

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.003

气相色谱法测定猪结肠内容物中短链脂肪酸含量*

耿梅梅 许丽卫 袁红朝 王久荣 孔祥峰 王 敏

(中国科学院亚热带农业生态过程重点实验室 中国科学院亚热带农业生态研究所 湖南 长沙 410125)

摘要 目的:为了准确测定猪结肠内容物中蛋白质代谢物短链脂肪酸含量以研究猪结肠蛋白质代谢情况,本文拟利用气相色谱建立一种更准确快速分析猪结肠内容物中短链脂肪酸含量的方法。**方法:**实验选用体重相近的21日龄断奶的杜长大三元杂交仔猪,单栏饲养。试猪麻醉后放血致死,迅速剖开腹腔,收集结肠末端内容物,保存于-80℃。收集到的结肠末端内容物用偏磷酸预处理,利用毛细管气相色谱法程序升温测定猪结肠内容物中短链脂肪酸含量。**结果:**结肠内容物经偏磷酸预处理3h后,在程序升温、0.8 mL/min载气流量的气相色谱条件下,内容物中乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸得到有效分离,其回收率为93%~113%,相对标准偏差为0.46%~0.70%,变异系数小于1%。**结论:**此方法具有操作简便、快速、准确的优点,是测定动物肠道内容物中短链脂肪酸较为理想的方法。

关键词:气相色谱;结肠内容物;短链脂肪酸

中图分类号:S-3;S828 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)06-1010-05

A Determination Method Based on Gas Chromatography for Analysis of Short-chain Fatty Acids in Colonic Contents of Piglet*

GENG Mei-mei, XU Li-wei, YUAN Hong-zhao, WANG Jiu-rong, KONG Xiang-feng, WANG Min

(Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, the Chinese Academy of Sciences, Changsha, Hunan, 410125, China)

ABSTRACT Objective: This study was conducted to establish a more accurate method for analysis the short-chain fatty acids in colonic contents of piglet using gas chromatography in order to accurately measure the short-chain fatty acid content in the colonic contents to study the situation of intestinal protein metabolism. **Methods:** The experiment was conducted with similar weight 21 day weaned piglets of Duroc × Landrace × Yorkshire hybrid, single bar feeding. After anesthesia bleeding to death, the abdominal cavity was quickly opened, the end of the colon contents were collected and stored at -80℃. Samples were treated with metaphosphoric acid and then capillary gas chromatography was used for determination of short-chain fatty acid with a temperature programmed. **Results:** The results showed that temperature programmed, 0.8 mL/min of carrier gas flow rate can effectively separate acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid and pentanoic acid, the recoveries were 93%~113%, the relative standard deviations were 0.46%~0.70% and the variation coefficient is less than 1%. **Conclusions:** This method proved to be not only stable, practical, fast and easy to operate, but also better in repetition and accuracy, and would be an ideal way to determinate the short-chain fatty acids in colonic contents of piglet.

Key words: Gas chromatography; Colonic contents; Short-chain fatty acids

Chinese Library Classification(CLC): S-3; S828 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1010-05

前言

过量摄取蛋白质食物可能会危害机体健康。未被消化吸收的蛋白质类物质在大肠微生物作用下,代谢产生大量的氨、硫化氢、短链脂肪酸、支链脂肪酸、生物胺、吲哚和酚类等有毒有害物质,破坏肠道形态结构与功能,增加患结肠直肠癌的风险^[1,2]。短链脂肪酸(Short-chain fatty acids, SCFA)是碳链为1~6的脂肪酸,包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸等,其中对动物机体代谢最为重要的是乙酸、丙酸和丁酸^[3]。SCFA是哺

