



Kunnskapen
du trenger

Rapport fra arbeidet
med

Utvikling av metode for analyse av pigment i muskel
hos laksefisk

I regi av Fiskeri- og havbruksnæringens landsforening (FHL)
Utført i tiden november 2008 til november 2010

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
1. Bakgrunn	3
2. Formelle krav	4
2.1. Begrepsforklaring	4
2.2. Referansemetode	4
2.3. Rutinemetode	4
2.4. Avgrensning av prosjektet	5
3. Mål og delmål	5
3.1. Hovedmål	5
3.2. Delmål	5
4. Arbeidet	6
4.1. Grunnlagsrapport	6
4.2. Standardiseringsgruppen	6
4.3. Referansegruppen	7
4.4. Møte 1	7
4.5. Møte 2	8
4.6. Møte 3	11
5. Resultater	12
5.1. Ringtest 1	12
5.2. Ringtest 2	14
5.3. Andre resultat	15
6. Videre utfordringer for FHL	15
7. Konklusjon	16
Vedlegg 1	17
Vedlegg 2	20

Sammendrag

Målet for prosjektet var derfor å utarbeide en faglig korrekt referansemetode (heretter kalt standardmetode) for analyse av pigment i muskel av laksefisk til bruk for ulike aktører. Arbeidet med metoden skal følge modellen fra standardisering av pigmentmetode for fiskefôr. Analyse av pigmentet skal utføres ved HPLC etter ekstraksjon med organisk løsemiddel. Standardmetoden skal kunne fungere som en referansemetode for ulike rutinemetoder.

Det ble laget en rapport som et grunnlagsdokument for starte opp arbeidet i prosjektet. Det ble gitt en bakgrunn og målene for prosjektet ble satt. Fôrdustri, oppdrettsnæring, frittstående laboratorier, mattilsyn og forskningsinstitusjoner ble gjort kjent med og invitert inn i arbeidet med standardisering av pigmentanalyse i muskel fra laksefisk. Som et resultat av dette ble det nedsatt en Standardiseringsgruppe på 9 personer og en Referansegruppe på 15 personer. Referansegruppen besto av representanter for næringen som ikke selv har analytisk erfaring, men som ville bli direkte berørt av resultatet og dermed ønsket å holde seg orientert om framgangen i arbeidet. Alle medlemmene i Standardiseringsgruppen sendte sine interne metoder inn til leder av prosjektet som et grunnlag.

Det er gjennomført 2 metodeutprøvinger (ringtester) med laks som inneholder både astaxanthin og canthaxanthin med lovende resultat.

Det er kommet til enighet om en FHL referansemetode som ligger nært opp til CEN metoden bortsett fra på noen punkter.

Det ble gitt noen utfordringer til FHL for å fullføre arbeidet med en referansemetode for analyse av pigment i fiskemuskel.

HiST Matteknologisk utdanning 1. desember 2010

Marianne Østerlie

1. Bakgrunn

Pigmenter er viktige ingredienser i fôr for å oppnå en ønsket innfarging av laksefisk, og er en svært kostbar råvare i fiskefôret.

Astaxanthin er det naturlige hovedcarotenoidet i kjøttet til vill laksefisk som absorberer pigmentet ved inntak av zooplankton eller krill. Skaldyrprodukter inneholder astaxanthin og ble benyttet til å pigmentere laksefisk tidlig i 1970 årene. Senere er syntetisk, industrielt framstilt astaxanthin og canthaxanthin brukt som pigmentkilde til oppdrett av laks og ørret.

I dag er det en økende interesse for å ta i bruk pigmenttilsetninger i fôret fra naturlige mikrobiologiske kilder. Rød gjær, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (tidligere *Phaffia rhodozyma*), produserer opptil 1 % fritt astaxanthin av tørrvekt, mens grønnalgen *Hematococcus pluvialis* produserer forestret astaxanthin. Slike naturlige pigmentkilder vil i tillegg til astaxanthin også gi spor av andre karotenoider som β,β -carotene, canthaxanthin, echinenon og idoxanthin. På grunn av mangel på fiskeolje på verdensbasis benyttes det i dag ofte vegetabiliske oljer i produksjon av fôret som kan inneholde karotenoidene lutein og zeaxanthin.

Det ble, i 1994, etablert en norsk standard (NS 9402) for måling av farge og fett i atlantisk laks. Initiativet til denne ble tatt av norske fiskeeksportører, og den ble utarbeidet av et utvalg sammensatt av representanter fra eksportnæringen, fôrprodusenter og forskning. Standarden fastsetter framgangsmåten for måling av farge og fett hos atlantisk laks. I standarden skal farge måles med fargekort eller optisk fargemåleinstrument ($L^*a^*b^*$ -verdier fra Minolta Chromameter eller tilsvarende).

