

淡水鱼肝脏中维生素 A₁, A₂ 含量的研究^①

韩雅珊^② 王 强

(中国农业大学食品科学系)

广田才之

(日本大学农兽医学部化学研究室 日本 252)

摘 要 本试验建立了用高效液相色谱法同时测定淡水鱼肝脏中的VA₁和VA₂的方法。以 μ -Porasil 3.9 mm×150 mm (Waters Co.)为色谱柱,正己烷:乙醚(87:13)为流动相,紫外 350 nm,荧光 Ex 325 nm,Em 480 nm 双道检测,VA₁和VA₂的保留时间分别为 26.25 min 和 28.00 min。采用不同波长条件下的紫外吸收特性,对VA₂予以定性,以VA₁为内标物对VA₂予以定量。实验对多种淡水鱼肝脏中的VA₁和VA₂进行了测定,取得了满意效果。

关键词 鱼肝脏; 维生素 A₁; 维生素 A₂; 高效液相色谱法

中图分类号 R151.2; TS201.24

Study on the Contents of Vitamin A₁ and Vitamin A₂ in Fresh Water Fish Livers

Han Yashan Wang Qiang

(Dept. of Food Science, CAU)

Saishi Hirora

(Dept. of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Japan 252)

Abstract The high performance liquid chromatography method for a simultaneous determination of vitamin A₁ and vitamin A₂ in various kinds of fresh water fish livers has been developed. Separation was achieved by use of μ -Porasil column (3.9 mm×150 mm), n-hexane : diethyl ester (87 : 13) as mobile phase and was detected at UV 350 nm. The qualitative assay of vitamin A₂ was determined with UV absorption character in different wavelength condition and the quantitative assay of vitamin A₂ were determined with vitamin A₁ standard as internal standard. The vitamin A₁ and vitamin A₂ contents in various kinds of fresh water fish livers were determined satisfactorily.

Key words fish livers; vitamin A₁; vitamin A₂; HPLC

维生素 A₂(3-dehydroretinol)和维生素 A₁(retinol)对维持视觉功能具有同样重要的生理作用^[1,2]。而近几年来人们对VA₁的分析研究较多^[3,4],对VA₂的报道却很少。因为VA₁和VA₂结构近似,使两者难以分离;同时由于VA₂性质极不稳定^[5],给其分析分离带来很大困

收稿日期: 1996-09-10

①本项目为中国农业大学食品学院与日本大学农兽医学部合作项目

②韩雅珊,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

难。目前,国内尚未见有关 VA_2 分析分离方面的报道。本试验用高效液相色谱法首次对淡水鱼肝脏中 VA_1 和 VA_2 的含量进行了研究,取得了较好效果,并为我国淡水鱼资源的综合利用提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(LKB 2150型),荧光检测器(岛津 RF-530型),冷凝皂化装置。

1.2 试剂

正己烷、甲醇、无水乙醇、乙醚、50%KOH 甲醇溶液、二丁基羟基甲苯(BHT)各种试剂均为分析纯或色谱纯。

VA_1 标准溶液的配制:准确称取 VA_1 醋酸酯 5.0 mg,于 250 mL 皂化瓶中,加 50 mL 无水乙醇,20 mL 50%KOH 甲醇溶液,冷凝皂化 40 min,冷却后用正己烷反复提取,并定容于 50 mL 容量瓶,得浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的贮备液,上机前稀释成 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的工作液。

1.3 试材

生长期 2~3 年的新鲜鲤鱼、鳙鱼及草鱼等淡水鱼,取肝脏备用。

1.4 样品前处理

取各种鱼的肝脏,用滤纸吸干表面水分,并分别称取 5.00~10.00 g 于研钵中,加适量甲醇,BHT 及石英砂研磨或匀浆,转移至皂化瓶中,加 60 mL 乙醇,40 mL 50%KOH 甲醇溶液,1.0 mg BHT,60~75℃ 回流皂化 40 min。冷却后用正己烷反复提取皂化液,多次水洗至中性后,用无水硫酸钠脱水并定容至 50 mL 容量瓶中。取上述提取液 5 mL 减压蒸干,用 1 mL 正己烷溶解,经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后进色谱柱。

1.5 色谱条件

色谱柱为 μ -Porasil (3.9 mm \times 150 mm);流动相为正己烷:乙醚(87:13)流速 $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测器为紫外 350 nm (0.32 AUFS),荧光 Ex 325 nm, Em 480 nm;进样量 20 μL ;柱温为室温。

