

短链脂肪酸在动物样本中的检测方法研究进展

刘娜 焦京琳 饶正华

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 短链脂肪酸又称挥发性脂肪酸, 其检测方法常用于动物肠道菌群健康及饲料营养研究。本文综述了近几年在不同类型动物样本中短链脂肪酸检测的方法, 讨论了各方法的优势及存在的问题, 为今后动物样本中短链脂肪酸检测提供方法参考。随着高分辨质谱技术的崛起, 未来应该开发出更快捷方便且灵敏度高的检测技术。

关键词: 动物样本; 短链脂肪酸; 前处理; 检测方法

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1429

Research Progress in the Detection Methods of Short Chain Fatty Acids in Animal Samples

LIU Na JIAO Jing-lin RAO Zheng-hua

(Institute of Animal Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100193)

Abstract: Short chain fatty acids are also known as volatile fatty acids. At present, its detection method is often used in the research direction of animal intestinal microflora health and feed nutrition. In this paper, the methods for detecting short-chain fatty acids in different types of animal samples in recent years are reviewed, and the advantages and issues of each method are discussed, so as to provide a method reference for the detection of short-chain fatty acids in animal samples in the future. With the development of high resolution mass spectrometry, more convenient and higher sensitive detection techniques should be developed in the future.

Key words: animal samples; short chain fatty acid; pretreatment; determination method

短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs), 又称挥发性脂肪酸 (volatile fatty acids, VFA), 是肠道内未消化的复合碳水化合物被结肠厌氧微生物发酵的主要代谢终产物^[1]。其由碳链为 1-6 的有机羧酸构成, 主要包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸等, SCFAs 可降低畜禽胃肠道内容物的 pH 值, 抑制病原菌的生长, 同时促进养分的吸收^[2]。通常情况下, 动物的 SCFAs 来源有两个方面, 一是直接通过外源获取, 二是通过后肠微生物的发酵产生, 后者也是动物获取 SCFAs 的主要方式^[3]。SCFAs 作为营养物质通过瘤胃或肠道上

皮细胞被吸收, 为反刍动物提供大部分代谢能量需求^[4]。在瘤胃液内的含量高达 90-150 mmol/L, 其中约 80% 的 SCFAs 在反刍动物瘤胃和网胃内被吸收, 剩余的 SCFAs 主要在瓣胃和皱胃吸收^[5]。对非反刍动物来说, SCFAs 主要是膳食纤维通过微生物在结肠 (猪) 或盲肠 (禽) 发酵合成, 是肠道上皮细胞的主要能量物质, 为其提供 60%-70% 的能量需求, 是维持动物肠道健康的重要物质^[6]。SCFAs 可维持动物肠道内环境稳态, 促进肠道的消化吸收, 激活肠道免疫应答, 调节细胞分化与凋亡, 调节机体的脂质代谢及糖代谢^[7]。在动物健康和饲料营养研究

收稿日期: 2021-11-06

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2019-YWF-YB-02)

作者简介: 刘娜, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 农产质量安全; E-mail: liuna@caas.cn

通讯作者: 饶正华, 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 农产质量安全; E-mail: raozhenghua@caas.cn

中短链脂肪酸的浓度越来越受到关注,因此 SCFAs 的检测方法凸显尤为重要。

动物样本和人体样本不尽相同。目前更多的检测方法是应用在人体粪便中,而关注动物样本检测方法优化的研究略少。SCFAs 是一类半衰期短、代谢快的挥发性化合物。不同的生物样本中 SCFAs 的前处理方法不同,粪便中前处理常见有蒸馏法、高速离心法及超滤法等;常用检测方法包括气相色谱法、液相色谱法、毛细管电泳法等。本文综述了近几年来不同动物样本中 SCFAs 检测主流的前处理和仪器分析方法,对比各方法的利弊,以期 SCFAs 在动物样本中检测提供理论参考。

