

张晓伟,孙鑫,李秀娟,等. 衍生化-顶空固相微萃取-气相色谱法测定大鼠粪便中游离短链脂肪酸[J].华中农业大学学报, 2021,40(5):160-168.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.05.020

衍生化-顶空固相微萃取-气相色谱法测定大鼠粪便中 游离短链脂肪酸

张晓伟,孙鑫,李秀娟,潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院,武汉 430070

摘要 为满足生物样品中短链脂肪酸的痕量检测需求,以氯甲酸丙酯为衍生试剂,结合顶空固相微萃取,建立了基质内衍生-顶空固相微萃取-气相色谱方法用于大鼠粪便中 7 种游离短链脂肪酸的测定。在最佳衍生条件(pH 8、300 μL 丙醇、100 μL 吡啶、100 μL 氯甲酸丙酯及涡旋衍生 2 min)及顶空固相微萃取的条件(pH 3.46、萃取温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、萃取时间 40 min 和转速 1 000 r/min)下,该方法的检出限在 0.133~0.420 $\mu\text{mol}/\text{kg}$,定量限在 0.444~1.400 $\mu\text{mol}/\text{kg}$,远低于其他文献中所建方法的检出限和定量限,而且线性关系好($R^2 > 0.99$),精密度和准确度高,加标回收率在 65.42%~117.69%,相对标准偏差低于 11.60%。该方法操作简单、快速、灵敏且廉价,完全能够满足粪便中短链脂肪酸痕量检测需求。

关键词 大鼠粪便;短链脂肪酸;氯甲酸丙酯;基质中衍生;固相微萃取;气相色谱

中图分类号 O 657.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)05-0160-09

短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)是肠道菌群重要代谢产物,主要包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸^[1-2]。研究发现,约 5%~10%的 SCFAs 被排泄在粪便中,90%以上的 SCFAs 在盲肠和结肠中被吸收,参与生命活动代谢,在维持肠道稳态、调节宿主代谢及免疫应答和一些相关性疾病中发挥重要作用^[3-4]。粪便是目前研究 SCFAs 应用最为广泛的生物样品,其 SCFAs 浓度与结肠状态和肠道菌群密切相关,是肠道菌群监测、肠道疾病及代谢性疾病早期诊断的重要手段^[5-6]。然而,SCFAs 理化性质独特,含量较低且粪便等生物样品基质复杂等因素使得 SCFAs 的准确定量十分困难^[7]。因此,建立操作简单、灵敏度高及分析成本低的检测方法对于粪便中 SCFAs 的分析具有重要意义。

气相色谱法(gas chromatography, GC)是目前分析 SCFAs 最为常用的方法^[8-10],但是 SCFAs 极性较强,易在色谱柱中产生吸附(尤其在低浓度时),导致检测结果的重现性和准确度较差^[9]。因此,常常会将 SCFAs 衍生化后再通过有机溶剂萃

取,经脱水或浓缩后进行 GC 分析,但此过程中 SCFAs 衍生物极易逸失,回收率偏低^[10],而且过量衍生试剂也会对色谱柱造成损害。采用固相微萃取技术(solid-phase microextraction, SPME)可以改善上述状况,还可以大大提高方法的灵敏度,被广泛应用于食品、医药及生物领域中痕量化合物的检测^[11-12]。但是衍生化 SPME 结合用于分析生物样品中 SCFAs 的报道并不多,并且还存在着一些不足:回收率偏低、准确度不佳、衍生反应条件苛刻、安全性差、衍生操作繁琐、耗时及分析成本高等^[13-16]。

目前用于 SCFAs 衍生的试剂有五氟苄基溴(pentafluorobenzyl bromide, PFBBBr)^[17-18]、三甲基硅烷试剂(trimethylsilyl, TMS)^[19]、烷基氯甲酸酯类^[20-23]等。其中,烷基氯甲酸酯类因衍生操作简单、快速、条件温和、价格便宜等优点,被广泛用于 SCFAs 衍生^[20]。Furuhashi 等^[20]和 Zheng 等^[21]发现氯甲酸丙酯(propylchloroformate, PCF)衍生效率较高,衍生物在色谱中分离好,获得了较好的分析结果。但是他们使用粪便提取液进行衍生化,再采用液液萃取分离纯化,操作过程极为繁琐,需用大量

收稿日期:2021-03-24

基金项目:湖北省农业科技创新岗位项目(201962000000131)

张晓伟, E-mail: 2118845274@qq.com

通信作者:李秀娟, E-mail: lixiujuan@mail.hzau.edu.cn

有机试剂进行多次分离转移,目标物极易逸失,导致分析物回收率偏低,且检出限较高,可能无法满足生物样品中痕量 SCFAs 的检测^[20-21]。

因此,为改善传统 GC 法不足,更加适用于 SCFAs 的痕量检测,本研究以 PCF 为衍生试剂,结合 HS-SPME,建立基质内衍生-顶空固相微萃取-气相色谱方法用于大鼠粪便中游离 SCFAs 的测定,期为肠道菌群与健康研究提供技术支持,并为血液及组织等生物样品中 SCFAs 的痕量检测提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

大鼠粪便由华中农业大学实验动物中心提供。

乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、己酸、2-甲基戊酸(>98%)及 PCF(>99%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;正丙醇、吡啶(分析纯),上海国药集团化学试剂有限公司;超纯水。

