

Application News

No. L516

高效液相色谱法

有机酸分析系统对肠道菌群研究的应用

近年来，逐渐阐明了肠道内的肠道菌群对宿主的健康维护具有增进效果。肠道菌群给宿主带来的有益影响被认为与肠道菌群产生的代谢产物有关。¹⁾

此类代谢产物中含有多种物质，因此可考虑采用 LC-MS 进行分析，但 LC-MS 的流动相中会用到甲酸和乙酸，因此无法对上述有机酸进行检测。

相对于此，HPLC 的离子排斥模式与柱后反应检测法相结合的方法（柱后缓冲电导法）不会使用甲酸和乙酸作为流动相，因此能够高灵敏度和选择性的检测出含有甲酸和乙酸的有机酸。

在此，我们对采用有机酸分析系统测定小鼠粪便提取物中肠道菌群产生的短链脂肪酸代谢产物的示例进行介绍。

Y. Oka

■ 标准样品溶液的分析

分析条件如表 1 所示。进样 10 μL 标准溶液(各 20 mmol/L)的结果如图 1 所示。

表 1 分析条件

Column	: Shim-pack SCR-102H (300 mmL. \times 8.0 mm I.D.) \times 2
Guard column	: Guard column SCR-102H (50 mmL. \times 6.0 mm I.D.)
Mobile phase	: 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid
Flow rate of mobile phase	: 0.8 mL/min
pH buffering solution	: 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid 20 mmol/L Bis-Tris 0.1 mmol/L EDTA
Flow rate of pH buffering solution	: 0.8 mL/min
Column temp.	: 45 $^{\circ}\text{C}$
Detection	: Conductivity detector (CDD-10Avp)
Injection vol.	: 10 μL

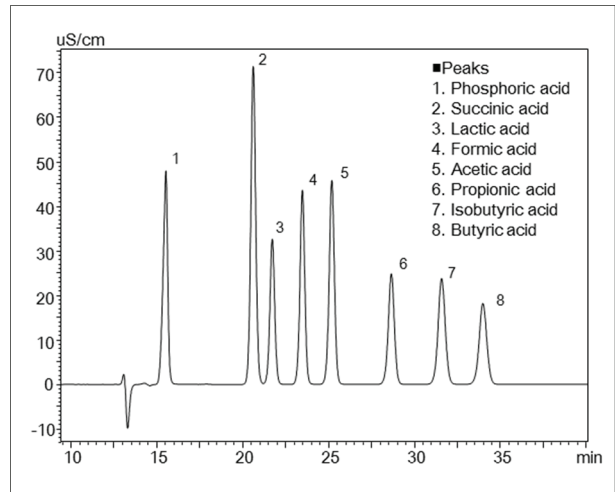


图 1 标准溶液的色谱图

■ 校准曲线

在表 1 的条件下分析的丙酸的校准曲线如图 2 所示。在 0.1 ~ 2.0 mmol/L 和 1.0~20 mmol/L 的范围内制作了校准曲线。各成分线性良好，线性相关系数 R^2 在 0.999 以上。

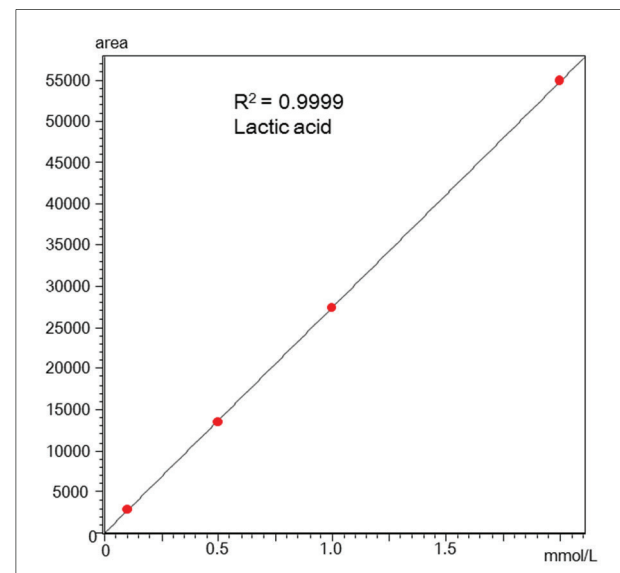


图 2 校准曲线

有机酸分析流动相试剂组

有机酸分析流动相试剂组是制备完毕的流动相和 pH 缓冲剂的套装，开封后必须立即使用的。不仅能减少制备溶液花费的时间和成本（※），还能降低制备错误的风险，使分析过程一直保持稳定。※ 每年能削减约 7 万日元的成本（本公司的估算值）



