

高效液相色谱法快速鉴别人工合成虾青素 养殖的三文鱼

牟志春¹, 张明², 张艺兵¹, 管恩平¹, 吕朋¹, 冷凯良³, 段小娟¹, 刘琳¹, 郑诗翔¹

(1. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002; 2. 青岛出入境检验检疫局, 山东 青岛 266001;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 建立了虾青素手性异构体分离和检测的 HPLC 方法。条件: 采用手性固定相色谱柱; Pirkle *L*-亮氨酸 (4.6mm × 25cm, 5 μm); 流动相: 正己烷-四氢呋喃-异丙醇-三乙胺(77:17:3:3, *V/V*); 紫外检测波长: 474nm; 流速: 0.75ml/min。本法可应用于快速鉴别养殖三文鱼是否使用了人工合成虾青素, 并可以初步判断是否为野生三文鱼。

关键词: 虾青素; 手性异构体; 三文鱼; 高效液相色谱(HPLC)

Rapid Identification of Salmon Aquacultured with Synthetic Astaxanthin through High Performance Liquid Chromatography

MU Zhi-chun¹, ZHANG Ming², ZHANG Yi-bing¹, GUAN En-ping¹, LÜ Peng¹, LENG Kai-liang³, DUAN Xiao-juan¹, LIU Lin¹, ZHENG Shi-xiang¹

(1. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;

2. Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China;

3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to identify salmon aquacultured with synthetic astaxanthin through determining relative ratio of chiral isomers of astaxanthin in salmon. Astaxanthin was extracted from flesh of salmon, passed through a Sep-Pak silica gel column for purification, and then analyzed by HPLC. The chromatographic conditions were Pirkle covalent *L*-leucine column (4.6 mm × 25 cm, 5 μm) as the stationary phase, hexane-tetrahydrofuran-2-propanol-triethylamine (77:17:3:3, *V/V*) as mobile phase with flow rate of 0.75 ml/min, and detection wavelength at 474 nm. Distribution of chiral isomers of astaxanthin in wild salmon and salmon fed with natural feedstuff was similar. However, it revealed a significant difference in salmon fed with synthetic astaxanthin.

Key words: astaxanthin; chiral isomer; salmon; HPLC

中图分类号: TS254.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)22-0318-03

虾青素为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-, 1'-胡萝卜素, 是一种酮式类胡萝卜素, 分子式为 C₄₀H₅₂O₄。虾青素对鱼类的生长繁殖有很重要的作用, 尤其是鲑鱼、鲟鱼食用了含有虾青素的饲料后, 虾青素积累在其皮肤和肌肉中呈红色, 这种鱼富含营养、色泽鲜艳, 口味好, 经济价值高。目前虾青素的主要来源有两方面: 一是生物合成途径, 如从水产品废弃物中提取、利用藻类和酵母生产, 也就是类似野生三文鱼获得虾青素食物链, 但是该途径产量有限、成本较高; 二是通过人

工化学合成途径, 可以大量生产, 饲料成本也就比较低。二者之间的主要区别是人工化学合成的虾青素存在大量的内消旋光学异构体。因此, 通过测定三文鱼肉中虾青素的各种异构体的相对含量, 可以很容易地鉴别其是否为使用人工合成虾青素饲料添加剂养殖的三文鱼。

本研究采用手性固定相进一步优化检测条件^[2], 旨在建立快速、简便、准确的 HPLC 分析测定虾青素光学异构体的方法, 并将其应用于野生三文鱼和养殖三文鱼的鉴别。

收稿日期: 2008-12-05

作者简介: 牟志春(1961-), 男, 高级工程师, 主要从事色谱分析和食品理化检验研究。E-mail: muzhichun2000@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

野生三文鱼 智利产, 经青岛口岸进口; 人工养殖三文鱼(已确认该鱼在饲养中使用了人工合成虾青素) 青岛地区水产养殖厂。

人工合成虾青素对照品(纯度 98%) Sigma 公司; Sep-Pak Vac 硅胶小柱(6ml) Waters 公司; 丙酮(HPLC 级) Tedia 公司; 正己烷、四氢呋喃(均为 HPLC 级) Burdick & Jackson 公司; 异丙醇(HPLC 级) Caledon 公司; 三乙胺(纯度 99.5%) Fluka 化学公司; 二氯甲烷(分析纯) 国药集团化学试剂公司。

1200 型四元泵高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器、Chemstation 化学工作站) Agilent 公司; T25 型均质器、MS1 涡旋振荡器 IKA 公司; GS-6 离心机 Beckman 公司; 固相提取仪; R110 旋转蒸发仪 布奇公司; AG245 天平 赛多利斯(北京)公司。

