

# Application News

## No. C168

LC/MS

### SPF 及抗生素给药小鼠粪便中的短链脂肪酸、有机酸（3-NPH 衍生物）分析

在人体的肠道内存在着多达数百种肠道细菌。通过显微镜观察其形态时，他们成群结队的生长，看似一大片鲜花，因此，也被称为肠道菌群。肠道细菌是将抗消化性糖类作为主要能量来源，产生乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸。近年来，有报道称这种短链脂肪酸被人体吸收后，与自身免疫性疾病<sup>1)</sup>以及肥胖、糖尿病等慢性病具有关联性，为了加深对短链脂肪酸与疾病之间的关联性的理解，并为了更好地理解肠道细菌与宿主生物体的代谢活动，对短链脂肪酸进行定量分析的需求正在增加。

短链脂肪酸具有高挥发性和高亲水性，在常规的反相系统中进行 LC/MS 分析比较困难。另外，在常规的 GC/MS 法中广泛使用衍生化方法，需要对试样进行干燥处理，存在挥发成分损失的可能性。因此，样品通过在水溶液中的衍生化进行分析<sup>1)</sup>。在本稿中，通过使用 3-硝基苯胍（3-NPH）对羧酸进行衍生化处理，对 C2 ~ C5 的短链脂肪酸（6 种成分）和乳酸、丙酮酸、琥珀酸等的有机酸（16 种成分）进行同时分析。分析时采用了在《LC/MS/MS 短链脂肪酸方法包》中收录的 MRM 参数及分析方法（表 1）。

采用 2-硝基苯胍的衍生化方法很久以前就为人所知，是以脂肪酸作为主要分析对象。在本稿中采用的不是 2-NPH，而是 3-NPH，除了短链脂肪酸之外，还可以对有机酸进行高效地衍生化处理，支持短链脂肪酸与有机酸的合并分析。

收录的 MRM 参数依据 3-NPH 衍生物进行了优化。另外，3-NPH 还会和酮体发生反应，因此，具有羰基的丙酮酸、草酰乙酸等除了羧酸之外，还对羰基进行反应的衍生物的 MRM 参数进行设置。

在这里，将存在生理性肠道菌群的 SPF（Specific Pathogen Free）小鼠和通过抗生素给药使肠道菌群显著减少的小鼠粪便作为试样，进行了短链脂肪酸及有机酸分析。在对各小鼠的粪便进行回收、称量后，用乙醇进行提取，通过离心分离回收了上清液。该上清液用于 3-NPH 衍生化处理。在进行 3-NPH 衍生化处理时，如图 1 所示，使用吡啶作为催化剂、使用碳二亚胺作为缩合剂，在室温下进行 30 分钟的反应。反应后，使用含有甲酸的甲醇溶液进行稀释，然后使用 LCMSTM-8060 进行了同时分析。

T. Nakanishi

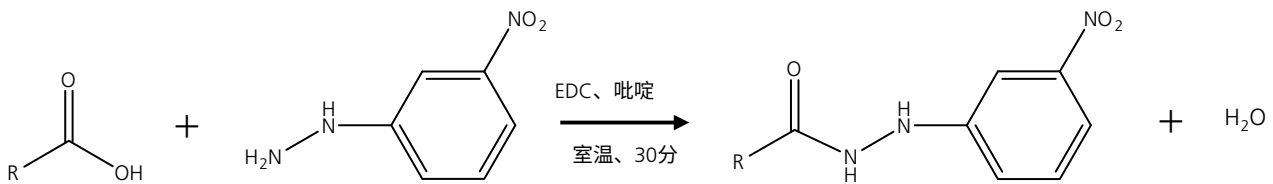


图 1 使用 3-硝基苯胍（3-NPH）进行的衍生化反应

#### HPLC 条件

分析柱	: Mastro C18 (2.1 mmI.D. × 150 mmL、3 μm)
流动相 A	: 0.1% 甲酸-水
流动相 B	: 乙腈
时间程序	: 梯度
流速	: 0.35 mL/min
进样量	: 3 μL
柱温箱温度	: 40 °C

#### MS 条件 (LCMS-8060)

离子源	: ESI (Positive/Negative)
雾化气流速	: 2.0 L/min.
干燥气流速	: 10.0 L/min.
加热气流速	: 10.0 L/min.
DL 温度	: 250 °C
加热块温度	: 400 °C
接口温度	: 300 °C
CID 气体压力	: 270 kPa

图 2 是从 SPF 小鼠及抗生素给药小鼠粪便试样中萃取的短链脂肪酸及有机酸 (3-NPH) 的 MRM 色谱。从中可以发现, 短链脂肪酸和琥珀酸在各自的粪便试样中均表现出特征性的波动。这表明, 抗生素给药导致的肠道细菌减少与粪便中的短链脂肪酸的减少具有相关性。

然后, 进行对照品混合溶液的衍生化, 制作标准曲线, 测定了各粪便试样萃取液的短链脂肪酸及有机酸浓度。图 3 就是利用该数值而绘制的单位粪便重量中的短链脂肪酸 / 有机酸量 (nmol/mg) 的曲线 (对各个体进行 n = 3 的重复分析)。在这里, 从测定的 22 种成分中, 显示了 6 种短链脂肪酸成分和具有代表性的 4 种有机酸成分的定量结果。从红色曲线所示的短链脂肪酸的结果来看, 可以发现与 SPF 小鼠相比, 抗生素给药小鼠的短链脂肪酸量 (nmol/mg) 大幅度减少。