1 前处理

1.1 不同动物样本前处理方法

1.1.1 动物粪便样本 由于肠道中 SCFAs 的组成与宿主肠道菌群直接关联,所以动物肠道菌群的研究中常常检测动物的粪便样本^[8-9]。SCFAs 具有自身极性大、挥发性强、水溶性大的特点使样本快速处理尤为重要,常规的蒸馏、衍生化、萃取等方法耗时、耗有机试剂、污染大,因此在分离效果好的基础上需要简单、准确且快速直接的前处理方法^[10]。动物粪便样本的前处理方式较人体样本相对简单。在养殖场采集新鲜粪便后用低温转运箱运送到实验室进行检测,同时可备份样品在 -80℃ 下冷冻保存。一般动物粪便样本前处理包括提取和低温高速离心,随后取上清液过膜进样。提取时可以采用蒸馏水或盐酸溶液,其中盐酸可以用 5% 浓度^[11]或 0.1% 浓度^[12]等;蒸馏水可以与样本量等体积^[13-15],可以 8 倍体积^[16-17]等,然后超声 20 min。蒋恺懂等^[1]比较了酸(盐酸溶液, pH 2)提取法和水(灭菌去离子水)提取法对于犊牛和小鼠的新鲜粪便中 SCFAs 的测定,结果表明 2 种方法均可检测到 6 种 SCFAs,且水提法的 SCFAs 检测浓度高于酸提法,但无显著性差异。样本提取后一般采用 4℃ 高速(离心力 10 000 × g 以上)离心至少 10 min 后取上清液待测。

1.1.2 动物肠道样本 乙酸、丙酸和丁酸在猪的结肠短链脂肪酸中占据 85% 甚至更高的比例^[18-19]。动物肠道内 SCFAs 的浓度主要取决于动物肠道内微生物群组成、饲料中纤维的含量、饲料在肠道内的

消化时间以及宿主与微生物的代谢通量。研究表明饲料纤维水平可通过调节肠道微生物从而显著影响宿主的肠道健康,而这一过程可能源于纤维在后肠发酵产生 SCFAs 模式和浓度的差异^[20]。不同纤维来源非淀粉多糖也会改变动物肠道中短链脂肪酸的种类和数量。Pieper 等^[21]在仔猪日粮中添加了麦麸和甜菜碱,发现猪结肠中乙酸的比例从 58% 增至 62.7%,丙酸比例从 25.7% 降至 23%。因此,研究学者常常通过动物肠道中短链脂肪酸的浓度变化来开展饲料营养与动物健康方面的研究。

动物肠道样本在前处理过程中常用水提取。研究学者发现猪回肠食糜可以采用等体积双蒸水提取^[22],肉鸡盲肠食糜可以用两倍体积生理盐水提取^[23],肉兔盲肠内容物采用蒸馏水稀释 10 倍提取^[24],白鹅盲肠(半固体状)采用两倍体积蒸馏水稀释提取^[25]。提取后进行低温高速离心,再加入 25% 偏磷酸(也可以是 25% 偏磷酸-巴豆酸)溶液混匀,随后可以 -20℃ 冰箱中过夜,也可以在冰水浴中放置半小时以上,最后低温高速离心去除蛋白质沉淀物,取上清液过膜进样。

1.1.3 动物瘤胃样本 反刍动物为复胃动物,其中瘤胃是最大的胃,掌握反刍动物瘤胃中短链脂肪酸浓度对监测动物身体状况、调整营养水平、提高动物机体免疫力等具有重要意义^[26]。瘤胃液的采集一般是用胃管式瘤胃采样器,采集后装于冻存管中并迅速置入液氮罐中冷冻,再带回实验室 -80℃ 保存。研究学者在处理牛和羊的瘤胃液样本时前处理操作相对简单。离心可以清除瘤胃液中的颗粒物,牛瘤胃液可以先低速(6 000 × g)离心 10 min 后再取上清液继续高速(14 000 × g)离心 10 min^[27],也可以直接高速(20 000 × g)离心 25 min 取上清液^[28]或 16 100 × g 下离心 30 min 取上清液^[29]。羊的瘤胃液同样可以先低速(转速 5 400 r/min)离心 10 min 取上清液^[30]。离心后的上清液均需要加 25% 偏磷酸混匀后再次低温高速离心后取上清液待测^[31-33]。目前瘤胃液中短链脂肪酸也有团体标准《T/NAIA 005-2020》可以参考,同样用 25% 偏磷酸除去可溶性蛋白质后 10 000 r/min 离心 10 min 后上清液过膜直接进样。

1.2 内标物的选择

在短链脂肪酸含量测定时常使用内标化合物。用内标法测定时需在样品中加入一种物质作内标,而内标物应符合以下条件:(1)应是样品中不存在的纯物质;(2)内标物质的色谱峰位置,应位于被测组分色谱峰附近或在几个被测组分色谱峰中间,且与这些组分能完全分离;(3)其物理性质及理化性质应与被测组分相近;(4)加入的量应与被测组分含量接近^[34-35]。因此根据内标物的选择原则并结合实验室已有物质,短链脂肪酸测定时可选用异己酸^[27]、4-甲基戊酸^[28]、巴豆酸及丙二酸^[30]、2-乙基丁酸(2EB)^[31-33]、2-甲基丁酸^[36]等为内标物质。

