



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105203655 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201510581613. 3

(22) 申请日 2015. 09. 14

(71) 申请人 大连工业大学

地址 116034 辽宁省大连市甘井子区轻工苑
1号

(72) 发明人 宋亮 宋玉昆 周大勇 陈晓婷
宋爽 杨静峰 朱蓓薇

(74) 专利代理机构 大连格智知识产权代理有限
公司 21238

代理人 刘琦

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种南极磷虾油中虾青素含量的测定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种南极磷虾油中虾青素含量的测定方法,其工艺路线如下:南极磷虾油在以乙醇为溶剂的NaOH-乙醇溶液中低温皂化,使虾青素酯完全转化为游离虾青素,并测定南极磷虾油中虾青素在皂化过程中的加标回收率;采用Hypersil C₁₈色谱柱,以二氯甲烷、甲醇、乙腈、水为流动相进行梯度洗脱,流速1.0mL/min,检测器为紫外检测器,检测波长为478nm;确定游离虾青素的三种同分异构体,并采用三峰面积的加和定量。本发明只对南极磷虾油进行一步皂化处理,然后直接测定,并考察虾青素在皂化过程中的加标回收率,采用C₁₈反相高效液相色谱法,测定的可靠性和准确性高,客观真实地测定南极磷虾油中虾青素的含量。

1. 一种南极磷虾油中虾青素含量的测定方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、称取两份重量相同的南极磷虾油,每份 0.2 ~ 0.5g,其中一份添加 1ml 虾青素标准品;

S2、向上述南极磷虾油中分别加入 4 ~ 6ml 无水乙醇溶解,加入 0.100 ~ 0.115mol/L NaOH-乙醇溶液 2ml,定容到 10 ~ 25ml,充氮后在 4 ~ 25℃层析柜中进行皂化反应 0.5 ~ 10h;皂化完成后,加入 0.100 ~ 0.105mol/L 磷酸-乙醇溶液 2 ~ 5ml 终止反应;两份步骤 S1 所述南极磷虾油中各试剂的加入量均相同;

S3、混合、离心取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,分别进行 HPLC 检测分析;

S4、采用 250mm×4.6mm×10 μm 规格的 Hypersil C₁₈ 色谱柱对虾青素进行分离检测;流动相的流速为 0.5 ~ 1.0mL/min,检测器为紫外检测器,检测波长为 478nm,进样量为 5 ~ 50 μL,柱温为 20 ~ 30℃;按比例二氯甲烷:甲醇:乙腈:水 = 5.0:85.0:5.5:4.5,配制溶液 A;按比例二氯甲烷:甲醇:乙腈:水 = 22.0:28.0:45.5:4.5 配制溶液 B;以 A、B 为流动相进行梯度洗脱;洗脱条件:0min ~ 8min,A 流动相为 100%,B 流动相为 0%;8min ~ 56min:A 流动相从 100%降到 0%,B 流动相从 0%升到 100%;

S5、得出进样中游离虾青素的含量,得到加标回收率,进而获得南极磷虾油中虾青素含量,具体步骤为:

S51、利用液相色谱分别测得步骤 S2 得到的两种样品游离虾青素的面积,并利用面积归一化法分别得到总面积,

$$\text{总面积 } A = A_{\text{全反式}} + 1.1 \times A_{9\text{顺}} + 1.3 \times A_{13\text{顺}}$$

其中, A_{13顺}、A_{全反式}、A_{9顺} 分别为试样溶液中 13-顺虾青素、全反式虾青素、9-顺虾青素的峰面积;1.1、1.3 分别为 9-顺虾青素和 13-顺虾青素对全反式虾青素的校正因子;

S52、结合步骤 S4 所述检测条件下得到的虾青素标准曲线,得到步骤 S2 得到的两种样品游离虾青素的含量;

$$\text{所述虾青素标准曲线为 } Y = 99.6569x - 5.1469$$

其中, Y 为步骤 T1 得到的总面积, x 为游离虾青素含量;

$$\text{S53、加标回收率: } P = (C_2 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

