

高效液相色谱法测定试验鸡肉中水飞蓟宾含量

侯泽桦¹,李美钰¹,孙雯可¹,谢艾伶¹,刘全瑞¹,刘鼎阔²,于晓雪^{1*},李留安^{1*}

(1.天津农学院 动物科学与动物医学学院,天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室,天津 300392;
2.鼎正新兴生物技术(天津)有限公司 天津市生物饲料添加剂企业重点实验室,天津 300383)

摘要: 为建立试验鸡肉中水飞蓟宾含量的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测方法,以乙酸乙酯为提取剂从鸡肉匀浆中提取水飞蓟宾后,采用 C18 色谱柱,在流动相为水:甲醇=47:53(体积比)、柱温 30 °C、流速 0.65 mL/min、检测波长 288 nm、进样量 20 μL 的条件下进行分离检测。结果显示,水飞蓟宾标准品浓度在 0.1~5.0 μg/mL 时线性关系良好,标准曲线方程为 $y=95.16x-0.8753$,相关系数 $R^2=0.9996$,检测试验鸡肉中水飞蓟宾的平均回收率为 88.45%~104.34%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.85%~2.94%。结果表明,该方法简单易行,精密度较高,回收率良好,可用于试验鸡肉中水飞蓟宾含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法;试验鸡肉;水飞蓟宾;含量测定;功能性食品

Determination of Silybin in Experimental Chicken by High Performance Liquid Chromatography

HOU Zehua¹, LI Xianyu¹, SUN Wenke¹, XIE Ailing¹, LIU Quanrui¹, LIU Dingkuo²,
YU Xiaoxue^{1*}, LI Liu'an^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Biological Feed Additive Enterprise, S&E Burgeoning Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300383, China)

Abstract: In order to establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of silybin in chicken used in the experiment, ethyl acetate was used as the extraction agent to extract silybin from chicken homogenate, and C18 chromatographic column was used. The separation and detection were performed under optimized conditions such as mobile phase of water: methanol = 47:53 (volume ratio), column temperature of 30 °C, flow rate of 0.65 mL/min, detection wavelength of 288 nm, and sample size of 20 μL. The results showed that the linear relationship was good when the concentration of silybin standard product was 0.1–5.0 μg/mL. The standard curve equation was $y = 95.16x - 0.8753$, and the correlation coefficient $R^2 = 0.9996$. The average recovery of silybin in the chicken was 88.45%–104.34%, and the relative standard deviation (RSD) ranged from 1.85% to 2.94%. The results showed that the method was simple and feasible. It had high precision and good recovery and could be used for the determination of silybin in chicken.

Key words: high performance liquid chromatography; experimental chicken; silybin; content determination; functional food

引文格式:

侯泽桦,李美钰,孙雯可,等. 高效液相色谱法测定试验鸡肉中水飞蓟宾含量[J]. 食品研究与开发,2024,45(5):184-188.
HOU Zehua, LI Xianyu, SUN Wenke, et al. Determination of Silybin in Experimental Chicken by High Performance Liquid Chromatography[J]. Food Research and Development, 2024, 45(5): 184-188.

基金项目:天津市科技计划项目(22YDTPJC00990、21YDTPJC00580、18ZXBFNC00310);天津市教委科研计划项目(2021KJ108);天津市“131”创新型人才团队项目(20180318)

作者简介:侯泽桦(1996—),女(汉),硕士研究生,研究方向:动物性食品生产与安全。

*通信作者:于晓雪(1990—),女(汉),副教授,博士,研究方向:畜禽营养生理生化和免疫;李留安(1979—),男(汉),教授,博士,研究方向:畜禽营养生理生化。

