

# 饲料中抗营养因子——单宁的含量分析方法

唐一国<sup>1</sup> 龙瑞军<sup>2</sup> 毕玉芬<sup>3</sup>

(1.四川省草原工作站,四川 成都 610041;

2.甘肃农业大学草业学院,甘肃 兰州 730070;3.云南农业大学动物科技学院,云南 昆明 650201)

中图分类号:S816.11 文献标识码:B 文章编号:1008-9381(2003)10-0059-02

**摘要:**针对近年来单宁在动物营养上的最新研究成果,本文重点阐述了饲料中缩合单宁、可水解单宁和总酚类化合物的分析方法。旨在为更好地利用含单宁饲料提供参考。

**关键词:**缩合单宁;可水解单宁;聚乙二醇(PEG)

单宁通常分为可水解单宁(Hydrolysable tannin)和缩合单宁(Condensed tannin)。缩合单宁是饲料中单宁的主要存在形式。日粮中高含量单宁会影响动物的食欲,降低采食量、动物的生产成绩和营养物质的消化利用率,甚至引起胃肠道疾病和毒害肝肾。而单宁广泛分布于植物体内,因此探讨饲料中单宁含量的测定方法对畜牧业生产具有重要的意义。

## 1 缩合单宁含量的测定

常用的方法包括沉淀法、氧化还原法、酶法、酸分解裂反、微生物抑制法、高效液相色谱分析(HPLC)法、香兰素法、丁醇盐酸法和重量分析法等。目前国内外常用的是丁醇盐酸法和香兰素法。大多数缩合单宁的含量分析是用丙酮或甲醇浸提可溶性单宁而进行的。而分析不可溶性单宁的方法可用<sup>13</sup>C-NMR和丁醇盐酸法。

### 1.1 影响缩合单宁分析的因素

采样、干燥方法和浸提处理等步骤都对缩合单宁含量分析具有重要的影响。另外,Giner-Chavez等(1997)<sup>[1]</sup>研究表明,饲料的原产地对缩合单宁的含量有相当大的影响。Waterman和Mole(1994)<sup>[2]</sup>,Mueller-Harvey(2001)<sup>[3]</sup>对影响因素作了比较全面的综述。

### 1.2 丁醇盐酸法

丁醇盐酸法是一种利用丙酮溶液(丙酮/水/乙醚=4.7/2.0/3.3(V/V))浸提植物组织的测定方法。它除了可测定饲料中可浸提缩合单宁含量外,还能进一步测定与蛋白质或纤维素结合的缩合单宁。这种方法能比较准确全面地评价单宁在

作者简介:唐一国,四川人,动物营养学硕士,从事饲料抗营养因子方面的研究。

基金项目:云南省科委主任基金项目的一部分(2000C0009R)

收稿日期:2003-08-08

家畜消化代谢过程中的抗营养作用。

### 1.3 香兰素法

香兰素法也是一种利用丙酮(丙酮/水=70/30(V/V))浸提植物组织的测定方法。这种方法对缩合单宁含量的测定具有较高的选择性,其成功率依赖于溶剂的类型、反应时间、光照、温度、酸浓度、香兰素浓度和参考的标准物质<sup>[4]</sup>。其主要优点在于能快速、专一地测定黄酮类化合物和二氢查耳酮类化合物的含量。由于该法对光照和温度比较敏感,所以有光时测定值会降低。由于所选择的标准物质可能并不完全代表饲料中的单宁种类,所以测定值不一定准确。当用香兰素法测定单宁含量比较低的牧草时,误差比较大。

## 2 可水解单宁含量的测定

可水解单宁可分为没食子单宁和鞣质单宁,故一般测定可水解单宁就检测这二者的含量。常用的方法有KIO<sub>3</sub>试剂法、罗丹明试剂法、Na<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>试剂法和高效液相色谱法等。

### 2.1 KIO<sub>3</sub>试剂法

1977年Bate-Smith首先介绍该法测定槭(Acer)中的可水解单宁。没食子单宁和鞣质单宁与KIO<sub>3</sub>试剂反应产生粉红色的产物。Hagerman等(1997)<sup>[5]</sup>发现,这种方法因产生颜色不同而不适合分析单宁的复杂混合物,其颜色的形成对温度和反应时间有很强的依赖性,但用黄酰单宁(pentagalloylglucose)作为标准单宁比较好。Willis和Allen(1998)<sup>[6]</sup>也对KIO<sub>3</sub>法的研究提出了改进方案。