1.3 同位素示踪法

动物大肠中发酵产生的部分短链脂肪酸在肠道被吸收,供机体利用,而未被吸收利用的则随着大肠内容物以粪便的形式排出体外^[37],因此有学者关注短链脂肪酸在动物体内的去向研究,常利用同位素示踪法测定短链脂肪酸。同位素示踪剂对动物灌注常采用¹³C标记。Markantonatos等^[38]将¹³C-乙酸钠盐、¹³C-丙酸钠盐和¹³C-丁酸钠盐注入荷斯坦母牛瘤胃中进行短链脂肪酸测定,瘤胃液前处理时同样加入偏磷酸后低温高速离心。张博等^[37]利用^{[13C]-VFA}(乙酸、丙酸、丁酸)稳定性同位素灌注法,跟踪猪大肠内产生的VFA的去向,前处理时将大肠肠道组织用液氮研磨,随后用超纯水溶解并稀释,超声提取,随后高速离心取上清液待测。

1.4 衍生化法

衍生化是将一些难于分析检测的物质转化为稳定且易于分析的物质。羧基的极性比较强,在气相色谱柱中易产生吸附从而使结果的重现性差,尤其在浓度低(<1 mmol/L)时发生^[39]。而在液相系统中短链脂肪酸又缺乏合适的发色基团。因此短链脂肪酸检测中常需要进行柱前衍生化,主要是通过增加结构中的发色基团提高紫外检测器等的响应,或者通过降低其挥发性避免分析过程中短链脂肪酸的逸失,使测定结果更加精准^[40]。羟基、羧基、胺、硫醇、磷酸盐等官能团在气相色谱分析高温环境下可能不稳定,因此需要通过某些硅基化试剂进行衍生化^[41]。衍生化可以提高化合物稳定性、灵敏度及

分离度。常用的衍生试剂有吡啶^[42]、氯甲酸丙酯^[43]、硝基苯胍等^[44]。对样品进行简单的酸化也是短链脂肪酸测定中常用的方法,主要包括盐酸、偏磷酸、甲酸、高氯酸等^[45-48],可以减少峰拖尾现象,也有利于脱蛋白,起到除杂质和提高分离度的作用。同时短链脂肪酸为酸性化合物,在溶液中有离子型和游离型两种状态,加入偏磷酸可使短链脂肪酸处于游离态,有利于测定^[49]。

2 仪器分析方法

2.1 气相色谱

1952年首次报道了利用气相色谱检测短链脂肪酸^[50]。目前利用气相色谱分析短链脂肪酸也是最常见的技术手段之一,仪器可靠性高,操作简单。在色谱柱的选择上,通常采用毛细管柱,利用相似相溶原则选择合适固定相的色谱柱。常用的色谱柱有DB-FFAP^[10, 36]、Inter Cap Wax^[1]、SH-Stabilwax^[51]等。检测器通常选用火焰离子化检测器(FID)。FID是用氢气在空气中燃烧所产生的火焰使被测物质离子化。气相色谱检测短链脂肪酸时需要设置升温程序,一般采用分流进样。

对于反刍动物瘤胃液成分杂质较多,对仪器的进样口和色谱柱会造成一定程度污染,降低分析的准确性,也缩短了色谱柱的使用寿命^[52]。一些学者也利用顶空进样法对复杂基质中短链脂肪酸进行测定^[53-54]。王俊红等^[51]分析奶牛和湖羊的瘤胃液中短链脂肪酸时,利用顶空-气相色谱法检测,无需样品前处理过程,称取一定量样品放入顶空瓶中,在85℃平衡预热30 min后取平衡气体直接进行测定。顶空进样需要在气相色谱上配备顶空进样装置,节约了样本前处理的时间,有效降低了样品中杂质对色谱柱的污染^[55]。气相色谱操作简单,前处理方法也无需衍生化,但仪器程序升温需要单独消耗时间,仪器运行时间大约20 min,且灵敏度上不如质谱联用仪器高,适合动物样本中短链脂肪酸浓度高的样品检测。