乳动物结肠微生物发酵的终产物,细菌发酵产生SCFA的能力受细菌数量、pH及底物的影响,不同底物生成的SCFA总量和比例不同。除了非淀粉多糖和抗性淀粉外,大肠中蛋白质消化释放的氨基酸也是SCFA合成的一类重要底物^[4]。微生物代谢甘氨酸、丙氨酸、苏氨酸、谷氨酸、赖氨酸和天冬氨酸可生成乙酸,乙酸可作为不同类型上皮细胞和肠道细菌的能量来源;代谢丙氨酸和苏氨酸可生成丙酸,代谢谷氨酸和赖氨酸可生成丁酸,丁酸对结肠上皮细胞增殖和黏膜生长起主要作用;异丁酸和异戊酸等支链脂肪酸则分别来源于缬氨酸、异亮氨酸和亮氨

* 基金项目:国家科技支撑计划专题(2012BAC17B0102)

作者简介:耿梅梅(1982-),女,助理研究员,主要从事动物生化分析研究,电话:0731-84615214, E-mail: gengmeimei@isa.ac.cn

(收稿日期:2014-07-27 接受日期:2014-08-20)

酸的代谢,且只来源于蛋白质的分解代谢,因此可作为肠腔中蛋白质分解代谢的理想标志物^[5-7]。SCFA 在体内参与重要的生理代谢过程,为结肠黏膜细胞提供主要的能量来源或被转运至肝脏中进一步代谢,具有促进钠离子吸收,增加肠系膜血流等生理作用^[9]。因此,准确测定结肠内容物中 SCFA 含量对于研究后肠蛋白质代谢具有重要意义。

本文在调研前期研究成果的基础上,采用 GC 结合 FID 技术,通过优化试验条件,建立 SCFA 的测定方法,旨在为肠道微生物代谢调控研究提供技术手段。

1 材料与方法

表 1 标准样品浓度(单位: $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Table 1 Concentration of standard sample

Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Stock solution	S1	S2	S3	S4	S5
Standard sample						
Acetic acid	10276	205.52	513.80	1027.60	3082.80	5138.00
Propionic acid	3783	75.66	189.15	378.30	1134.90	1891.50
Isobutyric acid	896	17.92	44.80	89.60	268.80	448.00
Butyric acid	1817	36.34	90.85	181.70	545.10	908.50
Isovaleric acid	469	9.38	23.45	46.90	140.70	234.50
Pentanoic acid	881	17.62	44.05	88.10	264.30	440.50

1.2 试验条件

DB-FFAP 柱,规格为 $30\text{ m}\times 250\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$;载气为高纯氮气(99.999%),流量 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;辅助气为高纯氢气(99.999%),检测器 FID 温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,分流比 50:1,进样量: $1\text{ }\mu\text{L}$;程序升温:初始温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,以 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升温至 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 1 min。

1.3 样品前处理

选用体重相近的 21 日龄断奶的杜长大三元杂交仔猪 3 头,单栏饲养。试猪麻醉后放血致死,迅速剖开腹腔,收集结肠

1.1 仪器与试剂

气相色谱仪:安捷伦公司,7890A,配有 FID 检测器。

SCFA 标准溶液:分别取乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸(购自 Sigma 公司,色谱纯)1000、400、100、200、100 和 $100\text{ }\mu\text{L}$,用万分之一天平称重,记录各组分重量,用超纯水定容至 100 mL ,配成储备溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。将标样储备溶液梯度稀释,浓度见表 1。

25%(W/V)偏磷酸(购自国药集团,分析纯):准确称取 25.00 g 偏磷酸定容至 100 mL 超纯水中。

试验用水均为二次过滤超纯水。

末端内容物。采集的样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

用万分之一天平准确称取 1 g 左右的结肠内容物样品,加入 1.0 mL 超纯水,漩涡混匀 30 s 。 $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 。转移上清,按 $v:v=9:1$ 的比例加入 25%偏磷酸,分别处理 2、3、4 和 5 h,待测。

