

【药动力学研究】

气相色谱-质谱联用法分析肠炎小鼠短链脂肪酸代谢

孟 拓, 邓珊珊, 郝海平*, 曹丽娟*

中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 建立气相色谱-质谱联用(GC/MS)的短链脂肪酸(SCFAs)分析方法, 分析肠炎小鼠 SCFAs 代谢情况。方法 盐酸饱和氯化钠溶液酸化生物样本, 醋酸乙酯提取 SCFAs 后衍生化, 建立 GC/MS 方法进行生物样本中 SCFAs 测定; 考察盐酸溶液提取和盐酸饱和氯化钠溶液提取 SCFAs 总离子流图谱; 考察 SCFAs 混合物衍生化前后的稳定性, 粪便、血清、小肠、结肠、肝脏组织中 SCFAs 测定方法的线性、精密度及准确度、提取回收率和基质效应。运用建立的方法对正常及硫酸葡聚糖(DSS)慢性肠炎小鼠血、肝、小肠、结肠、结肠内容物以及盲肠内容物中发挥重要作用的 SCFAs 进行测定。结果 用盐酸饱和氯化钠溶液进行 SCFAs 提取后, 建立的 GC/MS 法可同时测定甲酸、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、己酸、乳酸、琥珀酸共 11 种 SCFAs; 方法学考证显示, 该方法具有较好的准确度、精密度以及提取回收率; 除乙酸外, 其余 SCFAs 基质效应均较好, 不能完全除去乙酸的基质效应, 但其 RSD 均小于 3.8%, 说明基质的影响效应相对稳定, 对结果准确性影响较小。与对照组比较, 慢性肠炎小鼠结肠内容物 SCFAs 蓄积; 盲肠内容物 SCFAs 整体下调, 乳酸蓄积, 提示肠炎小鼠 SCFAs 代谢紊乱。结论 建立了生物样品中 SCFAs 提取和检测方法, 并应用于慢性肠炎小鼠 SCFAs 代谢分析, 肠炎小鼠 SCFAs 代谢紊乱。

关键词: 短链脂肪酸; 气相色谱-质谱联用; 衍生化; 代谢紊乱; 慢性肠炎

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)06-1035-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.017

Analysis on SCFAs dysregulation pattern in experimental colitis mice based on gas chromatography - mass spectrometer

MENG Tuo, DENG Shanshan, HAO Haiping, CAO Lijuan

China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To analyze the metabolism of short chain fatty acids (SCFAs) in enteritis mice by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). **Method** The pretreatment of biological samples contains acidification in sodium chloride solution saturated with hydrochloric acid, ethyl acetate extraction, and derivatization. GC/MS method is established to quantify SCFAs in biological samples. Total ion chromatograms of SCFAs of fecal samples extracted by hydrochloric acid solution and hydrochloric acid saturated sodium chloride solution were observed. The stability of the SCFAs mixture before and after the derivatization, the linearity, precision, accuracy, recovery, and the matrix effect of SCFAs determination in feces, sera, small intestine, colon, and liver tissues were investigated. The established method was used to determine the important SCFAs in the blood, liver, small intestine, colon, colon content, and the content of cecum in normal and DSS chronic enteritis mice. **Results** The method could quantify 11 different kinds of SCFAs including formic acid, acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovalerate, valerate, ISO caproic acid, hexanoic acid, lactic acid, and succinic acid in biological samples extracted by hydrochloric acid saturated sodium chloride solution with great accuracy, precision, and extraction recovery. Except for acetic acid, the other SCFAs matrix effects were all good, and the matrix effect of acetic acid could not be completely removed, but the RSD was less than 3.8%, indicating that the effect of matrix was relatively

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81430091)

第一作者: 孟 拓(1992—), 女, 硕士, 研究方向内源性物质代谢调控。

*通信作者: 郝海平, 男, 教授。Email: hhp_770505@hotmail.com

曹丽娟, 女, 助理研究员。Email: caolijuan0702@163.com

stable and had little effect on the accuracy of the results. The method has been used to analyze SCFAs in mouse intestinal contents, liver, small intestinal, and colon. Compared with control group, colitis mouse showed SCFAs metabolic disorder caused by SCFAs accumulation in colon content and SCFAs reduction except for lactic acid in cecum content. **Conclusion** The SCFAs extraction and quantification method has been established and applied to analyze SCFAs in colitis mouse, and colitis mouse showed SCFAs metabolic disorder.