2.2 气相色谱串联质谱

气相色谱串联质谱法是在气相色谱基础上,样品中各组分经气相色谱分离后,质谱作为其检测器,先将被测物质离子化,根据离子的质荷比进行分离,

测定各种离子谱峰的强度而实现分析目的^[56]。质谱法较单纯色谱法相比不光能定量,还能更准确地对短链脂肪酸进行定性,并有效减少干扰峰,且灵敏度也大大提升,同时气质仪器还有用相应的质谱谱库。Douny 等^[57]利用 GC-MS 全扫模式,质量范围在 40–150 Da 下检测猪体外模拟胃肠道模型中短链脂肪酸。Bianchi 等^[58]同样用 GC-MS 全扫模式,质量范围在 35–150 amu 下检测短链脂肪酸含量。气相色谱串联质谱仪较气相色谱在灵敏度上有所提升,而且有谱库可以比对,没有标准品情况下也能对样品中短链脂肪酸进行定性,但前处理步骤也相对复杂,分析时间上同气相一样仪器基本也运行 20 min。

2.3 液相色谱

液相色谱原理是流动相与检测物被注入色谱柱,通过压力在固定相中移动,由于被测物中不同物质与固定相的相互作用力不同,不同的物质先后被洗脱,通过检测器得到不同的峰信号,最后通过分析比对这些信号来判断待测物所含有的物质。利用液相色谱检测短链脂肪酸,常用紫外检测器。但由于 SCFAs 的极性和挥发性,以及缺乏合适的发色团,使得 SCFAs 的提取和在紫外检测中有信号变得更加困难。一般需要用酸性流动相且用硝基苯胍等衍生化。流动相组成中水相可以用 20 mmol/L NaH_2PO_4 溶液 (pH 2.2)^[59]、高氯酸溶液 (pH 2.1)^[60]、磷酸溶液 (pH 2.5)^[61]等,有机相一般用乙腈溶液。检测波长可以选 210 nm^[59–60]或 400 nm^[61]。液相色谱检测虽提升了灵敏度,但需要衍生化,增加了实验步骤,且强酸流动需要注意维护色谱柱。

2.4 液相色谱串联质谱

为了提高短链脂肪酸的灵敏度,科学家也开发了利用液相色谱串联质谱的检测方法。短链脂肪酸类化合物在质谱中响应很低,且高亲水性及极性特点导致其在反相色谱柱上保留很弱,因此常采用衍生化法进行测定。离子源通常采用大气压电喷雾离子源 (ESI 源),扫描模式是 ESI^+ ^[62]。流动相中水相可以采用 0.1% 甲酸水^[63], 10 mmol/L 甲酸铵水溶液 (含 0.1% 甲酸)^[64]等;有机相选择乙腈^[65], 0.1% 甲酸甲醇等溶液进行梯度洗脱。研究表明衍生剂添加的官能团可以通过在电喷雾离子源中更有效地电

离,或在碰撞池中更容易地碰撞诱导解离,产生独特和高度丰富的特征片段离子来潜在地提高灵敏度^[64]。衍生化试剂可以选择 4-AMBA^[63], 0.1 mol/L 甲醇中丁基羟基茴香醚 (BHA) 溶液和甲醇中 0.25 mol/L 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC)^[64], d_0/d_6 -邻苯二甲酸二庚酯 (d_0/d_6 -DHPP) 试剂等^[65]。液相色谱串联质谱缩短了检测时间,大大提高了灵敏度,同时能检测多种脂肪酸,但同样需要衍生化,需要购买合适的衍生化试剂以完成检测。

2.5 离子色谱

离子色谱是分析阴离子和阳离子的一种液相色谱,它是利用物质在离子交换柱上迁移的差异而达到分离,用于亲水性阴阳离子的测定。离子色谱的分离原理主要是离子交换,基于离子交换树脂上可离解的离子与流动相中具有相同电荷的溶质离子之间进行的可逆交换,不同离子因与交换剂的亲和力不同而被分离,与液相色谱不用的是,离子色谱选择性的改变主要是通过不同的固定相来实现的^[56]。离子色谱可以识别以下阴离子:甲酸、醋酸酯、丙酸酯、丁酸酯、戊酸酯、己酸酯、庚酸酯和辛酸酯^[66]。样品需要被氧化,产生的有机阴离子进行收集。可以采用不同浓度的硫酸溶液和硫酸/丙酮溶液作为洗脱液^[67]。Wu 等^[16]和 Liu 等^[17]测定断奶小猪消化物时均利用离子色谱检测。离子色谱检测时前处理过程中需要添加试剂以实现氧化,因此增加了前处理步骤。