其中 C₂ 为步骤 S2 得到的添加有标准品的磷虾油样品中游离虾青素量; C₁ 为步骤 S2 得到的磷虾油样品中游离虾青素量; C₀ 为虾青素标准品添加量;

S54、利用加标回收率得到南极磷虾油中虾青素含量:

$$\text{南极磷虾油中虾青素含量: } C = C_1 / P.$$

2. 根据权利要求 1 所述南极磷虾油中虾青素含量的测定方法,其特征在于,步骤 S1 所述虾青素标准品的浓度为 1.0、2.0 或 4.0 μg/mL。

3. 根据权利要求 1 所述南极磷虾油中虾青素含量的测定方法,其特征在于,步骤 S2 所述 NaOH-乙醇溶液的浓度为 0.105mol/L。

4. 根据权利要求 1 所述南极磷虾油中虾青素含量的测定方法,其特征在于,所述皂化时间为 3.5h。

5. 根据权利要求 1 所述南极磷虾油中虾青素含量的测定方法,其特征在于,所述皂化温度为 5℃。

一种南极磷虾油中虾青素含量的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种色谱检测的方法,具体涉及一种高效液相色谱法测定南极磷虾油中虾青素含量的方法,即 C_{18} 反相高效液相色谱分离,紫外检测器测定南极磷虾油中虾青素含量的方法。

背景技术

[0002] 南极磷虾是地球上数量最大的单种生物资源。据联合国粮农组织 1985 年估算的数据,南极磷虾的总生物量约 1.25 ~ 7.25 亿吨,年可捕捞量约 0.13 ~ 1 亿吨,对于人口爆炸、食物资源短缺的当今世界,在全球海洋资源急速下降的大背景下,南极磷虾资源可以极大的缓解资源短缺等现状,因此南极磷虾受到世界各国的广泛关注。

[0003] 南极磷虾油中含有虾青素、磷脂、 ω -3 多不饱和脂肪酸等活性物质。虾青素具有较强的抗氧化活性、抑制多不饱和脂肪酸的氧化、预防糖尿病、预防肿瘤、增强免疫力、促进生长繁殖等功效。因此磷虾油中的虾青素含量是评价南极磷虾油品质优劣的重要指标。

[0004] 虾青素 (astaxanthin), 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β , β' -胡萝卜素,是一种酮式类胡萝卜素,分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$,分子量为 596.86。南极磷虾油中的虾青素主要以虾青素酯的形式存在,游离虾青素占的比例较少,由于虾青素酯和游离虾青素的同分异构体种类较多,难以同时对各组分进行分离测定。而虾青素酯经皂化或酶解后可以完全转化为游离的虾青素,游离的虾青素主要有三种同分异构体:全反式虾青素,9-顺-虾青素,13-顺-虾青素,通过对游离虾青素的三种同分异构体进行分离测定,可以用于南极磷虾油中虾青素含量的测定。

[0005] 虾青素的测定方法主要为分光光度法和高效液相色谱法,其中液相色谱法应用范围广、更加准确、有效。南极磷虾油的成分比较复杂,如果按照以前测定虾青素的方法测定南极磷虾油中虾青素,容易发生色谱柱堵塞现象,甚至导致液相色谱柱的损坏,所以传统的虾青素测定方法不适合南极磷虾油中虾青素的测定。有学者对南极磷虾油中虾青素进行提纯后再进行皂化反应,测量虾青素的含量,即认为是实际含量,但其忽略了提纯及皂化过程中,虾青素的损失,准确度较低。例如,采用 BIO-3X 填料的凝胶净化柱对南极磷虾油进行分离纯化,然后对虾青素酯皂化,使虾青素酯完全转化为游离虾青素,采用 YMC-Caroteniod C_{30} 色谱柱进行南极磷油中虾青素的定量。但是没有考察虾青素在皂化过程中的损失率,较真实值有所偏差。

