

固相誘導体化法による短鎖脂肪酸と有機酸の 一斉分析法の開発

○佐々野僚一¹、杉立久仁代²、野原健太²、古野正浩³、福崎英一郎³
(¹アイスティサイエンス, ²アジレント・テクノロジー, ³阪大院・工)



Beyond your Imagination

Abstract

従来のメタボローム分析において、**短鎖脂肪酸**は、凍結乾燥/遠心乾固の工程における気化損失が懸念されるため、通常のメタボローム解析と同じ手法での前処理が難しく、塩酸酸性下でのジエチルエーテル抽出などの手法が取られることが多い。そこで、本研究では凍結乾燥工程を必要としない**自動固相誘導体化**オンラインSPE/GC/MSシステムを用いて、**MTBSTFA誘導体化**試薬による短鎖脂肪酸と有機酸の一斉分析のメソッド開発を行った。

固相誘導体化法

STEP ①

試料負荷&保持

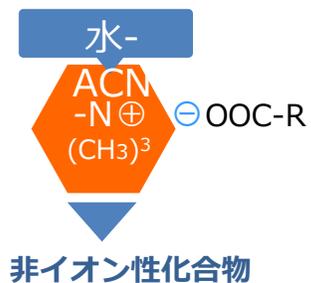
短鎖脂肪酸と有機酸を
イオン交換相互作用によ
り固相に保持



STEP ②

洗浄

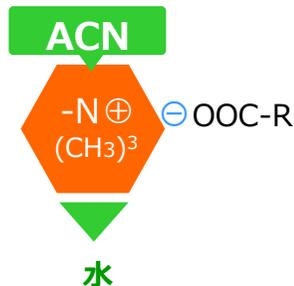
水-ACNで固相に残存
している非イオン性化合
物を除去



