

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 3053—2019

水产品及其制品中虾青素含量的测定 高效液相色谱法

Determination of astaxanthin in fish and fishery products by high performance
liquid chromatography method

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会加工分技术委员会(SAC/TC 156/SC 3)归口。

本标准起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、辽渔南极磷虾科技发展有限公司、山东鲁华海洋生物科技有限公司。

本标准主要起草人：孙伟红、邢丽红、王联珠、冷凯良、丛心缘、刘冬梅、范宁宁、付树林、李兆新、李风玲、郭莹莹、朱文嘉、彭吉星。



水产品及其制品中虾青素含量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了水产品及其制品中虾青素含量的高效液相色谱测定方法的原理、使用的试剂及仪器、测定步骤、结果计算方法、方法灵敏度、准确度和精密度。

本标准适用于鱼类、甲壳类及虾粉、磷虾油等制品中虾青素含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 30891 水产品抽样规范

3 原理

样品中待测物采用丙酮或二氯甲烷-甲醇混合溶液提取,经碱皂化,使其中的虾青素酯转化成游离态的虾青素,液相色谱分离,紫外检测器测定,外标法定量。

4 试剂

- 4.1 除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。
- 4.2 丙酮(CH_3COCH_3):色谱纯。
- 4.3 二氯甲烷(CH_2Cl_2):色谱纯。
- 4.4 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 4.5 叔丁基甲醚[$\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$]:色谱纯。
- 4.6 磷酸(H_3PO_4):优级纯。
- 4.7 氢氧化钠(NaOH):优级纯。
- 4.8 2, 6-二叔丁基对甲酚($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$):化学纯。
- 4.9 碘(I_2)。
- 4.10 硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.11 无水碳酸钠(Na_2CO_3)。
- 4.12 无水硫酸镁(MgSO_4): 650°C 灼烧 4 h,在干燥器内冷却至室温,储于密封瓶中备用。
- 4.13 1%磷酸溶液(V/V):量取 10 mL 磷酸和 990 mL 水,混匀后备用。
- 4.14 二氯甲烷-甲醇溶液:量取 250 mL 二氯甲烷和 750 mL 甲醇,加入 0.5 g 2, 6-二叔丁基对甲酚,混匀后备用。
- 4.15 0.02 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液:称取 0.4 g 氢氧化钠,用甲醇溶解并稀释至 500 mL,混匀后备用。
- 4.16 0.6 mol/L 磷酸甲醇溶液(V/V):量取磷酸 600 μL ,用甲醇稀释至 10 mL。
- 4.17 0.01 g/mL 碘-二氯甲烷溶液:称取 0.1 g 碘,用二氯甲烷溶解并稀释至 10 mL,混匀后备用。
- 4.18 0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液:称取 1.3 g 硫代硫酸钠,加入 0.01 g 无水碳酸钠,溶于 50 mL 水中,缓缓煮沸 10 min,冷却后备用。
- 4.19 全反式虾青素标准品:纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.20 全反式虾青素标准储备溶液:准确称取全反式虾青素标准品约 10 mg,用丙酮溶解并定容于 500

mL 容量瓶中,此溶液浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充氮密封,置于 -18°C 冰箱中避光保存,有效期 1 个月。

4.21 虾青素几何异构体的制备:准确吸取全反式虾青素标准储备液(4.20)适量,用丙酮稀释配成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,移取 2 mL 标准溶液于 10 mL 具塞试管中,加入 3 mL 二氯甲烷,混匀,加入 50 μL 0.01 g/mL 碘-二氯甲烷溶液(4.17),充分涡旋,密封置于自然光下反应 15 min,然后加入 1 mL 0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液(4.18)充分振荡以脱除多余的碘后,静置分层取下相,氮气吹干后加入 1 mL 丙酮溶解,现用现配。

4.22 N-丙基乙二胺(PSA)填料:粒径 40 $\mu\text{m}\sim 60 \mu\text{m}$ 。

5 仪器

5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。

5.2 分析天平:感量 0.01 g。

5.3 分析天平:感量 0.000 1 g。

5.4 分析天平:感量 0.000 01 g。

5.5 超声波清洗仪。

5.6 离心机:转速 8 000 r/min。

5.7 涡旋混合器。

5.8 氮吹仪。

6 测定步骤

6.1 试样制备

取代表性试样,按 GB/T 30891 的规定执行。

6.2 提取

6.2.1 鱼类、甲壳类

称取试样 2 g(准确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 4 g 无水 MgSO_4 ,再加入 10 mL 丙酮,充分涡旋, 15°C 以下超声波提取 15 min,8 000 r/min 离心 5 min,收集上清液于 50 mL 离心管中,残渣中加入 10 mL 丙酮重复以上过程,合并提取液,混匀。

