

自動サンプル前処理を用いた GC/MS による 哺乳類糞便中の短鎖脂肪酸の分析

著者

Takeshi Furuhashi and
Genki Ishihara
Anicom Specialty Medical
Institute Inc., 8-17-1, Nishi
Shinjuku, Shinjuku-ku,
Tokyo

Kuniyo Sugitate,
Agilent Technologies
Japan

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 5977B GC/MSD と Agilent 7890B GC および Agilent 7693A オートサンプラで構成されるシステムを使用した哺乳類糞便中の短鎖脂肪酸 (SCFA) のプロファイリングメソッドを紹介し、糞便中の SCFA は、プロファイリングや定量が重要であるにもかかわらず、揮発性および親水性が高いことから、その分析には技術的困難が伴います。今回の研究では、サンプルを乾燥することなく、水溶液中でクロロギ酸イソブチル/イソブタノールによる誘導体化を行いました。このプロトコルを用いて C1~C7 の酸 (ギ酸からヘプタン酸) の分析メソッドを開発し、哺乳類糞便中の 7 種類以上の SCFA を GC/MS で正確に同定、定量することができました。

はじめに

腸内細菌の研究では、短鎖脂肪酸 (SCFA) のプロファイリングが大きなテーマとなってきました^{1,2}。ただし、SCFA は高い揮発性と親水性を持つことから、分析が困難な状況にあります。GC/MS は揮発性化合物の検出に有効な手法です。しかしながら短鎖脂肪酸のような高極性種を GC/MS で分析するためには、誘導体化が必要になります。

誘導体化には、シリル化 (トリメチルシリル (TMS))³、アルキル化⁴、およびエステル化⁵ などの手法があります。多くの誘導体化プロトコルでは非水性条件が要求されるため、誘導体化反応前に生体サンプルを脱水する必要があります。ただし、この乾燥プロセスにより SCFA に悪影響がおよび、結果の正確さが損なわれる可能性があります。クロロギ酸プロピル/プロパノールによるエステル化を用いて水性条件下で誘導体化を行った研究も発表されていますが⁶、この誘導体化試薬をギ酸からクロマトグラフィー分離できず、ギ酸を正確に同定および検出することができませんでした。

そこで、高感度の GC/MS 分析により 14 種類の SCFA を適切に分離、同定、検出可能な、クロロギ酸イソブチル/イソブタノールを用いた改良型の GC/MS 誘導体化プロトコルを開発しました。このアプリケーションノートでは、GC/MS を使用した、哺乳類糞便サンプルの SCFA プロファイリングプラットフォームを紹介いたします。

実験方法

脂質は誘導体化プロセスに影響を与える可能性があることから、特に糞便など脂質を多く含む生体サンプルでは、サンプル前処理が重要になります。つまり、誘導体化プロセスの前に、生体サンプル中の多様な脂溶性化合物を相分離によって除去することが必要です。これにより、汚染物質による誘導体化の妨害を防ぎ、GC クロマトグラムから汚染物質のピークを排除できます。

