

## オンライン SPE-GC システムを用いた固相誘導体化法による糞便中の短鎖脂肪酸分析

○新川翔也, 浅井智紀, 佐々野僚一  
株式会社アイスティサイエンス

### Short chain fatty acid analysis in feces using solid-phase derivatization technique by online SPE-GC system

○Shoya Arakawa, Tomonori Asai, Ryoichi Sasano  
AiSTI SCIENCE Co., Ltd.

【目的】糞便中の代謝物分析はヒトと腸内細菌叢の関連を理解する手段のひとつとして重要なアプローチである。腸内細菌叢は代謝を通じて生理活性物質などを生産し宿主に影響を与える。代表的な例として短鎖脂肪酸が挙げられるが、短鎖脂肪酸の分析はその低沸点かつ高い親水性のため、通常は脱水を伴う誘導体化が必要である。さらには糞便に含まれる複雑なマトリックスからの精製も行う必要がある。この課題を解決するため、本報告ではオンライン SPE-GC システムを用いた分析法を提案する。本手法はバイアル中気相成分（ヘッドスペース）を小型固相カートリッジに捕集・濃縮し、固相上で誘導体化反応を行い、溶出液を GC/MS に全量注入する手法（固相捕集-誘導体化-溶媒溶出法）により分析を行うものである。

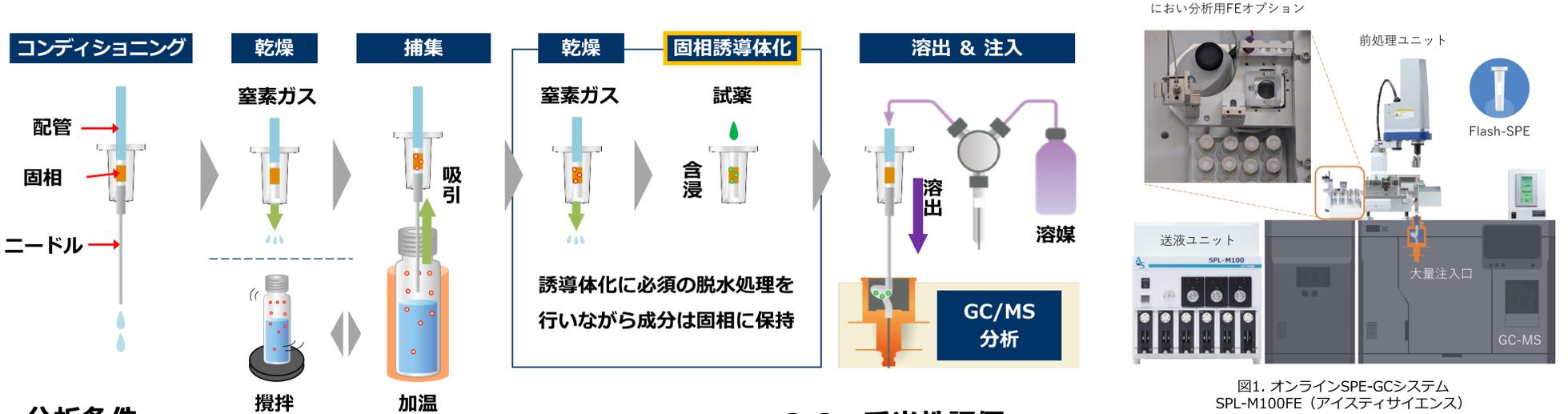
【方法】サンプルとして市販のヒト糞便検体を用いた。20 mL ヘッドスペースバイアルに糞便の水懸濁液を分注し、液量 5 mL に対して塩化ナトリウム 2 g および 0.1 mol/L 塩酸 50  $\mu$ L を添加し密閉した。バイアル中ヘッドスペースの捕集、誘導体化反応、および GC/MS へのオンライン注入は SPL-M100FE（アイスティサイエンス）を用いて全自動化された。80°C に加温したヒートブロックでバイアルを加温し、気相 20 mL をシリンジポンプで固相カートリッジ内に吸引し揮発性成分を捕集した。固相に付着した水分を窒素パージによって除去し、MSTFA/ヘキサン溶液を含浸させることによりトリメチルシリル化処理を行った（反応時間 1 分）。溶出液を大量注入口 LVI-S250（アイスティサイエンス）に全量導入し、GC/MS による分析を行った（スプリット、1:25）。分析カラムには VF-5ms（30 m, i.d.=0.25 mm, df=0.25  $\mu$ m）を使用した。

【結果・考察】短鎖脂肪酸をはじめとしてアルコール、芳香族化合物など多くの成分がトリメチルシリル化物として検出された。トリメチルシリル化することによって広く利用されている 5%フェニル系カラムで沸点の低い短鎖脂肪酸を検出することが可能となった。また、気相成分のみを捕集しているため夾雑ピークが少なく良好なクロマトグラムが得られ、再現性も RSD<5% (n=6) と良好であった。本システムは気相サンプリング・誘導体化処理・GC/MS 分析の自動化により分析の省力化・迅速化を達成でき、ルーチン分析に活用できるものと考えられる。

# オンラインSPE-GCシステムを用いた固相誘導体化法による糞便中の短鎖脂肪酸分析

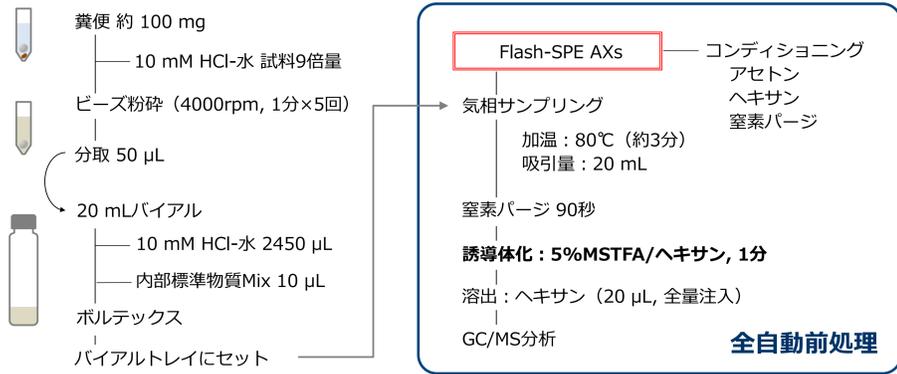
○新川翔也, 浅井智紀, 佐々野僚一 (株式会社アイスティサイエンス) 本発表演題に関連して開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

