



**RESULTADOS**

Identificación del Cliente	Técnico Responsable
<b>Usuario (IP): Roberto Álvarez Lafuente</b>	<b>Estefanía García/ Cristina Gutiérrez</b>
<b>Facultad de Óptica</b>	
<b>Departamento: Bioquímica</b>	Fecha análisis: <b>26/09/17-29/09/17</b>
<b>Universidad Complutense de Madrid</b>	
Número de solicitud de servicio: <b>17-495;17-496;17-501</b>	
Fecha de recepción de muestra/s: <b>26/09/17-28/09/17</b>	
Código/s de muestra/s: 2017/EM/2109-2017/EM/2173; 2017/EM/2181-2017/EM/2194	
Referencia de los análisis: <b>Acetato, propionato, butirato</b>	
Tipo de análisis: <b>Análisis Cuantitativo mediante MRM (LC-QQQ-MS)</b>	

**Analytical Conditions**

- Injection volume: 10  $\mu$ L
- Gradient mode: 20% phase B for 2 min, to 40% phase B to 7 min; from 40 to 100 % phase B till 7.5 min; Return to initial conditions from 8-9 min
- Phase A: H<sub>2</sub>O + 0.01% FA  
Phase B: Acetonitrile + 0.01% FA
- Flow: 0.6 mL/min
- Run time: 10 min
- MRM Transitions

**Acetate**

Quantifier (m/z): 194.0 >152.1(CE:18 V)

Qualifier (m/z): 194.0 >137.05 (CE: 21 V)

**Propionate**

Quantifier (m/z): 208.2 >137.05(CE:20 V)

Qualifier (m/z): 208.2 >165.15 (CE: 15 V)

**Butyrate**

Quantifier (m/z): 222.1 >137.00 (CE:20 V)

Qualifier (m/z): 222.1 >152.05 (CE: 16 V)

- Column: Phenomenex Gemini 5u C18 110 A 150x2mm

## **Standard preparation**

The standard mix with 500 mg/L of acetic, propionic and butyric acid (sigma) was prepared in acetonitrile:water (1:1) solution. Derivatization was carried out mixing 40  $\mu\text{L}$  of standard mix with 20  $\mu\text{L}$  of 200 mM 3-NPH and 20  $\mu\text{L}$  of 120 mM EDC in 6% pyridine. The incubation time was 30 min and 40 °C. Then samples were dissolved in 1920  $\mu\text{L}$  of 10% acetonitrile and diluted in 1:1 ratio with ACN:H<sub>2</sub>O (1:1). Finally samples were filtered with 0.22  $\mu\text{m}$  PTFE filters and analyze by LC-ESI-QQQ 8030 Shimadzu mass spectrometer.

3-NPH: 3-Nitrophenylhydrazine hydrochloride

EDC: N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride

## **Plasma sample preparation**

Proteins were precipitated with equal volume of ACN:H<sub>2</sub>O (1:1). After 10 minutes of centrifugation, at 4 °C, derivatization was carried out mixing 40  $\mu\text{L}$  of samples with 20  $\mu\text{L}$  of 3-NPH and 20  $\mu\text{L}$  of 120 mM EDC in 6% pyridine. The incubation time was 30 min and 40 °C. Then samples were diluted with 920  $\mu\text{L}$  of 10% acetonitrile. Finally samples were filtered with 0.22  $\mu\text{m}$  PTFE filters and analyze by LC-ESI-QQQ 8030 Shimadzu mass spectrometer.

## Results

Sample name	Acetate Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	Propionate Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	Butyrate Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )
11440	27,9	4,2	5,1
11444	29,5	5,5	4,7
11597	30,6	ND	3,0
11604	24,7	ND	ND
11906	29,6	7,3	ND
11907	31,1	7,1	3,2
11918	22,8	6,3	4,4
11929	32,9	6,8	5,2
1	63,2	7,6	9,1
2	26,5	4,4	3,4
3	72,4	8,7	6,6
4	52,8	5,7	4,5
5	49,2	5,0	4,8
6	53,8	9,2	5,1
7	157,8	5,9	4,7
8	49,1	3,7	4,5
9	49,4	5,6	6,2
10	49,1	3,9	4,3
11	384,3	15,4	9,3
12	46,3	6,4	5,5
13	38,8	5,5	4,5
14	64,7	6,6	8,9
15	57,6	8,1	8,1
16	15,1	3,1	3,1
17	26,1	5,9	6,1
18	23,4	3,6	3,6
19	13,3	4,4	4,4
20	21,9	4,3	3,9
21	40,3	4,5	4,9
22	34,4	3,8	5,2
11714	25,0	6,1	ND
11715	22,7	6,0	ND
11728	18,1	6,3	3,7
11620	33,8	5,0	5,8
11591	24,4	4,1	4,2
23	23,6	3,3	2,9
24	27,1	3,5	4,6
25	25,0	5,2	5,1
26	19,1	2,3	4,2
27	46,7	4,7	5,1
28	38,4	4,8	ND
29	23,9	3,8	2,2
30	21,0	2,3	ND

31	17,2	2,5	3,0
32	22,4	2,8	3,2
33	23,9	2,7	3,5
34	27,9	3,6	4,1
35	34,9	3,3	4,0
36	30,8	3,5	5,3
37	51,0	3,3	5,2
38	30,3	4,9	3,0
39	31,3	3,4	4,5
40	38,3	3,7	3,2
41	32,7	2,7	2,5
42	30,3	3,7	4,3
43	24,4	3,5	3,0
44	16,7	2,8	3,2
45	17,0	2,9	3,2
46	21,0	2,8	3,5
47	32,5	4,1	4,4
11562	22,5	ND	3,4
11564	24,3	ND	ND
11579	22,6	ND	4,4
48	25,5	ND	1,6
49	11,7	ND	ND
50	24,3	ND	ND
51	15,0	2,1	ND
52	14,0	1,7	ND
53	15,8	1,8	2,7
54	18,4	1,9	2,7
55	19,6	1,9	2,0
56	14,0	2,0	2,1
57	25,9	2,3	3,4
58	8,2	2,4	2,1