

## 高效液相色谱法测定人和小鼠粪便中短链脂肪酸

闫晨<sup>1</sup>, 刘天宇<sup>2</sup>, 卢习角<sup>3</sup>, 金多晨<sup>2</sup>, 王斯南<sup>2</sup>, 曹海龙<sup>2\*</sup>

1. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052
2. 天津医科大学总医院 消化科, 天津 300052
3. 天津医科大学 药学院, 天津 300052

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱测定人和小鼠粪便中短链脂肪酸的方法。**方法** 样品进行衍生化处理, 采用高效液相色谱法测定乙酸、丙酸、丁酸以及戊酸。YMC-Pack FA 型色谱柱 (250 mm×6.0 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (60:40, 0.1% 三氟乙酸调节 pH 值至 4.5), 检测波长 400 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 50 °C, 进样量 20 μL。**结果** 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸分别在 0.300~6.005 mg/L ( $r=0.9992$ )、0.370~7.408 mg/L ( $r=0.9985$ )、0.441~8.811 mg/L ( $r=0.9973$ )、0.511~10.210 mg/L ( $r=0.9979$ ) 线性关系良好; 平均加样回收率分别为 93.27%、96.40%、95.67%、95.43%, RSD 值分别为 4.62%、5.42%、3.64%、3.92%。**结论** 方法操作简单, 精密性、稳定性、重复性良好, 可用于测定人、小鼠粪便中短链脂肪酸。

**关键词:** 短链脂肪酸; 乙酸; 丙酸; 丁酸; 戊酸; 粪便; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)06-1319-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.06.006

## Determination of short chain fatty acids in human and mice feces by HPLC

YAN Chen<sup>1</sup>, LIU Tian-yu<sup>2</sup>, LU Xi-jiao<sup>3</sup>, JIN Duo-chen<sup>2</sup>, WANG Si-nan<sup>2</sup>, CAO Hai-long<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
2. Department of Gastroenterology and Hepatology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
3. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for determination of short chain fatty acids in human and mice feces. **Methods** All samples were derived, and the contents of acetic acid, propionic acid, butyric acid, and pentanoic acid were determined by HPLC method. YMC-Pack FA chromatographic column (250 mm × 6.0 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol - water (0.2% trifluoroacetic acid solution regulated pH value to 4.5). The detection wavelengths were set at 400 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 50 °C, and volume of injection was 20 μL. **Results** The linear range of acetic acid, propionic acid, butyric acid, and pentanoic acid were 0.300—6.005 mg/L ( $r=0.9992$ ), 0.370—7.408 mg/L ( $r=0.9985$ ), 0.441—8.811 mg/L ( $r=0.9973$ ), and 0.511—10.210 mg/L ( $r=0.9979$ ), respectively. The average recoveries were 93.27%, 96.40%, 95.67%, and 95.43%, respectively. The corresponding RSD values were 4.62%, 5.42%, 3.64%, and 3.92%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, stable, and reproducible, which can be used for the determination of short chain fatty acids in human and mice feces.

**Key words:** short-chain fatty acids; acetic acid; propionic acid; butyric acid; pentanoic acid; feces; HPLC

生物体内的短链脂肪酸在机体细胞和分子各系统中起各种生理作用<sup>[1]</sup>, 包括乙酸、丙酸、丁酸 (异丁酸) 和戊酸 (异戊酸) 等, 其中以乙酸、丙酸、丁酸的总量为最高 (90%~95%)。肠道内的短链脂肪酸由膳食纤维被结肠内厌氧细菌 (如双歧杆菌,

拟杆菌等) 酵解产生, 可以直接为肠黏膜细胞提供能量<sup>[2]</sup>。短链脂肪酸特别是乙酸能降低结肠肠道 pH 值, 抑制结肠肠腔内有害细菌的生长, 维持肠道功能<sup>[3]</sup>。部分乙酸被吸收入血液, 进入肝脏的代谢, 参与肌肉、脾脏、心脏和脑等各组织代谢, 是机体

收稿日期: 2017-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81470796)