## 1. システム概要



## 2. 分析条件

### 前処理フロー



### GC-MS条件

PTV Injector	LVI-S250 (AiSTI Science)
Injector temp.	220°C(0.5 min)-100°C/min-290°C
GC-MS	7890B + 5977B (Agilent Technologies)
Split	1:50
Flow mode	Constant flow, 1.0 mL/min
Column	VF-5ms, 0.25 mm i.d. × 30 m, df=0.25 µm
Oven temp.	60°C (2 min) - 10°C/min - 130°C - 30°C/min - 310°C (2 min), Total 17 min
Transferline temp.	290°C
Ion source temp.	260°C
Acquisition mode	Scan (m/z 33-350)

## 3-2. 妥当性評価

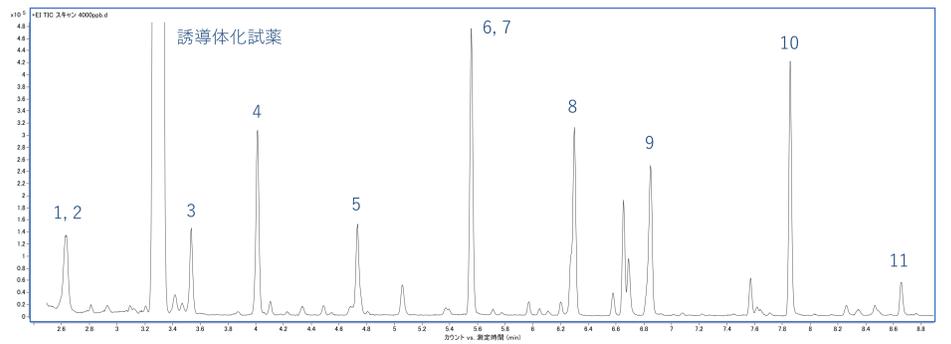


図3. 水添加試料におけるトータルイオンクロマトグラム (バイアル中濃度 4 mg/L)

1. Acetic acid-d4-TMS (IS)
2. Acetic acid-TMS
3. Propanoic acid-TMS
4. Isobutyric acid-TMS
5. Butyric acid-TMS
6. Crotonic acid-TMS (IS)
7. Isovaleric acid-TMS
8. Valeric acid-TMS
9. Tiglic acid-TMS (IS)
10. Hexanoic acid-TMS
11. Hexanoic acid-TMS (IS)

表2. 糞便試料の連続測定結果 (内部標準物質による相対ピーク面積値、n=6)

成分名 (保持時間順)	水 (Blank)	糞便1	糞便2	糞便3	糞便4	糞便5	糞便6	平均	RSD (%)
Acetic acid-d4-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—
Acetic acid-TMS	0.172	1.649	1.614	1.666	1.629	1.616	1.670	1.641	1.5
Propionic acid-TMS	0.085	0.692	0.691	0.673	0.705	0.670	0.763	0.699	4.8
Isobutyric acid-TMS	N.D.	0.190	0.198	0.174	0.181	0.188	0.197	0.188	5.0
Butyric acid-TMS	N.D.	0.377	0.361	0.351	0.354	0.348	0.366	0.359	3.0
Crotonic acid-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—
Isovaleric acid-TMS	N.D.	0.199	0.204	0.191	0.192	0.196	0.193	0.196	2.6
Valeric acid-TMS	N.D.	0.143	0.157	0.148	0.156	0.138	0.136	0.147	6.1
Tiglic acid-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—
Hexanoic acid-TMS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
Hexanoic acid-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—

N.D.: Not Detected (絶対ピーク面積値<1000)

## 3-1. バイアル中液体量の検討

ヘッドスペース法では加温により成分の気液平衡を気相側に移動させ検出感を向上させる。GC/MS分析時間が短い場合、平衡待ち時間は律速工程となり分析のスループットに影響する。上記の理由から、バイアル中液体量の設定を目的として、一定の加温時間 (約3分) におけるバイアル中液体量と再現性の変動について検討を行った。

結果として、本分析法のバイアル中液体量を最も再現性の良い 2.5 mL に設定した。バイアル中液体量を増やす場合は、検出強度と再現性が担保される平衡待ち時間の設定で対応可能であると考えられる。

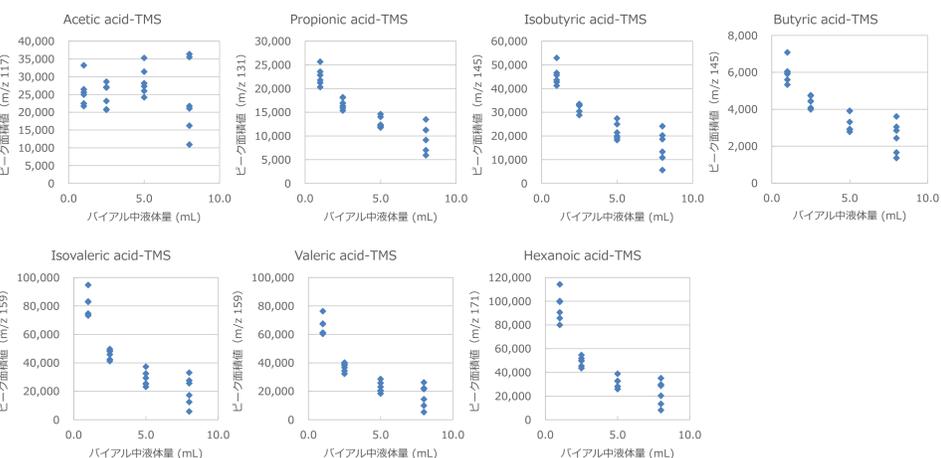
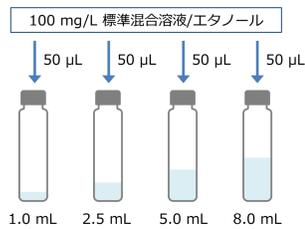