水飞蓟宾(silybin, SLB)是菊科植物水飞蓟果实提取物的主要生物活性物质,是天然的黄酮木质素类化合物^[1],其已有上千年的药用历史。研究表明,水飞蓟宾具有保肝、抗肿瘤、抗炎、抗代谢功能失调等多种生物活性功能^[2-3],广泛应用于医药领域。鸡肉具有低脂肪、高蛋白的特点,是国民膳食中肉类的重要组成部分。功能性食品是指具有特定营养保健功能的食品,即具有调节机体功能、不以治疗为目的的食品。功能性食品形式多种多样,如饮料、冲剂、烘焙制品等^[4],鸡肉也可作为功能性食品的一种。检测功能性食品中活性物质含量对于保证营养供给和品质检测是非常必要的。目前国内外关于水飞蓟宾含量的测定研究多集中在植物提取、医药等方面。石万银等^[5]利用高效液相色谱法测定得到水飞蓟提取物中水飞蓟宾的含量不低于20%。周旖璇等^[6]通过建立高效液相色谱法测定大鼠血浆中水飞蓟宾的含量,测得水飞蓟宾在大鼠体内的消除半衰期为(9.9±0.9)h。但目前国内外关于动物产品中水飞蓟宾含量检测方法未见报道。本研究通过在鸡基础饲料中添加水飞蓟宾,获得富含水飞蓟宾的鸡肉,并建立高效液相色谱法检测试验鸡肉中水飞蓟宾含量的方法,以期为后续开发含水飞蓟宾的功能性鸡肉及其有效含量检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验鸡肉样品:天津农学院实训基地。将135只鸡随机分为3组,每组45只。第1组为对照组,饲喂基础饲料;第2组在基础日粮中添加0.5%(质量分数)的水飞蓟宾;第3组在基础日粮中添加1%(质量分数)的水飞蓟宾。30d后每组随机抽取10只鸡进行屠宰采集鸡肉,置于-20℃备用。

水飞蓟素(纯度≥98%):陕西云奇生物科技有限公司;水飞蓟宾标准品(纯度95.7%):中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯):德国Merck公司;乙酸乙酯(分析纯):天津市风船化学试剂科技有限公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(1260):安捷伦科技有限公司;超声波清洗机(SB-100D):宁波新芝生物科技股份有限公司;旋转蒸发器(IKA RV 10):上海予申仪器有限公司;多用途涡旋混合器(VORTEX-6):海门市其林贝尔仪器制造有限公司;电子分析天平(FB223):上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件的优化

参照《中华人民共和国药典》2020版一部^[7]中水飞蓟宾含量测定方法的高效液相色谱条件进行优化。色谱柱:Agilent-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为

水:甲醇=43:57、47:53、53:47(体积比);流速:0.65、0.70 mL/min;柱温:30℃;检测波长:288 nm;进样量:20 μL。

1.3.2 标准溶液配制

标准储备液:准确称取水飞蓟宾标准品20 mg于50 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,得到400 μg/mL水飞蓟宾溶液,取400 μg/mL水飞蓟宾溶液250 μL于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀放置备用,所得水飞蓟宾标准储备液浓度为10 μg/mL。

标准工作液:依次吸取0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 mL水飞蓟宾标准储备液于10 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,得到系列浓度为0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 μg/mL的水飞蓟宾标准工作液。

1.3.3 标准曲线绘制

将配制好的0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 μg/mL的标准工作液参照1.3.1的液相色谱条件进行分析,以水飞蓟宾的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到水飞蓟宾的标准曲线线性回归方程。

1.3.4 精密度测定

用1 μg/mL的标准工作液,重复测定6次,计算精密度。

1.3.5 样品前处理

称10 g鸡肉样品剪碎置于50 mL离心管中,加入20 mL乙酸乙酯,涡旋混匀,超声30 min,以10 000 r/min离心10 min,上清液经滤纸过滤置于圆底烧瓶中,90℃旋转蒸发,2 mL甲醇复溶,经0.22 μm微孔滤膜过滤,待高效液相色谱仪检测。

1.3.6 回收率测定

精密称取10 g空白鸡肉样品9份,将浓度为0.5、1.0、2.5 μg/mL的标准工作液分别加入样品中,每个浓度3份,每份加1 mL,按1.3.5方法进行处理,测得峰面积,代入标准曲线方程,算出实际浓度,计算回收率。

1.3.7 鸡肉样品测定

按照1.3.5方法对试验鸡肉样品进行处理,按照1.3.1色谱条件进行测定。样品中的水飞蓟宾含量根据标准曲线方程进行换算。

1.4 数据处理

试验数据均以平均值±标准差表示。采用SPSS 22.0软件进行统计分析,用单因子方差分析(one-way analysis of variance, One-way ANOVA),并采用Duncan法进行多重比较,进行组间显著性分析, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