[0006] 针对以上问题,本发明方法不需对南极磷虾油进行纯化处理,较传统方法未有虾青素的损失;虾青素酯经过皂化得到游离虾青素过程中有所损失,因此本发明方法考察了虾青素的损失情况,引入加标回收率的步骤,计算皂化过程中加标回收率;由于加标回收率的引进,本方法虾青素的测定值更接近真实值。

发明内容

[0007] 鉴于上述情况,本发明对南极磷虾油中虾青素酯的皂化后,直接采用 Hypersil C_{18}

色谱柱进行南极磷油中虾青素的定量,并引入了虾青素酯在皂化过程中的加标回收率的校正,客观真实地测定南极磷虾油中虾青素的含量,提高了南极磷虾油中虾青素含量测定的准确度。

[0008] 本发明提供了一种高效液相色谱法测定南极磷虾油中虾青素含量的方法,该方法可以客观真实地反映虾青素含量。

[0009] 本方法包括如下步骤:

[0010] S1、称取两份重量相同的南极磷虾油,每份 0.2 ~ 0.5g,其中一份添加 1ml 虾青素标准品;所述虾青素标准样品来自法夫酵母提取,德国 Dr. Ehrenstorferg 公司生产,纯度 $\geq 97.1\%$ 。

[0011] S2、向上述南极磷虾油中加入 4 ~ 6ml 无水乙醇溶解,加入 0.100 ~ 0.115mol/L NaOH-乙醇溶液 2ml,定容到 10 ~ 25ml,充氮后在 4 ~ 25℃层析柜中进行皂化反应 0.5 ~ 10h,使虾青素酯完全转化为游离虾青素;皂化完成后,加入 0.100 ~ 0.105mol/L 磷酸-乙醇溶液 2 ~ 5ml 终止反应;两份步骤 S1 所述南极磷虾油中各试剂的加入量均相同。

[0012] S3、涡旋混合后,离心取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,进行 HPLC 检测分析。

[0013] S4、采用 250mm \times 4.6mm \times 10 μm 规格的 Hypersil C₁₈ 色谱柱对虾青素进行分离检测;流动相的流速为 0.5 ~ 1.0mL/min,检测器为紫外检测器,检测波长为 478nm,进样量为 5 ~ 50 μL ,柱温为 20 ~ 30℃;按比例二氯甲烷:甲醇:乙腈:水 = 5.0:85.0:5.5:4.5,配制溶液 A;按比例二氯甲烷:甲醇:乙腈:水 = 22.0:28.0:45.5:4.5 配制溶液 B;以 A、B 为流动相进行梯度洗脱;洗脱条件:0min ~ 8min, A 流动相为 100%, B 流动相为 0%;8min ~ 56min: A 流动相从 100% 降到 0%, B 流动相从 0% 降到 100%;此种流动相的选择,不仅游离虾青素的三个同分异构体能较好的分离,而且能够同时保证虾青素酯的出峰。

[0014] S5、得出进样中游离虾青素的含量,计算加标回收率,进而算得南极磷虾油中虾青素含量;步骤 S5 具体为:

[0015] S51、利用液相色谱分别测得步骤 S2 得到的两种样品游离虾青素的面积,并利用面积归一化法分别得到总面积,

[0016] 总面积 $A = A_{\text{全反式}} + 1.1 \times A_{9\text{顺}} + 1.3 \times A_{13\text{顺}}$

[0017] 其中, $A_{13\text{顺}}$ 、 $A_{\text{全反式}}$ 、 $A_{9\text{顺}}$ 分别为试样溶液中 13-顺虾青素、全反式虾青素、9-顺虾青素的峰面积;1.1、1.3 分别为 9-顺虾青素和 13-顺虾青素对全反式虾青素的校正因子;

[0018] S52、结合步骤 S4 所述检测条件下得到的虾青素标准曲线,得到步骤 S2 得到的两种样品游离虾青素的含量;

[0019] 所述虾青素标准曲线为 $Y = 99.6569x - 5.1469$,

[0020] 其中 Y 为步骤 T1 得到的总面积, x 为游离虾青素含量;