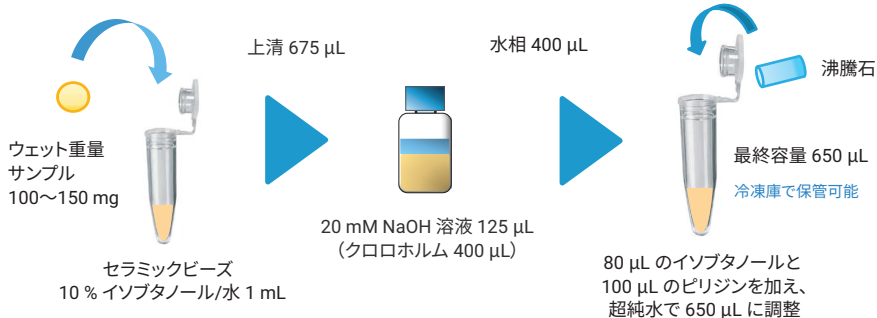
サンプル前処理

採取したばかりの糞便サンプル (ヒトおよびネコ、ウェット重量 100~150 mg) をセラミックビーズ入り 2 mL スクリューキャップチューブ (KT03961-1、Bertin Technologies 社、フランス) に入れました。サンプルに 1 mL の 10% イソブタノールを加えた後、ホモジナイザ (Precellys Evolution、Bertin Technologies 社、フランス) を使用して、6,000 rpm、20 秒間の均質化サイクルを 30 秒間の間隔を挟んで 2 回繰り返しました。その後、各サンプルを 21,000 g で 5 分間遠心分離し、675 μ L の上澄みを新しいチューブに移しました。次に、回収率をモニタリングするために、20 μ g の 3-メチルペンタン酸を上澄みに加えました。さらに、125 μ L の 20 mM NaOH 溶液と 400 μ L のクロロホルム (注) をチューブに加え、サンプルをボルテックスミキサーで攪拌した後、21,000 g で 2 分間遠心分離しました。400 μ L の上澄み水性相を新しいチューブに移し、80 μ L のイソブタノールと 100 μ L のピリジンを加えた後、超純水で総量を 650 μ L に調整しました。また、発泡を最小限に抑えるために、チューブに沸騰石 1 個を入れました。サンプルは、このステップ後に冷凍庫で保管できます。

で 2 回繰り返しました。その後、各サンプルを 21,000 g で 5 分間遠心分離し、675 μ L の上澄みを新しいチューブに移しました。次に、回収率をモニタリングするために、20 μ g の 3-メチルペンタン酸を上澄みに加えました。さらに、125 μ L の 20 mM NaOH 溶液と 400 μ L のクロロホルム (注) をチューブに加え、サンプルをボルテックスミキサーで攪拌した後、21,000 g で 2 分間遠心分離しました。400 μ L の上澄み水性相を新しいチューブに移し、80 μ L のイソブタノールと 100 μ L のピリジンを加えた後、超純水で総量を 650 μ L に調整しました。また、発泡を最小限に抑えるために、チューブに沸騰石 1 個を入れました。サンプルは、このステップ後に冷凍庫で保管できます。

(注) クロロホルムは脱脂の目的で入れます。C4 程度までの短鎖脂肪酸が対象の場合に有効です。C6 以上の短鎖脂肪酸は回収率が落ちるため、クロロホルム洗浄は省いてください。

サンプル前処理



誘導体化



図 1. サンプル前処理および誘導体化プロセス

標準溶液の調製

目的濃度の SCFA 標準試料と、125 μL の 20 mM NaOH、100 μL のピリジン、および 80 μL のイソブタノールをチューブ内で混合しました。水を加えて最終的な体積を 650 μL に調整しました。発泡を防ぐため、チューブに沸騰石 1 個を入れました。

誘導体化プロセス

標準溶液およびサンプルに対して同じ誘導体化手順を実行しました。650 μL のサンプルまたは標準溶液に 50 μL のクロロギ酸イソブチルを注意深く加えました。反応により発生したガスを逃すために、チューブのふたを 1 分間開けたままにし、その後ふたを開けてサンプルをボルテックスミキサーで攪拌しました。次に、150 μL のヘキサンを加え、チューブを 21,000 g で 2 分間遠心分離しました。上澄みのヘキサン-イソブタノール相をオートサンプリャルに移し、GC/MSD で分析しました。CO₂ ガスが発生するため、バイアルにはスリット入りスクリュウキャップ (p/n 5185-5824) を使用することをおすすめします。

図 2 に、誘導体化プロセスの反応メカニズムを示します。

装置構成

SCFA を定量するための GC/MS 測定には、Agilent 5977B GC/MSD シングル四重極質量分析計と Agilent 7890B GC および Agilent 7693A オートサンプリャルで構成されるシステムを使用しました。表 1 に、GC/MS 分析条件を示します。