6.2.2 虾粉

称取试样 1 g \sim 2 g(准确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 丙酮, 15°C 以下超声波提取 15 min,8 000 r/min 离心 5 min,收集上清液于 50 mL 离心管中,残渣中加入 10 mL 丙酮重复以上过程,合并提取液,混匀。

6.2.3 磷虾油

称取磷虾油 0.2 g \sim 0.5 g(准确到 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 二氯甲烷-甲醇溶液(4.14),涡旋混匀, 15°C 以下超声波提取 20 min,8 000 r/min 离心 5 min。

注:虾青素含量高于 100 mg/kg 的南极磷虾油的称样量不大于 0.2g。

6.3 皂化和净化

准确移取 2 mL 样品提取液于 10 mL 具塞试管中,加入 2.9 mL 0.02 mol/L NaOH 甲醇溶液(4.15),涡旋混合,充氮密封,在 $4^{\circ}\text{C}\sim 5^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反应过夜 12 h \sim 16 h。然后在试样溶液中加入 0.1 mL 0.6 mol/L 磷酸甲醇溶液(4.16)中和剩余的碱,再加入 100 mg PSA 填料,涡旋混合,静置 5 min,过 0.2 μm 微孔滤膜后,待测。

6.4 测定

6.4.1 色谱条件

- 色谱柱: C_{30} 色谱柱,250 mm \times 4.6 mm,5 μm ,或相当者;
- 柱温: 25°C ;

- c) 流速:1.0 mL/min。
 d) 检测波长:474 nm。
 e) 流动相:A为甲醇,B为叔丁基甲基醚,C为1%磷酸溶液;梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间, min	A, %	B, %	C, %
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
30	81	15	4
35	81	15	4

6.4.2 标准曲线绘制

准确移取适量全反式虾青素标准储备溶液(4.20)用试样定容溶剂稀释成浓度分别为0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL的标准工作液,现用现配。

6.4.3 液相色谱测定

6.4.3.1 定性方法

分别注入20 μL全反式虾青素标准工作液(6.4.2)、虾青素几何异构体(4.21)和试样溶液(6.3),按6.4.1列出的色谱条件进行液相色谱分析测定,根据虾青素几何异构体色谱图中13-顺式虾青素、全反式虾青素和9-顺式虾青素3种虾青素同分异构体组分的保留时间定性。色谱图参见附录A。

6.4.3.2 定量方法

根据试样溶液中虾青素的含量情况,选定峰面积相近的全反式虾青素的标准工作液单点定量或多点校准定量,试样测定结果以3种虾青素同分异构体的总和计,外标法定量,同时标准工作液和样液的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。

7 结果计算

试样中虾青素的含量(X)按式(1)计算,保留3位有效数字。

$$X = \frac{(1.3 \times A_{13\text{-cis}} + A_{\text{trans}} + 1.1 \times A_{9\text{-cis}}) \times C_s \times V}{A_s \times m} \times f \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X ——样品中虾青素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
 1.3 ——13-顺式虾青素对全反式虾青素的校正因子;
 $A_{13\text{-cis}}$ ——试样溶液中13-顺式虾青素的峰面积;
 A_{trans} ——试样溶液中全反式虾青素的峰面积;
 1.1 ——9-顺式虾青素对全反式虾青素的校正因子;
 $A_{9\text{-cis}}$ ——试样溶液中9-顺式虾青素的峰面积;
 C_s ——标准工作液中全反式虾青素的含量,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V ——试样溶液体积,单位为毫升(mL);
 A_s ——全反式虾青素标准工作液的峰面积;
 m ——样品质量,单位为克(g);
 f ——稀释倍数。

