



动物营养学实验课程中色谱技术研究性 实验设计

曹庆云, 赵恒枫, 曾琳玮, 左建军

(华南农业大学 动物科学国家级实验教学示范中心, 广州 510642)

摘要: 色谱技术是动物科学专业学生学习动物营养学实验课程时, 开展研究性实验的重要环节。学生团队在教师的指导下, 结合科研项目和生产实际, 独立设计实验方案, 成功建立了一种利用高效液相色谱法测定饲料调味剂中 5'-鸟苷酸钠(GMP)和 5'-肌苷酸钠(IMP)含量的方法。样品经前处理后, 采用 Athena C₁₈ 色谱柱, 以甲醇和 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(2:98, v/v)作为流动相, 流速设定为 0.6 mL/min, 进行等度洗脱。色谱柱的温度控制在 25 °C, 检测波长设定为 250 nm, 进样量为 10 μL。实验结果表明, GMP 和 IMP 的浓度在 0.05~2.00 mg/mL 范围内与峰面积呈现良好的线性关系($R^2=0.9999$), 其中 IMP 的检测限为 0.4 μg/mL, GMP 的检测限为 0.8 μg/mL。此外, 该方法的回收率高达 98%, 相对标准偏差分别为 0.81% 和 0.75%。该实验项目不仅操作简便, 分析时间合理, 而且具有高精密度和高回收率, 有助于激发学生的学习兴趣和探索精神, 同时也有利于培养学生的创新能力和科学素养。

关键词: 色谱技术; 调味剂; 核苷酸二钠; 研究性实验

中图分类号: G642.0; S816.74

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20240210

Design of an Investigative Experiment: Application of Chromatography Technology in an Animal Nutrition Experimental Course

CAO Qingyun, ZHAO Hengfeng, ZENG Linwei, ZUO Jianjun

(National Demonstration Center for Experimental Teaching of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Chromatography is a crucial component of investigative experiments in the Animal Nutrition experimental course for students majoring in Animal Science. Under the guidance of their instructors, a student team independently designed an experimental protocol by integrating a scientific research project into practical production needs. They successfully established a high-performance liquid chromatography method for determining the content of GMP and IMP in feed flavor enhancer. After sample pretreatment, isocratic elution was performed on an Athena C₁₈ column, using a mobile phase consisting of methanol and 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (2:98, v/v) at a flow rate of 0.6 mL/min. The column temperature was maintained at 25 °C, and the detection wavelength was set to 250 nm with an injection volume of 10 μL. The results indicated a good linear relationship between the concentrations of GMP and IMP and their peak areas over the range of 0.05~2.00 mg/mL ($R^2=0.9999$). The limits of detection were 0.4 μg/mL for IMP and 0.8 μg/mL for GMP, respectively. Furthermore, the method exhibited high recovery rates (up to 98%), with relative standard deviations (RSDs) of 0.81% and 0.75% for IMP and GMP, respectively. This experimental project is not only simple to perform with reasonable analysis time, but also demonstrates high precision and excellent recovery rates. It effectively stimulates students' interest in learning and spirit of inquiry, while fostering their innovative capabilities and scientific literacy.

Key words: chromatographic technology; feed flavour enhancer; disodium nucleotide; investigative experiment

研究性实验是学生自主提出或结合教师的科研项目及生产实际问题, 综合运用多学科知识, 在教师指导下独立进行的实验。通过实验学生能

初步掌握科学思维方式和科学研究方法, 学会撰写研究报告和有关论证报告, 培养创新能力。华南农业大学本科生院坚持实验室面向本科生开

收稿日期: 2024-04-18

基金项目: 2022 年度广东省本科高校教学质量与教学改革工程项目(粤教高函〔2023〕4 号); 2020 年华南农业大学质量工程项目(华南农教〔2020〕32 号); 校企合作项目(H20230417)。

作者简介: 曹庆云, 博士, 高级实验师, 主要从事饲料质量安全检测与评价、动物营养与饲料学综合实验教学与实验室管理方面的研究。E-mail: qycao@scau.edu.cn