STEP ③

脱水 / 1分

ACNで固相に残存
している水分を除去



STEP ④

誘導体化 / 1分

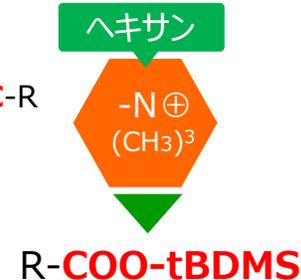
誘導体化試薬を固相
に含浸させて、目的成
分を固相中で誘導体
化



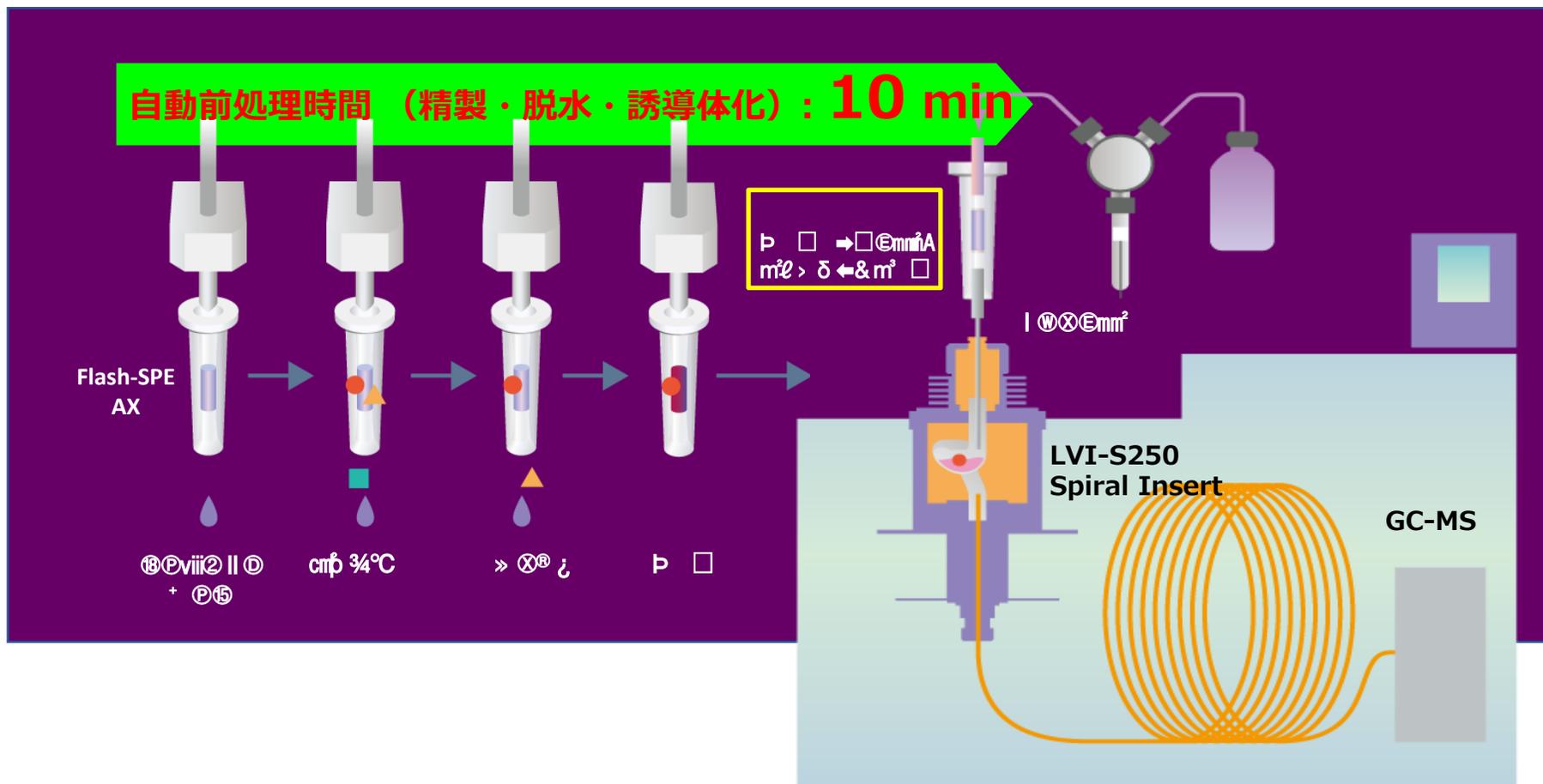
STEP ⑤

溶出

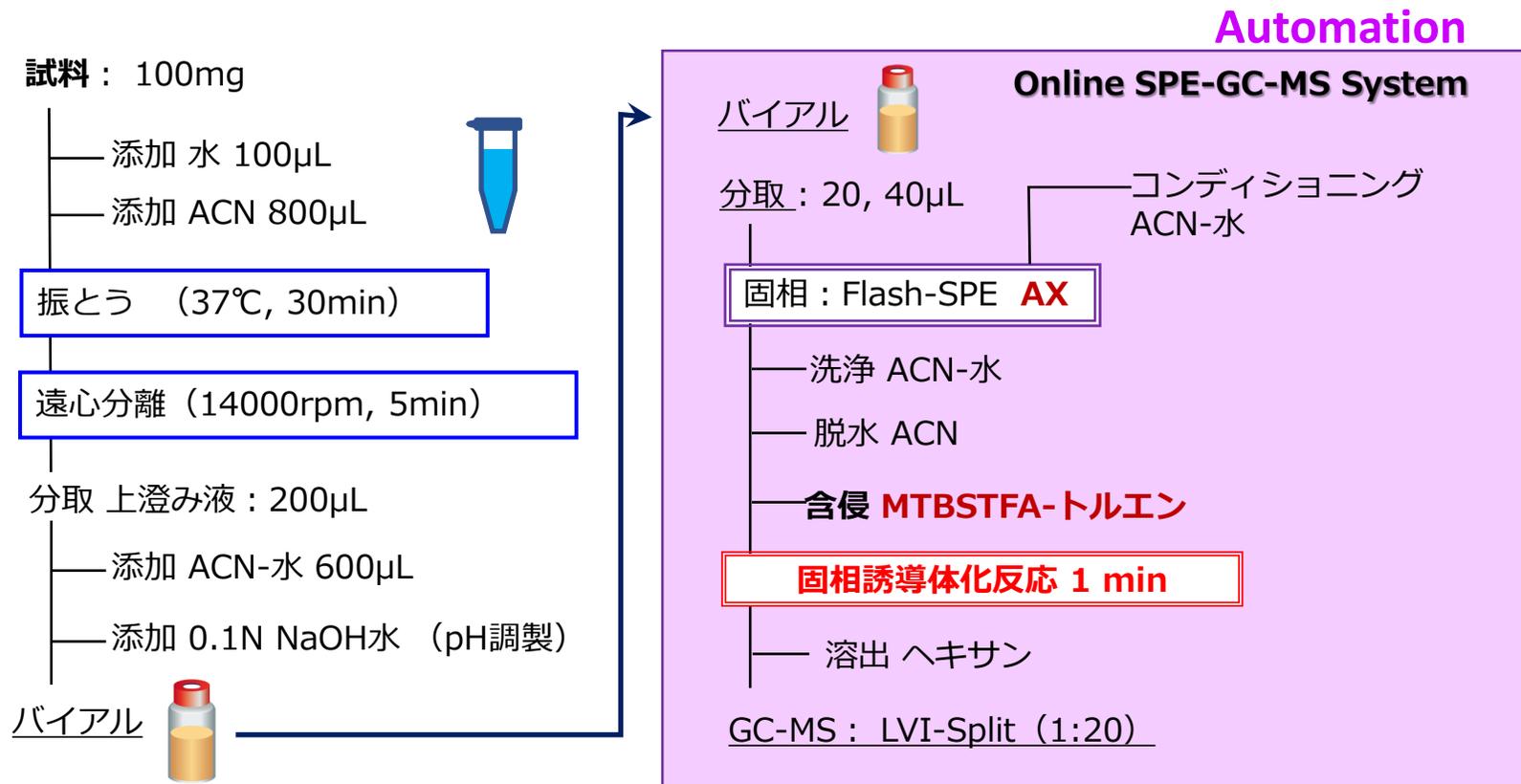
誘導体化物をヘキサン
で溶出



自動固相誘導体化オンラインSPE-GC-MSシステム

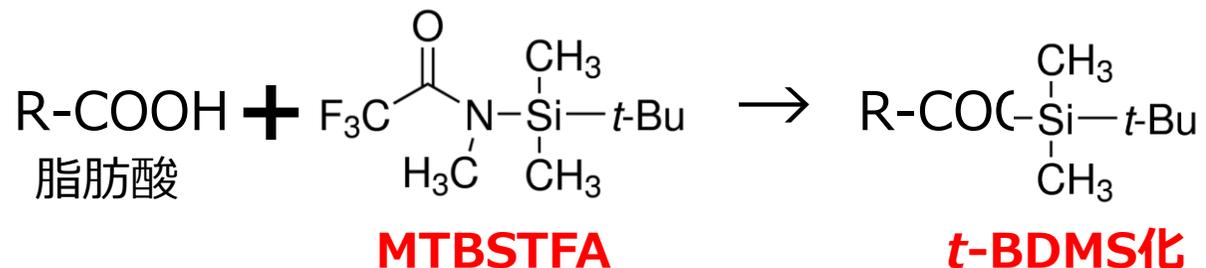


前処理フロー



MTBSTFA誘導體化

■ MTBSTFAによる*t*-BDMS誘導體化



TMS 誘導體は加水分解されやすいのに対し、*t*-BDMS 誘導體は加水分解に対し非常に安定。

■ 固相抽出技術

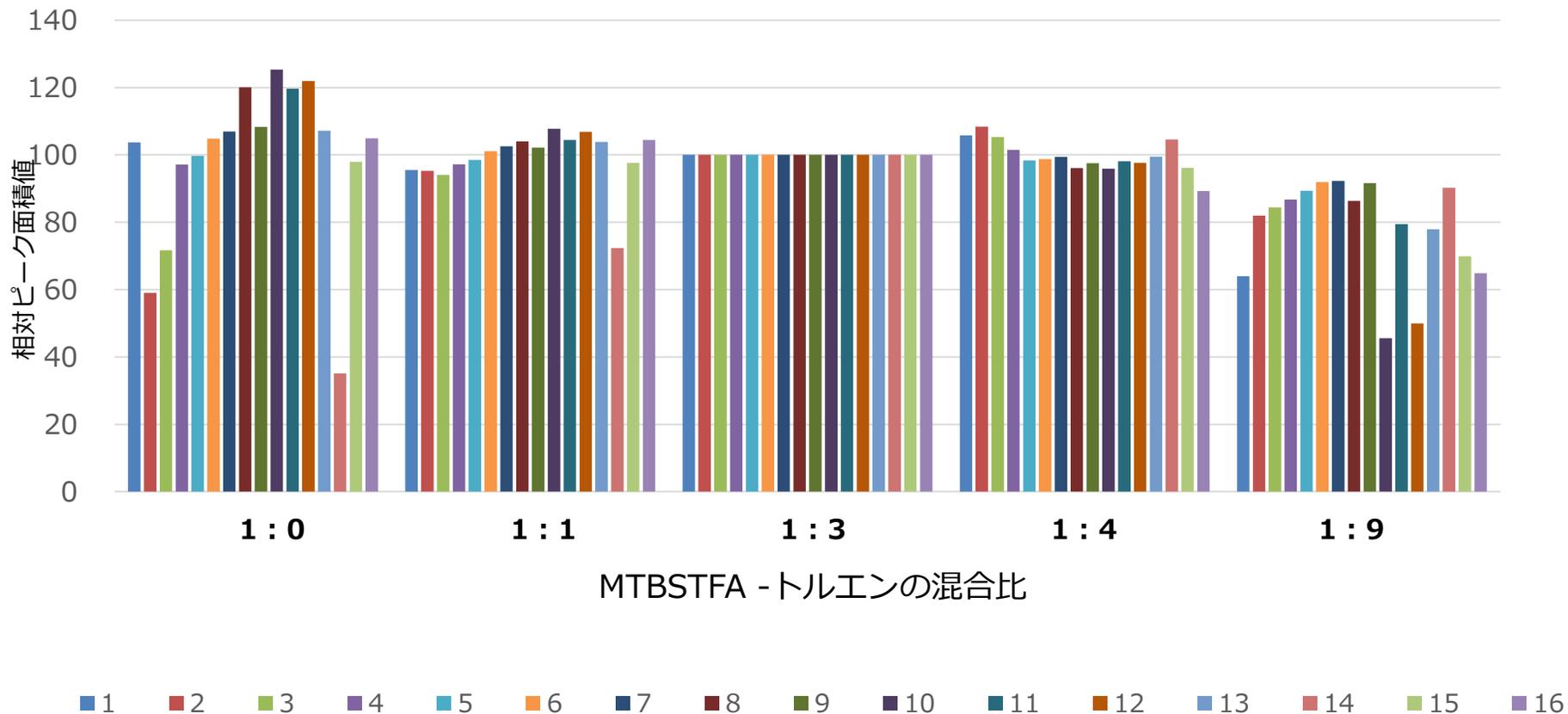
脱水：強イオン性固相に短鎖脂肪酸を吸着させてアセトニトリルを通液することで固相に残存している水分を取り除く。