3 总结与展望

短链脂肪酸是维持动物肠道平衡的重要代谢产物,在动物体内能参与不同器官的代谢,因此其检测方法尤为重要。动物样本涉及的基质类型相对人体样本多,其检测前处理技术上普遍采用低温高速离心后直接上样。仪器方面主要应用色谱及色谱质谱联用技术,各项检测技术各有利弊,根据样品浓度高低的要求,以及实验室自身仪器装备来选择合适的检测技术。由于短链脂肪酸类化合物具有极性大、挥发性强及水溶性大的特点增加了其检测难度,因此为了提高检测的灵敏度常采用衍生化的方法,根据使用仪器的不同需要采用不同的衍生化试剂。

未来短链脂肪酸在动物样本中检测方法的开发中,应结合现在高分辨质谱的优势,在不衍生化,尽量少前处理步骤的条件下进行研发。目前高分辨质谱技术崛起,具有高分辨率、高灵敏度和高准确度的仪器为未来检测带来无限可能。

参考文献

- [1] 蒋恺瑾,程悦,焦圣寅,等.粪便中6种短链脂肪酸的气相色谱快速检测法[J].现代预防医学,2020,47(4):686-689,711.
Jiang KC, Cheng Y, Jiao SY, et al. Rapid determination of 6 short-chain fatty acids in feces by gas chromatography[J]. Mod Prev Med, 2020, 47(4): 686-689, 711.
- [2] 黎宇,杨琳,朱勇文,等.日粮纤维对畜禽肠道健康的调控作用研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2021(15):29-35.
Li Y, Yang L, Zhu YW, et al. Research progress of dietary fiber regulation on intestinal health of livestock and poultry[J]. Heilongjiang Animal Sci Vet Med, 2021(15): 29-35.
- [3] 薛永强,张辉华,等.短链脂肪酸对肠道健康的调控机制及在动物生产中的应用[J].饲料工业,2020,41(19):18-22.
Xue YQ, Zhang HH, et al. Regulation mechanism of short-chain fatty acids on intestinal health and their application in animal production[J]. Feed Ind, 2020, 41(19): 18-22.
- [4] Shabat SKB, Sasson G, Doron-Faigenboim A, et al. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants[J]. ISME J, 2016, 10(12): 2958-2972.
- [5] 唐文浩,张养东,郑楠,等.短链脂肪酸的生理功能及其在奶牛生产中的研究进展[J].饲料工业,2021,42(15):43-48.
Tang WH, Zhang YD, Zheng N, et al. Physiological function of short-chain fatty acids and its application in dairy production[J]. Feed Ind, 2021, 42(15): 43-48.
- [6] 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.
- [7] 程雅婷,孔祥峰.短链脂肪酸的生理作用及其在母猪生产中的应用[J].动物营养学报,2021,33(10):5435-5440.
Cheng YT, Kong XF. Physiological functions of short-chain fatty acids and their application in sow production[J]. Chin J Animal Nutr, 2021, 33(10): 5435-5440.
- [8] 宫玉杰,邹晓庭,肖英平,等.生理盐水实验性干预对肉鸡盲肠微生物区系和短链脂肪酸含量的影响[J].中国实验动物学报,2019,27(1):38-45.
- [9] Gong YJ, Zou XT, Xiao YP, et al. Effects of experimental intervention with normal saline on the microflora and short-chain fatty acid content in the cecum of broilers[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2019, 27(1): 38-45.
- [10] Zhao GH, Nyman M, Jönsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography[J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20(8): 674-682.
- [11] Brestenský M, Nitrayová S, Bomba A, et al. The content of short chain fatty acids in the jejunal digesta, caecal digesta and faeces of growing pigs[J]. Livest Sci, 2017, 205: 106-110.
- [12] Zhao JB, Bai Y, Tao SY, et al. Fiber-rich foods affected gut bacterial community and short-chain fatty acids production in pig model[J]. J Funct Foods, 2019, 57: 266-274.
- [13] Li JY, Chen DW, Yu B, et al. The fungal community and its interaction with the concentration of short-chain fatty acids in the faeces of Chenghua, Yorkshire and Tibetan pigs[J]. Microb Biotechnol, 2020, 13(2): 509-521.
- [14] Franklin MA, Mathew AG, Vickers JR, et al. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age[J]. J Anim Sci, 2002, 80(11): 2904-2910.
- [15] Liu CS, Liang X, Wei XH, et al. Gegen Qinlian Decoction treats diarrhea in piglets by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 825.
- [16] Wu Y, Pan L, Shang QH, et al. Effects of isomaltoligosaccharides as potential prebiotics on performance, immune function and gut microbiota in weaned pigs[J]. Animal Feed Sci Technol, 2017, 230: 126-135.
- [17] Liu XZ, Zhao JB, Zhang G, et al. Dietary supplementation with *Flammulina velutipes* stem waste on growth performance, fecal short chain fatty acids and serum profile in weaned piglets[J]. Animals (Basel), 2020, 10(1): 82.
- [18] Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine[J].