結果と考察

クロマトグラフィーによる分離

表 2 に、モニタリングした 14 種類の SCFA と、それぞれのリテンションタイムおよび定量イオンを示します。

図 3 および図 4 に示すように、改良型の誘導体化プロセスにより、溶出の早いギ酸や酢酸などの SCFA を誘導体化試薬から完全に分離できました。

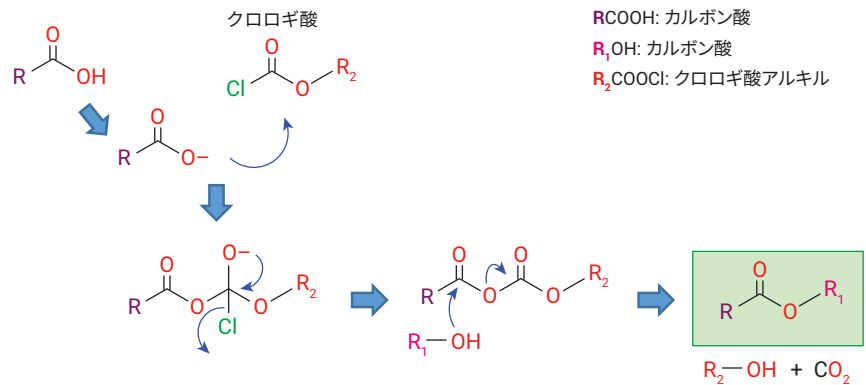


図 2. 誘導体化の反応メカニズム

表 1. GC/MS 分析メソッド

パラメータ	設定値
GC/MS システム	Agilent 7890B GC/5977 MSD
カラム	VF-5ms, 30 m \times 0.25 mm, 0.5 μm (p/n CP8945)
カラム流量	1.0 mL/min
ライナ	ウルトライナーートライナ、汎用、低圧力損失、ウール (p/n 5190-2295)
注入モード	スプリット (50:1) 1 μL 注入
注入口温度	260 $^{\circ}\text{C}$
オープン温度	40 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間、10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 310 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温
トランスファーライン温度	280 $^{\circ}\text{C}$
MS モード	スキャン
スキャン範囲	m/z 30 ~ 350
イオン源温度	250 $^{\circ}\text{C}$
四重極温度	150 $^{\circ}\text{C}$

表 2. 成分とそのリテンションタイムおよび定量イオンの一覧

No.	化合物	RT (分)	
1	ギ酸	4.28	56
2	酢酸	7.30	56
3	プロピオン酸	9.83	57
4	イン酪酸	10.88	71
5	酪酸	11.75	71
6	2-メチル酪酸	12.67	85
7	イソ吉草酸	12.75	85
8	ペンタン酸 (吉草酸)	13.59	85
9	3-メチルペンタン酸 (IS)	14.26	99
10	イソカプロン酸	14.58	99
11	ヘキサン酸 (カプロン酸)	14.67	99
12	2-メチルヘキサン酸	15.23	113
13	4-メチルヘキサン酸	15.70	113
14	ヘプタン酸	16.33	113

