

瘤胃内容物样本中有机酸的定量分析 (高效液相色谱)

Quantitative Analysis of Organic Acids in Samples of Rumen Content (HPLC)

王阔鹏¹, 吉慧敏¹, 程志强¹, 林淼^{1,*}

¹ 动物科学与技术学院, 扬州大学, 扬州, 江苏省

*通讯作者邮箱: linmiao@yzu.edu.cn

摘要: 反刍动物通过瘤胃微生物发酵饲料中的碳水化合物产生大量的有机酸, 主要为挥发性脂肪酸, 这些有机酸不仅起到了维持瘤胃内环境稳态的作用, 而且反映了个体能量代谢和饲料发酵类型, 因此准确检测瘤胃液有机酸各成分含量对评定饲料营养价值及进一步提高反刍动物能量转化效率具有重要意义。本文介绍了一种利用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 测定瘤胃发酵样品中的有机酸含量。样品前处理方法利用氢氧化钙 [Ca(OH)₂] 和硫酸铜 (CuSO₄) 溶液去除样品中的蛋白和糖类。高效液相色谱法仅要求样品能制成溶液, 不受样品挥发性的限制, 可分离热不稳定和非挥发性的等各分子量范围的物质。与试样预处理技术相配合, HPLC 能达到的高分辨率和高灵敏度。此方法除还可用于检测瘤胃液及发酵样品中的乳酸、琥珀酸的含量。

关键词: 有机酸, 液相色谱, 体外发酵, 瘤胃液

材料与试剂

1. 枪头 (1000, 200 和 10 μ L)
2. 离心管 2 mL
3. 螺口瓶 (250 mL)
4. 锥形瓶 (500 mL)
5. 容量瓶 (500 mL)
6. 量筒 (500 mL)
7. 超纯水
8. 烧杯 (4 L)

- 30 9. 玻璃棒
- 31 10. 封口膜
- 32 11. 滤膜 (0.2 μm)
- 33 12. 氢氧化钙 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 34 13. 硫酸铜 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 35 14. 巴豆酸 (Macklin, 色谱纯)
- 36 15. 浓硫酸 (H_2SO_4 , 沪试, 优级纯)
- 37 16. 乙二胺四乙酸 (阿拉丁, 色谱纯)
- 38 17. 琥珀酸 (阿拉丁, 色谱纯)
- 39 18. 乳酸 (阿拉丁, 色谱纯)
- 40 19. C1-C6 (阿拉丁, 色谱纯)
- 41 20. 氢氧化钙溶液 (见溶液配方)
- 42 21. 硫酸铜溶液 (见溶液配方)
- 43 22. EDTA 溶液 (见溶液配方)
- 44 23. 混合标准酸溶液 (见溶液配方)
- 45 24. 标样中有机酸浓度 (见溶液配方)

46

47 仪器设备

- 48 1. 高效液相色谱仪 (Waters 1525)
- 49 2. 磁力搅拌器 (上海雷磁 JB-2A)
- 50 3. 离心机 (Eppendorf 5810R)
- 51 4. 真空泵 (上海亚荣 YR-PTB)

52

53 实验步骤

54 一、样品前处理制备

- 55 1. 将 1.5 mL 的体外瘤胃培养液 (参照 Menke1979 等体外瘤胃发酵方法) 或过
- 56 滤瘤胃液 (直接从瘦管牛/羊瘤胃中取出瘤胃液经四层纱布过滤所得) 样本移
- 57 入 2.0 mL 的离心管中, 离心 (12,000 $\times g$, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)。

2. 吸取 600 μL 上清液，转移到新的 2.0 mL 离心管中，加入 600 μL 氢氧化钙溶液和 300 μL 硫酸铜溶液，涡旋混匀，放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻（Siegfried 和 Hückermann, 1984）。
3. 解冻试管，离心 (12,000 $\times g$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)。
4. 转移 1000 μL 的上清液到空的 2.0 mL 的离心管中 (含有 28 μL 的浓硫酸)混匀，-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻。
5. 再次解冻试管后，重复冷冻一次，使溶液沉淀充分析出。
6. 解冻试管，离心 (12,000 $\times g$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)。
7. 转移 800 μL 上清液到高效液相色谱小瓶中，待测。

二、高效液相色谱条件（Weimer, et al., 1991; Njokweni et al., 2019）

1. 色谱柱：Rezex RHM Monosaccharide 7.8 \times 300 mm column (00H0132-K0, Phenomenex)
2. 溶剂：EDTA
3. 流速：0.7 mL/min
4. 柱温：45 $^{\circ}\text{C}$
5. 进样量：50 μL
6. 检测器：UV/Vis 检测器 (220 nm)

