

超高效合相色谱法检测短链脂肪酸的研究展望

欧则民, 吉燕华, 孙青云, 黄霞, 周缪辉, 严小军, 徐国良, 刘红宁, 曾治君*
(江西中医药大学 江西省中医病因生物学重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 短链脂肪酸(Short-chain fatty acids, SCFAs)的检测多以气相色谱法(gas chromatography, GC)为主,但随着研究的深入,GC在食品、化工和临床应用中所表现出的弊端也越发突出。通过对现有的研究结果进行分析,发现超高效合相色谱法(ultra performance convergence chromatography, UPC²)适用于对脂质的高效分析。UPC²是近五年发展起来的新型色谱分离技术,而SCFAs的水平与人体多种代谢性疾病的研究相关联,因此将UPC²运用于SCFAs的检测将有助于国内外学者对其展开更为深入的研究,也有助于指导多种代谢性疾病的治疗。本文回顾了SCFAs近十年来的相关研究,分析了GC和液相色谱(liquid chromatography, LC)在SCFAs检测中存在的不足之处,介绍了UPC²的发展历程、基本特性和国内外研究现状,总结了其应用于SCFAs检测分析的可行性和创新性。归纳了UPC²应用于粪便、血清中SCFAs检测的样品预处理方法,指出了样品预处理过程中应注意的问题,同时对UPC²检测SCFAs进行方法学的研究展望。着重探讨了提取溶剂、流动相、辅助溶剂对色谱行为的影响以及UPC²色谱柱的理化性质、类型和选择。简述了碱性改性剂、酸性改性剂、盐类改性剂的选择,以期期为SCFAs的研究提供高效、简便、环保、经济的检测技术,为临床大规模样品的快速检测提供更具优势的参考方案。

[关键词] 超高效合相色谱法; 短链脂肪酸; 样品预处理; 研究展望

[中图分类号] R284.1;R22;R2-03;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0205-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190415

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1612.014.html>

[网络出版时间] 2018-11-05 10:47

Research Outlook of Short-chain Fatty Acids Detected by Ultra Performance Convergence Chromatography

OU Ze-min, JI Yan-hua, SUN Qing-yun, HUANG Xia, ZHOU Miu-hui, YAN Xiao-jun, XU Guo-liang,
LIU Hong-ning, ZENG Zhi-jun*
(Jiangxi Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Etiopathogenesis,
Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Gas chromatography (GC) is mainly used to detect the levels of short-chain fatty acids (SCFAs), but with the deepening of research, the drawbacks of GC have become more and more obvious in the fields of food, chemical engineering and clinical application. The analysis on existing research results showed that ultra performance convergence chromatography (UPC²) was appropriate for the analysis of lipid metabolism. The UPC² is a new kind of chromatographic separation technology developed in recent five years and the level of SCFAs is associated with the research on multiple diseases. Therefore, application of UPC² in the detection of SCFAs would be helpful for the scholars at home and abroad to carry out deeper researches, and also helpful to guide the treatment for various metabolic disorders. In this paper, the researches on SCFAs in recent ten years were reviewed; the shortcomings of GC and liquid chromatography (LC) in the detection of SCFAs were reviewed; the

[收稿日期] 20180713(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760787);中国博士后科学基金项目(2017M622101);江西省教育厅项目(GJJ 160812);江西省卫生厅项目(2017A254)

[第一作者] 欧则民,从事中医病因学研究,Tel:0791-87142859,E-mail:863874699@qq.com

[通信作者] *曾治君,博士,副教授,从事中医病因学研究,Tel:0791-87142859,E-mail:157185405@qq.com

development process, basic characteristics and research status of UPC² at home and abroad were introduced; feasibility and innovation of UPC² in the detection of SCFAs were summarized. Pretreatment methods for UPC² application to the detection of SCFAs in feces or serum were collected; the problems that should be noticed during the process of sample pretreatment were pointed out; meanwhile, an research outlook on methodology of UPC² application in the detection of SCFAs was conducted. The effects of extracting solvent, mobile phase, and auxiliary solvent on chromatographic behavior as well as the physicochemical property, type and choice of UPC² chromatographic column were mainly discussed in this paper. In addition, the choices of basic modifier, acid modifier, and salinity modifier were briefly outlined, in order to provide efficient, simple, environmental, and economic detection technologies for the research on SCFAs, and provide better reference solutions for the rapid detection of massive clinical samples.

[**Key words**] ultra performance convergence chromatography; short-chain fatty acids; sample pretreatment; research outlook

