

非同位素双标记法测定十二指肠、回肠食糜流量方法的研究

张乃锋, 王中华*, 李福昌, 高秀华
(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 以4只安装有永久性瘤胃瘘管、十二指肠、回肠瘘管的小尾寒羊阉公羊为试验动物。采用 Cr_2O_3 、聚乙二醇(PEG)为非同位素双标记法的食糜和食糜液相标记物, 分别对于连续饲喂条件下标记物的回收率、标记物浓度达到平衡的时间、食糜流量的稳定性及标记物的瘤胃平均滞留时间等进行了研究。结果表明: Cr_2O_3 、PEG平均回收率分别为95.75%±20.63%、91.48%±12.63%。全食糜和食糜液相中的标记物 Cr_2O_3 、PEG浓度在4d内基本达到了平衡。由标记物 Cr_2O_3 、PEG利用双标记法测定的十二指肠、回肠平均食糜流量分别为10.054 3±1.726 5 L/d和5.629 5±0.901 9 L/d, 其变异系数分别为0.171 7、0.116 0, 测定结果具有较好的稳定性和可靠性。标记物 Cr_2O_3 、PEG的瘤胃平均滞留时间分别为88、40 h。其浓度随时间的递降曲线分别为: Cr_2O_3 : $y = 0.38e^{-0.0397t}$ ($r = 0.9750$); PEG: $y = 0.367e^{-0.09812t}$ ($r = 0.8685$)。

关键词: 非同位素双标记法; 食糜流量; Cr_2O_3 ; PEG

中图分类号: S826.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)03-0225-05

测定反刍动物食糜小肠消化率需要采集十二指肠、回肠代表性食糜样品并测定两位点的食糜流量。国外多采用固液相食糜放射性同位素双标记的方法, 它是目前最灵敏的方法, 但需要放射性防护条件, 并且试验成本较高。固液相食糜双标记测定十二指肠、回肠食糜流量和体外重组获得代表性食糜样品的原理由Faichney^[1]提出, 卢德勋等^[2]对Faichney的原理进行了详细介绍, 鉴于我国多数动物营养实验室不具备进行放射性同位素双标记的条件, 提出了一种非同位素标记测量技术。该技术以 Cr_2O_3 为标记物, 是一种单标记方法, 用于测定小肠食糜流量时需要在多个时间点采样。本试验应用Faichney的原理, 选择应用较普遍、较容易取得的三氧化二铬(Cr_2O_3)、聚乙二醇4000(PEG-4000)分别作为固相和液相食糜标记物, 建立了一种非同位素双标记测定小肠食糜流量的方法。

1 材料与方法

1.1 试验动物及饲养

选择4只体况良好, 体重相近(35.3 ± 2.92 kg)

的小尾寒羊阉公羊为试验动物, 安装永久性瘤胃、十二指肠、回肠瘘管。试验羊单笼饲养, 采用自动喂料器每隔1 h 喂料1次, 自由饮水。

1.2 试验日粮

试验羊每天喂给颗粒料1.1 kg。试验羊日粮配制参照中国美利奴羊饲养标准, 即绵羊代谢能维持需要为 $470 \text{ kJ/kg W}^{0.75}$, 蛋白质维持需要为 $350 \text{ mg N/kg W}^{0.75}$ 。日粮组成和营养水平见表1。

表1 试验羊日粮配方及营养水平

Table 1 Composition and nutrient level of the experimental diet

原料 Ingredient	配比 / %	营养成分 Nutrient	营养水平 Levels / %
花生秧 Peanut Stalk	60	粗蛋白 CP	13.64
玉米 Corn	23.5	粗脂肪 EE	2.45
麦麸 Wheat bran	5	粗纤维 CF	19.26
豆粕 Soybean meal	10	灰份 Ash	5.91
食盐 Salt	0.5	钙 Ca	1.54
预混料 Premix	1	磷 P	0.16
合计 Total	100	消化能 DE/(MJ/kg)	11.08