Det som imidlertid mangler i NS 9402 er en fastsettelse av hvilken metode som skal brukes når farge skal måles kjemisk. Kjemisk målt pigmentinnhold er som kjent en del av kravet til dokumentasjon ved salg av laksefisk.

Dominerende metoder for fargemåling i norsk oppdrettsnæring i dag er:

- Synliglys- (VIS)-spektroskopi
- Fargevifte/Fargemålingsinstrument
- Hurtigmetoder (PhotoFish, NIR) med HPLC som referansemetode
- Online metoder som QVision og Digieye
- HPLC brukes stor grad i FoU-sammenheng, men i mindre grad som rutinemetode i kvalitetskontroll av laksefisk

Hovedforskjellen mellom HPLC og VIS-spektroskopi/fargemåling er at HPLC både kan skille mellom og kvantifisere de ulike pigmenter som er tilstede i en fiskeprøve, mens VIS-metoden måler det totale nivået av pigmenter tilstede i fiskeprøven.

Analyse av pigment ved HPLC vil derfor være viktig hvis det i framtiden benyttes naturlig pigmentkilder, som *Xanthophyllomyces* og *Hematococcus* og vegetabiliskeoljer som råstoff i produksjon av fôr til laksefisk.

Det er til dels stor variasjon mellom de nevnte analysemetodene, og selv innefor samme metodikk vil forskjeller forekomme (tilsvarende som det fantes for pigmentmåling i fiskefôr).

Analyse av pigmenter er spesielt komplisert i fettholdige prøver som fiskemuskel fordi pigmenter som astaxanthin er ustabile molekyler som fort blir nedbrutt av lys, oksygen og reaktive produkter ved harskning. Anvendelse av ulike metoder til pigmentanalyse bidrar til store forskjeller i resultater hos ulike laboratorier. Varierende resultater fører iblant til diskusjoner og eventuelt reklamasjoner fra kunder, hvor kjøper og selger av fiskefôr har ulikt syn på og ulik dokumentasjon av pigmentnivå i levert vare og i ferdig produsert fisk. På grunn av pigmentenes kvalitetsmessige og økonomiske betydning for oppdrettsbransjen er næringen

avhengig av å få på plass en faglig korrekt og pålitelig analysemetodikk for pigmenter i muskel av laksefisk slik at analysevariasjon kan reduseres til et minimum mellom laboratorier snarest mulig.

Det er derfor behov for en standardisering av pigmentmåling i laksefisk.

Det foregår et tilsvarende standardiseringsarbeid mot en CEN metode i EU, hvor Joseph Schierle fra DSM er leder for arbeidsgruppen (TC275/WG9). Der foreligger det to metodedrafts som skal tas opp på neste CEN møte i oktober 2009.

- a) Kvantitativ bestemmelse. Denne metoden skal benyttes til å bestemme konsentrasjonen av astaxanthin og canthaxanthin i fiskemuskel og er viktig for å kontrollere at, for eksempel, den øvre grensen for canthaxanthin overholdes.
- b) Kvalitativ bestemmelse. Forholdet mellom de optiske isomere (*R* og *S* isomere) i astaxanthin skal bestemmes for kunne kontrollere hvilken kilde, det være seg syntetisk, fermentert eller naturlig kilde, pigmentene kommer fra. Metoden kan også skille mellom vill- og oppdrettet laks.

Bruken av begge metodene krever to ulike HPLC kolonner, men det er mulig at det kan benyttes en og samme ekstraksjonsmetode.

For teori om karotenoider generelt, karotenoider i laksefisk og pigmentkilder se rapport 1 (2009) til FHL i dette arbeidet.

2. Formelle krav, forankring og avgrensinger i prosjektet

2.1 Begrepsforklaring:

- **Referansemetode** = standardisert metode som alle andre analysemetoder/hurtigmetoder kalibreres mot
- **Rutinemetoder** = hurtigmetoder eller andre analysemetoder som brukes i kvalitetskontroll av laksefisk

2.2 Referansemetode:

- Det er kun en HPLC-metode som er egnet som referansemetode for måling av pigment i laksefisk, da dette er den eneste metoden som kan skille mellom og kvantifisere ulike pigmenter og isomere av disse i fiskemuskel
- Tilsvarende som for "FHL-metoden" for bestemmelse av astaxanthin i fiskefôr bør det være en målsetning å standardisere HPLC-metoden som referansemetode.
- HPLC metoden bør som referansemetode søkes godkjent som internasjonal standard gjennom CEN, ISO, AOAC, NMKL, eller lignende.
- Etter innføringen av en standard metode for analyse av pigment i muskel fra laksefisk skal det arrangeres obligatoriske laboratoriesammenligninger (også kalt ring tester) for alle aktører.