図2. 水添加試料 (100 mg/L 標準混合溶液/エタノール 50 µL) の連続測定における絶対ピーク面積値

表1. 水添加試料 (100 mg/L 標準混合溶液/エタノール 50 µL) の連続測定における絶対ピーク面積値のばらつき

バイアル中液体量	1.0 mL	2.5 mL	5.0 mL	8.0 mL
成分名	RSD (%、n=6)	RSD (%、n=6)	RSD (%、n=6)	RSD (%、n=6)
Acetic acid-TMS	15.9	14.0	14.0	43.5
Propionic acid-TMS	8.5	6.9	9.1	29.6
Isobutyric acid-TMS	9.1	5.9	16.3	43.9
Butyric acid-TMS	9.9	7.2	15.6	34.3
Isovaleric acid-TMS	10.4	7.5	18.6	50.5
Valeric acid-TMS	9.5	8.2	16.8	48.5
Hexanoic acid-TMS	12.8	8.3	15.0	46.2

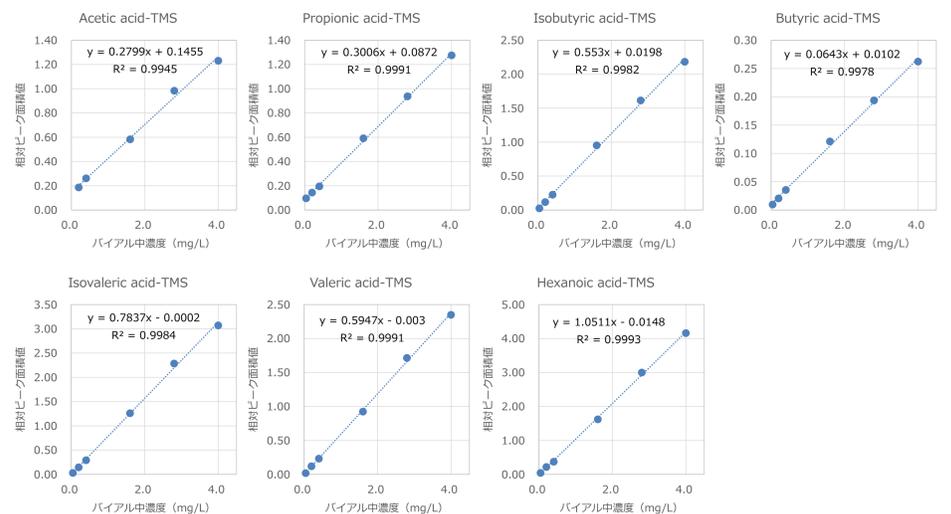


図4. 水添加試料における相対ピーク面積値の検量線

各短鎖脂肪酸に対する内部標準物質での補正を行い、糞便試料における良好な分析再現性とバイアル中濃度0.04~4 ppm (酢酸のみ 0.2 ppm~) の検量範囲を確認した。

## 4. まとめ&展望

オンラインSPE-GCシステムおよび固相捕集-誘導体化-溶媒溶出法を用いて短鎖脂肪酸分析の自動前処理法を構築した。代表的な手法であるニトロフェニルヒドラジンによるHPLC分析法と比較して誘導体化処理での恒温槽や遠心機が不要で簡便な手法であるといえる。

また、本手法は液相中の低沸点成分を加温や酸性条件にすることで気相に移行させてサンプリングを行うためマトリクスの混入が少なく、質量分析計を用いた分析で問題となるマトリクス効果が最小限となるため様々な試料において適用可能であると考えられる。

今後は糞便採取キットによる保存液からの抽出条件を検討し、研究および臨床現場で運用可能なメソッド構築を行っていく。保存液には短鎖脂肪酸の揮発を防ぐ成分が含まれていると考えられるが、本サンプル調製フローでは50倍の水希釈を行っているため保存液の組成による影響は低くなると思われる。

第49回日本医用マススペクトル学会年会  
2024年9月14日（土）13:20-13:30  
島津製作所京都本社1F大ホール  
演題番号O1-3（ポスター番号P-46）

