

液相色谱法检测鱼类肝脏中天然维生素 A

黄文婷^{1,2,3,4,5,6,7}, 曹文红^{1,2,3,4,5,6,7}, 章超桦^{1,2,3,4,5,6,7}, 秦小明^{1,2,3,4,5,6,7},
高加龙^{1,2,3,4,5,6,7}, 郑惠娜^{1,2,3,4,5,6,7}

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 国家贝类加工技术研发分中心, 广东 湛江 524088;
3. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524088; 4. 广东省海洋生物制品工程实验室,
广东 湛江 524088; 5. 广东省海洋食品工程技术研究中心, 广东 湛江 524088; 6. 水产品深
加工广东普通高等学校重点实验室, 广东 湛江 524088; 7. 大连工业大学 海洋食品
精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034)

摘要:为了准确测定鱼类肝脏中维生素 A (维生素 A₁、维生素 A₂) 含量, 对样品预处理方法 (水浴皂化法、室温皂化法、直接提取法) 和检测方法 (正相色谱法、反相色谱法) 进行筛选, 并应用于 9 种经济鱼类肝脏中维生素 A 的测定。结果表明: 维生素 A₁、维生素 A₂ 标准品用反相色谱法检测分离效果良好, 且在各自线性范围内线性关系良好, R² 均大于 0.99; 水浴皂化法维生素 A 含量显著高于室温皂化法及直接提取法 ($p < 0.05$), 且维生素 A₁ 平均回收率为 104.52%, 维生素 A₂ 平均回收率为 90.94%; 在 9 种鱼中, 除了淡水鱼乌鳢和大口黑鲈外, 其他淡水、海水鱼类肝脏中维生素 A 总含量均达 200 μg/100 g 以上, 其中海水鱼龙躄石斑鱼肝脏中维生素 A 总含量最高, 达到 14 413.78 μg/100 g。水浴皂化法结合反相色谱法精密度良好, 适用于鱼类肝脏中维生素 A 的分析测定。

关键词: 鱼; 肝脏; 维生素 A; 提取方法; 检测方法

中图分类号: TQ646; Q562

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)06-0141-07

Determination of natural vitamin A in fish liver by liquid chromatography

HUANG Wenting¹, CAO Wenhong^{1,2,3,4,5,6,7}, ZHANG Chaohua^{1,2,3,4,5,6,7},
QIN Xiaoming^{1,2,3,4,5,6,7}, GAO Jialong^{1,2,3,4,5,6,7}, ZHENG Huina^{1,2,3,4,5,6,7}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 2. National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 4. Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 5. Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Seafood, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 6. Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 7. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

Abstract: In order to accurately determine the content of vitamin A (vitamin A₁, vitamin A₂) in fish liver, sample pretreatment methods (water bath saponification, room temperature saponification, direct extraction) and detection methods (normal phase chromatography, reversed phase chromatography) were screened and applied to the determination of vitamin A in the liver of nine economic fish species. The

收稿日期: 2021-06-28; 修回日期: 2022-02-24

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2018YFD0901105)

作者简介: 黄文婷 (1997), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏 (E-mail) 1501126595@qq.com。

通信作者: 曹文红, 教授, 博士 (E-mail) cchunlin@163.com。

results showed that vitamin A₁ and vitamin A₂ were separated effectively by reversed phase chromatography and showed good linear relationship within their respective linear ranges ($R^2 > 0.99$); the content of vitamin A extracted

by water bath saponification was significantly higher than that by room temperature saponification and direct extraction ($p < 0.05$), and its average recoveries of vitamin A₁ and vitamin A₂ were 104.52% and 90.94%, respectively. Except for the freshwater snakehead and big mouth bass, the total content of vitamin A in the livers of other freshwater fishes and marine fishes was more than 200 μg/100 g, and the total content of vitamin A in the liver of marine giant grouper was the highest, reaching 14 413.78 μg/100 g. The water bath saponification method combined with reversed phase chromatography has good precision and is suitable for the determination of vitamin A in fish liver.

Key words: fish; liver; vitamin A; extraction method; detection method

维生素 A (V_A) 是人体所必需的脂溶性维生素, 具有维持视觉、上皮组织、免疫等正常生理功能的作用, 当人体缺乏 V_A 时会导致夜盲病、干眼症、生长迟缓、免疫下降等^[1-2]。V_A 缺乏症是一个全球性的健康问题, 现有约 2.5 亿学龄前儿童缺乏 V_A^[3]。V_A 分为天然 V_A 和合成 V_A, 天然 V_A 主要存在于肝脏、乳品、蛋黄及红黄色植物中, 合成 V_A 大多应用于涂抹软膏、V_{AD} 油剂等产品中, 但合成 V_A 存在一些安全隐患, 易导致高脂血症、假性肿瘤、眼睑结膜炎等^[4-5]。天然 V_A 包括视黄醇 (V_{A1}) 和脱氢视黄醇 (V_{A2}) 两种类型, 两者结构相似, 唯一的差异是 V_{A2} 在 3,4 碳位键上存在共轭双键。V_{A1} 常见于哺乳动物和海水鱼体内, 而 V_{A2} 则多存在于淡水鱼体内^[6]。鱼类肝脏中 V_A 含量丰富且经济易得, 是获取天然 V_A 的优良原料^[7]。

