

## 短链脂肪酸气相色谱-质谱测定方法的建立

卜子晨, 郑诗琪, 王佳, 夏永军, 艾连中, 王光强\*

(上海理工大学健康科学与工程学院 上海食品微生物工程技术研究中心 上海 200093)

**摘要** 肠道微生物群及其主要代谢物短链脂肪酸(SCFAs)被认为是肠道内环境稳定和代谢疾病发生的重要因素。气相色谱-质谱(GC-MS)是生物样品中最常用的短链脂肪酸谱分析方法。三甲基硅基(TMS)衍生化试剂 *N,O*-双(三甲基硅基)-三氟乙酰胺(BSTFA)是气相色谱/质谱分析中常用的提高灵敏度和准确性的试剂,采用 BSTFA 对粪便、盲肠和结肠内容物的 SCFAs 进行 GC-MS 分析,并采用选择离子监测模式对短链脂肪酸进行高灵敏度的定量分析。在 37 °C 条件下,用 BSTFA 衍生的 SCFAs 具有良好的线性关系( $R^2>0.998$ ),回收率 86%~96%,精密度 RSD<4%。结论:采用 GC-MS 和 BSTFA 衍生化结合的方法可应用于粪便中 SCFAs 的定量分析,是一种准确、通用的检测方法。

**关键词** 短链脂肪酸; 气相色谱-质谱联用仪; 粪便样品; 衍生化

文章编号 1009-7848(2023)09-0261-05 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.09.027

短链脂肪酸(SCFA)是肠道微生物的重要代谢产物。它们主要由厌氧微生物的多糖、寡糖、蛋白质、多肽和糖蛋白前体形成<sup>[1]</sup>。短链脂肪酸是饱和脂肪酸的一个子集,含有 6 个或更少的碳分子,包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸<sup>[2]</sup>。在人体中,乙酸、丙酸和丁酸是肠道发酵产生的 3 种主要短链脂肪酸,占肠道短链脂肪酸含量的 95%,宿主产生短链脂肪酸的主要部位是结肠和盲肠<sup>[3]</sup>。其中 SCFAs 的浓度在近端结肠较高,在远端结肠较低。SCFAs 参与人体代谢,在肝脏、骨骼肌、脂肪组织和胰岛等不同器官中具有重要功能,可以直接影响碳水化合物代谢和脂质利用,并通过副交感神经系统间接调节能量代谢<sup>[4]</sup>。SCFAs 被报道可以缓解肥胖、糖尿病,抑制炎症和肿瘤细胞生长<sup>[5-7]</sup>。近年 SCFAs 的测量已被用于研究许多疾病。粪便标本是研究 SCFAs 浓度与疾病之间相关性的最常用标本,它能够反映结肠中 SCFAs 的产生与吸收之间的平衡<sup>[8]</sup>。为了分析饮食、肠道微生物群和宿主健康之间的关系,需要可靠、方便、灵敏的方法来准确测定短链脂肪酸的含量。

生物样品中 SCFAs 的分析方法多种多样,其中包括高效液相色谱(HPLC)联合紫外检测<sup>[9]</sup>、固相微萃取气相色谱-质谱联用技术(SPME-GC-

