

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

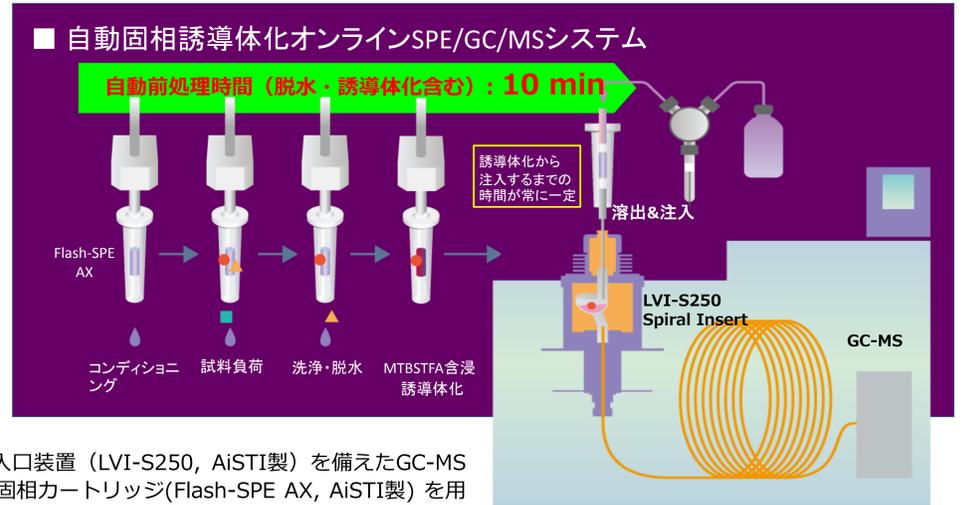
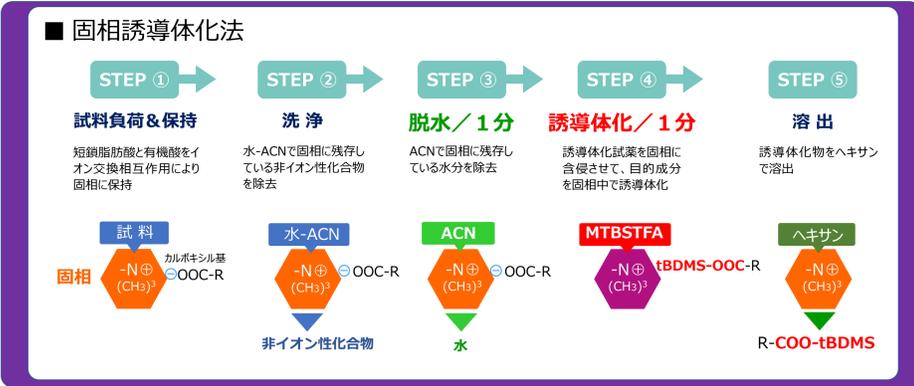
○佐々野僚一¹、杉立久仁代²、野原健太²、古野正浩³、福崎英一郎³

(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)

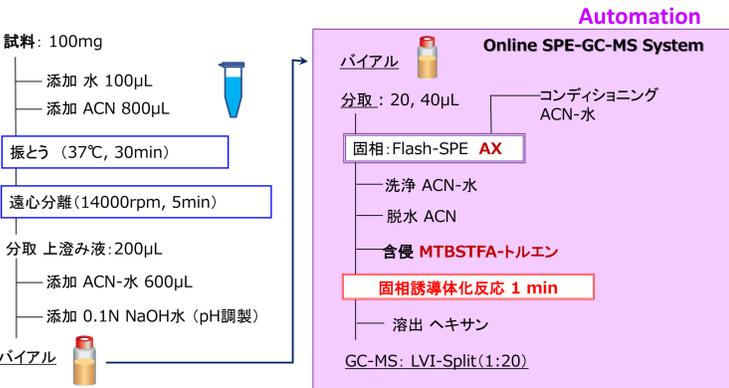
【Abstract】

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酸化損失が懸念されるため、通常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。

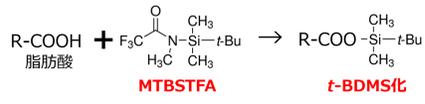
【Experimental】



前処理装置にはオンラインSPE-GCインターフェース (SGI-M100, AiSTI製)、測定装置には大量注入装置 (LVI-S250, AiSTI製) を備えたGC-MS (GC: 7890B, MS: 5977B, Agilent製) を用いた。固相カートリッジには、強イオン交換相互作用の固相カートリッジ (Flash-SPE AX, AiSTI製) を用いた。測定試料は短鎖脂肪酸と有機酸をアセトニトリル-水混合溶液 (4/1) で調製した。自動前処理の手順は、固相カートリッジをコンディショニングした後に、試料溶液を通液し目的物質を固相にイオン交換相互作用により吸着させ、アセトニトリル-水混合溶媒で洗浄し、アセトニトリルを流すことで脱水を行った。その後、誘導体化試薬MTBSTFAを固相に直接添加して含浸させて、固相中で t BDMS誘導体化を行い、ヘキサンで溶出しながら直接GCへ注入した。