图 3 有机酸分析流动相试剂组

预处理

从小鼠粪便提取代谢产物所需的预处理流程如图 4 所示。¹⁾

回收在通常环境下饲养的 C57BL/6J 小鼠的粪便，向新鲜粪便 50 mg 中添加磷酸盐缓冲液 450 μ L 后，搅拌，离心分离上清液，经超滤后供作测量用样本。

小鼠粪便提取液的分析

进样 10 μ L 小鼠粪便提取液的结果如图 5 所示。检测出了用 LC-MS 难以检测的、含乙酸和甲酸在内的 7 种成分。

各成分的定量结果如表 2 所示。

表 2 定量结果

No.	Compounds	:	Quantitative value (mmol/L)
1	Phosphoric acid	:	7.88
2	Succinic acid	:	0.07
3	Lactic acid	:	0.26
4	Formic acid	:	0.13
5	Acetic acid	:	2.69
6	Propionic acid	:	0.59
8	Butyric acid	:	0.61

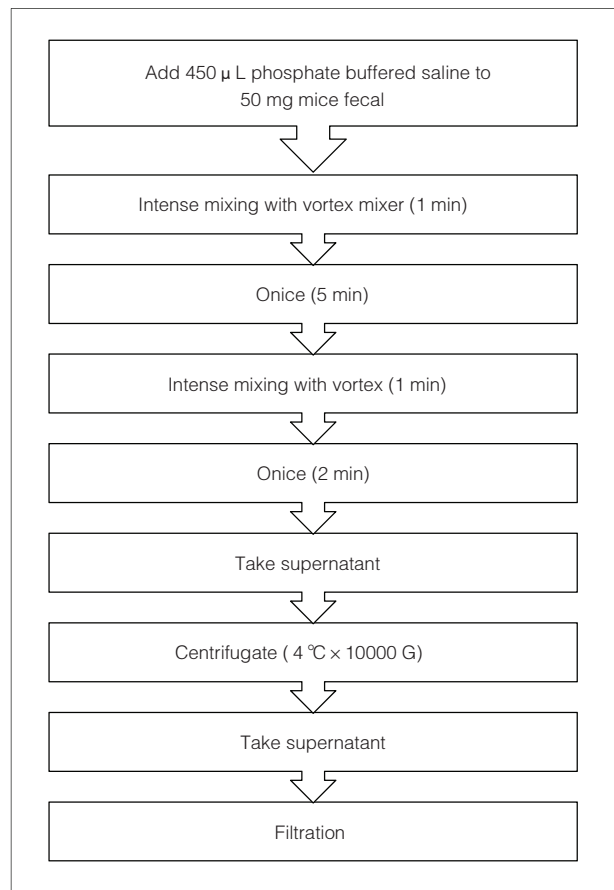


图 4 预处理的流程图

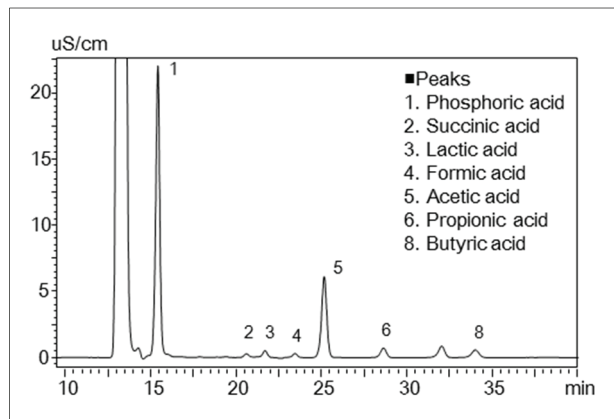


图 5 小鼠粪便提取液的色谱图

参考文献

- 1) M. Matsumoto, R. Kibe, T. Ooga, Y. Aiba, S. Kurinara, E. Sawaki, Y. Koga, Y. Benno: Scientific Reports 2, 223 (2012).
- 2) 星清子, 大肠内容物的有机酸测量方法: 消化道的营养、生理和肠内细菌 11-25 (2011)

注) 未对粪便进行均匀搅拌时, 使用均质化用的研钵将其粉碎, 之后在漩涡混合器中搅拌。

※ 本测量中使用的样本由协同乳业株式会社的松本老师提供。



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: 2017 年 3 月