Key words: short chain fatty acids; GC/MS; derivatization; metabolic disorder; chronic enteritis

短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 是碳原子数 1~6 的挥发性有机酸, 由肠道菌群代谢产生, 主要包括乙酸、丙酸和丁酸。SCFAs 可以为肠上皮细胞提供能量, 并且在维持肠道完整性和调节肠道免疫功能中发挥重要作用。在肠炎条件下, SCFAs 促进肠道黏膜细胞增殖, 保护肠道屏障, 抑制促炎因子分泌从而缓解肠道炎症^[1-4]。

常用的 SCFAs 定量方法包括气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管色谱法等^[5-9], 其中气相色谱法最为常见。气相色谱法样本前处理主要包括盐酸酸化、醋酸乙酯或乙醚提取后进行衍生化分析^[10-14]。盐酸水溶液酸化易引入较多水分损失色谱柱柱效, 本实验利用饱和氯化钠溶液吸水效应, 采用盐酸饱和氯化钠溶液进行酸化。乙醚对甲酸、乙酸等小分子有机酸萃取效率较醋酸乙酯低^[14-15], 安全性差, 因此本实验采用醋酸乙酯替代乙醚进行萃取。

本研究对粪便样本中 SCFAs 的提取方法进行了优化, 并建立了基于气相色谱-质谱联用 (GC/MS) 的 SCFAs 分析方法。通过对不同生物样本间精密度、准确度、基质效应及提取回收率的考察, 证明该方法同样可应用于肝脏、小肠、结肠以及血液中 SCFAs 分析, 为肠炎小鼠 SCFAs 代谢处置研究提供参考。

1 材料

1.1 主要试剂

甲酸 (批号 399388)、乙酸 (批号 71251)、丙酸 (批号 94425)、异丁酸 (批号 46935-U)、丁酸 (批号 19215)、异戊酸 (批号 78651)、戊酸 (批号 75054)、异己酸 (批号 277827)、己酸 (批号 21529)、乳酸 (批号 46937)、琥珀酸 (批号 49893) 标准品, 购自 Sigma-Aldrich; 醋酸乙酯 (批号 ES1512-001), 购于 Tedia; 硫酸镁 (批号 171217) 和无水氯化钠 (批号 20111228), 购自上海凌峰化学试剂有限公司; 硫酸葡聚糖 (DSS), 购自 MP Biochemical, 批号 MW 36000-50000; 内标 2-乙基丁酸, 购自 Sigma-Aldrich, 批号 109959; 衍生化试剂为含有 1% t-BMCS 的 MTBSTFA, 购自 Sigma-chemical, 批号

M-108。

1.2 主要仪器

冻干机, 型号为 FreeZone12L, 购自 Labconco; 色谱分析仪器, 型号为 GC 2010 plus system, 日本岛津公司。

1.3 实验动物

SPF 级健康 C57BL/6J 小鼠, 雄性, 5 周龄, 体质量 (20±2) g, 购于南京大学生物医药研究院, 实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2015-0001。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Rtx-5MS 毛细管柱 (30 mm×0.25 mm, 0.25 μm), 氢气为载气, 体积流量 1.0 mL/min, 界面温度维持在 280 °C。气相条件如下: 进样温度 250 °C; 进样体积 0.5 μL; 分流比 6:1。升温程序如下: 40 °C 维持 3 min, 以 40 °C/min 的速度逐渐升温至 60 °C, 随后以 10 °C/min 速度升温至 110 °C, 40 °C/min 升温至 250 °C 并且维持 1 min。

质谱条件: EI 源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 200 °C, 接口温度 220 °C, Scan 模式扫描范围 m/z 30~300。

分析物峰面积与内标峰面积进行定量, GC/MS solution Version 2.5 软件进行数据分析。

2.2 溶液配制

2.2.1 SCFAs 混合标准品储备液配制 甲酸、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、己酸、乳酸、琥珀酸共 11 种 SCFAs, 根据各自密度, 吸取一定体积的 SCFAs 标准品, 用醋酸乙酯稀释, 配制成 10 mg/mL SCFAs 混合标准品母液。随后用醋酸乙酯稀释为 1 mg/mL SCFAs 混合标准品储备液。4 °C 冷藏备用。

2.2.2 内标储备液配制 用移液枪吸取 54.3 μL 2-乙基丁酸至容量瓶中, 用醋酸乙酯定容至 5 mL, 配制成 10 mg/mL 内标母液。随后用醋酸乙酯稀释为 5 μg/mL 内标储备液。4 °C 冷藏备用。