MS)<sup>[10]</sup>、核磁共振(NMR)<sup>[11]</sup>、毛细管电泳(CE)<sup>[12]</sup>等。由于 SCFAs 具有较强的挥发性,在所有用于测定短链脂肪酸的设备中,气相色谱是最广泛用于短链脂肪酸分析的设备,并且与质谱联用具有更好的灵敏度和选择性<sup>[13]</sup>。然而,直接进样分析回收率较低,并存在杂质污染气相色谱柱的现象<sup>[14]</sup>。由于丙酸峰面积比较小,因此直接进样也很难使其明显出峰。为了提高检测灵敏度和对柱子较少的损害,衍生化方法是更好的选择。由于挥发性酸物质较难检测,且峰很难分离,因此硅烷化方法是气相色谱分离挥发性酸的一种常用方法。硅烷化试剂有很多种,其中 *N,O*-双(三甲基硅基)乙酰胺(BSA)、*N,O*-双(三甲基硅基)-三氟乙酰胺(BSTFA)和 *N*-甲基-*N*-(三甲基硅基)-三氟乙酰胺(MSTFA)是 GC/MS 分析中最常用的试剂<sup>[15]</sup>。这些衍生化剂通过三甲基硅基取代酸、醇、硫醇、胺、酰胺、酮和醛中的活性氢,与生物有机分子具有良好而广泛的反应活性<sup>[16]</sup>。相比较而言,很少用 BSA 来检测挥发性较强或分子质量很低的化合物,而 BSTFA 虽与 BSA 相似,但由它生成的副产物挥发性优于 BSA,且更容易与衍生物分离,从而达到更好的出峰效果。常规的硅烷化试剂在检测器中能形成 SiO<sub>2</sub>, 污染指数高并且会增加基线的噪音, BSTFA 分子中含有 3 个氟原子,在检测过程中可使 SiO<sub>2</sub> 进一步转化为 SiF<sub>4</sub>, 从而有效降低污染情况<sup>[17]</sup>。与 MSTFA 相比, BSTFA 氯甲酸盐运行时间更短,受空间位阻的影响更小,丁酸的分离效果更

收稿日期: 2022-09-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972056)

第一作者: 卜子晨,女,硕士生

通信作者: 王光强 E-mail: 1015wangqg@163.com

好,且操作时间较短,具有更好的衍生化效率和灵敏度<sup>[18]</sup>。最终选用 GC-MS 联合 BSTFA 衍生化试剂,旨在建立一种可以高效定量分析短链脂肪酸的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及饲养环境

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠,购于南京模式动物有限公司。小鼠饲养环境条件为温度 (23±2) °C、相对湿度控制在 (50±5)%、12 h 光照和 12 h 黑夜的环境中,自由取食、进水,适应 1 周后进行实验。

### 1.2 材料与试剂

乙酸、丙酸、丁酸(纯度≥99%)购自源叶生物;无水乙醚,盐酸,均为分析级,购自国药集团化学试剂有限公司;N,O-三甲硅烷基三氟乙酰胺(BSTFA),无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,购自 Sigma 公司。

### 1.3 主要仪器设备

Thermo 气相色谱-质谱联用仪,美国赛默飞世尔科技有限公司;漩涡振荡仪;3-18K 型离心机,德国 Sigma 公司;PL2002 型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;GT200 研磨仪,北京格瑞德曼仪器设备有限公司。

### 1.4 气相色谱条件

色谱柱: TG-5MS 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)。初始温度 40 °C,保持 2 min,以 15 °C/min 升至 150 °C,保持 1 min,再以 30 °C/min 升至 300 °C,保持 5 min。进样口温度: 260 °C;载气: 氮气(纯度≥99.999%);分流比: 10:1;柱流速: 1 mL/min;进样量: 1 μL;溶剂延迟时间: 3 min。

### 1.5 质谱条件

离子源: EI 源 (70 eV);离子源温度: 230 °C。定性时扫描方式为全扫描 (*m/z* 40~400),采集频率为每秒 12.8 次,定量时扫描方式为选择性离子扫描,乙酸、丙酸、丁酸扫描离子为 (*m/z*): 117, 131, 145。采用外标法计算短链脂肪酸的含量。

### 1.6 试验方法

1.6.1 样品前处理 小鼠排便后立即用镊子收集粪便样本 0.05 g 左右并与 500 μL 纯水混合,用研磨仪快速研磨至形成匀浆状态,然后低速振荡 30 min。随后放入冷冻离心机 13 000 r/min 的条件下

离心 30 min。将 100 μL 的上清液转移到离心管中,并加入 10 μL 5 mol/L HCl 使粪便溶液 pH 值在 2 左右。酸化后的粪便匀浆加入 100 μL 无水乙醚,漩涡振荡混匀,10 000 r/min 的条件下离心 5 min。取上清转移至含无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的离心管中,从而去除多余水分。重复萃取 2 次。

衍生化过程: 将 100 μL 无水乙醚层转移至内插管中,加入 5 μL 的 BSTFA,漩涡振荡后保存在气相小瓶中。70 °C 孵育 20 min,37 °C 孵育 2 h。最后将样品上机处理。