8 方法定量限、回收率和精密度

8.1 定量限

鱼类、甲壳类中虾青素的定量限为2.5 mg/kg,虾粉中虾青素的定量限为5 mg/kg,磷虾油中虾青素

的定量限为 10 mg/kg。

8.2 回收率

本方法添加浓度为 2.5 mg/kg~100 mg/kg 时,回收率为 90%~110%。

8.3 精密度

本方法的批内变异系数 $\leq 10\%$,批间变异系数 $\leq 10\%$ 。



附录 A
(资料性附录)
色谱图

A.1 异构化的标准溶液色谱图

见图 A.1。

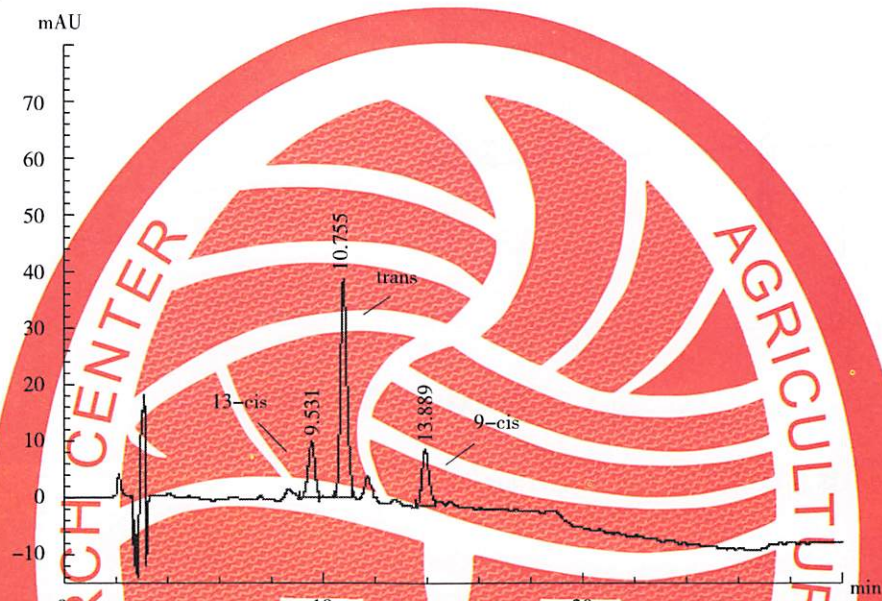


图 A.1 异构化的虾青素标准溶液色谱图

A.2 全反式虾青素标准溶液色谱图(1 $\mu\text{g/mL}$)

见图 A.2。

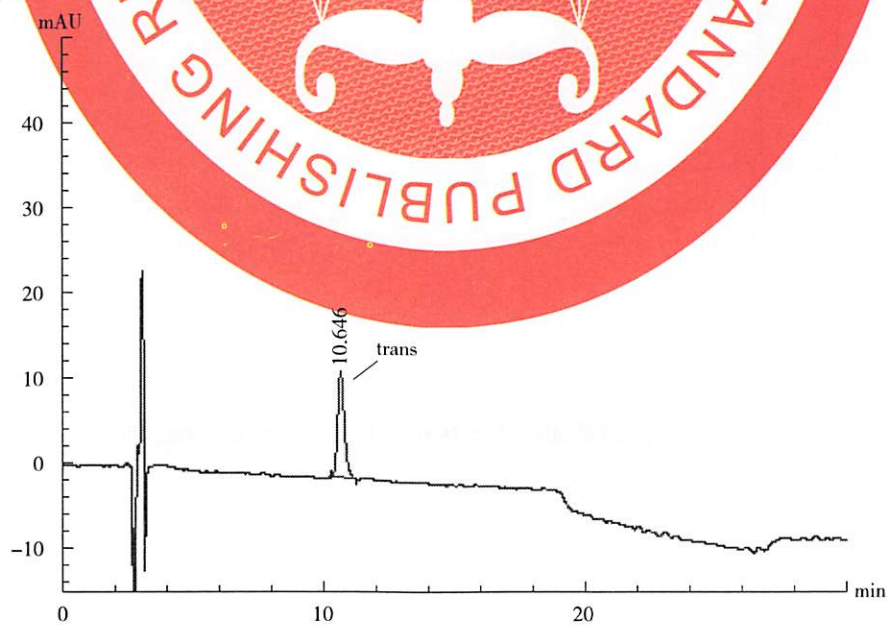


图 A.2 全反式虾青素标准溶液色谱图(1 $\mu\text{g/mL}$)

