

中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—201×

虾青素旋光异构体含量的测定 液相色谱法

Determination of astaxanthin opticalisomers content—
Liquid chromatography

201×-××-×× 发布

201×-××-×× 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国科学院烟台海岸带研究所、中国科学院海洋研究所、中国标准化研究院、山东省标准化研究院、云南龙布瑞生物科技有限公司、福建师范大学福清分校、中国科学院过程工程研究所。

本标准主要起草人：刘建国、秦松、苏芳、韩春梅、梁文伟、崔玉琳、马爱进、陈军、王寅初、黄永东。

虾青素旋光异构体含量的测定

液相色谱法

1 范围

本标准规定了用液相色谱法测定虾青素中旋光异构体含量的方法。
本标准适用于虾青素产品中虾青素旋光异构体含量的测定。

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

3 原理

试样经研磨、浸提其中的虾青素后，胆固醇酯酶酶解处理成为游离虾青素，经手性色谱柱分离后，用配有紫外检测器的液相色谱仪测定，外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1 水

应符合 GB/T 6682 中的二级水规定。

4.2 乙腈

色谱纯。

4.3 胆固醇酯酶

酶活力 ≥ 10 U/mg。

4.4 甲基叔丁基醚

色谱纯。

4.5 石油醚

沸点 60℃～90℃。

4.6 左旋虾青素

纯度 $\geq 96\%$ 。

4.7 右旋虾青素

纯度≥96%。

4.8 外消旋虾青素

纯度≥96%。

4.9 左旋虾青素标准工作溶液

准确称取左旋虾青素标准品约 1.0 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,1 mL 二氯甲烷溶解,然后用乙腈定容至 10 mL,充氮密封,置-20℃冰箱中避光保存,有效期一个月。

4.10 右旋虾青素标准工作溶液

准确称取右旋虾青素标准品约 1.0 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,1 mL 二氯甲烷溶解,然后用乙腈定容至 10 mL,充氮密封,置-20℃冰箱中避光保存,用于定性,有效期一个月。

4.11 外消旋虾青素标准工作溶液

准确称取外消旋虾青素标准品约 1.0 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,1 mL 二氯甲烷溶解,然后用乙腈定容至 10 mL,置于-20℃冰箱中避光保存,用于定性,有效期一个月。

4.12 0.5 mol/L 盐酸溶液

量取 4.2 mL 浓盐酸,缓缓加到 100 mL 去离子水中。

4.13 0.05 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,pH 7

准确称取 1.211 4 g 三羟甲基氨基甲烷,用约 150 mL 去离子水溶解,使用 0.5 mol/L 的盐酸调节 pH 至 7.0,然后用水定容至 200 mL。

4.14 4 U/mL 胆固醇酯酶工作溶液

500U 的胆固醇酯酶用 125 mL 的 0.05 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,pH=7,溶解混匀后分装至 2 mL 小玻璃瓶内,-20℃保存,有效期一个月。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。

5.2 分析天平:感量 0.000 1 g。

5.3 冷冻离心机。

5.4 超声波清洗机。

5.5 恒温水浴锅。

5.6 玻璃匀浆器:20 mL。

6 测定步骤

6.1 提取

6.1.1 对于虾青素含量≥500 mg/kg 的样品可直接按照以下步骤提取,而对于小于该浓度的样品需适

当增加取样量或对提取液进一步浓缩。

6.1.2 固体试样:称取 50.0 mg~100.0 mg 置于干燥的 20 mL 玻璃匀浆器中,加入 2 mL 丙酮,充分研磨使样品破碎完全,转移至 10 mL 离心管中,用 5 mL 丙酮溶液分 3 次清洗玻璃匀浆器,合并提取液,5 ℃下 3 800 r/min 离心 5 min,将上清液转移至 50 mL 容量瓶中,离心管中加入 2 mL 丙酮溶液。重复上述步骤 3 次以上,直至提取后的渣呈灰白色,上清液清澈,合并上清液,用丙酮溶液定容至 50 mL,待测。

6.1.3 液相油剂试样:取样前,先将试样置于 50 ℃水浴锅中水浴加热,直到试样性状不再黏稠且状态均匀,以少量试样 30 min 水浴为宜,然后根据试样中虾青素的含量,称取 30.0 mg~50.0 mg 均匀试样至 100 mL 容量瓶中,加入丙酮溶液定容至 100 mL,过 0.45 μm 尼龙滤膜,滤液待测。