[0021] S53、加标回收率: $P = (C_2 - C_1) / C_0 \times 100\%$,

[0022] 其中 C_2 为步骤 S2 得到的添加有标准品的磷虾油样品中游离虾青素量; C_1 为步骤 S2 得到的磷虾油样品中游离虾青素量; C_0 为虾青素标准品添加量。

[0023] S54、利用加标回收率得到南极磷虾油中虾青素含量:

[0024] 南极磷虾油中虾青素含量: $C = C_1 / P$ 。

[0025] 优选方式下,步骤 S1 所述虾青素标准品的浓度为 1.0、2.0 或 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0026] 优选方式下,步骤 S2 中所述 NaOH-乙醇溶液的浓度为 0.105mol/L。

[0027] 优选方式下,步骤 S2 中所述皂化时间为 3.5h。

[0028] 优选方式下,步骤 S2 中所述皂化温度为 5℃。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有的优点和效果如下:

[0030] 1、本发明在其他学者测定法夫酵母中虾青素流动相的基础上稍作改进,最终确定 A 流动相为二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=5.0:85.0:5.5:4.5;B 流动相为二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=22.0:28.0:45.5:4.5;梯度洗脱:0min~8min,A 流动相为 100%,B 流动相为 0%;8min~32min:A 流动相从 100%降到 0%,B 流动相从 0%降到 100%;此色谱条件可以对南极磷虾油中虾青素酯皂化后直接进样,减少因前处理步骤造成的虾青素损失,方法简单、灵敏、准确、重现性好。

[0031] 2、本发明采用皂化法对虾青素酯进行皂化,将虾青素酯转变为游离虾青素。由于皂化温度和皂化碱浓度对虾青素酯皂化影响较大,所以本发明优化了皂化温度和碱的浓度。在预实验基础上,考察四种碱浓度(0.100,0.105,0.110 和 0.115mol/L)和两个温度(5℃和 25℃),最终确定碱浓度为 0.105mol/L,皂化温度为 5℃。

[0032] 3、回收率是反映待测物在样品分析过程中损失程度的指标。虾青素酯在皂化过程中极易受到皂化条件的影响而损失,本发明考察了虾青素酯在皂化过程中的加标回收率。通过测定虾青素酯在皂化过程中的加标回收率范围为 80.52%~84.93%,相对标准偏差为 3.37%~5.56%;由于虾青素加标回收率的引进,较未加标的测定值提高了 18%左右,南极磷虾油中虾青素的含量更接近真实值。

[0033] 4、线性试验结果表明,在一定浓度范围内,峰强度与质量浓度的线性关系良好($r>0.99$)。

附图说明:

[0034] 图 1 为虾青素标准品的标准曲线;

[0035] 图 2 为南极磷虾油样品皂化前中后色谱图;

[0036] 图 3 为 5℃时 NaOH-乙醇溶液浓度虾青素酯皂化效率的影响;

[0037] 图 4 为 25℃时 NaOH-乙醇溶液浓度虾青素酯皂化效率的影响。

具体实施方式

[0038] 本发明为一种南极磷虾油中虾青素的测定方法,南极磷虾油中的虾青素酯经皂化后可以完全转化为游离的虾青素。液相色谱中,各物质具体出峰顺序为全反式虾青素,9-顺-虾青素,13-顺-虾青素。

[0039] 下面以具体实施例并结合附图,进一步详细叙述本发明测定南极磷虾油中虾青素含量的技术方法。

[0040] 一、高效液相色谱条件的建立。

[0041] 色谱柱为 C₁₈-反相色谱柱,检测器为紫外检测器,检测波长 478nm,进样量 10 μL,柱温 25℃。

[0042] 流动相的选择:首先对液相色谱的不同的流动相进行多次考察,最终确定流动相为 A(二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=5.0:85.0:5.5:4.5),B(二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=22.0:28.0:45.5:4.5),此时可以将南极磷虾油的虾青素直接进样而不需要纯化,此时