2 结果与分析

2.1 吸收波长的确定

维生素 A_1 和维生素 A_2 结构的不同使两者的紫外吸收有差异。Belitz 等研究了 VA_1 和 VA_2 的吸收光谱,确认 VA_1 的最大吸收波长为 325 nm, VA_2 为 350 nm^[6]。由于一般测定样品中 VA_2 含量较低,且变化较快,故确定 350 nm 为二者的共同检测波长。同时,用荧光检测器在 Ex 325 nm, Em 480 nm 对 VA_1 作辅助检测。结果表明,这种以紫外检测为主,荧光同时辅助检测的双道检测方法,可获得更好的检测结果。

2.2 流动相的选择

VA_1 和 VA_2 仅环状结构中一双键之差,结构极为相似,使两者在色谱柱上较难分离。本实验经多项研究,选择 μ -Porasil 3.9 mm \times 150 mm 为色谱柱,以正己烷:乙醚=87:13 为流动相,使 VA_1 与 VA_2 得以较好分离(图 1-1,2)。 VA_2 , VA_1 的保留时间分别为 28.00 min,

26.25 min。

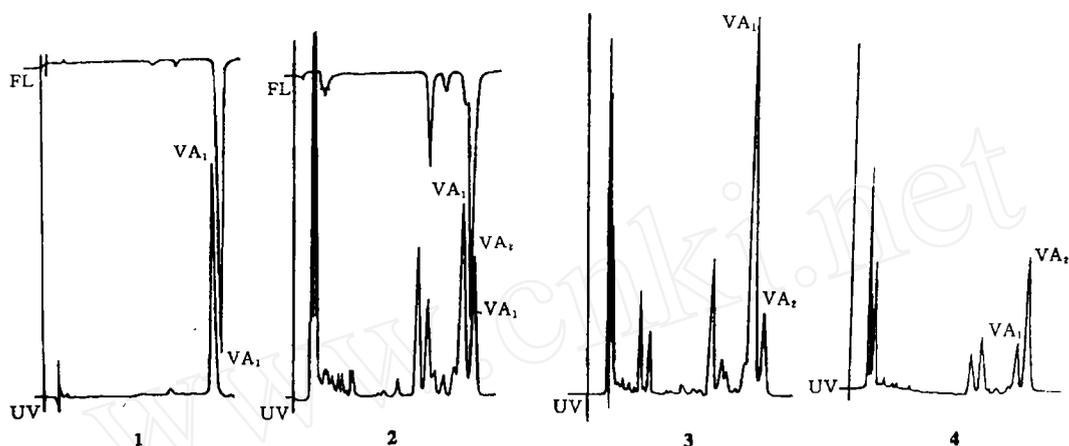


图1 各种鱼肝脏 VA₁ 和 VA₂ 的分离色谱图

- 1 标准样品 VA₁, 350 nm; 3 鲤鱼肝脏, 325 nm;
2 鳊鱼肝脏, nm; 4 鲤鱼肝脏, 350 nm

2.3 VA₂的定性与定量

很多实验已经表明 HPLC 测定 VA₁ 具有很高的精密度和重现性, 并可根据标样的保留时间和峰高予以定性和定量^[3-4]。因 VA₂ 性质极不稳定, 在难以取得标样的特别情况下, 本实验采用 260~400 nm 的不同波长条件, 对同一样品的 VA₂ 进行色谱重复测定, 并计算其相应峰值(表 1)。可以看出, 350 nm 处其峰值最高(280 nm 处有一小肩峰), 表明在此波长条件下有最大吸收, 与标准理论吸收特征完全相符^[7]。同一样品在 350 nm, 325 nm 两波长条件下的色谱图(图 1-3, 4)相比较, 可以看出 325 nm 为 VA₁ 的最大吸收峰, 此波长下 VA₂ 峰高较低, 当把波长移至 350 nm 时, 峰高显著升高至最大值, 由此可以对 VA₂ 予以定性。根据 VA₁, VA₂ 的标准光谱图, 在 350 nm 波长下, 等量 VA₁ 与 VA₂ 吸收比值系数为 0.119 0, 因此将 VA₁ 视为内标物, 用 350 nm 条件下的标准 VA₁ 值即可对 VA₂ 予以定量。其计算公式为: VA₂ 含量 = VA₂ 峰高 / VA₁ 峰高 × VA₁ 含量 × 0.119 0。