作者简介: 闫晨 (1982—), 男, 安徽合肥人, 主管药师, 硕士, 从事药品调剂、医院制剂等工作。E-mail: yanchen2@sina.com

\*通信作者 曹海龙, 副主任医师。E-mail: cao\_hailong@163.com

从小肠不能直接消化的碳水化合物中获取能量的主要途径。短链脂肪酸对机体的免疫调节功能有着重要影响,如丙酸盐能显著抑制肝脏内胆固醇和脂肪酸的合成,丁酸通过激活G蛋白偶联受体(GPCRS)激活途径和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制途径对免疫系统和血管内皮细胞产生的作用<sup>[4]</sup>,可影响各种细胞类型包括淋巴细胞<sup>[5]</sup>、中性粒细胞<sup>[6]</sup>和巨噬细胞<sup>[7]</sup>的功能。丁酸可以调节参与肠道细胞的增殖、分化和凋亡<sup>[8]</sup>,通过肿瘤抑制蛋白自我调节乙酰化酶的基因编码<sup>[9]</sup>。短链脂肪酸还能够抑制抗炎因子的生成,对结肠炎症反应起调节作用。此外,短链脂肪酸还可抑制肿瘤细胞的增殖,控制原癌基因的表达,促进肿瘤细胞的分化和凋亡,起到抗肿瘤的作用<sup>[10-11]</sup>。随着关于短链脂肪酸在机体中的作用研究的不断深入,越来越多的实验要求对人或实验动物粪便中短链脂肪酸含量进行方便、快捷的测定。目前的测定方法以气相色谱联用质谱(GC-MS)法最为常见,但GC-MS法测定生物体内的短链脂肪酸的设备、载气费用高昂,成为该法普遍推广的难点。本实验采用高效液相色谱法分析粪便中短链脂肪酸的含量,考察该方法的线性、稳定性、重复性及回收率试验,并尝试用该法测定人和小鼠粪便中的乙酸、丙酸、丁酸和戊酸等短链脂肪酸。

## 1 材料与试剂

GL-150B 数控金属浴(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),TD5A-WS 低速双管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),KQ-200KDE 型高功率超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),PHS-3C PH计(郑州宝晶电子科技有限公司),岛津 LC-10AT 色谱仪(日本岛津公司),HS-3120 超声脱气机(上海楚定分析仪器有限公司),SPD-10A VP Plus 紫外检测器(杭州赛析科技有限公司),Milli-Q Integral 10 超纯化水机(法国默克密理博公司)。

2-硝基苯胍盐酸盐(2-NPH-HCl)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺)盐酸盐(EDC·HCl)、*N*-(3-二甲氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐(色谱纯,天津伯维特生物技术有限公司);乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、吡啶、磷酸、氢氧化钾、乙醚(分析纯,天津市波利仪器有限公司),2-乙基丁酸、甲醇(色谱纯,天津伯维特生物技术有限公司);三氟乙酸(分析纯,美国Sigma公司)、纯化水。

健康志愿者1名,男性,体质量62 kg,25岁;SPF级4周龄雄性C57BL/6小鼠,体质量21 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号SCXK(京)2014-0004。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

YMC-Pack FA 型色谱柱(250 mm×6.0 mm,5 μm),流动相甲醇-水(60:40,0.1%三氟乙酸调节pH值至4.5),检测波长400 nm,体积流量1.0 mL/min,柱温50℃,进样量20 μL。

### 2.2 混合对照品溶液的配制

取200 mmol/L乙酸储备液、丙酸储备液、丁酸储备液、戊酸储备液、2-乙基丁酸储备液各100 μL,混合后乙醇定容至25 mL量瓶中,得0.8 mmol/L混合标准酸乙醇溶液。取混合标准酸乙醇溶液适量,加乙醇制成5.00、10.0、20.0、50.0、100 μmol/L混合标准酸乙醇溶液。

### 2.3 粪便样本处理

分别收集人、小鼠新鲜的粪便0.2~0.5 g,置离心管中,加入70%乙醇5 mL,用玻璃棒混合均匀,20℃、2 500 r/min离心10 min,收集上清液,加入适量2-乙基丁酸溶液,作为粪便分析样品,待进一步处理。