1.3 标记物的选择

以 Cr_2O_3 为固相标记物、PEG为液相标记物。在每1.25 kg全价日粮中添加4 g Cr_2O_3 、8 g PEG,

收稿日期: 2003-07-21

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目

作者简介: 张乃锋(1974), 男, 硕士, 助研, 主要从事反刍动物营养的研究。现在中国农业科学院饲料研究所工作

* 通讯作者: E-mail: zhwang@sdau.edu.cn

混匀后制成颗粒料备用。

1.4 标记物回收率的测定

预饲期7d, 喂不含标记物的颗粒料, 正试期8d, 在第1天1次性从瘤胃瘘管投入Cr₂O₃ 4g、PEG 8g, 正试期开始收集每天的全粪样, 混匀, 取10%准确称重后于65℃烘干24h, 供测定标记物含量用。

1.5 食糜中标记物达到稳定状态的时间及食糜流量测定

预饲期10d, 喂不含标记物的颗粒料, 正试期12d, 喂含标记物的颗粒料。正试期开始每天采集瘤胃、十二指肠、回肠食糜。正试期前5d每隔4h采集瘤胃内容物50mL, 每12h采集十二指肠食糜30mL、回肠食糜15mL, 准确记录采样时间间隔。离心食糜, 分离食糜液相, 分别测定全食糜中和食糜液相中2种标记物浓度。正试期6~9d每隔12h采集十二指肠食糜30mL、回肠食糜15mL, 将食糜放入冰箱冷冻保存以备测定食糜流量。

1.6 食糜样品的预处理

将同一天的食糜样品倒入500mL烧杯中, 放置于磁力搅拌器上搅拌约3min, 待食糜充分混匀后边搅拌边用自制的取样器(将一次性塑料注射器的前端挖一孔, 要求孔的直径在吸入食糜后样品不会流出)取样, 取出一部分食糜样品放入凯氏烧瓶或三角瓶(已称重)中称重记录食糜重, 用于测定食糜中标记物Cr₂O₃、PEG的浓度; 另取一部分食糜放入离心管中2000r/min离心10min, 取上清液置于凯氏烧瓶或三角瓶称重, 用于液相标记物Cr₂O₃、PEG的测定。

1.7 样品的分析

1.7.1 Cr₂O₃分析方法 Cr₂O₃分析采用高民^[3]的方法。准确称取食糜2g或粪样0.5g倒入100mL凯氏烧瓶内, 加入10mL消化剂, 将凯氏烧瓶置于电炉上加热约20min, 待消化管中溶液呈橙黄色, 消化完毕。取下冷却, 待消化管冷却后, 将消化液转移至100mL容量瓶中, 冲洗消化管数次后, 稀释至刻度。在440nm波长下用分光光度计测定吸光度, 利用Cr₂O₃标准曲线确定样本内Cr₂O₃的含量。

Cr₂O₃标准曲线的制作: 准确称取分析纯Cr₂O₃粉末0.1g于100mL凯氏烧瓶内, 再加入消化剂10mL(溶解10g钼酸钠于150mL蒸馏水中, 慢慢加入150mL浓硫酸, 冷却后加入200mL72%高氯酸, 混合备用), 按上述方法进行消化, 定容至

200mL, 此液即为Cr₂O₃标准溶液。取该溶液1.2、3.4、5.6、7mL分别置于50mL容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 然后按上述方法测定其吸光度, 以Cr₂O₃浓度为纵坐标, 以吸光度为横坐标, 绘制标准曲线作为定量的依据。