另一方面, 发现 SPF 小鼠中的直链短链脂肪酸 (乙酸、丙酸、丁酸、戊酸) 与支链短链脂肪酸 (异丁酸、异戊酸) 的产生比例存在个体差异。这可能是每个个体的肠道菌群差异造成的影响。

另外, 从蓝色曲线所示的有机酸的结果来看, 抗生素给药小鼠的琥珀酸呈现明显的高值。短链脂肪酸和有机酸与肠道细菌的活动密切相关, 在通过抗生素给药和无菌饲养等使肠道菌群减少和不存在的条件下, 可见非常具有特征性的短链脂肪酸、有机酸含量波动。

如上所述, 通过使用以 3-NPH 衍生物为分析对象的《LC/MS/MS 短链脂肪酸方法包》, 采用常规的反相 LC/MS 分析, 可以进行短链脂肪酸、有机酸的定量分析。

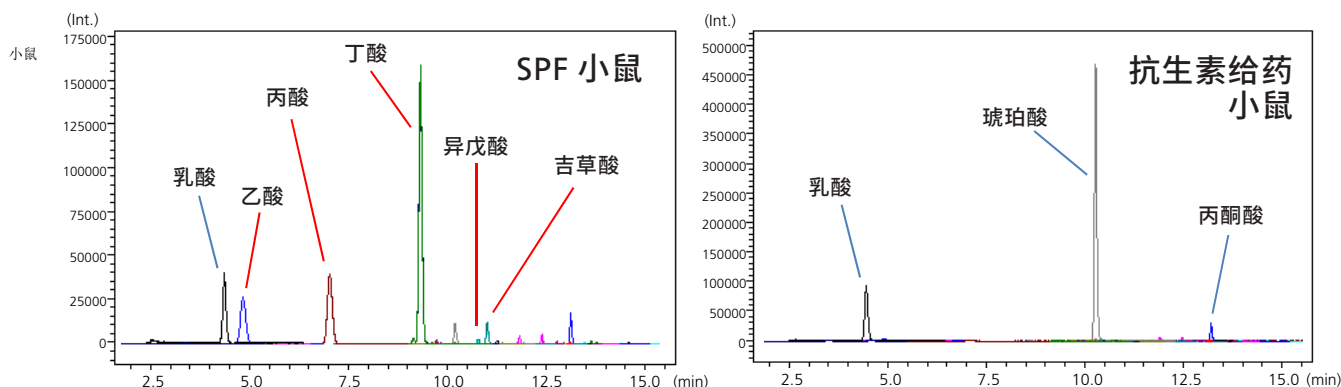


图 2 SPF 小鼠和抗生素给药小鼠粪便试样中的短链脂肪酸及有机酸 (3-NPH) 的 MRM 色谱

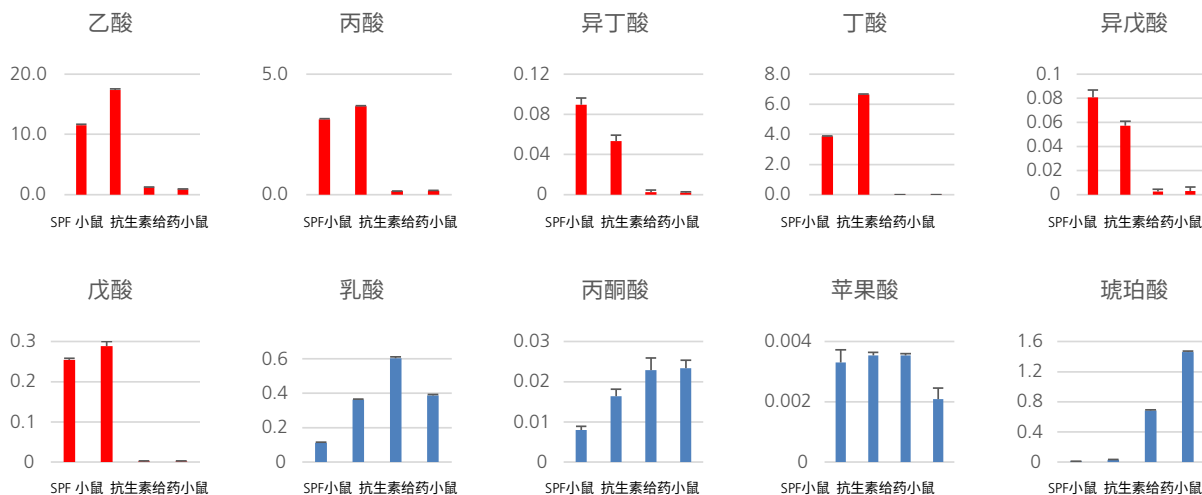


图 3 SPF 小鼠及抗生素给药小鼠粪便试样中的短链脂肪酸 (6 种成分) 与有机酸 (4 种成分) 的单位粪便重量的比较 (纵轴: nmol/mg)

\* 在本稿中介绍的分析试样是庆应义塾大学医学部医化学教室的杉浦悠毅先生、末松诚先生提供的。

参考文献

- 1) *Gut Microbes*. 5(3): 333-9. 2014. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. Narushima S, Sugiura Y, Oshima K, Atarashi K, Hattori M, Suematsu M, Honda K.

LCMS 是岛津制作所株式会社的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司  
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2018 年 3 月