短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 是挥发性有机脂肪酸,属于脂质的一种,和中、长链脂肪酸 (medium-chain fatty acids, MCFAs; long-chain fatty acids, LCFAs) 不同,SCFAs 近些年才受到了较大的关注。SCFAs 可以为肠道细胞提供能量,也能减轻肠道炎症,并且有增加饱腹感的作用^[1-3],丁酸盐可直接被结肠上皮细胞利用,进入肝脏产生酮体,而参与肝外组织的氧化。SCFAs 中的丙酸盐和乙酸盐通过血液循环到达不同的器官被用作氧化、脂质合成和能量代谢,特别是丙酸盐在肝细胞中被用于糖异生^[4]。SCFAs 通过调节组蛋白脱乙酰基酶类^[5],而刺激交感神经系统,进而影响到宿主的行为活动。SCFAs 还刺激肠道蠕动和小肠转运,生理浓度下引起 8~10 倍 5-羟色胺的增加,释放入结肠黏膜系统内^[6]。SCFAs 已证实为肠道微生物最重要的一类分泌物,影响宿主一系列的生理过程,包括能量的利用、宿主与微生物的信号通路、结肠 pH 的调节、肠道动力和上皮细胞的增殖等^[4]。因此选用合适的方法进行样品预处理和测定 SCFAs 含量对其进一步研究显得尤为重要^[7-11]。以往人们多将气相色谱 (gas chromatography, GC) 运用于 SCFAs 的检测,但随着研究的深入,GC 在样品检测中表现出样品预处理复杂、色谱柱使用寿命短等缺陷^[12-14]。近年来,越来越多的国内外学者使用超高效液相色谱 (ultra performance convergence chromatography, UPC²) 进行脂质的分析研究,并在一定程度上推动了食品、化工和临床领域的研究工作^[15-16]。UPC² 结合了各类色谱技术特点,采用超临界流体作为流动相,具有溶剂载量小、分离度高、峰形窄、分离效率高等特点,是一种新型色谱分离技术;并且受到了学者们的广泛认可。因此采用 UPC² 联合质谱 (mass

spectrometry, MS) 等检测器能够对 SCFAs 进行更为精确、快速的检测,目前还没有该方面的系统总结。本文系统整理了近年来 UPC² 的相关研究和应用于 SCFAs 检测的潜在优势,本研究团队也正在采用该技术构建粪便和血液样品中的 SCFAs 的检测方法,以期解决含 SCFAs 样品处理繁琐、检测慢等问题,进而阐明 UPC² 技术特点,为大规模临床样品精确、快速检测 SCFAs 提供依据,并为深入研究 SCFAs 的生理作用奠定基础。

1 UPC² 的发展历程及其特性

色谱法产生于 20 世纪初,经历了一个多世纪的发展,现已成为物质分离分析的重要手段而应用于各领域。在 1901 年, Tswett 首先观察到物质的色谱现象,2 年后发表了应用吸附原理进行植物色素分离的方法;直到 1906 年, Tswett 才将这种新型分离方法正式命名为色谱法。1940 年, Martin 和 Syngge 提出了分配色谱法,12 年后 James 和 Martin 构建了较为完整的 GC^[17]。在这之后,色谱法得到快速发展,到 20 世纪 60 年代,人们便制造出以微粒做为填料、高压输液泵进行输液,并与光学检测器相结合工作的高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC),极大地加快了物质分离分析的速度。1.7 μm 细颗粒固定相填料的出现使得超高效液相色谱法 (ultra high performance liquid chromatography, UPLC) 得以建立。而超临界流体对物质的溶解能力强,黏度和扩散速度均优于有机溶剂,因此超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography, SFC) 兼具 GC 和液相色谱 (liquid chromatography, LC) 的特点,同时也是对二者的补充^[18]。在此基础之上, Waters 公司首先于 2012 年发布了 UPC² 的建立,将 GC 和 LC 相结合,实现对物

质更加高效且环保的分离分析^[19]。

UPC² 由二元溶剂管理器 (binary solvent manager, BSM), 样品管理器 (sample manager, SM), 柱温箱管理器 (column manager, CM), 检测器 (detector) 以及合相管理器 (convergence chromatography manager, CCM) 组成。BSM 是 UPC² 的核心部件之一, 泵的性能好坏将直接影响整个系统的质量和结果的可靠性, BSM 采用 DPC (direct pressure control) 专利算法技术, 由 A 泵和 B 泵组成, A 泵为 CO₂ 泵, 两级冷却, 且冷却装置位于泵头的后方, 可确保实验结果具有更好的重复性; B 泵为改性剂泵, 物理结构与 UPLC 相同, 精度可高达 0.1%。通过 BSM 可以有效地控制运行流速、压力的大小以及四路改性剂的切换, 运行流速为 0.5 ~ 4 mL·min⁻¹, 压力应控制在 41 368.8 kPa 以内, 分析样品时通常调节在 34 474 kPa 以下。Fixed Loop 进样器, 进样量为 10% ~ 75% 的定量环体积, 进样方式为带针溢出部分环进样模式, 具有进样体积小、交叉污染低和进样精度高等优点。CM 根据配置的不同可分为两柱、四柱和六柱, 具有预加热模块和独立控温的特点, 温度通常控制在 35 ~ 45 °C。UPC² 配有 PDA (photo-diode array) 检测系统, 还可连用的检测系统有 MS, 高分辨率质谱 (high resolution mass spectrometry, HR-MS), 紫外 (ultraviolet, UV) 和蒸发光散射 (evaporative light scattering, ELS)。CCM 的主要功能是控制 CO₂ 流体和调控系统压力, 在 CO₂ 进泵之前有三级过滤装置, 能够加强对泵及色谱柱的保护; 系统所配置的自动备压调节器 (auto back pressure regulator, ABPR) 具有静态和动态调节的二级备压调节, 能够确保在进行等度或梯度分析时的重复性, 并提高检测的灵敏度。