表 1 同一鲤鱼鱼肝样品在不同检测波长条件下 VA₂ 的色谱峰高值

波长/nm	260	280	300	325	340	350	360	380	400
样品峰高/cm	0.95	1.80	1.30	2.98	4.61	5.00	3.81	0.90	0.69

2.4 各种鱼肝中 VA₁ 与 VA₂ 的测定

实验对以下 8 种鱼肝脏中的 VA₁ 和 VA₂ 进行了重复测定, 结果见表 2。各种淡水鱼中均含有 VA₁, VA₂ 而海鱼肝脏中只含有 VA₁, 而 VA₂ 未检出, 与文献报道一致^[8]。上述各种淡水鱼肝中 VA₁ 和 VA₂ 的含量分别在 36.72~151.22 μg·g⁻¹, 和 3.60~14.37 μg·g⁻¹ VA₂ 的生物活性按 VA₁ 的 45% 计算^[9], 则以上各淡水鱼肝中 VA 生物活性为 127.67~525.09 IU·

g^{-1} 。而我国北方地区猪,牛,羊,鸡肝脏中的 VA 生物活性在 $87.00 \sim 509.00 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间^[10]。因此,上述各种淡水鱼肝脏中 VA 的生物活性均高于各动物肝脏中 VA 的生物活性。

3 讨论

维生素 A 与脱辅基视蛋白(apo-protein opsin)共价结合形成具有生理活性的视紫红质(rhodopsin)对视觉功能起重要作用。VA 的结构、生物活性不同,形成的视紫红质活性不同,其中全反式 VA 的活性最高。而也有许多学者认为 VA₁及 VA₂的 11-顺式异构体,9-顺式异构体是主要色基(chromophone),对视觉形成起主要作用^[6,11]。本实验仅就全反式 VA 进行了分析,对视觉功能起重要作用的其他异构体,尚有待于进一步研究。

目前,我国将大量的淡水鱼内脏视为废弃物,而本研究证明我国现在人工饲养的淡水鱼中含有大量的维生素 A₁ 和维生素 A₂,既可利用制成作畜禽饲料的鱼粉,又可制成维生素 A 含量丰富的宠物食品,还可提取鱼油,经氢化后做人造奶油。本研究为我国淡水鱼资源的综合开发利用提供了重要的科学依据。

本试验得到房淑惠先生、严衍录先生的帮助,特表谢意。

参 考 文 献

- 1 Wilson J C, Pitt G A. Vitamin A₂ has vitamin A activity in rat without conversion to retinol. *Biochem Soc Trans*, 1986, 14: 950~951
- 2 Yoshikami S, et al. Visual pigments of the vitamin A-deficient rat following vitamin A administration. *Vision Res*, 1969, 9: 633~644
- 3 Kiyoshi T, et al. Simultaneous determination of cis-trans isomeric retinals by high performance liquid chromatography. *J Chromatography*, 1977, 134: 331~336
- 4 Paanakker J E, Groenendijk G W. Separation of geometric isomers of retinyl ester, retinal and retinol, pertaining to the visual cycle, by high performance liquid chromatography. *J Chromatography*, 1979, 168: 125~132
- 5 Shantz E M. Isolation of pure vitamin A₂. *Science*, 1948, 108: 417~420
- 6 Belitz H D, Grosch W. *Food Chemistry*. Germany: Springer-Verlag, 1987, 305~307
- 7 Moore T. *Vitamin A*. New York: Elsevier, 1957, 96~108
- 8 韩雅珊. 食品化学. 北京: 北京农业大学出版社, 1992, 159~160
- 9 日本食品工业学会编. 食品分析方法. 成都: 四川科技出版社, 1995, 296~299
- 10 中国医学科学院卫生研究所编. 食物营养成分表. 北京: 人民卫生出版社, 1985, 117~129
- 11 Crouch R. Isorhodopsin: Artificial photosensitive pigment formed from 9, 13-dicis retinal. *Proc Nat Acad Sci*, 1975, 72: 1 538~1 542

表 2 8 种鱼肝脏中 VA₁及 VA₂的含量 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

鱼类	维生素 A ₁ *	维生素 A ₂ **
鲤鱼	38.25	3.60
鲢鱼	84.37	8.26
鳙鱼	62.34	4.09
草鱼	132.87	11.85
鳊鱼	36.72	10.63
泥鳅	147.25	13.34
鳝鱼	151.22	14.37
梭鱼	93.57	未检出

*全反式维生素 A₁ **全反式维生素 A₂