

曲 斌,耿士伟,冯群科,等. 超高效液相色谱测定鸡饲料中的 5 种类胡萝卜素添加剂[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):273-275.

超高效液相色谱测定鸡饲料中的 5 种类胡萝卜素添加剂

曲 斌,耿士伟,冯群科,吴 玲,贡玉清,姜加华

(江苏省畜产品质量检测测试中心,江苏南京 210000)

摘要:研究并建立了鸡饲料中角黄素、虾青素等 5 种类胡萝卜素的超高效液相色谱分析法。采用乙腈提取饲料样品后,将提取液直接进行进样分析。色谱柱为 Waters BEH C₁₈ (1.7 mm, 2.1 mm × 100 mm);流动相为 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸乙腈溶液,采用梯度洗脱;检测波长 450 nm;流速 0.25 mL/min。结果表明,5 种类胡萝卜素在 50 ~ 500 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,检测限为 0.01 ~ 0.10 mg/kg,定量限为 0.03 ~ 0.40 mg/kg,回收率 80% ~ 105%,精密度小于 15%,说明超高效液相色谱分析法操作简便,适宜用于测定鸡饲料中的类胡萝卜素。

关键词:类胡萝卜素;饲料;超高效液相色谱

中图分类号: O657.7⁺²

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)09-0273-03

类胡萝卜素(carotenoids)是一类聚异戊二烯类天然色素,广泛存在于植物、动物和微生物中,其分子结构中含有大量的共轭双键,在分子链的末端具有线性或环状基团,末端基团、含氧官能团以及氢化作用的强弱不同产生了大量结构不同的类胡萝卜素,常见的有虾青素(astaxanthin)、角黄素(canthaxanthin)、 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛(β -apo-8'-carotenal)、 β -隐黄素(β -cryptoxanthin)、 β -胡萝卜素(β -carotene)等^[1]。类胡萝卜素具有抑制多不饱和脂肪酸的氧化、改善视力、提高免疫力、促进色素形成等重要的生物学功能,目前常被添加到禽类或水产动物的饲料中来改善禽蛋产品或水产品的色泽,使其具有诱人的颜色,从而提高产品的商业价值。近年来,不法商家为了谋求经济利益超量使用类胡萝卜素,使得某些产品中类胡萝卜素添加过量,而科学研究也发现,过量食用类胡萝卜素对人体具有一定的副作用,特别是其中的角黄素,因此,欧盟修正了角黄素的最大残留限量值为 15 mg/kg(除蛋鸡外的家禽肝脏)、30 mg/kg(蛋鸡蛋黄)^[2]、8 mg/kg(产蛋母鸡用饲料)^[3]。我国农业部第 1126 号公告仅规定允许角黄素、虾青素、 β -胡萝卜素等在家禽或水产动物中使用,但未明确提出饲料中的允许限量^[4]。因此,从源头控制产品质量,建立饲料中类胡萝卜素的分析测定方法具有重要意义。本研究采用高效液相色谱分析法测定三黄鸡饲料中的类胡萝卜素类色素添加剂,以期建立鸡饲料中类胡萝卜素的多种组分测定方法。

1 材料与方法

1.1 试验仪器

超高效液相色谱仪(UPLC):Waters Acquity 超高效液相色谱系统(含高压二元泵、自动进样器、柱温箱、TUV 紫外可见波长检测器、Empower2 数据处理系统);KS 501 振荡器,IKA 公司;Sigma 3K30 离心机,Sartorius 公司。

