

分光光度法测定海捕虾中 4-己基间苯二酚

施进¹, 胡兴娟¹, 章伟锋², 周静峰², 袁高峰³, 王芳菲³, 余辉^{2*}

(1. 舟山海关综合技术服务中心, 舟山 316022; 2. 浙江药科职业大学食品学院, 宁波 315500;
3. 浙江海洋大学食品与药学学院, 舟山 316022)

摘要: **目的** 基于分光光度法建立检测海捕虾中 4-己基间苯二酚(4-hexylresorcinol, 4HR)的分析方法。**方法** 用乙腈-二氯甲烷溶液提取 4HR, 经 Sep-Pak NH₂ 固相萃取柱净化, 4HR 与固蓝 RR 盐(fast blue RR salt, FBRR)在碱性介质中反应生成红色偶合产物, 进行比色定量。**结果** 本方法在 0~90 µg/mL 范围内具有良好的线性, 相关系数 $r^2=0.9998$, 其检出限和定量限分别是 1.019 µg/mL 和 3.087 µg/mL。3 个不同加标水平(0.5、1.0、2.0 µg/g)的平均回收率为 86.30%~93.25%, 相对标准偏差为 1.57%~5.54%。本方法与现行标准 GB 5009.280—2020《食品安全国家标准 食品中 4-己基间苯二酚残留量的测定》进行比对, 两种方法检测结果无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 本法灵敏、准确可靠, 可用于海捕虾中 4HR 的分析检测。**关键词:** 分光光度法; 4-己基间苯二酚; 海捕虾

Determination of 4-hexylresorcinol in marine-capture shrimp by spectrophotometric method

SHI Jin¹, HU Xing-Juan¹, ZHANG Wei-Feng², ZHOU Jing-Feng²,
YUAN Gao-Feng³, WANG Fang-Fei³, YU Hui^{2*}

(1. Zhoushan Customs Comprehensive Technical Service Center, Zhoushan 316022, China; 2. College of Food, Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315500, China; 3. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of the content of 4-hexylresorcinol (4HR) in marine-capture shrimp by spectrophotometric method. **Methods** The 4HR was extracted with acetonitrile-dichloromethane from sample. After purification by Sep-Pak NH₂ solid-phase extraction column, the 4HR coupled with fast blue RR salt (FBRR) in alkaline medium, yielding red coupling product that could be quantified colorimetrically. **Results** Good linearity was observed for 4HR in the range 0-90 µg/mL with a correlation coefficient of 0.9998. The limits of detection and limits of quantitation were 1.019 µg/mL and 3.087 µg/mL, respectively. The average recoveries were 86.30%–93.25% and the relative standard deviations were 1.57%–5.54% at 3 spiked levels of 0.5, 1.0, 2.0 µg/g. Meanwhile, compared with the current standard of GB 5009.280—2020 *National food safety standards-Determination of 4HR residues in foods*, the results from 2 kinds of methods had no distinguishability ($P>0.05$). **Conclusion** The new method is sensitivity, accuracy, credibility, which can be

基金项目: 舟山科技计划项目(2021C31008)、舟山市公益类科技项目(2022C31050)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of Zhoushan (2021C31008), and the Scientific Research Project of Zhoushan City (2022C31050)

*通信作者: 余辉, 博士, 副教授, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: ahjnyh@163.com

*Corresponding author: YU Hui, Ph.D, Associate Professor, Zhejiang Pharmaceutical University, No.666, Siming Road, Fenghua District, Ningbo 315500, China. E-mail: ahjnyh@163.com

applied for analysis and detection of 4HR residues in marine-capture shrimp.

KEY WORDS: spectrophotometric method; 4-hexylresorcinol; marine-capture shrimp

0 引言

海捕虾具有高蛋白、低脂肪等特点,是优质蛋白质的来源之一。但是,海捕虾一旦捕获后就开始褐变,极其影响其市场价值与消费者的接受度^[1]。众所周知,4-己基间苯二酚(4-hexylresorcinol, 4HR)是一种能够抑制多酚氧化酶褐变的物质,已被广泛应用于食品、制药和化妆品等行业^[2-4]。4HR 最早被发现能有效抑制虾类褐变^[5],后来陆续发现4HR 对果蔬褐变有抑制作用^[6-7],甚至还有防腐效果^[8]。

尽管 4HR 被认为是安全的食品添加剂,但其毒理学数据仍不完善^[9],而且高 4HR 残留量会使虾肉产生令人不愉快的味道^[10-11]。为确保虾的品质与安全性,欧盟规定甲壳类中 4HR 的最大残留限量为 2 mg/kg,联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO)和加拿大规定虾类产品中 4HR 的最大残留限量为 1 mg/kg。1996 年,我国就将 4HR 纳入 GB 2760 标准中,并明确规定鲜水产(仅限虾类)中 4HR 的最大残留限量为 1 mg/kg。当前,我国海捕虾主要采用撒保鲜粉与冰藏相结合方式来保鲜与抑制褐变,若保鲜粉中含有 4HR,会造成部分虾肉中 4HR 含量超标,可能会对人体产生一定危害^[12]。考虑到保鲜粉的使用不可避免,有必要建立一种简捷的 4HR 检测方法,以便于对其残留的监测与控制。

