

# 高效液相色谱法测定动物源性食品中角黄素、虾青素的研究

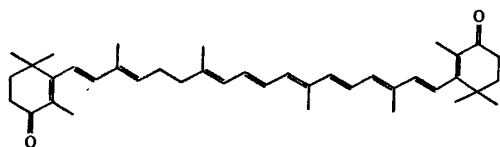
余孔捷, 钱 疆, 杨 方, 黄 杰, 李耀平, 李 捷, 蔡春平

(福建出入境检验检疫局, 福建福州, 350001)

**摘 要** 研究并建立了高效液相色谱测定动物源性食品中角黄素、虾青素的方法。采用加有抗氧化剂 BHT 的乙腈提取、正己烷脱脂制备样液。黄鱼、鳗鱼、鸡肉、鸡蛋、鸭肝、猪肾、牛奶等样品添加 0.1~1 mg/kg 的角黄素和虾青素时, 角黄素和虾青素平均回收率范围分别为 84.2%~103.1% 和 83.1%~98.7%, RSD 范围分别为 3.0%~10.5% 和 2.0%~8.9%, 测定下限 0.1 mg/kg。

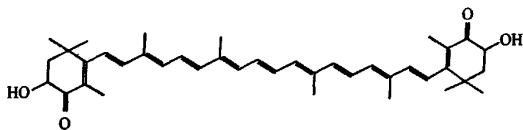
**关键词** 动物源性食品, 角黄素, 虾青素, 高效液相色谱

角黄素、虾青素属于类胡萝卜素(carotenoid)。角黄素, 又名斑蝥黄质, 英文名 canthaxanthin, 分子式  $C_{40}H_{52}O_2$ , 相对分子质量为 564.86, 结构式如下:



在饲料中添加加丽素红、露康定红, 其有效成分即是角黄素。然而, 1997 年, 欧盟食品科学委员会根据科学研究成果发表报告称, 角黄素的摄入和视网膜病变存在必然联系, 摄取大量角黄素, 可导致色素积聚于视网膜而影响视力<sup>[1]</sup>。日本于 2006 年 5 月 29 日实施的“肯定列表制度”规定: 禽蛋和猪、牛、水产品等动物源性食品中角黄素最大残留限量为 0.1 mg/kg。

虾青素, 英文名 astaxanthin, 分子式  $C_{40}H_{52}O_4$ , 分子量 596.84, 结构式如下:



在日本“肯定列表制度”中, 虾青素为豁免物质。

存在于自然界中的角黄素、虾青素大部分为全反式异构体。角黄素、虾青素进入动物体后可影响动物及禽蛋的色泽; 可有效吸收紫外线, 猝灭单线态及三线态氧, 使自由基失活。虾青素更具有优良的脂溶性自由基猝灭剂功能, 其抗氧化性比  $\beta$ -胡萝卜素高 10 倍<sup>[2]</sup>, 比  $V_E$  高 100 倍<sup>[3]</sup>。主要作为养殖动物饲料添加剂用来对动物源食品着色的虾青素、角黄素已日益

被人们关注。但由于角黄素、虾青素性质不稳定, 如对光、热、酸、碱敏感, 易被氧化等, 给动物源性食品中的角黄素、虾青素的定量提取检测增加了难度。角黄素、虾青素的测定方法主要包括分光光度法和色谱法等等, 食品中角黄素、虾青素分析因要求的检测限较低, 主要以色谱法为主。我国尚未见有系统的对肉、蛋、奶、动物内脏、水产品等动物性样品基体中角黄素、虾青素检测的研究报道, 研究动物性样品基体中角黄素、虾青素检测方法, 对于应对日本肯定列表制度, 克服技术性贸易壁垒, 保护生产者和消费者权益具有现实意义。本文研究采用高效液相色谱法对肉、蛋、奶、动物内脏、水产品等动物源性食品中角黄素、虾青素同时测定, 结果满意方法可行。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪, 配二极管阵列(DAD)或紫外-可见(UV-Vis)检测器。液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾(ESI)离子源。旋涡混合器。超声提取器。离心机, 5 000 r/min。

乙腈、正己烷: 色谱纯; 正丙醇: 分析纯; 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT): 化学纯; 无水硫酸钠: 分析纯, 650 °C 灼烧 4 h, 贮于干燥器内备用; 乙腈提取剂: 0.25 g BHT 溶解于 500 mL 色谱纯乙腈; BHT 乙腈溶液: 5 g BHT 溶解于 500 mL 色谱纯乙腈; 角黄素标准品: canthaxanthin, CAS: 514-78-3, 纯度  $\geq 90\%$ , 避光贮于 4 °C; 虾青素标准品: astaxanthin, CAS: 472-61-7, 纯度  $\geq 90\%$ , 避光贮于 -18 °C; 标准储备液: 分别准确称取适量(相当于 5.00 mg 纯品)角黄素、虾青素标准品, 加入 BHT 乙腈溶液溶解, 定容于 200 mL 棕色容量瓶, 配制浓度各为 25.0  $\mu$ g/mL 的标准储备液, 充氮气置 -18 °C 冰箱避光保存,