- FEMS Microbiol Lett, 2009, 294 (1): 1-8.
- [19] Nielsen TS, Lærke HN, Theil PK, et al. Diets high in resistant starch and Arabinoxylan modulate digestion processes and SCFA pool size in the large intestine and faecal microbial composition in pigs [J]. Br J Nutr, 2014, 112 (11): 1837-1849.
- [20] 刁慧. 猪肠道微生物与 SCFAs 对肠道结构和功能的影响及其机制 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- Diao H. Effects of gut microbiota and SCFAs on intestinal structure and functions of pigs and the underlying mechanisms [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017.
- [21] Pieper R, Kröger S, Richter JF, et al. Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets [J]. J Nutr, 2012, 142 (4): 661-667.
- [22] 王伟兰. 不同日粮纤维对猪肠道微生物多样性及挥发性脂肪酸的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- Wang WL. Influence of different diet fiber on swine gastrointestinal tract microbial diversity and volatile fatty acid [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [23] 彭宇, 柴毛毛, 崔细鹏, 等. 丁酸类添加剂及其与合生元组合对肉鸡生长性能和肠道健康的影响 [J]. 动物营养学报, 2020, 32 (11): 5145-5157.
- Peng Y, Chai MM, Cui XP, et al. Effects of butyric acids additives alone or combination with synbiotics on growth performance and gut health of broilers [J]. Chin J Animal Nutr, 2020, 32 (11): 5145-5157.
- [24] 魏宇超, 王凤霞, 张灿, 等. 枯草芽孢杆菌对肉兔肠道结构、盲肠挥发性脂肪酸含量和微生物多样性的影响 [J]. 动物营养学报, 2021, 33 (12): 7021-7032.
- Wei YC, Wang FX, Zhang C, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on intestinal structure, cecal volatile fatty acid contents and microbial diversity of meat rabbits [J]. Chin J Animal Nutr, 2021, 33 (12): 7021-7032.
- [25] 金灵, 罗海凌, 高玉云, 等. 饲粮粗纤维水平与砂砾对四川白鹅肠道组织形态、纤维分解酶活性及挥发性脂肪酸含量的影响 [J]. 动物营养学报, 2020, 32 (7): 3403-3411.
- Jin L, Luo HL, Gao YY, et al. Effects of dietary fiber level and grit on intestinal morphology, cellulolytic enzyme activities and volatile fatty acid contents in Sichuan white geese [J]. Chin J Animal Nutr, 2020, 32 (7): 3403-3411.
- [26] 陈希, 姜婉茹, 等. 麦秸对湖羊瘤胃发酵代谢及肠道组织形态的影响 [J]. 中国农业大学学报, 2021, 26 (8): 120-130.
- Chen X, Jiang WR, et al. Effect of wheat straw feeding on rumen fermentation metabolism and intestinal tissue morphology of Hu sheep [J]. J China Agric Univ, 2021, 26 (8): 120-130.
- [27] Chibisa GE, Gorka P, Penner GB, et al. Effects of partial replacement of dietary starch from barley or corn with lactose on ruminal function, short-chain fatty acid absorption, nitrogen utilization, and production performance of dairy cows [J]. J Dairy Sci, 2015, 98 (4): 2627-2640.
- [28] Kumar M, Khiaosa-Ard R, Pourazad P, et al. Evidence of *in vivo* absorption of lactate and modulation of short chain fatty acid absorption from the reticulorumen of non-lactating cattle fed high concentrate diets [J]. PLoS One, 2016, 11 (10): e0164192.
- [29] Schwaiger T, Beauchemin KA, Penner GB. The duration of time that beef cattle are fed a high-grain diet affects the recovery from a bout of ruminal acidosis: dry matter intake and ruminal fermentation [J]. J Anim Sci, 2013, 91 (12): 5729-5742.
- [30] 沙玉柱. 放牧藏绵羊瘤胃发酵-宿主-微生物互作对其寒冷环境适应的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
- Sha YZ. Effect of rumen fermentation-host-microbe interaction on the adaptation to cold environment of grazing Tibetan sheep [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2021.
- [31] 严淑红, 赵士萍, 等. 茶皂素对奶牛瘤胃发酵及瘤胃微生物区系的影响 [J]. 动物营养学报, 2016, 28 (8): 2485-2496.
- Yan SH, Zhao SP, et al. Effects of tea saponin on rumen fermentation and rumen microflora of dairy cows [J]. Chin J Animal Nutr, 2016, 28 (8): 2485-2496.
- [32] 郝小燕, 牟春堂, 乔栋, 等. 葡萄籽原花青素对羔羊瘤胃发酵、血清炎症及抗氧化指标的影响 [J]. 中国农业科学, 2021, 54 (10): 2239-2248.
- Hao XY, Mu CT, Qiao D, et al. Effects of high-concentrate diet supplemented with grape seed proanthocyanidins on rumen fermentation, inflammatory and antioxidant indicators of rumen and serum in lambs [J]. Sci Agric Sin, 2021, 54 (10): 2239-2248.
- [33] 胡伟莲, 王佳莹, 吕建敏, 等. 瘤胃体外发酵产物中的甲烷和有机酸含量的快速测定 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32 (2): 217-221.
- Hu WL, Wang JK, Lv JM, et al. Rapid gas chromatogram determination of methane, organic acid in *in vitro* ruminal