放,推动科教融汇,鼓励学生在实验室进行科技创新或自主实验。支持各实验室开设一定数量的研究性实验,供学生自由选择,欢迎学生自带题目到实验室进行研究。

研究性实验一般在常规实验训练之后开设,主要培养学生综合运用多学科知识及相关实验原理去发现问题和解决问题的自主实验能力。动物营养学实验课程中研究性实验环节包括消化试验、代谢试验、光谱学技术、色谱学技术4大板块,每个板块又有若干分支,以供由6~10位同学组成的学生团队选择。色谱技术因其具有分离效率高、分析速度快、样品用量少、灵敏度高等优点在动物营养学科领域得到广泛应用^[1-4],也是学校动物科学专业学生动物营养实验课程中研究性实验环节的重要内容之一。

1 设计背景及思路

近年来,农业农村部深入推进实施玉米、豆粕减量替代行动,聚焦“提效减量、开源替代”,玉米、豆粕减量替代成为当今畜牧业发展的聚焦工作和重要方向^[5]。杂粮、杂粕、粮食加工副产物、食用动物副产品和微生物蛋白、昆虫蛋白等都是可利用的蛋白质饲料资源,如大麦、高粱、木薯、菜籽粕、棉籽粕、葵花籽粕、花生粕、羽毛粉、蝇蛆类、黑水虻类等^[6-7]。杂粮、杂粕等非常规饲料原料使用量增大,会改变原有饲料的天然风味,影响配合饲料的适口性,降低动物对饲料的采食量^[8]。调味剂可掩盖饲料中的异味,改善饲料适口性,增进动物食欲,促进动物的生长发育。使用调味剂,可提高非常规饲料原料的使用量,降低饲料成本,缓解人畜争粮的矛盾^[9-10],但过量使用调味剂也会影响动物健康,若在饲料中比例不合理,还会产生严重的后果。因此开发快速、灵敏、准确的检测方法对行业合理、规范、精准地使用饲料调味剂至关重要^[11]。

结合当前畜牧业政策背景和指导教师的校企合作科研项目“新型饲料鲜味剂的研究开发”,学生团队以市售饲料调味剂为研究对象,查阅文献资料,设计实验方案,探索应用反相高效液相色谱法对饲料调味剂中5'-鸟苷酸二钠(disodium 5'-guanosine monophosphate, GMP)、5'-肌苷酸二钠(disodium 5'-inosine monophosphate, IMP)的分离和测定。GMP、IMP是可以增强食物鲜味的核苷

酸类化合物,常被用作断奶仔猪乃至宠物饲料的风味促进剂,有改善饲料适口性、增加动物对养分的消化吸收、提高生长性能的作用^[12-13]。

实验思路设计遵循“学生为主体,教师为主导”的理念,学生团队通过查阅文献对实验方案进行设计,再与指导教师反复沟通修改后确定方案,对测定饲料调味剂中GMP、IMP含量的色谱分析波长、流动相组成和比例、流速、柱温等条件进行探索,期望找到满足饲料调味剂中GMP、IMP含量测定的最佳条件,并进行分析方法学验证,为日粮中精准、科学使用饲料调味剂提供参考。具体实验设计思路如图1所示。

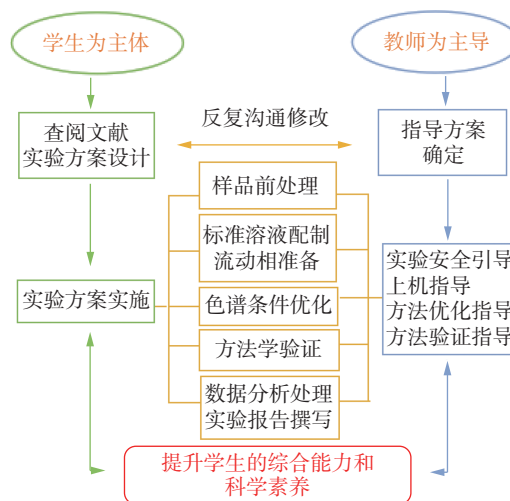


图1 实验设计思路图

2 实验部分

2.1 实验目的

- 1) 了解高效液相色谱仪的基本构造;
- 2) 掌握高效液相色谱法定性、定量分析的原理和方法;
- 3) 了解色谱分析方法学验证的指标及验证方法;
- 4) 掌握应用高效液相色谱技术解决本专业实际问题的方法。