### 2.4 样品衍生化

取吡啶0.75 mL用乙醇定容至25 mL,得体积比为3%(试剂1)。称取1.196 g 1-EDC·HCl、*N*-(3-二甲氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐和94.7 μg 2-NPH-HCl,用乙醇分别定容至25 mL量瓶中,得250 mmol/L试剂2和20 mmol/L试剂3。称取3.0 g氢氧化钾溶解至水中,得15%氢氧化钾水溶液20 mL,与5.0 mL甲醇混匀(试剂4)。取85%磷酸溶液2.9 mL,用水定容至50 mL,得0.50 mol/L溶液(试剂5)。

用乙酸、丙酸、丁酸、戊酸为标准酸,2-乙基丁酸为衍生化内标物,配制成相应质量浓度的乙醇溶液作为储备液。取粪便分析样品,备用。取150 μL标准酸乙醇溶液或粪便分析样品,加入200 μmol/L内标物储备液25 μL和试剂1、2、3各150 μL作为衍生化反应剂,在60℃金属浴下反应20 min,加入100 μL试剂4混合,60℃金属浴下反应20 min。在冷却至室温后,加入1.5 mL试剂5和2 mL乙醚,振荡混合液3 min提取,3 000 r/min离心10 min。静置后取乙醚层,加入2 mL水振荡3 min,3 000

r/min 离心 10 min。静置后取乙醚层，氮气吹干。100 μL 甲醇复溶，HPLC 进样。

### 2.5 系统适应性试验

取混合对照品溶液和人、小鼠的粪便分析样品

适量，进行衍生化，进样测定，记录色谱，见图 1。结果可见乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、乙基丁酸的保留时间分别为 6.8、7.7、9.2、12.1、13.5 min，各成分基线分离良好；理论塔板数均大于 1.5。

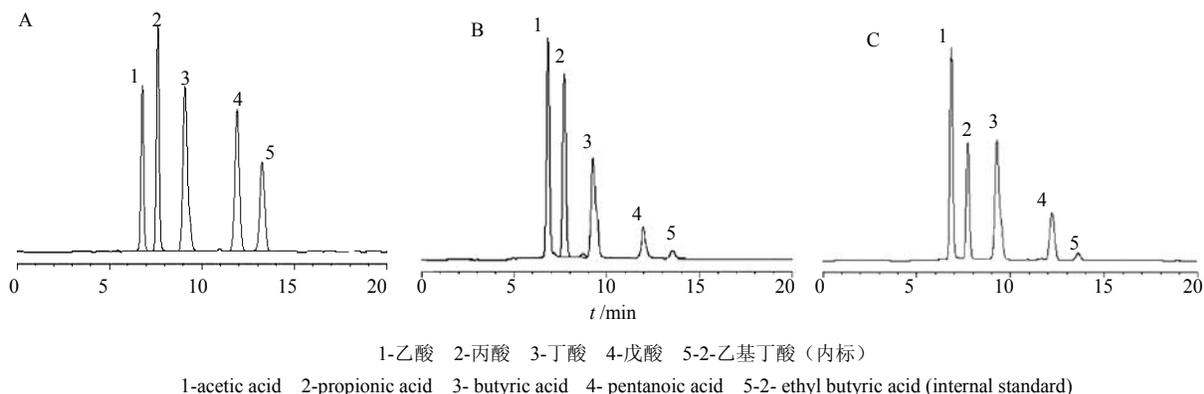


图 1 混合对照品 (A)、人粪便分析样品 (B) 和小鼠粪便分析样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), human feces samples (B), and mice feces samples (C)

### 2.6 线性关系考察

分别精确量取含乙酸、丙酸、丁酸和戊酸混合标准酸乙醇溶液 156、312、624 μL 以及 1.56、3.12 mL，用乙醇定容到 25 mL 量瓶中，得 5.00、10.0、