2 应用 UPC² 进行 SCFAs 检测的可行性和创新性

SCFAs 是具有挥发性的脂质, 因此以往人们多采用 GC-MS 对其进行检测分析, 但 GC 对物质的分离也存在较大的局限性, 例如对于异构体、高沸点有机物、高分子和热稳定性差的化合物表现出分离困难, 分离时间长等缺点, 并且能够用于 GC 分析的样品仅占全部有机化合物中比例的 20%, 这也正说明了 GC 在食品、化工和临床运用中所存在的短板^[20]。也有少数研究者采用 LC-MS, 例如采用同位素标记的化学衍生化法对 SCFAs 进行衍生化处理。在此研究过程中, 使用 3-硝基苯胺对粪便样品中的 SCFAs 进行衍生化处理, 在上机后 12 min 的运行中, 10 个 SCFAs 被很好地分离, 方法验证也具有很好的

重复性^[21]。通过化学衍生化可以引入新的官能团, 并将分析物转化为 LC 可分离和 MS 可检测的衍生物, 这种方法虽然有效, 但化学衍生化的时间、有机物结构变异和副产物的生成也会对实验产生较大的影响。因此, LC-MS 主要适用于分析含 12 个碳原子以上的游离脂肪酸。

通过对现有的研究成果进行分析发现, SFC 能够很好地分离脂质类物质, 而 UPC² 结合了 SFC 和 UPLC 的特点, 并补充了 GC 和 LC 的短板, 是一种更加完善的色谱技术^[22-26]。如在脂质的分离检测方面, LIN 等^[16]直接将样品溶于正己烷中, 通过 UPC²-MS 进行分析发现 5 种高沸点脂肪酸在 3 min 内实现有效分离, 初步优化色谱条件后各组分的相关系数均大于 0.998 5。TAO 等^[15]运用 UPC²-MS 分析肾脏脂肪中的孕酮, 以 CO₂ 和甲醇作为流动相, 11 种目标物在 2.03 min 内即完成分离。QI 等^[27]运用 UPC² 联合二极管阵列检测器同时对油茶叶中 8 种维生素 E 的异构体进行分离测定, 8 种异构体也在 3 min 内即实现有效分离, 结果表现出良好的线性关系和高分辨率, 重现性和再现性的 RSD 分别为 0.6% ~ 3.2%, 0.8% ~ 3.3%。对现有脂质研究结果进行分析推测, 运用 UPC² 对 SCFAs 进行分离分析具有样品预处理简单、分析时间短、成本低、有机溶剂消耗少、重现性高等特点^[28]。因此建立 UPC² 对 SCFAs 的分离和检测方法, 不仅能够打破对 SCFAs 检测的传统方法, 还能够为 SCFAs 的研究提供高效、简便、环保、经济的检测技术, 在临床大规模样品的快速检测中更是体现了无可比拟的优势。

3 SCFAs 的基本认识及相关性

3.1 SCFAs 的基本认识 在过去的十年中, 脂质组学就已经成立并且作为一种新的战略思想, 用以理解并解释脂质在生物系统中的作用。根据脂质结构和功能的多样性, 脂质可分为 8 种类型, 它们分别与人体多种代谢性疾病相关联, 已经被证实的有动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、糖尿病、脂质堆积症和癌症等疾病^[29-32]。SCFAs 是挥发性有机脂肪酸, 属于衍生脂质的一种, 碳链中碳原子数为 1 ~ 6 个, 产生途径主要来源于食物中不消化的碳水化合物在结肠腔内经厌氧菌酵解生成, 经肠上皮运输后, 可在门静脉、肝脏和外周血中检测到, 主要包括乙酸、丙酸、丁酸等^[33-35], 其中在结肠和粪便中乙酸、丙酸和丁酸的含量最高, 其比值约为 2:1:1^[36]。SCFAs 在被不同器官摄取之后, 可作为信号调节剂或局部营养物质参与构成葡萄糖、脂质和胆固醇代谢的不同代谢

酶的底物,在调节能量稳态方面发挥着重要的作用^[37-39]。见表 1。

表 1 脂质的类别及举例

Table 1 Lipid categories and examples

类别	简写	举例
脂肪酸酯类	FA	十二烷酸
甘油酯类	GL	1-棕榈酰-2-油酰基甘油
甘油磷脂类	GP	1-棕榈酰-2-油酰基磷酸酰胆碱
鞘脂类	SP	<i>N</i> -(十四烷酰)- <i>D</i> -鞘氨醇-4-磷酸胆碱
固醇脂类	ST	胆甾-5-烯-3 β -醇
孕烯醇酮脂类	PR	2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -金合欢醇
糖脂类	SL	UDP-3- <i>O</i> -(3 <i>R</i> -羟基-十四烷酰)- α <i>D</i> -乙酐葡萄糖胺
多聚乙烯类	PK	黄曲霉毒素 B ₁