# オンラインSPE-GCシステムを用いた 固相誘導体化法による糞便中の短鎖脂肪酸分析

株式会社アイスティサイエンス  
技術開発部  
新川翔也

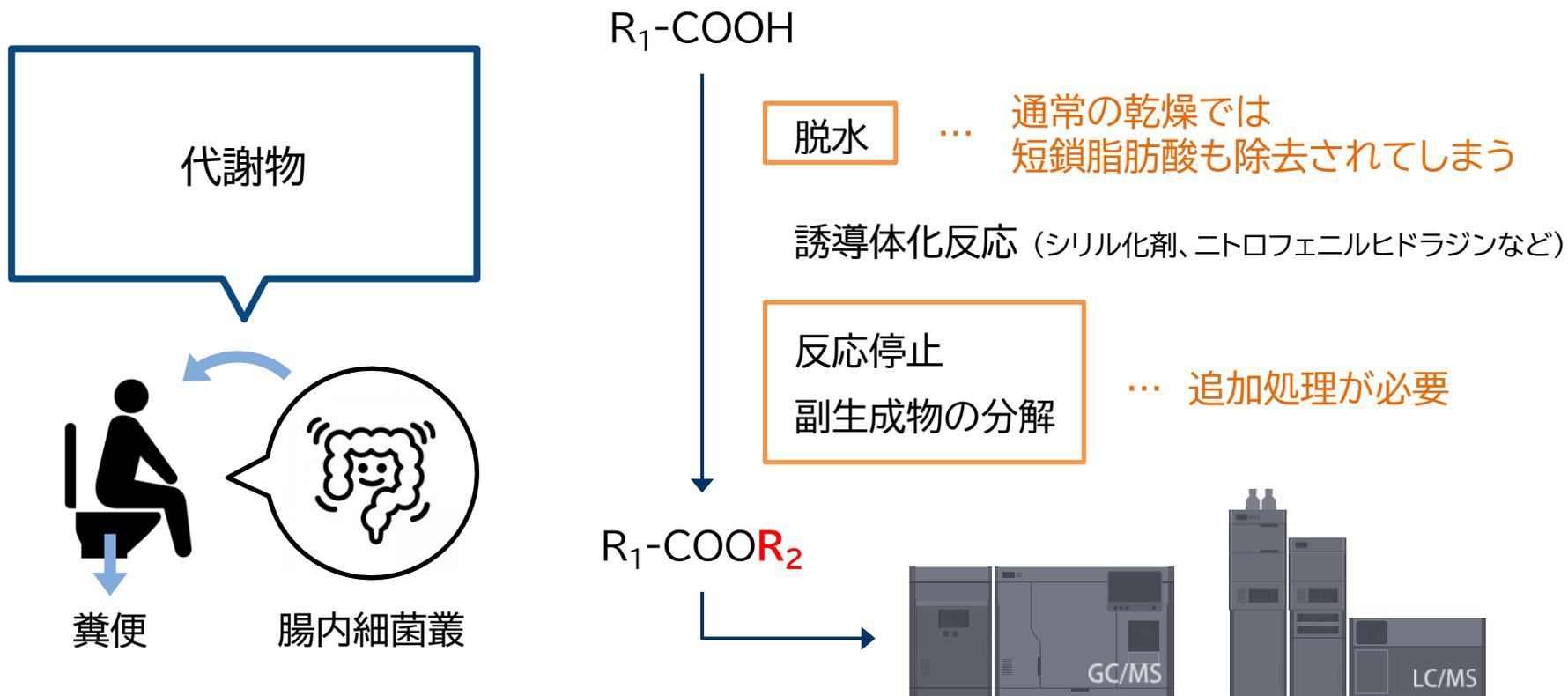


Beyond your Imagination

本発表演題に関連して開示すべきCOI 関係にある企業などはありません。

**AiSTI SCIENCE**

# 研究背景

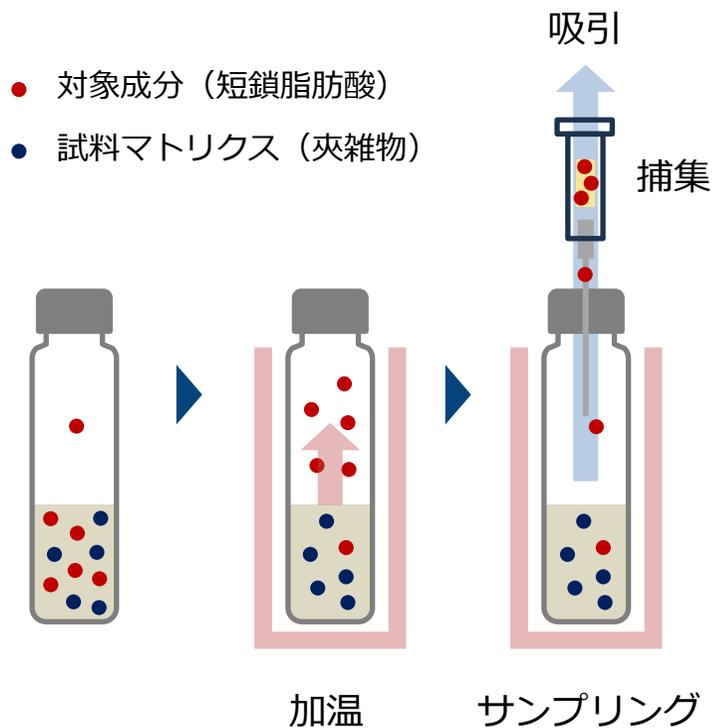


糞便中代謝物の分析は重要であるが、分析の自動化には課題が残っている