2.2.3 盐酸饱和氯化钠溶液配制 饱和氯化钠溶液稀释 12 mol/L 浓盐酸溶液至 1 mol/L, 混匀静置,

上清即为 1 mol/L 盐酸饱和氯化钠溶液。

2.3 粪便样本前处理

2.3.1 空白粪便基质制备 小鼠粪便在冻干机中冻干 2 d, 收集冻干粉。150 mg 小鼠粪便冻干粉中加入 150 μ L 1 mol/L 盐酸饱和氯化钠溶液酸化, 随后加入 1.5 mL 醋酸乙酯研磨均匀, 10 000 r/min 离心 10 min 取 220 μ L 上清, 真空挥干, 用含有 5 μ g/mL 内标的醋酸乙酯复溶。

2.3.2 小鼠粪便以及肠内容物前处理 小鼠粪便以及肠内容物在冻干机中冻干 2 d, 收集冻干粉。称取 150 mg 粪便以及肠内容物冻干粉, 加入 150 μ L 1 mol/L 盐酸饱和氯化钠溶液酸化, 随后加入 1.5 mL 含有 5 μ g/mL 内标的醋酸乙酯, 研磨均匀, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取 220 μ L 上清, 经 150 mg 硫酸镁干燥 2 次, 10 000 r/min 离心 10 min 取上清, 加入 1/3 体积的衍生化试剂, 混匀在 80 $^{\circ}$ C 水浴中加热 20 min, 室温衍生化 8 h, 待进样分析。

2.4 组织及血清样本前处理

2.4.1 空白血清基质制备 1 mL 血清加入 50 mg 硫酸镁, 37 $^{\circ}$ C 混匀 2 h, 18 000 r/min 离心 10 min, 取上清。

2.4.2 空白组织基质制备 200 mg 组织加入 150 μ L 1 mol/L 盐酸饱和氯化钠溶液酸化, 其余处理同“2.3.1”项。

2.4.3 小鼠血清及组织样本前处理 100 μ L 血清加入 60 μ L 1 mol/L 盐酸饱和氯化钠溶液酸化, 其余处理同“2.3.2”项。200 mg 组织加入 150 μ L 1 mol/L 盐酸饱和氯化钠溶液酸化, 其余处理同“2.3.2”项。

2.5 方法学考证

2.5.1 标准曲线 取 1 mg/mL 的 SCFAs 储备液, 用醋酸乙酯逐级稀释为 10、20、50、100、200、500 ng/mL; 1、2、5、10、20、50、100、500、1 000 μ g/mL 系列工作液。90 μ L 空白粪便基质加入 10 μ L 系列浓度梯度的 SCFAs 工作液, 配制成质量浓度为 0、1、2、5、10、20、50、100、200、500 ng/mL; 1、2、5、10、50、100 μ g/mL 的标准曲线样本, 衍生化后进样分析, 血清及组织样本标准曲线制备同粪便样本。

2.5.2 准确度和精密度 粪便空白基质加入低、中、高 (0.2、5.0、200.0 μ g/mL) 3 个质量浓度的 SCFAs 标准液进行日内和日间精密度考察。1 d 内测定 3 次或连续测定 3 d, 根据标准曲线回算样本浓度。测定结果与加入的实际浓度的相对偏差作为准

确度, 样本的相对标准偏差作为日内和日间精密度。组织和血清操作同粪便空白基质。

2.5.3 稳定性 考察存储于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱的 SCFAs 混合物的稳定性及样品经衍生化后的存放时间稳定性。5、100 μ g/mL 质量浓度的 SCFAs 标准品储备液分别存放于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱储存 8、30 d 后, 衍生化后进样分析, 依据当日新鲜配制随行标曲计算浓度, 与实际加入浓度比较, 确定其稳定性。

衍生化后的待测 SCFAs (5、100 μ g/mL) 样本放于室温 48 h 后, 进样分析, 依据当日新鲜配制随行标曲, 回算衍生化样本的浓度, 与实际加入浓度比较确定其稳定性。

2.5.4 提取回收率和基质效应 样品分为 3 组进行处理。①空白基质前处理后加入 SCFAs 混合标准品衍生化进样; ②空白基质加入 SCFAs 混合标准品经前处理后衍生化进样; ③SCFAs 混合标准品衍生化后进样。以②样品响应与①样品响应比值考察前处理后 SCFAs 的提取回收率, SCFAs 质量浓度为 0.2、5、200 μ g/mL; 以②样品响应与③样品响应比值作为基质效应, 加入的 SCFAs 标准品质量浓度为 0.5 和 50 μ g/mL。

