	◎	◎	◎	◎
2-Oxobutyric acid	◎	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
alpha-Ketoglutaric acid	◎	◎	◎	◎	◎
Glycolic acid	◎	◎	◎	◎	◎
Malic acid	◎	◎	◎	◎	◎
Malonic acid	◎	◎	◎	◎	◎
Isocitric acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	◎
Citric acid	◎	◎	◎	◎	◎
Oxaloacetic acid	◎	◎	◎	◎	◎

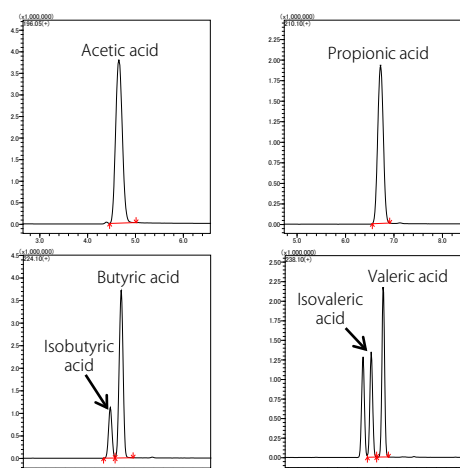


図4 マスクロマトグラム (S3)

内部標準物質に対する各成分のピーク面積比を用いて、マルチオミクス解析パッケージで主成分分析と階層クラスタリング解析を行いました。それぞれの結果を図5, 6に示します。S1のサル糞便は他のサル糞便と大きく異なり、ピルビン酸、乳酸、2-オキソ酪酸、α-ケトグルタル酸が多く、酢酸、プロピオン酸、酪酸等が少ない傾向でした。採取場所が同じ（群れが同じ）S2とS3は、摂食物が同じ影響もあるのか、類似した傾向を示しました。一方、S4とS5は同じ場所で採取したサル糞便ですが、第二主成分（PC2）軸で傾向が異なり、S5にはクエン酸、イソクエン酸等の有機酸が多く含まれました。糞便採取前の摂食物が異なるのか、同じでもサルの個体（腸内細菌叢）の違いを反映しているのかもしれない。

## ■ まとめ

シングル四重極LC-MSを用いた糞便中の短鎖脂肪酸・有機酸の分析事例をご紹介しました。糞便中の短鎖脂肪酸や有機酸はLCで分析されることが多いですが、LC-MSで分析することで、LCでは検出が難しい微量な短鎖脂肪酸・有機酸も感度良く分析できます。シングル四重極LC-MSは安価で扱いやすいため、質量分析の経験がない方をはじめ、より多くの方に使っていただきやすい装置です。シングル四重極LC-MSによる糞便中の短鎖脂肪酸・有機酸の分析が広まることで、腸内細菌研究のますますの発展が期待されます。