V_A 本身是微量元素且其性质不稳定, 易被光、热、氧、酸、碱等破坏^[8-9], 因此选择一种能准确反映样品真实含量的提取方法, 就显得尤为重要。目前 V_A 提取方法主要有皂化法和直接提取法。皂化法又分为室温皂化法及水浴皂化法, 其中水浴皂化法适用范围广, 但操作烦琐且温度较高, 可能会对 V_A 造成一定损失, 室温皂化法作用温和, 但所需时间长; 而直接提取法提取时间较短, 操作简便。

V_A 的检测方法有紫外法、荧光法和液相色谱法, 其中紫外法和荧光法灵敏度较低, 操作烦琐, 而液相色谱法是目前检测 V_A 的主要方法。液相色谱法又分为正相色谱法与反相色谱法, 正相色谱法容许样品中存在较多的脂肪, 其流动相也可有较大的极性范围跨度^[10]。在 2010 版药典中规定采用正相色谱法测定药品中的顺式及反式 V_A^[11], Rebeca 等^[12] 的研究结果表明正相色谱能很好地分离 V_A 异构体, 分离度良好。反相色谱法稳定性更高^[13], 其常用于 V_{A1} 含量的分析测定。目前关于 V_{A2} 的研究

较少^[14-16], 由于 V_{A2} 性质不稳定, 现多数研究方法中仅以 V_{A1} 含量作为 V_A 总含量, 这可能会造成检测结果与实际结果不符, 无法真实反映样品 V_A 含量情况。为正确评估鱼类肝脏中 V_A 含量, 本研究对正相色谱法和反相色谱法进行了比较, 同时以龙趸石斑鱼肝脏为原料, 对水浴皂化法、室温皂化法、直接提取法 3 种样品预处理方法进行了比较, 筛选出了最佳的样品预处理、检测方法, 并比较了 9 种经济鱼类肝脏中 V_A 类型及其总含量, 以期天然 V_A 新资源的开发利用提供前期基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

草鱼、乌鳢、金鲳鱼、点篮子鱼、花鲢、珍珠龙胆石斑鱼、罗非鱼、大口黑鲈、龙趸石斑鱼肝脏, 购自湛江霞山水产品批发市场, 鱼现杀后将肝脏用冰块运回实验室, 去除表面脂肪及结缔组织, 用预冷的生理盐水清洗后用厨房纸巾吸干表面水分, 匀浆后立即冻存于 -80 °C 冰箱。

抗坏血酸、无水硫酸钠、氢氧化钾、石油醚、2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT), 均为分析纯, 汕头西陇公司; 无水乙醇 (分析纯), 天津科密欧公司; 甲醇 (色谱纯)、V_{A1} 标准品 (纯度 ≥ 95%), 美国 Sigma 公司; V_{A2} 标准品 (纯度 ≥ 93%), 加拿大 TRC 公司; 异丙醇 (色谱纯), 上海阿拉丁公司; 正己烷 (色谱纯), 美国 Thermo Fisher 公司。

1.1.2 仪器与设备

e2695 高效液相色谱仪 (配 2489 紫外检测器), 美国 Waters 公司; FA 2004 型分析天平, 上海舜宇公司; N-1300 旋转蒸发器, 上海爱朗公司; SHZ-B 恒温水浴振荡器, 上海迅博公司; MGS-2200H 氮吹仪, 上海爱朗公司; 超声波清洗机, 昆山超声公司; Z-16KL 离心机, 美国 Sigma 公司; D-24UV 明澈超纯水一体机, 德国默克公司; ZLS-3 真空离心浓

缩仪,湖南赫西公司。

1.2 试验方法

1.2.1 V_{A1} 标准溶液的配制

将 25 mg V_{A1} 标准品和 2.5 mg V_{A2} 标准品分别用 25 mL 和 5 mL 无水乙醇溶解后制成标准储备液, V_{A1} 标准储备液临用前参照 GB 5009.82—2016 附录 B 进行浓度校正,校正后 V_{A1} 标准储备液质量浓度为 1.29 mg/mL, V_{A2} 因没有可参照的方法未对其进行浓度校正。分别吸取 0.25 mL V_{A1} 标准储备液和 0.4 mL V_{A2} 的标准储备液于同一 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成混合标准中间液。分别准确吸取 0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0 mL 混合标准中间液于 5 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成 V_{A1} 和 V_{A2} 系列混合标准工作液。

