

文章编号:2095-7386(2019)03-0013-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2019.03.003

小鼠肠道内容物中短链脂肪酸提取与检测方法

桂黎凤,阮梦成,王华林,刘志国

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023)

摘 要:通过气相色谱—质谱联用(GC/MS)快速定量分析小鼠肠道内容物中短链脂肪酸(SCFAs)含量。在水、异丙醇和吡啶(V/V/V=8:3:2)的反应体系中使用100 μ L的氯甲酸丙酯(PCF)进行一步衍生化,正己烷两步萃取,并进行GC/MS分析。该方法可以同时测定多种SCFAs。方法学研究显示,该方法具有较好的准确度、精密度以及提取回收率。运用该方法对小鼠结肠内容物中的SCFAs进行测定结果表明,乙酸含量最高,丙酸次之,戊酸最少。

关键词:短链脂肪酸;气相色谱—质谱联用;肠道内容物

中图分类号:Q-331

文献标识码:A

The establishment of a method for extraction and detection of short-chain fatty acids in intestinal contents of mice

GUI Li-feng, RUAN Meng-cheng, WANG Hua-lin, LIU Zhi-guo

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, 430023, China)

Abstract: A method for the analysis of short-chain fatty acids(SCFAs) by gas chromatography-mass spectrometry(GC/MS) was developed to rapidly and quantitatively analyze the content of SCFAs in mouse intestinal contents. One-step derivatization was carried out using 100 μ L of Propyl chloroformate(PCF) in a reaction system of water, isopropanol and pyridine(V/V/V=8:3:2) by two-step extraction with n-hexane and GC/MS analysis. The method can simultaneously measure six kinds of SCFAs of acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid and isovaleric acid. The research showed that the method had good accuracy, precision and extraction recovery. The method was applied to the determination of SCFAs in the colonic contents of normal mice. The results showed that the abundance of acetic acid was the highest, followed by propionic acid and valeric acid.

Key words: short-chain fatty acids; gas chromatography-mass spectrometry; intestinal contents

1 引言

短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)是碳原子数1—6的挥发性有机酸,由肠道微生物发酵

肠道中的膳食纤维、碳水化合物和其他植物营养素形成^[1]。结肠内容物中产生的主要SCFAs是乙酸、丙酸和丁酸。超过90%的SCFAs被盲肠和结肠吸收,其中只有5%—10%随粪便排出^[2]。SCFAs是

收稿日期:2019-04-22.

作者简介:桂黎凤(1994-),女,硕士研究生,E-mail:995966912@qq.com.

通信作者:刘志国(1963-),男,教授,博士,E-mail:zhiguo_l@126.com.

结肠上皮细胞的重要能量来源,并作为配体激活特异性 G 蛋白偶联受体以调节上皮细胞增殖和分化^[3]。SCFAs 与炎症性肠病(IBD)^[4]、2 型糖尿病^[5]和肥胖^[6]密切相关。肠道微生物群和饮食之间复杂的相互作用影响肠腔中的 SCFAs 水平^[7]。定量检测肠道中 SCFAs 能为评价肠道微生态平衡提供指标^[8]。

分析样品中的 SCFAs 含量有多种不同的方法,包括气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC/MS)和毛细管电泳(CE)^[9-14]等。其中 GC/MS 是生物样品中最常用的 SCFAs 测量方法,因为它具有更高的灵敏度。未衍生化的 SCFAs 可以通过特定毛细管柱直接分析,但定量结果显示回收率低^[15],并且由于杂质的存在会污染 GC 色谱柱。因此,衍生化通常用于提高灵敏度和减轻色谱柱污染。

本研究对肠道内容物样本中 SCFAs 的提取方法进行了优化,并建立了基于 GC/MS 的 SCFAs 分析方法。用氯甲酸丙酯(PCF)作为衍生化试剂,并用无水硫酸钠(Na_2SO_4)除水,正己烷萃取。通过对结肠内容物中 SCFAs 的方法学考证,证明该方法可应用于快速检测小鼠肠道内容物中短链脂肪酸含量,为评价肠道微生态平衡提供依据。

2 材料与方法

2.1 试剂

乙酸(纯度>99.5%,批号:A2035),丙酸(纯度>99.0%,批号:P0500),丁酸(纯度>99.0%,批号:B0754),异丁酸(纯度>99.0%,批号:I0103),戊酸(纯度>98.0%,批号:V0003),异戊酸(纯度>99.0%,批号:M0182),氯甲酸丙酯(纯度>95.0%,批号:C0929),DL-2-甲基丁酸(纯度>97.0%,批号:M0181),均购自日本 TCI 公司;无水硫酸钠(色谱纯)和正己烷(色谱纯)购自德国 CNW 公司;氢氧化钠(分析纯),异丙醇(分析纯),吡啶(分析纯),均购自国药集团化学试剂有限公司。