1.2 方法

1.2.1 人工合成虾青素对照品溶液的制备

精确称取人工合成虾青素对照品 100mg, 加少量 CH_2Cl_2 溶解后, 用丙酮稀释定容 100ml, 配成浓度为 1.0mg/ml 的对照品溶液。

1.3 样品处理

称取三文鱼肉 5g, 转移到一个 50ml 的离心管中, 用 10ml 丙酮和 10ml 正己烷均质 2min, 3000r/min 离心混合物 5min, 移取上层正己烷溶液入心型瓶中。丙酮层和样品残渣留在离心管中, 添加 10ml 正己烷入上述离心管中, 涡旋振荡 1min, 3000r/min 离心混合物 5min, 移取上层正己烷溶液合并入心型瓶中, 并用旋转蒸发器除去正己烷, 用 10ml 二氯甲烷溶解残留物, 涡旋振荡后, 加入 1g 无水硫酸钠脱水。

用正己烷预先进行活化处理的 Sep-Pak 硅胶小柱, 将经过干燥处理的二氯甲烷提取物加到小柱上, 进行虾青素的纯化, 用 20ml 二氯甲烷分二次涮洗心型瓶, 涮洗液用来洗脱小柱除去提出物中的脂肪, 用丙酮从小柱上洗脱虾青素, 收集丙酮洗脱液, N_2 吹除去丙酮, 残留物溶于二氯甲烷中, 过 $4.5\mu\text{m}$ 滤膜后, 并取一定体积的溶液注入高效液相色谱仪分离测定。

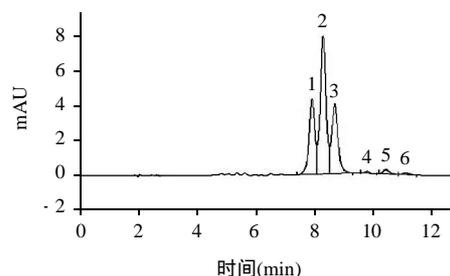
1.4 色谱条件

色谱柱: Pirkle *L*-亮氨酸($4.6\text{mm} \times 25\text{cm}$, $5\mu\text{m}$); 流动相: 正己烷-四氢呋喃-异丙醇-三乙胺(77:17:3:3, *V/V*); 紫外检测波长: 474nm; 流速: 0.75ml/min; 进样量: $20\mu\text{l}$ 。

2 结果与分析

2.1 人工合成虾青素对照样品的色谱行为

按 1.4 节的色谱条件进行人工合成虾青素对照品溶液的 HPLC 色谱分离实验, 得到其色谱图见图 1。人工合成虾青素对照品首先被分离成全反式空间异构体(7~9min)和全顺式空间异构体(9~11min)两部分; 前后两部分又分别被分离成左旋异构体(3*S*,3'*S*)、右旋异构体(3*R*,3'*R*)和内消旋异构体。

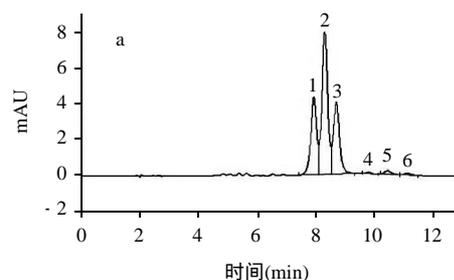


色谱峰: 1.全反式左旋异构体; 2.全反式内消旋异构体; 3.全反式右旋异构体; 4.全顺式左旋异构体; 5.全顺式内消旋异构体; 6.全顺式右旋异构体。下同。

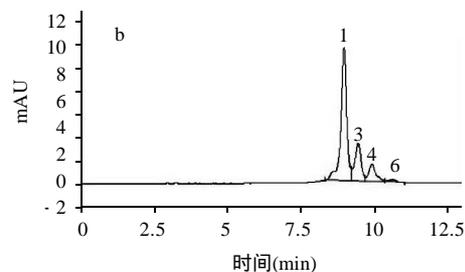
图1 人工合成虾青素对照品的 HPLC 色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatogram of synthetic astaxanthin

2.2 野生三文鱼与人工饲养三文鱼虾青素的光学异构体组成



a. 人工合成虾青素饲养



b. 野生

图2 三文鱼中虾青素的 HPLC 色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatogram of astaxanthin in salmon fed with synthetic astaxanthin and wild salmon

按 1.3 节样品处理、1.4 节色谱条件分别对样品中提取虾青素的溶液进行 HPLC 色谱分离实验, 得到其色谱图见图 2。图 2a 为使用了合成虾青素饲料添加剂的人工

养殖三文鱼提取液的色谱图, 各异构体的含量分布与人工合成虾青素对照品基本一致; 图 2b 为野生三文鱼提取液的色谱图。后一个色谱图中基本见不到合成虾青素中占主要成分的内消旋异构体, 二种外消旋异构体中, 主要成分(含量 > 80%)为左旋异构体(3*S*,3'*S*), 右旋异构体(3*R*,3'*R*)也比较低, 占不到总量的五分之一; 空间异构体之间比较情况看, 全顺式空间异构体中的二种外消旋异构体(3*S*,3'*S*和3*R*,3'*R*)之间的比例与全反式中空间异构体中外消旋异构体(3*S*,3'*S*和3*R*,3'*R*)的比例基本一致。