1.2.2 样品的预处理(V_A 的提取)

因为 V_A 不稳定,操作时使用棕色瓶及锡箔纸包裹的玻璃瓶,尽量避免光线照射。

1.2.2.1 水浴皂化法

参照 GB 5009.82—2016,准确称取 1.6 g 龙趸石斑鱼肝脏于锥形瓶中,加入 20 mL 水混匀,加入 1.0 g 抗坏血酸和 0.1 g BHT 作为抗氧化剂,加入 30 mL 无水乙醇,再加入一定量的质量分数为 50% 的氢氧化钾溶液作为皂化液,混匀后盖上瓶塞于 80 °C 恒温水浴振荡皂化 30 min,皂化后立即用冰水冷却。将皂化物用 30 mL 水转入 250 mL 棕色分液漏斗中,加入石油醚振荡萃取 5 min,将下层水相移至另一分液漏斗中进行第二次萃取,合并醚相并水洗至中性,然后经 3 g 无水硫酸钠过滤入 1 L 旋转蒸发瓶中,在旋转蒸发仪上浓缩至近干,用甲醇分次溶解残留物后定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜后待测。

1.2.2.2 室温皂化法

参考刘波等^[17]的方法,并稍有改动。准确称取 1.6 g 龙趸石斑鱼肝脏于锥形瓶中,加入 20 mL 水,加入 1.0 g 抗坏血酸和 0.1 g BHT,加入 30 mL 无水乙醇,再加入一定量的质量分数为 50% 的氢氧化钾溶液作为皂化液,混匀后在氮气流下吹扫 5 min,用橡皮软塞塞紧瓶口,振荡过夜。用石油醚萃取后水洗至中性,经旋转蒸发仪浓缩后用甲醇定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜后待测。

1.2.2.3 直接提取法

参照 Nimalaratne 等^[18]的方法,并稍有改动。准确称取 1.6 g 龙趸石斑鱼肝脏于平底烧瓶中,加入 20 mL 正己烷,再加入 1.0 g 抗坏血酸和 0.1 g BHT,混匀后超声处理(超声功率为 240 W,超声频率为 40 kHz)一定时间。然后于 5 000 r/min 下离心

10 min,取上清液在真空离心浓缩仪上 25 °C 旋蒸至干,用甲醇定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜后待测。

1.2.3 V_A 的液相色谱检测条件

分别采用反相色谱法和正相色谱法检测 V_A 。反相色谱法条件:Waters BEH C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(体积比 96:4);流速 0.8 mL/min;进样量 10 μL 。正相色谱法条件:Phenomenex Luna Silica 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为正己烷-异丙醇(体积比 99.7:0.3);流速 1 mL/min;进样量 10 μL 。

1.2.4 标准曲线绘制及样品检测

将 V_{A1} 和 V_{A2} 系列混合标准工作液进液相色谱进行检测,以 V_{A1} 和 V_{A2} 的质量浓度(x)为横坐标,相应峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线。将样液进液相色谱进行检测,得到峰面积,再根据标准曲线得到 V_{A1} 和 V_{A2} 的质量浓度,按下式计算 V_A 含量。

$$X_1 = \rho \times V \times f \times 100/m \quad (1)$$

$$X_2 = (\rho \times V \times f \times 100/m) \times 0.4 \quad (2)$$

$$X_3 = X_1 + X_2 \quad (3)$$

式中: X_1 、 X_2 、 X_3 分别为 V_{A1} 、 V_{A2} 含量和 V_A 总含量, $\mu\text{g}/100 \text{ g}$; ρ 为根据标准曲线计算得到的试样中 V_A 的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V 为定容体积, mL; f 为换算因子(V_A 的换算因子为 1); m 为样品的质量, g; 0.4 为 V_{A2} 换算系数, V_{A2} 活性为 V_{A1} 的 40%, 进行计算时将其折算^[19]。

1.2.5 数据处理

V_A 含量采用“平均值 \pm 标准差”($n = 3$)表示。对不同预处理方法提取的 V_A 含量及不同鱼类肝脏 V_A 含量进行单因素方差分析(One-way ANOVA),若差异显著则采用 Duncan 法进行多重比较,以 $p < 0.05$ 作为差异显著性的判断标准。

2 结果与分析

2.1 V_A 检测方法的确立

V_{A2} 在视觉调节上具有与 V_{A1} 同样重要的作用, V_{A1} 与 V_{A2} 的互相转化是动物对光变化的一种适应性反应。 V_{A1} 在 325 nm 处有最大吸收峰, V_{A2} 在 350 nm 处有最大吸收峰, V_{A2} 不稳定、变化较快,因此以 350 nm 作为两者的共同测定波长^[14]。为了更准确地测定样品中 V_A 含量,本研究对正相色谱法和反相色谱法进行了比较。