2.6 肠炎小鼠 SCFAs 代谢规律

2.6.1 慢性肠炎小鼠模型建立 采用 DSS 诱导小鼠慢性溃疡性结肠炎模型。小鼠随机分为对照组和肠炎组, 每组 6 只, 对照组给予正常饮用水, 肠炎组给予 2% DSS 饮水 1 周, 随后换为正常饮水 2 周, 连续 3 个周期, 每隔 1 日记录小鼠体质量以及粪便情况, 3 个周期后小鼠会出现便血样症状, 证明模型成功。

2.6.2 GC/MS 分析 SCFAs 造模结束后, 小鼠眼眶取血收集血清, 取小鼠肝、小肠、结肠、结肠内容物以及盲肠内容物, 存放于干冰中待用。按“2.3.2”和“2.4.3”项分别对小鼠粪便、组织和血清样本进行 SCFAs 提取, 进行 GC/MS 分析。

3 结果

3.1 SCFAs 提取方法考察

盐酸溶液提取和盐酸饱和氯化钠溶液提取 SCFAs 总离子流图谱见图 1。用盐酸饱和氯化钠溶液进行粪便样本中 SCFAs 提取能够同时分离 11 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。而以同浓度盐酸水溶液进行提取时仅能提取分离出乙酸一种物质。说明盐酸饱和氯化钠溶液进行 SCFAs 提取效率更高, 分离效果更好。

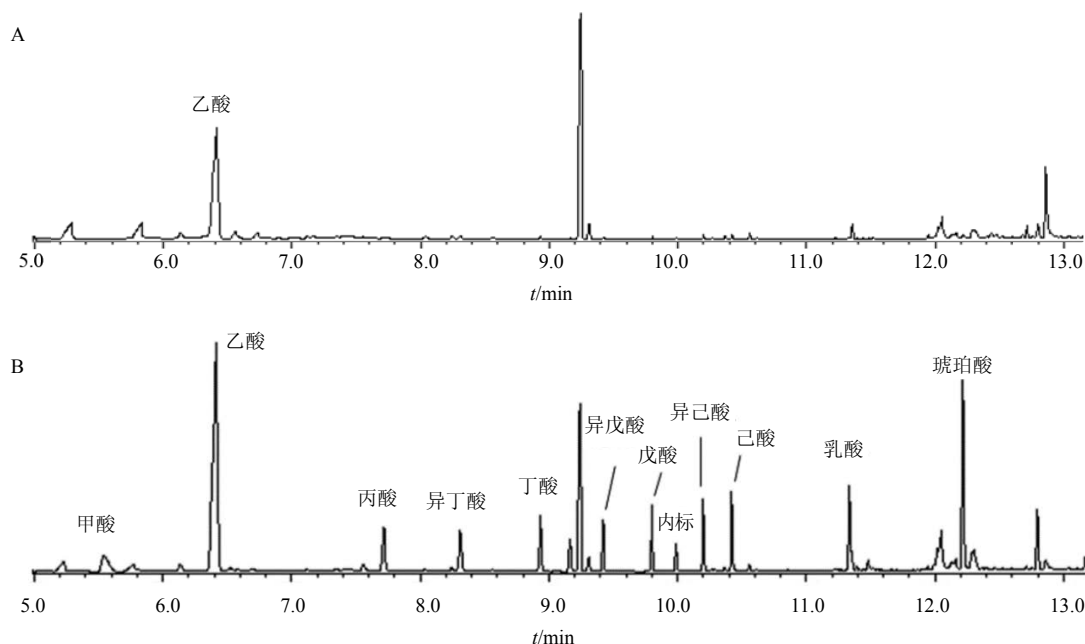


图1 粪便样本经盐酸溶液(A)和盐酸饱和氯化钠溶液(B)提取后 SCFAs 总离子流图谱

Fig. 1 Total ion chromatogram of SCFAs of fecal samples extracted by hydrochloric acid solution (A) and hydrochloric acid saturated sodium chloride solution (B)

3.2 方法学考察

3.2.1 线性与定量限 用选择离子监测 SIM 模式对所需测定的 SCFAs 特征离子峰进行积分, 以 11 种 SCFAs 特征离子峰的峰面积与相应的内标特征离子峰 m/z 116 的峰面积之比为纵坐标, SCFA 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 11 种 SCFA 的标准曲线及线性相关系数。取信噪比 S/N 大于 3 作为方法的检测限, S/N 大于 10 作为方法的定量限。

SCFAs 的浓度和峰面积比呈现良好的线性关系, R^2 均大于 0.99。粪便样本各 SCFAs 的线性范围及线性相关系数、最低检测限 (LOD) 及最低定量限 (LOQ) 见表 1。组织及血清样本各 SCFAs 线性范围及线性系数见表 2。与其他定量方法相比, 本研究方法线性良好, 定量下限更低。