# 本研究のアプローチ

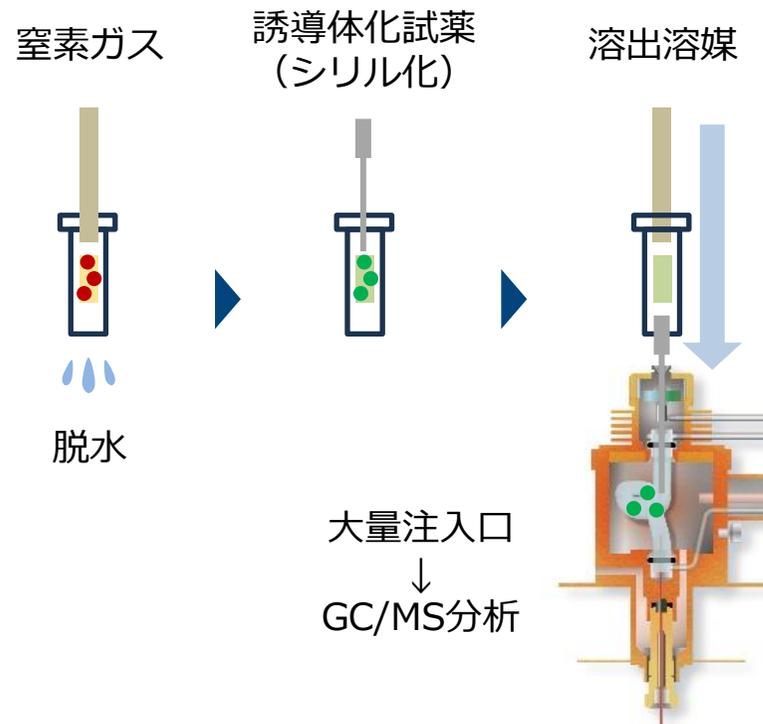
## 1. 試料マトリクスの混入回避

→ 気相サンプリングによる分析



## 2. 揮発性成分の誘導体化

→ オンラインSPE-GCシステムによる固相誘導体化



# オンラインSPE-GCシステム

抽出以降の前処理からGC分析までを全自動化したシステム

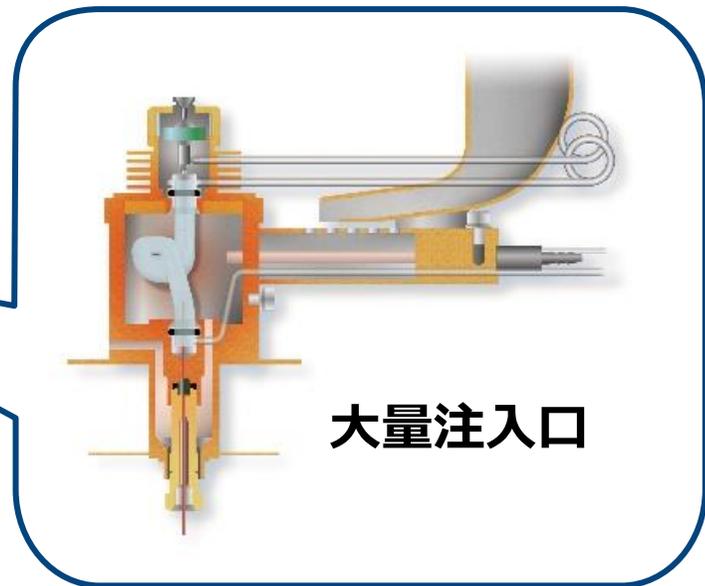
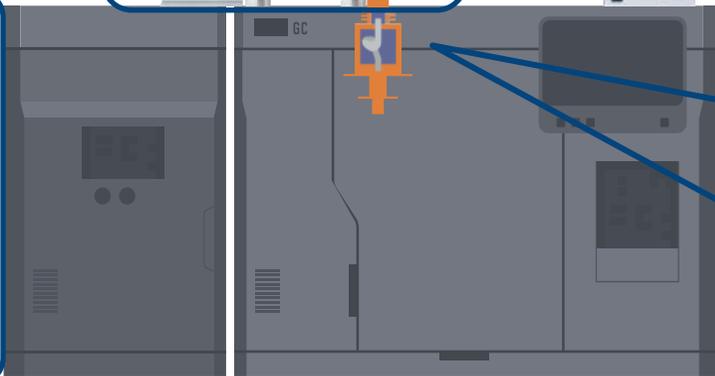