3.2 SCFAs 的相关性研究 近年来,研究人员发现内源性 G-蛋白偶联游离脂肪酸受体 FFAR2 (GPR43)和 FFAR3 (GPR41)被 SCFAs 广泛的激活和表达,它们被证明能够刺激多种激素肽的分泌,例如内分泌素和瘦素^[40]。此外,SCFAs 还可作为微生物和免疫系统间的通讯工具,通过 2 种互补机制激活机体肠道的糖异生,为结肠黏膜细胞提供主要的能量供应^[41-42]。SCFAs 可影响促炎 T 细胞和抗炎 T 细胞之间的平衡,参与脂肪组织炎症,并且具有缓解炎症的作用,还可通过降低促炎因子的数量,加快黏膜炎症的修复^[43-44]。同时,SCFAs 还参与宿主微生物与脑功能的相互作用:它们能够穿过血脑屏障,并且作为小胶质细胞功能和成熟的重要组成部分^[45-46]。SCFAs 能维护杯状细胞的分泌功能和肠道上皮细胞的完整性,促进黏膜免疫细胞的生理作用,在自身免疫性胰岛炎中起保护作用,并改善糖尿病的发展^[11,47]。更重要的是,近来已经证实 SCFAs 能抑制某些肿瘤细胞增殖,促进芳香烃受体在结肠癌中发挥作用^[48-52]。也有研究表明,通过口服或直肠给予 SCFAs 能调节肠道菌群,改善肠道功能^[53]。WANG 等^[54]通过研究发现较高的膳食纤维摄入量能够降低心血管疾病的死亡率。Miura 等^[55]通过对高血压患者 7 年的随访调查,发现肠道菌群代谢膳食纤维产生的 SCFAs 与较低的血压相关。这也说明通过调节人体对膳食纤维的摄入量,能够对人体健康产生有益影响。此外,SCFAs 还参与腹泻,体质量,胰岛素敏感性,Ret 综合征以及胆固醇代谢的调节^[56-57]。随着人们对 SCFAs 的关注越来越高,相关的科学研究报道也逐渐增多,但受限于 GC 的检测

水平,大多集中在多组分的整体研究。像 Aviram 等^[58]对 SCFAs 中单组分丁酸的高精度测定含量要求的研究还较少,而近些年人们研究发现丁酸不仅具有减轻肥胖的作用,还能够一定程度上诱发肥胖^[59-61]。随着研究的深入,人们发现 SCFAs 在机体内的分布和浓度对人体代谢性疾病的影响显著,同时 SCFAs 也是营养学领域的热点话题,因而尽快建立起高效的检测方法能够促进人们对 SCFAs 的进一步研究。

4 SCFAs 检测前样品的预处理

4.1 粪便样品的预处理 因 UPC²兼具了 GC 和 LC 的技术特点,故而样品预处理方法无需做特殊的改变,且多具有无需衍生的优势。样品预处理的一般开发流程为通过了解样品的性质,进而筛选合适的预处理方案。具有筛选意义的样品性质有分子的结构,PKa 值,相对分子质量和 log*P* 值,其中 log*P* 值是指某物质在油水两相中分配系数比值的对数值,常作为衡量样品是否可用于 UPC² 分离分析的特征值。若目标物的 log*P* 值在 -2 ~ 9,则可用于 UPC² 分离分析,在此区间之外则分离困难^[62],需要注意的是在样品储液的准备过程中应尽量选择弱的有机溶剂进行溶解以避免溶剂效应。张梦洁等^[63]通过 GC 法检测粪便中 SCFAs 的研究发现,在 0.5 g 新鲜样品中加入酸稀释液(100 mmol·L⁻¹ 2-乙基丁酸溶液 15 mL 和 5 mmol·L⁻¹ 盐酸溶液混合液 50 mL)8 mL,涡旋 2 min,21 130 × *g* 离心 20 min 是最佳前处理方案。转速越高,上清液越澄清,过滤效果越好,但上清液中所含 SCFAs 的含量也会随之降低。Murugesan 等^[64]称取一定量干燥粪便,按 100 g·L⁻¹加入去离子水,充分混匀后,15 749 × *g*, 4 °C 条件下离心 5 min,吸取上清液,再次 15 749 × *g*, 4 °C 条件下离心 5 min,吸取上清液过 C₁₈ 反相 Supelco 柱,也得到较好的分离效果;但该方案含水量太大,不适用于 SCFAs 的预处理与检测,且易对硅胶色谱柱造成较大损伤,应向溶剂中加入一定量的异丙醇溶液,并延长离心时间。ZENG 等^[65]将粪便样品 0.1 g 于同位素内标液 2.0 mL 中混匀 5 min 后,在 18 407 × *g*, 4 °C 条件下离心 10 min。取上清液 80 μL 于 0.1 mol·L⁻¹ 的苯基羟胺盐酸盐的甲醇溶液 10 μL 和 0.25 mol·L⁻¹ 的 *N*-(3-二甲氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐的甲醇溶液 10 μL 中, 25 °C 条件下乳化 1 h。乳化后,在 50% 的甲醇水溶液中稀释 20 倍,稀释液 200 μL 用二氯甲烷 600 μL 振摇 10 min 萃取。离心后,转移下层有机液 40 μL