收稿日期:2013-12-04

基金项目:江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(编号:NY-062)。

作者简介:曲 斌(1979—),男,辽宁盘锦人,博士,兽医师,研究方向为兽药残留分析新技术与新方法。E-mail:qubin2000@hotmail.com。

1.2 材料与试剂

对照品:虾青素、角黄素、 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛、 β -隐黄素、 β -胡萝卜素, Sigma 公司、Dr. Ehrenstorfer 公司;色谱纯乙腈, Fisher 公司;色谱纯甲酸, Tedia 公司;分析纯乙腈, 南京化学试剂有限公司;化学纯 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT), 百灵威公司;纯净水, PTFE(30 mm × 0.45 μ m)针式过滤器, National Scientific 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 对照品溶液的配制 取适量上述 5 种对照品,精确称定后置于棕色容量瓶中,用含 1% BHT 的丙酮溶解并稀释定容,得 100 g/mL 的对照品溶液,于 -18 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.3.2 工作液的配制 取适量对照品溶液,用乙腈稀释,分别制得 50、100、150、200、250、375、500 ng/mL 的工作液。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Waters BEH C₁₈ 柱, 1.7 μ m, 2.1 mm × 100 mm;流动相 A:0.1% 甲酸水溶液;流动相 B:0.1% 甲酸乙腈溶液;梯度洗脱:0→5 min, 90% B→90% B, 5→6 min, 90% B→95% B, 6→13 min, 95% B→95% B, 13→13.5 min, 95% B→100% B, 13.5→40 min, 100% B→100% B, 40→40.5 min, 100% B→90% B, 40.5→45 min, 90% B→90% B, 流速 0.25 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L;检测波长:450 nm。

1.3.4 工作曲线 按工作液浓度由小到大依次在 UPLC 进样分析,以色谱峰面积对浓度作图,计算线性方程和回归系数。

1.3.5 样品处理 称取 5 g 鸡饲料样品,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 20 mL 乙腈,高速振荡 30 min, 5 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,经 0.45 μ m PTFE 微孔滤膜过滤至进样瓶中,UPLC 分析测定。