- fermentation products [J]. *J Zhejiang Univ Agric Life Sci*, 2006, 32 (2): 217-221.
- [34] 刘晓东. 气相色谱内标法定量分析教学实验 [J]. *实验科学与技术*, 2009, 7 (4): 23-24, 29.
- Liu XD. Teaching experiment compilation on quantitative analysis of gas chromatographic internal standard method [J]. *Exp Sci Technol*, 2009, 7 (4): 23-24, 29.
- [35] 张晓彤, 云自厚. 液相色谱检测方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- Zhang XT, Yun ZH. Liquid chromatography method for detection [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [36] Eberhart BL 2nd, Wilson AS, O'Keefe SJD, et al. A simplified method for the quantitation of short-chain fatty acids in human stool [J]. *Anal Biochem*, 2021, 612: 114016.
- [37] 张博, 杨俊, 冯志, 等. ^{13}C 标记法测定猪血液、大肠组织和大肠内容物中挥发性脂肪酸含量 [J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57 (10): 209-213.
- Zhang B, Yang J, Feng Z, et al. Determination of volatile fatty acids in pig blood, Colon tissue and colon contents by ^{13}C labeling [J]. *Chin J Animal Sci*, 2021, 57 (10): 209-213.
- [38] Markantonatos X, Green MH, Varga GA. Use of compartmental analysis to study ruminal volatile fatty acid metabolism under steady state conditions in Holstein heifers [J]. *Animal Feed Sci Technol*, 2008, 143 (1/2/3/4): 70-88.
- [39] 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 HX, Li JS. Extraction and determination of short-chain fatty acids in biological samples [J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, 24 (1): 81-87.
- [40] 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 YJ, Shen H, Xu JD, et al. Advance in determination of short-chain fatty acids of gut bacterial metabolites in feces [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39 (6): 967-974.
- [41] Wallace AJ, Eady SL, Hunter DC, et al. No difference in fecal levels of bacteria or short chain fatty acids in humans, when consuming fruit juice beverages containing fruit fiber, fruit polyphenols, and their combination [J]. *Nutr Res*, 2015, 35 (1): 23-34.
- [42] 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.
- Zhang XW, Sun X, Li XJ, et al. Determination of free short-chain fatty acids in rat feces by derivatization-headspace solid-phase microextraction-gas chromatography [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2021, 40 (5): 160-168.
- [43] Zheng XJ, Qiu YP, 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.
- [44] Torii T, Kanemitsu K, Wada T, et al. Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability [J]. *Ann Clin Biochem*, 2010, 47 (Pt 5): 447-452.
- [45] Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, et al. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e70803.
- [46] Zhao GH, Nyman M, Jönsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006 (8): 674-682.
- [47] Okazaki M, Matsukuma S, Suto R, et al. Perioperative synbiotic therapy in elderly patients undergoing gastroenterological surgery: a prospective, randomized control trial [J]. *Nutrition*, 2013, 29 (10): 1224-1230.
- [48] Ohigashi S, Sudo K, Kobayashi D, et al. Significant changes in the intestinal environment after surgery in patients with colorectal cancer [J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17 (9): 1657-1664.
- [49] Sullivan HM, Martin SA. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation [J]. *J Dairy Sci*, 1999, 82 (9): 2011-2016.
- [50] James AT, Martin AJP. Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid [J]. *Biochem J*, 1952 (5): 679-690.
- [51] 王俊红, 高歌, 张圆圆, 等. 顶空-气相色谱法测定反刍动物瘤胃液中挥发性脂肪酸含量 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2021, 47 (5): 667-672.
- Wang JH, Gao G, Zhang YY, et al. Determination of the volatile fatty acid contents in rumen fluid of ruminants by headspace-gas chromatograph method [J]. *J Zhejiang Univ Agric Life Sci*, 2021, 47 (5): 667-672.
- [52] Cerkowniak M, Bogus MI, Wloka E, et al. Comparison of the