1.7.2 聚乙二醇-4000(PEG-4000)分析方法

1.7.2.1 试剂: 阿拉伯树胶: 3mg/L, 从母液(2%阿拉伯树胶加苯甲酸0.15%)每日制备。TCA: 在10%BaCl₂中加入60%三氯乙酸, 用定量滤纸过滤。10% BaCl₂(w/v), 11.73 g BaCl₂ · 2H₂O/100 mL。5% ZnSO₄(w/v), 8.90 g ZnSO₄ · 7H₂O/100 mL。0.15 mol/L Ba(OH)₂, 称取约7g [Ba(OH)₂ · 8H₂O]投入100mL水中(预先煮沸除去CO₂), 使之饱和, 放置一昼夜后用虹吸管吸入试剂瓶, 注意保存时勿接触空气。

1.7.2.2 PEG标准液: 准确称取分析纯PEG约5g定容于200mL水中, 从中分别吸取1.2、4、6、8、12、16、20mL定容于100mL。

1.7.2.3 操作步骤: 吸取2mL PEG标准液、瘤胃液或水于50mL三角瓶中, 加入10mL水, 然后加入1mL 10% BaCl₂溶液和2mL 0.15 mol/L Ba(OH)₂, 每次加时轻轻摇动。加入2mL 5% ZnSO₄, 盖上盖, 用力震荡, 然后静止不少于10min, 用定量滤纸过滤。取3mL滤液于试管中, 加入3mL 3mg/L的阿拉伯树胶, 轻轻混合。加入3mL TCA, 将试管盖上, 反复颠倒几次, 静止100min, 在650nm波长下测定吸光度。从标准曲线中计算PEG含量。

1.8 计算和处理

1.8.1 食糜中标记物达到稳定状态的时间的判定
标记物在食糜中浓度随时间的递增曲线符合函数关系: $C(t) = Co(1 - e^{-kt})$, 当时间t的变化引起的C(t)的变化不超过误差范围时, 也即 Coe^{-kt} 的变化不超过误差范围时, 视为标记物在食糜中已经达到稳定状态。试验中食糜标记物浓度测定的有效数字为小数点后两位, 故将时间t引起的C(t)变化小于0.01视为标记物浓度达到稳定状态。即当 $Coe^{-kt} < 0.01$ 视为标记物在食糜中已经达到稳定状态。

1.8.2 食糜流量的计算 设: x = 食糜质量(D)

Y = 液体质量(F), 当从x中减去或加入y时就得到真正的食糜(TD)。

S_D, S_F, S_{TD} = 液相标记物的浓度;

P_D, P_F, P_{TD} = 固相标记物的浓度;

M_p, M_s = 固相和液相标记物的投放速度;

$$\text{则: } x \times S_D + y \times S_F = x \times P_D + y \times P_F$$

$$\text{因此, } y/x = (P_D - S_D)/(S_F - P_F) = R \quad (1)$$

其中, R 为重组系数, 即重组食糜时需要从单位食糜中加入或减去的液体的单位数量。

$$\text{则 } (S_D + R \times S_F)/(1 + R) = S_{TD} = (P_D + R \times P_F)/(1 + R) = P_{TD} \quad (2)$$

$$\text{TD 流量} = M_s / S_{TD} = M_p / P_{TD} \quad (3)$$

2 结果

2.1 标记物回收率

标记物的回收率见表 2。 Cr_2O_3 、PEG 的回收率平均值分别为 95.75% \pm 20.63%、91.48% \pm 12.63%。

表 2 标记物的回收率

Table 2 Recovery of markers

回收率	羊号 Sheep number				均值
	1	2	3	4	
Recovery	101.82	120.95	72.49	87.74	95.75 \pm 20.63
PEG	103.73	100.63	83.61	77.95	91.48 \pm 12.63

2.2 食糜中标记物达到稳定状态的时间

瘤胃内容物中 Cr_2O_3 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.53(1 - e^{-0.1071t})$, $r = 0.8357$, 达到平衡的时间为 37.07 h; 十二指肠食糜中 Cr_2O_3 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.31(1 - e^{-0.0550t})$, $r = 0.9542$, 达到平衡的时间为 62.44 h; 回肠食糜中 Cr_2O_3 浓度-