2.2 主要仪器

Agilent 7890B/5977B 气-质联用仪(美国安捷伦公司);D-37520 台式高速冷冻离心机(德国 Centrifuge 公司)。

2.3 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,5 周龄,体质量(20 ± 2)g,购自湖北省疾病控制中心。

2.4 方法

2.4.1 色谱及质谱条件

色谱柱为 Agilent HP-5 毛细管柱($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm ID} \times 0.25 \mu\text{m}$),氦气为载气,载气流速 1.0 mL/min 。气相条件如下:进样口温度 250°C ;分流进样 $10:1$,进样量 $1 \mu\text{L}$ 。升温程序如下:起始温度 60°C 维持 5 min ,以 10°C/min 的速度升温至 110°C ,以 35°C/min 升温至 250°C 并且维持 1 min 。

质谱条件:电子轰击电离(EI)源,全扫及 SIM 扫描方式,电子能量 70 eV ,离子源温度 230°C ,传输线温度 250°C ,四极杆温度 150°C 。

比较 GC/MS 分析图与标准谱图,确定 SCFAs 的性质。DL-2-甲基丁酸为内标,通过各样品中 SCFAs 峰面积与内标峰面积进行定量,利用 Agilent MassHunter 软件进行数据分析。

2.4.2 标准品配制

准确称量乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸,用纯水配置成 $1 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$, $20 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$, $250 \mu\text{g/mL}$, $500 \mu\text{g/mL}$ 七种标准浓度梯度。

2.4.3 标准品前处理

取 $1000 \mu\text{L}$ 的标准品(含 0.005 M NaOH),加入 $50 \mu\text{L}$ 的 1 mg/mL DL-2-甲基丁酸(溶于 0.005 M NaOH)作为内标,振荡混匀 2 min , 4°C 静置 2 h ,再次振荡混匀 2 min , 4°C , 13000 r/min 离心 20 min ;取 $500 \mu\text{L}$ 上清,加入 $300 \mu\text{L}$ 纯水, $300 \mu\text{L}$ 异丙醇, $200 \mu\text{L}$ 吡啶, $100 \mu\text{L}$ PCF 溶液进行衍生化反应,振荡至充分混匀, 25°C 超声 1 min ;加入 $300 \mu\text{L}$ 正己烷,振荡混匀 1 min , 4°C , 3000 r/min 离心 5 min ,取上清至新的 2 mL 离心管中,再加入 $200 \mu\text{L}$ 正己烷进行第二次提取,合并上清液,加无水硫酸钠去水,振荡混匀, 3000 r/min 离心 5 min ,取上清样品待 GC/MS 检测。

2.4.4 样品前处理

准确量取 200 mg 小鼠肠道内容物,加入 $1000 \mu\text{L}$ 0.005 M NaOH 水溶液,与 $50 \mu\text{L}$ DL-2-甲基丁酸,振荡混匀 2 min , 4°C 静置 2 h ,再次振荡混匀

2 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 20 min;后续操作同 2.4.3标准品前处理。

2.5 方法学研究

2.5.1 重复性实验

使用相同浓度的 SCFAs 标准品和肠道内容物 SCFAs 提取物测量日内和日间重复性,精度用相应峰面积的相对标准偏差(RSD,%)表示。

2.5.2 回收率实验

将已确定 SCFAs 含量的小鼠肠道内容物样品分别进行其 SCFAs 含量的 80%和 120%浓度加标回收测定,加标后的样品经氯甲酸丙酯衍生化,正己烷萃取,上机操作,计算回收率。

3 结果与分析

3.1 SCFAs 提取方法

将 100 μg/mL 的 SCFAs 混标分别按照上述条件

进行检测,确定各种酸的保留时间,结果如表 1 所示。

表 1 六种短链脂肪酸的保留时间

标准品	保留时间/min
乙酸	2.320
丙酸	3.431
丁酸	4.061
异丁酸	4.395
戊酸	6.719
异戊酸	6.982

SCFAs 总离子流图谱如图 1 所示。从图 1 中可知,用异丙醇和吡啶溶液进行肠道内容物样品中 SCFAs 提取能够同时分离 6 种不同的 SCFAs,且在图谱中分离良好,互相之间无干扰,符合检测要求。其中 DL-2-甲基丁酸峰能与其他峰分开,表明方法适用。