将 V_{A1} 和 V_{A2} 混合标准工作液(V_{A1} 质量浓度为 12.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, V_{A2} 质量浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别采用正相色谱法和反相色谱法进行检测,所得液相色谱图如图 1 所示。

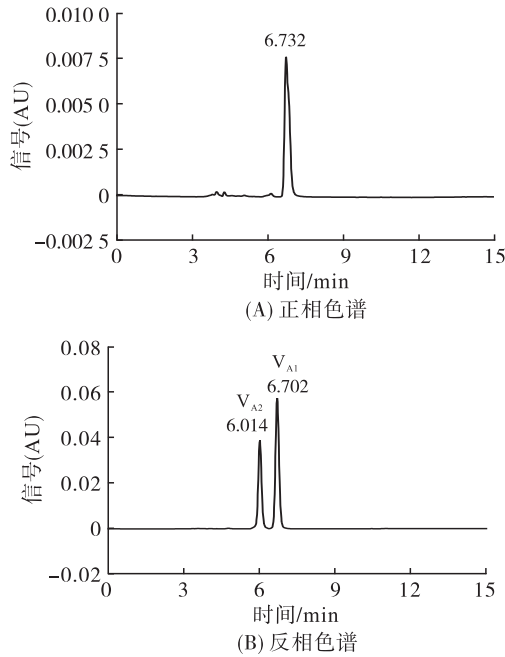


图1 混合标准溶液在正相及反相色谱中的液相色谱图

由图1可知:采用正相色谱法,仅检测出一个单峰,无法将 V_{A1} 、 V_{A2} 分离开,更换流动相、流动相比例及流速均无法分离;而采用反相色谱法, V_{A1} 、 V_{A2} 分离情况良好。

将 $19.35 \mu\text{g/mL}$ 的 V_{A1} 及 $12 \mu\text{g/mL}$ 的 V_{A2} 混合标准溶液连续进样6针,以相对标准偏差(RSD)表示检测方法的稳定性,结果反相色谱法平均RSD为0.38%,小于正相色谱法的4.48%,说明反相色谱法稳定性更高。因此,本研究选用反相色谱法作为检测 V_{A1} 和 V_{A2} 的方法。采用反相色谱法,按1.2.4绘制标准曲线,结果见图2。由图2可见, V_{A1} 和 V_{A2} 的线性方程分别为 $y = 29\ 100x - 5\ 515$, $y = 87\ 906x - 7\ 591.5$,相关系数(R^2)分别为0.9998及0.9999,二者分别在 $0.645 \sim 19.35 \mu\text{g/mL}$ 与 $0.4 \sim 12 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

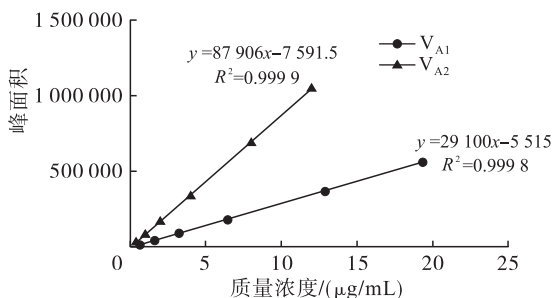


图2 V_{A1} 、 V_{A2} 的标准曲线

2.2 样品预处理方法的确定

2.2.1 3种样品预处理方法提取条件的确定

2.2.1.1 水浴皂化法

皂化法是通过碱与油脂发生皂化反应,以去

除样品中共存的类脂化合物,将 V_A 酯转变为游离 V_A ,并使得被油脂包裹的游离 V_A 脱离出来,以供测定。质量分数为50%的氢氧化钾溶液适合大部分样品的皂化需求^[20]。碱用量的增多有利于完全皂化,若加入的碱量不足,皂化反应不完全,会造成测定结果偏低。但若加入的碱量过多,水洗过程中需要大量的水将其洗至中性,造成浪费,且 V_A 是敏感成分,碱用量过多会对 V_A 造成一定的氧化破坏。采用水浴皂化法,在不同的氢氧化钾(质量分数50%)用量下,对龙趸石斑鱼肝脏中的 V_A 进行提取,并采用反相色谱法检测 V_A 总含量,结果见图3。