■ MTBSTFAによる t -BDMS誘導体化



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

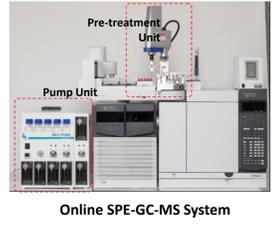
■ 固相抽出技術

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。

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

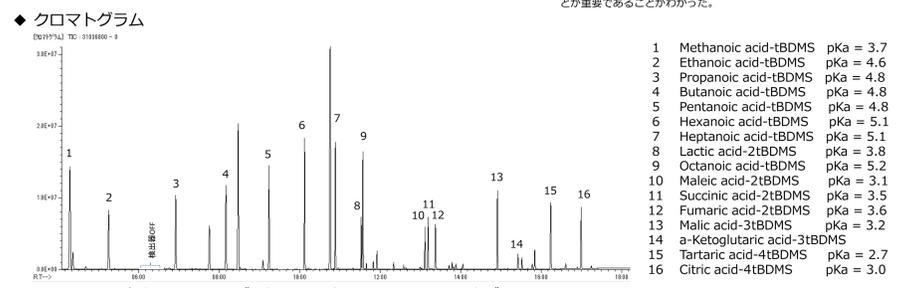
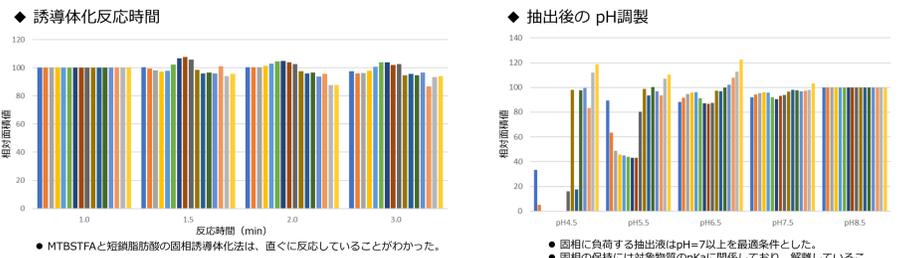
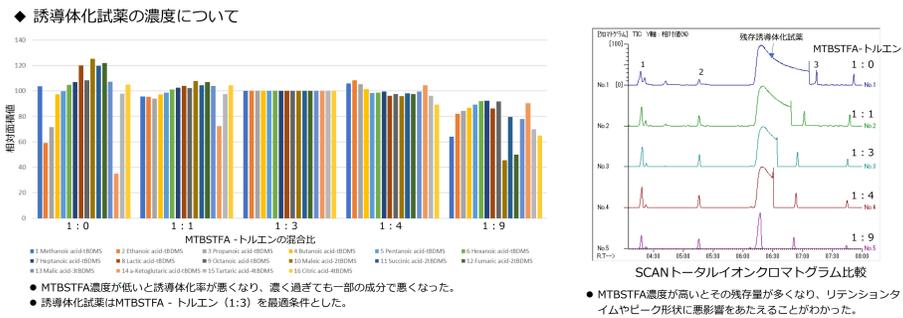
■ Condition of SPE-GC/MS System

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 $^{\circ}$ C (0.5min)-25 $^{\circ}$ C/min-290 $^{\circ}$ 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:0.25 μ m
Oven Temp.	60 $^{\circ}$ C (3min)-10 $^{\circ}$ C/min-100 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C/min-310 $^{\circ}$ C
Trans. Line Temp.	290 $^{\circ}$ C
MS	Agilent 5977B
MS Method	SCAN, m/z:70-470