于 Supelco 干燥器中 40 °C 浓缩, 浓缩液用 50% 甲醇水溶液 200 μL 复溶, 上机前再次短暂离心。Lotti 等^[14] 将粪便水溶液与磷酸盐缓冲液按体积比 1:1 混匀后, 转移混匀液于离心管中, 在 64 000 $\times g$, 4 °C 的条件下离心 2 h, 取上清液 50 μL 于 2 mL 离心管中, 加入酸化水 10 μL , 15% 的磷酸和内标液 20 μL , 剧烈混匀后进行液液萃取。需要注意的是含有磷酸盐等非挥发性盐的样品, 因该类盐不能随溶剂挥发而不能用于 MS 检测, 但可选用其他检测器联用。

4.2 血清样品的预处理 Moreau 等^[66] 在 2 100 $\times g$, 10 min 条件下离心, 血清转移到离心管中, 用质量分数为 20% 的 5-磺基水杨酸, 以体积分数 10% 加入, 19 120 $\times g$ 离心 45 min, 吸取上清液, 保存在 -80 °C 冰箱, 过 0.22 μm 滤膜, 实现了高效快速地分离, 需要说明的是收集到的血液样品应立即放于冰上冷却^[67]。Pouteau 等^[68] 将收集到的血浆, 按血浆 450 μL 加入 2.9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $^2\text{H}_3$ -乙酸 10 μL 作为内标, 并且加入 5-磺基水杨酸水溶液 (1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 10 μL , 2 000 g 离心 20 min, 取上清液转移到装有 32% HCl 10 μL 的瓶中, 加入二乙醚 3 mL 与之混合, 涡旋 30 min, 1 200 $\times g$ 离心 10 min, 将乙醚层转移至新的试管中, 保存在 -80 °C 冰箱, 也实现了较好的分离。将血液收集于肝素钠的试管中并保存于冰中, 立即 4 °C, 8 500 $\times g$ 离心 10 min, 转移血浆于 2 mL 离心管中, 并保存于 -80 °C 冰箱, 进样之前按 50 μL 的血浆以 100 μL 的甲醇去蛋白处理, 涡旋 10 min 并立即 4 °C, 50 000 $\times g$, 离心 10 min, 转移上清液于新的离心管中^[69]。Lotti 等^[14] 用 EDTA 抗凝的血液真空管收集血液样品, 并在 1 503 $\times g$, 4 °C 的条件下离心 10 min 后, 取血浆样品 100 μL 于 2 mL 离心管中, 加入酸化水 10 μL , 15% 的磷酸和内标液 10 μL , 剧烈混匀后进行液液萃取。ZENG 等^[65] 向小鼠血浆液 20 μL 中加入内标工作液 60 μL 沉淀蛋白, 振摇并在 18 407 $\times g$, 4 °C 条件下离心 10 min。在进行衍生化处理之前, 上清液 40 μL 应用超纯水 40 μL 混匀, 并进行液液萃取, 收集有机层溶液 400 μL 用于上机检测。文献中还对偶联剂 *N*-(3-二甲氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐的浓度、反应溶剂、反应时间、反应温度等因素进行了考察, 确定了最佳反应条件, 并采用 GC-MS 对在优化条件下衍生化的纯溶液和生物基质中残留的游离脂肪酸进行了考察。不过, 要想建立一种合适的化学衍生方法, 在对生物样品进行衍生化之前必须考虑几个关键因素, 例如高通量的快速反应时间、在含水的溶液中反

应的可行性、衍生物的灵敏度、对分子中官能团羧基的适用性以及衍生化后 SCFAs 的快速分离。

5 SCFAs 的检测及色谱条件的选择

通过 NCBI, PubMed 及 SpringerLink 三大数据库检索, 尚未发现已有国内外科人员使用 UPC² 进行 SCFAs 的检测, 大多研究者采用 GC-MS 进行分离和测定^[70-73]。UPC² 开发人员采用 CO₂ 作为主要流动相, 是利用 CO₂ 具有无毒、稳定、非极性等特点, 能够在较低的温度 (31 °C) 和压强 (73 bar) 下达到超临界状态, 并可与改性剂混合, 调节流动相极性, 以达到理想的分离效果^[15, 74-75]。要建立一种准确、重复性高的检测方法, 提取溶剂、辅助溶剂及改性剂的选择是关键。García-Villalba 等^[76] 为优化粪便样品中 SCFAs 的提取流程, 研究了 3 种提取溶剂的功效率, 分别是二乙醚、二氯甲烷和乙酸乙酯, 结果发现乙酸乙酯最适合作为其提取溶剂。Lotti 等^[14] 也对酸化水、乙醚、二氯甲烷、乙基叔丁基醚和甲基叔丁基醚进行了有效性测定, 并对提取溶剂在选择性、灵敏性、效率、基质效应和萃取流程等方面进行了评价和优化, 发现甲基叔丁基醚为最佳提取溶剂。