使用超纯水配制 SCFAs 混合标准储备溶液,每种标准物的质量浓度为 1 mg/mL。将储备溶液进一步稀释至一系列浓度制备混合标准工作溶液。在超纯水中制备 2-甲基戊酸储备溶液(0.1 mg/mL),将其用作内标(IS)。所有标准储备溶液和所有工作溶液均存储于 4℃。

1.2 仪器与设备

SP-7890 型气相色谱仪(配氢火焰离子化检测器,FID),山东鲁南瑞虹化工有限公司;N2000 色谱工作站,浙江大学智达信息工程有限公司;SE-54 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm),兰州中科安泰分析科技有限公司;CT-1 型氮氢空气发生器,武汉科林普丰仪器有限公司;QL-861 型漩涡混合器,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;XHF-D 高速分散器内切式匀浆机,宁波新芝生物科技股份有限公司;DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,武汉德力祥仪器设备有限公司。

65 μm 羟基硅油-甲基丙烯酸丁酯-二乙烯苯基(hydroxy-terminated silicone oil-butyl methacrylate-divinylbenzene, OH-TSO-BMA-DVB) 萃取头参考文献[24]制备。

气相色谱条件:以高纯氮气为载气,柱头压 0.10 MPa,空气 0.095 MPa,氢气 0.065 MPa,尾吹气 0.075 MPa,分流比为 20:1。进样口温度 280℃,FID 温度 290℃。升温程序:初始温度 70℃,保持

1 min,然后以 5℃/min 升至 120℃,以 10℃/min 升至 280℃,保持 10 min。

1.3 粪便中 SCFAs 提取、衍生和顶空固相微萃取操作方法

随机收集 Wistar 大鼠的新鲜粪便于离心管内,密封并于-80℃冻存。粪便基质内 SCFAs 的提取参考 Zheng 等^[21]的方法并加以调整。取-80℃冻存的粪便,以料液质量比 1:10,加入超纯水(含 10 μg/mL 的 2-甲基戊酸作为内标),匀浆 10 min。称取 1.1 g 样品悬浊液,加入 NaOH 溶液调节 pH 值为 8,依次加入 100 μL 吡啶、300 μL 丙醇和 100 μL PCF,涡旋 2 min 进行衍生。衍生完毕后,加入盐酸调节溶液 pH 值为 3,置于恒温加热磁力搅拌器中,转速 1 000 r/min、温度 60℃,采用 OH-TSO-BMA-DVB 萃取头萃取 30 min,然后取出萃取头于 280℃下 GC 气化室解吸 5 min。所有试验均做 3 次平行,结果取平均值。

取-80℃冻存的粪便,以料液质量比 1:4 加入超纯水(含 10 μg/mL 的 2-甲基戊酸作为内标),匀浆 10 min,加入一定浓度的混合标准液涡旋混合,在 4℃下放置 12 h 以模拟真实样品,再加入一定量超纯水(含 10 μg/mL 的 2-甲基戊酸)使以料液质量比为 1:10。按照上述操作,分别对影响衍生的因素(pH、吡啶、丙醇及 PCF)和顶空固相微萃取的因素(萃取温度、萃取时间、pH 及转速)进行优化。

1.4 方法建立与评价

采用内标标准加入法定量。按本文“1.3”方法在样品中加入一系列不同浓度混合标准溶液,加入内标,在 4℃下放置 12 h,按照最佳条件进行衍生和 HS-SPME 操作。以各组分加标浓度为横坐标,以各组分峰面积和内标物峰面积之比的平均值为纵坐标建立定量标准曲线。

根据 $3\delta/S$ (δ 为仪器空白响应值的标准偏差, S 为采用不含内标的标准加入法建立的校正曲线的斜率)求得方法的检出限,定量限(limit of quantification, LOQ)为 $10\delta/S$ 。

通过内标标准加入法定量,采用绘制的标准曲线,曲线与横坐标的交点的绝对值即为真实样品中 SCFAs 的浓度。采用内标标准加入法计算试验方法的回收率。在真实样品中分别添加各 SCFAs 线性范围内高、中、低 3 个浓度的混合标准溶液,在最优条件下,重复测定 3 次得到各组分峰面积与内标峰面积比值的平均值,代入标准曲线方程中计算出

浓度,与加标浓度的比值即为方法的加标回收率。精密度用相对标准偏差(RSD)表示。

1.5 数据处理

数据处理采用 Excel 2016 版本软件,绘图采用 ChemDraw 19.0 和 Origin 2018 版本软件。

2 结果与分析

2.1 粪便中 SCFAs 的衍生条件优化

图 1 显示了 SCFAs 的 PCF 衍生过程。为了获

得满意的衍生化效果和萃取效果,对衍生条件进行了优化。

1)衍生辅助方式。SCFAs 衍生效果与衍生试剂添加速率及衍生体系的摇动程度有关。为此,比较了超声和涡旋 2 种辅助方式,如图 2 所示,涡旋更有利于粪便中 SCFAs 的衍生。进一步考察了涡旋时长对衍生反应的影响,发现涡旋 1 min 即可满足衍生需要,但是当涡旋 2 min 时,结果的重现性更好,因此选择涡旋 2 min 用于后续研究。