没有使用合成虾青素饲料添加剂而使用天然生物原料, 如虾、蟹壳等作为饲料添加剂养殖的三文鱼, 其提取液的色谱图与野生三文鱼提取液的色谱图基本一致。

2.3 检测波长的选择

经紫外扫描, 虾青素对照品溶液的各种异构体的紫外光谱图显示其在 474 nm 波长处有最大吸收, 采用 474 nm 作为检测波长, 可获得高灵敏度, 良好的峰形, 故选择此波长进行检测。

2.4 色谱柱的选择

与文献[3-7]报道的结果一致, 本实验也曾采用反相色谱柱对三文鱼肉中的虾青素进行检测, 结果是只能检测虾青素总的含量, 无法对其中的手性异构体进行分离。本研究采用 Pirkle *L*-亮氨酸色谱柱, 在对虾青素中顺、反异构体进行有效分离的同时, 对其中的手性异构体进行分离。在虾青素的二种外消旋光学异构体之间可以得到完全分离, 但由于内消旋光学异构体的色谱峰出峰时间处于两种外消旋光学异构体的色谱峰之间, 没有对手性异构体做到完全分离。对于区分被检测对象的三文鱼中是否使用了合成虾青素饲料添加剂的目的, 分离效果完全可以满足要求。

2.5 流动相的选择

由于本研究采用 Pirkle *L*-亮氨酸色谱柱为正相色谱柱, 被分离物质的保留时间对流动相的极性极其敏感, 在分析过程中流动相和样品中微量的水分被色谱柱中的固定相吸附, 失去对弱极性物质的吸附作用, 保留时间缩短、分离效果下降, 因此在分析过程中要尽量消除水分等极性成分进入色谱分离系统。

2.6 样品采集方式的选择

三文鱼肉中的筋膜会影响到样品的均质过程, 常常缠绕在超声均质器的刀头上难以去除, 为此, 将三文鱼整块肌肉剖下后, 平放于案板上, 采用不锈钢小勺轻轻刮削样品, 单纯的肌肉就很容易地与筋膜、皮及

骨刺分离开来。

2.7 样品处理与净化方式的选择

本研究采用文献[2]中描述的方法, 首先用正己烷均质三文鱼样品, 以去除其中的脂肪, 在实验中发现均质操作非常困难, 直接采用丙酮均质样品则容易得多。原因可能是疏水性使得正己烷难以分散到样品中; 相反, 亲水性使得丙酮很容易分散到样品中, 用丙酮均质含水量多的样品就容易些。但是, 如果直接采用丙酮均质样品, 在对均质后的样品离心分离丙酮后, 可以看到大量的虾青素附着在离心管的管壁上。为此, 采用 1.3 节的方式进行样品的均质处理, 用等量的丙酮和正己烷进行样品的均质处理后, 通过离心完成虾青素液-液分配提取。这样引入有机相的水分也相应地减少了, 可以简化液-液分配的操作步骤。

实验发现, 用氯仿根本无法洗脱吸附在 Sep-Pak Vac 硅胶小柱上的虾青素, 因此本研究采用极性更大的溶剂——丙酮作为 Sep-Pak Vac 硅胶小柱上的虾青素洗脱液。

3 结论

本研究建立了三文鱼虾青素的样品处理及其手性异构体分离和 HPLC 检测方法, 具体操作条件为: 采用手性固定相色谱柱; Pirkle *L*-亮氨酸(4.6 mm × 25 cm, 5 μm); 流动相: 正己烷-四氢呋喃-异丙醇-三乙胺(77:17:3:3, *V/V/V*); 紫外检测波长: 474 nm; 流速: 0.75 ml/min。该方法可以应用于快速鉴别养殖三文鱼是否使用人工合成虾青素, 也可以初步判断是否为野生的三文鱼。

参考文献:

- [1] 谢虹, 张惠碧, 何国平, 等. 高效液相色谱法测定虾青素的含量[J]. 粮食与饲料工业, 2003(1): 46-47.
- [2] TURUJMAN S A, WAMER W G, WEI R R. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin[J]. J AOAC International, 1997, 80(3): 622-632.
- [3] 陈晋明, 王世平, 陈敏. 反相高效液相色谱法测定虾青素[J]. 化学分析计量, 2006, 15(2): 27-29.
- [4] 惠伯棣, 裴凌鹏, 李京. 食品中虾青素的 C₁₈-HPLC-PAD 分离与鉴定[J]. 食品工业科技, 2006, 27(8): 169-171.
- [5] 裴凌鹏, 惠伯棣, 刘蕊, 等. C₃₀-HPLC-PAD 分离与鉴定虾青素类化合物初探[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 323-326.
- [6] 张玉珍, 刘喆. 高效液相色谱法测定虾青素的含量[J]. 中国食品添加剂, 2007, 27(5): 151-152.
- [7] 应国清, 王晓艳, 沈寅初. 高效液相色谱法分析检测虾青素[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 43-44.