常用辅助溶剂洗脱能力由强至弱依次为甲醇、乙腈、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙醚、三氯甲烷、正己烷, 研究人员多采用两种辅助溶剂调整化合物的保留值, 文献中将多种辅助溶剂以一定比例混合也实现了样品的高效分离^[19, 77-79]。改性剂的选择可根据溶液的性质选择合适的酸性、碱性和盐类物质, 常用的酸性改性剂有甲酸、乙酸、柠檬酸和三氟乙酸; 碱性改性剂有氨水、二乙胺、三乙胺; 盐类改性剂主要为甲酸铵和乙酸铵; 可以通过加入不同组合的改性剂进而调节流动相的 pH, 密度和黏度等理化性质, 进而改变各组分的保留值。常用 UPC² 色谱柱为 BEH, BEH 2-EP, CSH Fluoro-Phenyl, HSS C₁₈ SB, Torus 等, 其中 HSS C₁₈ SB 适用于脂溶性有机物及脂肪酸的分离和测定, 但新一代 Torus 2-PIC 色谱柱更适用于非手性酸性化合物的分离和测定^[15, 20, 80]。见表 2。

6 小结与展望

SCFAs 的水平直接与肥胖、高血压、糖尿病、肿瘤等人体代谢性疾病相关联^[9, 11, 49], 尽管目前对于检测 SCFAs 含量的最佳方法以及这种测定方法能否用于评估肠道微生物的发酵水平仍然存在争议, 但是要了解机体对 SCFAs 的产生、吸收和利用的生物学特性, 就必须依赖于精确和可重复的分析方法。随着人们对其研究的深入, 传统 GC 的分析手段已

表 2 常用色谱柱的理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of common chromatographic columns

色谱柱	粒径 /μm	孔径 /Å	表面积 /m ² /g	载碳量 /%	末端 封闭
BEH	1.7,3.5	135	185	N/A	N/A
BEH 2-EP	1.7,3.5	135	185	9	No
CSH FP	1.7,3.5	135	185	10	No
HSS C ₁₈ SB	1.8,3.5	100	230	8	No

注:颗粒形状均为球形。

无法满足人们对其组分快速、高效检测分析的要求,而 UPC² 在物质的检测分析中,表现出灵敏度高、分离度高、峰形好、出峰时间短和成本低等优势。因此,通过 UPC² 来建立新型 SCFAs 的检测方法不仅可以实现高效、准确地对其进行分离分析,而且能够促进人们对其在机体代谢中所发挥的作用的认识,有助于推动与 SCFAs 相关的研究。

[参考文献]

[1] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. Cell, 2016, 165 (6) : 1332-1345.

[2] ZHAO L P, ZHANG F, DING X Y, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes [J]. Science, 2018, 359 (6380) : 1151-1156.

[3] Sawicki C M, Livingston K A, Obin M, et al. Dietary fiber and the human gut microbiota: Application of evidence mapping methodology [J]. Nutrients, 2017, 9 (2) : 1-21.

[4] Zadeh-Tahmasebi M, Duca F A, Rasmussen B A, et al. Activation of short and long chain fatty acid sensing machinery in the ileum lowers glucose production *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2016, 291 (16) : 8816-8824.

[5] LIU Z, LIU T. Production of acrylic acid and propionic acid by constructing a portion of the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle from *Metallosphaera sedula* in *Escherichia coli* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2016, 43 (12) : 1659-1670.

[6] Reigstad C S, Salmonsén C E, Rainey J F I, et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells [J]. Faseb J, 2015, 29 (4) : 1395-1403.

[7] Bugaut M, Bentejac M. Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals [J]. Annu Rev Nutr, 1993, 13 (1) : 217-241.

[8] Natarajan N, Hori D, Flavahan S, et al. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41 [J]. Physiological Genomics, 2016, 48 (11) : 826-834.

[9] Pluznick J L. Microbial Short-chain fatty acids and blood pressure regulation [J]. Curr Hypertens Rep, 2017, 19 (4) : 25.

[10] Hald S, Schioldan A G, Moore M E, et al. Effects of arabinoxylan and resistant starch on intestinal microbiota and short-chain fatty acids in subjects with metabolic syndrome: A randomised crossover study [J]. PLoS One, 2016, 11 (7) : 1-18.

[11] Marino E, Richards J L, Mcleod K H, et al. Erratum: gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes [J]. Nat Immunol, 2017, 18 (11) : 1271.

[12] Pruksatrakul T, Phoopraintra P, Wilairat P, et al. Development of a sequential injection-liquid microextraction procedure with GC-FID for analysis of short-chain fatty acids in palm oil mill effluent [J]. Talanta, 2017, 165 (67) : 1-29.

[13] TAO J H, DUAN J A, JIANG S, et al. Simultaneous determination of six short-chain fatty acids in colonic contents of colitis mice after oral administration of polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* Ramat by gas chromatography with flame ionization detector [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1029 (458) : 88-94.

[14] 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]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409 (23) : 5555-5567.

[15] TAO Y, Paula R, Stolker A, et al. Simultaneous determination of seven gestagens in kidney fats by ultra performance convergence chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2015, 988 (2015) : 143-148.

[16] LIN C, FAN N L, RUI P X, et al. Rapid detection of five common fatty acids in industrial oleic acid based on ultra performance convergence chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43 (1) : 75-80.

[17] Snyder L R, Kirkland J J. Introduction to modern liquid chromatography [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 181 (3-4) : 1-2.