20.0、50.0、100 μmol/L 混合标准酸乙醇溶液，衍生化后进行测定，记录峰面积。以进样量为横坐标、峰面积为纵坐标，进行线性回归，回归方程及线性范围，见表 1。

表 1 回归方程及线性范围

Table 1 Regression equation and linear range

组分	回归方程	r	线性范围/(mg·L <sup>-1</sup> )
乙酸	Y=6 040.7 X+5 416.0	0.999 2	0.300~6.005
丙酸	Y=8 524.1 X-4 133.1	0.998 5	0.370~7.408
丁酸	Y=4 522 X+49 290	0.997 3	0.441~8.811
戊酸	Y=8 377.5 X-5 339.9	0.997 9	0.511~10.210

### 2.7 稳定性试验

取健康志愿者粪便分析样品，分别置于室温下放置 0、2、4、6、9、12 h，衍生化后进行测定，记录峰面积。结果分析样品中乙酸、丙酸、丁酸、戊酸质量分数在室温下放置 6 h 后的 RSD 值分别为 1.15%、0.84%、1.50%、2.01%；在室温下放置 12 h 后的 RSD 值分别为 2.08%、2.72%、3.32%、4.94%。结果表明样品在 12 h 内基本稳定，但在 6 h 后 RSD 值有上升的趋势，提示应尽量在 6 h 内进行衍生化操作并进行测定。

### 2.8 重复性试验

分别精确量取混合对照品溶液，衍生化后连续进样 6 次，测定并记录乙酸、丙酸、丁酸、戊酸的

峰面积，结果所测各成分峰面积的 RSD 值分别是 0.19%、0.21%、0.19%、0.23%。

### 2.9 精密度试验

精密称取同一份健康志愿者粪便，制备分析样品，衍生化后进行测定。其中 5 d 不同的实验日期进行衍生化反应和 HPLC 法进样测定；1 d 内连续进行 5 次衍生化反应和 HPLC 法进样测定，记录峰面积，计算出所测定出的短链脂肪酸的质量分数。结果乙酸、丙酸、丁酸、戊酸质量分数的日间 RSD 值分别为 1.60%、3.23%、2.84%、3.47%，日内 RSD 值分别为 0.17%、0.28%、0.33%、0.59%。

### 2.10 回收率试验

取已知含量人粪便样品共 6 份，每份约 0.25 g，

精密称定, 分别精密加入 1.501 mg 乙酸、0.741 mg 丙酸, 1.234 mg 丁酸, 0.664 mg 戊酸, 衍生化后进行测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果乙酸、丙酸、丁酸、戊酸的平均加样回收率分别为 93.27%、96.40%、95.67%、95.43%, RSD 值分别为 4.62%、

5.42%、3.64%、3.92%。

### 2.11 粪便中短链脂肪酸的测定

取人粪便、小鼠粪便适量各 3 份, 分别处理, 衍生化后进行测定。记录峰面积, 并采用标准曲线法计算短链脂肪酸的质量分数, 结果见表 2。

表 2 人、小鼠粪便样本中短链脂肪酸的测定结果 ( $n=3$ )

Table 2 Results of of short chain fatty acids in human and mice feces ( $n=3$ )

样品	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )			
	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸
人粪便	5.844	2.967	4.966	2.659
小鼠粪便	4.557	2.964	3.204	1.064

### 3 讨论

正常生理状态下, 人体肠道菌群与机体内外环境处于平衡状态。改变饮食习惯、疾病的发生和进展均可导致肠道菌群的组成、不同短链脂肪酸相对含量发生变化。有临床研究表明, 在疾病条件下, 因改变了肠道微环境, 包括肠道菌群的种类和数量, 可使肠道中的短链脂肪酸水平发生明显变化<sup>[12]</sup>。C57BL/6 小鼠是第 1 个完成基因组测序的小鼠品系, 普遍作为生理学、病理学的实验动物模型, 易于构建转基因动物模型<sup>[13-14]</sup>, 在肠道疾病研究中应用广泛, 因此建立测定 C57BL/6 小鼠粪便中短链脂肪酸的含量具有重要意义。