Flash-SPE

送液ユニット



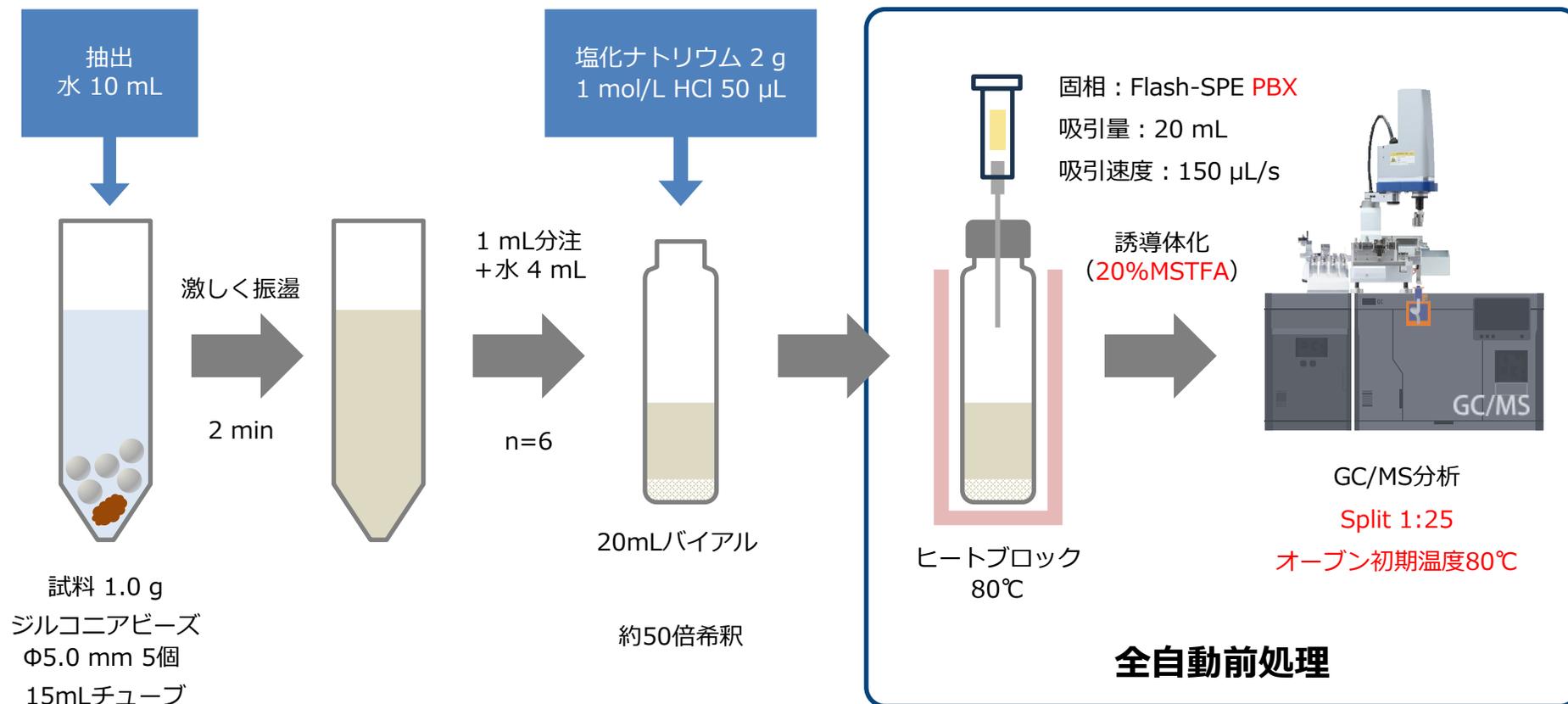
前処理ユニット



大量注入口

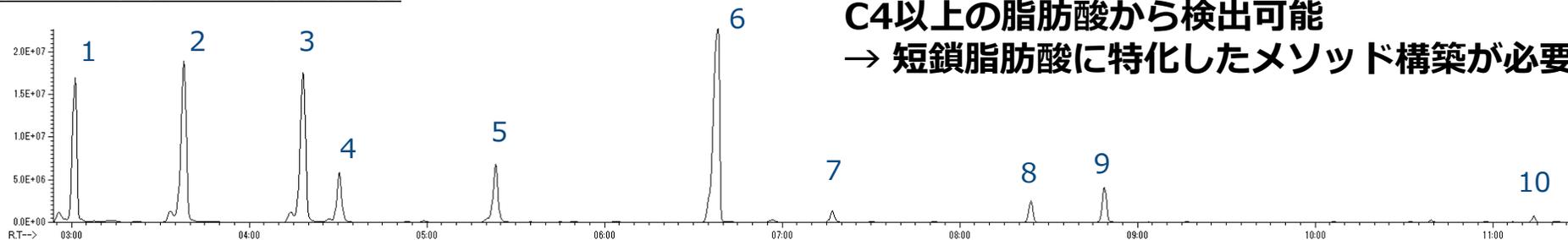
# 汎用分析フローでの初期検討

**主な対象成分：低沸点化合物全般**



# 定性結果、再現性

トータルイオンクロマトグラム例



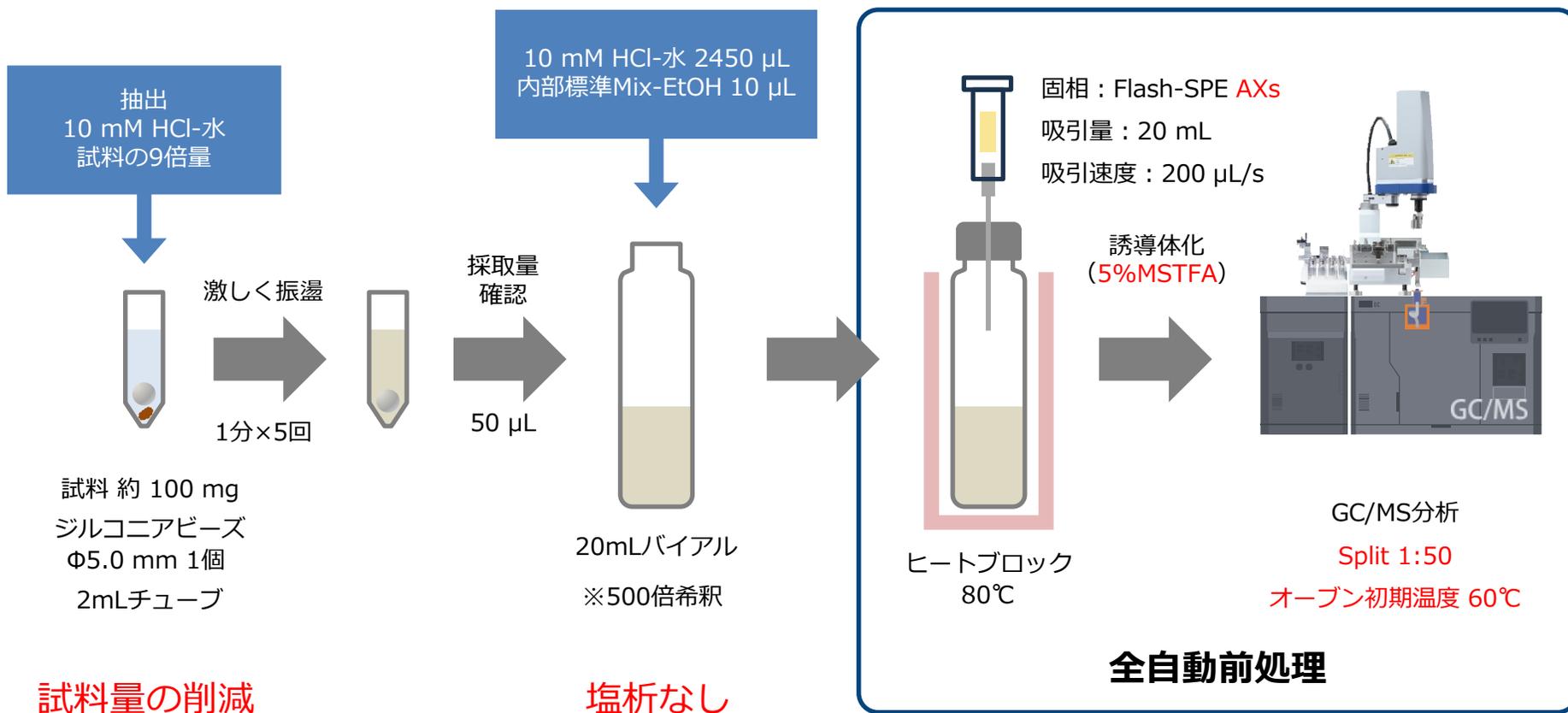
C4以上の脂肪酸から検出可能  
→ 短鎖脂肪酸に特化したメソッド構築が必要

表：糞便試料より検出された代表的なピークの面積値の平均および再現性 (n=6)