【Results】

■ スタンドによる条件検討と評価

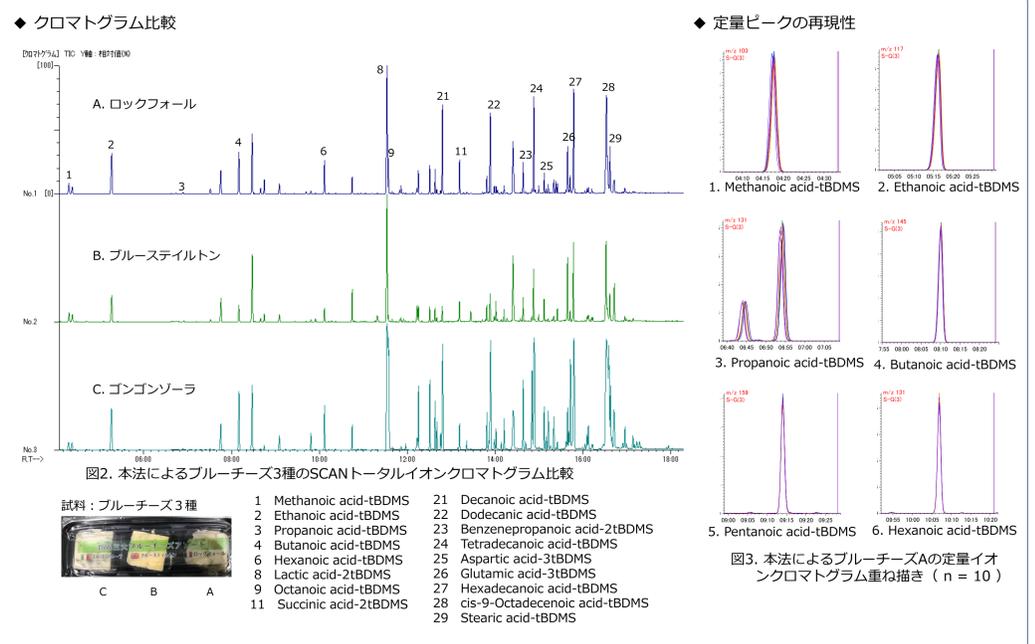


◆ 再現性

Table 1. 本法の繰り返し測定による標準品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- t BDMS	30.227	4.30	30.889	8.96	30.429	8.39	30.948	4.41	31.244	5.77	31.557	7.76	32.493	2.98	32.124	5.85	32.670	2.91	31.126	5.54	31.371	2.65	2.7
2	Ethanoic acid- t BDMS	12.340	8.83	12.538	8.08	12.137	2.82	12.298	9.44	12.381	3.11	12.578	2.73	13.094	0.81	12.862	7.55	12.135	5.03	12.516	8.63	12.516	8.63	2.6
3	Propanoic acid- t BDMS	12.823	8.11	12.909	2.58	12.779	1.43	12.845	2.78	13.087	0.33	13.015	9.73	13.636	6.56	13.327	8.89	13.578	3.99	13.245	8.34	13.034	9.27	3.0
4	Butanoic acid- t BDMS	11.475	2.99	11.581	9.78	11.808	9.66	11.688	3.44	11.946	6.09	12.009	8.82	12.394	0.07	11.964	7.97	12.362	0.85	11.127	7.40	11.825	9.71	3.3
5	Pentanoic acid- t BDMS	11.588	2.43	11.720	2.23	12.243	8.30	11.820	5.75	12.135	0.19	12.354	2.32	12.670	5.58	12.084	3.88	12.720	8.21	11.576	1.39	12.101	4.03	3.4
6	Hexanoic acid- t BDMS	11.580	6.46	11.842	7.42	12.353	9.00	11.988	0.66	12.169	0.39	12.387	8.48	12.572	8.32	12.065	3.98	12.647	7.53	11.874	4.40	12.148	2.66	2.8
7	Heptanoic acid- t BDMS	11.806	8.83	11.805	2.99	12.464	5.53	12.009	3.52	12.146	5.74	12.496	2.00	12.573	6.04	11.959	9.07	12.691	0.60	12.106	9.93	12.186	0.43	2.9
8	Lactic acid- t BDMS	1.077	1.85	1.230	0.88	1.131	3.34	1.076	8.05	1.162	5.95	1.154	1.03	1.154	1.43	1.145	9.13	1.187	4.30	1.112	9.92	1.143	2.79	4.1
9	Octanoic acid- t BDMS	10.608	9.92	10.881	0.88	11.527	4.48	11.111	5.74	11.200	9.05	11.651	3.75	11.407	1.26	10.950	0.90	11.613	5.34	11.248	9.75	11.220	1.11	3.0
10	Maleic acid- t BDMS	1.867	7.79	1.969	3.24	2.040	3.17	1.900	2.32	2.065	9.59	2.022	2.21	1.949	1.68	1.898	8.25	2.022	7.59	2.113	8.77	1.983	0.26	4.0
11	Succinic acid- t BDMS	2.406	0.66	2.458	7.63	2.495	1.30	2.401	3.36	2.499	3.33	2.510	9.22	2.491	2.12	2.377	2.00	2.506	7.91	2.573	3.43	2.470	0.13	2.5
12	Fumaric acid- t BDMS	4.193	0.48	4.331	9.27	4.480	3.05	4.218	6.60	4.487	9.27	4.390	8.57	4.285	9.80	4.205	1.44	4.422	0.52	4.579	9.83	4.359	5.89	3.1
13	Malic acid- t BDMS	1.570	3.55	1.544	7.80	1.523	7.46	1.576	2.09	1.573	1.85	1.590	4.39	1.612	9.39	1.578	6.52	1.571	3.89	1.623	1.41	1.576	4.84	1.8
14	α -Ketoglutaric acid- t BDMS	553	4.88	530	1.43	534	3.18	509	9.53	582	9.38	521	5.69	534	1.78	552	6.56	537	5.14	609	2.45	546	6.00	5.4
15	Tartaric acid- t BDMS	563	0.21	521	4.46	497	1.59	546	2.41	530	9.17	526	1.43	540	0.08	583	5.06	526	6.41	580	9.16	541	6.00	5.1
16	Citric acid- t BDMS	924	9.16	849	8.05	796	5.06	911	9.65	892	9.92	862	4.43	834	1.70	973	4.66	842	4.53	1.025	0.26	891	9.74	7.8