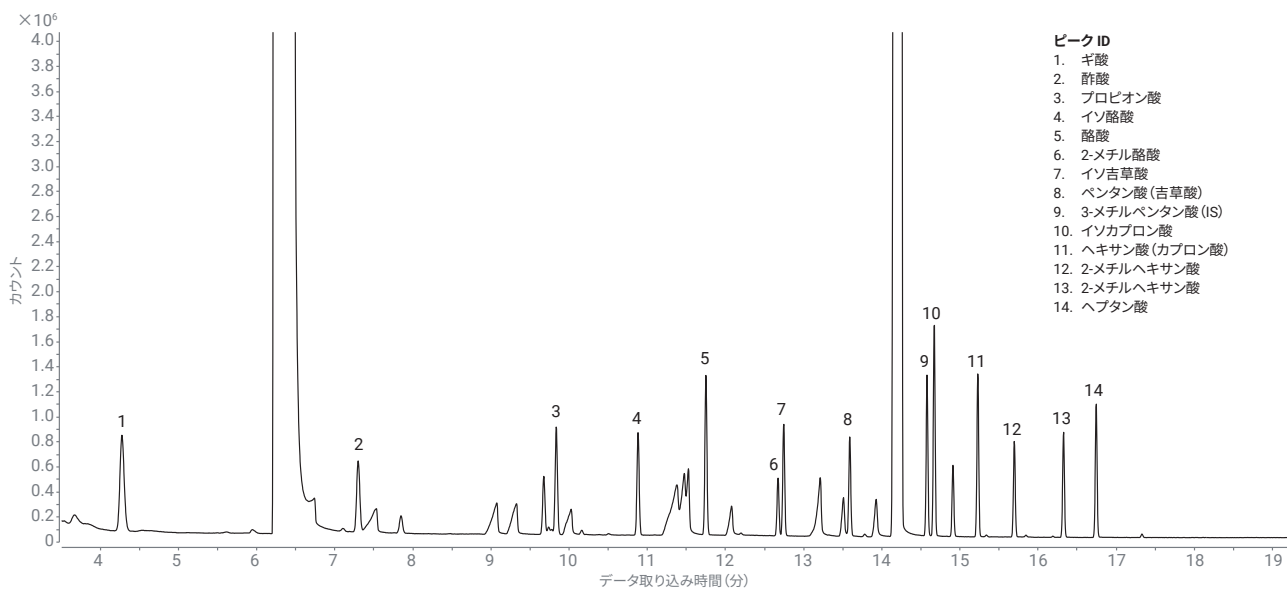


図 3. SCFAs のトータルイオンカレントクロマトグラム (TIC) (クロロホルム洗浄なしのクロマトグラム例)