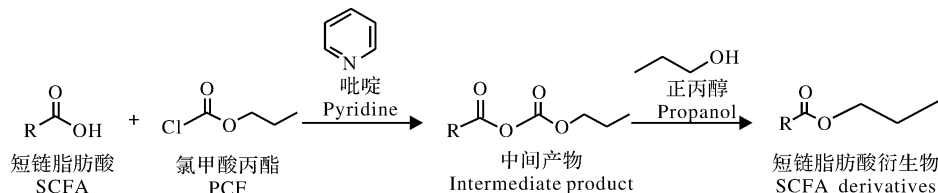
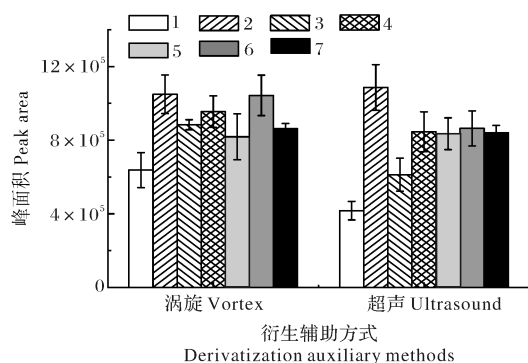


图 1 氯甲酸丙酯衍生短链脂肪酸的示意图

Fig.1 Schematic representation of derivatization of SCFAs with PCF



1:乙酸; 2:丙酸; 3:异丁酸; 4:丁酸; 5:异戊酸; 6:戊酸; 7:己酸。下同。1: Acetic acid; 2: Propionic acid; 3: Isobutyric acid; 4: Butyric acid; 5: Isovaleric acid; 6: Valeric acid; 7: Caproic acid. The same as below.

图 2 衍生辅助方式对粪便中游离 SCFAs 衍生的影响

Fig.2 The effect of different auxiliary methods on the derivatization of free SCFAs in rat feces

2)pH。体系 pH 是影响衍生化反应的重要因素之一。在最初的试验中发现,当 pH 过高时,PCF 水解,衍生效果较差,各目标物的萃取量较低。因此,将衍生体系 pH 值分别设置为 6、7、8、9 和 10,考察 pH 值对衍生反应的影响。如图 3 所示,当溶液 pH 值在 8~9 时,衍生效果较佳。综合考虑,选择 pH 8 用于后续试验。

3)吡啶加入量。吡啶是烷基氯甲酸酯类衍生化反应中常用的催化剂。图 4 考察了不同吡啶加入量对粪便中 SCFAs 衍生的影响。当吡啶加入量从 50

μL 增加至 100 μL 时,所有 SCFAs 的衍生率大幅度上升,在 100~150 μL 时衍生率上升较慢,而后开始

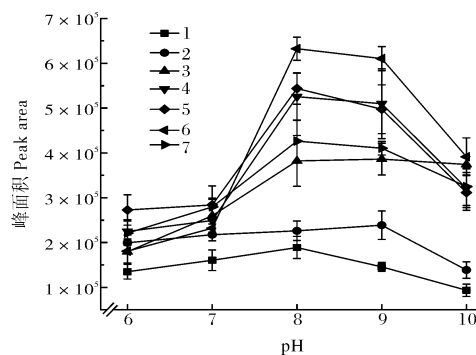


图 3 pH 对粪便中游离 SCFAs 衍生的影响
Fig.3 The effect of pH on the derivatization of free SCFAs in feces

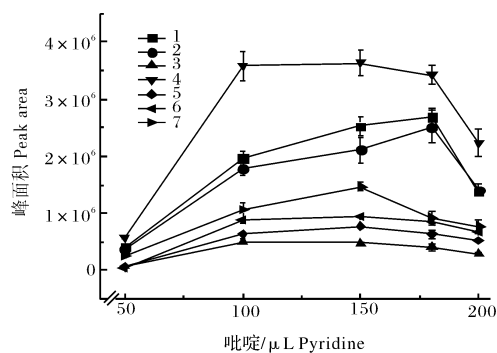


图 4 吡啶加入量对粪便中游离 SCFAs 衍生的影响
Fig.4 The effect of pyridine addition on the derivatization of free SCFAs in feces

下降。这是因为吡啶呈碱性,过多使用吡啶会影响体系 pH,导致衍生效果变差;而且过多的吡啶会损坏萃取涂层,使涂层萃取效果下降。综合考虑,选择 100 μL 吡啶用于后续试验。

4) 丙醇加入量。过量的丙醇可以使衍生反应完全,但是丙醇用量过多,会降低衍生体系极性,增加衍生物在溶剂中的溶解度,减少衍生物萃取量。图 5 考察了丙醇对 SCFAs 衍生反应的影响,选择 300 μL 丙醇用于后续试验。

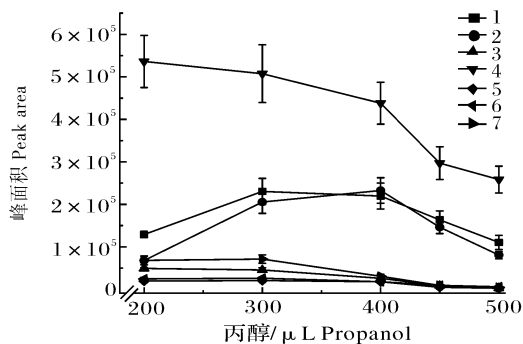


图 5 丙醇加入量对粪便中游离 SCFAs 衍生的影响
Fig.5 The effect of propanol addition on the derivatization of free SCFAs in feces