色谱基本条件的优化见表1。

表1 色谱基本条件的优化

Table 1 Optimization of basic chromatographic conditions

流动相(水:甲醇) (体积比)	流速/ (mL/min)	保留时间/min		峰分离情况
		SLB A	SLB B	
43:57	0.65	29.579	31.051	两峰重叠
47:53	0.65	33.660	35.384	分离良好
53:47	0.65	42.716	45.307	分离良好
47:53	0.70	-	-	-

注:-表示因柱压过大,检测程序终止,未获得数据。

由表1可知,有机相比比例越大,保留时间越短,在水飞蓟宾A、B两峰分离完全的前提下,当水与甲醇体积比为47:53时,保留时间最短。当流速提高到0.70 mL/min,由于柱压过大,检测程序终止。为使两峰完全分离,准确定量检测水飞蓟宾,最终选用色谱条件为水:甲醇=47:53(体积比),流速0.65 mL/min,柱温30℃,检测波长288 nm,进样量20 μL。

2.2 标准曲线

水飞蓟宾标准曲线见图1。

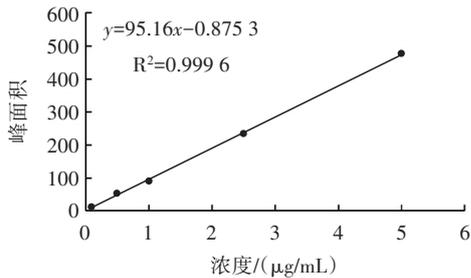


图1 水飞蓟宾标准曲线

Fig.1 Standard curve of silybin

由图1可知,水飞蓟宾标准曲线方程为 $y=95.16x-0.8753$,相关系数 $R^2=0.9996$,表明水飞蓟宾标准品浓度在0.1~5.0 μg/mL时与峰面积线性关系良好。

2.3 检出限和定量限

以峰高为3倍平均信噪比时的浓度为检出限(limit of detection, LOD),以峰高为10倍平均信噪比时的浓度为定量限(limit of quantitation, LOQ),计算得本方法的LOD和LOQ分别为0.022 μg/g和0.073 μg/g。

2.4 精密度测定

精密度试验结果见表2。

表2 精密度试验结果

Table 2 Precision test results

峰面积						相对标准 偏差/%
1	2	3	4	5	6	
106.71	100.20	99.88	98.36	99.91	101.32	2.89

由表2可知,此方法相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为2.89%,表明精密度良好。

2.5 回收率测定

样品加标回收率如表3所示。

表3 样品加标回收率

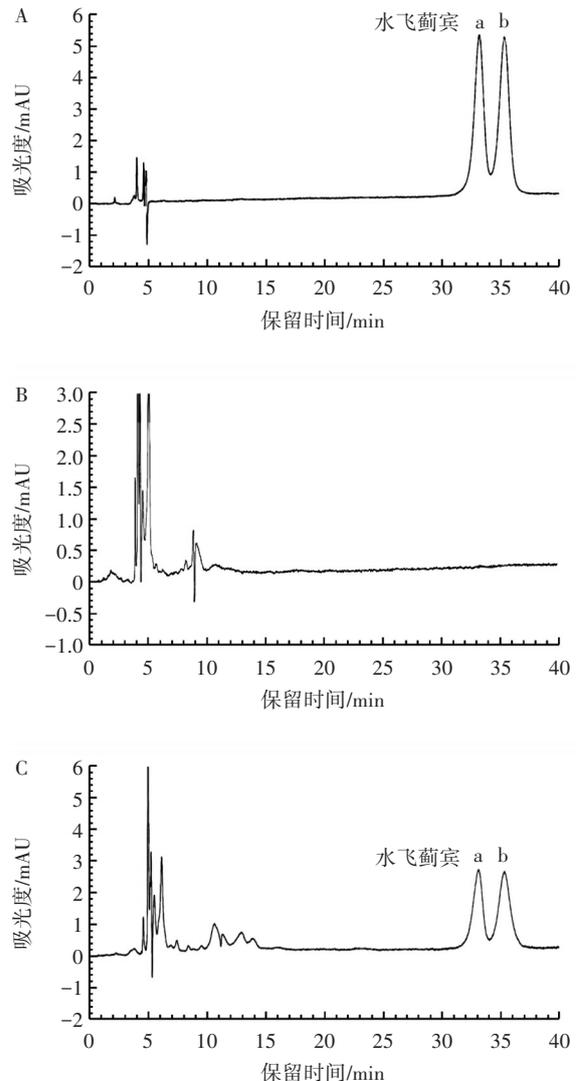
Table 3 Recovery rate of samples with added standard substance