既不发生色谱柱堵塞现象,也不损坏柱子。然后对流动相的洗脱流速,时间等条件进行考察,经过多次试验后,发现流动相流速为 1.0mL/min,梯度洗脱程序为 0% 的 B 洗脱 8min, 0% -100% 的 B 洗脱 24min 时效果最佳,不仅游离虾青素的三个同分异构体能较好的分离,而且能够同时保证虾青素酯的出峰。

[0043] 定性、定量方式:利用相对保留时间及添加标准物质法定性,并采取全反式虾青素、9-顺虾青素和 13-顺虾青素三个峰面积之和进行定量。

[0044] 总峰面积 $A = A_{\text{全反式}} + 1.1 \times A_{9\text{-顺}} + 1.3 \times A_{13\text{-顺}}$ (其中 1.3、1.1 分别为 13-顺虾青素和 9-顺虾青素对反式虾青素的校正因子)

[0045] 二、皂化条件考察及样品检测。

[0046] 美国 waters e2695 高效液相色谱仪,配紫外检测器。

[0047] 试剂:二氯甲烷、甲醇、乙腈均为色谱纯,乙醇为分析纯。

[0048] 标准曲线和相关系数:分别配制浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的虾青素标准工作液,以全反式虾青素的色谱峰面积为横坐标,以相应的浓度为纵坐标,绘制标准曲线,拟合,求标准曲线方程和相关系数。

[0049] 如图 1 所示,曲线方程为 $Y = 99.6569x - 5.1469$,相关系数为 0.9985。虾青素在 0.5 ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ 内(色谱峰面积与虾青素浓度)呈现良好的线性关系。

[0050] 皂化条件的考察:对皂化温度,不同碱浓度对虾青素酯皂化效率的影响以及皂化过程中虾青素的加标回收率进行了考察。

[0051] 虾青素酯皂化过程前中后液相色谱图(图 2),其中 a 为皂化前, b 为皂化中, c 皂化后;1 为全反式虾青素, 2 为 9-顺虾青素, 3 为 13-顺虾青素, 4 为虾青素酯。南极磷虾油中虾青素酯皂化前含量最高,随着皂化时间的进行,虾青素酯含量逐渐降低,而游离虾青素逐渐升高。当虾青素酯皂化达到终点时,虾青素酯的峰消失,而游离虾青素含量达到最大,因此可以通过液相色谱图判断皂化终点。

[0052] 温度和 NaOH-乙醇溶液浓度都会影响南极磷虾油中虾青素酯的皂化效率,当浓度低时皂化不完全,浓度过高会破坏虾青素的结构而使得皂化效率降低,从而影响了虾青素的测定结果。如图 3 和图 4 所示,本发明考察了不同温度(5 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$)和不同 NaOH-乙醇溶液浓度(0.10, 0.105, 0.11, 0.115mol/L)对皂化效率的影响。结果表明温度越高虾青素的皂化反应速度越快,但是 25 $^{\circ}\text{C}$ 时虾青素的含量要低于 5 $^{\circ}\text{C}$ 。碱浓度越高虾青素的皂化反应速度越快,在 4 种不同碱浓度条件下,NaOH-乙醇浓度为 0.105mol/L,游离虾青素含量最高,达到 2.33 $\mu\text{g/mL}$ 。因此选取 NaOH-乙醇浓度为 0.105mol/L,皂化温度 5 $^{\circ}\text{C}$,皂化反应时间 3.5h。

[0053] 在上述最优条件下对南极磷虾油中虾青素酯在皂化过程中的加标回收率进行测定。准确称取南极磷虾油进行加标回收率实验,分别在样品中加入高、中、低 3 个水平的混合标样,每组重复进样 3 次,测定其回收率,并计算含量的相对标准偏差(RSD);结果如表 1,虾青素酯在皂化过程中加标回收率达到了 80% 以上,相对标准偏差较低,说明此方法可用于南极磷虾油中虾青素含量的测定。

[0054] 表 1 为虾青素酯在皂化过程中加标回收率。

[0055] 表 1

[0056]