1.6.2 回收率和精密度 将小鼠粪便样品加入 3 种不同水平 (10, 50 和 250 μmol/L) 的混合 SCFAs 标准品,按上述方法衍生化并进行 GC-MS 分析,计数出回收率。并采用相同浓度的粪便 SCFAs 提取物测定精密度。

1.6.3 小鼠粪便、盲肠、结肠中 SCFAs 的含量比较 小鼠适应性饲养 1 周,收取 0.05 g 左右粪便。脱颈椎处死后,分别取 0.05 g 左右盲肠和结肠内容物。并为加入无菌水按上述衍生化方法处理。随后对 3 种 SCFAs 进行含量测定和比例分布统计。

1.6.4 数据统计分析 本试验中得到的结果进行统计分析,利用 Origin 9.0 软件处理数据并作图,采用 SPSS 22.0 数据分析软件进行显著性差异分析。所有数据均用“平均值±标准差”(mean±SD)表示。*P*>0.05 无显著性差异,*P*<0.05 有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系

将 3 种短链脂肪酸进样后获得各自的出峰时间,它们的出峰顺序为乙酸、丙酸和丁酸。色谱图见图 1,3 种 SCFAs 的色谱峰得到很好的分离。根据峰面积,绘制出标准曲线,并以峰面积对不同浓度进行线性回归,结果见表 1。根据线性回归方程和 *R*<sup>2</sup> 可知乙酸、丙酸、丁酸在 25~400 μmol/L 范围内线性关系良好。

### 2.2 精密度

粪便样品中 SCFAs 分析方法精密度分析结果见表 2。对同一粪便样品进行 5 次平行进样测定,试验结果显示,峰面积和保留时间的 RSD 均小于 4%,表明仪器的精密度良好。

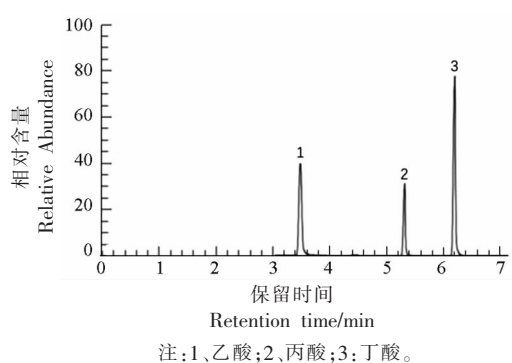


图 1 混合 SCFAs 的 GC-MS 色谱图

Fig.1 The chromatogram of mixed SCFAs

表 1 不同 SCFAs 线性关系考察

Table 1 The linear relationship of different SCFAs

化合物	线性回归方程	$R^2$
乙酸	$y=1\ 440\ 254.8x+118\ 373.68$	0.997
丙酸	$y=801\ 587.4x+58\ 515.28$	0.998
丁酸	$y=2\ 664\ 956.9x+297\ 919.28$	0.997

表 2 精密度测定结果

Table 2 The precision of the method for the determination of mixed SCFAs

进样	乙酸		丙酸		丁酸	
	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min
1	853.504	3.45	458.256	4.74	1 229.183	6.20
2	841.452	3.48	479.345	4.67	1 227.237	6.19
3	855.243	3.44	465.334	4.64	1 209.342	6.22
4	866.567	3.45	489.112	4.70	1 211.435	6.18
5	880.223	3.46	448.123	4.66	1 240.348	6.17
RSD%	1.705	0.438	3.497	0.83	1.06	0.31

### 2.3 回收率

粪便样品 GC-MS 回收率分析结果见表 3。对粪便样品进行回收率试验,按照上述色谱条件进行测试,结果显示,加样回收率达到了 86%~

96%之间,各组分加样回收率的 RSD 均小于 4%,说明本试验的分析条件下测定短链脂肪酸的方法可靠。

表 3 添加不同含量 SCFAs 的粪便样本回收率测定结果

Table 3 Determination results of fecal sample recovery with different SCFAs content