2.2 主要试剂与仪器

试剂:市售饲料调味剂;5'-鸟苷酸二钠标准品(Solarbio公司)、5'-肌苷酸二钠(Solarbio公司);磷酸二氢钾(AR)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)。

仪器:紫外可见分光光度计(2501PC,岛津公司),Agilent1260高效液相色谱仪(配有VAD检测器,安捷伦公司);色谱柱Athena C₁₈(250 mm×

4.6 mm, 5 μm , CNW 公司); 离心机(SC-2546, 中佳公司), 超声波提取器(SB-5200DTD, 新芝公司), 移液器(Eppendorf 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制

称取 20 mg GMP、IMP 标准品于烧杯中, 加入少量超纯水, 搅拌溶解, 将溶液倒入 10 mL 容量瓶中, 定容、摇匀, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

准确吸取一定量的混合标准储备液, 配制质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/mL 混合标准工作液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤至 1.5 mL 样品瓶中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.3.2 样品前处理

准确称量 0.5 g 饲料调味剂样品(精确到 0.001 g)置于 10 mL 离心管中, 加入蒸馏水均质混匀, 超声提取 10 min, 提取完成后放入低速离心机 4000 r/min 离心 10 min。收集上清液于容量瓶中, 加水定容至 20 mL, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤至 1.5 mL 样品瓶中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 待测。

2.3.3 色谱分离条件优化

实验分别比较了不同检测波长、流动相的组成和比例、流速、柱温等条件对 GMP、IMP 分离效果的影响, 确定饲料调味剂中 GMP、IMP 含量测定的最佳色谱条件。

2.3.4 方法学验证

在最佳色谱条件下, 对标准溶液和样品溶液中 GMP、IMP 进行分离分析, 分别从标准曲线、检测限、精密度、回收率等方面对方法的准确性和重复性进行验证。

2.3.5 数据处理与实验报告

采用 Excel 2016 分析软件, 对数据进行计算和处理, 以保留时间为定性依据, 以标准曲线法对调味剂中 GMP、IMP 进行定量分析, 并撰写实验报告。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择

用紫外可见分光光度计对 GMP 和 IMP 混合标准溶液在 210~300 nm 波长范围内进行光谱扫描, 如图 2 所示, GMP 和 IMP 在 250 nm 处有最大吸收。在此基础上, 实验比较了不同波长对样品中 GMP、IMP 色谱分离效果的影响, 如图 3~图 5 所示。由图可知, 在波长 250~260 nm 之