2 结果与分析

2.1 色谱图

如图 1 所示,6 种 SCFA 的色谱峰分离效果较好。

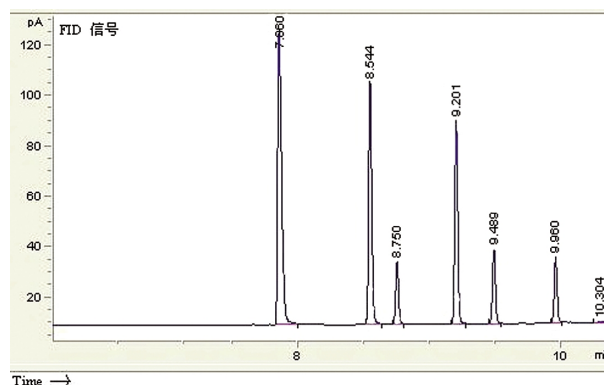
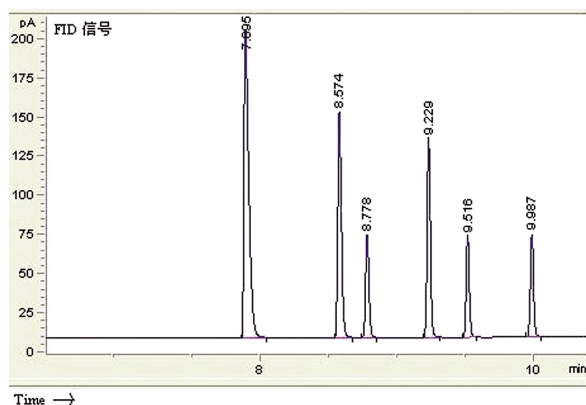


图 1 标准溶液(A)和样品(B)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard solution (a) and sample (b)

注:由左至右分别为:乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸。

Note: From left to right are: acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid and pentanoic acid.

2.2 处理时间

由表 2 可知,偏磷酸处理时间对 SCFA 的含量有影响。乙酸、丙酸、异丁酸、戊酸处理 2 h 与 5 h 的含量相比,几乎没有变化(相对标准偏差 <5%)。偏磷酸处理 2、3、4、5 h 时,异戊酸

的测定结果相对标准偏差为 7.46%,而以处理时间 3~5 h 的结果计算,异戊酸的测定结果相对标准偏差仅为 0.75%。此时,丁酸的测定结果相对标准偏差为 0.32%。因此,偏磷酸处理时间以 3 h 为最佳。

表 2 偏磷酸处理时间的影响(n=3,单位 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Table 2 Effect of metaphosphoric acid processing time(n=3)

Processing Time(h)	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Pentanoic acid
2	32.80± 0.11	11.45± 0.03	5.03± 0.02	7.32± 0.02	7.63± 0.02	2.96± 0.01
3	32.89± 0.07	11.52± 0.08	4.94± 0.05	7.75± 0.03	8.98± 0.05	3.00± 0.09
4	32.77± 0.44	11.45± 0.02	5.04± 0.01	7.72± 0.06	8.85± 0.04	3.04± 0.05
5	32.74± 0.05	11.43± 0.05	4.99± 0.08	7.70± 0.12	8.89± 0.09	2.95± 0.06
Relative Standard Deviation(%)	0.2	0.34	0.91	2.66	7.46	1.38

2.3 标准曲线及检出限

将表 1 中的标样按试验方法进行测定,以峰面积比对其相应质量浓度进行线性回归,结果见表 3。乙酸、丙酸、异丁酸、丁

酸、异戊酸和戊酸在对应的浓度范围内线性关系良好,相关系数均达到 0.999,检测限(RSN=3)为 0.54~1.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 3 SCFA 的线性范围、线性回归方程、相关系数及相对标准偏差
Table 3 Linear equation, correlation coefficient (r^2) and detection limit for the volatile fatty acids

	Linear equation	Correlation coefficient (r^2)	Linear range ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Detection limit(RSN = 3, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Acetic acid	$y=9.449x+1.628$	1.000	4.01~1027.6	1.38
Propionic acid	$y=0.171x-0.117$	1.000	1.48~378.30	0.87
Isobutyric acid	$y=0.226x-0.053$	1.000	0.70~89.60	0.63
Butyric acid	$y=0.206x-0.023$	1.000	0.71~181.70	0.68
Isovaleric acid	$y=0.230x+0.107$	0.999	0.73~46.90	0.57
Pentanoic acid	$y=0.227x+0.013$	0.999	0.69~88.10	0.54