[18] Kim H S, Moon B C, Choi G, et al. Ultra-performance convergence chromatography for the quantitative

- determination of bioactive compounds in *Aralia continentalis* Kitagawa as quality control markers [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(9):2071-2079.
- [19] ZHOU Q, GAO B, ZHANG X, et al. Chemical profiling of triacylglycerols and diacylglycerols in cow milk fat by ultra-performance convergence chromatography combined with a quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2014, 143(2014):199-204.
- [20] 鲁红军. 气相色谱衍生化技术在食品分析中的应用 [J]. *分析仪表与分析监测*, 1994(3):26-29.
- [21] HAN J, LIN K, Sequeira C, et al. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chimica Acta*, 2015, 854:86-94.
- [22] WANG M, WANG Y H, Avula B, et al. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: A novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry [J]. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2016, 1(1):262-271.
- [23] ZHANG H, MA Z F, YANG H, et al. Determination of chlormequat and mepiquat residues and their dissipation rates in tomato cultivation matrices by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1064:75-84.
- [24] LI P, YUE G G, Kwok H F, et al. Using ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry-based chemometrics for the identification of anti-angiogenic biflavonoids from edible garcinia species [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(38):8348-8355.
- [25] HUANG Y, TANG G, ZHANG T, et al. Supercritical fluid chromatography in traditional Chinese medicine analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147:65-80.
- [26] Bamba T, Lee J W, Matsubara A, et al. Metabolic profiling of lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1250:212-219.
- [27] QI N L, GONG X, FENG C P, et al. Simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in *Moringa oleifera* Lam. leaves by ultra performance convergence chromatography [J]. *Food Chem*, 2016, 207:157-161.
- [28] GAO B, LUO Y, LU W, et al. Triacylglycerol compositions of sunflower, corn and soybean oils examined with supercritical CO₂ ultra-performance convergence chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2017, 218:569-574.
- [29] HAN X, Gross R W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics [J]. *J Lipid Res*, 2003, 44(6):1071-1079.
- [30] Shevchenko A, Simons K. Lipidomics coming to grips with lipid diversity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 8(11):593-598.
- [31] Merrill A H, Dennis E A, McDonald J G, et al. Lipidomics technologies at the end of the first decade and the beginning of the next [J]. *Adva Nutr*, 2013, 4(5):565-567.
- [32] Fahy E, Subramaniam S, Brown H A, et al. A comprehensive classification system for lipids [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(5):839-861.
- [33] Stein J, Zores M, Der O S. Short-chain fatty acid (SCFA) uptake into Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier mediated transport mechanism [J]. *Eur J Nutr*, 2000, 39(3):121-125.
- [34] Primec M, Micetic-Turk D, Langerholc T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: a scoping review [J]. *Anal Biochem*, 2017, 526(6):9-21.
- [35] Cummings J H, Pomare E W, Branch W J, et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood [J]. *Gut*, 1987, 28(10):1221-1227.
- [36] Hj B. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea [J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72(2010):297-313.
- [37] GAO Z, YIN J, ZHANG J, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice [J]. *Diabetes*, 2009, 58(7):1509-1517.
- [38] Fushimi T, Suruga K, Oshima Y, et al. Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet [J]. *Br J Nutr*, 2006, 95(5):916-924.
- [39] Demigné C, Morand C, Levrat M A, et al. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes [J]. *Br J Nutr*, 1995, 74(2):209-219.
- [40] Brown A J, Goldsworthy S M, Barnes A A, et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13):11312-11319.
- [41] XIONG Y, Miyamoto N, Shibata K, et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41 [J]. *PNAS*, 2004, 101(4):1045-1050.