目前,关于 4HR 检测方法主要分为 3 类:(1)基于分析化学技术,如电分析化学法^[13-15]、氧化还原滴定法,前者需要特制的电极且检出限高,后者前处理步骤烦琐、试剂种类多且消耗量大,但因仪器设备及操作简单而被采纳为 AOAC 标准(AOAC 933.10),用于测定药物中 4HR 含量;(2)基于光谱技术,如傅立叶变换红外光谱法,但该方法的准确度和精密度较差^[16];(3)基于色谱技术,如薄层层析-光密度法^[17]、气相色谱-氢火焰离子化检测器法/质谱法^[18-19]、高效液相色谱-紫外检测器法/二极管阵列检测器法/荧光检测器法/串联质谱法^[20-23]、超高效液相色谱-荧光检测器法/串联质谱法^[24-25]。其中,高效液相色谱-荧光检测器法(high performance liquid chromatography with fluorescence detector, HPLC-FLD)作为一种灵敏度和准确度高的定性定量检测技术,被采纳于我国 GB 5009.280—2020《食品安全国家标准 食品中 4-己基间苯二酚残留量的测定》,用于虾蟹中 4HR 残留量的分析检测。据调查,因仪器价格贵、利用率低、维护成本高以及对操作人员技术要求高等原因,当前仅有 5%水产加工企业购置了高效液相色谱仪。因此,

急需建立一种操作简捷、仪器设备简单、结果准确可靠的 4HR 分析检测方法,以便于被水产加工企业和基层监管部门应用。

相比于其他 4HR 检测方法,分光光度法因其仪器设备简单、操作方便、实用性强等特点而更适于广泛应用。常用于测定酚类化合物含量的分光光度法有:酒石酸亚铁比色法、4-氨基安替比林比色法、紫外分光光度法、福林酚比色法、重氮偶合比色法等。酒石酸亚铁比色法需通过经验系数计算而导致结果偏高,4-氨基安替比林比色法适于单羟基酚和邻甲苯酚的测定,紫外分光光度法、福林酚比色法和重氮偶合比色法因提取液中酪氨酸、色氨酸等物质而影响结果准确性。重氮偶合比色法是基于酚类化合物与重氮化合物的显色反应,研究报道重氮化合物固蓝 B 盐(fast blue B salt, FBB)和固蓝 RR 盐(fast blue RR salt, FBRR)对 5-*n*-烷基间苯二酚具有高度特异性^[26],但是否对 4HR 具有特异性却未知。因此,本研究采用有机溶剂提取与固相萃取排除干扰物^[27],并筛选出对 4HR 具有特异性的重氮化合物,利用其与 4HR 的特异性显色偶合反应,建立 4HR 分光光度检测方法,同时,根据 ICH 指南对该方法进行验证^[28],并与现行标准 GB 5009.280—2020 比对,以期建立一套实用、方便、准确可靠的检测海捕虾中 4HR 的分析方法,旨在为海捕虾中 4HR 残留监控提供简单方便的评价工具。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

哈氏仿对虾、中华管鞭虾(沈家门水产码头)。

4HR 标准品(纯度≥98.0%,美国 Sigma 公司);FBB、FBRR、虾青素标准品(纯度 96%)、盐酸酪胺、L-酪氨酸、L-组氨酸、盐酸组胺(生化试剂)、甲醇、乙酸、K₂CO₃、HCl、Na₂CO₃、氨水、乙腈、二氯甲烷、正己烷、丙酮(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司);Sep-Pak NH₂固相萃取柱(500 mg、3 mL,美国 Waters 公司);乙腈(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 仪器与设备

ME204 型分析天平(精度 0.0001 g,瑞士梅特勒-托利多集团);Evolution 60S 型紫外可见分光光度计(美国热电公司);IKA T18 型高速分散机(德国 IKA 集团);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);5804R 型高速冷冻离心机(德国艾本德公司);Waters e2695 型高效液相色谱仪带 2475 荧光检测器(美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制

4HR 标准储备液: 用甲醇配制成 1.0 mg/mL 4HR 储备液(m:V), 于-18℃冰箱储存, 有效期 1 个月, 临用前用甲醇将储备液稀释成标准工作溶液; FBB 储备液或 FBRR 储备液: 用 1.0%乙酸甲醇溶液(V:V)配制成 0.05% FBB 储备液或 0.05% FBRR 储备液(m:V), 4℃放置 7 d 后使用, 临用前按储备液:1.0%乙酸甲醇溶液=1:5 (V:V)稀释成工作液; 对硝基苯胺重氮盐(p-nitroaniline diazo salt, pNAD)工作液: 按 AOAC 957.07 方法制备, 现用现制。

1.3.2 显色剂的筛选

分别吸取 200 μL 0~50 $\mu\text{g/mL}$ 4HR 标准工作液于试管里, 依次加入 150 μL 10% K_2CO_3 (m:V)溶液、2 mL FBB 或 FBRR 工作液, 涡流混匀, 暗处静置 15 min, 于 300~800 nm 范围内间隔 1 nm 进行波长扫描。

分别吸取 200 μL 0~50 $\mu\text{g/mL}$ 4HR 标准工作液于试管中, 依次加入 150 μL HCl 溶液、390 μL 10% K_2CO_3 、600 μL pNAD 工作液和 400 μL 纯水, 涡流混匀, 暗处静置 15 min, 于 300~800 nm 范围内间隔 1 nm 进行波长扫描。

