

杨姝丽, 吴祥庆, 黎小正, 等. 高效液相色谱法测定水产品中的斑螫黄[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 308–309.

# 高效液相色谱法测定水产品中的斑螫黄

杨姝丽, 吴祥庆, 黎小正, 吴明媛, 谢宗升, 陈 静, 秦振发, 黄鸾玉

(广西水产科学研究院/广西渔业病害防治环境监测和质量检验中心, 广西南宁 530021)

**摘要:**建立了一种高效液相色谱测定水产品中斑螫黄的方法。样品经乙腈萃取, 用乙腈和水为流动相, 用液相色谱-紫外检测器检测, 采用外标法定量。该方法检出限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 斑螫黄质量浓度在 0.02 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时线性良好, 相关系数 0.999 4; 不同浓度的加标回收率为 90.1% ~ 96.5%, 相对标准偏差 (*RSD*) 为 2.0% ~ 4.2% ( $n=6$ )。该方法简便、准确, 精密度良好, 消耗少, 适用于水产品中斑螫黄残留量的测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 斑螫黄; 水产品

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0308-02

斑螫黄 (astaxanthin) 化学名称  $\beta$ -胡萝卜素-4,4'-二酮, 亦称角黄素, 分子式为  $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{O}_2$ 。天然的斑螫黄具有抗氧化、消除自由基的作用, 在生物体内的含量甚微。随着人工合成斑螫黄的工业化, 其在饲料、食品、化工、医药等行业得到了广泛的应用<sup>[1]</sup>。然而, 近年来的研究表明, 人体吸收斑螫黄后会积累在视网膜上, 从而造成视力减退等眼疾。为此, 欧盟于 2003 年出台法规将饲料中的斑螫黄最高含量从原来的 80  $\text{mg}/\text{kg}$  降低到 25  $\text{mg}/\text{kg}$ <sup>[2]</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  $\text{mg}/\text{kg}$ 。2008 年我国农业部 1126 公告即《饲料添加剂品种目录》中规定, 斑螫黄被允许添加在家禽养殖饲料中, 而不允许在水产饲料中添加。斑螫黄重要用途之一是作为蛋黄着色剂饲喂产蛋家禽, 使蛋黄变成人们喜爱的橙红色, 但不法商贩将着色剂超量饲喂家禽现象依然存在。虽然在水产养殖中禁止使用斑螫黄, 但是由于其具有较好的着色效果, 喂养后的鱼类色泽更好、销售价格更高, 违规使用的现象较多。给水产品质量安全带来了隐患。目前, 斑螫黄的检测方法主要有色谱法<sup>[3-6]</sup>、分光光度法<sup>[7]</sup>、薄层色谱法<sup>[8]</sup>, 但主要是针对饲料或者家禽类产品。由于水产品的特殊性, 在检测技术上要求更高。本研究设立了水产品中斑螫黄的高效液相色谱测定方法, 有效消除了脂类及其他杂质对待测物的干扰, 降低了损耗, 减少了有机溶剂用量, 提高了回收率、准确度和精密度。该方法满足水产品质量安全检测的需要, 对于应对日本肯定列表制度, 克服技术性贸易壁垒, 增加出口, 保护渔民和消费者权益具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Thermo Accela PDA 液相色谱仪 (美国 Thermo 公司), 配

收稿日期: 2013-10-08

基金项目: 广西壮族自治区直属公益性科研院所基本科研项目 (编号: GXIF-2012-9)。

作者简介: 杨姝丽 (1982—), 女, 广西南宁人, 工程师, 主要从事渔业检测技术研究。E-mail: 13042606@qq.com。

通信作者: 吴祥庆, 副研究员, 主要从事渔业生态环境和水产品检测技术研究。E-mail: wuxiangqing19@163.com。

紫外检测器; 电子天平 (瑞士梅特勒公司), 感量 0.000 1 g; SK3300LH 超声仪 (上海科导仪器公司); TDD-4 离心机 (长沙非凡仪器仪表有限公司); B-490 旋转蒸发仪 (美国 BUCHI 公司)。