间, 样品中 GMP、IMP 分离效果基本一致, 实验选择 250 nm 为实验检测波长。

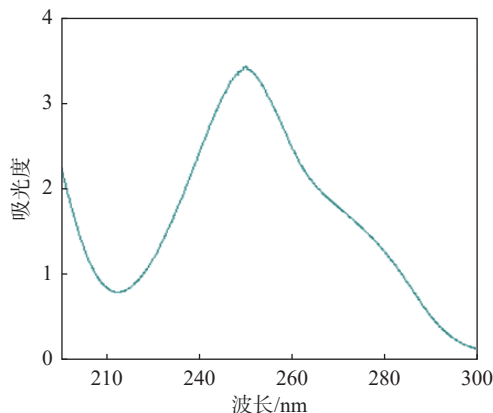


图 2 混合标准溶液紫外光谱图

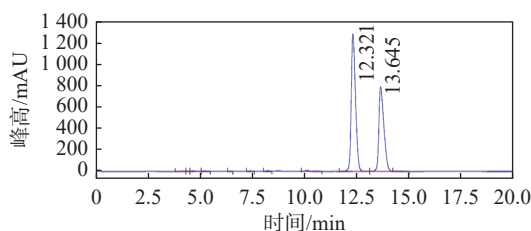


图 3 波长为 250 nm 的样品色谱图

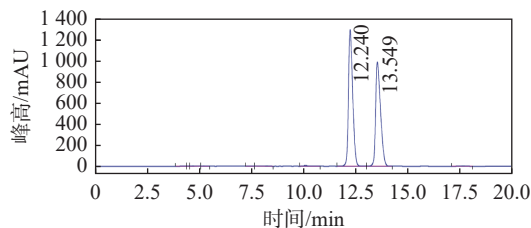


图 4 波长为 255 nm 的样品色谱图

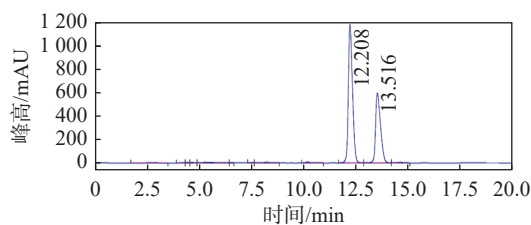


图 5 波长为 260 nm 的样品色谱图

3.2 流动相组成及比例对分离效果的影响

实验比较了不同流动相组成及比例对样品色谱分离效果的影响, 用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液与甲醇、水与甲醇和 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液与乙腈两两按不同比例组合, 分别作为流动相进行色谱分离。结果表明, 水与甲醇(80 : 20, v/v)作为流动相, GMP 和 IMP 不能分离; 水与甲醇(20 : 80, v/v)作为流动相, 干扰峰多, 不能完全分离; 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液与乙腈(98 : 2, v/v)作为流动相时, GMP 和 IMP 虽能分离, 但分

离效果不佳,峰形不理想;0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液与甲醇(98:2, v/v)作为流动相时,GMP和IMP分离效果理想,峰形良好。因此实验选择0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液与甲醇(98:2, v/v)作为最佳流动相组成和比例。

3.3 流速的选择

实验比较了不同流速(1.2、1.0、0.6 mL/min)对样品中GMP、IMP分离效果的影响。通过比较分析,流速为1.0、1.2 mL/min时,虽可实现组分的分离且出峰时间较短,但样品分离度较差;采用0.6 mL/min的流速进样分析,两种组分可实现完全分离,峰形好,因此选择0.6 mL/min为最佳流速。

3.4 柱温的选择

实验比较了在25、40℃的柱温条件对样品中GMP、IMP分离效果的影响。结果表明,在40、25℃条件下,均可实现GMP和IMP的分离,但柱温为25℃时,分离效果更好,选择25℃作为最佳柱温条件。

3.5 色谱定性分析

在最佳实验条件下,对GMP、IMP混合标准溶液与样品溶液进行色谱分析,得到相应的色谱图,如图6和图7所示。由图可知,混合标准溶液中GMP、IMP的保留时间分别为12.353、13.730 min;样品溶液中GMP、IMP保留时间分别为12.321、13.645 min,两种组分的保留时间一致,为样品中GMP、IMP的定性分析提供了依据。