1.3.3 比色条件的确定

以吸光值为指标, 用 200 μL 40 $\mu\text{g/mL}$ 4HR 标准工作液来确定比色条件。基本比色条件: 依次向盛 4HR 标准工作液的试管中加入 150 μL 10% K_2CO_3 溶液、2 mL FBRR 工作液, 涡流混匀, 暗处静置 15 min, 于 473 nm 测其吸光值。考察 4℃下 FBRR 储备液的储存时间(7~32 d)对 4HR-FBRR 偶合产物生成量(吸光值)的影响, 选择合适的储存时间; 考察碱化剂种类(10% K_2CO_3 溶液、10% Na_2CO_3 溶液、氨水)对 4HR-FBRR 偶合产物生成量的影响, 选择合适的碱化剂; 考察两种光照条件(黑暗处、光亮处)对 4HR-FBRR 偶合产物生成量及其稳定性的影响, 选择合适的偶合反应条件; 考察不同浓度 FBRR 工作液(FBRR 储备液:1.0%乙酸甲醇溶液=1:1~1:15, V:V)对 4HR-FBRR 偶合产物生成量的影响, 选择合适浓度的 FBRR 工作液。

1.3.4 干扰物及其消除

各干扰物(酪氨酸、组氨酸、组胺、酪胺、虾青素)用 80%甲醇溶液(V:V)配制成 40 $\mu\text{g/mL}$ 干扰物溶液, 各吸取 200 μL 上述干扰物溶液于试管中, 再按 1.3.3 基本比色条件进行偶合反应, 于 300~800 nm 范围内间隔 1 nm 进行波长扫描。

用乙腈-二氯甲烷溶液(7:3, V:V)将虾青素和 4HR 配制成 40 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 考察虾青素和 4HR 在固相萃取柱上的解吸附特性。600 μL 虾青素或 200 μL 4HR 上述溶液在平衡好的 Sep-Pak NH_2 固相萃取柱上进行分步洗脱。洗脱条件: 洗脱速度 1 mL/min, 洗脱顺序为正己烷、甲醇丙酮溶液(1:1, V:V), 洗脱体积 6 mL, 收集各洗脱组分, 分别命名为虾青素-1 或 4HR-1、虾青素-2 或 4HR-2。各洗脱组分于 45℃氮气吹干, 残留物分别用 200 μL 甲醇超声溶解, 再按 1.3.3 基本比色条件进行偶合反应和测定吸光值。

1.3.5 方法验证

(1)线性范围、检出限和定量限

分别吸取 200 μL 0~90 $\mu\text{g/mL}$ 4HR 标准工作液于试管中, 按 1.3.3 基本比色条件进行偶合反应和测定吸光值, 重复 3 次实验。最终, 获得 4HR 质量体积浓度-吸光值回归方程及相关系数 r^2 。根据 ICH 指南^[28], 检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)分别为 3.3s/b、10s/b, 其中 s 为 20 次试剂空白值的标准偏差, b 为标准曲线回归方程的斜率。

(2)精密度与准确度

取中华管鞭虾可食部分, 组织捣碎成匀浆, 称取 10.00 g 匀浆于 100 mL 螺口塑料离心管, 依次加入一定体积的 100 $\mu\text{g/mL}$ 4HR 标准工作液、30 mL 乙腈-二氯甲烷溶液, 12000 r/min 均质 2 min, 旋紧盖后超声 10 min, 10000 r/min 离心 5 min, 上清液移入 100 mL 蒸馏瓶中, 残渣重复上述操作 1 次, 合并上清液于 45℃旋转蒸发至近干。向蒸馏瓶中加入 2.5 mL 二氯甲烷, 超声溶解, 溶液转至已活化 Sep-Pak NH_2 固相萃取柱, 重复操作 2 次。待溶液近干后, 按 1.3.4 洗脱条件进行洗脱、收集(甲醇丙酮溶液)、浓缩和复溶, 再按 1.3.3 基本比色条件进行偶合反应和测定吸光值。

1.3.6 样品测定

从市场中各抽取 15 批次的中华管鞭虾(1[#]~15[#]样品)和哈氏仿对虾(16[#]~30[#]样品), 分别采用 1.3.5(2)的分光光度法和现行标准 GB 5009.280—2020 的 HPLC-FLD 对其 4HR 含量进行测定。

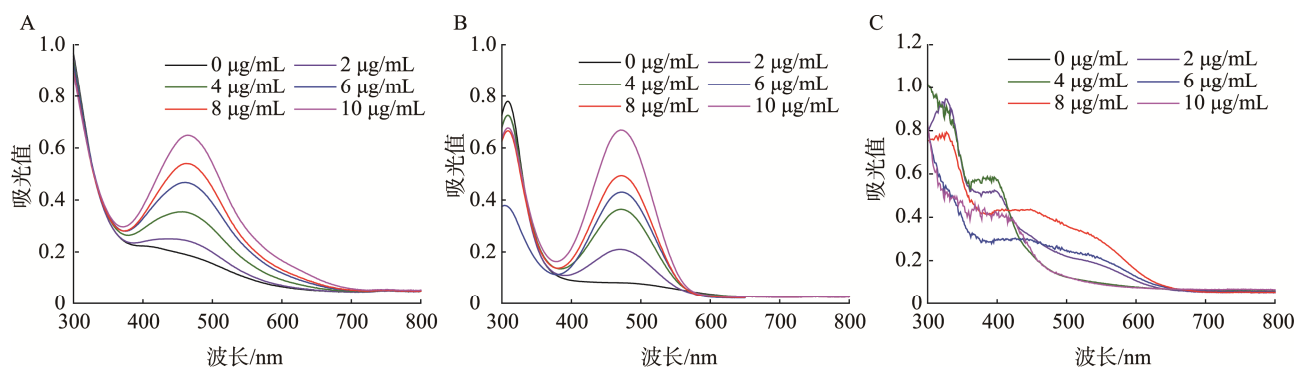
1.4 数据处理

结果用平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 采用 IMB SPSS Statistic 19.0 软件的 Duncan 检验对数据进行方差分析, 显著水平为 $P<0.05$, 利用 OriginLab Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 显色剂的筛选与检测波长的确定