固相誘導體化：強イオン性固相に短鎖脂肪酸を吸着させた状態で誘導體化試薬をその固相に含浸させて、誘導體化。

■ Condition of SPE-GC/MS System

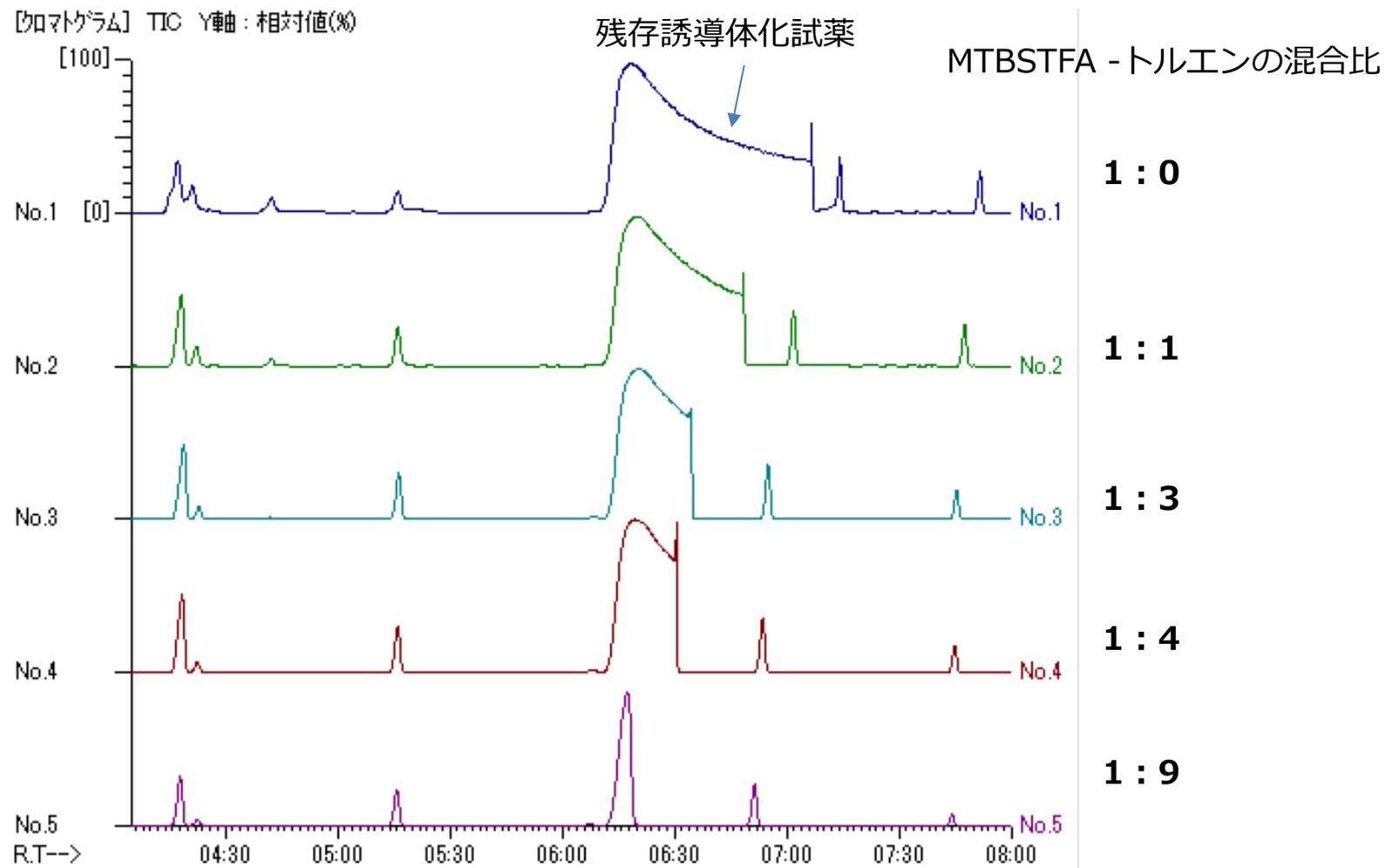
SPE-GC Interface	SGI-M100; AiSTI Science
SPE Cartridge	Flash-SPE AX
PTV Injector	LVI-S250(AiSTI Science)
Insert Type	Spiral Insert
Injector Temp.	150°C(0.5min)-25°C/min-290°C
GC	Agilent 7890B
Inlet Mode	Split
Split Flow	20 mL/min
Flow Mode	Constant Flow, 1.1ml/min
Column	Vf-5ms, 0.25mm i.d. X 30m, df;0.25µm
Oven Temp.	60°C(3min)-10°C/min-100°C-20°C/min-310°C
Trans. Line Temp.	290°C
MS	Agilent 5977B
MS Method	SCAN, m/z;70-470