	添加浓度($\mu\text{g/mL}$)	测定浓度($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
	1.0	0.84 \pm 0.04	84.93 \pm 2.55	4.90
虾青素	2.0	1.64 \pm 0.09	82.03 \pm 4.56	5.56
	4.0	3.22 \pm 0.11	80.52 \pm 2.71	3.37

[0057] 举例说明方案中各变量的计算方法。

[0058] 称取 2 份重量相同的南极磷虾油, 每份 0.2g, 其中一份添加 1ml 浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的虾青素标准品, 两份南极磷虾油中分别加入 6ml 无水乙醇溶解, 加入 0.105mol/L NaOH-乙醇溶液 2ml, 定容至 10ml, 充氮后在 5 $^{\circ}\text{C}$ 层析柜中进行皂化反应 3.5h, 使虾青素酯完全转化为游离虾青素; 皂化完成后, 加入 0.105mol/L 磷酸-乙醇溶液 2ml 终止反应, 涡旋混合后离心取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 供 HPLC 检测分析。

[0059] 具体计算过程如下:

[0060] 利用液相色谱检测得出样品虾青素峰面积:

[0061] 样品虾青素峰面积: $A_{\text{全反式}}$:212.01, $A_{9\text{顺}}$:5.24, $A_{13\text{顺}}$:9.14

[0062] 样品 + 标准品虾青素峰面积: $A_{\text{全反式}}$:236.21, $A_{9\text{顺}}$:6.32, $A_{13\text{顺}}$:10.34

[0063] 根据虾青素峰面积换算公式: 总面积 $A = A_{\text{全反式}} + 1.1 \times A_{9\text{顺}} + 1.3 \times A_{13\text{顺}}$

[0064] 样品虾青素总峰面积: 总面积 $A = 212.01 + 1.1 \times 5.24 + 1.3 \times 9.14 = 229.66$

[0065] 样品 + 标准品虾青素峰面积: 总面积 $A = 236.21 + 1.1 \times 6.32 + 1.3 \times 10.34 = 256.60$

[0066] (其中, $A_{13\text{cis}}$ 、 A_{tra} 、 $A_{9\text{cis}}$ 、分别为试样溶液中 13-顺虾青素、全反式虾青素、9-顺虾青素的峰面积; 1.3、1.1 分别为 13-顺虾青素和 9-顺虾青素对反式虾青素的校正因子。)

[0067] 根据虾青素标准曲线: $Y = 99.6569x - 5.1469$

[0068] 样品虾青素浓度: $(229.66 + 5.1469) / 99.6569 = 2.3562 \mu\text{g/mL}$

[0069] 样品 + 标准品虾青素浓度: $(256.60 + 5.1469) / 99.6569 = 2.6265 \mu\text{g/mL}$

[0070] 样品虾青素质量 (C_1): 浓度 \times 体积 = $2.3562 \times 12 = 28.2744 \mu\text{g}$

[0071] 样品 + 标准品虾青素质量 (C_2): 浓度 \times 体积 = $2.6265 \times 12 = 31.5780 \mu\text{g}$

[0072] 虾青素添加质量 (C_0): 浓度 \times 体积 = $4 \times 1 = 4 \mu\text{g}$

[0073] 加标回收率 (P): 虾青素标准品测定值 / 虾青素标准品添加值 = $(31.5780 - 28.2744) / 4 \times 100\% = 81.09\%$

[0074] 每克南极磷虾油中虾青素含量: 虾青素质量 / 样品质量 / 加标回收率 = $28.2744 / 0.2 / 81.09\% = 174.34 \mu\text{g/g}$

[0075] 实施例

[0076] 1. 称取四份重量相同的南极磷虾油, 每份 0.2g, 其中四份分别添加浓度为 0、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的虾青素标准品 1ml。

[0077] 2. 向上述南极磷虾油中加入 4ml 无水乙醇溶解, 加入 0.105mol/L NaOH-乙醇溶液 2ml, 定容至 10ml, 充氮后在 5 $^{\circ}\text{C}$ 层析柜中进行皂化反应 3.5h, 使虾青素酯完全转化为游离虾青素; 皂化完成后, 加入 0.105mol/L 磷酸-乙醇溶液 2ml 终止反应, 涡旋混合后离心取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 供 HPLC 检测分析。