在碱性介质中, 重氮盐与间苯二酚发生偶合反应生成显色偶合产物, 该方法对微量 5-烷基间苯二酚具有较高的专一性和灵敏度^[26], 是否适于 4HR 的检测还有待验证。因此, 考察了 FBB、FBRR、pNAD 3 种重氮盐与 4HR 偶合反应溶液的光谱特性。如图 1 所示, FBB 和 FBRR 与 4HR 偶合反应溶液均在 400~550 nm 范围有一吸收峰, 表明反应生成了 4HR-FBB 和 4HR-FBRR 偶合产物且在 400~550 nm 范围有吸光值; 而 pNAD 与 4HR 偶合反应溶液却无明显吸收峰, 说明反应未生成 4HR-pNAD 偶合产物或者该偶合产物在可见光范围内无吸光值。另外, 随着 4HR 浓度的减小, 4HR-FBB 的最大吸收波长由 465 nm 降至 440 nm; 而 4HR-FBRR 的最大吸收波长则稳定在 471~473 nm 范围。因此, 选择 FBRR 和 473 nm 作为后续实验的显色剂与检测波长。



注: A: FBB; B: FBRR; C: pNAD。

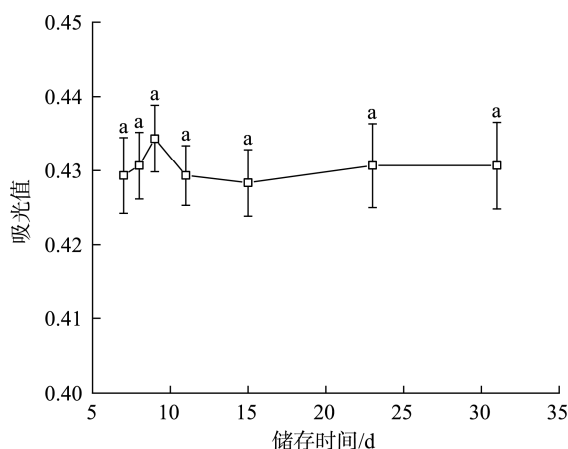
图1 3种显色剂与不同质量浓度4HR的耦合反应溶液的紫外可见吸收光谱图

Fig.1 Ultraviolet-visible absorption spectra of coupled reaction solutions of different mass concentration of 4HR with 3 kinds of color developing agents

2.2 比色条件的确定

2.2.1 储存时间

尽管较低 pH 可使重氮盐储备液具有很强的稳定性^[29], 但储存过程中储备液难免不受到光照、温度等因素的影响。因此, 考察 FBRR 储备液的储存时间对 4HR-FBRR 耦合产物生成量的影响, 结果如图 2 所示。图 2 反映出, 在 7~31 d 储存期内 4HR-FBRR 耦合产物的生成量无显著变化($P>0.05$), 表明 4℃下 FBRR 储备液性质较稳定, 且有效期可达 1 个月。



注: 图中不同小写字母表示组内差异显著($P<0.05$), 下同。

图2 储存时间对 4HR-FBRR 耦合产物生成量的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of storage time of FBRR stock solution on the generation of 4HR-FBRR coupling products ($n=3$)

2.2.2 碱化剂

碱化剂不仅对 4HR 与 FBRR 的耦合反应及其反应速率起着关键作用, 而且也影响着耦合产物的稳定性^[29]。因此, 考察了 3 种 pH 相近的碱化剂溶液对 4HR-FBRR 耦合产物生成量及其稳定性的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 当反应时间不大于 30 min, 10% Na_2CO_3 溶液与氨水两种碱化剂的 4HR-FBRR 耦合产物生成量比 10% K_2CO_3 溶液的高, 这与 SAMPIETRO 等^[30]的结果不同, 可能原因是这两种碱化剂

会使更多 4HR 变成带负电荷的亲核酚氧基离子, 从而攻击亲电的重氮离子生成更多 4HR-FBRR 耦合产物。进一步延长反应时间, 10% K_2CO_3 溶液的 4HR-FBRR 耦合产物生成量无显著变化($P>0.05$), 表明 K_2CO_3 对 4HR-FBRR 耦合产物的稳定性无显著影响, 这与张珺等^[31]的结果相似; 而其他两种碱化剂的 4HR-FBRR 耦合产物生成量则显著减小($P<0.05$), 说明这两种碱化剂会降低 4HR-FBRR 耦合产物的稳定性。综上所述, 后续实验采用 10% K_2CO_3 溶液作为碱化剂。