3.2.2 准确度和精密度 粪便样本 SCFAs 准确度在 82.73%~112.49%, 日内精密度在 0.09%~6.90%, 日间精密度在 0.96%~5.24% ($n=5$)。血液、

表1 小鼠粪便样本各 SCFAs 标准曲线、 R^2 、LOD、LOQ、线性范围、

Table 1 Calibration curve, linearity, R^2 , LOD and LOQ for various SCFAs in mouse fecal sample

SCFAs	m/z	线性范围	标准曲线	R^2	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
甲酸	46	20 ng·mL ⁻¹ ~300 μg·mL ⁻¹	$y=0.019\ 0x+0.060\ 4$	0.998\ 7	10	20
乙酸	60	40 ng·mL ⁻¹ ~300 μg·mL ⁻¹	$y=0.050\ 0x+3.014\ 6$	0.998\ 8	20	40
丙酸	74	40 ng·mL ⁻¹ ~300 μg·mL ⁻¹	$y=0.063\ 8x+1.101\ 4$	0.995\ 6	20	40
异丁酸	71	100 ng·mL ⁻¹ ~300 μg·mL ⁻¹	$y=0.032\ 4x+1.778\ 3$	0.999\ 0	40	100
丁酸	71	100 ng·mL ⁻¹ ~300 μg·mL ⁻¹	$y=0.036\ 4x+1.074\ 2$	0.997\ 9	40	100
异戊酸	87	80 ng·mL ⁻¹ ~100 μg·mL ⁻¹	$y=0.005\ 2x+0.028\ 2$	0.997\ 0	40	80
戊酸	85	20 ng·mL ⁻¹ ~100 μg·mL ⁻¹	$y=0.037\ 7x+0.219\ 0$	0.998\ 6	10	20
异己酸	116	20 ng·mL ⁻¹ ~100 μg·mL ⁻¹	$y=0.032\ 8x+0.104\ 7$	0.998\ 7	10	20
己酸	116	20 ng·mL ⁻¹ ~100 μg·mL ⁻¹	$y=0.061\ 0x+0.291\ 9$	0.998\ 2	10	20
乳酸	59	80 ng·mL ⁻¹ ~100 μg·mL ⁻¹	$y=0.284\ 5x+0.129\ 0$	0.998\ 6	40	80
琥珀酸	55	80 ng·mL ⁻¹ ~100 μg·mL ⁻¹	$y=0.262\ 9x+0.782\ 8$	0.992\ 2	40	80

表 2 小鼠血清和组织样本各 SCFA 标准曲线、线性系数

Table 2 Calibration curve and R^2 for various SCFAs in mouse serum and tissue

SCFAs	血清		肝脏		小肠	
	标准曲线	R^2	标准曲线	R^2	标准曲线	R^2
甲酸	$y=0.021\ 5x+0.012\ 5$	0.999 7	$y=0.020\ 3x+0.006\ 2$	0.996 3	$y=0.019\ 9x+0.013\ 8$	0.999 9
乙酸	$y=0.051\ 7x+2.075\ 0$	0.999 7	$y=0.047\ 0x+3.632\ 3$	0.993 1	$y=0.054\ 3x+2.409\ 3$	0.997 9
丙酸	$y=0.075\ 6x+0.097\ 9$	0.999 0	$y=0.070\ 2x+0.103\ 3$	0.993 0	$y=0.072\ 0x+0.304\ 7$	0.998 7
异丁酸	$y=0.035\ 9x+0.653\ 5$	0.998 6	$y=0.033\ 8x+1.480\ 0$	0.998 3	$y=0.036\ 8x+1.378\ 1$	0.997 1
丁酸	$y=0.048\ 6x+0.267\ 5$	0.996 2	$y=0.041\ 8x+0.686\ 3$	0.999 1	$y=0.045\ 4x+0.993\ 6$	0.999 2
异戊酸	$y=0.005\ 8x+0.012\ 1$	0.999 1	$y=0.004\ 9x+0.031\ 5$	0.998 6	$y=0.005\ 4x+0.019\ 5$	0.998 0
戊酸	$y=0.042\ 0x+0.049\ 8$	0.999 3	$y=0.038\ 7x+0.021\ 6$	0.991 7	$y=0.039\ 9x+0.081\ 5$	0.998 6
异己酸	$y=0.037\ 5x+0.029\ 9$	0.997 9	$y=0.032\ 1x+0.147\ 3$	0.998 4	$y=0.034\ 8x+0.063\ 2$	0.997 5
己酸	$y=0.064\ 2x+0.066\ 8$	0.996 9	$y=0.052\ 4x+0.293\ 0$	0.996 2	$y=0.055\ 2x+0.175\ 2$	0.991 9
乳酸	$y=0.275\ 2x+1.489\ 0$	0.997 4	$y=0.115\ 9x+2.828\ 0$	0.993 4	$y=0.136\ 2x+2.781\ 0$	0.991 9
琥珀酸	$y=0.328\ 1x+0.252\ 1$	0.997 0	$y=0.163\ 1x+3.196\ 2$	0.986 0	$y=0.311\ 1x+0.364\ 9$	0.996 1