- [42] Tolhurst G, Heffron H, Lam Y S, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2 [J]. *Diabetes*, 2012, 61(2):364-371.
- [43] Arpaia N, Campbell C, FAN X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation [J]. *Nature*, 2013, 504(7480):451-455.
- [44] SUN M M, WU W, LIU Z J, et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases [J]. *J Gastroenterol*, 2017, 52(1):1-8.
- [45] Erny D, de Angelis Al H, Prinz M. Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate [J]. *Immunology*, 2017, 150(1):7-15.
- [46] AWF J, Kersten S. Potential mediators linking gut bacteria to metabolic health: a critical view [J]. *J Physiol*, 2017, 595(2):477-487.
- [47] Wen L, Wong F S. Dietary short-chain fatty acids protect against type 1 diabetes [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(5):484-486.
- [48] Basson M D, Turowski G A, Rashid Z, et al. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate [J]. *Dig Dis Sci*, 1996, 41(10):1989-1993.
- [49] JIN U H, CHENG Y, Park H, et al. Short chain fatty acids enhance aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in mouse colonocytes and Caco-2 human colon cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10163.
- [50] Tsukahara T, Iwasaki Y, Nakayama K, et al. Stimulation of butyrate production in the large intestine of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. [J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2004, 49(6):414-421.
- [51] Menzel T, Luhrs H, Zirlik S, et al. Butyrate inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells via modulation of VCAM-1 [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2004, 10(2):122-128.
- [52] Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, et al. Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF-kappa B and PPAR alpha [J]. *J Nutr Biochem*, 2004, 15(4):220-228.
- [53] Ichikawa H, Shineha R, Satomi S, et al. Gastric or rectal instillation of short-chain fatty acids stimulates epithelial cell proliferation of small and large intestine in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(5):1141-1146.
- [54] WANG X, OUYANG Y, LIU J, et al. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer-systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies [J]. *Br Med J*, 2014, 349(2014):g4490.
- [55] Miura K, Greenland P, Stamler J, et al. Relation of vegetable, fruit, and meat intake to 7-year blood pressure change in middle-aged men-the Chicago Western electric study [J]. *Am J Epidemiol*, 2004, 159(6):572-580.
- [56] Conterno L, Fava F, Viola R, et al. Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease [J]. *Genes Nutr*, 2011, 6(3):241-260.
- [57] Verbeke K A, Boobis A R, Chiodini A, et al. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics [J]. *Nutr Res Rev*, 2015, 28(1):42-66.
- [58] Aviram A, Rephaeli A, Shaklai M, et al. Effect of the cytostatic butyric acid pro-drug, pivaloyloxymethyl butyrate, on the tumorigenicity of cancer cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123(5):267-271.
- [59] Elce A, Amato F, Zarrilli F, et al. Butyrate modulating effects on pro-inflammatory pathways in human intestinal epithelial cells [J]. *Benef Microbes*, 2017, 8(5):841-847.
- [60] ZHENG L, Kelly C J, Battista K D, et al. Microbial-derived butyrate promotes epithelial barrier function through IL-10 receptor-dependent repression of Claudin-2 [J]. *J Immunol*, 2017, 199(8):2976-2984.
- [61] LIU H, WANG J, HE T, et al. Butyrate: a double-edged sword for health [J]. *Adv Nutr*, 2018, 9(1):21-29.
- [62] YING Y. Acquity ultra performance convergence chromatography analysis method development process [R]. Nanjing: Waters, 2012.
- [63] 张梦洁, 袁甜, 史雪敏, 等. 气相色谱法检测粪便中短链脂肪酸的前处理方法 [J]. *包头医学院学报*, 2017, 33(11):121-123.
- [64] Murugesan S, Ulloa-Martinez M, Martinez-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):1337-1346.
- [65] ZENG M, CAO H. Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction [J]. *J Chromatogr*, 2018, 1083(2018):137-145.
- [66] Moreau N M, Goupy S M, Antignac J P, et al. Simultaneous measurement of plasma concentrations and

- 13C-enrichment of short-chain fatty acids, lactic acid and ketone bodies by gas chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 784 (2) : 395-403.
- [67] Meesters R J W, van Eijk H M H, Ten Have G A M, et al. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to measure the concentrations and study the synthesis of short chain fatty acids following stable isotope infusions [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 854 (1/2) : 57-62.
- [68] 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.
- [69] Van 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) : 719-724.
- [70] ZHAO X, JIANG Z, YANG F, et al. Sensitive and simplified detection of antibiotic influence on the dynamic and versatile changes of fecal short-chain fatty acids [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (12) : 1-17.
- [71] WAN J, HU S, NI K, et al. Characterisation of fecal soap fatty acids, calcium contents, bacterial community and short-chain fatty acids in sprague dawley rats fed with different sn-2 palmitic triacylglycerols diets [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (10) : e0164894.
- [72] Mulat D G, Feilberg A. GC/MS method for determining carbon isotope enrichment and concentration of underivatized short-chain fatty acids by direct aqueous solution injection of biogas digester samples [J]. *Talanta*, 2015, 143 (2015) : 56-63.
- [73] ZHAO R, CHU L, WANG Y, et al. Application of packed-fiber solid-phase extraction coupled with GC-MS for the determination of short-chain fatty acids in children's urine [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 468 (2017) : 120-125.
- [74] Kim H S, Chun J M, Kwon B I, et al. Development and validation of an ultra-performance convergence chromatography method for the quality control of *Angelica gigas* Nakai [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39 (20) : 4035-4041.
- [75] LIN C, XIE X, FAN N, et al. Fast analysis of common fatty acids in edible vegetable oils by ultra-performance convergence chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33 (4) : 397-402.
- [76] Garcia-Villalba R, Gimenez-Bastida J, Garcia-Conesa M, 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.
- [77] Rathi D N, CHEN Y L, Fairulnizal M N M, et al. Fat-soluble vitamin and carotenoid analysis in cooking oils by ultra-performance convergence chromatography [J]. *Food Anal Method*, 2017, 10 (4) : 1087-1096.
- [78] TANG J, DING Y, CAO X, et al. Rapid detection of eight fluorescent whitening agents in textile by ultra performance convergence chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32 (11) : 1230-1235.
- [79] DAI X, WEI B, WANG X, et al. Determination of 18 polycyclic aromatic hydrocarbons in plastic products by ultra performance convergence chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33 (10) : 1059-1064.
- [80] Quanson J L, Stander M A, Pretorius E, et al. High-throughput analysis of 19 endogenous androgenic steroids by ultra-performance convergence chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1031 : 131-138.

[责任编辑 顾雪竹]