



中华人民共和国国家标准

GB/T 31520—2015

红球藻中虾青素的测定 液相色谱法

Determination of astaxanthin in *Haematococcus* —
High performance liquid chromatography method

2015-05-15 发布

2015-05-15 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
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。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会(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、云南爱尔发生物技术有限公司。

本标准主要起草人:孙伟红、张勇、冷凯良、徐春媚、刘建国、吴秋瑾、邢丽红、苗均魁、肖荣辉、孙来娣、翟毓秀、许洋。

红球藻中虾青素的测定

液相色谱法

1 范围

本标准规定了红球藻(*Haematococcus*)中虾青素的液相色谱测定方法。

本标准适用于雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)藻粉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

3 原理

试样经二氯甲烷与甲醇混合溶液提取,氢氧化钠甲醇溶液皂化,使其中的虾青素酯转化成游离态的虾青素,经 C_{30} 反相液相色谱柱分离后,用配有紫外检测器的液相色谱仪测定,外标法定量。

4 试剂

所用试剂除另有规定外均为色谱纯。

4.1 试验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

4.2 丙酮。

4.3 磷酸:优级纯。

4.4 氢氧化钠:优级纯。

4.5 甲醇。

4.6 二氯甲烷。

4.7 叔丁基甲基醚。

4.8 2,6-二叔丁基对甲酚:化学纯。

4.9 1%磷酸溶液(体积分数):量取 10 mL 磷酸(4.3)和 990 mL 水,混匀后备用。

4.10 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(4.8),混匀后备用。

4.11 0.1 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液:称取 0.4 g 氢氧化钠(4.4),用甲醇溶解并稀释至 100 mL,混匀后备用。

4.12 2%磷酸-甲醇溶液(体积分数):量取 2 mL 磷酸(4.3)和 98 mL 甲醇,混匀后备用。

4.13 全反式虾青素、13-顺虾青素、9-顺虾青素标准品:纯度 $\geq 95\%$ 。

4.14 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 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存,有效期 1 个月。

4.15 13-顺虾青素标准储备溶液:准确称取 13-顺虾青素标准品约 1 mg,用丙酮溶解并定容于 50 mL 容量瓶中,此溶液浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充氮密封,置 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存,有效期 1 个月。

4.16 9-顺虾青素标准储备溶液:准确称取 9-顺虾青素标准品约 1 mg,用丙酮溶解并定容于 50 mL 容量瓶中,此溶液浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充氮密封,置 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存,有效期 1 个月。

4.17 全反式虾青素标准工作溶液:准确移取适量全反式虾青素标准储备溶液(4.14)用丙酮稀释成浓度分别为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液,现配现用。

4.18 13-顺虾青素标准工作溶液:准确移取 13-顺虾青素标准储备溶液(4.15),用丙酮配制成适当浓度的标准工作液,用于定性,现配现用。

4.19 9-顺虾青素标准工作溶液:准确移取 9-顺虾青素标准储备溶液(4.16),用丙酮配制成适当浓度的标准工作液,用于定性,现配现用。

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 0.000 01 g、0.000 1 g 各一台。

5.3 超声波清洗机。

5.4 冷冻离心机:8 000 r/min。

5.5 旋涡混合器。

5.6 氮吹仪。

5.7 具塞聚丙烯离心管:50 mL。

5.8 棕色容量瓶:50 mL。

5.9 棕色比色管:10 mL。

5.10 玻璃匀浆器:10 mL。

6 测定步骤

6.1 提取

准确称取雨生红球藻粉 50 mg~100 mg(精确到 0.1 mg),置于干燥的玻璃匀浆器中,加入 1 mL 二氯甲烷-甲醇溶液(4.10)充分研磨使细胞壁破碎完全,转移至 50 mL 离心管中,用 10 mL 二氯甲烷-甲醇溶液(4.10)分 3 次清洗玻璃匀浆器,合并提取液。超声提取 5 min, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 8 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至 50 mL 容量瓶中,离心管中再加入 10 mL 二氯甲烷-甲醇溶液(4.10),重复上述步骤 3 次以上,直到提取后的藻渣为白色,合并上清液,用二氯甲烷-甲醇溶液(4.10)定容至 50 mL,然后静置 15 min。准确移取 5 mL 上清液于另一 50 mL 容量瓶中,用二氯甲烷-甲醇溶液(4.10)稀释并定容,备用。

注:虾青素含量高于 2% 的雨生红球藻粉的称样量不大于 50 mg。

6.2 皂化

从上述容量瓶中准确移取 5 mL 溶液于 10 mL 比色管中,加入 0.7 mL 氢氧化钠-甲醇溶液(4.11),涡旋混合,充氮密封,在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反应过夜 12 h~14 h。然后在反应液中加入 0.4 mL 2% 磷酸-甲醇溶液(4.12)中和剩余的碱,混匀,在氮气吹扫下定容至 5 mL,过 0.45 μm 滤膜,滤液作为试样溶液。