肝脏以及小肠样本准确度均在 80.96%~116.81%、日内及日间精密密度(RSD)均在 0.17%~7.63% ($n=5$)。结果提示,本方法具有较好的准确度和精密密度,符合检测要求。

3.2.3 稳定性试验 SCFAs 醋酸乙酯溶液在-80℃存放 8、30 d,测定浓度与实际加入浓度的比值分别在 88.14%~112.42%和 86.94%~115.11%, $RSD\leq 10.43\%$ ($n=6$),符合生物样品分析要求。说明 SCFAs 醋酸乙酯溶液在-80℃中稳定储存 30 d,浓度基本不发生变化。经过前处理的 SCFAs 储备液在室温条件下储存 48 h,测定浓度与实际加入浓度的比值在 87.64%~102.49%, $RSD\leq 2.87\%$ ($n=6$),符合生物样品分析要求。说明经过前处理后的 SCFAs 样本可在室温稳定储存 48 h,浓度不发生变化。

3.2.4 提取回收率和基质效应 粪便样本中 SCFAs 提取回收率均在 85.07%~109.32%,血液、肝脏以及小肠样本提取回收率均在 75.02%~115.83% ($n=6$),符合生物样本检测要求。除乙酸外,其余 SCFAs 基质效应在可接受范围内 76.62%~110.71%,乙酸的基质效应为 43.03%~51.96%。虽然不能完全除去乙酸的基质效应,但其基质效应的 RSD 均小于 3.8% ($n=6$),说明基质对样品的影响效应相对稳定,对结果测定准确性影响较小。

3.3 肠炎小鼠 SCFAs 代谢规律

运用该方法对正常及 DSS 慢性肠炎小鼠血、肝、小肠、结肠、结肠内容物以及盲肠内容中发挥重要作用的 SCFAs 进行测定^[16-19],结果见图 2。与

对照组比较,肠炎小鼠结肠内容物出现明显的 SCFAs 蓄积,其中乙酸、丙酸、异戊酸、戊酸、乳酸蓄积尤为明显,差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。与对照组比较,肠炎小鼠盲肠内容物 SCFAs 下调,其中乙酸、丙酸、丁酸尤为明显,差异显著 ($P<0.05$);乳酸、琥珀酸蓄积 ($P<0.01$)。提示肠炎条件下小鼠 SCFAs 代谢紊乱。

4 讨论

前期研究表明^[10-13],SCFAs 测定多采用盐酸酸化-乙醚提取的前处理方法,并通过 GC/MS 进行定量。由于盐酸水溶液酸化易引入较多水分,损失色谱柱柱效,并且乙醚安全性差、极性低,对甲酸、乙酸等小分子有机酸萃取率低,因此本文对前处理方法进行了改进。采用盐酸的饱和氯化钠溶液替代盐酸的水溶液进行生物样本酸化,醋酸乙酯替代乙醚进行生物样本中 SCFAs 提取。盐酸的饱和氯化钠溶液可以对样本进行去蛋白化,同时氯化钠促进水和醋酸乙酯分离,提取效率更高。用硫酸镁干燥减少醋酸乙酯萃取引入的水分,提高色谱柱柱效。

在上述内容的基础上,本研究建立了对 11 种 SCFAs 共检测的 GC/MS 定量方法,并对该方法在小鼠粪便基质中的应用进行了全面的方法学考证,表明 11 种 SCFAs 在小鼠粪便基质中均具有良好线性, R^2 均大于 0.99,最低检测限达 10 ng/mL,定量限达 20 ng/mL;11 种 SCFAs 在小鼠粪便基质中测定准确度及精密密度均符合生物样品分析要求,且样品衍生化后稳定性考察符合生物样品分析要求,说明样品处理过程对样本稳定性无明显影响;在小鼠