5) 氯甲酸丙酯加入量。衍生试剂的用量对衍生反应的影响比较复杂。图 6 考察了 PCF 加入量对粪便中 SCFAs 衍生的影响,发现当衍生试剂用量大于 100 μL 时,衍生物的萃取量下降。过多的衍生试剂会产生更多的副产物,干扰衍生反应进行,也影响涂层对衍生物的萃取效果,造成衍生试剂峰拖尾,导致背景噪音增加,对衍生物的检测造成影响。所以,选择 100 μL PCF 用于后续研究。

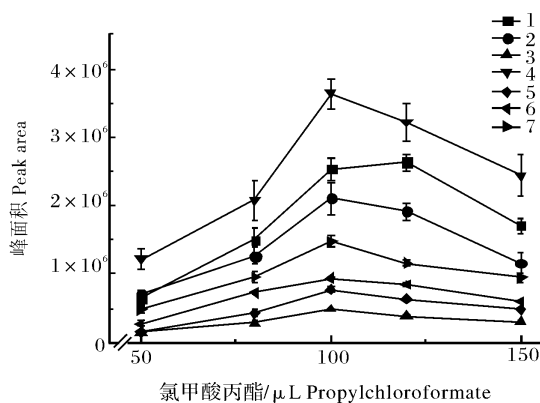


图 6 氯甲酸丙酯加入量对粪便中游离 SCFAs 衍生的影响
Fig.6 The effect of propylchloroformate addition on the derivatization of free SCFAs in feces

2.2 顶空固相微萃取条件优化

1) 萃取温度。萃取温度是影响 SPME 的重要因素之一。如图 7 所示,萃取温度升高会加快 SCFAs 衍生物从样品基质向顶空的传递速率,增强了涂层的萃取效果,但是当温度继续升高,分析物在涂层与基质间的分配常数降低,导致分析物的萃取量下降,而且温度过高也会导致衍生物的水解,降低衍生物的萃取量。因此,选择萃取温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 用于后续研究。

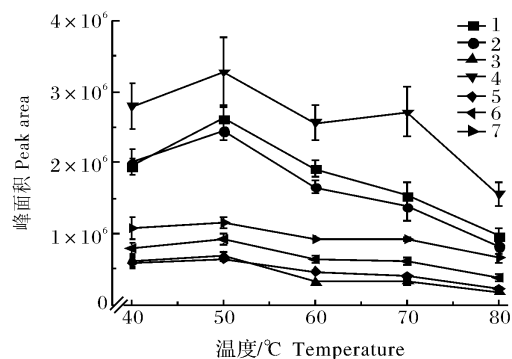


图 7 温度对粪便中游离 SCFAs 衍生物萃取的影响
Fig.7 The effect of temperature on the extraction of the SCFAs derivatives in feces

2) 萃取时间。由图 8 可知,随着萃取时间的增加,各 SCFAs 衍生物的萃取量逐渐增加,在 40 min 达到萃取平衡;当继续延长萃取时间到 70 min,各目标物的重现性变差,甚至乙酸的萃取量开始下降,可能是长时间的水浴加热导致衍生物开始水解造成。所以,选择 40 min 作为萃取时间用于后续研究。

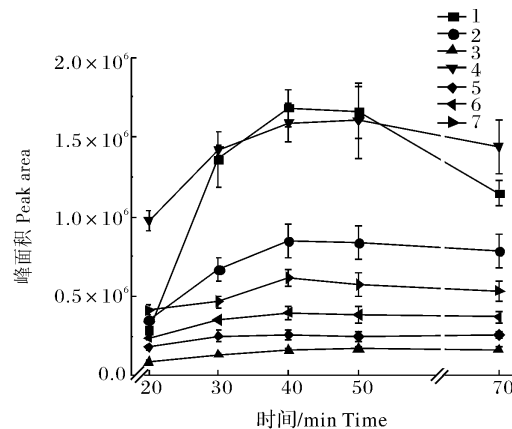


图 8 萃取时间对粪便中游离 SCFAs 衍生物萃取的影响
Fig.8 The effect of extraction time on the extraction of the SCFAs derivatives in feces

3) 搅拌速度。搅拌可以提高分析物的传递速率,缩短萃取时间,提高萃取效果,但搅拌时一定要保持速度的均匀性和一致性,否则将会导致分析物的萃取量下降或者重复性变差。由图 9 可知,随着搅拌速度增加,SCFAs 衍生物的萃取量逐渐增加,并在转速为 1 000 r/min 时,达到最佳萃取效果;当继续提高转速时,由于转速过高,磁子不均匀转动甚至跳动,从而导致各目标物的萃取量下降。