[0078] 3. 采用 250mm \times 4.6mm \times 10 μm 规格的 Hypersil C_{18} 色谱柱对虾青素进行分离检测; 流动相的流速为 1.0mL/min, 检测器为紫外检测器, 检测波长为 478nm, 进样量为 10 μL ,

柱温为 25℃;按比例二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=5.0:85.0:5.5:4.5,配制溶液 A;按比例二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=22.0:28.0:45.5:4.5 配制溶液 B;以 A、B 为流动相进行梯度洗脱;洗脱条件:0min~8min,A 流动相为 100%,B 流动相为 0%;8min~32min:A 流动相从 100%降到 0%,B 流动相从 0%降到 100%;

[0079] 4:确定游离虾青素的三种同分异构体,全反式虾青素、9-顺-虾青素、13-顺-虾青素,并采用总峰面积归一化法定量。

[0080] 利用相对保留时间及添加标准物质法定性,并采取全反式虾青素、9-顺虾青素和 13-顺虾青素三个峰面积之和进行定量:

[0081] 总峰面积 $A = A_{\text{全反式}} + 1.1 \times A_{9\text{顺}} + 1.3 \times A_{13\text{顺}}$

[0082] S5、计算南极磷虾油中虾青素的实际浓度: $C_1 = C_2 - P \cdot C_0$

[0083] 其中 C_2 为虾青素的测定浓度, C_1 为南极磷虾油中虾青素的计算浓度, C_0 为虾青素标准品在磷虾油中的浓度, P 为实验测得的加标回收率。

[0084] 测定南极磷虾油中虾青素加标量为 0 $\mu\text{g/mL}$ 时,此时南极磷虾油中虾青素含量为 143.30 $\mu\text{g/g}$;加标量为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时,加标回收率为 81.02%此时南极磷虾油中虾青素含量为 176.87 $\mu\text{g/g}$;加标量为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时,加标回收率为 82.03%,此时南极磷虾油中虾青素含量为 174.69 $\mu\text{g/g}$;加标量为 4 $\mu\text{g/mL}$ 时,加标回收率为 81.82%,此时南极磷虾油中虾青素含量为 175.14 $\mu\text{g/g}$,较未加标的测定结果提高了 18%左右。