誘導体化試薬の濃度について



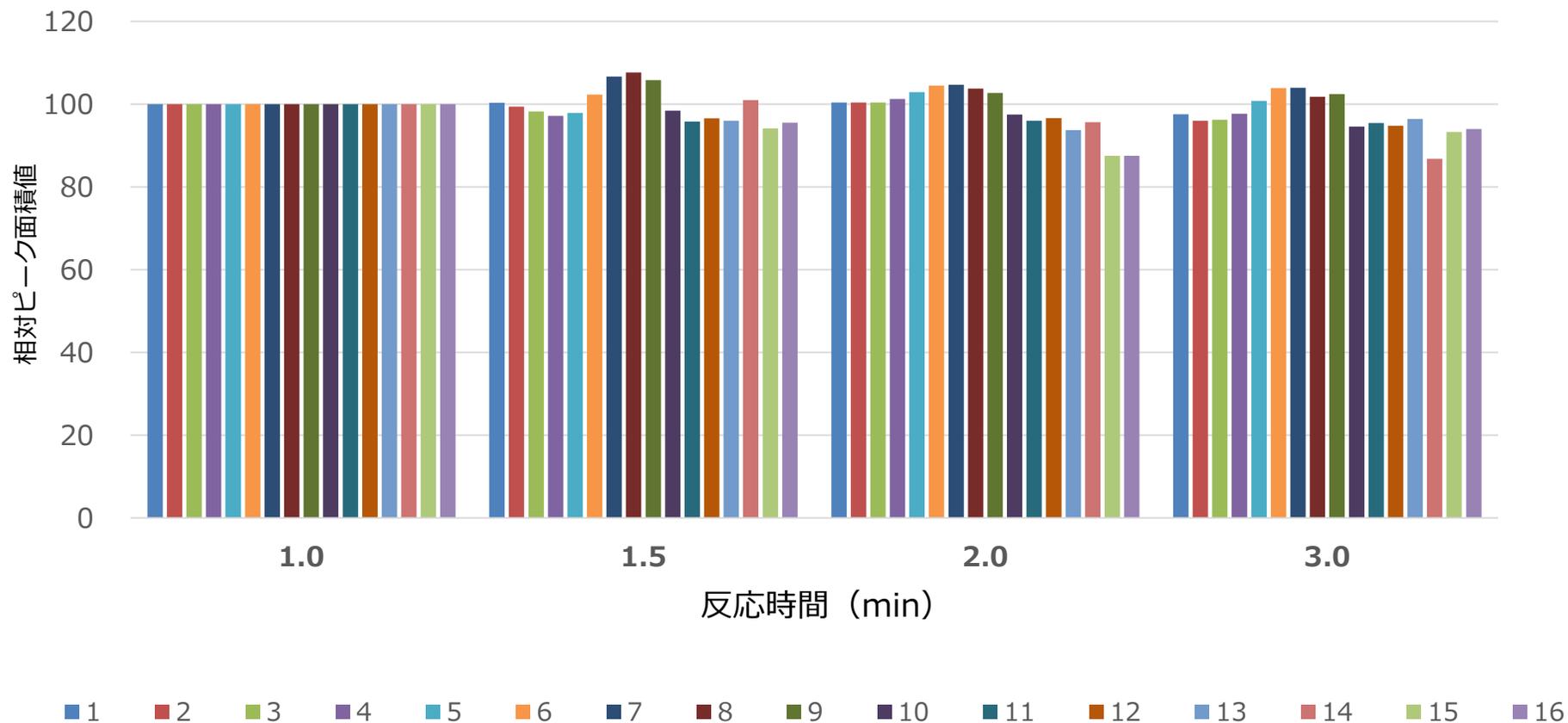
- MTBSTFA濃度が低いと誘導体化率が悪くなり、濃く過ぎても一部の成分で悪くなった。
- 誘導体化試薬はMTBSTFA - トルエン (1:3) を最適条件とした。