A.3 南极磷虾样品色谱图

见图 A.3。

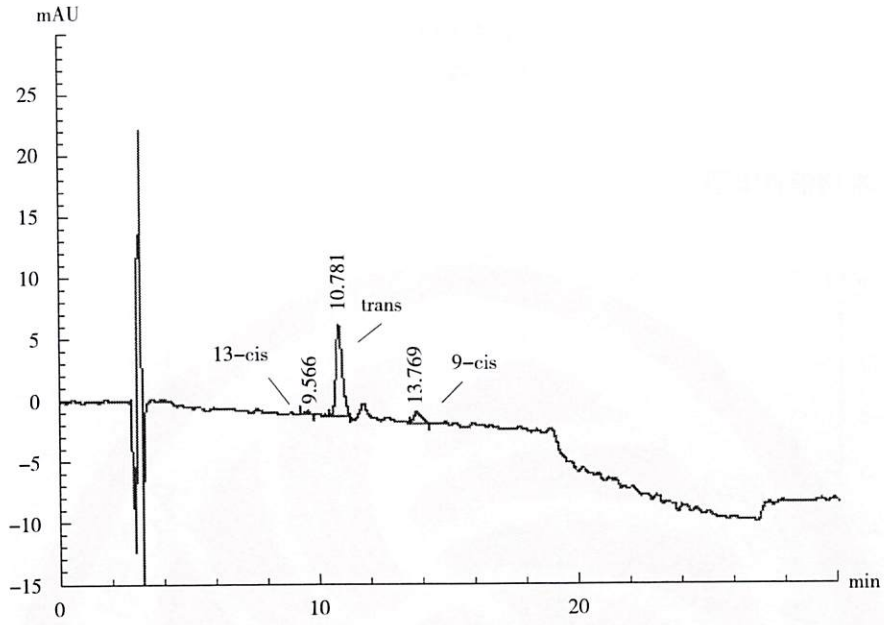


图 A.3 南极磷虾样品色谱图

A.4 南极磷虾加标样品色谱图(添加水平 2.5 mg/kg)

见图 A.4。

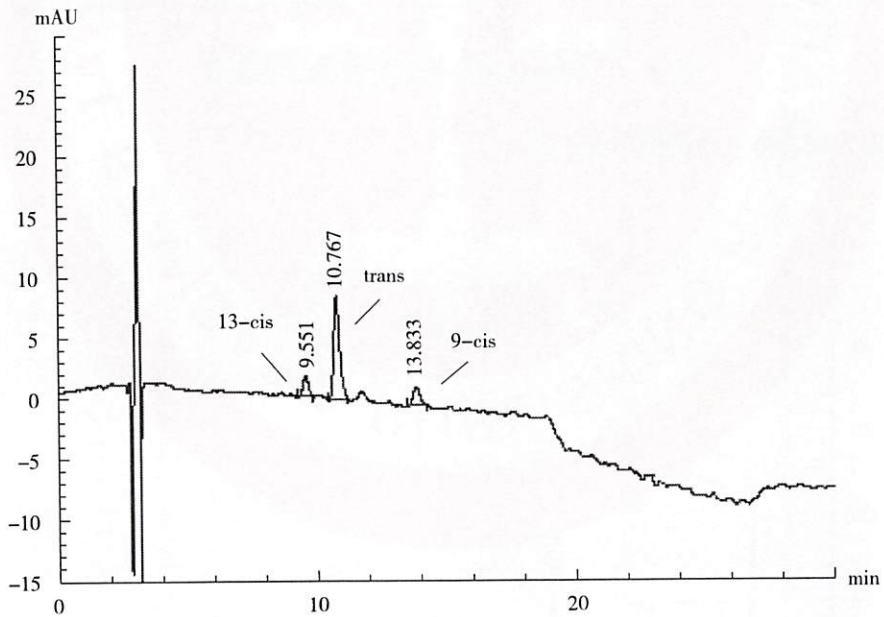


图 A.4 南极磷虾加标样品色谱图(添加水平 2.5 mg/kg)