样品号	加标量/(μg/mL)	平均回收率/%	RSD/%
1~3	0.5	88.45	2.09
4~6	1.0	103.35	2.94
7~9	2.5	104.34	1.85

由表3可知,水飞蓟宾的平均回收率在88.45%~104.34%之间,相对标准偏差最大为2.94%。该结果表明,本检测方法具有良好的回收率。

2.6 标准品和鸡肉样品色谱图

水飞蓟宾标准品和试验样品色谱图见图2。



A. 水飞蓟宾标准品; B. 对照鸡肉样品; C. 试验鸡肉样品; a、b 为水飞蓟宾的两个非对映异构体。

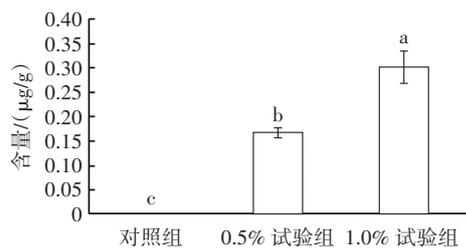
图2 标准品和样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of standard substance and sample

由图2可知,试验鸡肉中水飞蓟宾色谱峰的分离情况和峰形良好,对照鸡肉样品中无目的峰。水飞蓟宾由水飞蓟宾a和水飞蓟宾b两个非对映异构体等比例组成,为双峰。

2.7 试验鸡肉样品水飞蓟宾含量测定结果

按照1.3.5和1.3.1的方法对试验鸡肉进行前处理和测定,试验鸡肉样品水飞蓟宾含量测定结果如图3所示。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图3 高效液相色谱法检测试验鸡肉中水飞蓟宾含量

Fig.3 Determination of silybin in experimental chicken by HPLC

由图3可知,对照组鸡肉中未检测出水飞蓟宾,0.5%试验组鸡肉中水飞蓟宾平均含量为 (0.167 ± 0.010) μg/g,1.0%试验组鸡肉中水飞蓟宾平均含量为 (0.302 ± 0.033) μg/g,结果表明,在日粮中添加的水飞蓟宾能够在鸡肉中富集,且富集效果与添加比例有关,1.0%试验组含量显著高于0.5%试验组($P<0.05$)。

3 讨论与结论

水飞蓟素的护肝、抗氧化、免疫调节等多种生物活性功能,使其在保健品、医药行业中被广泛应用。自我我国养殖业全面禁抗后,水飞蓟素在畜牧业中展现出较好的应用前景。有研究表明,在饲料中添加水飞蓟素可有效促进畜禽生长,维护机体健康,有利于抵抗各种不良应激反应^[8-9]。Bendowski等^[10]研究发现,在肉鸡的饮用水中添加水飞蓟提取物可促进机体健康,提高生产性能,血清抗氧化能力更强,试验组传染性法氏囊炎发生率显著低于对照组。上述研究均为开发水飞蓟宾作为畜禽饲料添加剂提供了理论基础。此前有在鸡肉中成功富集硒元素的试验,朱梅芳等^[11]在灵山土鸡日粮中使用自主配制的红枣富硒饲料,获得了富硒鸡肉和鸡蛋,且改善了鸡肉和鸡蛋的风味。也有关于水飞蓟宾在动物内脏中分布的研究,李秋红等^[12]通过给大鼠静脉注射水飞蓟宾葡甲胺盐注射液后,以叔丁基甲醚为提取剂从大鼠心、肝、脾、肺、肾组织匀浆中均检测到了水飞蓟宾,且在体内分布的浓度大小顺序依次为肺、肝、心、肾、脾。但由于水飞蓟宾具有高度疏水性和非电离性的化学结构,导致水飞蓟宾水溶性差,口服生物利用率低^[13],推测其导致水飞蓟宾在机体内富集效

率较低。通过将水飞蓟宾制成纳米晶体,有效改善了药物在体内的吸收,提高了生物利用度^[14]。

本试验通过在鸡基础饲料中添加0.5%、1.0%的水飞蓟宾来获得试验鸡肉样品,结合水飞蓟宾易溶于有机溶剂的特性,以乙酸乙酯作为提取试剂对试验鸡肉进行预处理,建立了一种高效液相色谱测定试验鸡肉中水飞蓟宾含量的方法,在色谱条件为流动相(水:甲醇=47:53,体积比)、流速0.65 mL/min、柱温30℃时,可在饲料添加水飞蓟宾后获得的试验鸡肉中检测出水飞蓟宾,此方法操作简便、定量准确、所出色谱峰峰型良好,精密度和回收率较高,为水飞蓟宾在鸡肉中的含量测定提供了方法参考。