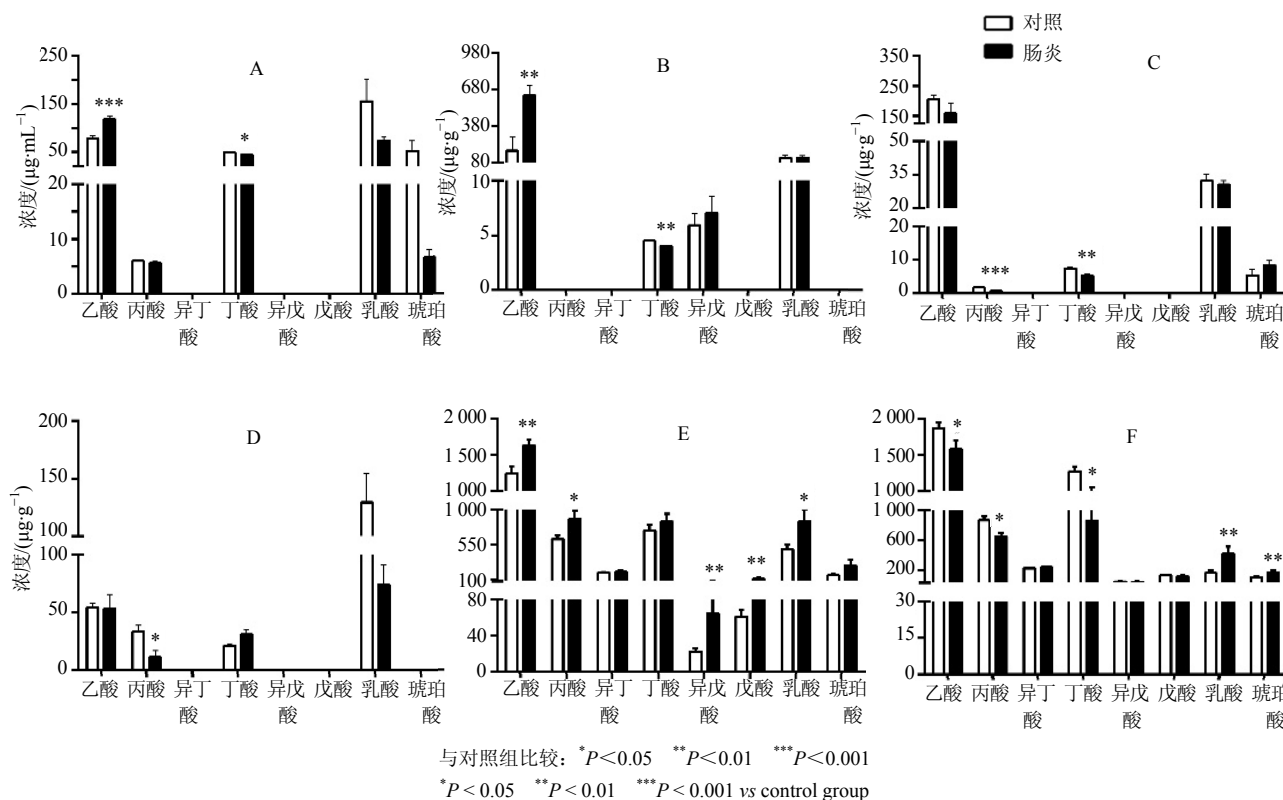


图2 SCFAs在血清(A)、肝脏(B)、小肠(C)、结肠(D)、结肠内容物(E)和盲肠内容物(F)中的分布
 Fig. 2 SCFAs distribution in mouse blood (A), liver (B), small intestine (C), colon (D), colonic content (E), and cecal contents (F)

粪便基质效应考察中,乙酸的基质效应在 43.03%~51.96%,可能与醋酸乙酯在酸性条件下水解相关,虽然乙酸的基质效应无法完全除去,但是方法学考证显示该方法具有较好的准确度、精密度和提取回收率,基质效应对乙酸测定影响的 RSD 小于 15%;同样血清、小肠、结肠、肝脏组织中 SCFAs 测定方法的线性、精密度和准确度、提取回收和基质效应均符合生物样品分析要求,充分说明该方法可同时应用于肝、小肠、结肠和血清组织 SCFAs 测定。

炎症性肠病是一种发病机制尚不明确的慢性炎症性疾病,饮食、遗传、肠道菌群等因素均可导致炎症性肠病的发生。近年来研究报道^[20],肠道菌群在炎症性肠病发生发展中发挥重要作用。肠道菌群可以通过其代谢产物调节肠道免疫,如双歧杆菌和梭状芽胞杆菌代谢生成 SCFAs 激活其下游受体 GPR43 等发挥其肠道免疫应答作用^[21-23]。此外,SCFAs 为健康结肠上皮细胞提供能量,促进细胞增殖,缓解结肠炎症和氧化应激,增强肠道免疫屏障^[24]。在病理状态下,SCFAs 也可以抑制结肠癌细胞增殖,诱导结肠癌细胞凋亡,进而抑制结肠癌症的发生^[20]。基