### 2.2 罗丹明试剂法

该法主要用来测定没食子单宁的含量。该法对没食子酸具有特异性,而与没食子酰酯、鞣酸、鞣质单宁和其它酚类物质都不反应。没食子单宁的含量是在厌氧条件下通过测定单宁水解前后的没食子酸的含量来测定的。因为在自然界没食

草干草给量。

例如:计算体重600 kg成年母牛每天所需的粗饲料给量、玉米青贮给量和羊草干草给量。

首先,通过查阅ZBB 43007-86 奶牛饲养标准可得体重600 kg成年母牛(每日每头)DM、NND、CP维持需要量分别为7.52 kg、13.73 NND、559 g。然后分别计算出能满足DM、NND、CP需要量的粗饲料给量:

满足DM需要的粗饲料给量=DM维持需要量/1 kg粗

饲料 DM含量=7.52/0.356=21.2 kg;

满足NND需要的粗饲料给量=NND维持需要量/1 kg粗饲料 NND含量=13.73/0.552=24.9 kg;

满足CP需要量的粗饲料给量=CP维持需要量/1kg粗饲料 CP含量=559/23.4=23.9 kg。

由此可见,为同时满足体重600 kg成年母牛DM、NND、CP维持需要量,粗饲料给量应为25 kg,其中玉米青贮为25×80%=20 kg,羊草干草则为5 kg。■

子单宁中的单宁酸的含量是变化的,且鞣质单宁中也含有单宁酸,所以该法很难把含量测得准确。

### 2.3 NaNO<sub>2</sub> 试剂法

该法于 1972 年由 Bate-Smith 提出, Wilson 和 Hagerman (1990)<sup>[7]</sup> 作出了改进,主要用来测定鞣酸的含量, NaNO<sub>2</sub> 试剂对鞣酸具有特异性。而对缩合单宁、没食子单宁、没食子酸、和黄烷醇类均不反应。因为鞣质单宁是不可溶性的,所以该法可用于分析整个植物组织。同样,必须在厌氧条件下操作。

缩合单宁和可水解单宁的鉴定可用薄层层析法(TLC); HPLC 法;核磁共振技术(NMR)和质谱分析(MS)。

### 3 总酚类化合物含量的测定

有几种方法可以测定植物组织中总酚类化合物的含量。福林酚-乔卡梯奥法是在福林-丹尼斯法的基础上改进而来的。福林酚-乔卡梯奥法的原理是:牧草中单宁的乙醇(乙醇:水=1:4)浸提液,在碳酸盐碱性介质中,可将钨钼酸还原为深兰色络合物,通过分光光度法测定吸光度,就可确定单宁的含量。该方法被 Waterman 和 Mole 推荐用来测定总酚类化合物的含量<sup>[2]</sup>。还有福林-丹尼斯法和普鲁斯蓝法等比色方法,实际上测的都是牧草中总酚化合物的含量。尽管这些方法被广泛采用,但仍有缺陷。因为总酚类化合物中单宁的组成还不知道,也就不能使用单一准确的标准物质作为基础来进行分析。

另外,醋酸铋沉淀法也用于测定总酚类化合物。这种方法的优势是与酚的重量有关而不需要标准物质。试验表明,在干物质中总酚含量超过 15%,这种方法测定的结果就较准确。因此,这是测定总酚很有前景的一种方法,但还需要改进,特别是沉淀条件的改进。