第一作者: 学士, 高级工程师。

收稿日期: 2007-11-27

可使用2周;混合标准工作液:分别准确移取摇匀的角黄素、虾青素标准储备液,混合,用色谱纯乙腈准确稀释成适宜浓度,即配即用。

水为GB/T 6682规定的一级水。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 提取与净化

操作应避免强光、快速进行。

(1)准确称取搅碎混匀的样品5.00 g于50 mL离心管中,加入30 mL乙腈提取剂及10 g无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 后,涡旋混合,在35℃以下超声提取10 min,再以3 000 r/min离心5 min;(2)将上清液移入预置有20 mL正己烷的125 mL分液漏斗中,振摇0.5 min后,静置分层;收集下层乙腈相,正己烷层留在分液漏斗,待本样品后续脱脂重复使用;(3)对离心管中的残留物再重复提取2次、每次加入20 mL乙腈提取剂,按上述(1)、(2)步骤,重复使用原己烷层,但不加无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ;(4)合并提取3次所收集的乙腈相,加入5 mL正丙醇,于40℃以下旋转蒸发浓缩至近干,用乙腈溶解并准确定容至5 mL,0.20  $\mu\text{m}$ 过滤,滤液待测。

### 1.2.2 高效液相色谱法测定

#### 1.2.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$ , (4.6  $\times$  250)mm或相当的色谱柱;柱温:35℃;流动相: $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=95:5$ ;流速:1 mL/min;检测波长:471 nm;进样量:50.0  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.2.2 色谱测定

根据试样中被测物的含量情况,选取响应值适宜的标准工作液进行色谱分析。标准工作液和待测样液中角黄素、虾青素的响应值应在仪器线性响应范围内。标准工作液与待测样液等体积进样。根据标准溶液色谱峰的保留时间和峰面积,对样液的色谱峰进行定性和外标法定量。反式体、顺式体应合并计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 角黄素、虾青素的稳定性

角黄素、虾青素分子中的多烯链导致其具有极大的不稳定性,对光敏感,在光照下易被破坏,很容易被空气中的氧或过氧化物氧化。如虾青素标准溶液在自然状态下2 h内浓度即明显下降。应避光低温保存,试验操作需要尽快完成且尽可能避光操作,操作过程应尽量减少氧气接触机会,控制操作温度,采用40℃下抽真空旋转蒸发浓缩,或氮吹干,不能在常压

下蒸发浓缩或空气吹干。样品提取时的超声浴温度不要超过35℃,同时采取在乙腈提取剂中添加2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)作为稳定剂。浓缩时的温度不超过40℃。

### 2.2 提取剂的选择

类胡萝卜素可溶解于大部分有机溶剂中,不溶于水(除非存在强极性基团,如类胡萝卜素硫酸盐)。角黄素、虾青素的分子结构中因含氧而相对于不含氧的类胡萝卜素具有比较强的极性,故在极性较强的有机溶剂中有较大的溶解度。文献报道的提取溶剂有丙酮、乙腈、甲醇/二氯甲烷等极性有机溶剂。经过试验,以上溶剂的提取效果均能满足要求,但用乙腈提取对动物性基体具有可减少脂肪进入提取液的优点,有利于后续净化步骤的简化以缩短检测时间。因而选择乙腈作为本方法提取剂,加无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 吸收样品中水分并提高样液极性,减少了乙腈提取液中含水量,改善了提取效果。

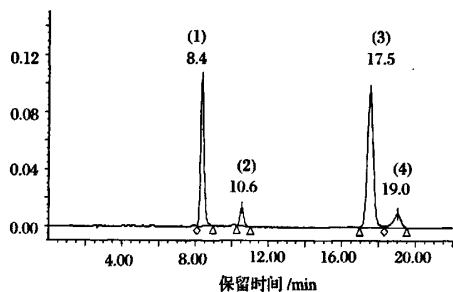
### 2.3 净化条件的选择

液-液分配和SPE小柱净化是实验室常用净化手段。本方法试验了角黄素在几种SPE小柱中过柱回收,在LC-18、氟罗里硅土、中性氧化铝、及LC-1PSA等小柱中,正己烷溶液上柱,丙酮-正己烷溶剂体系(5%~15%)洗脱,其回收率不满意。而采用正己烷脱脂,既可符合HPLC的上机检测要求,又可缩短操作时间,减少被测物在操作过程的损失,回收率满意。因而采用正己烷脱脂净化。