2.4 回收率与精密度测定

按试验方法取 1 g 结肠内容物样品,加入适量 SCFA 标准溶液进行加标回收试验,结果见表 4。加标回收率在 93.63~113.41%之间。

在最优的色谱条件下进行了方法的精密度实验。用低浓度的混合标准样品连续进样 6 次,获得保留时间和峰面积的 RSD。各成分的相关系数和精密度指标均能满足分析要求。结果见表 5。

2.5 样品检测结果

采用本方法对仔猪肠道内容物中 SCFA 进行测定。结果表明,这 6 种挥发酸在仔猪肠道内容物中均被检测到(表 6)。

3 讨论

微生物发酵产生的 SCFA 的数量和组成取决于底物的有效性、内容物在肠道中的通过时间和微生物区系的组成^[8]。肠道微生物具有很强的代谢活性,可分泌蛋白酶和肽酶降解肠腔中未被消化的营养物质,对宿主的生理和代谢功能均具有重要作用^[9,10]。结肠中微生物密度很高、内容物通过时间较长,对肠腔中残留蛋白质和肽的降解更为彻底^[11]。后肠微生物代谢产生的

大部分氨基酸可被结肠微生物用于生成多种代谢物^[12]。采食高蛋白日粮可增加大鼠对一些 SCFA 的产生^[8];肥胖人群食用高蛋白、低碳水化合物食物后,粪便中丁酸、乙酸和丙酸含量均显著降低,异戊酸和异丁酸水平升高^[13]。结肠中短链脂肪酸的浓度可反映结肠中代谢物的浓度,尤其是蛋白质代谢物的浓度^[15,12]。目前有限的相关研究多是以人或鼠为研究对象,猪在解剖结构及生理特点等方面与人类极为相似,与经典实验动物相比具有很多优势。本文首次建立了猪结肠内容物中挥发性脂肪酸含量的测定方法,为研究猪结肠蛋白质的微生物代谢提供参考。

气相色谱法(GC)结合火焰离子检测器(FID)是分析脂肪酸的主要方法。国内基本上是采用不同材料的填充柱来检测样品中的 SCFA 含量,多采用程序升温,有的采用恒温条件^[14,15]。由于 SCFA 易挥发、极性高、亲水性强,直接分析这些化合物难度大,一般常对 SCFA 进行衍生使其成为非极性化合物再进行 GC 测定,但衍生步骤复杂,试剂毒性大,对实验人员和实验室环境污染较大。

本文建立的程序升温测定 SCFA 的方法,首次对比了偏磷酸的作用时间与测定结果之间的关系。结果发现,偏磷酸预处理 3 h 后测试结果较理想(相对标准偏差在 0.2%~1.5%之间)。

表 4 加标回收实验(单位: $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Table 4 The results of recovery experiment

	Added	Origin	Found	Recovery(%)
Acetic acid	52.43	533.21 $\pm$ 5.50	586.25 $\pm$ 5.47	101.16
	104.50		640.40 $\pm$ 5.95	102.57
	210.05		754.83 $\pm$ 4.61	105.51
Propionic acid	18.21	133.92 $\pm$ 2.49	150.97 $\pm$ 6.85	93.63
	35.88		168.73 $\pm$ 2.89	97.02
	72.20		205.61 $\pm$ 4.21	99.29
Isobutyric acid	5.12	31.31 $\pm$ 0.93	36.60 $\pm$ 2.91	103.32
	10.81		42.42 $\pm$ 1.77	102.78
	22.42		54.30 $\pm$ 2.77	102.54
Butyric acid	11.99	72.51 $\pm$ 1.00	85.80 $\pm$ 3.45	110.84
	23.96		98.27 $\pm$ 4.40	107.51
	46.61		122.57 $\pm$ 4.20	107.40
Isovaleric acid	6.04	50.61 $\pm$ 2.74	56.94 $\pm$ 4.19	104.80
	11.57		63.63 $\pm$ 3.20	112.53
	19.76		73.02 $\pm$ 2.66	113.41
Pentanoic acid	5.03	22.58 $\pm$ 2.31	27.74 $\pm$ 2.85	102.58
	10.46		33.38 $\pm$ 2.40	103.25
	21.58		43.49 $\pm$ 2.55	96.90