誘導体化試薬の濃度について



SCANトータルイオンクロマトグラム比較

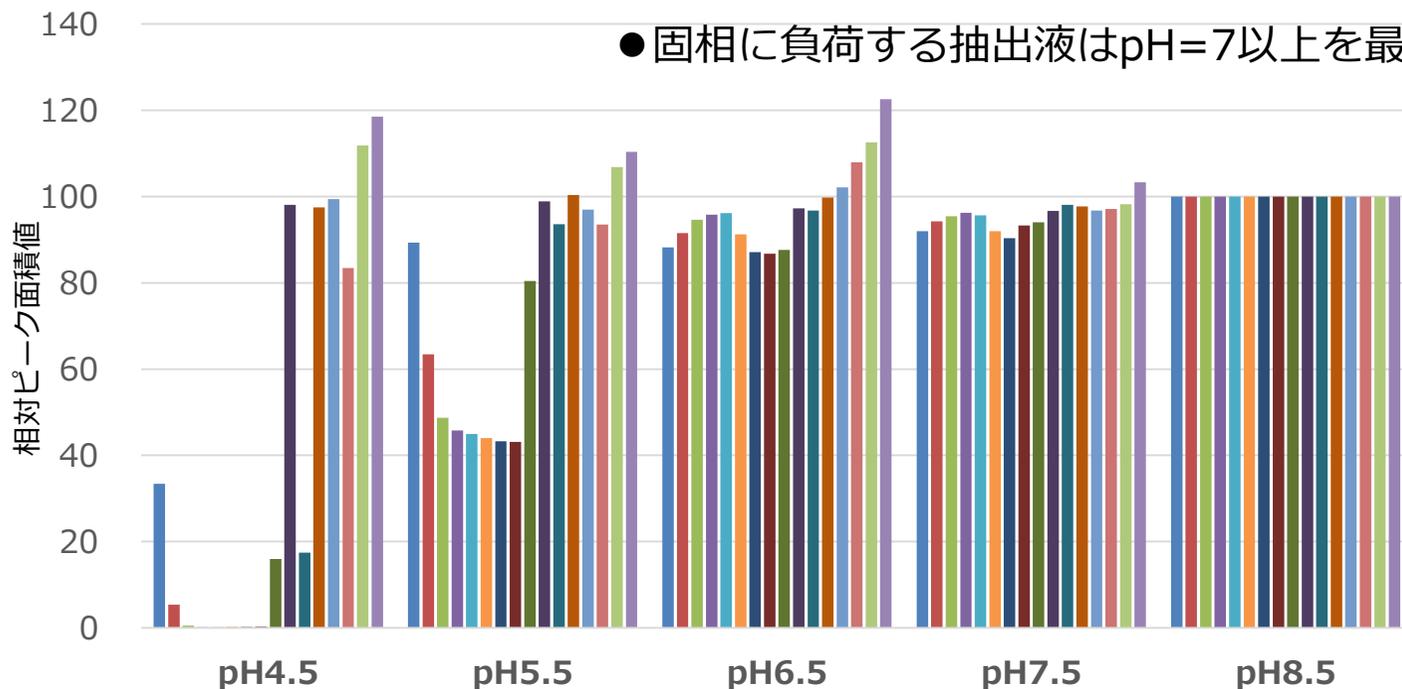
誘導体化反応時間



●MTBSTFAと短鎖脂肪酸の固相誘導体化法は、直ぐに反応することがわかった。

抽出液のpH調製について

● 固相に負荷する抽出液はpH=7以上を最適条件とした。

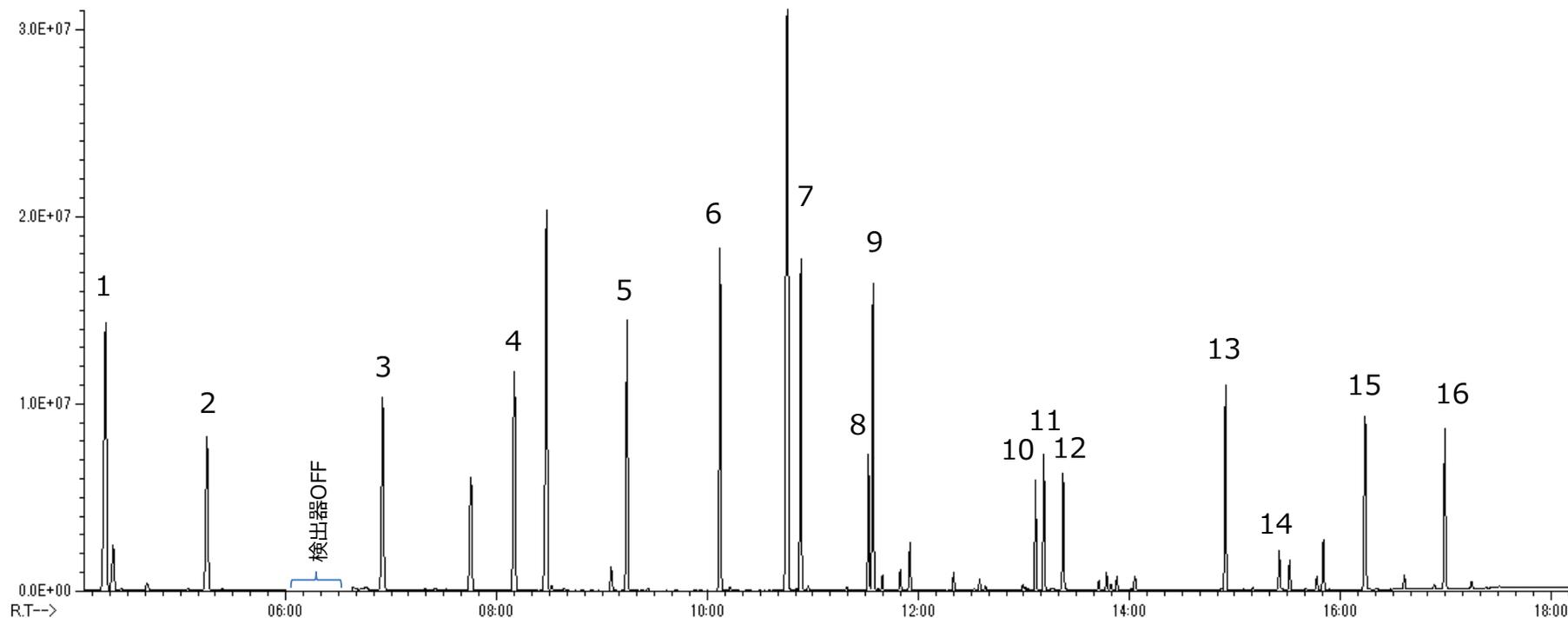


- 1 Formic acid pKa = 3.7
- 2 Acetic acid pKa = 4.6
- 3 Propanoic acid pKa = 4.8
- 4 Butanoic acid pKa = 4.8
- 5 Pentanoic acid pKa = 4.8
- 6 Hexanoic acid pKa = 5.1
- 7 Heptanoic acid pKa = 5.1
- 8 Lactic acid pKa = 3.8
- 9 Octanoic acid pKa = 5.2
- 10 Maleic acid pKa = 3.1
- 11 Succinic acid pKa = 3.5
- 12 Fumaric acid pKa = 3.6
- 13 Malic acid pKa = 3.2
- 14 a-Ketoglutaric acid
- 15 Tartaric acid pKa = 2.7
- 16 Citric acid pKa = 3.0

- Formic acid-tBDMS
- Propanoic acid-tBDMS
- Pentanoic acid-tBDMS
- Heptanoic acid-tBDMS
- Lactic acid-tBDMS
- Succinic acid-2tBDMS
- Malic acid-3tBDMS
- Tartaric acid-4tBDMS
- Acetic acid-tBDMS
- Butanoic acid-tBDMS
- Hexanoic acid-tBDMS
- Octanoic acid-tBDMS
- Maleic acid-2tBDMS
- Fumaric acid-2tBDMS
- a-Ketoglutaric acid-tBDMS
- Citric acid-4tBDMS

本法によるスタンダードのSCANトータルイオンクロマトグラム

【クロマトグラム】 TIC : 31036800 - 0



- 1. Methanoic acid-tBDMS
- 2. Ethanoic acid-tBDMS
- 3. Propanoic acid-tBDMS
- 4. Butanoic acid-tBDMS
- 5. Pentanoic acid-tBDMS
- 6. Hexanoic acid-tBDMS

- 7. Heptanoic acid-tBDMS
- 8. Lactic acid-2tBDMS
- 9. Octanoic acid-tBDMS
- 10. Maleic acid-2tBDMS
- 11. Succinic acid-2tBDMS
- 12. Fumaric acid-2tBDMS

- 13. Malic acid-3tBDMS
- 14. a-Ketoglutaric acid-3tBDMS
- 15. Tartaric acid-4tBDMS
- 16. Citric acid-4tBDMS