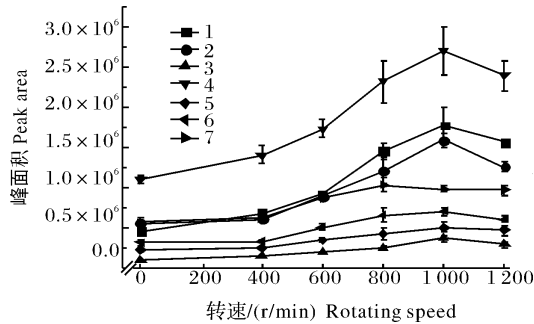


图 9 转速对粪便中游离 SCFAs 衍生物萃取的影响

Fig.9 The effect of rotating speed on the extraction of the SCFAs derivatives in feces

4) pH。pH 对衍生反应和 SPME 的影响是不同的。图 10 反映了衍生后体系的 pH 对 SCFAs 衍生物萃取的影响。衍生完成后体系的 pH 呈弱酸性,在 4.19 左右,通过加入一定浓度的 NaOH 溶液或 HCl 溶液调节体系 pH,发现当 pH 为 3.46 时,涂层对衍生物的萃取效果最佳。当 pH 值小于或者大于 3.46 时,衍生物的萃取量明显下降,可能因为 pH 较低或较高会导致 SCFAs 衍生物的水解,或导致衍生物在溶液中电离,影响萃取。

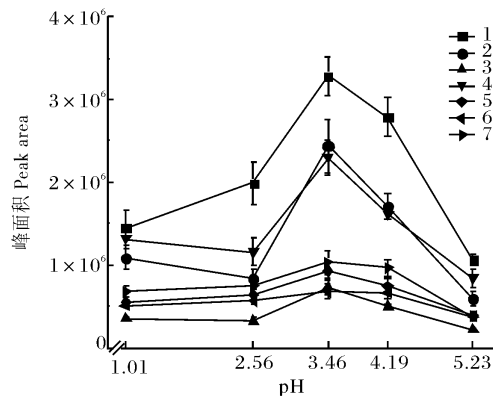


图 10 不同 pH 对粪便中游离短链脂肪酸衍生物萃取的影响

Fig.10 The effect of pH on the extraction of the SCFAs derivatives in feces

2.3 方法建立与评价

在大鼠粪便悬浊液中添加不同浓度的 SCFAs 混合标准溶液及内标,在最佳衍生条件和顶空固相微萃取条件下,建立氯甲酸丙酯衍生-顶空固相微萃取-气相色谱检测方法,结果见表 1。7 种 SCFAs 的线性范围很宽,决定系数 R^2 均大于 0.99,所建方法的 LOD 在 0.133~0.420 $\mu\text{mol}/\text{kg}$,LOQ 在 0.444~1.400 $\mu\text{mol}/\text{kg}$,连续 5 次重复试验的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 在 7.63%~12.84%。

表 1 7 种短链脂肪酸的线性范围、决定系数、检出限、定量限和精密度

Table 1 Linear linearities, coefficients of determination, LOD, LOQ and precision of 7 kinds of SCFAs

短链脂肪酸 SCFAs	线性范围/ ($\mu\text{g}/\text{g}$) Linear range	决定 系数 R^2	检出限/ ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) LOD	定量限/ ($\mu\text{mol}/\text{kg}$) LOQ	相对标 准差/% RSD
乙酸 Acetic acid	10~ 5 000	0.994 7	0.420	1.400	8.57
丙酸 Propionic acid	10~ 5 000	0.997 7	0.364	1.212	7.63
异丁酸 Isobutyric acid	0.1~ 500	0.996 5	0.345	1.151	8.79
丁酸 Butyric acid	10~ 5 000	0.993 3	0.199	0.662	12.16
异戊酸 Isovaleric acid	0.1~ 500	0.992 8	0.177	0.591	12.84
戊酸 Valeric acid	0.1~ 500	0.994 5	0.145	0.482	10.32
己酸 Caproic acid	0.1~ 500	0.998 6	0.133	0.444	10.45

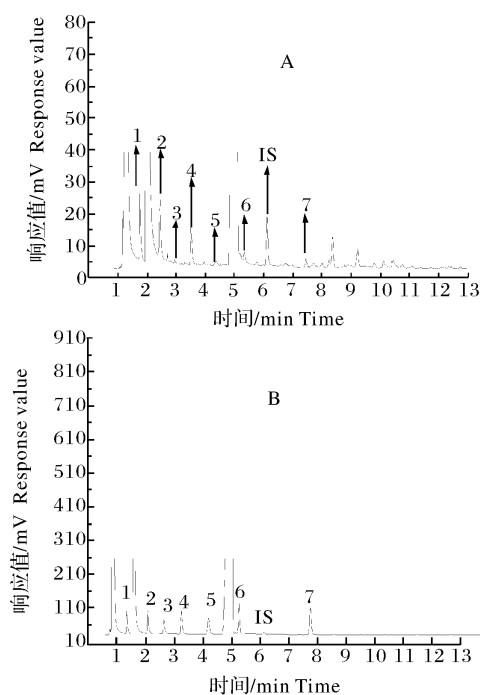
随机收集大鼠粪便,按照所建方法测定其中乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸的含量分别为 12.51、6.26、0.36、1.80、0.35、0.17 和 0.61 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