本アプリケーションニュース作成にあたり、サル糞便のご提供並びにご指導を中部大学 応用生物学部の牛田一成教授にご協力頂きました。心より感謝申し上げます。

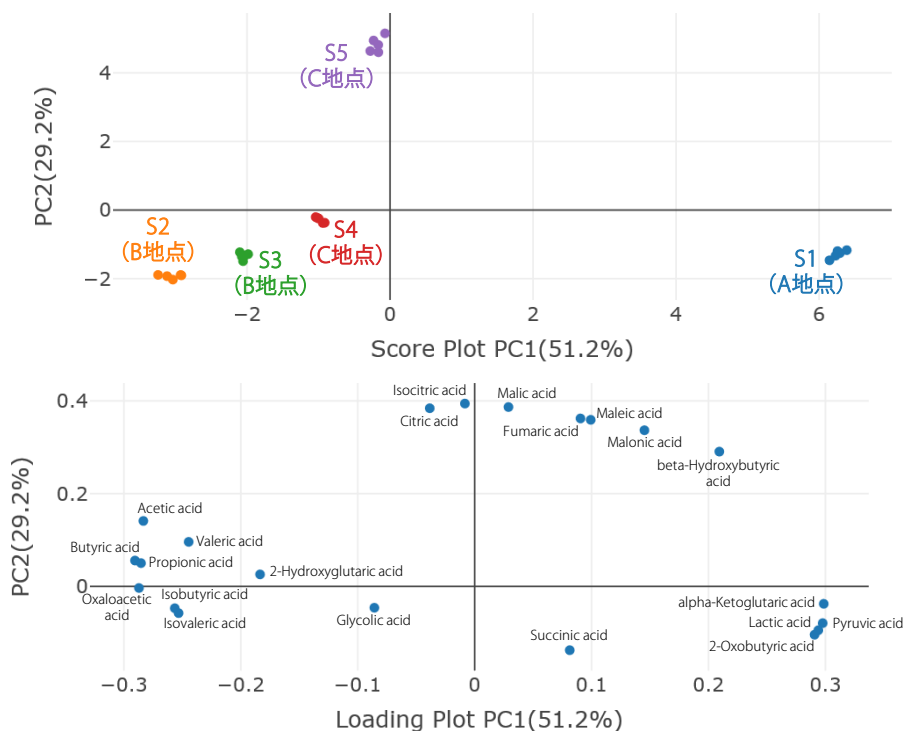


図5 主成分分析の結果

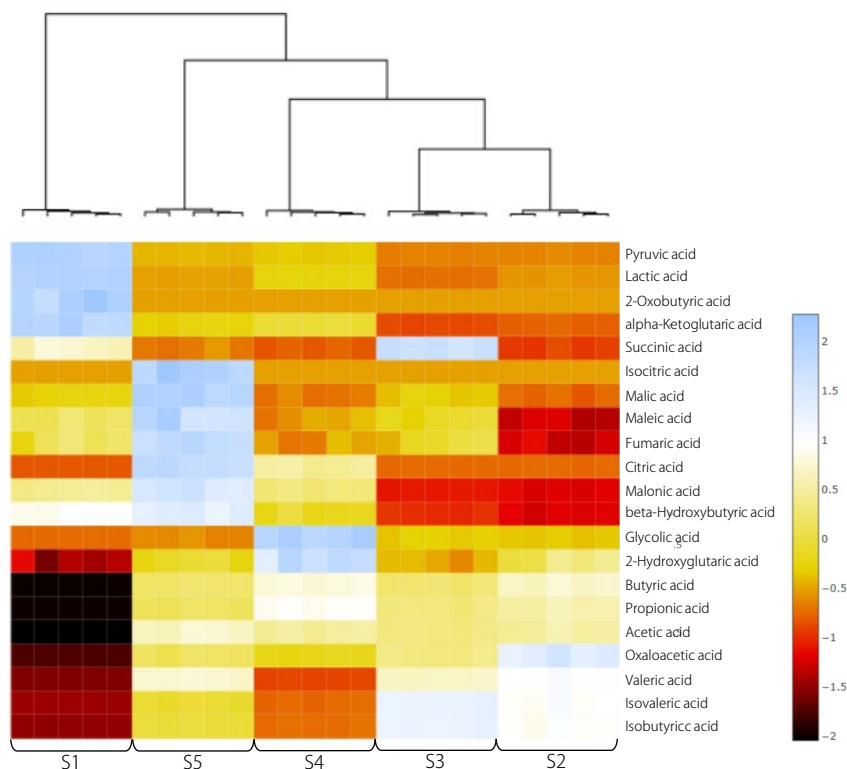


図6 階層クラスタリング解析の結果

<参考文献>

- 1) S. Tsuchida, T. Hattori, A. Sawada, K. Ogata, J. Watanabe, K. Ushida: Fecal metabolite analysis of Japanese macaques in Yakushima by LC-MS/MS and LC-QTOF-MS, J Vet Med Sci, 83 (6) 1012–1015 (2021).

<関連アプリケーション>

1. 有機酸高速分析カラム Shim-pack™Fast-OAIによる腸内細菌叢研究の生産性向上 [Application News No. L555](#)
2. シングル四重極質量分析計を用いた糞便中の親水性代謝物の一斉分析 [Application News No. 01-00600-JP](#)

LCMS、Nexera、DUIは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00601-JP 初版発行：2023年 10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。  
 本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

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。  
 本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。  
 本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。