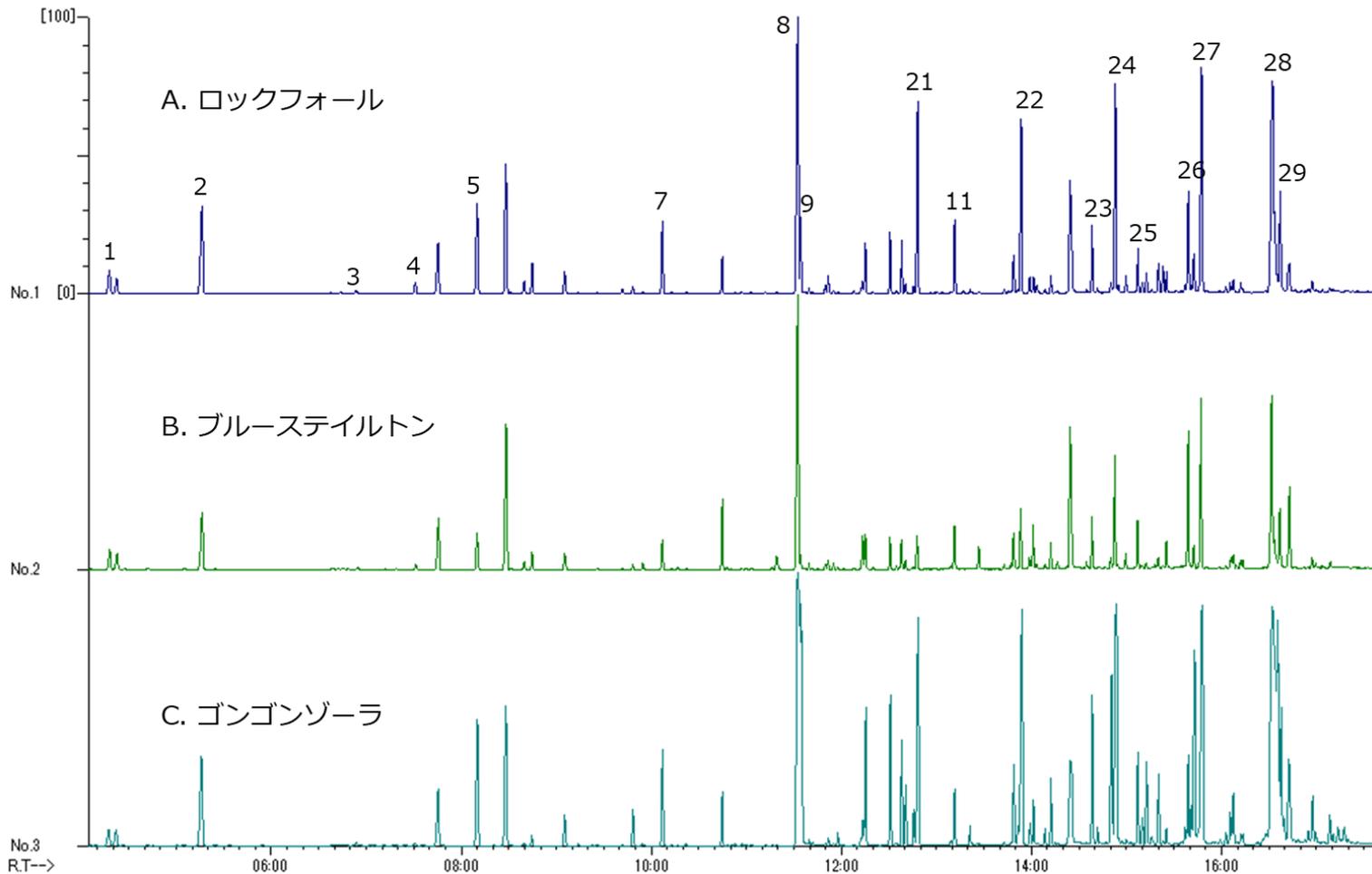
再現性

Table 1. 本法の繰り返し測定によるスタンダードのピーク面積値の再現性 (n = 10)

No. 化合物名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ave.	RSD, %
1 Methanoic acid-tBDMS	30,227,430	30,889,896	30,429,839	30,948,441	31,244,577	31,557,736	32,493,298	32,124,585	32,670,291	31,126,554	31,371,265	2.7
2 Ethanoic acid-tBDMS	12,340,883	12,538,808	12,137,282	12,298,944	12,381,311	12,578,273	13,094,081	12,862,755	12,800,785	12,135,503	12,516,863	2.6
3 Propanoic acid-tBDMS	12,823,811	12,909,258	12,779,143	12,845,278	13,087,033	13,015,973	13,636,656	13,327,889	13,578,399	12,345,834	13,034,927	3.0
4 Butanoic acid-tBDMS	11,475,299	11,581,978	11,808,966	11,688,344	11,946,609	12,009,882	12,394,007	11,964,797	12,362,085	11,127,740	11,835,971	3.3
5 Pentanoic acid-tBDMS	11,588,243	11,720,223	12,243,830	11,920,575	12,135,019	12,354,232	12,670,558	12,084,388	12,720,821	11,576,139	12,101,403	3.4
6 Hexanoic acid-tBDMS	11,580,646	11,842,742	12,353,900	11,988,066	12,169,039	12,387,848	12,572,832	12,065,398	12,647,753	11,874,440	12,148,266	2.8
7 Heptanoic acid-tBDMS	11,606,883	11,805,299	12,464,553	12,009,352	12,146,574	12,496,200	12,573,604	11,959,907	12,691,060	12,106,993	12,186,043	2.9
8 Lactic acid-2tBDMS	1,077,185	1,230,088	1,131,334	1,076,805	1,162,595	1,154,103	1,154,143	1,145,913	1,187,630	1,112,992	1,143,279	4.1
9 Octanoic acid-tBDMS	10,608,992	10,881,088	11,527,448	11,111,574	11,200,905	11,651,375	11,407,126	10,950,090	11,613,534	11,248,975	11,220,111	3.0