### 2.4 色谱分离条件

选择 $\text{C}_{18}$ 柱,柱温35℃,比较了甲醇/水体系作流动相和乙腈/水体系作流动相对皮蛋样品和咸蛋样品进行分离分析,发现分离效果优劣顺序为用乙腈/水(体积比95:5),甲醇/0.05%三氟乙酸(体积比93:7),甲醇/0.05%三氟乙酸(体积比95:5);即用乙腈/水(体积比95:5)时角黄素与干扰峰分离较好,用甲醇/0.05%三氟乙酸(体积比93:7)时分离较不好,而用甲醇/0.05%三氟乙酸(体积比95:5)时分离更不好。本方法选择乙腈/水(体积比95:5)作流动相。

在本文仪器条件下,虾青素反式、顺式异构体参考保留时间分别为8.4、10.6 min,角黄素反式、顺式异构体的参考保留时间分别为17.5、19.0 min,角黄素、虾青素标准品色谱图见图1。由图1中可见,虾青素,角黄素都有反式体、顺式体2个峰,定量时反式体、顺式体合并计算。



(1) 虾青素反式体, (2) 虾青素顺式体,  
(3) 角黄素反式体, (4) 角黄素顺式体

图 1 标准品的液相色谱图

考察了鸡肉、鸭肝、猪肾、鸡蛋、鳗鱼、黄鱼、牛奶样品基体空白与其添加(虾青素、角黄素各 0.1mg/kg)样的色谱结果,表明基体成分对 0.1 mg/kg 水平的分析目的物的分析检测没有干扰。

### 2.5 线性相关性和检测限

在本文所确定的实验条件下,以峰面积对标准工作液浓度作图,角黄素、虾青素在 0.05~5 $\mu$ g/mL 范围内呈良好线性关系,线性方程与相关系数及测定下限如表 1。

表 1 线性方程、相关系数及测定下限

	线性方程	相关系数 $r^2$	测定下限/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
角黄素	$y=226\ 655x-10\ 526$	0.998 5	0.1
虾青素	$y=206\ 175x-11\ 530$	0.997 8	0.1

### 2.6 回收率和精密度

黄鱼、鳗鱼、鸡肉、鸡蛋、鸭肝、猪肾、牛奶等样品都分别添加 0.1、0.2、0.4、1 mg/kg 的角黄素和虾青素时( $n=10$ ),角黄素和虾青素平均回收率和精密度数 RSD 见表 2。

表 2 添加浓度及回收率和精密度数  
(RSD)实验结果( $n=10$ )

基 体	添加浓度 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	角黄素		虾青素	
		平均回收 率/%	RSD/%	平均回收 率/%	RSD/%
黄鱼肌肉	0.1	90.7	8.7	95.1	8.9
	0.2	97.7	7.1	95.2	7.1
	0.4	96.1	4.7	94.8	2.0
	1.0	97.5	7.5	96.1	5.9
鳗鱼肌肉	0.1	88.7	4.2	83.2	3.9
	0.2	88.1	3.3	83.7	3.4
	0.4	85.2	4.2	88.8	6.4
	1.0	95.3	3.8	92.3	6.9
鸡肌肉	0.1	100.1	10.5	87.9	8.0
	0.2	100.0	6.2	86.6	7.9
	0.4	101.4	7.7	85.8	5.5
	1.0	103.1	3.6	83.3	3.1
鸡 蛋	0.1	95.9	4.1	94.4	5.4
	0.2	89.7	4.8	88.3	5.1
	0.4	88.6	3.2	87.8	3.5
	1.0	87.2	3.1	89.2	3.7

续表 2

基 体	添加浓度 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	角黄素		虾青素	
		平均回收 率/%	RSD/%	平均回收 率/%	RSD/%
鸭 肝	0.1	100.2	6.6	96.5	3.4
	0.2	96.5	7.2	95.4	4.5
	0.4	98.0	3.9	98.4	2.1
	1.0	100.1	3.1	98.7	3.2
猪 肾	0.1	91.5	6.3	84.2	3.1
	0.2	84.2	4.2	86.0	4.4
	0.4	86.4	4.8	83.3	6.5
	1.0	87.0	6.0	92.9	2.3
牛 奶	0.1	88.8	8.6	83.1	3.0
	0.2	92.5	6.9	83.7	3.0
	0.4	98.0	5.5	87.4	6.4
	1.0	97.5	3.0	87.0	4.0

## 3 结 论

在本文研究确定的条件下,采用加有抗氧化剂 BHT 的乙腈提取、正己烷脱脂制备样液。黄鱼、鳗鱼、鸡肉、鸡蛋、鸭肝、猪肾、牛奶等样品都分别添加 0.1~1 mg/kg 的角黄素和虾青素时,HPLC 测定角黄素和虾青素的实验结果为:平均回收率范围分别为 84.2%~103.1%和 83.1%~98.7%,RSD 范围分别为 3.0%~10.5%和 2.0%~8.9%,测定下限 0.1 mg/kg。可满足现有相关法规所要求检测的需要。