参考文献:

- 高诗特. 水飞蓟宾类似物的设计、合成及抗肿瘤活性研究[D]. 沈阳: 沈阳化工大学, 2022.
GAO Shite. Design, synthesis and antitumor activity of silybin analogues[D]. Shenyang: Shenyang University of Chemical Technology, 2022.
- 陈汝静, 吴云杰, 胡凯莉. 水飞蓟宾药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(2): 90-96.
CHEN Rujing, WU Yunjie, HU Kaili. Research progress on pharmacological effects of silybinin[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 55(2): 90-96.
- 张志鹏, 孟艳秋, 王赓. 水飞蓟宾及其衍生物生物活性及作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(12): 3717-3724.
ZHANG Zhipeng, MENG Yanqiu, WANG Zan. Research progress on biological activities and mechanism of silybin and their derivatives[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(12): 3717-3724.
- 钟耀广, 刘长江. 我国功能性食品存在的问题及展望[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 166-168.
ZHONG Yaoguang, LIU Changjiang. The problems and prospects of functional food in China[J]. Food Research and Development, 2009, 30(2): 166-168.
- 石万银, 李韦琴, 王道清, 等. 水飞蓟中水飞蓟宾的提取纯化工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(10): 99-105.
SHI Wanyin, LI Weiqin, WANG Daoqing, et al. Study on extraction and purification technology of silybin from silybum marianum[J]. China Food Additives, 2022, 33(10): 99-105.
- 周旖璇, 张纯刚, 尹丽, 等. 水飞蓟宾原料药、利加隆、水林佳大鼠体内药物动力学研究[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(6): 11-15.
ZHOU Yixuan, ZHANG Chungang, YIN Li, et al. Pharmacokinetics of silybin, legalon and Shuilinjin in rats[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2021, 17(6): 11-15.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典—一部: 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC) pharmacopoeia—part I: 2020 edition[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- 蔡龙, 蒋显仁, 丁宏标, 等. 水飞蓟素的生物学功能及其在畜禽生产中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(1): 27-34.
CAI Long, JIANG Xianren, DING Hongbiao, et al. Biological functions of silymarin and its application in livestock and poultry production[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2023, 59(1): 27-34.

- [9] AHMAD M, CHAND N, KHAN R U, et al. Dietary supplementation of milk thistle (*Silybum marianum*): Growth performance, oxidative stress, and immune response in natural summer stressed broilers[J]. Tropical Animal Health and Production, 2020, 52(2): 711-715.
- [10] BENDOWSKI W, MICHALCZUK M, JÓŹWIK A, et al. Using milk thistle (*Silybum marianum*) extract to improve the welfare, growth performance and meat quality of broiler chicken[J]. Animals, 2022, 12(9): 1085.
- [11] 朱梅芳, 覃建基, 彭辉才. 红枣富硒饲料对灵山土鸡肉、蛋中硒含量和风味的影响[J]. 中国饲料, 2020(13): 109-112.
ZHU Meifang, QIN Jianji, PENG Huicai. Effects of selenium rich feed on selenium content and flavor in chicken and egg of Lingshan native chickens[J]. China Feed, 2020(13): 109-112.
- [12] 李秋红, 杨柳, 吴莹, 等. 注射用水飞蓟宾葡甲胺盐在大鼠体内药动学及组织分布的研究[J]. 中医药信息, 2012, 29(2): 58-61.
LI Qiuhong, YANG Liu, WU Ying, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution in rats by injection use of silybin meglumine salt[J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2012, 29(2): 58-61.
- [13] BIJAK M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. gaertn.)-chemistry, bioavailability, and metabolism[J]. Molecules, 2017, 22(11): 1942.
- [14] 麻雪娜. 水飞蓟宾纳米晶体的制备及药动学研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2019.
MA Xuena. Study on preparation and pharmacokinetics of silybin nanocrystals[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2019.

加工编辑: 张岩蔚
收稿日期: 2023-04-03