10 Maleic acid-2tBDMS	1,867,779	1,969,324	2,040,317	1,900,232	2,065,959	2,002,221	1,949,168	1,898,625	2,022,759	2,113,877	1,983,026	4.0
11 Succinic acid-2tBDMS	2,406,066	2,438,793	2,495,130	2,401,336	2,499,333	2,510,922	2,491,212	2,377,200	2,506,791	2,573,343	2,470,013	2.5
12 Fumaric acid-2tBDMS	4,193,048	4,331,927	4,480,305	4,218,660	4,487,927	4,390,857	4,285,980	4,205,144	4,422,052	4,579,983	4,359,588	3.1
13 Malic acid-3tBDMS	1,570,355	1,544,780	1,523,746	1,576,209	1,573,185	1,590,439	1,612,939	1,578,652	1,571,389	1,623,141	1,576,484	1.8
14 a-Ketoglutaric acid-3tBDMS	553,488	530,143	534,318	509,953	582,938	521,569	534,178	552,656	537,514	609,245	546,600	5.4
15 Tartaric acid-4tBDMS	563,021	521,446	497,159	546,241	530,917	526,143	540,008	583,506	526,641	580,916	541,600	5.1
16 Citric acid-4tBDMS	924,916	849,805	796,506	911,965	892,992	862,443	834,170	973,466	842,453	1,025,026	891,374	7.8

ブルーチーズ3種のSCANトータルイオンクロマトグラム比較

【クロマトグラム】 TIC Y軸：相対値(%)



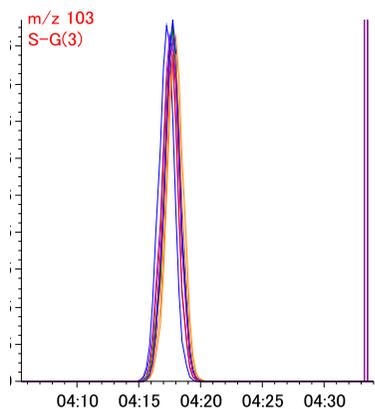
試料：ブルーチーズ3種



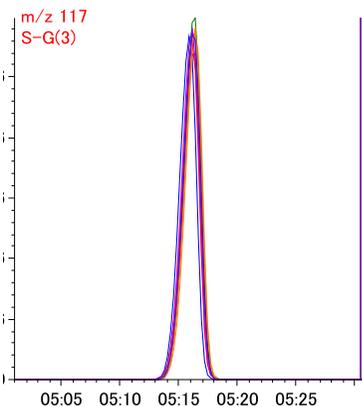
C B A

- 1 Methanoic acid-tBDMS
- 2 Ethanoic acid-tBDMS
- 3 Propanoic acid-tBDMS
- 4 Butanoic acid-tBDMS
- 5 Pentanoic acid-tBDMS
- 7 Heptanoic acid-tBDMS
- 8 Lactic acid-2tBDMS
- 9 Octanoic acid-tBDMS
- 11 Succinic acid-2tBDMS
- 21 Decanoic acid-tBDMS
- 22 Dodecanic acid-tBDMS
- 24 Tetradecanoic acid-tBDMS
- 25 Aspartic acid-3tBDMS
- 26 Glutamic acid-3tBDMS
- 27 Hexadecanoic acid-tBDMS
- 28 cis-9-Octadecenoic acid
- 29 Stearic acid-tBDMS