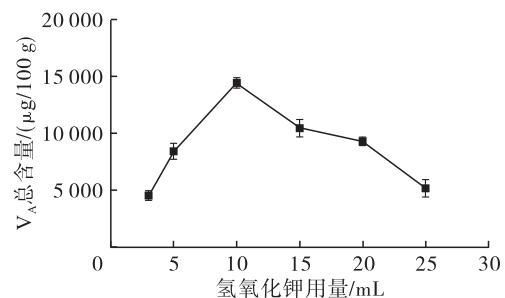


图3 氢氧化钾用量对水浴皂化法的影响

由图3可知,随着质量分数为50%的氢氧化钾用量的增加, V_A 总含量呈先上升后下降的趋势,在50%氢氧化钾用量为10 mL时, V_A 总含量达到最大值,此后随着50%氢氧化钾用量的增多, V_A 总含量开始下降,这可能是因为加入了过多的碱,加速了游离 V_A 的氧化破坏。因此,在水浴皂化法中选择50%氢氧化钾用量为10 mL。

2.2.1.2 室温皂化法

采用室温皂化法,在不同氢氧化钾(质量分数50%)用量下,对龙趸石斑鱼肝脏中的 V_A 进行提取,并采用反相色谱法检测 V_A 总含量,结果见图4。

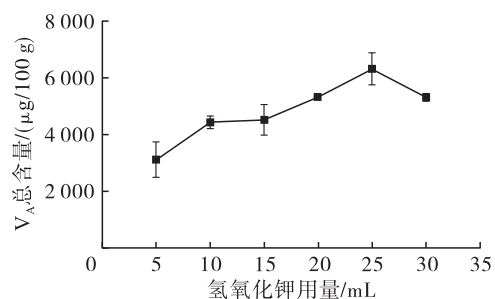


图4 氢氧化钾用量对室温皂化法的影响

由图4可知,随着50%氢氧化钾用量的增多, V_A 总含量呈先平缓上升后下降的趋势,50%氢氧化钾用量为25 mL时, V_A 总含量达最大值,随后再增加氢氧化钾用量, V_A 总含量下降。因此,在室温皂化法中选择50%氢氧化钾用量为25 mL。

2.2.1.3 直接提取法

直接提取法是利用超声的空化效应辅助有机溶剂浸提,从而加速细胞内物质的释放^[21]。超声时间过短则 V_A 提取效果不好,超声时间过长又会造成能源浪费。采用直接提取法,在不同的超声时间下,对龙趸石斑鱼肝脏中的 V_A 进行提取,并采用反相色谱法检测 V_A 总含量,结果见图 5。

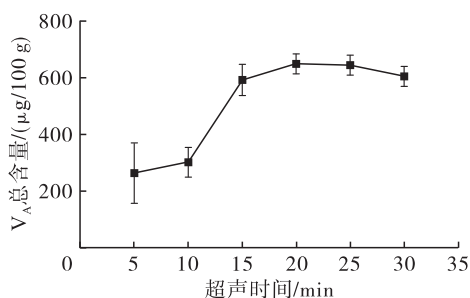


图5 超声时间对直接提取法的影响

由图 5 可知,随着超声时间的延长, V_A 总含量呈先上升后平稳的变化趋势,超声 20 min 时, V_A 总含量最高,但与超声 15 min 时的 V_A 总含量没有显著差异。因此,选择超声时间为 15 min。

2.2.2 不同提取方法的精密度比较

按照 2.2.1 确定的条件,分别采用 3 种样品预处理方法对龙趸石斑鱼肝脏中的 V_A 进行提取,并采用反相色谱法检测 V_A 总含量,在一天内连续进样 4 次,连续测定 3 d,以相对标准偏差(RSD)来表示精密度(RSD 越大精密度越小),计算不同提取方法的日内 RSD 及日间 RSD,结果见表 1。

表 1 3 种样品预处理方法的 RSD 比较 %

预处理方法	平均日内 RSD	平均日间 RSD
水浴皂化法	1.07	10.64
室温皂化法	1.39	2.77
直接提取法	6.91	10.44

由表 1 可知:水浴皂化法与室温皂化法的日内 RSD 分别为 1.07% 和 1.39%,这两种提取方法的差值较小,而与直接提取法的日内 RSD(6.91%) 差值较大;室温皂化法的日间 RSD 最小,为 2.77%,而水浴皂化法与直接提取法的日间 RSD 较大。这可能是因为室温皂化法的反应温度较为温和,而水浴皂化法反应温度较高, V_A 不稳定且对温度敏感,放置时间越长 V_A 损失越多^[22] 导致,而直接提取法则在超声过程中易发生乳化现象造成整个体系不稳定,对检测造成一定影响,因而使得其 RSD 较大,此与姜波等^[23] 的研究结果一致。3 种样品预处理方法的日内 RSD 均小于 10%, 日间 RSD 均小于 15%, 均符合分析方法的要求^[24]。