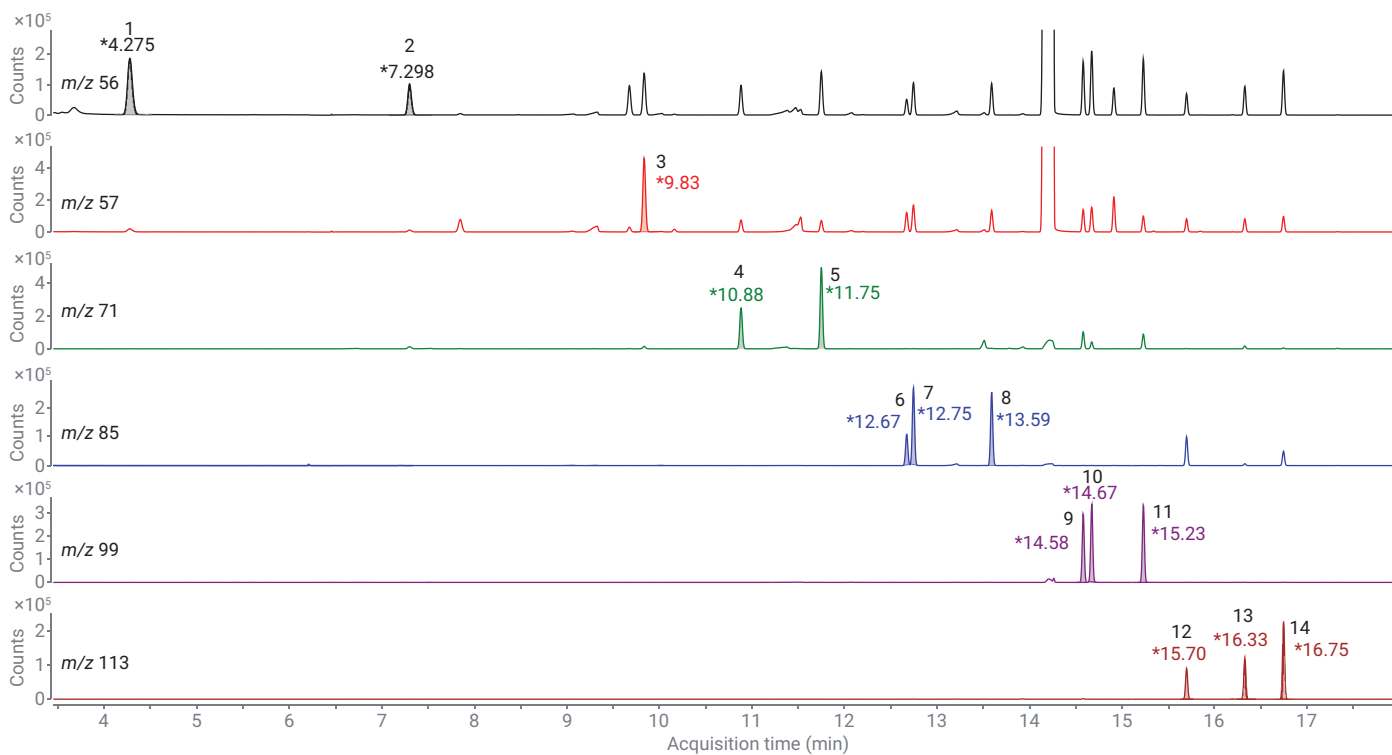


図 4. 定量イオンの抽出イオンクロマトグラム (EIC) (クロロホルム洗浄なしのクロマトグラム例)

約 6.5 分および 14.3 分に誘導体化試薬の大きなピークが現れていますが、これらのピークによって SCFA の正確な同定および定量は妨げられていません。

定量性能

検量線は、哺乳類糞便に含まれる濃度が収まるように作成しました。生体サンプルでは、C1～C4 の SCFA が、より炭素数の多い SCFA よりもはるかに高濃度で検出されます。これを踏まえ、溶出の早い成分の検量線の濃度範囲を、溶出の遅い化合物よりも高い濃度から作成しました。すべての範囲で優れた直線性が得られました。

サンプルの分析結果

このメソッドを使用して、哺乳動物の糞便サンプルをテストしました。テストしたすべてのサンプルから共通して、酢酸 (C2)、プロピオン酸 (C3)、および酪酸 (C4) が検出されました。また、酢酸は、どの糞便からも高濃度で検出されました。

クロロギ酸を用いたこのイソブチル化プロトコルでは、糞便を含むさまざまな生体サンプルの SCFA プロファイリングを迅速に行えます。この改良型プロトコルにより、腸内細菌の発酵プロセスの研究が促進されます。

結論

クロロギ酸によるエステル化は、水溶液中で行うことができます。このプロトコルは、非水性溶液 (BF₃ や H₂SO₄ のメタノール溶液など) でのエステル化⁵ と比較して、操作が容易で実用的です。また、今回の研究で用いたアプローチはオートサンプラで行えるため、誘導体化ステップの自動化が可能です。このプロトコルは、ルーチン測定への適用も期待できます。

※イソブチルエステル化を用いた論文^{7,8}が発表されていますので併せてご参照ください。

表 3. 検量線の範囲及び決定係数 (R²)
(クロロホルム洗浄なしの結果)

No.	化合物	範囲 (カラム中)	R ²
1	ギ酸	40 pg ~ 1 ng	0.9963
2	酢酸	20 pg ~ 1 ng	0.9979
3	プロピオン酸	20 pg ~ 1 ng	0.9992
4	イソ酪酸	10 pg ~ 1 ng	0.9993
5	酪酸	10 pg ~ 1 ng	0.9993
6	2-メチル酪酸	10 pg ~ 1 ng	0.9987
7	イソ吉草酸	10 pg ~ 1 ng	0.9985
8	ペンタン酸 (吉草酸)	10 pg ~ 1 ng	0.9995
9	3-メチルペンタン酸 (IS)	-	-
10	イソカプロン酸	4 pg ~ 1 ng	0.9995
11	ヘキサン酸 (カプロン酸)	4 pg ~ 1 ng	0.9996
12	2-メチルヘキサン酸	4 pg ~ 1 ng	0.9987
13	4-メチルヘキサン酸	4 pg ~ 1 ng	0.9990
14	ヘプタン酸	4 pg ~ 1 ng	0.9996