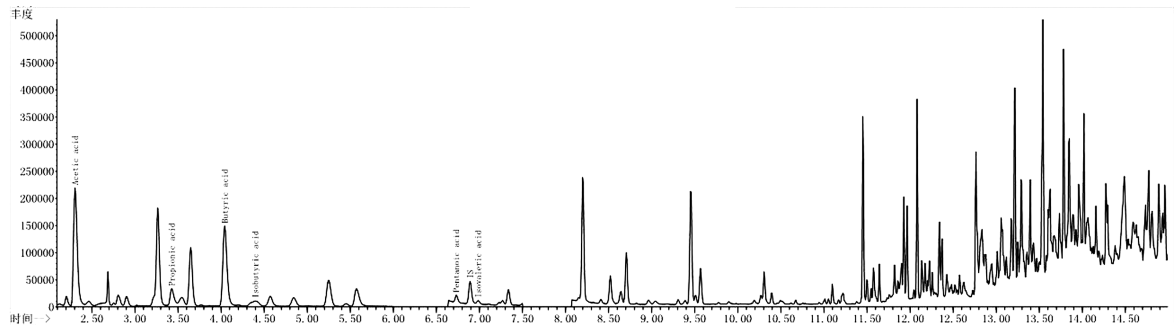


图 1 样品中 SCFAs 总离子流色谱图 TIC

3.2 方法学考察

3.2.1 线性与定量限

用 SIM 模式对 SCFAs 特征离子峰积分,以 6 种 SCFAs 与 DL-2-甲基丁酸特征离子峰的峰面积之比为纵坐标,SCFAs 浓度为横坐标绘制曲线,通

过绘制所得的曲线即可得到小鼠生物样本中 6 种 SCFAs 的标准曲线及线性相关系数。SCFAs 的浓度和峰面积比的线性关系良好, $R^2>0.99$ 。肠道内容物样本各 SCFAs 的线性范围及线性相关系数及最低定量限如表 2 所示。

表 2 小鼠肠道内容物样本各 SCFAs 标准曲线、 R^2 、线性范围、定量限

SCFAs	m/z	标准曲线	相关系数(R^2)	线性范围/(mg/L)	定量限/(mg/L)
乙酸	43	$y=2.792x-0.494$	0.996 2	10—500	10
丙酸	57	$y=2.547x+0.251$	0.998 1	10—500	10
丁酸	43	$y=2.449x+0.141$	0.997 8	1—500	1
异丁酸	43	$y=1.613x-0.301$	0.995 1	10—500	10
戊酸	85	$y=1.643x+0.268$	0.998 9	1—500	1
异戊酸	85	$y=1.803x-0.097$	0.999 8	10—500	10

3.2.2 重复性实验

日内和日间的保留时间的 RSD(%)分别为 0.01—0.12 和 0.01—0.41。日内和日间相应峰面

积的 RSD(%)分别为 0.68—2.45 和 1.75—4.14。日内和日间的重复性表明,本方法在保留时间和相应的峰面积方面都是精确的,具有较好的精密度,符

合检测要求。

3.2.3 回收率实验

对一个确定 SCFAs 含量的样品,分别进行其 SCFAs 含量的 80%和 120%浓度加标回收测定,样品中 SCFAs 的加标回收率为 85.4%—109.8%,这说明 SCFAs 经异丙醇/吡啶提取后,样品的回收率较高。

3.3 小鼠结肠内容物中 SCFAs 的定量分析

运用该方法对正常饮食小鼠结肠内容物中的 SCFAs 含量进行测定,结果如图 2 所示。样品中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸的相对丰度比为 121:35:13:15:1:6。小鼠结肠内容物中乙酸含量最高,丙酸含量次之,戊酸含量最少。