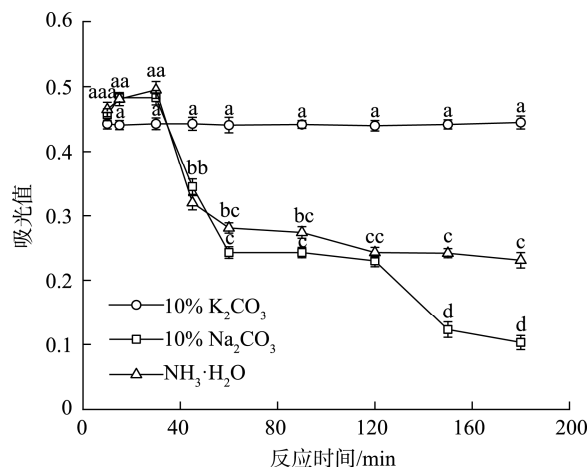


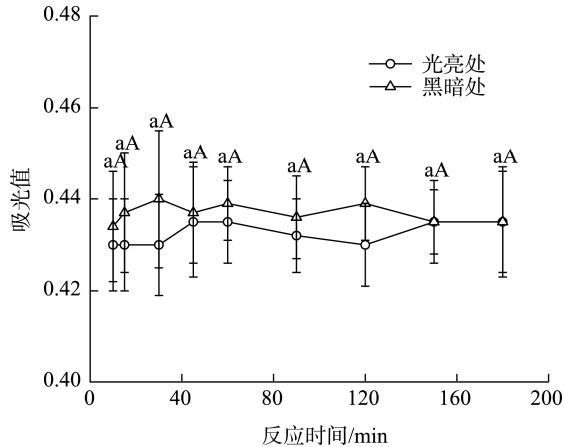
图3 碱化剂种类对 4HR-FBRR 耦合产物生成量及其稳定性的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of basifying reagent types on the generation and stability of 4HR-FBRR coupling products ($n=3$)

2.2.3 光照条件

重氮盐经曝光后会分解生成无色物质和氮气^[29]。研究显示, 光照极大降低 FBB 与 5-烷基(C15:0)间苯二酚的耦合产物生成量^[26], 而对 FBRR 与橄榄醇的耦合产物生成量却无显著影响^[32]。因此, 考察了两种光照条件对 4HR-FBRR 耦合产物稳定性的影响, 结果见图 4。图 4 显示, 在初始 120 min 内, 黑暗处的 4HR-FBRR 耦合产物生成量较光亮处的高, 但无显著差异($P>0.05$), 表明光照条件对 4HR-FBRR

偶合产物的稳定性无显著影响, 这与 SAMPIETRO 等^[30]的结果相似。另外, FBRR 储备液曝光 6 h 后会分解成无色溶液。因此, 为避免 FBRR 分解而影响结果准确性, 应先暗处偶合反应 15 min。



注: 图中不同大写字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 图 7 同。

图 4 光照条件对 4HR-FBRR 偶合产物稳定性的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of light intensities on the stability of 4HR-FBRR coupling products ($n=3$)

2.2.4 FBRR 工作液浓度

理论上, 1 分子 FBRR 可与 2 分子 4HR 发生偶合反应, 而偶联上的 1 分子 4HR 也可与 2 或 3 分子 FBRR 发生聚合反应^[33]。因此, 考察了 FBRR 工作液浓度对 4HR-FBRR 偶合产物生成量的影响, 结果见图 5。由图 5 可看出, 随着 FBRR 工作液浓度的增大, 4HR-FBRR 偶合产物生成量也逐渐升高; 当浓度大于 0.0083% (FBRR 储备液:1.0%乙酸甲醇溶液=1:5, V:V)时, 进一步增大浓度, 4HR-FBRR 偶合产物生成量却无显著差异($P > 0.05$), 表明 4HR 与 FBRR 偶合反应已达平衡。因此, FBRR 储备液与 1.0%乙酸甲醇溶液的体积比为 1:5 较适宜。

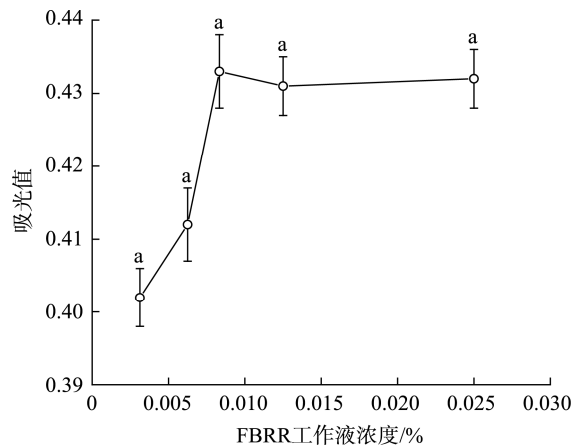


图 5 FBRR 工作液浓度对 4HR-FBRR 偶合产物生成量的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of concentration of FBRR working solution on the generation of 4HR-FBRR coupling products ($n=3$)

2.3 干扰实验

为排除虾肉中是否存在影响检测结果的干扰物, 考察了几种干扰物与 FBRR 的反应溶液的光谱特性, 结果见图 6。图 6 显示, 仅虾青素与 FBRR 的反应溶液在 400~550 nm 处有吸收峰, 证实虾青素-FBRR 偶合产物的生成^[34], 且该物质吸收峰与 4HR-FBRR 吸收峰基本重合, 从而影响 4HR 检测结果的准确性。因此, 为消除虾青素的影响, 考察了虾青素和 4HR 在氨基固相萃取柱上的吸附与解吸附特性, 结果见图 7。由图 7 可知, 虾青素经正己烷可完全洗脱, 而此时 4HR 则完全吸附于萃取柱上, 4HR 经甲醇丙酮溶液可完全洗脱。虾肉样品中含有一定量的虾青素, 势必会影响检测结果的准确性。因此, 在样品前处理中需纳入氨基固相萃取柱净化处理。