2.2.3 不同提取方法 V_A 含量的比较

按照 2.2.1 确定的条件,分别采用 3 种样品预处理方法对龙趸石斑鱼肝脏中的 V_A 进行提取,并采用反相色谱法检测 V_A 含量,结果如图 6 所示。

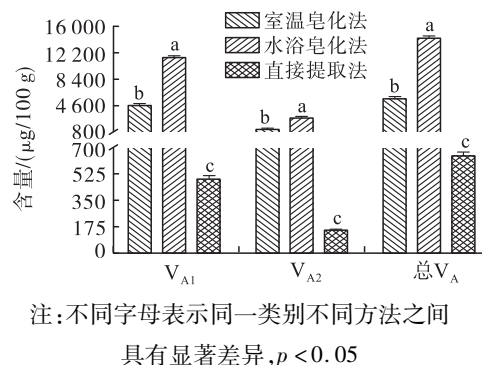


图 6 3 种预处理方法龙趸鱼肝脏中 V_A 含量比较

由图 6 可知,在 3 种样品预处理方法中,水浴皂化法 V_{A1} 、 V_{A2} 含量及 V_A 总含量均显著高于室温皂化法及直接提取法($p < 0.05$),而室温皂化法 V_{A1} 、 V_{A2} 含量及 V_A 总含量均显著高于直接提取法($p < 0.05$)。

本研究结果显示直接提取法 V_A 含量最低。不同提取方法所适用试验对象不同,虽然直接提取法对水貂肾脏^[12]、奶粉^[18]及植物油^[23]中 V_A 的提取效果良好,但根据本研究结果此方法并不适合龙趸石斑鱼肝脏中 V_A 的提取。室温皂化法因没有加热处理,作用更温和,反应速率也较低,而本研究对象的脂肪含量高,因此在室温条件下其所需的皂化反应时间更长,然而长时间暴露于碱性环境中对 V_A 反而造成了破坏,这可能是室温皂化法 V_A 含量低于水浴皂化法的原因。经过对比分析,结合表 1 试验结果,选择水浴皂化法对样品进行预处理。

2.2.4 水浴皂化法的加标回收率

向均质处理的龙趸石斑鱼肝脏中分别按低、中、高 3 种水平加入 V_{A1} 、 V_{A2} 标准品,然后采用水浴皂化法进行预处理,再采用反相色谱法检测 V_A 含量,计算加标回收率,结果见表 2。

表 2 加标回收率

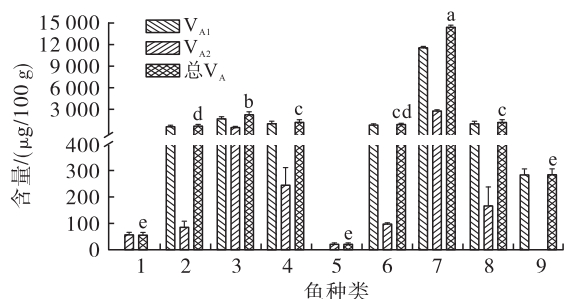
V_A	样品中含量/ μg	加标量/ μg	测定值/ μg	回收率/%	平均回收率/%
V_{A1}	11.73	4.69	16.62	104.26	104.52
	11.45	6.87	18.21	98.40	
	11.59	9.27	21.87	110.90	
V_{A2}	2.82	1.16	3.79	83.62	90.94
	2.90	1.64	4.37	89.63	
	2.74	2.26	4.99	99.56	

由表 2 可知, V_{A1} 加标回收率在 98.40% ~

110.90%之间, V_{A2} 加标回收率在83.62%~99.56%之间,回收率良好。综合以上结果本研究选择水浴皂化法进行 V_A 的提取,由于水浴皂化法日间RSD相对较大,因此需在提取当天尽快测定。

2.3 9种经济鱼类肝脏 V_A 含量比较

选取草鱼、乌鳢、金鲳鱼、点篮子鱼、花鲢、珍珠龙胆石斑鱼、龙趸石斑鱼、罗非鱼、大口黑鲈这9种常见的经济鱼类进行研究,其中草鱼、乌鳢、花鲢、罗非鱼、大口黑鲈为淡水鱼,其余为海水鱼。将这些鱼类的肝脏采用水浴皂化法进行预处理,再采用反相色谱法检测 V_A 含量,结果见图7。



注:1. 乌鳢;2. 草鱼;3. 花鲢;4. 罗非鱼;5. 大口黑鲈;6. 金鲳鱼;7. 龙趸石斑鱼;8. 珍珠龙胆石斑鱼;9. 点篮子鱼。对 V_A 总含量进行分析,不同字母表示具有显著差异, $p < 0.05$