标准物质斑螫黄, 纯度  $\geq 98\%$ , 由德国 Dr. Ehrenstorfer 公司生产。乙腈为色谱纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。滤膜: 0.22  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 斑螫黄标准溶液配制

1.2.1 标准贮备液 准确称取斑螫黄标准物质 10  $\text{mg}$  (精确到 0.1  $\text{mg}$ ), 用乙腈溶解, 转入容量瓶定容至 100  $\text{mL}$ , 摇匀, 配成浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准贮备液, 4  $^{\circ}\text{C}$  以下避光保存, 有效期 3 个月。

1.2.2 标准中间液 准确吸取斑螫黄标准贮备液 1.0  $\text{mL}$  于 10  $\text{mL}$  容量瓶中, 用乙腈稀释定容, 摇匀, 配成浓度为 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准中间液。临用前配制。

1.2.3 标准工作溶液 在室温下, 分别取标准中间液 0、10、20、50、100、200、500、1 000  $\mu\text{L}$ , 各置 10  $\text{mL}$  容量瓶中用乙腈稀释定容, 摇匀。该标准系列浓度分别为 0、0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。临用前配制。

### 1.3 样品前处理

称取 5  $\text{g}$  均质后的水产品样品于 50  $\text{mL}$  离心管中, 加入 10  $\text{mL}$  乙腈, 超声提取 2  $\text{min}$ , 匀浆提取 30  $\text{s}$ , 以 4 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 5  $\text{min}$ 。另取一支 50  $\text{mL}$  离心管加 10  $\text{mL}$  乙腈, 洗涤匀浆刀头 10  $\text{s}$ , 洗涤液移入前一离心管中, 涡旋混合 30  $\text{s}$ , 超声提取 2  $\text{min}$ , 以 4 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 5  $\text{min}$ ; 合并上清液, 旋转蒸发至干, 用乙腈定容至 10  $\text{mL}$ , 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 待上机分析。

### 1.4 色谱分析条件

色谱柱: Hypersil GOLD  $\text{C}_{18}$  液相色谱柱 (2.1  $\text{mm} \times 100 \text{ mm}$ , 1.9  $\mu\text{m}$ ), 流动相: A 相为乙腈, B 相为水, 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 样品盘温度 15  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 检测波长: 475  $\text{nm}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准溶液色谱图

在“1.4”节规定的色谱条件下, 斑螫黄标准溶液的色谱图如图 1 所示, 浓度为 2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
0.5	90	10
3	98	2
9	98	2
9.1	90	10
11	90	10

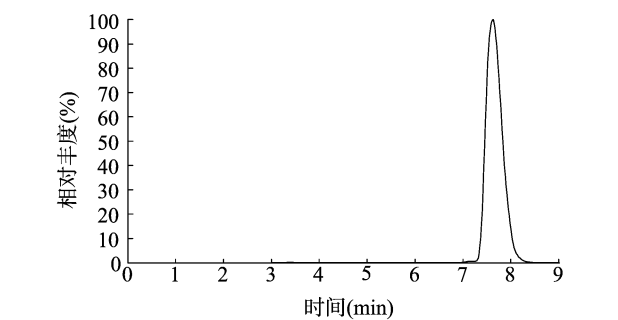


图1 斑蝥黄标准溶液液相色谱图

2.2 标准曲线绘制

分别将各浓度标准工作溶液注入到液相色谱仪中(色谱图参见图1),按“1.4”节色谱条件进行色谱分析,结果见表2。以测得的峰面积为纵坐标,以标准溶液中斑蝥黄浓度为横坐标,绘制标准曲线。斑蝥黄质量浓度在0.01~1.00 μg/mL范围时,线性方程为  $Y = -33\,714 + 4\,719\,932X$ , 相关系数0.999 4,线性良好。色谱峰的保留时间7.60 min。

表 2 斑蝥黄标准溶液质量浓度与吸收峰面积

质量浓度 (μg/mL)	峰面积
0.01	90 519
0.02	118 174
0.05	192 313
0.10	367 513
0.20	827 175
0.50	2 340 324
1.00	4 701 457