时间曲线为: $C(t) = 0.83(1 - e^{-0.0728t})$, $r = 0.9387$, 达到平衡的时间为 60.70 h。

瘤胃内容物液相中 Cr_2O_3 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.08(1 - e^{-0.43t})$, $r = 0.2828$, 达到平衡的时间为 4.84 h; 十二指肠食糜液相中 Cr_2O_3 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.03(1 - e^{-1.18t})$, $r = 0.6557$, 达到平衡的时间为 0.93 h; 回肠食糜液相中 Cr_2O_3 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.16(1 - e^{-0.034t})$, $r = 0.8099$, 达到平衡的时间为 81.57 h。

瘤胃内容物中 PEG 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.53(1 - e^{-0.095t})$, $r = 0.8022$, 达到平衡的时间为 41.73 h; 十二指肠食糜中 PEG 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.38(1 - e^{-0.1384t})$, $r = 0.7593$, 达到平衡的时间为 26.34 h; 回肠食糜中 PEG 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.88(1 - e^{-0.0639t})$, $r = 0.9569$, 达到平衡的时间为 70.00 h。

瘤胃内容物液相中 PEG 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.46(1 - e^{-0.060t})$, $r = 0.8668$, 达到平衡的时间为 63.81 h; 十二指肠食糜液相中 PEG 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.35(1 - e^{-0.0355t})$, $r = 0.9647$, 达到平衡的时间为 100 h; 回肠食糜液相中 PEG 浓度- 时间曲线为: $C(t) = 0.98(1 - e^{-0.0485t})$, $r = 0.9366$, 达到平衡的时间为 94.54 h。

2.3 食糜流量的测定

标记物在全食糜中和食糜液相中的浓度及用双标记法测得的食糜流量见表 3。可以看出食糜液相中 Cr_2O_3 的浓度远低于全食糜样品中的浓度, 而

表 3 Cr_2O_3 、PEG 双标记法测得的十二指肠、回肠食糜流量

Table 3 Duodenal and ileal digesta flow measured by the Cr_2O_3 and PEG dual-marker method

	Cr_2O_3		PEG		食糜流量/(L/d)
	食糜 Digesta	液相 Liquid	食糜 Digesta	液相 Liquid	
十二脂肪肠	1	0.3212	0.0175	0.2922	12.1026
	2	0.3106	0.0182	0.3201	10.6424
	3	0.2795	0.0079	0.3742	9.4166
	4	0.3592	0.0116	0.4339	8.0556
均值 \pm 标准差		0.3176 \pm 0.0329	0.0138 \pm 0.0049	0.3551 \pm 0.0626	0.3688 \pm 0.0597
Mean \pm SD					10.0543 \pm 1.7265
回肠	1	0.5106	0.0384	0.5456	6.5926
	2	0.8257	0.0511	0.7127	4.8048
	3	0.7548	0.0339	0.6148	5.4912
均值 \pm 标准差		0.6970 \pm 0.1653	0.0411 \pm 0.0089	0.6244 \pm 0.0840	0.9212 \pm 0.0721
Mean \pm SD					5.6295 \pm 0.9019

PEG 在食糜液相和全食糜样品中的浓度相近, 即两种标记物在食糜固液相中的分配系数差别较大。用双标记法测得的十二指肠、回肠的食糜流量分别为 $10.0543 \pm 1.7265 \text{ L/d}$ ($C.V. = 17.17\%$) , $5.6295 \pm 0.9019 \text{ L/d}$ ($C.V. = 11.60\%$) , 变异系数较小, 稳定性较好。

2.4 标记物的瘤胃平均滞留时间

停止饲喂含标记物的颗粒料后, 瘤胃食糜中 Cr_2O_3 、PEG 的浓度-时间函数分别为: $\text{Cr}_2\text{O}_3: C(t) = 0.38e^{-0.0397t}$ ($r = 0.9750$) ; PEG : $C(t) = 0.37e^{-0.0981t}$ ($r = 0.8685$) 。瘤胃稀释率分别为 0.03974 和 0.09812 , 标记物 Cr_2O_3 、PEG 的瘤胃平均滞留时间分别为 88.40h 。