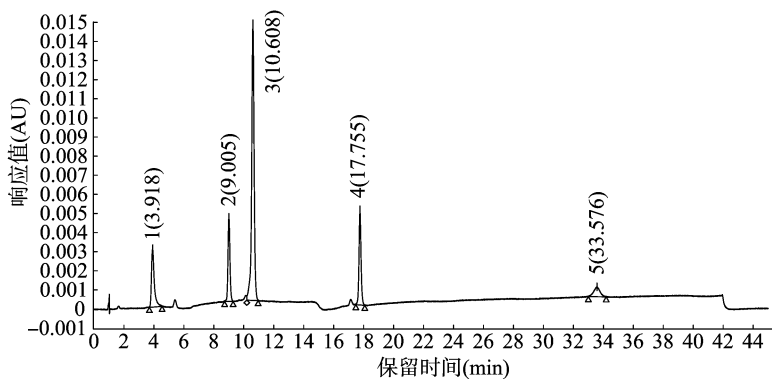
2 结果与分析

2.1 专属性分析

5 种类胡萝卜素对照品溶液的色谱图见图 1,空白饲料的色谱图见图 2,饲料中阳性添加的色谱图见图 3,某批次真实检出的饲料样品的色谱图见图 4。

2.2 标准曲线

5 种类胡萝卜素的标准曲线线性方程见表 1。



1—虾青素；2—角黄素；3— β -阿朴-8'-胡萝卜素醛；4— β -隐黄素；5— β -胡萝卜素

图1 5种类胡萝卜素对照品溶液的色谱图

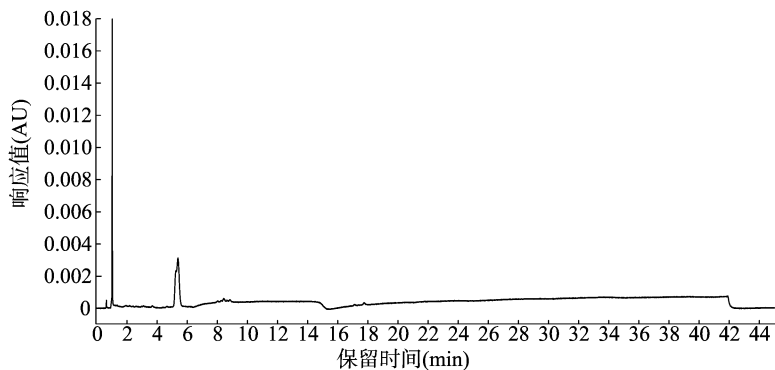


图2 空白饲料的色谱图

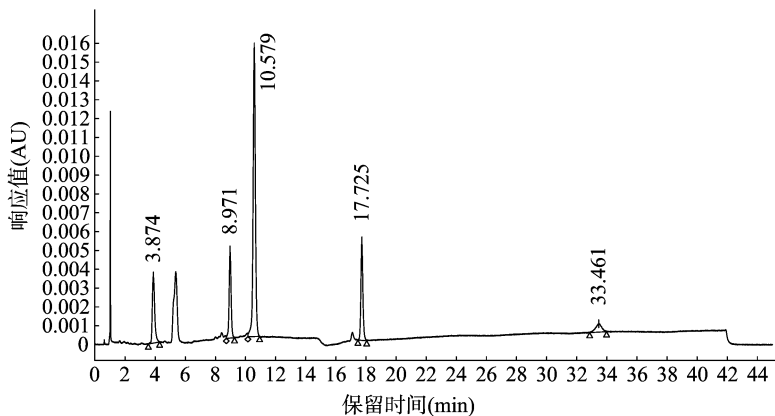


图3 饲料中阳性添加的色谱图 (添加量1.0 mg/kg)

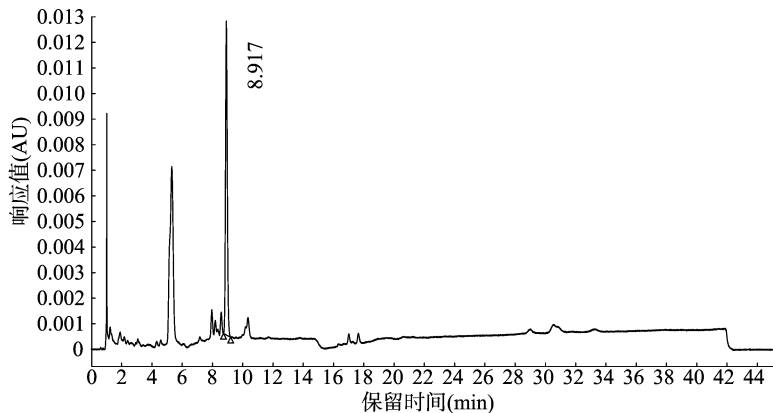


图4 某批次真实检出的饲料样品的色谱图

表 1 5 种类胡萝卜素的标准曲线

名称	线性方程	r^2
虾青素	$y = 169x - 2\ 196$	0.999 2
角黄素	$y = 161x + 338$	0.999 5
β -阿朴-8'-胡萝卜醛	$y = 669x - 826$	0.999 7
β -隐黄素	$y = 1\ 339x - 830$	0.999 3
β -胡萝卜素	$y = 65x - 2\ 446$	0.991 5

表 2 不同样品浓度的回收率与精密度测定结果

名称	回收率(%)			精密度(RSD,%)		
	0.6 mg/kg	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg	0.6 mg/kg	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg
虾青素	99.6	98.1	98.4	6.2	5.7	3.9
角黄素	104.1	103.3	102.0	7.5	5.3	3.0
β -阿朴-8'-胡萝卜醛	96.3	97.6	95.8	4.2	3.9	3.8
β -隐黄素	91.8	90.3	93.0	7.8	6.9	8.6
β -胡萝卜素	84.4	89.5	83.7	11.6	9.8	8.2

表 3 检出限与定量限

名称	检出限(mg/kg)	定量限(mg/kg)
虾青素	0.03	0.10
角黄素	0.03	0.10
β -阿朴-8'-胡萝卜醛	0.01	0.03
β -隐黄素	0.03	0.10
β -胡萝卜素	0.10	0.40