[0085] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

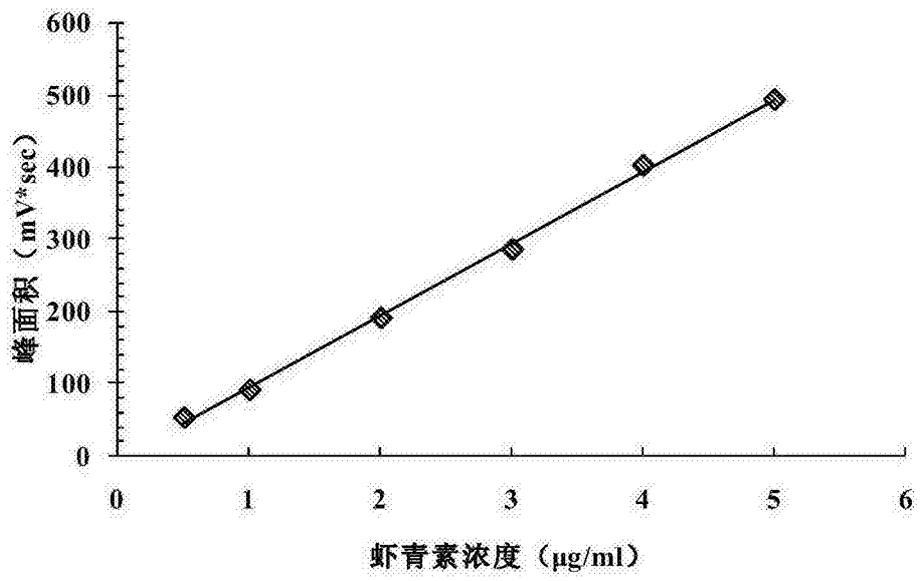


图 1

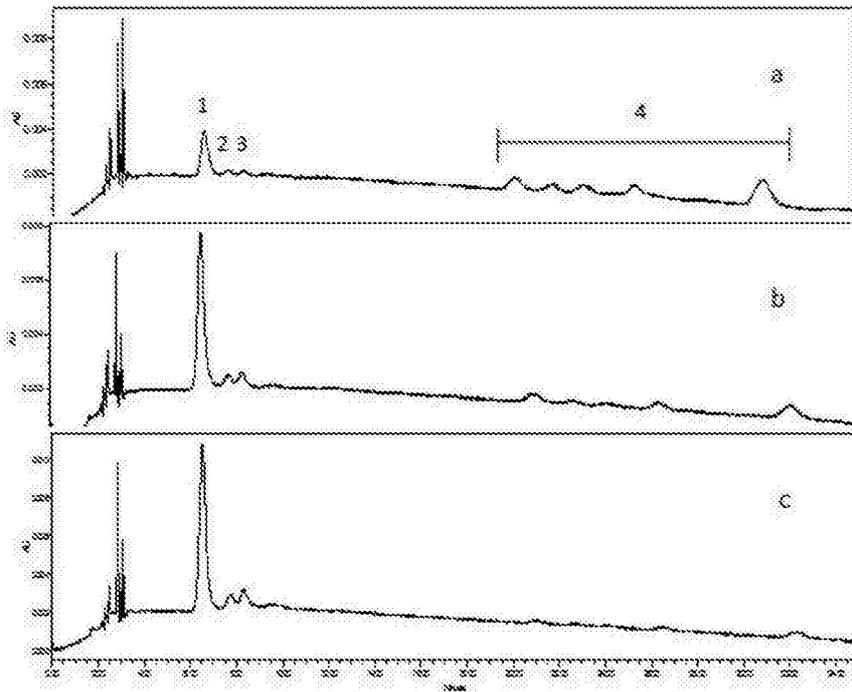


图 2

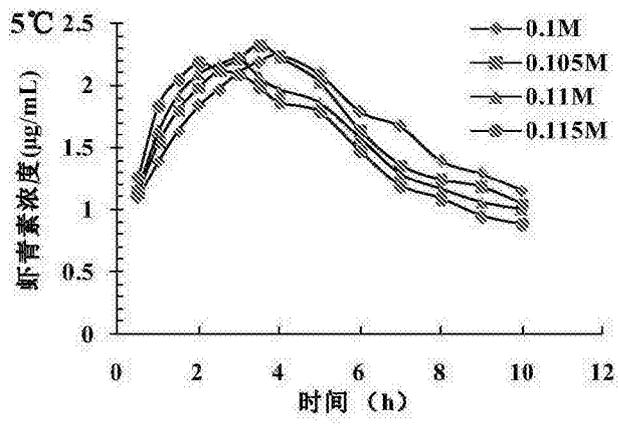


图 3

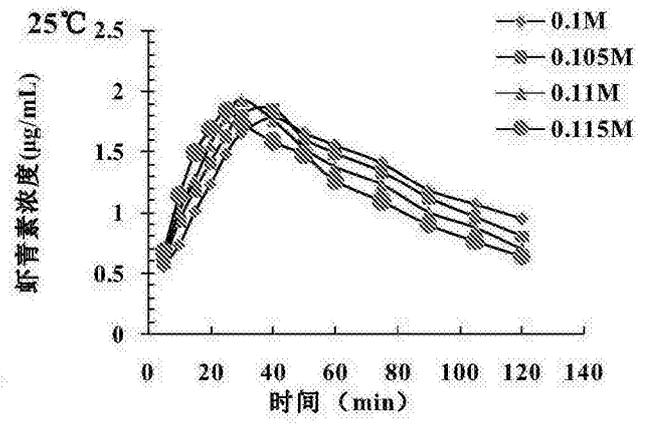


图 4