向该样品中添加高、中、低 3 种浓度的混合标准溶液,计算加标回收率,以验证方法的准确性,结果如表 2 所示。除异戊酸和己酸的低浓度加标回收率较低外,该方法的加标回收率都在 65.42%~117.69%, $RSD \leq 11.60\%$,说明该方法的准确度和精密度较好。由图 11A 和 11B 可知,该方法用于实际样品和加标样品(每种 SCFAs 的添加量均为 500 $\mu\text{g}/\text{g}$) 分析时,7 种 SCFAs 在此衍生条件下,衍生效果较好,谱图较为干净,没有衍生试剂峰拖尾及背景噪音增加现象,衍生物分离度好,不会对衍生物的检测造成影响。

表2 方法的回收率与精密度

Table 2 Recovery and precision of the proposed method

短链脂肪酸 SCFAs	加标水平/ ($\mu\text{g/g}$) Spiking levels	回收率/% Recovery	相对标准 偏差/% RSD
乙酸 Acetic acid	10.00	94.17	2.55
	2 500.00	107.07	5.56
	5 000.00	97.32	4.56
丙酸 Propionic acid	10.00	93.43	1.91
	2 500.00	98.25	11.60
	5 000.00	100.16	3.79
异丁酸 Isobutyric acid	0.10	97.69	4.13
	250.00	109.69	6.78
	500.00	97.24	4.83
丁酸 Butyric acid	10.00	80.67	11.06
	2 500.00	106.52	8.02
	5 000.00	97.19	6.24
异戊酸 Isovaleric acid	0.10	65.42	11.11
	250.00	90.61	8.16
	500.00	102.04	11.58
戊酸 Valeric acid	0.10	82.07	4.81
	250.00	117.69	5.38
	500.00	97.55	8.49
己酸 Caproic acid	0.10	75.50	6.41
	250.00	116.12	4.96
	500.00	97.66	5.51



IS: 内标物 2-甲基戊酸。IS: Internal standard 2-methyl valeric acid.

图 11 大鼠粪便中 SCFAs 衍生物 (A) 和加标大鼠粪便中 SCFAs 衍生物 (B) 的气相色谱图

Fig.11 Gas chromatograms of derivatives of SCFAs in rat feces (A) and spiked rat feces (B)

3 讨论

本研究以 PCF 为衍生试剂,建立了衍生化-顶空固相微萃取-气相色谱法分析大鼠粪便中游离短链脂肪酸。由表 3 可知,相对于现有的 SPME 法、衍生化-液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)-直接进样法^[18-19]及 LLE-直接进样法^[25-26]等方法,本方法具备操作简单、快速、省时、精密度好、灵敏度高等优点。同时本方法采用基质内衍生,结合 HS-SPME 进行富集萃取,有效减少了大量有机试剂的使用及在分离提取过程中衍生物的损失,降低了过量衍生试剂对色谱柱的损害。此外,本方法对仪器要求不高,采用 GC-FID 设备即可满足粪便中 SCFAs 的检测需求。

将本方法用于随机收集的大鼠粪便中 SCFAs 的检测,测得其中乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸的含量分别为 12.51、6.26、0.36、1.80、0.35、0.17 和 0.61 $\mu\text{mol/g}$ 。而 Fiorini 等^[27]在大鼠粪便中测得上述物质含量及范围分别为 58.99 (27.31~108.12)、8.93 (4.44~15.58)、2.43 (1.45~4.20)、1.43 (0.91~2.18)、0.41 (0.26~0.62)、0.67 (0.42~1.07) 和 0.39 (0.26~0.60) $\mu\text{mol/g}$; Scortichini 等^[26]在大鼠粪便中测得上述物质含量及范围分别为 135.00 (118.10~161.60)、15.70 (13.30~19.40)、1.80 (1.00~2.20)、34.90 (26.00~47.80)、2.00 (1.60~2.20)、2.50 (1.70~2.90) 和 2.30 (1.40~3.10) $\mu\text{mol/g}$, 3 种方法所得结果相差很大,而本方法测得的结果与 Fiorini 等^[27]的结果较为接近,但也存在差异,这可能是样品来源不同造成的,而且样品收集、保存方法也会造成影响。

研究表明在正常成年人粪便中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、戊酸和己酸的平均浓度分别为 40、15、13、2、2.5、2.0 和 0.5 mmol/kg 粪便^[5],说明所建立的方法能够满足人类粪便中 SCFAs 的检测需求。相比于粪便,血液、生物组织等生物样品中 SCFAs 的丰度及含量更低,检测更为困难。将本方法与目前现有的血液中的 SCFAs 检测方法^[19,28]相比,发现本方法亦可满足血液中 SCFAs 的检测需求,不过,仍需要进一步探究本方法在血液、组织等生物样品中检测的适用性,但其对血液、组织等生物样品中的 SCFAs 痕量检测也提供了参考价值。

表 3 本方法与文献中 SCFAs 检测方法对比
 Table 3 Comparison of the proposed method with other methods reported in literatures for determination of SCFAs