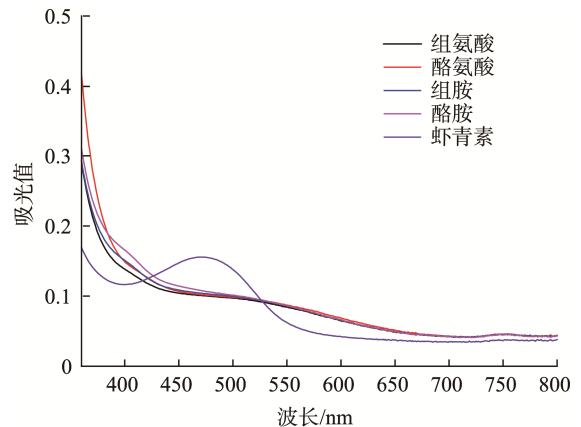


图 6 干扰物与 FBRR 反应溶液的紫外可见吸收光谱图

Fig.6 Ultraviolet-visible absorption spectra of interferences and FBRR reaction solutions

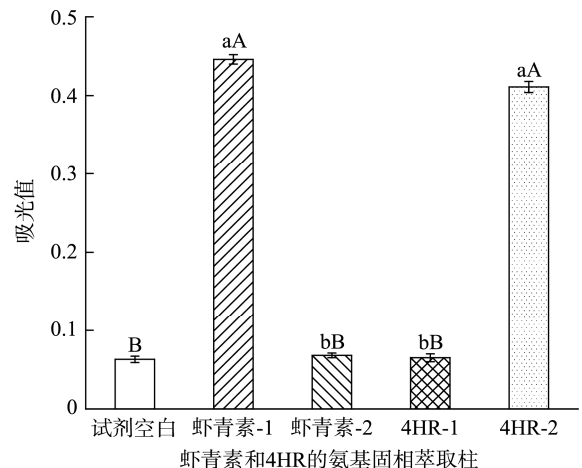


图 7 虾青素和 4HR 的氨基固相萃取柱的吸附与解吸附特性($n=3$)

Fig.7 Adsorption and desorption characteristics of Sep-Pak NH₂ SPE column for astaxanthin and 4HR ($n=3$)

2.4 方法验证

2.4.1 线性范围、检出限和定量限

本方法采用外标法定量分析, 配制 4HR 系列标准工

作溶液,以 4HR 质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光值(Y)为纵坐标,绘制标准工作曲线,并采用最小二乘回归法计算获得 4HR 质量浓度-吸光值回归方程及相关系数(r^2),如图 8 所示。在 0~90 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,4HR-FBRR 吸光值与 4HR 质量浓度的关系符合朗伯-比尔定律,标准工作曲线的回归方程为 $Y=0.00937X+0.06128$,相关系数 $r^2=0.9998$,表明线性回归模型可信,适用于 4HR 的定量分析。连续测定 20 次试剂空白吸光值,求出标准偏差,最终获得本方法的 LOD 和 LOQ 分别为 1.019 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.087 $\mu\text{g/mL}$ 。当称样量为 10.00 g 时, HPLC-FLD 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.0091 mg/kg 和 0.0228 mg/kg,新方法 LOD 和 LOQ 分别为 0.0204 mg/kg 和 0.0617 mg/kg,可用于海捕虾中 4HR 的分析检测。

2.4.2 精密度和准确度

方法日内精密度为日内系列重复测定结果的相对标准偏差。从表 1 可看出,相对标准偏差为 1.57%~5.54%,平均加标回收率为 86.30%~93.25%,符合 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》相关要求,而且随着 4HR 加标量增大,方法日内精密度、回收率和准确度均随之升高。方法日间精密度为连续 6 d 测定 1.0 $\mu\text{g/g}$ 加标量样品的检测结果的相对标准偏差,日间精密度($n=6$)为 5.78%。由此可知,本方法重复性良好、精密度和准确度高,可满足虾肉中 4HR 定量分析要求。

2.5 与现行标准比对

采用本研究的分光光度法和现行标准 HPLC-FLD 对

市售 30 份虾肉中 4HR 进行分析检测,结果显示,仅有 1 份中华管鞭虾(7[#]样品)和 2 份哈氏仿对虾(19[#]样品、28[#]样品)中检出含有 4HR(表 2),但均未超出 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定的最大限量,其余样品均未检出 4HR;分光光度法检测结果的相对偏差为 3.31%~14.9%,HPLC-FLD 的相对偏差为 1.66%~8.80%。另外,分光光度法检测结果比 HPLC-FLD 要高,但无显著性差异($P>0.05$),表明两种方法的检测结果有较好的一致性。本分光光度法具有操作简便、快捷(实验时间约 2 h)、设备简单等优点,可用于海捕虾中 4HR 残留的日常检测。

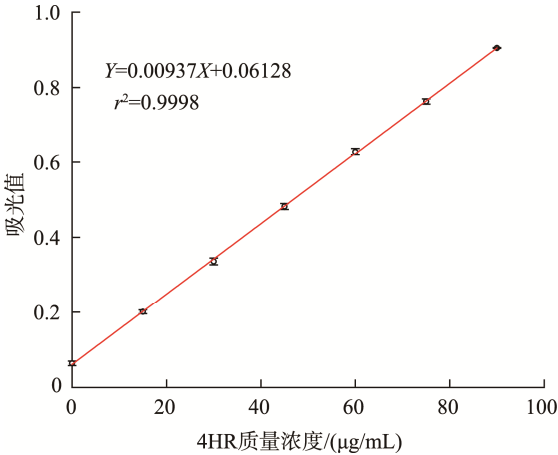


图 8 标准工作曲线($n=3$)
Fig.8 Standard working curve ($n=3$)