注:若试样溶液的色谱图中,在 20 min~30 min 的出峰处存在杂峰,将加碱量提高一倍后重新取提取液皂化。

6.3 测定

6.3.1 色谱条件

6.3.1.1 色谱柱: C₃₀ 色谱柱, 250 mm×4.6 mm, 5 μm, 或相当者。

6.3.1.2 柱温: 25 ℃。

6.3.1.3 检测器: 检测波长为 474 nm。

6.3.1.4 进样量: 20 μL。

6.3.1.5 流速: 1.0 mL/min。

6.3.1.6 流动相: 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

注: A 为甲醇, B 为叔丁基甲基醚, C 为 1% 磷酸溶液。

6.3.2 定性方法

分别注入 20 μL 适当浓度的全反式虾青素标准工作液(4.17)、13-顺虾青素标准工作液(4.18)、9-顺虾青素标准工作液(4.19)及试样溶液(6.2), 按 6.3.1 列出的色谱条件进行液相色谱分析测定, 根据标准工作液色谱图中三种虾青素同分异构体组分的保留时间定性。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, 试样测定结果以三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)以质量分数计(%), 按式(1)计算, 保留 3 位有效数字。

$$X = \frac{(1.3 \times A_{13-cis} + A_{trans} + 1.1 \times A_{9-cis}) \times C_s \times V \times 10^{-3}}{A_s \times m} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 样品中虾青素的含量, %;

1.3 —13-顺虾青素对全反式虾青素的校正因子；

A_{13-cis} —试样溶液中 13-顺虾青素的峰面积；

A_{trans} —试样溶液中全反式虾青素的峰面积；

1.1 —9-顺虾青素对全反式虾青素的校正因子；

A_{9-cis} —试样溶液中 9-顺虾青素的峰面积；

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($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

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,单位为毫克(mg)；

f —稀释倍数,为 100。

8 方法的灵敏度、准确度和精密度

8.1 灵敏度

本方法的定量限为 500 mg/kg 。

8.2 准确度

雨生红球藻中全反式虾青素添加浓度为 500 mg/kg ~2 000 mg/kg 时,回收率为 90%~110%。

8.3 精密度

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 15%。

附录 A
(资料性附录)
色谱图

A.1 虾青素同分异构体标准溶液色谱图

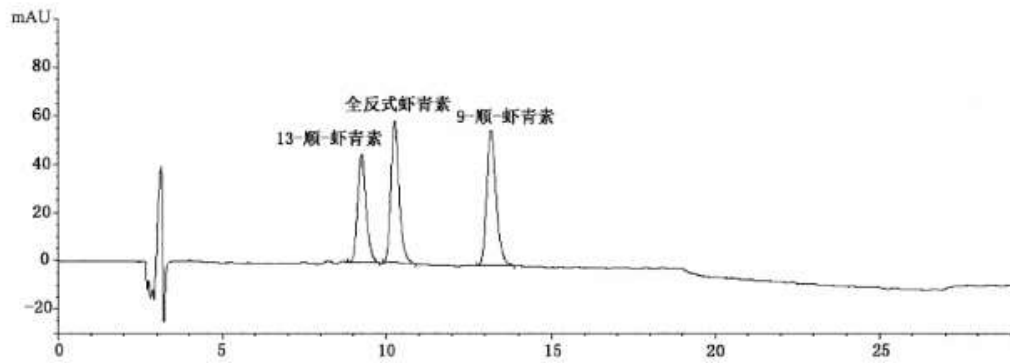


图 A.1 虾青素同分异构体标准溶液色谱图(5.0 mg/L)

A.2 雨生红球藻试样溶液色谱图

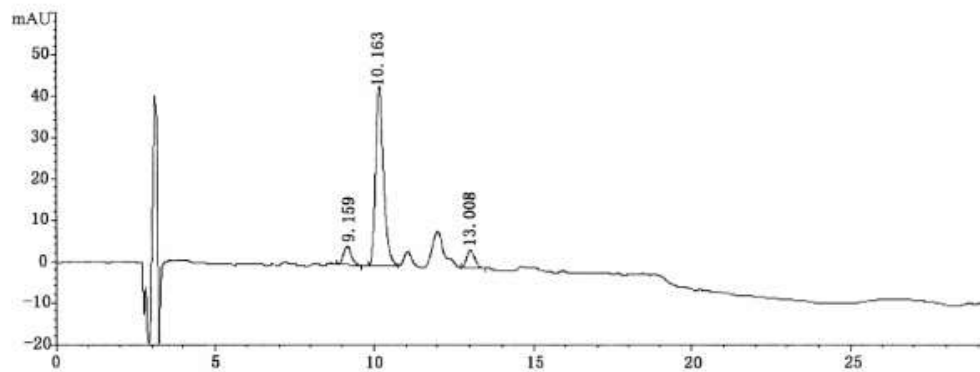


图 A.2 雨生红球藻试样溶液的色谱图