6.1.4 液相水剂试样:取样前,重复混匀后过 0.45 μm 尼龙滤膜,取 10 mL 滤液,用丙酮稀释至 50 mL,混匀待测。

6.2 酶解

用移液管准确移取 1.0 mL 待测滤液于 25 mL 具塞刻度试管中,加入 2 mL 丙酮及 2 mL 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,加盖混匀后,于 37 ℃水浴锅中保温 2 min 后取出,加入 1 mL 胆固醇酯酶工作溶液震荡均匀后,在 37 ℃水浴锅中保温反应 60 min(期间每 10 min 震荡数秒)。酶解后取出,加入 2.0 mL 石油醚和 1 g 十水硫酸钠后加盖剧烈震荡数秒,然后避光冰水浴中静置,溶液出现明显分层,色素被转移至上层石油醚中,用移液管小心地将石油醚层转移至干净的容量瓶中,再加入 2 mL 石油醚至原具塞玻璃刻度试管中,加盖震荡数秒后静置分层,收集上层石油醚色素层,重复多次,直至所有的色素全部转移至容量瓶中。在低温避光环境中使用氮气将试管中的石油醚吹干,用 1.0 mL 乙腈溶解容量瓶中的色素,得到的试样溶液于-20 ℃避光保存待测。

6.3 测定

6.3.1 色谱条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:三(3,5-二氯苯基氨基甲酸酯)纤维素手性柱,4.6 mm×250 mm,5 μm,或相当者;
- b) 柱温:25 ℃;
- c) 紫外检测器:检测波长 470 nm;
- d) 进样量:20 μL;
- e) 流速:1.0 mL/min;
- f) 流动相:甲基叔丁基醚+乙腈=35+65。

6.3.2 定性方法

分别注入 20 μL 适当浓度的左旋虾青素的标准品溶液,外消旋虾青素标准工作溶液,右旋虾青素的标准品溶液及试样溶液,进行液相色谱分析测定,根据标准品溶液色谱中的虾青素旋光同分异构体的保留时间定性。标准品色谱图参见附录 A。

6.3.3 定量方法

根据试样溶液中虾青素的含量情况,选择峰面积相近的左旋虾青素标准品溶液单点定量或多点校准定量。试样测定结果以实际存在的旋光异构体的含量计,外标法定量,同时标准品溶液和试样溶液的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。

7 结果计算

按式(1)进行计算：

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_s \times V \times 10^{-3}}{A_s \times m} \times f \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- w_i ——样品中目标虾青素旋光异构体的含量，%；
- A_i ——试样溶液中目标虾青素旋光异构体的峰面积；
- ρ_s ——左旋虾青素旋光异构体标准溶液中虾青素的含量，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；
- V ——试样溶液体积，单位为毫升(mL)；
- A_s ——左旋虾青素旋光异构体标准溶液的峰面积；
- m ——样品质量，单位为毫克(mg)；
- f ——稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

8 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

9 定量限

本方法的定量限为 500 mg/kg 。

附录 A
(资料性附录)
虾青素旋光异构体色谱图

虾青素旋光同分异构体标准品色谱图见图 A.1。

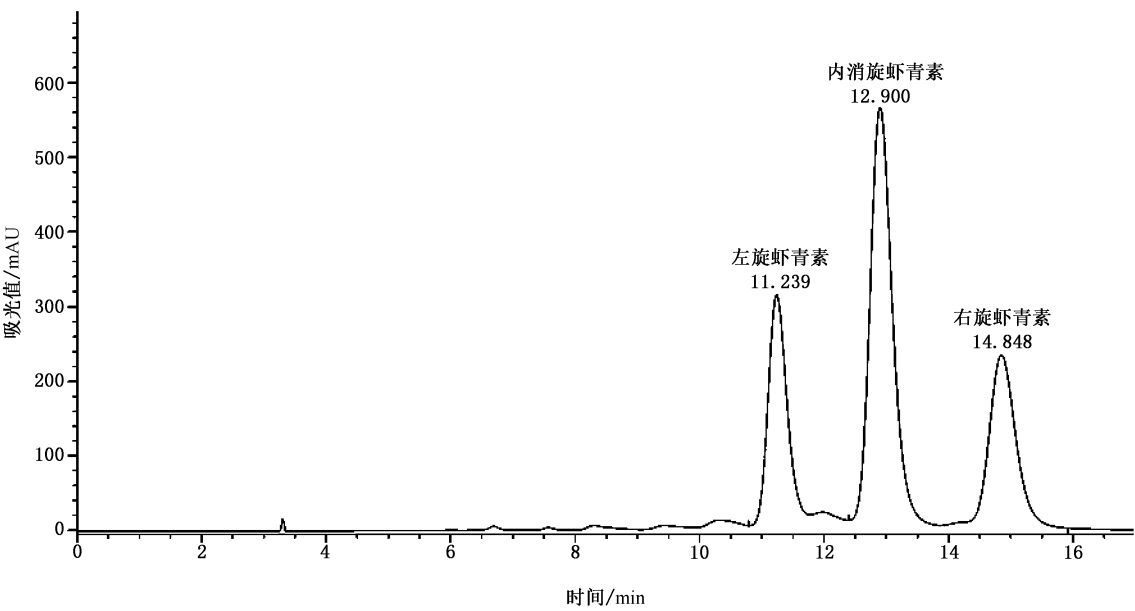


图 A.1 虾青素旋光同分异构体标准品色谱图