- volatile compounds of *Dermestes maculatus* and *Dermestes ater* pupae : application of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS) [J] . ISJ Invertebr Surviv J, 2017, 14 : 303-311.
- [53] Korntner P, Schedl A, et al. Sulfonic acid group determination in lignosulfonates by headspace gas chromatography [J] . ACS Sustainable Chem Eng, 2018, 6 (5) : 6240-6246.
- [54] Li MQ, Yang RW, et al. Development of a flavor fingerprint by HS-GC-IMS with PCA for volatile compounds of *Tricholoma matsutake* Singer [J] . Food Chem, 2019, 290 : 32-39.
- [55] 江振作, 王跃飞, 等. 顶空气相色谱 - 质谱联用法分析粪便中挥发性脂肪酸 [J] . 分析化学, 2014, 42 (3) : 429-435.
- Jiang ZZ, Wang YF, et al. Rapid analysis of volatile fatty acids in feces by headspace gas chromatography tandem mass spectrometry [J] . Chin J Anal Chem, 2014, 42 (3) : 429-435.
- [56] 高慧. 离子色谱和液相色谱串联质谱法测定食品中的添加剂 [D] . 泰安 : 山东农业大学, 2012.
- Gao H. Determination of food additives in food by ion chromatography and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [D] . Tai'an : Shandong Agricultural University, 2012.
- [57] Douny C, Dufourny S, et al. Development of an analytical method to detect short-chain fatty acids by SPME-GC-MS in samples coming from an *in vitro* gastrointestinal model [J] . J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1124 : 188-196.
- [58] Bianchi F, Dall'Asta M, Rio DD, et al. Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of short-chain fatty acids from intestinal fermentation [J] . Food Chem, 2011, 129 (1) : 200-205.
- [59] Correia Sales GF, Carvalho BF, Schwan RF, et al. Heat stress influence the microbiota and organic acids concentration in beef cattle rumen [J] . J Therm Biol, 2021, 97 : 102897.
- [60] Correia Sales GF, Carvalho BF, Schwan RF, et al. Heat stress influence the microbiota and organic acids concentration in beef cattle rumen [J] . J Therm Biol, 2021, 97 : 102897.
- [61] Inoue H, Takayama K, Takahara C, et al. Determination of short-chain fatty acids in mouse feces by high-performance liquid chromatography using 2-nitrophenylhydrazine as a labeling reagent [J] . Biol Pharm Bull, 2019, 42 (5) : 845-849.
- [62] Fu H, Zhang QL, et al. A rapid and convenient derivatization method for quantitation of short-chain fatty acids in human feces by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J] . Rapid Commun Mass Spectrom, 2020, 34 (9) : e8730.
- [63] Zheng J, Zheng SJ, Cai WJ, et al. Stable isotope labeling combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for comprehensive analysis of short-chain fatty acids [J] . Anal Chim Acta, 2019, 1070 : 51-59.
- [64] Zeng MF, Cao HC. Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction [J] . J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1083 : 137-145.
- [65] Wei JT, Xiang L, Li XN, et al. Derivatization strategy combined with parallel reaction monitoring for the characterization of short-chain fatty acids and their hydroxylated derivatives in mouse [J] . Anal Chim Acta, 2020, 1100 : 66-74.
- [66] Souza PT, et al. Kinetic of the formation of short-chain carboxylic acids during the induced oxidation of different lipid samples using ion chromatography [J] . Fuel, 2017, 199 : 239-247.
- [67] Dias JC, Suzuki E, de Albuquerque CL, et al. Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection [J] . J Pharm Biomed Anal, 2009, 49 (4) : 1128-1132.

(责任编辑 张婷婷)