■ 実試料による評価



◆ 再現性

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- t BDMS	5.862	3.35	6.087	2.41	4.025	1.18	5.973	3.96	6.063	5.86	5.802	2.39	6.134	5.22	6.101	1.79	5.798	7.42	5.777	3.80	5.943	1.37	2.8	
2	Ethanoic acid- t BDMS	18.770	2.24	20.146	8.48	19.677	2.95	20.067	4.83	20.422	9.68	19.469	6.83	21.313	1.54	20.143	0.63	20.431	3.35	20.147	3.90	20.058	9.44	3.3	
3	Propanoic acid- t BDMS	524	1.84	593	1.24	554	1.10	579	2.84	587	0.88	547	8.40	600	3.95	572	0.69	579	1.79	576	6.79	571	3.87	4.0	
4	Butanoic acid- t BDMS	13.001	5.25	14.053	2.61	13.282	1.54	14.064	7.81	14.082	7.58	13.297	3.50	14.175	9.57	13.582	0.32	13.870	2.75	13.807	7.88	13.721	7.88	3.0	
5	Pentanoic acid- t BDMS	85	5.40	90	5.61	86	5.90	92	5.14	94	2.05	86	6.36	90	4.75	88	6.03	88	2.50	88	2.37	89	1.35	3.0	
6	Hexanoic acid- t BDMS	885	5.58	909	1.80	860	0.93	962	6.74	943	5.73	900	3.24	908	7.90	901	7.09	906	4.54	902	4.39	908	5.79	3.2	
7	Heptanoic acid- t BDMS	108	0.89	106	6.75	100	2.68	116	2.43	111	7.57	107	8.15	107	0.17	108	2.04	106	6.38	107	8.50	108	0.56	3.7	
8	Lactic acid- t BDMS	2.937	7.00	2.896	6.98	2.933	6.99	3.024	6.71	3.004	1.21	3.016	7.02	3.054	4.93	2.995	0.71	3.028	2.98	2.994	3.98	2.987	5.84	1.7	
9	Octanoic acid- t BDMS	7.688	9.98	7.401	6.64	7.429	8.20	8.050	9.50	7.874	5.11	7.738	8.06	7.568	0.72	7.785	5.79	7.625	6.65	7.743	8.74	7.691	7.74	2.6	
10	Maleic acid- t BDMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Succinic acid- t BDMS	930	4.29	907	1.60	953	7.85	962	1.54	959	7.02	976	3.03	951	2.61	990	5.90	989	0.84	993	6.76	961	4.14	2.9	
12	Fumaric acid- t BDMS	97	0.15	95	7.07	107	6.31	99	7.65	108	7.64	114	0.54	109	2.47	116	1.37	106	4.51	101	7.62	105	6.53	6.5	
13	Malic acid- t BDMS	168	1.52	158	2.83	162	7.71	167	9.83	158	2.69	167	3.63	170	7.71	181	3.88	176	8.93	177	7.83	168	6.66	4.7	
14	α -Ketoglutaric acid- t BDMS	63	2.06	55	2.31	60	4.96	63	3.80	61	5.75	59	2.89	59	8.91	64	9.24								