于 SCFAs 在肠道炎症和肠道免疫中的重要作用,本文将建立的 SCFAs 提取与测定方法应用到 DSS 诱导慢性肠炎小鼠 SCFAs 代谢分析中。结果显示,肠炎条件下小鼠结肠内容物 SCFAs 蓄积,而盲肠内容物 SCFAs 下降,乳酸产量上升。以上结果均表明,肠炎条件下小鼠 SCFAs 代谢紊乱,然而其潜在机制仍需进一步研究^[25-26]。

本文建立了快速、灵敏、稳定的生物样本 SCFAs 测定方法,并将该方法应用到肠炎小鼠肝脏、小肠、结肠、血液等组织 SCFAs 代谢分析,为肠炎条件下 SCFAs 的代谢调控研究提供依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism [J]. *Nature*, 2012.

- 489(7415): 242-249.
- [4] 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: 144-151.
- [5] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells [J]. Nature, 2013, 504(7480): 446-450.
- [6] Tan L, Wang Y, Liu X, et al. Simultaneous determination of L-and D-lactic acid in plasma by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2005, 814(2): 393-398.
- [7] Pouteau E, Meirim I, Métairon S, et al. Acetate, propionate and butyrate in plasma: determination of the concentration and isotopic enrichment by gas chromatography/mass spectrometry with positive chemical ionization [J]. J Mass Spectrom, 2001, 36(7): 798-805.
- [8] Arellano M, Jomard P, E Kaddouri S, et al. Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection [J]. J Chromatogr B, 2000, 741(1): 89-100.
- [9] De Baere S, Eeckhaut V, Steppe M, et al. Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during *in vitro* fermentation [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 80: 107-115.
- [10] Tsukahara T, Matsukawa N, Tomonaga S, et al. High-sensitivity detection of short-chain fatty acids in porcine ileal, cecal, portal and abdominal blood by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anim Sci J, 2014, 85(4): 494-498.
- [11] Chen Y, Li Y, Xiong Y, et al. An effective pre-treatment method for the determination of short-chain fatty acids in a complex matrix by derivatization coupled with headspace single-drop microextraction [J]. J Chromatogr A, 2014, 1325: 49-55.
- [12] Reddy A V B, Yusop Z, Jaafar J, et al. A simple, selective, and sensitive gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of five process-related impurities in atenolol bulk drug and capsule formulations [J]. J Sep Sci, 2017, 40(15): 3086-3093.
- [13] Mastovská K, Lehotay S J, Anastassiades M. Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes [J]. Anal Chem, 2005, 77(24): 8129-8137.
- [14] García-Villalba R, Giménez-Bastida J A, García-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): 1906-1913.
- [15] Primec M, Micetic-Turk D, Langerholc T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review [J]. Anal Biochem, 2017, 526: 9-21.
- [16] Sun M F, Shen Y Q. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease [J]. Ageing Res Rev, 2018, 45: 53-61.
- [17] Vemuri R, Gundamaraju R, Eri R. Role of Lactic Acid Probiotic Bacteria in IBD [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(16): 2352-2355.
- [18] Mills E, O'Neill L A. Succinate: a metabolic signal in inflammation [J]. Trends Cell Biol, 2014, 24(5): 313-320.
- [19] Sivaprakasam S, Bhutia Y D, Ramachandran S, et al. Cell-surface and nuclear receptors in the colon as targets for bacterial metabolites and its relevance to colon health [J]. Nutrients, 2017, 9(8). doi: 10.3390/nu9080856.
- [20] van der Beek C M, Dejong C H C, Troost F J, et al. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing [J]. Nutr Rev, 2017, 75(4): 286-305.
- [21] Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy [J]. Science, 2015, 350(6264): 1084-1089.
- [22] De Leon L M, Watson J B, Kelly C R. Transient flare of ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013, 11(8): 1036-1038.
- [23] Kim M H, Kang S G, Park J H, et al. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice [J]. Gastroenterology, 2013, 145(2): 396-406, e1-10.
- [24] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells [J]. Nature, 2013, 504(7480): 446-450.
- [25] Donohoe D R, Garge N, Zhang X, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon [J]. Cell Metabolism, 2011, 13(5): 517-526.
- [26] Roediger W. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon [J]. Gastroenterology, 1982, 83(2): 424-429.