三、有机酸浓度的计算

通过标准样品和内标巴豆酸各自的浓度 (或峰面积) 计算出乙酸、丙酸等有机酸的相对校正因子，然后根据乙酸、丙酸等酸的浓度与其峰面积成正比计算出样品中有机酸的浓度。

例如：求体外瘤胃发酵样品中丁酸浓度。

通过上样分析我们已知标样中的内标巴豆酸峰面积为 800，丁酸峰面积为 400；样品中内标巴豆酸峰面积为 1000，丁酸峰面积为 200。

相对校正因子： $f_{\text{丁}} = C_{\text{丁}} A_{\text{内标}} / W_{\text{内标}} A_{\text{丁}} = 10 \times 800 / 10 \times 400 = 2$

$C_{\text{丁}}$ ：标样中组分丁酸的浓度

$W_{\text{内}}$ ：标样中内标物的浓度

$A_{\text{内标}}$: 标样中组分丁酸的峰面积

$A_{\text{丁}}$: 标样中内标物的峰面积

丁酸浓度 (mM) = $w_{\text{内标}} f_{\text{丁}} a_{\text{丁}} / a_{\text{内标}} = 10 \times 2 \times 200 / 1000 = 4 \text{mM/L}$

$w_{\text{内标}}$: 待测样品中内标物的浓度

$f_{\text{丁}}$: 组分丁酸的校正因子

$a_{\text{丁}}$: 待测样品丁酸的峰面积

$a_{\text{内标}}$: 待测样品内标物的峰面积

某酸浓度 (mM) = $\frac{\text{样品某酸峰面积值} \times \text{巴豆酸标样峰面积} \times \text{某酸标样浓度}}{\text{样品中巴豆酸面积值} \times \text{标样某酸峰面积}}$

有机酸重现率: 将某有机酸 (如乙酸) 连续上样几次, 测定其峰面积值, 利用某酸峰面积值和内标峰面积值计算其重现率。

结果与分析

各组分出峰时间见下表 1。

表 1. 有机酸出峰时间

有机酸	出峰时间, min
琥珀酸	10.9
乳酸	11.9
甲酸	12.6
乙酸	13.8
丙酸	16.5
异丁酸	18.8
丁酸	20.5
异戊酸	24.0
巴豆酸	25.4
戊酸	29.5
己酸	49.7

注: 在实验中, 如果无需戊酸盐和己酸盐数据指标, 可在 30 分钟结束运行。

溶液配方

1. 氢氧化钙溶液

称取 52.9 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ，放入 250 mL 螺口瓶中，加入磁力搅拌子和 200 mL 超纯水，将瓶中溶液混匀。当分配试剂时，使用磁力搅拌器，以保持吸取均匀的浆液。

2. 硫酸铜溶液

称取 50.0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 加入 500 mL 三角瓶中，用 400 mL 超纯水溶解，再加入 2.0 g 巴豆酸，充分溶解后，定容于 500 mL 容量瓶中。

3. EDTA 溶液

1.60 mL 浓硫酸、0.40 g 乙二胺四乙酸，3.5 mL 超纯水溶解在 4 L 烧杯中。在加热板加热，然后冷却过夜，以完全溶解 EDTA。用超纯水将冷却的溶液稀释到 4 L，利用真空泵过膜 (0.2 μm)，将滤液转移到 HPLC 储存瓶中。

4. 有机酸标准溶液（见表 2）

表 2. 有机酸标准溶液

琥珀酸	乳酸	甲酸	乙酸	丙酸	异丁酸	丁酸	异戊酸	巴豆酸	戊酸	己酸
10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	5mM	10mM	10mM	10mM
118.1 mg	75.1 μL	37.7 μL	57.3 μL	74.6 μL	92.8 μL	91.8 μL	54.5 μL	84.6 μL	108.4 μL	124.9 μL

注：有机酸标准样品定容在 100 mL 容量瓶中。

致谢

- 本研究得到了国家现代农业产业技术体系 (CARS-36)，江苏省高校优势学科建设自主工程项目资助。
- Lin, M., Dai X. X., Weimer P. J. (2019). Shifts in fermentation end products and bacterial community composition in long-term, sequentially transferred *in vitro* ruminal enrichment cultures fed switchgrass with and without ethanol as a co-substrate. *Bioresource Technol* 285: 121324.

参考文献

- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J Agr Sci* 93(1): 217-222.

2. Siegfried, V.R., Huckermann, H., S.G. (1984). Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. *Landwirtsch Forsch* 37: 298-304.
3. Weimer, P.J., Shi, Y., Odt, C.L. (1991). A segmented gas/liquid delivery system for continuous culture of microorganisms on solid substrates, and its use for growth of *Ruminococcus flavefaciens* on cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 178-183.
4. Njokweni, G. S., Weimer, P. J., Warburg L., Botes, M., van Zyl, W. H. (2019). Valorisation of the invasive species, *Prosopis juliflora*, using the carboxylate platform to produce volatile fatty acids. *Bioresource Technol* 288 : 121602.