

Application News

No. L516

高速液体クロマトグラフィー

有機酸分析システムの腸内細菌叢研究への応用

近年、腸管内の腸内細菌叢が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになりつつあります。すなわち、腸内細菌叢による宿主への影響を考える上で、腸内細菌叢が産生する代謝物が関係していると考えられます。¹⁾

こうした代謝物には、数多くの物質が含まれることから、LC-MS を用いて分析することが考えられますが、LC-MS では、ぎ酸や酢酸を移動相に用いるため、これらの有機酸を検出することはできません。

これに対し、HPLC によるイオン排除モードとポストカラム反応検出法を組み合わせた方法（ポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法）では、ぎ酸や酢酸を移動相に用いないため、ぎ酸や酢酸を含む有機酸を高感度かつ選択的に検出することができます。

ここでは、マウス糞便から代謝物を抽出し、腸内細菌叢が産生する代謝物中に含まれる短鎖脂肪酸を有機酸分析システムにより測定した例をご紹介します。

Y. Oka

■ 標準試料溶液の分析

表 1 に分析条件を示します。図 1 に標準溶液 (各 20 mmol/L) を 10 μ L を注入した結果を示します。

表 1 分析条件

Column	: Shim-pack SCR-102H (300 mmL x 8.0 mm I.D.) x 2
Guard column	: Guard column SCR-102H (50 mmL x 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 $^{\circ}$ C
Detection	: Conductivity detector (CDD-10Avp)
Injection vol.	: 10 μ L

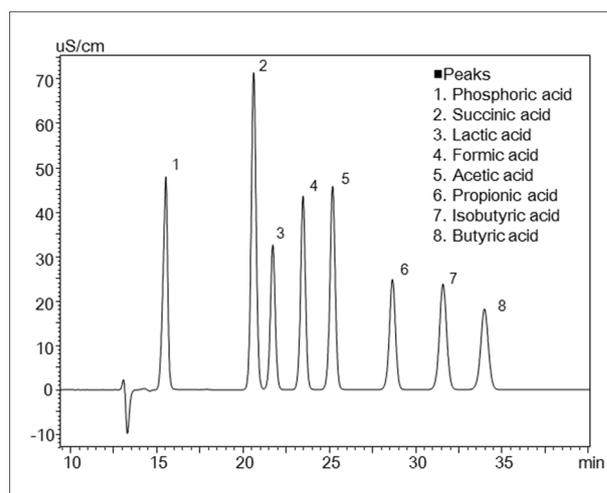


図 1 標準溶液のクロマトグラム

■ 検量線

図 2 に表 1 の条件で分析したプロピオン酸の検量線を示します。0.1~2.0 mmol/L 及び 1.0~20 mmol/L の範囲で検量線を作成しました。各成分とも、寄与率 $R^2 = 0.999$ 以上と良好な直線性が得られました。

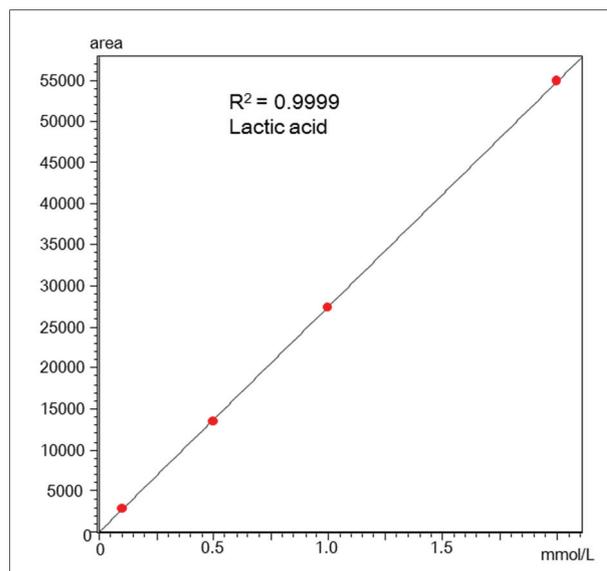


図 2 検量線の直線性

■有機酸分析移動相試薬セット

有機酸分析移動相試薬セットは、開封後すぐに使用いただける調製済みの移動相と pH 緩衝化試薬のセットです。溶液調製にかかる時間やコストを削減(※)するだけでなく、調製ミスリスクを低減し常に安定した分析ができます。
※年間約7万円のコスト削減(当社試算値)