3 讨论

Titgemeyer 等对食糜固相标记物 Cr_2O_3 和 TiO_2 进行的比较研究中测得 Cr_2O_3 在饲喂精料型日粮阉牛粪便的平均回收率为 98%^[4] 。Faichney 报道 Cr_2O_3 粪回收率在 91% ~ 101% 之间, 并且指出在连续饲喂时 Cr_2O_3 浓度不存在昼夜差异, 但是存在随机性的变化^[1,5,6] 。

PEG 回收率的测定结果多在 76.8% ~ 97.1% 之间。影响 PEG 回收率的主要因素是饲料种类而不是 PEG 的投入量。PEG 可吸附在饲料颗粒上, 而不同类型饲料对 PEG 的吸附能力不同。本试验测得的 PEG 平均回收率为 91.48% $\pm 12.63\%$, 变化范围为 77.95% ~ 103.73% 。

本试验瘤胃、十二指肠、回肠食糜及液相中的 Cr_2O_3 、PEG 达到稳定状态的时间在 4 d 以内。其中十二指肠全食糜中 Cr_2O_3 达到稳定状态的时间较 PEG 长, 除了试验误差以外, 可能还与 Cr_2O_3 本身的特性有关, 由于 Cr_2O_3 比重较大, 有可能在瘤网胃形成沉淀, 断续通过十二指肠, 从而造成十二指肠食糜 Cr_2O_3 不易达到稳定。PEG 作为液相标记物具有易溶于水, 随食糜流动快的特点, 因此其在十二指肠全食糜中达到稳定状态的速度较快。

Cr_2O_3 在全食糜样品中的浓度远远大于在食糜液相中的浓度($P < 0.01$), PEG 在全食糜样品中的浓度与在食糜液相中的浓度差异不显著($P > 0.05$), 2 种标记物在食糜固液相中的分配比例差别较大。

PEG 的外流速度明显大于 Cr_2O_3 外流速度, 这与 PEG 在液相中的浓度高于 Cr_2O_3 和食糜液相部分流动较快有关。

4 结论

Cr_2O_3 、PEG 回收率平均值分别为 95.75% $\pm 20.63\%$, 91.48% $\pm 12.63\%$; 在连续饲喂条件下, 瘤胃、十二指肠、回肠等处标记物 Cr_2O_3 、PEG 的浓度在 4 d 之内基本达到了稳定状态。 Cr_2O_3 主要分布于食糜固相中, PEG 则在食糜固相和液相中的分配比例相近。利用 Cr_2O_3 、PEG 双标记法测得的十二指肠、回肠的食糜流量比较稳定, 其平均食糜流量为 $10.0543 \pm 1.7265 \text{ L/d}$ 和 $5.6295 \pm 0.9019 \text{ L/d}$, 其变异系数分别为 17.17% 和 11.60% , 测定结果的可靠性较好。

参考文献:

- [1] Faichney G J. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants [A]. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant [M]. Armidale, NSW: Univ. of New England, 1975, 277~291.
- [2] 卢德勋, 谢启文. 现代反刍动物研究技术与方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1991.
- [3] 高民, 卢德勋, 胡明. 可发酵碳水化合物对纤维物质降解动力学影响的研究 [J]. 内蒙古畜牧科学, 1997(1): 5~8, 22.
- [4] Titgemeyer E C. Design and interpretation of nutrient digestion studies [J]. J Anim Sci, 1997, 75(8): 2235~2247.
- [5] Faichney G J. An assessment of chromic oxide as an indigestible marker for digestion studies in sheep [J]. J Agric Sci Camb, 1972, 79: 493~499.
- [6] Faichney G J. The effect of formaldehyde treatment of a concentrate diet on the passage of solute and particle markers through the gastrointestinal tract of sheep [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1975, 26: 319~327.
- [7] Faichney G J, Griffiths D A. Behaviour of solute and particle markers in the stomach of sheep given a concentrate diet [J]. British Journal of Nutrition, 1978, 40: 71~82.
- [8] Faichney G J, Colebrook W F. A simple technique to establish a self-retaining rumen catheter suitable for long-term infusions [J]. Research in Veterinary Science, 1979, 26: 385~386.
- [9] Faichney G J, The use of markers to measure digesta flow from the stomach of sheep fed once daily [J]. J Agric Sci Camb, 1980, 94: 313~318.