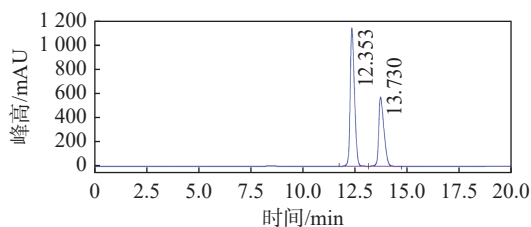


图6 GMP、IMP标准溶液色谱图

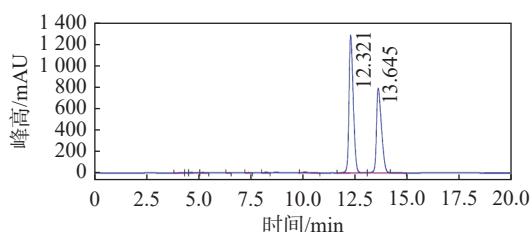


图7 GMP、IMP样品溶液色谱图

3.6 方法学考察

3.6.1 标准曲线

在最佳实验条件下,将0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/mL 6个浓度梯度的标准溶液依次进样10 μL,得到相应色谱图,以GMP、IMP的浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,如图8所示。由图可知,IMP和GMP在0.05~2.00 mg/mL范围内呈良好线性关系,IMP的线性方程为 $y = 23\,511x + 340.34$,线性相关系数 $R^2 = 0.999\,9$,GMP的线性方程为 $y = 14\,266x + 160.18$, $R^2 = 0.999\,9$,为色谱定量分析提供了保证。

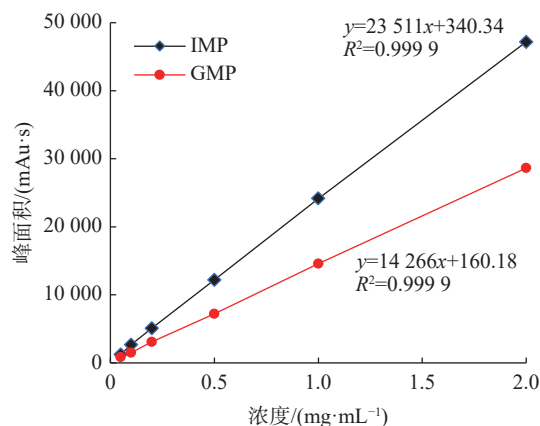


图8 GMP、IMP标准曲线图

3.6.2 方法检出限和定量限

按照样品分析的前处理方法,重复处理7个空白加标样品。在最优条件下进样分析,根据标准曲线方程计算样品中IMP和GMP的浓度,计算7次平行测定的标准偏差。以3倍信噪比计算方法的检出限,10倍信噪比计算方法的定量限,得到方法检出限为0.4、0.8 μg/mL,方法定量限为1.1、2.5 μg/mL,满足分析要求。

3.6.3 精密度

在最优实验条件下,平行处理6次样品,得到6份样品溶液,分别进行色谱分析,每个样品进样5次,计算平均峰面积。根据标准曲线计算样品中GMP、IMP的浓度,得到方法的精密度结果,如表1所示,可知IMP和GMP测定的相对标准偏差分别为0.75%、0.81%,说明该方法精密度高,稳定性好。

3.6.4 加标回收率实验

在样品中添加一定量的标准溶液,按上述方法对样品进行处理。在最佳实验条件下,进样分析,记录色谱峰的峰面积。每个样品平行测定3次,计算平均峰面积,根据标准曲线计算样品

中 GMP、IMP 的浓度, 与理论值比较, 计算回收率, 结果如表 2 所示。结果表明, 该方法回收率可达到 98% 以上, 接近 100%, 说明该分析方法准确度高。

表 1 样品精密度分析结果

重复次数	GMP浓度/ (mg·mL ⁻¹)	IMP浓度/ (mg·mL ⁻¹)
1	0.670	0.401
2	0.671	0.402
3	0.673	0.403
4	0.672	0.403
5	0.671	0.403
6	0.671	0.403
平均值	0.672	0.403
相对标准偏差 (RSD)/%	0.81	0.75

表 2 加标回收率分析结果

待测物	理论值	实测值	回收率/%
GMP	1.12	1.10	98.2
	1.08	1.06	98.4
	1.05	1.03	98.4
IMP	1.11	1.09	98.0
	1.07	1.05	98.0
	1.05	1.03	98.0