图7 9种经济鱼类肝脏 V_A 含量比较

由图7可见,在这9种鱼中,龙趸石斑鱼肝脏中 V_A 总含量为14413.78 $\mu\text{g}/100\text{g}$,显著高于其他鱼 ($p < 0.05$),花鲢肝脏中 V_A 总含量为2337.36 $\mu\text{g}/100\text{g}$,低于龙趸石斑鱼但显著高于其他鱼 ($p < 0.05$),珍珠龙胆石斑鱼及罗非鱼肝脏中 V_A 总含量分别为1265.13、1287.85 $\mu\text{g}/100\text{g}$,显著高于乌鳢、草鱼、大口黑鲈及点篮子鱼 ($p < 0.05$),金鲳鱼肝脏中 V_A 总含量为1019.71 $\mu\text{g}/100\text{g}$,草鱼肝脏中 V_A 总含量为765.03 $\mu\text{g}/100\text{g}$,两者均显著高于乌鳢、大口黑鲈及点篮子鱼 ($p < 0.05$),乌鳢、大口黑鲈及点篮子鱼相比其他鱼肝脏中 V_A 总含量较低,分别为57.01、23.02、287.56 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。乌鳢和大口黑鲈肝脏中仅含 V_{A2} ,点篮子鱼肝脏中仅含 V_{A1} ,其他6种鱼中都含有 V_{A1} 、 V_{A2} 两种类型的 V_A 。

在本研究中淡水鱼类肝脏均含有 V_{A2} ,一般来说 V_{A2} 多存在于淡水鱼类中,但随着研究的深入,发现不少海水鱼体内也存在 V_{A2} 。本研究共测定了4种海水鱼,其中金鲳鱼、龙趸石斑鱼、珍珠龙胆石斑鱼这3种海水鱼类肝脏中均存在 V_{A2} 。Kondrashev等^[25]在叉线六线鱼及线鳃鱼这两种海水鱼体内也发现存在比例不低的 V_{A2} 。研究表明,脂溶性维生素不能通过体液排出体外,易在体内累积,肝脏中 V_A 的含量随着饮食中 V_A 水平的增加而升高,且两

者呈显著线性正相关^[26]。本研究选取的9种鱼均为人工饲养,龙趸石斑鱼在这几种鱼中个体最大,养殖时间最长,体内蓄积的 V_A 含量也最高。不同鱼类肝脏中 V_A 种类及含量的不同,与鱼种类、个体大小、自身的食性及饲养管理水平等多方面因素相关^[27]。

3 结论

本文通过筛选鱼类肝脏中 V_A 提取的样品预处理方法和检测方法对鱼类肝脏中 V_A 含量进行测定,确定水浴皂化法能最多地将鱼肝脏中 V_A 提取出来,反相色谱法检测分离 V_{A1} 、 V_{A2} 情况良好、稳定性高,水浴皂化法结合反相色谱法适用于鱼类肝脏中 V_A 的分析测定。 V_A 在鱼类肝脏中含量丰富,在检测的9种鱼中,除了乌鳢和大口黑鲈外,其他鱼类肝脏中 V_A 总含量均达200 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 以上,其中海水鱼龙趸石斑鱼肝脏中 V_A 总含量最高,达到14413.78 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。研究结果为天然 V_A 新资源的开发提供了前期基础数据。

参考文献:

- [1] MASON J, GREINER T, SHRIMPSON R, et al. Vitamin A policies need rethinking[J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44(1): 283-292.
- [2] MEDEIROS S R, PINHEIRO - ROSA N, LEMOS L, et al. Vitamin A supplementation leads to increases in regulatory CD4 + Foxp3 + LAP + T cells in mice[J]. *Nutrition*, 2015, 31(10): 1260-1265.
- [3] Micronutrient deficiencies: vitamin A deficiency[EB/OL]. [2021-06-28]. <https://apps.who.int/nutrition/topics/vad/en/index.html>.
- [4] HERRERO B M C, GRANADO L F, BLANCO N I, et al. Retinol, α - and γ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A- and E-fortified dairy products commercialized in Spain[J]. *Int Dairy J*, 2004, 15(5): 521-526.
- [5] MCGEENEY B E, FRIEDMAN D I. Pseudotumor cerebri pathophysiology[J]. *Headache*, 2014, 54(3): 445-458.
- [6] GESTO M, CASTRO L F C, REIS - HENRIQUES M A, et al. Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comp Biochem Physiol A: Physiol*, 2012, 161(1): 69-78.
- [7] 林春波, 吴鹏, 唐旭, 等. 我国鱼肝油产品开发现状、存在问题及发展策略[J]. *中国油脂*, 2021, 46(6): 21-24.
- [8] CARLOTTI M E, ROSSATTO V, GALLARATE M. Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation[J]. *Int J Pharm*, 2002, 240(1): 85-94.