## 参 考 文 献

- 1 Opinion on Canthaxanthin scientific Committee on food-Euopean commission. <http://ec.europa.eu/fod/fs/sc/ddcomm710ut10-en.html>
- 2 Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids[J]. Pure& Appl Chem, 1991,63(1): 141~146
- 3 Tso M O, Lam T T. Method of retarding and ameliorating central rlervous system and eye damage [P]. US, 5527533, 1996
- 4 Hongxia Li, S'efene T. Tyndale, Daniel D, et al. Determination of carotenoids and all-trans-retinol in fish eggs by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2005,816: 49~56
- 5 Tolasa S, Cakli S, Ostermeyer U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid[J]. European Food Research and Technology, 2005,221:787~791
- 6 Van Vliet T, Van Schaik F, Van Schoonhoven J, et al. Determinatiaon of several retinoids, carotenoids and E vitamins by high-performance liquid chromatography. Application to plasma and tissues of rats fed a diet rich in either

- beta-carotene or canthaxanthin[J]. J Chromatogra, 1991,(553):179~186
- 7 惠伯棣..类胡萝卜素化学及生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2005.1
- 8 Analytical Methods for Residual Compositional substance of Agricultural chemicals, Feed Additives, and Veterinary Dvugsin food, Department of food Safety Ministry of Health, Labear and welfave [2006-05-26] [http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food\\_safety/positivie/List060228/dl/060526-/a.pdf](http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food_safety/positivie/List060228/dl/060526-/a.pdf)
- 9 陈勇,李德发,陆文清,等.测定水生红球藻中虾青素及其它色素含量的高效液相色谱法[J].分析测试学报,2003,22(4):28~31
- 10 陈晋明,王世平,陈敏,等.反相高效液相色谱法检测虾青素[J].化学分析计量,2006,15(2):27~29

## Determination of Canthaxanthin and Astaxanthin in Animal Origin Food by HPLC

Yu Kongjie, Qian Jiang, Yang Fang, Huang Jie,  
Li Yaoping, Li Jie, Cai Chunping

(Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

**ABSTRACT** A method had been developed to determine canthaxanthin and astaxanthin in animal origin food by high performance liquid chromatography. The canthaxanthin and astaxanthin in the test sample are extracted with acetonitrile containing BHT and defatted with hexane. In the levels of 0.1~1 mg/kg spike concentration in large yellow croaker muscle, eel muscle, chicken muscle, chicken egg, duck liver, pig kidney and milk, The spiike average recoveries of canthaxanthin and astaxanthin are in the range of 84.2~103.1% and 83.1~98.7%, respectively, and the relative standard deviation (RSD) falls in the range of 3.0~10.5% and 2.0~8.9%, respectively. The limits of detection of canthaxanthin and astaxanthin are all 0.1 mg/kg.

**Key words** animal origin food, canthaxanthin, astaxanthin, HPLC

(上接第 144 页)

## Research on Volatile Compounds of Chinese Mitten Crab

Zhang Na<sup>1</sup>, Yuan Xin Hua<sup>1</sup>, Guo Shi Dong<sup>1</sup>, Wang Li Ping<sup>2</sup>

1(The School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Key Laboratory of Ministry of Education in Food Science and Safety, Wuxi 214122, China); 2(Center of Analysis and Test of Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** In this paper, the volatile compounds of Chinese mitten crab were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry with solid phase microextraction technique. A total of 45 flavor compounds were identified, including 10 hydrocarbon compounds, 16 alcohols, 4 aldehydes, 3 ketones, 3 esters, 1 phenols, 7 nitrogen or sulphur compounds, 1 furan compounds.

**Key words** Chinese mitten crab, volatile compounds, GC-MS

信息窗

### 法国公司开发生物法生产琥珀酸和 PDO

法国启动的 BioHub 计划旨在鼓励工业生物技术开发,最近公布了 2 项开发成果。欧洲最大的淀粉和淀粉衍生物生产商——Roquette 公司与帝斯曼公司合作将生物基琥珀酸(丁二酸)推向商业化,他们计划于 2009 年底在法国 Lestrem 投运示范装置。

琥珀酸现从原油或天然气生产,两家公司将采用合作开发的发酵工艺生产生物基琥珀酸,据称这是该工艺的首次应用,它可组合利用 CO<sub>2</sub>。验证装置年生产能力将为数百吨。如验证成功,该合作伙伴将采用该技术在 2 年内建设大规模生产装置。

另一项开发成果是 Metabolic Explorer 公司已采用美国专利,利用发酵方法从粗甘油生产 1,3-丙二醇(PDO)。这也将是这项美国专利专门用于将甘油转化为高产率 PDO 的首次应用。