表 5 保留时间和峰面积的精密度(单位: %)
Table 5 Precision of Retention time and Peak Area

Retention	Time	Peak Area
Acetic acid	0.02	0.24
Propionic acid	0.01	0.41
Isobutyric acid	0.01	0.25
Butyric acid	0.01	0.30
Isovaleric acid	0.01	0.31
Pentanoic acid	0.01	1.32

表 6 实际样品测定结果(单位: $\mu\text{g}\cdot\text{g}$, n=3)
Table 6 Quantitation of SCFA in colonic contents ($\mu\text{g}\cdot\text{g}$, n=3)

Sample No.	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Pentanoic acid
1	486.59 $\pm$ 2.48	122.21 $\pm$ 2.12	28.57 $\pm$ 1.32	66.17 $\pm$ 2.99	46.19 $\pm$ 2.47	20.61 $\pm$ 3.16
2	519.27 $\pm$ 3.89	169.59 $\pm$ 1.87	33.29 $\pm$ 2.41	69.52 $\pm$ 3.24	54.25 $\pm$ 5.14	26.45 $\pm$ 3.35
3	548.25 $\pm$ 4.51	140.54 $\pm$ 2.96	31.45 $\pm$ 2.97	78.67 $\pm$ 4.13	57.81 $\pm$ 4.31	25.81 $\pm$ 3.71

本方法前处理操作步骤少,在确定的色谱条件下,乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、戊酸和异戊酸在 4.01~1027.6, 1.48~378.30, 0.70~89.60, 0.71~181.70, 0.73~46.90, 0.69~88.10 的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 范围内线性关系良好,相关系数均达到 0.999,检测限(RSN=3)为 0.54~1.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本方法前处理简单,回收率为 93%~113%,相对标准偏差小于 1%,变异系数小于 1%,色

谱峰分离效果好,重复性好,测试时间较前人报道^[6]缩短了一倍。样品实际测定结果表明,仔猪结肠内容物中 6 种挥发性脂肪酸均可检测到,其中乙酸含量最高,异丁酸和戊酸含量较低。本方法已成功用于猪结肠内容物中 SCFA 的测定,为研究蛋白质对结肠代谢物产生规律和结肠上皮细胞形态结构的影响提供理论参考。

4 结论

本文建立了一种利用气相色谱法测定猪结肠内容物中短链脂肪酸含量的方法,此方法具有操作简便、快速、准确的特点,是测定动物肠道内容物中短链脂肪酸较为理想的方法。

参考文献(References)