组分	样品中含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	加入量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
乙酸	279.23	25	292.20	96.04	1.35
		200	444.93	92.84	2.74
		400	558.96	82.29	3.87
丙酸	61.75	25	77.57	89.41	2.65
		200	219.17	83.73	3.97
		400	402.75	87.22	3.76
丁酸	30.75	25	47.49	86.34	2.71
		200	203.85	88.34	2.93
		400	376.45	87.39	3.99

### 2.4 小鼠粪便、盲肠、结肠中 SCFAs 的含量

体内的肠道菌群通过发酵难以消化的碳水化合物来产生 SCFAs,它们会显著参与多种代谢功能,并且对机体系统产生有益的影响。SCFAs 不但

可以调节肝脏中的脂肪生成和胆固醇生物合成等机制,并通过刺激肠道内分泌细胞调节能量稳态<sup>[9]</sup>。因此本试验通过对小鼠粪便的衍生化处理,来确定小鼠中 SCFAs 的含量,结果发现通过该

GC-MS 方法均能检测到乙酸、丙酸和丁酸的含量。由图 2a 的比例分布图所示粪便中含量最多的就是乙酸,高达 73.9%,其次是丙酸(17.6%)和丁酸(8.5%)。这样的含量分布顺序与之前报道的文

献基本吻合<sup>[20-21]</sup>。由图 2b 可知,SCFAs 在粪便、盲肠和结肠中均有分布。其中盲肠中 SCFAs 最高,粪便次之,结肠中最低。且盲肠中的乙酸、丙酸、丁酸含量均与结肠有显著性差异( $P<0.05$ )。

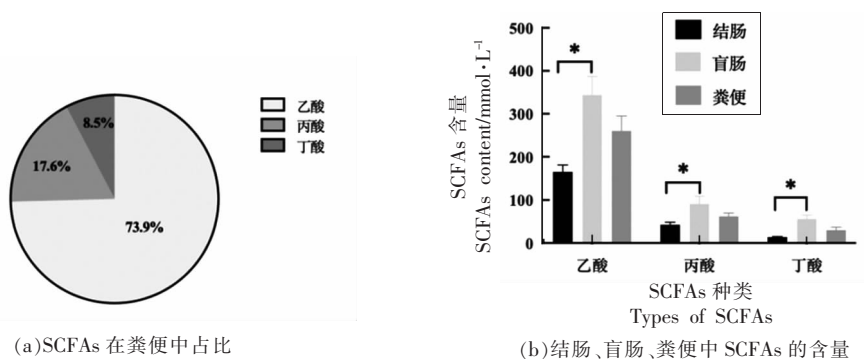


图 2 SCFAs 占比和不同部位 SCFAs 的含量

Fig.2 Proportion of SCFAs and content of SCFAs in different parts

### 3 结论

本试验中采用 BSTFA 作为硅烷化试剂,可以有效解决 SCFAs 分离效果差,挥发性太高从而不出峰等问题。利用无水乙醚作为广泛提取 SCFAs 的常用试剂,结合无水硫酸钠的使用可以更有效的把多余的水分去除,使得结果更准确,而且对机器的损伤也降到最低。从而建立了一种线性关系良好,回收率高,精密度达标的检测 SCFAs 的方法。并且该方法可以准确的测出粪便中乙酸、丙酸和丁酸这 3 种最常见的 SCFAs,没有明显的杂峰和干扰峰。并通过试验检测出小鼠肠道内盲肠中 SCFAs 含量最多,并且乙酸、丙酸和丁酸的分布情况是:乙酸>丙酸>丁酸。