2.5 实际样品的分析

对一些鸡饲料进行抽检,发现 1 例角黄素阳性样品,其色谱图见图 4,经计算角黄素含量为 2.1 mg/kg。

3 讨论

色素是食品添加剂的重要组成部分,合理使用色素能够增强人们的食欲,但是色素种类繁多,来源复杂,目前对色素的分析检测还很有限,由于各种原因,很多色素类食品添加剂还没有检测标准。我国仅规定了饲料中着色剂的种类和使用对象,并未明确规定允许使用量,因此建立色素的含量测定方法对于进一步评估食品安全具有重要意义。类胡萝卜素种类繁多,由于类胡萝卜素的稳定性较差,多数不能通过化学合成,因此获取类胡萝卜素对照品的量有限,与外国文献报道的^[5]相比,国内学者目前尚不能获得某些类胡萝卜素的对照品及其某些异构体。

类胡萝卜素类化合物对氧及光不稳定,需要贮存于充惰性气体的遮光性容器内,因此在研究中,笔者结合相关文献^[6-7],采用 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)作为抗氧剂,以含 1% BHT 的丙酮溶液作为溶剂,同时用棕色瓶充氮气低温保存。

根据类胡萝卜素类化合物的理化性质,可选择氯仿、丙酮、乙腈等有机溶剂作为提取溶剂。其中乙腈为常用的提取溶剂,经试验表明,提取效果好,并且可以与超高效液相色谱的流动相有机结合,因此选择乙腈作为提取溶剂。

类胡萝卜素由于其结构中含有长链烯烃,在早期 HPLC 分析时期,多数研究者选择 C₃₀ 色谱柱作为分析柱^[8-9],并采用含乙酸乙酯等有机溶剂的混合有机溶剂作为流动相,分析时间较长,色谱峰较宽,检测灵敏度不高。随着超高效液相色谱(UPLC)的推出,UPLC 以其亚 2 微米颗粒填料实现了分离的超高效,同时,色谱峰尖锐、灵敏度提高,实践表明,UPLC

2.3 回收率与精密度

在 3 批不同的空白饲料中分别添加适量的对照品溶液,制得 0.6、1.0、2.0 mg/kg 的样品,分别平行测定 3 次,计算加标回收率和精密度,结果见表 2。

2.4 检测限和定量限

以信噪比大于 3 确定检测限,信噪比大于 10 确定定量限,结果见表 3。

方法使用 C₁₈ 柱可用于类胡萝卜素的分离测定^[10]。

参考文献:

[1] Scotter M J. Methods for the determination of European Union - permitted added natural colours in foods;a review[J]. Food Additives & Contaminants;Part A,2011,28(5):527-596.

[2] Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the maximum residue limits for canthaxanthin in foodstuffs coming from animals fed with canthaxanthin used as a feed additive in accordance with Council Directive 70/524/EEC[J]. The EFSA Journal,2007,5(6):507.

[3] Commission Directive 2003/7/EC of 24 January 2003. Amending the conditions for authorisation of canthaxanthin in feedingstuffs in accordance with Council Directive 70/524/EEC[J]. Official Journal of the European Communities,2003;28-30.

[4] 农业部公告第 2045 号. 饲料添加剂品种目录(2013)[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2014:90-101.

[5] Mitrowska K, Vincent U, von Holst C. Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isosbestic wavelength approach[J]. Journal of Chromatography A,2012,1233:44-53.

[6] Careri M, Elviri L, Mangia A. Liquid chromatography - electrospray mass spectrometry of β -carotene and xanthophylls: Validation of the analytical method[J]. Journal of Chromatography A,1999,854(1/2):233-244.

[7] 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.

[8] Inbaraj B S, Chien J T, Chen B H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga Chlorella pyrenoidosa [J]. Journal of Chromatography A, 2006,1102(1/2):193-199.

[9] Breithaupt D E. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives; applicability of accelerated solvent extraction[J]. Food Chemistry,2004,86(3):449-456.

[10] Rivera S M, Canela - Garayoa R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials[J]. Journal of Chromatography A, 2012,1224:1-10.