表 1 方法的精密度、准确度和回收率($n=6$)
Table 1 Precisions, accuracies and recoveries of 4HR in spiked samples ($n=6$)

参数	4HR 加标量/($\mu\text{g/g}$)		
	0.5	1.0	2.0
4HR 含量范围/($\mu\text{g/g}$)	0.393~0.468	0.883~0.946	1.821~1.901
4HR 平均回收量/($\mu\text{g/g}$)	0.432	0.914	1.865
标准偏差/%	2.39	2.11	2.93
相对标准偏差/%	5.54	2.30	1.57
平均加标回收率/%	86.30	91.37	93.25

表 2 两种检测方法比对结果($n=3$)
Table 2 Comparison results of 2 kinds of detection methods ($n=3$)

方法	4HR 含量/(mg/kg)			相对标准偏差/%
	7 [#] 样品	19 [#] 样品	28 [#] 样品	
分光光度法	0.682±0.036 ^a	0.528±0.039 ^a	0.429±0.032 ^a	3.31~14.9
HPLC-FLD	0.673±0.017 ^a	0.522±0.017 ^a	0.432±0.019 ^a	1.66~8.80

注: 同列中相同字母标记表示无显著性差异($P>0.05$)。

3 结 论

本研究建立了海捕虾中 4HR 的分光光度检测方法, 4HR 质量浓度在 0~90 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 其吸光度与其质量浓度符合朗伯-比尔定律, 相对标准偏差为 1.57%~5.54%, 平均加标回收率为 86.30~93.25%, LOD 和 LOQ 分别为 1.019 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.087 $\mu\text{g/mL}$, 该方法重复性好、精确度和准确度高。同时, 与现行标准 GB 5009.280—2020 比对, 两种方法的检测结果无显著性差异($P>0.05$)。本方法仪器设备简单、操作简便、快捷(约 2 h)、稳定性好(180 min 内), 适用于海捕虾中 4HR 的定性定量分析要求, 为海捕虾日常质量监督及其 4HR 相关检测标准提供了技术支撑。

参考文献

- [1] YU Q, LIU J, YANG J, *et al.* Postharvest preservation technologies for marine-capture shrimp: A review [J]. Food Bioprocess Technol, 2023, 1: 1–16.
- [2] GUPTA S, SOOD M, GUPTA N, *et al.* Food browning, its type and controlling measures: A review article [J]. Chem Sci Rev Lett, 2022, 11(44): 417–424.
- [3] KIM SG. 4-Hexylresorcinol: Pharmacologic chaperone and its application for wound healing [J]. Max Plast Reconstr Surg, 2022, 44(5): 36–38.
- [4] SHARIFF R, DU Y, DUTTA M, *et al.* Superior even skin tone and anti-ageing benefit of a combination of 4-hexylresorcinol and niacinamide [J]. Int J Cosmetic Sci, 2022, 44(1): 103–117.
- [5] MCEVILY AJ, IYENGAR R, OTWELL S. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis [J]. Food Technol, 1991, 45(9): 80–86.
- [6] MARTINEZ-ALVAREZ O, LOPEZ-CABALLERO ME, MONTERO P, *et al.* The effect of different melanosis-inhibiting blends on the quality of frozen deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*) [J]. Food Control, 2020, 109: 106889.
- [7] AL-ABBASY OY, ALI WI, AL-LEHEBE NIA. Inhibition of enzymatic browning in fruit and vegetable, review [J]. Samarra J Pure Appl Sci, 2021, 3(1): 56–73.
- [8] RASANE P, SINGH J, KAUR S, *et al.* Strategic advances in the management of browning in fruits and vegetables [J]. Food Bioprocess Technol, 2023, 1: 1–26.
- [9] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3610, Hexylresorcinol [EB/OL]. [2023-06-24]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3610#section=Health-Hazards> [2023-06-26].
- [10] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific opinion on the reevaluation of 4-hexylresorcinol (E586) as a food additive [J]. EFSA J, 2014, 12(4): 3643.
- [11] GOKOGLU N, GUMUS B, CEYLAN A, *et al.* Storage in ice incorporated antmelanotic agent and its effects on melanosis and quality of giant red shrimp (*Aristaeomorpha foliacea*) [J]. Food Biosci, 2022, 46: 101599.
- [12] Food and Drug Administration. Consumer antiseptic wash final rule. Questions and answers [EB/OL]. [2017-07-26]. <https://www.regulations.gov/document/FDA-2017-D-3906-0002> [2023-06-10].
- [13] KALIYARAJ SKA, COMPTON RG. Understanding carbon nanotube voltammetry: Distinguishing adsorptive and thin layer effects via “single-entity” electrochemistry [J]. J Phys Chem Lett, 2022, 13(24): 5557–5562.
- [14] CHENG Z, FAN Y, ZHANG L, *et al.* Preparation of co-enhanced gold nanoclusters and its application in the detections of 4-hexylresorcinol and Cr^{6+} [J]. J Mol Struct, 2023, 1275: 134712.
- [15] GEORGE A, CHERIAN AR, BENNY L, *et al.* Surface-engineering of carbon fibre paper electrode through molecular imprinting technique towards electrochemical sensing of food additive in shrimps [J]. Microchem J, 2023, 184: 108155.
- [16] YANG WG, HA JH, KIM SG, *et al.* Spectroscopic determination of alkyl resorcinol concentration in hydroxyapatite composite [J]. J Anal Sci Technol, 2016, 7(1): 1–5.
- [17] SHOKRY RF, BEBAWY LI, ELGHOBASHY MR, *et al.* Comparative stability-indicating chromatographic methods for determination of 4-hexylresorcinol in pharmaceutical formulation and shrimps [J]. J Pharmaceut Biomed, 2017, 145(25): 386–398.
- [18] 霍晓敏, 王立娜, 佟克兴, 等. 气相色谱法测定食品中的 4-己基-1,3-苯二酚[J]. 食品科技, 2010, 35(7): 281–283.
- HUO XM, WANG LN, TONG KX, *et al.* Determination of 4-hexylresorcinol in food by gas chromatograph [J]. Food Sci Technol, 2010, 35(7): 281–283.
- [19] 余颖. 气相色谱-质谱法测定甲壳类水产品中 4-己基间苯二酚残留[J]. 福建水产, 2015, 37(3): 227–232.
- YU Y. Determination of 4-hexylresorcinol residue in crustacea by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Fujian Fish, 2015, 37(3): 227–232.
- [20] NAKAZATO M, MATSUMOTO H, KASUYA Y, *et al.* Determination of 4-hexylresorcinol residues in prawns and crabs [J]. J Food Hyg Soc Jpn, 2005, 46(6): 282–285.
- [21] SMALLWOOD AW, RANIERI TL, SATZGER RD. Determination of 4-hexylresorcinol in crab meat [J]. J AOAC Int, 1998, 81(2): 488–491.
- [22] KIM YH, KIM JM, LEE JS, *et al.* Development and validation of an analytical method for the determination of 4-hexylresorcinol in food [J]. Food Chem, 2016, 190: 1086–1092.
- [23] KIM JM, KIM YH, LEE JS, *et al.* Monitoring on the 4-hexylresorcinol in various shrimp and crab meat products [J]. FASEB J, 2015, 29(S1): 740.4.
- [24] 高学慧, 郝云彬, 张小军, 等. 超高效液相色谱法测定水产品保鲜剂中 4-己基间苯二酚的含量[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2017, 36(6): 511–515.
- GAO XH, HAO YB, ZHANG XJ, *et al.* Determination of 4-hexylresorcinol in aquatic preservative by ultra performance liquid chromatography [J]. J Zhejiang Ocean Univ (Nat Sci Ed), 2017, 36(6): 511–515.
- [25] HAO Y, GAO X, XIA W. Determination of 4-hexylresorcinol in shrimp samples by solid phase extraction ultra performance liquid chromatography-

- tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2173.
- [26] GAJDA A, KULAWINEK M, KOZUBEK A. An improved colorimetric method for the determination of alkylresorcinols in cereals and whole-grain cereal products [J]. *J Food Compost Anal*, 2008, 21(5): 428–434.
- [27] 许星鸿, 丁子媛, 王迅, 等. 高效液相色谱法检测水产品中双酚 A 及其蓄积特征研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(20): 6482–6487.
- XU XH, DING ZY, WANG X, *et al.* Determination of bisphenol A content in aquatic products by high performance liquid chromatography and its accumulation characteristics [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(20): 6482–6487.
- [28] International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1) [EB/OL]. [2005-11-01]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> [2023-03-20].
- [29] 王雪良, 周钹. 芳香重氮盐的稳定性问题[J]. *华东纺织工学院学报*, 1981, (4): 76–83.
- WANG XL, ZHOU H. The problems of stability of aromatic diazonium compounds [J]. *J East Chin Inst Textile Sci Technol*, 1981, (4): 76–83.
- [30] SAMPIETRO DA, JIMENEZ CM, BELIZÁN MM, *et al.* Development and validation of a micromethod for fast quantification of 5-*n*-alkylresorcinols in grains and whole grain products [J]. *Food Chem*, 2013, 141(4): 3546–3551.
- [31] 张琨, 何义雁, 朱香燕, 等. 分光光度法快速测定糙米中烷基间苯二酚的研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2015, (3): 63–65.
- ZHANG J, HE YY, ZHU XY, *et al.* Fast determination of alkyl resorcinols in brown rice by spectrophotometric method [J]. *Cere Feed Ind*, 2015, (3): 63–65.
- [32] SAMPIETRO DA, VATTUONE MA, CATALÁN CAN. A new colorimetric method for determination of alkylresorcinols in ground and whole-cereal grains using the diazonium salt fast blue RR [J]. *Food Chem*, 2009, 115(3): 1170–1174.
- [33] FEDOROV LA, SOKOLOVSKII SA, DVOSKIN SI, *et al.* NMR spectra and structures in solution of resorcinol azo derivatives [J]. *Russ Chem Bull*, 1988, 37(2): 250–256.
- [34] KANG J, THAKALI KM, XIE C, *et al.* Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart [J]. *Food Chem*, 2012, 133(3): 671–677.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



施 进, 中级工程师, 主要研究方向
为水产品质量安全与控制。
E-mail: 307810995@qq.com



余 辉, 博士, 副教授, 主要研究方向
为水产品加工与贮藏。
E-mail: ahjnyh@163.com