目前短链脂肪酸的测定方法主要有 HPLC 法、GC-MS 法、毛细管电泳法等。由于短链脂肪酸易挥发、极性高、亲水性强, HPLC 法直接分析这些化合物难度大。本实验通过衍生化过程把短链脂肪酸转变成比较稳定并具有紫外吸收特性的胂盐, 检测波长为 400 nm, 此波长受到其他物质紫外吸收的干扰小, 可以提高检测灵敏度。实验结果表明, 衍生化后采用 HPLC 法测定粪便中短链脂肪酸的含量准确度高, 线性好, 具有良好的重复性, 可以应用该方法测定粪便样本中短链脂肪酸。

图 1 中可以发现, 目标物峰前后有小峰出现。这是由于在人和小鼠粪便中的短链脂肪酸, 除了乙酸、丙酸、丁酸和戊酸外, 还包括相对少量的异丁酸、异戊酸、乳酸等其他短链脂肪酸。这其中乙酸、丙酸、丁酸和戊酸含量最多, 也是现有研究中关注最多的短链脂肪酸种类<sup>[15]</sup>。本实验中其他短链脂肪酸的小峰与目标峰之间分离度良好, 对目标物质含量测定的影响可以忽略不计。

在稳定性实验中, 超过 6 h 后测定的 RSD 值有上升的趋势。考虑由于粪便样品中存在大量的微生物, 室温条件下可持续对粪便中物质进行酵解导致偏差产生。建议采用该方法时, 应尽快对样品进行处理, 以减少偏差。

综上所述, 本方法操作简单, 精密度、稳定性、重复性良好, 可用于测定人、小鼠粪便中乙酸、丙酸、丁酸和戊酸等短链脂肪酸。

### 参考文献

- [1] Tan J, Mckenzie C, Potamitis M, *et al.* The role of short-chain fatty acids in health and disease [J]. *Adv Immunol*, 2014, 121: 91-119.
- [2] 万晓, 王新颖, 李宁. 短链脂肪酸的研究进展 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(9): 958-960.
- [3] Chambers E S, Morrison D J, Frost G. Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms [J]. *Proc Nutr Soc*, 2015, 74(3): 328-336.
- [4] Vinolo M A, Rodrigues H G, Nachbar R T, *et al.* Regulation of inflammation by short chain fatty acids [J]. *Nutrients*, 2011, 3(10): 858-876.
- [5] Bailón E, Cueto-Sola M, Utrilla P, *et al.* Butyrate *in vitro* immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(11): 863-873.
- [6] Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate-induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways [J]. *Nutrition*, 2010, 26(6): 653-661.
- [7] Chang P V, Hao L, Offermanns S, *et al.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition [J]. *Proc Natl*

- Acad Sci USA*, 2014, 111(6): 2247-2252.
- [8] Puertollano E, Kolida S, Yaqoob P. Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014, 17(2): 139-144.
- [9] Li C J, Li R W. Bioinformatic dissecting of TP53 regulation pathway underlying butyrate-induced histone modification in epigenetic regulation [J]. *Genet Epigenet*, 2014, 6(6): 1-7.
- [10] Piekarska J, Miśta D, Houszka M, *et al.* *Trichinella spiralis*: the influence of short chain fatty acids on the proliferation of lymphocytes, the goblet cell count and apoptosis in the mouse intestine [J]. *Exp Parasitol*, 2011, 128(4): 419-426.
- [11] Vinolo M A, Rodrigues H G, Hatanaka E, *et al.* Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(9): 849-855.
- [12] Mishiro T, Kusunoki R, Otani A, *et al.* Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8 [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(7): 834-843.
- [13] 章常华, 马广强, 邓永兵, 等. 葛根苓连汤对 KK-Ay 糖尿病小鼠血浆中 LPS、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及肠道菌群的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(8): 1611-1616.
- [14] 徐利满, 尹清晟, 王子璇, 等. 中药干预血脑屏障改善糖尿病认知功能障碍的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(3): 548-552.
- [15] Sivaprakasam S, Prasad P D, Singh N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 164(8): 144-151.