

使用有机酸快速分析色谱柱 Shim-pack™ Fast-OA 提高肠道菌群研究的工作效率

最近研究表明，肠道菌群有助于维持和促进宿主的健康。在肠道菌群研究领域，全面测定代谢产物需要使用质谱仪，但在目标明确的情况下（例如，对通过微生物代谢生成的短链脂肪酸进行定量），一般使用 HPLC。

在这里为您介绍从猴粪便中萃取代谢产物，使用有机酸快速分析色谱柱测定粪便中所含短链脂肪酸的示例。

M. Nakashima, T. Hattori

■ 标准试样的分析例

Shim-pack Fast-OA 是离子排斥模式的色谱柱，分离以短链脂肪酸为首的酸性化合物。保留行为随流动相组成和温度而变化，因此，根据分析物化合物的不同调整柱温，进行条件优化。图 1 所示为 35 ~ 50°C 下的短链脂肪酸保留时间。从中可知，洗脱顺序不会因温度的变化而发生变动，通过提高温度，可以使保留变弱。在不影响分离的情况下，本研究中采用了分析时间更短的 50°C。

使用同为离子排斥模式色谱柱的 Shim-pack SCR-102H 和 Shim-pack Fast-OA 对短链脂肪酸混合标准液 6 种成分进行分析时的分析条件如表 1 所示，色谱图如图 2 所示。使用 Shim-pack SCR-102H 时，每个样品的分析时间需要 30 分钟左右，而在使用 Shim-pack Fast-OA 时，可以在 10 分以内洗脱强保留的戊酸峰。

Shim-pack SCR-102H 色谱柱长 300mm，可实现高分离度，但像本次这样分析短链脂肪酸时，则存在分析时间过长的问题。离子排斥色谱法很难通过变更分析条件等措施大幅缩短分析时间，但与过去相比，颗粒直径小，并可以根据分析对象选择色谱柱数量的 Shim-pack Fast-OA 可以有效缩短分析时间。

表 1 分析条件

Column	: Shim-pack Fast-OA (100 mm L. × 7.8 mm I.D., 5 μm) Shim-pack SCR-102H (300 mm L. × 8.0 mm I.D., 7 μm)
Guard column	: Shim-pack Fast-OA (G) Shim-pack SCR-102H (G)
Mobile phase	: 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid (有机酸分析流动相试剂套装 流动相)
Flow rate	: 0.8 mL/min
pH buffering solution	: 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid 20 mmol/L Bis-Tris 0.1 mmol/L EDTA (有机酸分析流动相试剂套装 pH 缓冲化试剂)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Column temperature	: 50 °C
Detection	: Conductivity detector (CDD-10Avp)
Injection volume	: 10 μL

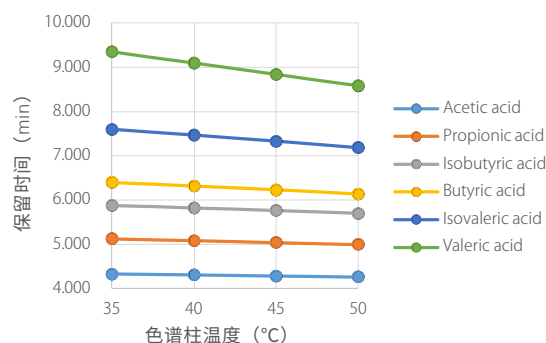


图 1 短链脂肪酸的保留行为

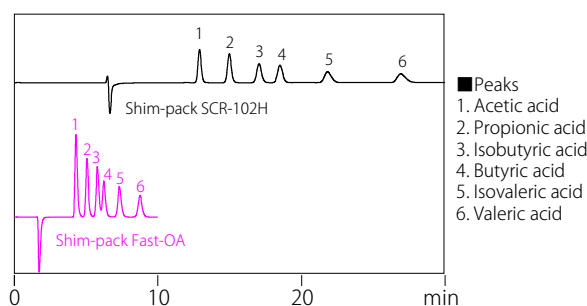


图 2 标准试样的色谱图 (各 500mg/L)

■ 标准曲线

针对各短链脂肪酸制作了 5, 10, 50, 100, 500, 1000 (mg/L) 浓度范围的标准曲线。对线性和 5 mg/L 样品的面积重现性进行评价的结果如表 2 所示。得到了 $r^2 > 0.999$ 、面积 RSD < 5% 的良好结果。

表 2 线性和面积重现性

	Linearity (r^2)	Reproducibility (N=6, %RSD)
Acetic acid	0.9997	1.36
Propionic acid	0.9997	3.51
Isobutyric acid	0.9997	2.48
Butyric acid	0.9998	2.24
Isovaleric acid	0.9999	3.40
Valeric acid	0.9997	1.95

■ 样品及预处理

作为试样使用的猴粪便现场冷冻，在 -80°C 条件下冷冻保存。图 3 所示为预处理步骤。向 100 mg 的粪便中加入 700 μL 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 后进行搅拌，对上清液进行离心分离并超滤，获得用于分析的样品。