2.3 样品测定

分别将样品溶液注入到液相色谱仪中,按“1.4”节色谱条件进行色谱分析,记录色谱峰面积,从标准曲线中分别获得样品溶液中斑蝥黄的含量,采用外标法定量。

2.4 空白试验

在相同试验条件下,与试样测定的同批做空白试验,除不加试样外,其他条件相同。

2.5 结果计算与表示

2.5.1 结果计算 采用外标法定量,按下式计算样品中斑蝥黄的含量:

$$X = \frac{C \times V_2}{V_1} \times 1\,000。$$

式中:  $X$  为样品中目标物含量, μg/kg;  $C$  为试样溶液浓度, μg/mL;  $V_1$  为样品质量, g;  $V_2$  为定容体积, mL。

2.5.2 结果表示 结果保留3位有效数字并扣除空白值。

2.6 方法的准确度和精密度

进行加标回收和精密度试验,测试方法的准确度和精密度。取空白水产品5 g,分别添加3个浓度水平的斑蝥黄标准溶液,样品中斑蝥黄含量分别为10、50、100 μg/kg,按“1.3”

节至“2.3”节所述的方法进行加标回收试验,每个浓度水平重复6次,得到斑蝥黄回收率分别为90.1%、96.5%、94.7%,  $RSD$  分别为2.0%、3.5%、4.2%。准确度和精密度符合残留检测技术要求,适合水产品中斑蝥黄残留量测定。

表 3 斑蝥黄标准溶液加标回收试验

加标量 (μg/kg)	重复	测定结果 (μg/kg)	回收率 (%)
10	I	9.31	93.1
	II	9.11	91.1
	III	9.21	92.1
	IV	9.13	91.3
	V	9.05	90.5
	VI	8.27	82.7
	平均	9.01	90.1
50	I	48.5	97.0
	II	46.8	93.6
	III	48.4	96.8
	IV	49.5	99.0
	V	48.9	97.8
	VI	47.5	95.0
	平均	48.3	96.5
100	I	91.4	91.4
	II	92.9	92.9
	III	91.2	91.2
	IV	96.9	96.9
	V	99.1	99.1
	VI	96.7	96.7
	平均	94.7	94.7

2.7 方法检出限

以空白水产品为基质加标,按照3倍信噪比( $S/N \geq 3$ )估算最低检出限,本方法检测限为10 μg/kg。

3 结语

本研究采用乙腈萃取,流动相为乙腈和水,萃取率高,出峰快,峰形良好;该方法简便,准确度和精密度好,灵敏度高,检出限低,满足水产品质量安全检测分析的要求。

参考文献:

[1]汪洪涛,徐学明,金征宇. 角黄素的性质与开发应用[J]. 粮食与饲料工业,2003(6):31-32.

[2]EU. Animal Feed - Brighter Eyesight or Brighter Salmon? Commission Decides New Rules on Colouring Feed Additive[EB/OL]. (2002-01-27) [2013-09-03]. <http://www.foodlaw.rdg.ac.uk/news/eu-03009.htm>.

[3]Del Campo J A, Rodríguez H, Moreno J, et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(6): 848-854.

[4]余孔捷,钱 疆,杨 方,等. 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[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(3): 145-148.

[5]王全林,史萍萍,张书芬,等. 反相高效液相色谱法同时测定咸鸭蛋黄中的斑蝥黄和苏丹红[J]. 色谱, 2007, 25(6): 864-866.

[6]张 华,马 鑫,杨 莺,等. 固相萃取-反高效液相色谱法同时测定饲料中角黄素和虾青素[J]. 色谱, 2008, 26(3): 392-394.

[7]刘良忠,彭光华,王海滨,等. 天然红心鸭蛋中红色素的化学及光谱性质研究[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 265-268.

[8]Tolasa S, Cakli S, Ostermeyer U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid[J]. European Food Research and Technology, 2005, 221(6): 787-791.