3.7 样品测定

在最佳实验条件下, 测定市售调味剂样品溶液中 IMP、GMP 的含量, 重复进样 6 次, 每次进样 10 μ L, 记录峰面积值。根据标准曲线计算, 得到该调味剂中 IMP、GMP 含量的平均值, 分别为 26.8、160.0 mg/g。

4 结束语

学生团队结合教师的科研课题“新型饲料鲜味剂的研究开发”, 从方案设计、样品前处理、溶液配制、色谱条件摸索、数据处理和分析、方法学考察等方面开展了研究性实验, 成功建立了一种利用高效液相色谱法测定饲料调味剂中 GMP 和 IMP 含量的方法, 最终确定了市售调味剂中 IMP、GMP 的含量, 为新型鲜味剂产品的开发提供了数据支持。该实验有助于学生掌握色谱分析完整的科学研究过程, 每一个实验条件的变化都会激起学生对结果的期待, 大大提高学生的学习兴趣 and 探索精神, 同时也使学生更深刻地理解色谱技术的原理和整个操作流程, 学以致用, 真正掌握应用色谱技术解决本专业实际问题的方法。

坚持“学生为主体, 教师为主导”原则, 教学团队在传统动物营养学实验教学中融入研究性

实验内容, 为学生提供更高层次的实验技能和科学思维训练, 让学生体会到解决科研课题和生产中实际问题的成就感, 培养学生的创新能力和科学素养, 助力学生早日成为“新农科”背景下的畜牧业时代新人。

参考文献

- [1] D' ONOFRIO F, LONGO F, MAUTI T, et al. Determination of eleven total amino acids including cyst(e)ine by HPLC-DAD/FLD in complete dry and wet pet foods and their feed materials[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2023, 303: 115720.
- [2] LUO S L, LIU Y, GUO Q, et al. Determination of zearalenone and its derivatives in feed by gas chromatography-mass spectrometry with immunoaffinity column cleanup and isotope dilution[J]. *Toxins*, 2022, 14(11): 764.
- [3] TAN L, LI Q, SUN C, et al. An efficient HPLC-PDA coupled with supel™ tox DON SPE approach for the analysis of deoxynivalenol contamination in cereal grains and feedstuffs in Jiangxi province[J]. *Journal of Food Protection*, 2023, 86(1): 100022.
- [4] 王凤芹, 刘鑫, 程远之, 等. 固相萃取-反相高效液相色谱法测定蛋黄中的斑蝥黄[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(8): 4675-4683.
- [5] 高鹏翔, 潘予琮, 蒋林树, 等. 饲用豆粕减量替代技术的应用及新型蛋白质饲料的开发前景[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(3): 1433-1443.
- [6] MARAMI M, NOBAKHT A, MAZLUM F, et al. Replacing soybean meal with sunflower meal in laying hens rations and its effects on cecal volatile fatty acids profile and intestinal microbial colonization[J]. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2022, 73(3): 4373-4378.
- [7] NIETO J, PLAZA J, LARA J, et al. Performance of slow-growing chickens fed with *Tenebrio molitor* larval meal as a full replacement for soybean meal[J]. *Veterinary Sciences*, 2022, 9(3): 131.
- [8] 郑爱荣, 牛岩, 张晓霞, 等. 豆粕减量替代的意义、研究进展与对策建议[J]. *饲料工业*, 2023, 44(14): 93-98.
- [9] 邓洁明, 朱宇旌, 李方方, 等. 饲料香味剂的作用机理及研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(1): 72-76.
- [10] 吕继蓉. 饲料风味剂对猪采食量和采食行为的影响及机理研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [11] 林彬. 饲料调味剂的检测技术[J]. *质量与市场*, 2021(24): 169-171.
- [12] 江皓天, 张家郡, 李治学, 等. 液态鲜味剂对犬采食与健康的影响[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(6): 3921-3931.
- [13] 单铭伟, 李方方, 李孟良, 等. 断奶仔猪饲料中玉米蛋白粉配合鲜味剂替代肠膜蛋白粉的研究[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(1): 150-164.