- [9] MIAN N R, MUHAMMAD A, RASHIDA A. Stability of vitamins during extrusion [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2009, 49(4): 361–368.
- [10] KAMAL – ELDIN A, GORGEN S, PETTERSSON J, et al. Normal – phase high – performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols: comparison of different chromatographic columns [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 881(1): 217–227.
- [11] 中华人民共和国药典编委会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [12] REBECA C, SUANA C. Direct analysis of vitamin A, vitamin E, carotenoids, chlorophylls and free sterols in animal and vegetable fats in a single normal – phase liquid chromatographic run [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1565: 81–88.
- [13] KÄKELÄ A, KÄKELÄ R, HYVÄRINEN H. Importance of the kidneys in metabolism of vitamins A₁ and A₂ and their fatty acyl esters in mink feeding on fish – based diets and exposed to Aroclor 1242 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 187(2): 118–127.
- [14] ENRIGHT J M, TOOMEY M B, SATO S Y, et al. Cyp27c1 red – shifts the spectral sensitivity of photoreceptors by converting vitamin A₁ into A₂ [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(23): 3048–3057.
- [15] CORBO J C. Vitamin A₁/A₂ chromophore exchange: its role in spectral tuning and visual plasticity [J]. *Dev Biol*, 2021, 475(12): 145–155.
- [16] DEFO M A, PIERRON F, SPEAR P A, et al. Evidence for metabolic imbalance of vitamin A₂ in wild fish chronically exposed to metals [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012, 85: 88–95.
- [17] 刘波, 郎昭滨, 殷晓红, 等. 高效液相色谱法测定乳粉中维生素 A、D [J]. *中国乳品工业*, 2003, 31(2): 36–38.
- [18] NIMALARATNE C, SUN C X, WU J P, et al. Quantification of selected fat soluble vitamins and carotenoids in infant formula and dietary supplements using fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Food Res Int*, 2014, 66: 69–77.
- [19] ROOS N, CHAMNAN C, LOEUNG D, et al. Freshwater fish as a dietary source of vitamin A in Cambodia [J]. *Food Chem*, 2006, 103(4): 1104–1111.
- [20] 郑熠斌, 黄百芬, 任一平. 正相高效液相色谱法测定食物中 8 种维生素 E 异构体及维生素 A [J]. *色谱*, 2016, 34(7): 692–696.
- [21] 温春燕, 胡妍, 周发, 等. 不同方法提取仙人掌果籽油的比较研究 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(8): 1–5.
- [22] 全思思. 超高效液相色谱/超临界流体色谱 – 串联质谱联用技术同时测定婴幼儿配方乳粉中多种维生素的研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [23] 姜波, 胡文忠, 刘长建, 等. HPLC 法同时测定植物油中维生素 A 和不同构型维生素 E 含量 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(3): 320–323, 334.
- [24] 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [25] KONDRASHEV S L, LAMASH N E. Unusual A₁/A₂ – visual pigment conversion during light/dark adaptation in marine fish [J]. *Comp Biochem Physiol A: Physiol*, 2019, 238: 1150–1160.
- [26] 刘宁, 崔桂山, 杨玲, 等. 冬季条件下维生素 A 水平对蛋鸡抗氧化能力及血清、肝脏和鸡蛋维生素 A 含量的影响 [J]. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2209–2214.
- [27] 连雪原, 陈乃松, 王孟乐, 等. 大口黑鲈维生素 A 需求量 [J]. *动物营养学报*, 2017, 29(10): 3819–3830.

(上接第 140 页)

流转连通,切实取得了人员优化、费用降低的效果以及较好的社会效益。工作流程自动化是一个持久性的、不断完善和提升的过程,未来将持续性优化的几个关键点如下:

(1) 鉴于增值税专用发票尚未实现电子化,当前供应商需要进行发票邮寄、采购业务人员需要进行纸质装订。未来将要实现在采购平台中通过税务系统接口进行发票接收,以及接收后直接推送资金系统付款。

(2) 鉴于每个供应商认证过程中,当前只有通过自动与国家企业信用信息公示系统进行真伪校

验。未来将要实现通过天眼查和企查查等第三方接口自动排查投标方公司间、股东间是否存在关联关系,采购过程是否有围标、串标等行为。

(3) 鉴于采购业务流程自动化的实现,是集成了多个系统,但是系统中积累、存储的各项真实生产环境的大量数据却未被充分利用与发挥价值。未来将要实现数据助力业务,通过数据挖掘等技术帮助企业做出最优决策、预测分析等数字化服务。

参考文献:

- [1] 美国管理会计师协会. 管理会计公告: 第 3 辑 [M]. 北京: 人民邮电出版社, 2013: 406–430.
- [2] JILES L. 管理你的机器人程序 [J]. *新理财*, 2020(5): 65–67.