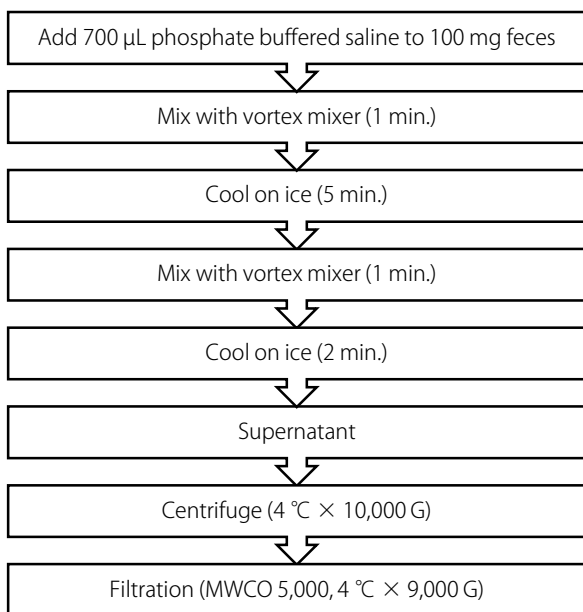


图3 猴粪便的预处理方法

实际试样分析

猴粪便样品分别在 A、B、C 三点采集共计 5 只猴子的粪便。样品详情如表 3 所示，采集地点如图 4 所示。

样品名	采样地点	猴	截至冷冻处理的过程
1	A 地点	不明	经过半天~1 天
2	B 地点	4 岁雄	排泄后
3	B 地点	2 岁雄	排泄后
4	C 地点	成年雌	排泄后
5	C 地点	成年雌	排泄后

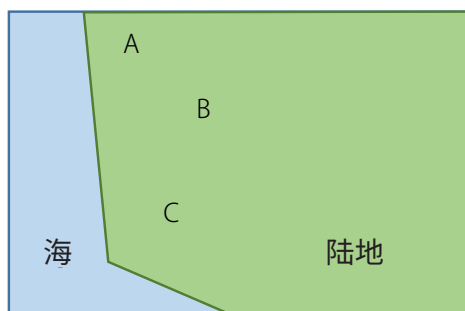


图4 采样地点简图

按照图 3 所示的步骤对上述 5 个样品进行预处理后，按照表 1 所示的条件（使用 Shim-pack Fast-OA）进行 HPLC 分析。图 5 所示为样品 2 的色谱图。在 t_0 (2.5 min) 附近观察到了预处理中引入的磷酸缓冲液峰，但在肠道菌群的研究领域特别重要的、在乙酸之后洗脱的短链脂肪酸谱峰（图 5、4 min 以后）可以准确定量。

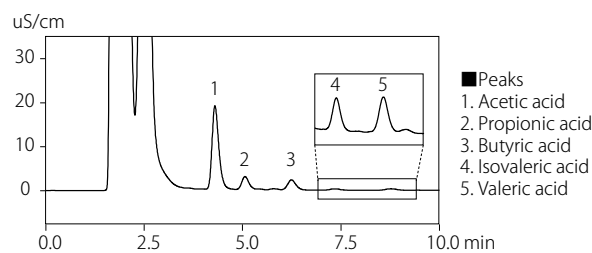


图5 样品 2 的色谱图

表 4 所示为样品 1~5 的各短链脂肪酸含量。样品 1 从排泄至采集经过了一定的时间，因此，几乎不存在短链脂肪酸。可能是因为短链脂肪酸在从排泄至采集期间因为挥发，或者通过粪便中的微生物代谢而损失。基于上述原因，为了通过粪便准确测肠道菌群的影响，需要在排泄后尽可能短的时间内采集样品，并且在防止微生物代谢和挥发的条件下进行存放。

表 4 各样品的短链脂肪酸含量

	Amount of compounds ($\times 10^{-2}$ mol/kg)					
	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Valeric acid
Sample 1	0.042	-----	-----	-----	-----	-----
Sample 2	5.6	0.99	-----	1.0	0.16	0.23
Sample 3	5.5	0.96	-----	0.90	0.19	0.34
Sample 4	5.8	1.3	-----	1.2	-----	0.25
Sample 5	6.3	0.88	-----	0.84	-----	0.23

总结

短链脂肪酸是肠道菌群研究中的常见分析对象。本研究使用 Shim-pack Fast-OA 在 10 分钟以内完成了短链脂肪酸的定量分析，且不受杂质的影响。在对 5 只猴子的粪便中短链脂肪酸含量进行测定后发现，排泄后经过半天以上的检体几乎不存在短链脂肪酸，而在排泄后立即实施冷冻处理的检体则可以高灵敏度地测定短链脂肪酸。

岛津应用云



在编写本应用新闻之际，获得了提供猴粪便并提供指导的中部大学 创发学术院的牛田一成教授的大力协助。Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020 年 2 月