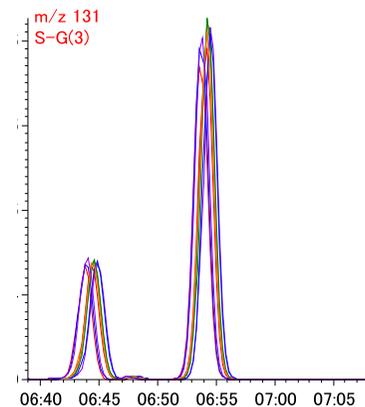
再現性



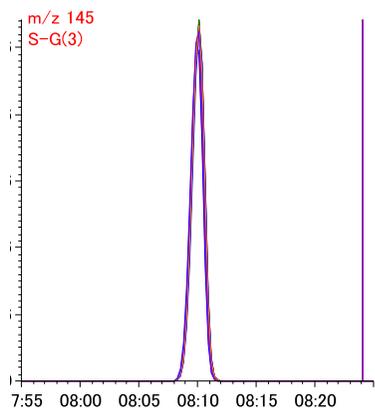
1. Methanoic acid-tBDMS



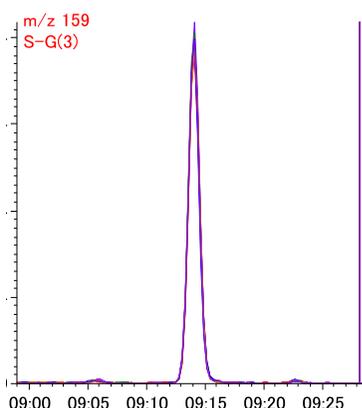
2. Ethanoic acid-tBDMS



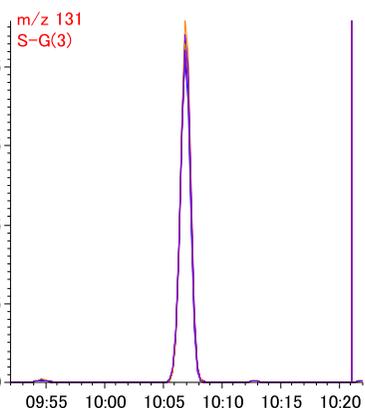
3. Propanoic acid-tBDMS



4. Butanoic acid-tBDMS



5. Pentanoic acid-tBDMS



6. Hexanoic acid-tBDMS

本法によるブルーチーズAの定量イオンクロマトグラム重ね描き (n = 10)

Table 2. 本法の繰り返し測定によるブルーチーズAのピーク面積値の再現性 (n = 10)

No.	化合物名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ave.	RSD, %
1	Methanoic acid-tBDM S	5,662,335	6,087,241	6,025,118	5,973,966	6,068,586	5,802,239	6,134,522	6,101,179	5,798,742	5,777,380	5,943,131	2.8
2	Ethanoic acid-tBDM S	18,770,224	20,146,848	19,677,295	20,067,483	20,422,968	19,469,683	21,313,154	20,143,063	20,431,335	20,147,390	20,058,944	3.3
3	Propanoic acid-tBDM S	524,184	593,124	554,110	579,284	587,008	547,840	600,395	572,069	579,179	576,679	571,387	4.0
4	Butanoic acid-tBDM S	13,001,525	14,053,261	13,282,154	14,064,781	14,082,758	13,297,350	14,175,957	13,582,032	13,870,275	13,807,788	13,721,788	3.0
5	Pentanoic acid-tBDM S	85,540	90,561	86,590	92,154	94,205	86,636	90,475	88,603	88,350	88,237	89,135	3.0
6	Hexanoic acid-tBDM S	885,558	909,180	860,093	962,674	948,573	900,324	908,790	901,709	906,454	902,439	908,579	3.2
7	Heptanoic acid-tBDM S	108,089	106,675	100,268	116,243	111,757	107,815	107,017	108,204	106,638	107,850	108,056	3.7
8	Lactic acid-2tBDM S	2,937,700	2,896,698	2,933,690	3,024,671	3,004,121	3,016,702	3,054,493	2,995,071	3,028,298	2,984,398	2,987,584	1.7
9	Octanoic acid-tBDM S	7,698,998	7,401,664	7,429,620	8,050,950	7,874,511	7,738,806	7,568,072	7,785,579	7,625,665	7,743,874	7,691,774	2.6
10	Maleic acid-2tBDM S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	Succinic acid-2tBDM S	930,429	907,160	953,785	962,154	959,702	976,303	951,261	990,590	989,084	993,676	961,414	2.9
12	Fumaric acid-2tBDM S	97,015	95,707	107,631	99,765	108,764	114,054	109,247	116,137	106,451	101,762	105,653	6.5
13	Malic acid-3tBDM S	168,152	158,283	162,771	167,983	158,269	167,363	170,771	181,388	176,893	177,783	168,966	4.7
14	a-Ketoglutaric acid-3tBDM S	63,206	55,231	60,496	63,380	59,289	61,575	59,891	64,924	70,249	65,135	62,338	6.5
15	Tartaric acid-4tBDM S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	Citric acid-4tBDM S	20,400	16,533	19,185	20,289	18,807	19,405	18,888	20,926	20,037	18,756	19,323	6.4

まとめ

ギ酸および酢酸を含む短鎖脂肪酸および有機酸とも良好なクロマトグラムを得ることができた。また、誘導体化反応時間は2分で、自動前処理にかかった時間は約10分であった。MBSTFAによる固相誘導体化法により、凍結乾燥工程を行わずに、自動で迅速な分析が可能となった。本法は短鎖脂肪酸および有機酸の一斉分析に有効であることがわかった。