方法 Method	样品 Sample	线性范围 Linear range	检出限 LOD	相对标准偏差/% RSD	回收率/% Recovery	时间 Time	参考文献 Reference
LLE-GC/MS	大鼠粪便 Rat feces	0.49~10 000 $\mu\text{mol/L}$	0.49~4.31 $\mu\text{mol/L}$	0.4~2.6	65.00~105.00	—	[25]
LLE-GC/FID	大鼠粪便 Rat feces	0.18~3 010.12 $\mu\text{mol/L}$ 2.12~6 487.50 $\mu\text{mol/L}$ (乙酸 Acetic acid)	0.04~0.64 $\mu\text{mol/L}$	0.6~4.2	80.80~108.80	—	[26]
HS-SPME-GC/MS	大鼠粪便 Rat feces	0.01~59.40 mg/L 8.40~315.00 mg/L (乙酸 Acetic acid)	0.039~81.9 $\mu\text{mol/L}$	1.3~4.8	74.50~104.60	预平衡 15 min, 萃取 30 min 15 min of incubation and 30 min of extraction	[27]
PFBBr 衍生-GC/MS PFBBr derivatization-GC/MS	小鼠粪便 Mice feces	0.977~1 250 $\mu\text{mol/L}$	0.244~0.977 $\mu\text{mol/L}$	0.87~23.07	55.70~97.90	衍生 90 min 90 min of derivatization	[18]
BSTFA 衍生-GC/MS BSTFA derivatization-GC/MS	粪便 Feces	1.60~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 1.60~5 000 $\mu\text{mol/L}$ (乙酸 Acetic acid)	0.064~0.067 $\mu\text{mol/L}$	<2	81.27~128.42	衍生 120 min 120 min of derivatization	[19]
苯基溴衍生 HS-SPME-GC/FID Benzyl bromide derivatization- HS-SPME-GC/FID	水中乙酸 Acetic acid in water	0.005~0.100 mmol/L	0.259 $\mu\text{mol/L}$	15.60	—	衍生 210 min, 萃取 30 min 210 min of derivatization and 30 min of extraction	[13]
PDAM 萃取头衍生 HS-SPME-GC/MS HS-SPME with PDAM in- fibre derivatization-GC/MS	粪便 Feces	0.138~32.420 $\mu\text{mol/g}$	1~4 $\mu\text{mol/kg}$	2.40~15.30	73.10~107.90	衍生试剂萃取 15 min, 样品萃取 30 min 15 min of derivatization reagent extraction and 30 min of sample extraction	[14]
PCF derivatization- HS-SPME-GC/FID	大鼠粪便 Rat feces	0.1~500 $\mu\text{g/g}$; 10~5 000 $\mu\text{g/g}$ (乙酸; 丙酸; 丁酸 Acetic acid; propionic acid; butyric acid)	0.133~0.420 $\mu\text{mol/kg}$	7.63~12.84	65.42~117.69	衍生 2 min, 萃取 40 min 2 min of derivatization and 40 min of extraction	本研究 This study

参考文献 References

- [1] DALILE B, VAN OUDENHOVE L, VERVLIET B, et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication[J]. *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 2019, 16(8): 461-478.
- [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] 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]. *Nutrition reviews*, 2017, 75(4): 286-305.
- [4] 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.
- [5] FERNANDES J, SU W, RAHAT-ROZENBLOOM S, et al. Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acid are linked in adult humans[J/OL]. *Nutrition & diabetes*, 2014, 4(6): e121 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.1038/nutd.2014.23>.
- [6] DE LA CUESTA-ZULUAGA J, MUELLER N T, ÁLVAREZ-QUINTERO R, et al. Higher fecal short-chain fatty acid levels are associated with gut microbiome dysbiosis, obesity, hypertension and cardiometabolic disease risk factors [J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(1): 51 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.3390/nu11010051>.
- [7] MOJSAK P, REY-STOLLE F, PARFIENIUK E, et al. The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity: a review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step[J/OL]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2020, 191: 113617 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113617>.
- [8] PRIMEC M, MI ČETI Ć-TURK D, LANGERHOLC T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: a scoping review [J]. *Analytical biochemistry*, 2017, 526: 9-21.
- [9] 谭力, 鞠焜先, 黎介寿. 生物样品中短链脂肪酸的提取与测定 [J]. *色谱*, 2006, 24(1): 81-87. TAN L, JU H X, LI J S. Extraction and determination of short-chain fatty acids in biological samples [J]. *Chinese journal of chromatography*, 2006, 24(1): 81-87 (in Chinese with English abstract).
- [10] 邵玉健, 沈红, 徐金娣, 等. 粪便中短链脂肪酸测定方法研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(6): 967-974. SHAO Y J, SHEN H, XU J D, et al. Advance in determination of short-chain fatty acids of gut bacterial metabolites in feces [J]. *Chinese journal of pharmaceutical analysis*, 2019, 39(6): 967-974 (in Chinese with English abstract).
- [11] DE CÁSSIA MARIOTTI K, SCHUH R S, FERRANTI P, et al. Simultaneous analysis of amphetamine-type stimulants in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of analytical toxicology*, 2014, 38(7): 432-437.
- [12] WISE J, DANIELSON T, MOZAYANI A, et al. Analysis of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine and methylenedioxymethamphetamine in whole blood using in-matrix ethyl chloroformate derivatization and automated headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS [J]. *Forensic toxicology*, 2008, 26(2): 66-70.
- [13] WITTMANN G, VAN L H, DEWULF J. Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatization, solid-phase microextraction and gas chromatography [J]. *Journal of chromatography A*, 2000, 874(2): 225-234.
- [14] MILLS G, WALKER V, MUGHAL H. Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane in-fibre derivatization for analysis of faecal short-chain fatty acids [J]. *Journal of chromatography B: biomedical sciences and applications*, 1999, 730(1): 113-122.
- [15] LI N, DENG C H, ZHANG X M. Determination of methylmalonic acid and glutaric acid in urine by aqueous-phase derivatization followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of separation science*, 2007, 30(2): 266-271.
- [16] LARRETA J, USOBIAGA A, ETXEBARRIA N, et al. Optimization of the on-fibre derivatization of volatile fatty acids in the simultaneous determination together with phenols and indoles in cow slurries [J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2007, 389(5): 1603-1609.
- [17] PARK N H, KIM M S, LEE W, et al. An *in situ* extraction and derivatization method for rapid analysis of short-chain fatty acids in rat fecal samples by gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Analytical methods*, 2017, 9(15): 2351-2356.
- [18] HE L Q, PRODHAN M A I, YUAN F, et al. Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short chain fatty acids by gas chromatography mass spectrometry [J]. *Journal of chromatography B*, 2018, 1092: 359-367.
- [19] 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.
- [20] FURUHASHI T, SUGITATE K, NAKAI T, et al. Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC-MS [J]. *Analytical biochemistry*, 2018, 543: 51-54.
- [21] ZHENG X J, QIU Y P, ZHONG W, et al. A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids [J]. *Metabolomics*, 2013, 9(4): 818-827.
- [22] AMER B, NEBEL C, BERTRAM H C, et al. Direct derivatization vs aqueous extraction methods of fecal free fatty acids for GC-MS analysis [J]. *Lipids*, 2015, 50(7): 681-689.
- [23] LI M H, ZHU R R, SONG X X, et al. A sensitive method for the quantification of short-chain fatty acids by benzylchloroformate derivatization combined with GC-MS [J]. *The analyst*, 2020, 145(7): 2692-2700.
- [24] LIU M M, ZENG Z R, TIAN Y. Elimination of matrix effects