A.5 南极磷虾粉样品色谱图

见图 A.5。

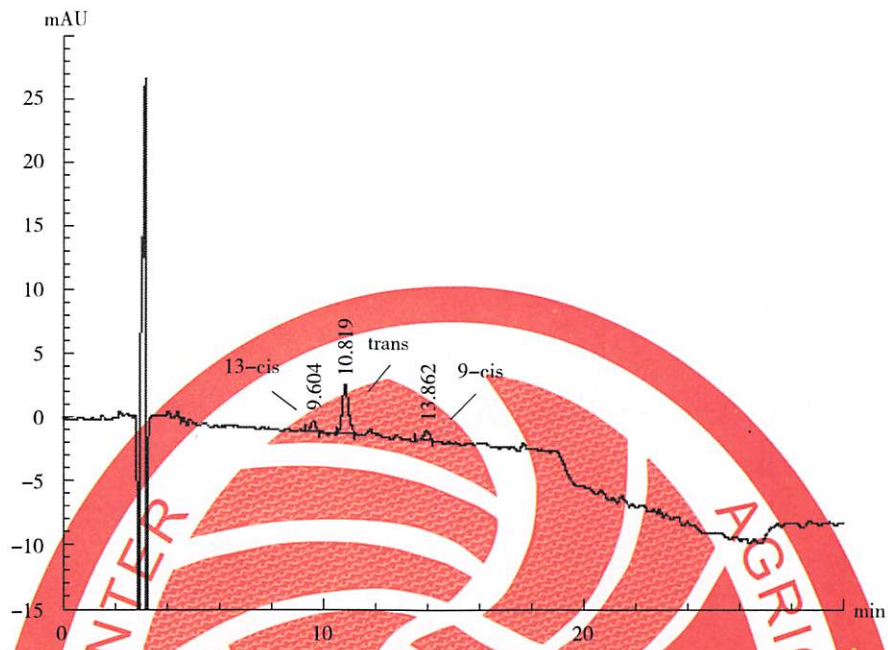


图 A.5 南极磷虾粉样品色谱图

A.6 南极磷虾粉加标样品色谱图(添加水平 5 mg/kg)

见图 A.6。

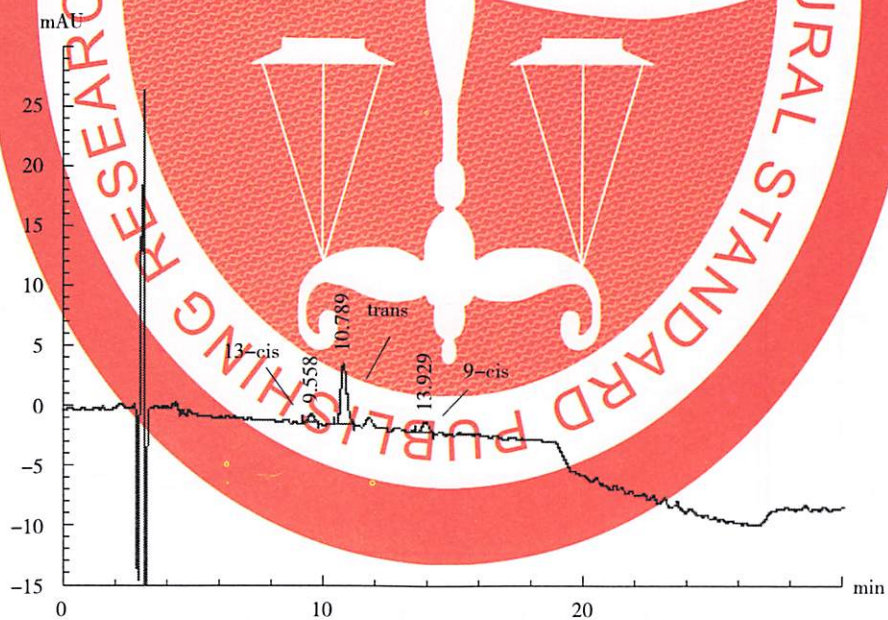


图 A.6 南极磷虾粉加标样品色谱图(添加水平 5 mg/kg)