- [10] Faichney G J. Measurement in sheep of the quantity and composition of rumen digesta and of the fractional outflow rates of digesta constituents [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1980, 31: 1129 ~ 1137.

The Feasibility of Measuring Duodenal and Ileal Digesta Flow by a Non-isotopic Dual-marker Method

ZHANG Nai-feng, WANG Zhong-hua*, LI Fu-chang, GAO Xiu-hua

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Four castrated Small Tail Han ram fitted with permanent ruminal, duodenal, and ileal fistula were used to examine the feasibility of a non-isotopic dual-marker method to measure duodenal and ileal digesta flow. The sheep were fed pellet diet by automatic feeder. For measuring digesta flow, chromic oxide (Cr_2O_3) and polyethylene glycol-4000 (PEG-4000) were added in the pellet diet. Markers were directly put into the rumen through rumen fistula when measuring their recovery rate in feces. The recovery rate of chromic oxide and PEG measured in the present study was 95.75% and 91.48% respectively. The concentrations of chromic oxide and PEG in ruminal, duodenal and ileal whole digesta and fluid phases reached plateau after about 4d successive feeding of marker-containing pellets. The averages of duodenal and ileal digesta flow rates measured in present study were $10.0543 \pm 1.7265 \text{ L/d}$ and $5.6295 \pm 0.9019 \text{ L/d}$ respectively. The mean retention time of chromic oxide in the rumen was 88 hours, and the mean retention time of PEG was 40 hours.

Key words: non-isotopic dual-marker method; digesta flow rate; Cr_2O_3 ; PEG

* Corresponding author

(上接 P215)

三、参会须知

1. 会议地点: 济南舜耕国际会展中心(济南市舜耕路28号) 电 话: 0531- 2912666

2. 会议日程: 2005年5月21日- 23日(5月21日报到) 报到地点: 舜耕国际会展中心一层

3. 参会费用: 2005年4月20日前注册参会代表800元/人, 高级会员720元/人; 2005年4月20日后注册参会代表900元/人, 高级会员720元/人。

注: 1. 高级会员是指2004年6月21日以后批准并颁发中国畜牧兽医学会高级会员证的会员。申请高级会员和查询有关信息请直接登陆 www.caav.org.cn)

2. 注册时间以会务费汇出(寄出)时间为准。并请于2005年4月30日之前将参会回执寄到中国畜牧兽医学会。

3. 参会代表可同时参加中国畜牧兽医学会2005年年会, 会务费不增加。

(2) 住宿费: 自理。会议推荐酒店如下:

酒店	标准间报价	距展馆距离	星级	早餐
山东大厦	¥250元/床	600米	☆☆☆☆☆	含早
舜耕山庄	¥175元/床	毗邻会展中心	☆☆☆☆	含早
舜德大厦	¥140元/床	60米	☆☆☆	含早

为保障会议代表用房, 请于2005年4月30日之前将1天房费汇/寄到中国畜牧兽医学会, 同时提交预定房间回执。

(3) 参会联系方式:

地址: 北京朝阳区农展馆南路9号博雅园1栋106室中国畜牧兽医学会(100026)

联系人: 孙丽波 石娟 刘海霞 电话: 010- 85959006 85959010(fax) E-mail: caav@caav.org.cn

网址: www.caav.org.cn 开户名称: 中国畜牧兽医学会 开户行: 农行北京朝阳支行营业部 帐号: 041601040003564