- [1] Bergen WG, Wu G. Intestinal nitrogen recycling and utilization in health and disease[J]. J Nutr, 2009, 139(5): 821-825
- [2] Hambly RJ, Saunders M, Rijkenc PJ, et al. Influence of dietary components associated with high or low risk of colon cancer on apoptosis in the rat colon[J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(6): 801-808
- [3] 陈燕,曹郁生,刘晓华. 短链脂肪酸与肠道菌群[J]. 江西科学, 2006, 24(1): 38-40, 69
Chen Yan, Cao Yu-sheng, Liu Xiao-hua. Short chain fatty acids and intestinal microflora[J]. Jiangxi Science, 2006, 24(1): 38-40, 69
- [4] Hughes R, Magee EAM, Bingham S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer [J]. Curr Issues Intest Microbiol, 2000, 1(2): 51-58
- [5] Davila AM, Blachier F, Gotteland M, et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host [J]. Pharmacol Res, 2012, 68(1): 95-107
- [6] 孔祥峰. 结肠微生物氮代谢与机体健康研究进展 [J]. 饲料与畜牧: 新饲料, 2013, (4): 10-17
Kong Xiang-feng. Research on microbial nitrogen metabolism and health of colon [J]. Feed and animal husbandry: The new feed, 2013, (4): 10-17
- [7] Kong Xiang-feng, Zhou Xiao-li, Lian Guo-qi, et al. Dietary supplementation with chitooligosaccharides alters gut microbiota and modifies intestinal luminal metabolites in weaned Huanjiang mini-piglets[J]. Livest Sci, 2014, 160: 97-101
- [8] Andriamihaja M, Davila AM, Eklou LM, et al. Colon luminal content and epithelial cell morphology are markedly modified in rats fed with a high-protein diet[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 299(5): 1030-1037
- [9] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science, 2006, 312(5778): 1355-1359
- [10] Windey K, De Preter V, Verbeke K. Relevance of protein fermentation to gut health[J]. Mol Nutr & Food Res, 2012, 56(1): 184-196
- [11] Dai ZL, Wu GY, Zhu WY. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health [J]. Front Biosci, 2011, 16: 1768-1786
- [12] Blachier F, Mariotti F, Huneau J F, et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences[J]. Amino Acids, 2007, 33(4): 547-562
- [13] Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, et al. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 93(5): 1062-1072
- [14] 丁学智,龙瑞军,淡瑞芳,等. 瘤胃发酵液挥发性脂肪酸的气相色谱分析方法[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 41(2): 24-26
Ding Xue-zhi, Long Rui-jun, Dan Rui-fang, et al. A determination method based on gas chromatography for analysis of volatile fatty acids in rumen fluid [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2006, 41(2): 24-26
- [15] 张浩勤,张伟,张翔,等. 气相色谱法测定牛粪厌氧发酵液中挥发性脂肪酸[J]. 郑州大学学报(工学版), 2007, 28(2): 51-53
Zhang Hao-qin, Zhang Wei, Zhang Xiang, et al. Analysis of VFA Contained in the Digested Solution of Cattle Manure by Gas Chromatography[J]. Journal of Zhengzhou University (Engineering Science), 2007, 28(2): 51-53
- [16] 赵兴涛,徐桂转,刘杰博,等. 气相色谱法测定厌氧发酵液中挥发性脂肪酸的研究[J]. 河南农业大学学报, 2013, 47(5): 584-591
Zhao Xing-tao, Xu Gui-zhuan, Liu Jie-bo, et al. Study on VFAs content in the anaerobic fermentation liquid by gas chromatography [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2013, 47(5): 584-591

(上接第 1173 页)

- [15] Genovese MC, Kavanaugh A, Weinblatt ME, et al. An oral Syk kinase inhibitor in the treatment of rheumatoid arthritis: a three-month randomized, placebo-controlled, phase II study in patients with active rheumatoid arthritis that did not respond to biologic agents[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(2): 337-345
- [16] Warner-Lambert Company. Inhibitors of colony stimulating factors [P]. US 2007/0059280
- [17] Fleishaker DL, Garcia-Mejide JA, Petrov A, et al. Maraviroc a chemokine receptor-5 antagonist, fails to demonstrate efficacy in the treatment of patients with rheumatoid arthritis in a randomized, double-blind placebo-controlled trial [J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(1): R11
- [18] Cutolo M, Soldano S, Montagna P, et al. CTLA4-Ig interacts with cultured synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients and down regulates cytokine production [J]. Arthritis Res Ther. 2009, 11(6): R176
- [19] Schiff M, Keiserman M, Coddling C, et al. Clinical response and tolerability to abatacept in patients with rheumatoid arthritis previously treated with infliximab or abatacept: open-label extension of the ATTEST Study[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(11): 2003-2007
- [20] Melvin G, Sandhiya S, Subraja K. Belatacept: A worthy alternative to cyclosporine?[J]. J Pharmacol Pharmacother, 2012, 3(1): 90-92