A.7 南极磷虾油样品色谱图

见图 A.7。

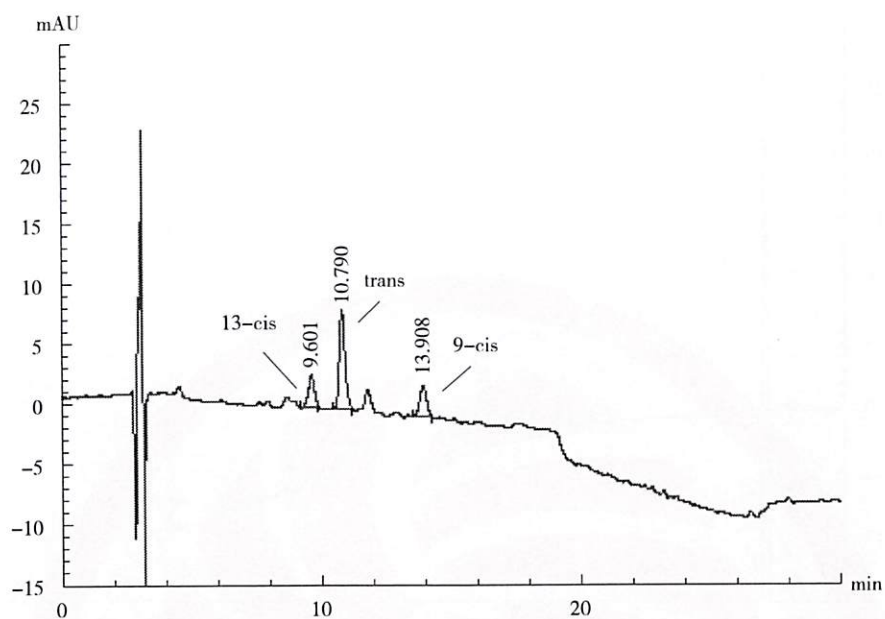


图 A.7 南极磷虾油样品色谱图

A.8 南极磷虾油加标样品色谱图(添加水平 10 mg/kg)

见图 A.8。

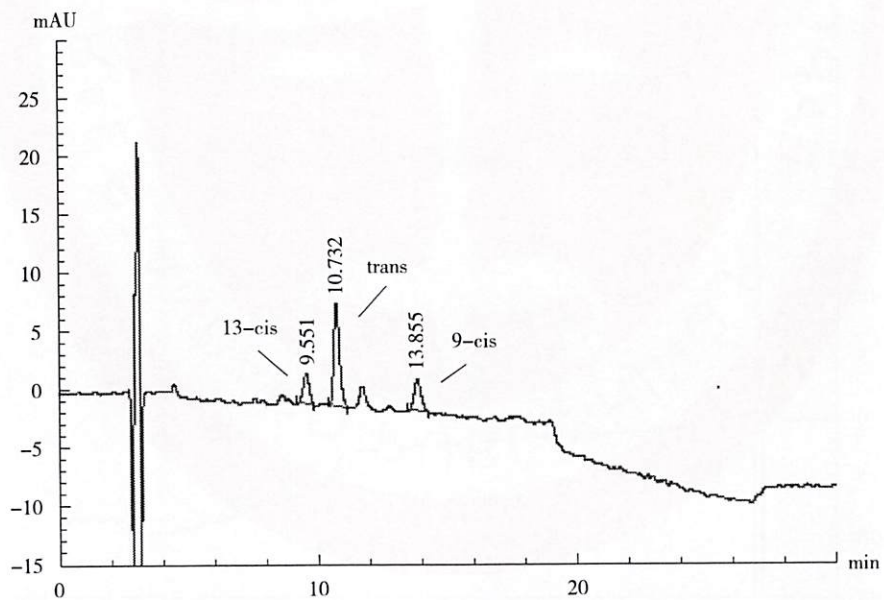


图 A.8 南极磷虾油加标样品色谱图(添加水平 10 mg/kg)



中华人民共和国
水产行业标准
水产品及其制品中虾青素含量的测定
高效液相色谱法
SC/T 3053—2019

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

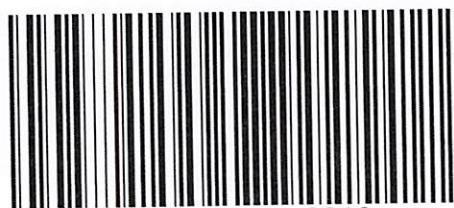
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2019年10月第1版 2019年10月北京第1次印刷

书号: 16109·4957

定价: 24.00 元



SC/T 3053—2019

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261