図3 有機酸分析移動相試薬セット

■前処理

図4にマウス糞便から代謝物を抽出するための前処理フローチャートを示します。¹⁾

通常環境下で飼育した C57BL/6J マウス糞便を回収し、新鮮糞便 50 mg にリン酸緩衝生理食塩水 450 μ L を添加後、攪拌し、その上清を遠心分離、限外濾過したものを測定用サンプルとしました。²⁾

■マウス糞便抽出液の分析

図5にマウス糞便抽出液を 10 μ L を注入した結果を示します。LC-MS では検出困難な酢酸やギ酸を含む7成分が検出されました。

表2に、各成分の定量結果を示します。

表2 定量結果

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

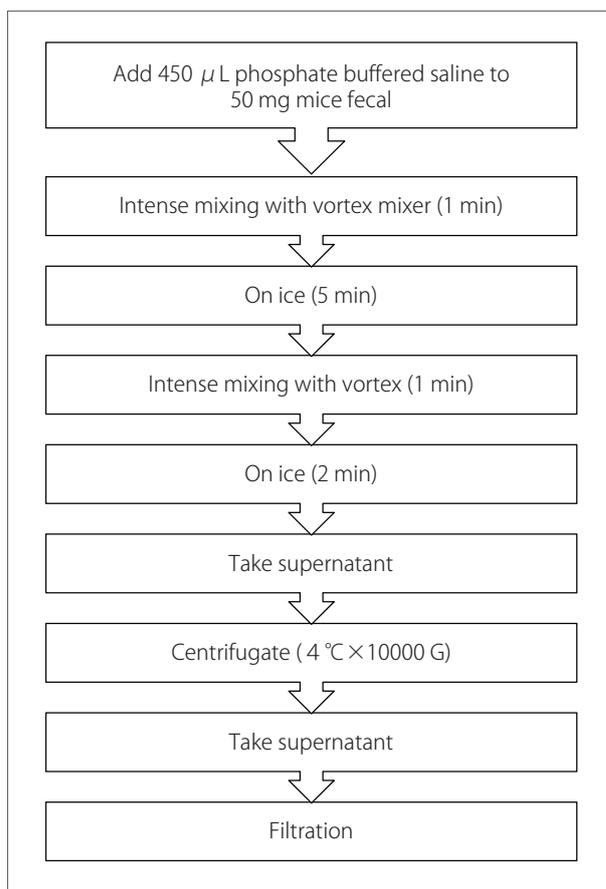


図4 前処理のフローチャート

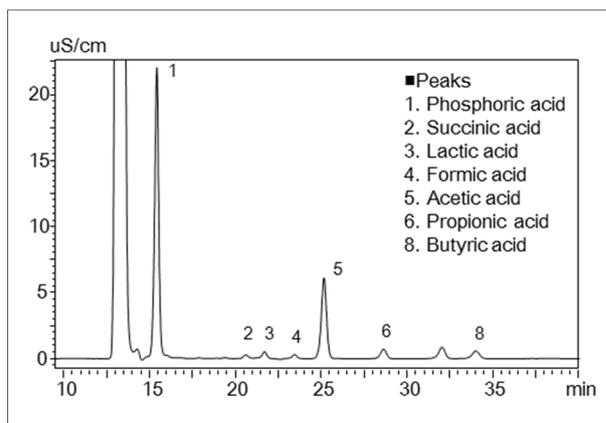


図5 マウス糞便抽出液のクロマトグラム

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, 大腸内容物の有機酸測定方法: 消化管の栄養・生理と腸内細菌 11-25 (2011)

注) 糞便が均一に攪拌しない場合は、ホモジナイゼーション用のペッセルを用いて粉碎した後、ボルテックスミキサーにて攪拌します。

※本測定に際し、協同乳業株式会社 松本様よりサンプルをご提供いただきました。