### 参 考 文 献

- [1] YAO Y, CAI X, FEI W, et al. The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(1): 1-12.
- [2] 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.
- [3] HU J, LIN S, ZHENG B, et al. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(8): 1243-1249.
- [4] XU Y, ZHU Y, LI X, et al. Dynamic balancing of intestinal short-chain fatty acids: The crucial role of bacterial metabolism[J]. Trends Food Sci Tech, 2020, 100: 118-130.
- [5] PERRY R J, PENG L, BARRY N A, et al. Acetate mediates a microbiome-brain- $\beta$ -cell axis to promote metabolic syndrome[J]. Nature, 2016, 534(7606): 213-217.
- [6] ZHAO L P, ZHANG F, DING X Y, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes[J]. Science, 359(6380): 1151-1156.
- [7] MONIRI N H, FARAH Q. Short-chain free-fatty acid G protein-coupled receptors in colon cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 186: 114483.
- [8] FERNANDES J, SU W, RAHAT-ROZENBLOOM S, et al. Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans[J]. Nutr. Diabetes, 2014, 4(6): e121.
- [9] WANG H Y, WANG C, GUO L X, et al. Simultaneous determination of short-chain fatty acids in human feces by HPLC with ultraviolet detection following chemical derivatization and solid-phase extraction segmental elution[J]. Journal of Separation Science, 2019, 42(15): 2500-2509.
- [10] CAROLINE D, SANDRINE D, FRANCOIS B, et al. Development of an analytical method to detect short-chain fatty acids by SPME-GC-MS in samples

- coming from an in vitro gastrointestinal model—ScienceDirect [J]. *Journal of Chromatography*, 2019, 1124: 188–196.
- [11] CAI J, ZHANG J, TIAN Y, et al. Orthogonal comparison of GC–MS and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for short chain fatty acid quantitation[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(15): 7900–7906.
- [12] KOTANI A, MIYAGUCHI Y, KOHAMA M. Determination of short-chain fatty acids in rat and human feces by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Analytical Sciences*, 2009, 25(8): 1007–1011.
- [13] LOTTI C, RUBERT J, FAVA F, et al. Development of a fast and cost-effective gas chromatography–mass spectrometry method for the quantification of short-chain and medium-chain fatty acids in human biofluids[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(23): 5555–5567.
- [14] ZHAO G, NYMAN M, JOENSSON J A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and feces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography, Biomed[J]. *Chromatogr*, 2006, 20(8): 674–682.
- [15] ZHANG S M, WANG H B, ZHU M J. A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples[J]. *Talanta*, 2019, 196: 249–254.
- [16] ZHOU Y Q, WANG Z J. Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography–mass spectrometry determination[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 19(7): 879–884
- [17] CLAUDE S, OLIVIER D, BRICE M R A, et al. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis[J]. *Talanta*, 2009, 77(4): 1473–1482.
- [18] LAURA B O R, ALMA E C G, ESTER R M, et al. Impact of the gut microbiota balance on the health–disease relationship: The importance of consuming probiotics and prebiotics[J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1261.
- [19] LU Y Y, FAN C N, 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: 37589.
- [20] BISHEHSARI F, ENGEN P A, PREITE N Z, et al. Dietary fiber treatment corrects the composition of gut microbiota, promotes SCFA production, and suppresses colon carcinogenesis[J]. *Genes*, 2018, 9(2): 102.
- [21] MARKOWIAK K P, SLIZEWSKA K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome[J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1107.

### Establishment of Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method of a Short-chain Fatty Acid

Bu Zichen, Zheng Shiqi, Wang Jia, Xia Yongjun, Ai Lianzhong, Wang Guangqiang\*

(Shanghai Engineering Research Center of Food Microbiology, School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093)

**Abstract** Intestinal microbiota and its main metabolites, short-chain fatty acids (SCFAs), are considered to be important factors for intestinal environmental stability and metabolic diseases. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is the most commonly used method for the analysis of short-chain fatty acids in biological samples. Trimethylsilyl (TMS) derivatization reagents N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) are commonly used to improve the sensitivity and accuracy of gas chromatography/mass spectrometry. We used BSTFA to analyze SCFAs in feces, cecum and colon contents by GC–MS. Selective ion monitoring mode was used for quantitative analysis of short-chain fatty acids with high sensitivity. At 37 °C, SCFAs derived from BSTFA showed good linearity ( $R^2 > 0.998$ ), recovery 86%–96% and precision RSD < 4%. The results showed that GC–MS combined with BSTFA derivatization can be successfully applied to quantitative analysis of SCFAs in feces, and it is an accurate and universal method.

**Keywords** short chain fatty acid; gas chromatography–mass spectrometry; fecal samples; derivatization