#	成分名	水	糞便1	糞便2	糞便3	糞便4	糞便5	糞便6	平均	RSD%
1	<b>Isobutyric acid-TMS (C4)</b>	17,970	3,503,129	3,291,538	3,421,584	3,401,998	3,053,050	3,284,376	3,325,946	4.7
2	<b>Butyric Acid-TMS (C4)</b>	24,134	4,408,520	4,278,964	4,364,995	4,420,271	4,105,806	4,342,242	4,320,133	2.7
3	<b>2-Methylbutyric acid-TMS (C4)</b>	1,225	4,155,934	4,091,677	4,257,590	4,171,624	4,035,839	4,107,760	4,136,737	1.8
4	<b>Isovaleric acid-TMS (C5)</b>	2,112	1,198,388	1,175,759	1,255,535	1,260,825	1,179,307	1,204,483	1,212,383	3.1
	4-Methyl-1-pentanol-TMS	177	10,673	10,565	11,127	10,624	10,358	10,052	10,566	3.4
5	<b>Valeric acid-TMS (C5)</b>	755	1,478,703	1,438,164	1,500,447	1,542,081	1,536,758	1,473,282	1,494,906	2.7
	1-Hexanol-TMS	71	1,843	1,805	1,959	1,834	2,060	1,947	1,908	5.1
6	<b>4-Methylvaleric acid-TMS (C6)</b>	300	3,926,848	3,843,768	4,008,691	4,024,032	4,131,461	3,987,064	3,986,977	2.4
	Phenol-TMS	2,601	96,314	91,255	94,989	98,048	100,574	94,510	95,948	3.3
7	<b>Hexanoic acid-TMS (C6)</b>	397	220,931	211,427	225,320	230,131	233,736	215,642	222,864	3.8
8	<b>Heptanoic acid-TMS (C7)</b>	1,306	302,831	276,880	303,569	305,291	309,230	287,691	297,582	4.2
9	p-Cresol-TMS	115	1,062,692	981,380	1,018,460	1,072,148	1,092,068	1,004,368	1,038,519	4.2
10	Benzeneacetic acid-TMS	1,838	175,511	170,660	165,755	186,463	207,368	172,556	179,719	8.5

# 短鎖脂肪酸用分析フロー

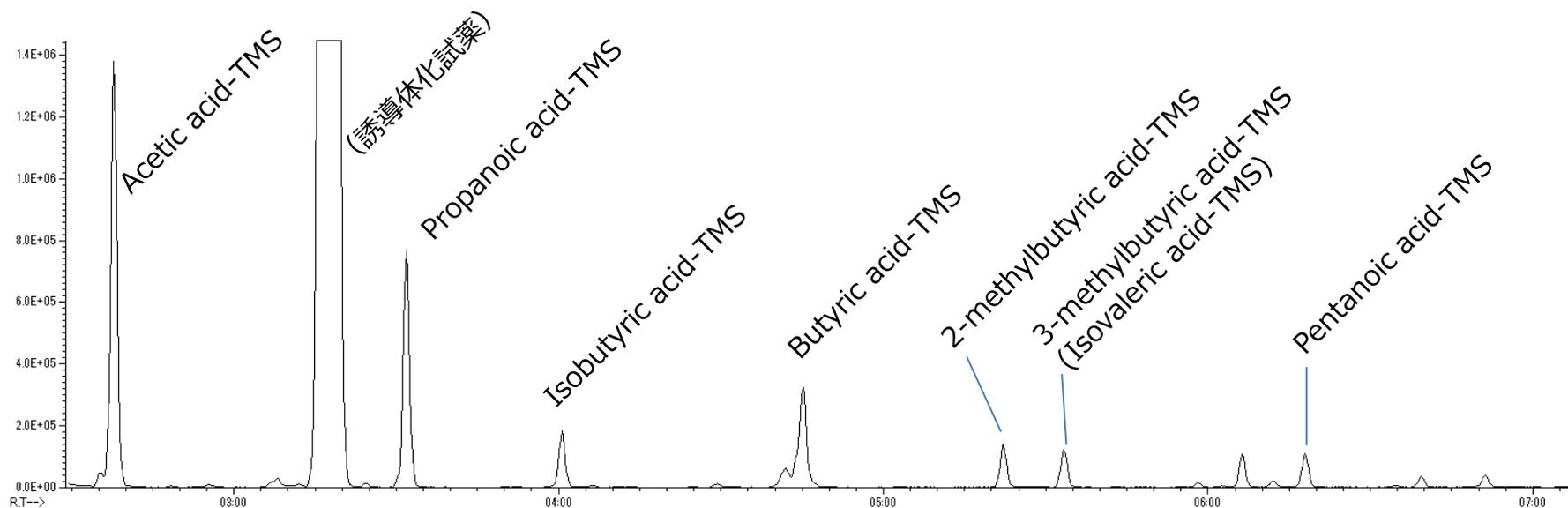
対象成分：短鎖脂肪酸 (C2~C6)