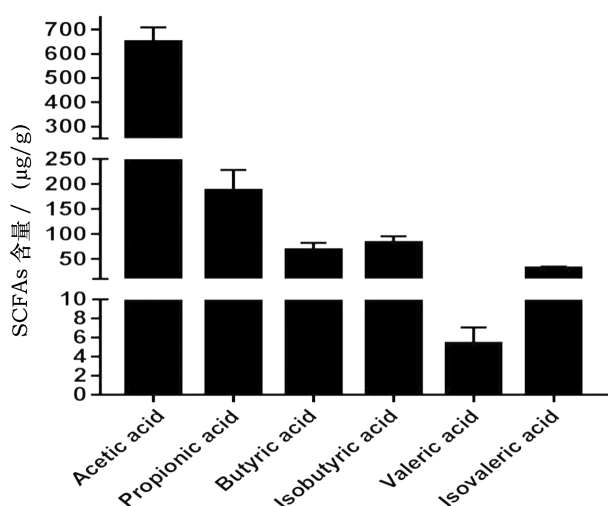


图 2 小鼠结肠内容物中的 SCFAs 浓度

4 结论

由于 SCFAs 易挥发,并且在肠道中有食物残渣和大量肠道微生物,所以肠道内容物中 SCFAs 较难提取^[16-17]。在本文中,笔者用 PCF 衍生化后进行提取^[18],水、异丙醇和吡啶是参与 PCF 触发的衍生化反应必需的衍生化溶剂^[19]。在水、异丙醇和吡啶(V/V/V=8:3:2)的反应体系中使用 100 μL 的 PCF 进行一步衍生化提供了最佳的衍生化效率,通过用正己烷两步萃取实现衍生化产物的最佳提取效率。

本研究建立了对 6 种 SCFAs 共检测的 GC/MS 定量方法,并对该方法在小鼠肠道内容物中的应用进行了方法学考证。结果表明 6 种 SCFAs 的标准曲线均具有良好线性,最低定量限达 1 mg/L。该方法表现出良好的衍生化效率和对各种浓度的回收率,每种化合物的检测限低。所有目标化合物的相对标准偏差(RSD)低,表现出良好的重复性和精密度。

结肠中 SCFAs 含量可反映结肠中代谢物的浓度^[20]。该方法成功用于测定小鼠结肠内容物中的 SCFAs 含量,提供了这些代谢物浓度的重要信息,为评价肠道微生态平衡提供依据。

参考文献:

- [1] Gill P A, van Zelm M C, Muir J G, et al. Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 48(1): 15-34.
- [2] David L, Peter M. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function_ Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3).
- [3] Blad C C, Tang C, Offermanns S. G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(8).
- [4] Kang Y, Yang G, Zhang S, et al. Goji berry modulates gut microbiota and alleviates colitis in IL-10-deficient mice[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(22).
- [5] Liping Z, Xiaoying D, Guojun W. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes[J]. *Science*, 2018, 359(6380).
- [6] Lu Y, Fan C, Li P, et al. Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota[J]. *Sci Rep*, 2016, 6.
- [7] Morrison D J, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 189-200.
- [8] 方景泉,迟涛,王菁华,等. 食品中脂肪酸分析方法的研究进展[J]. *中国乳品工业网*, 2018, 46(9): 36-41.
- [9] 耿梅梅,许丽卫,袁红朝,等. 气相色谱法测定猪结肠内容物中短链脂肪酸含量[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(6).
- [10] 王彩,高培鑫,许竞男,等. 小鼠粪便中短链脂肪酸提取与检测方法的建立及应用[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(6).

- [11] 孟拓,邓珊珊,郝海平,等. 气相色谱_质谱联用法分析肠炎小鼠短链脂肪酸代谢[J]. 药物评价研究,2018,41(6).
- [12] Garcia A,Olmo B,Lopez Gonzalvez A,et al. Capillary electrophoresis for short chain organic acids in faeces[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis ,2008,46(2).
- [13] Garcia Villalba R,Gimenez Bastida J A,Garcia Conesa M T,et al. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples[J]. J Sep Sci ,2012,35(15).
- [14] Eijk H M,Bloemen J G,Dejong C H. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to measure short chain fatty acids in blood[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci ,2009,877(8-9).
- [15] Zhao G,Nyman M,Jonsson J A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography [J]. Biomed Chromatogr ,2006,20(8).
- [16] Murugesan S,Ulloa-Martínez M,Martínez-Rojano H,et al. Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis ,2015,34(7).
- [17] Jenni Lappi H M,Knud Erik Bach Knudsen,Pirkka Kirjavainen,et al. Postprandial glucose metabolism and SCFA after consuming wholegrain rye bread and wheat bread enriched with bioprocessed rye bran in individuals with mild gastrointestinal symptoms [J]. Nutrition Journal ,2014,13(104): 1-9.
- [18] Zheng X,Qiu Y,Zhong W,et al. A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids[J]. Metabolomics ,2013,9(4).
- [19] Qiu Y,Su M,Liu Y,et al. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabonomic profiling[J]. Anal Chim Acta ,2007,583(2).
- [20] Davila A M,Blachier F,Gotteland M,et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host[J]. Pharmacol Res ,2013,68(1): 95-107.