- for headspace solid-phase microextraction of important volatile compounds in red wine using a novel coating[J]. *Analytica chimica acta*, 2005, 540(2): 341-353.
- [25] 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]. *Journal of separation science*, 2012, 35(15): 1906-1913.
- [26] SCORTICHINI S, BOARELLI M C, SILVI S, et al. Development and validation of a GC-FID method for the analysis of short chain fatty acids in rat and human faeces and in fermentation fluids[J/OL]. *Journal of chromatography B*, 2020, 1143: 121972 [2021-03-24]. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.121972>.
- [27] FIORINI D, BOARELLI M C, GABBIANELLI R, et al. A quantitative headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detector method to analyze short chain free fatty acids in rat feces[J]. *Analytical biochemistry*, 2016, 508: 12-14.
- [28] WANG C Y, CHEN Y W, TAIN Y L, et al. Fast quantification of short-chain fatty acids in rat plasma by gas chromatography [J]. *Journal of food science*, 2020, 85(6): 1932-1938.

Determination of free short-chain fatty acids in rat feces by derivatization-headspace solid-phase microextraction-gas chromatography

ZHANG Xiaowei, SUN Xin, LI Xiujuan, PAN Siyi

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Short chain fatty acids (SCFAs) are important metabolites of gut microbiota, and are currently important media and approaches for studying gut microbiota, diagnosing and treating intestinal diseases and metabolic diseases. Feces are closely related to the intestine, and the types and abundance of fecal SCFAs can sensitively reflect the changes in the intestinal microenvironment and gut microbiota. It is currently one of the most widely studied biological samples for SCFAs. However, SCFAs are highly polar, volatile, low in content and complex biological matrix, which makes the accurate quantification of SCFAs have great troubles and challenges. Therefore, the establishment of a detection method with simple operation, high sensitivity and low cost of analysis is of great significance for analyzing SCFAs in feces. In order to be more suitable for the trace detection of SCFAs in biological samples, propyl chloroformate was used as the derivatization reagent, combined with head space-solid phase microextraction (HS-SPME) technology for the analysis of SCFAs in rat feces. The conditions were optimized. The derivatization conditions were pH 8.0, 300 μL propanol, 100 μL pyridine, 100 μL propyl chloroformate and vortex derivatization for 2 min. The conditions of HS-SPME were pH 3.46, extraction temperature 50 $^{\circ}\text{C}$, extraction time 40 min and stirring speed 1 000 r/min. Under optimized conditions, a derivatization HS-SPME-GC method for analyzing free SCFAs in rat feces was established. The LOD and LOQ of the method established were between 0.133-0.420 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ and 0.444-1.400 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, far lower than the LOD and LOQ of the method in the literature. The linear relationship was good ($R^2 > 0.99$). The accuracy was high, the recovery rate of standard addition was between 65.42% and 117.69%, and the RSD was lower than 11.60%. The method is simple, fast, sensitive and low in cost, and can fully meet the needs for trace detection of short-chain fatty acids in feces. It will provide new technical support and reference for trace analysis of SCFAs in complex biological samples including blood and tissue as well.

Keywords rat feces; short chain fatty acids; propylchloroformate; in matrix derivatization; solid-phase microextraction; gas chromatography

(责任编辑:赵琳琳)