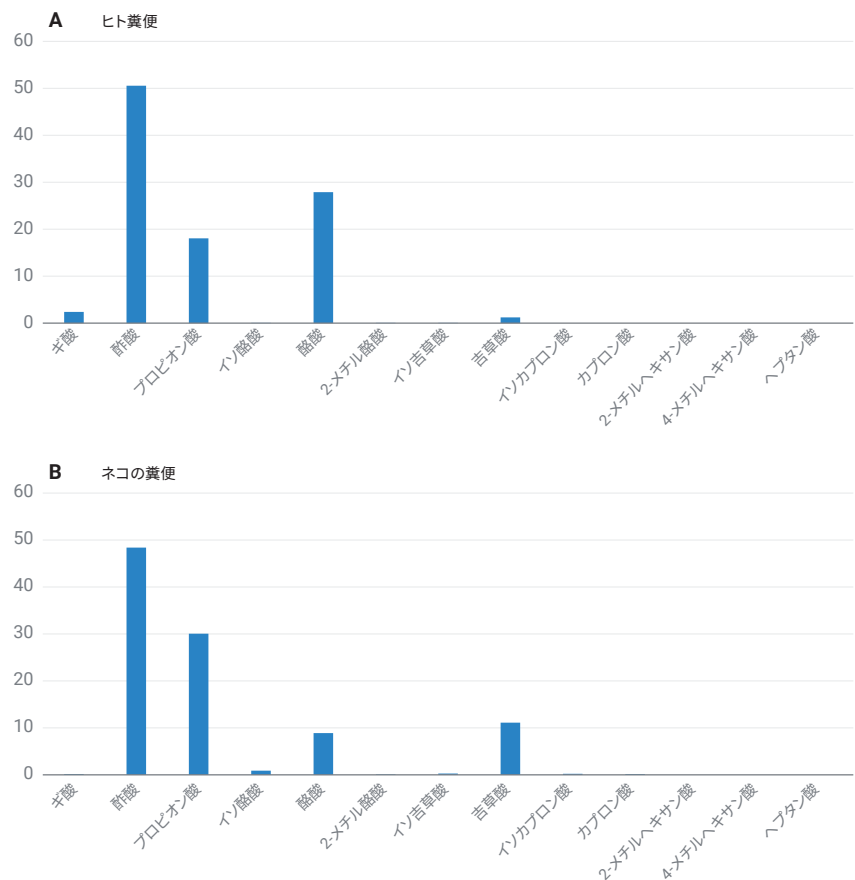


図 5. 哺乳類サンプルの分析結果 (クロロホルム洗浄を入れて前処理を行った結果)

参考文献

1. Matsumoto, M.; *et al.* Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific Reports* **2012**, 2(233), 1-10.
2. Primec, M.; Mičetić-Turk, D.; Langerholc, T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Analytical Biochemistry* **2017**, 526, 9-21.
3. Olsen, M. A.; Mathiesen, S. D. Production rates of volatile fatty acids in the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) forestomach. *British Journal of Nutrition* **1996**, 75, 21-31.
4. Pons, A.; *et al.* Sequential GC/MS Analysis of Sialic Acids, Monosaccharides, and Amino Acids of Glycoproteins on a Single Sample as Heptafluorobutyrate Derivatives. *Biochemistry* **2003**, 42, 8342-8353.
5. Hallmann, C.; van Aarssen, B. G. K.; Grice, K. Relative efficiency of free fatty acid butyl esterification. Choice of catalyst and derivatization Procedure. *J. of Chromatog.A* **2008**, 1198-1199, 14-20.
6. Zheng, X.; *et al.* A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids. *Metabolomics* **2013**, 9(4), 818-827.
7. T. Furuhashi. *et. al.* Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC-MS. *Anal. Biochem* **2018**, 543, 51-54
8. J. Ueyama. *et al.* Freeze-drying enables homogeneous and stable sample preparation for determination of fecal short-chain fatty acids. *Anal Biochem* **2020**, 589, 113508

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018-2020
Printed in Japan, October 9, 2020
5991-9103JAJP
Rev 2.0