### 4 含单宁饲料的生物学分析

单宁的生物学分析方法,即体外产气法与聚乙二醇(PEG)相结合的方法。通过该法可以了解:单宁对营养价值的影响;瘤胃微生物蛋白合成的效率。其原理是:饲料样品(0.5 g)在容量为 100 ml 标有刻度的玻璃注射器内培养,对照不加 PEG,试验组加 PEG。把加有缓冲液的瘤胃液 40 ml 注入注射器,然后放在 39℃ 的水浴中培养。然后根据产气量读数的差异来判断单宁对瘤胃发酵的生物学效果。培养过程中,PEG 能与各种单宁发生牢固的结合,形成稳定的 PEG-单宁复合物,并且 PEG 与单宁的结合能力超过蛋白质,可以破坏单宁与蛋白质的稳定结合,使蛋白质从单宁-蛋白质复合物中解离出来而得到利用。该复合物在沸水、中性和酸性洗涤剂以及其它有机溶剂中(pH 2~8.5)都不溶。Silanikove 等(1996a)<sup>[8]</sup>报道了用 <sup>14</sup>C 标记的 PEG 测定没有经过提取的植物样品中单宁的含量并建议用该方法来估测单宁对瘤胃降解的影响。

如果用 PEG 法直接测定发酵后底物的消化率,就会高估了真消化率和表观消化率。而用测定产气量的方法则显得简便而相对可靠。因为在含单宁饲料中添加了 PEG 而导致的产气量增加与用蛋白质沉淀法测得的单宁含量具有很高的相关性<sup>[9]</sup>。利用体外产气法的公式可以推算出是否含 PEG 的有机物质消化率(OMD)和代谢能(ME)值差异。例如,在一种金合欢树(*Acacia saligna*)的树叶中,OMD 在不加 PEG 的时候为 51.4%,而加 PEG 的时候可达 60.2%,这就意味着树叶中单宁的存在可以降低 OMD 达 8.8%(=60.2%-51.4%),同样降低

ME 值 1.34 MJ/kgDM。另外,根据产气量,短链脂肪酸(SCFA)也能够用方程式计算。总之,应用这种方法,根据 OMD、ME 或 SCFA 的产量降低值,就可以量化单宁对家畜的副作用。

### 5 结语

单宁在饲料中普遍存在且含量高,能对多种动物产生多种危害。现已有多种方法供选择来分析单宁的含量,但还没有统一的标准方法来测定单宁的含量,不同的研究者所用的方法不尽相同。因为单宁的类型和活性是易变的,我们只有知道单宁的活性成分以及单宁的类型之后,才可能选择出一种比较准确的分析单宁含量的方法。对现有的方法进行改进,还需要做大量的工作,同时还需要进一步地了解单宁的生物学和生物化学特性。

### 参考文献

- [1]Giner-Chavez, B., Van Soest, P.J., et al. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium [J]. *J. Sci. Food Agric.*, 1997,(74):359-368.
- [2]Waterman, P.G., Mole,S., 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [3]Mueller-Harvey, I. Analysis of hydrolysable tannins[J]. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2001,(91):3-20.
- [4]Sun,B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, L. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1998,(46):4267-4274.
- [5]Hagerman, A. E., Zhao, Y., Johnson, S. Methods for determination of condensed and hydrolysable tannins. In: Shahidi, F.(Ed.), *Antinutrients and Phytochemicals in Food*, ACS Symposium Series No. 662. American Chemical Society, pp., 1997, 209-222 (Chapter 12)
- [6]Willis, R.B., Allen, P.R.. Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate [J]. *Analyst*, 1998, (123):435-439.
- [7]Wilson, T.C., Hagerman, A.E.. Quantitative determination of ellagic acid. [J] *J. Agric. Food Chem.*, 1990,(38):1678-1683.
- [8]Silanikove, N., et al. Binding of poly(ethylene glycol) to samples of forage plants as an assay of tannins and their negative effects on ruminal degradation [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1996a, (44):3230-3234.

### Methods for Analyzing the Content of Antinutritional Factors (Tannins) in Feeds

Tang Yi-guo<sup>1</sup> Long Rui-jun<sup>2</sup> Bi Yu-fei<sup>3</sup>

(1.Sichuan General Grassland Station of Sichuan Province, Sichuan Chengdu 610041;

2.Faculty of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Gansu Lanzhou 730070;

3.College of Animal Science of Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201)

**Abstract:** According to the latest research results of tannin in animal nutrition, this review deals with the main issues relating to the analysis of condensed tannins, hydrolysable tannins and total phenols in feeds. The major aim was to provide the information for better using tannin-containing feeds.

**Key words:** condensed tannin; hydrolysable tannin; polyethylene glycol ■