# 糞便中短鎖脂肪酸分析結果

## GC/MS トータルイオンクロマトグラム

※内部標準物質未添加



誘導体化反応により  
良好なピーク形状が得られた

# 糞便試料における併行精度

## 再現性

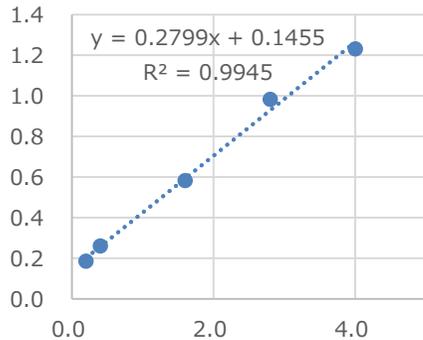
成分名	内部標準物質に対する相対面積値, N.D.: Not Detected (絶対面積値<1000)								
	水 (Blank)	糞便1	糞便2	糞便3	糞便4	糞便5	糞便6	平均	RSD (%)
Acetic acid-d4-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—
Acetic acid-TMS	0.172	1.649	1.614	1.666	1.629	1.616	1.670	1.641	<b>1.5</b>
Propionic acid-TMS	0.085	0.692	0.691	0.673	0.705	0.670	0.763	0.699	<b>4.8</b>
Isobutyric acid-TMS	N.D.	0.190	0.198	0.174	0.181	0.188	0.197	0.188	<b>5.0</b>
Butyric acid-TMS	N.D.	0.377	0.361	0.351	0.354	0.348	0.366	0.359	<b>3.0</b>
Crotonic acid-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—
Isovaleric acid-TMS	N.D.	0.199	0.204	0.191	0.192	0.196	0.193	0.196	<b>2.6</b>
Valeric acid-TMS	N.D.	0.143	0.157	0.148	0.156	0.138	0.136	0.147	<b>6.1</b>
Tiglic acid-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—
Hexanoic acid-TMS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
Hexenoic acid-TMS (IS)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	—

各炭素数に応じた内部標準物質の補正によって良好な再現性が得られた

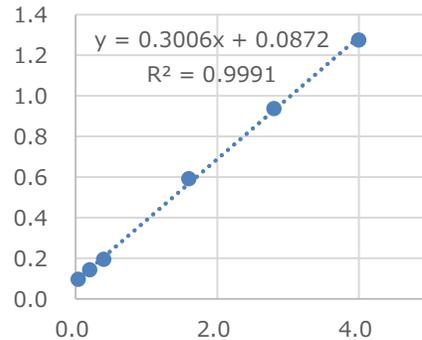
# 標準試料における直線性

## 直線性

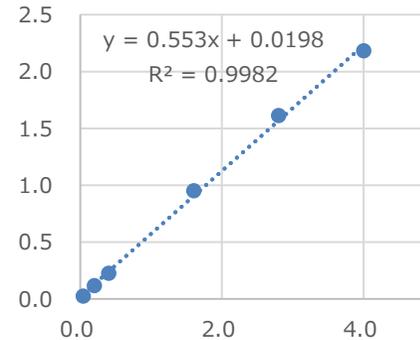
Acetic acid-TMS



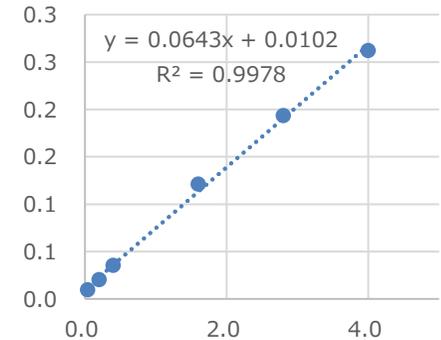
Propionic acid-TMS



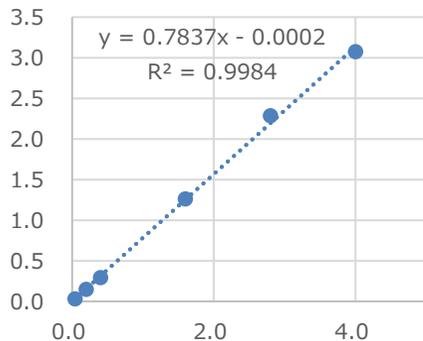
Isobutyric acid-TMS



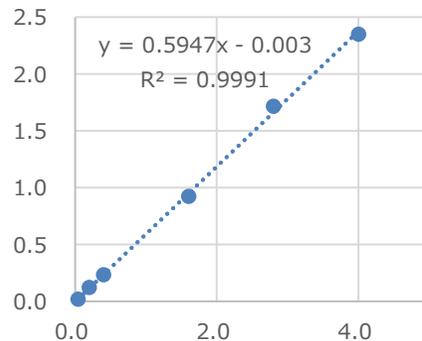
Butyric acid-TMS



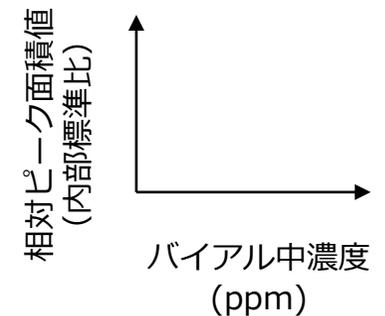
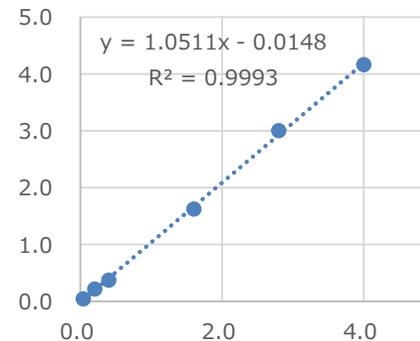
Isovaleric acid-TMS



Valeric acid-TMS



Hexanoic acid-TMS



バイアル中濃度 0.04~4 ppmで直線性を確認 (酢酸のみ 0.2 ppm~)

# まとめ&展望

- 糞便中短鎖脂肪酸の既存分析法における課題を解決するため、オンラインSPE-GCシステムを用いた気相成分の固相捕集-誘導體化-溶媒溶出法を検討した。
- 低極性成分の分析メソッドをベースに最適化を行い、酢酸（C2）からヘキサン酸（C6）までの短鎖脂肪酸について良好な再現性と直線性を示すメソッドを構築した。
- 今後は糞便採取キットによる保存液からの分析フローを検討し、現場で運用可能なメソッド構築を行っていく。

# ご清聴ありがとうございました

ポスター発表（P-46）も行いますので  
ご質問いただけますと幸いです