2.3 Rutinemetoder:

Det anses som lite realistisk å forlange at HPLC metoden skal standardiseres som rutinemetode ved kvalitetskontroll av laksefisk både ut i fra kapasitet, pris og hurtighet. Det

ønskes heller ikke å låse valg av rutinemetoder til en bestemt metode, da det anses som positivt for næringen at det utvikles nye og forbedrete hurtigmetoder.

Det stilles imidlertid et krav til alle rutinemetoder om at disse skal kalibreres og standardiseres mot referansemetoden, og rutinemessig valideres i forhold til denne gjennom ring tester.

Dersom dette kravet er oppfylt skal rutinemetoder kunne benyttes:

- I kvalitetsoppfølging av laksefisk gjennom sjøvannsfasen
- Ved reklamasjoner
- For dokumentasjon av pigment ved salg av fisk
- Ved sammenligning av pigmentinnhold i fisk fra ulike oppdrettere / fôrleverandører

2.4 Avgrensning av prosjektet

Dette prosjektet skal ikke fremme forslag til hvordan ring tester for referanse- eller rutinemetoder skal gjennomføres. Prosjektet skal heller ikke ta for seg videre arbeid med en internasjonal standardisering av metoden.

Det synes klart at den/de metoder og prosedyrer som skal være gjenstand for standardisering, ikke vil være relevante i forbindelse med offentlig tilsyn. Det er heller ikke relevant med referansemetode ved analyser i grensesnittet mellom sluttprodukt og forbrukerne. Unntaket er der det er snakk om analyser med tanke på forekomst av spesifikke pigmentstoffer der bruken av slike er regulert av offentlige bestemmelser (bl.a. som tilsetningsstoffer). I den grad det er behov for å arbeide med metodestandardisering i denne forbindelse, må det skje i samhandling med offentlig myndigheter (Mattilsynet) og derved utenfor denne gruppens mandat.

3. Mål og delmål

3.1 Hovedmål

Det skal utarbeides en faglig korrekt referansemetode (heretter kalt standardmetode) for analyse av pigment i muskel av laksefisk til bruk for ulike aktører. Arbeidet med metoden skal følge modellen fra standardisering av pigmentmetode for fiskefôr. Analyse av pigmentet skal utføres ved HPLC etter ekstraksjon med organisk løsemiddel. Standardmetoden skal kunne fungere som en referansemetode for ulike rutinemetoder.

3.2 Delmål

- Det gjøres kjent at det arbeides med en standardmetode for analyse av pigment i muskel fra laksefisk.
- Det letes opp mulige aktører og invitasjonsskriv fra FHL sendes ut. Interesserte aktører registreres.

- Ulike metoder for analyse av pigment i laksefisk innhentes hos aktørene. Det lages en kort foreløpig rapport med dokumentasjon over eksisterende metoder med fordeler og ulemper, som sendes aktørene.
- Det arrangeres et allmøte (Allmøte 1) med et påfølgende standardiseringsmøte (Standardiseringsmøte 1)
- Arbeidet med beskrivelsen av en standardmetode starter opp. Forslag sendes ut til standardiseringsgruppen som møtes (Standardiseringsmøte 2) og tar en endelig beslutning. Standardmetoden skrives og sendes ut til alle aktører.
- Det arrangeres et allmøte (Allmøte 2) hvor standard metoden legges fram og hvor det er anledning til å komme med spørsmål. Anledningen kan også benyttes til å diskutere hvordan ring testene skal arrangeres.

4. Arbeidet.

4. 1 Grunnlagsrapport

Det ble laget en rapport som et grunnlagsdokument for starte opp arbeidet i prosjektet. Det ble gitt en bakgrunn og målene for prosjektet. Fôrdustri, oppdrettsnæring, frittstående laboratorier, mattilsyn og forskningsinstitusjoner ble gjort kjent med og invitert inn i arbeidet med standardisering av pigmentanalyse i muskel fra laksefisk. Som et resultat av dette ble det nedsatt en Standardiserings gruppe på 9 personer og en Referansegruppe på 15 personer. Referansegruppen består av representanter for næringen som ikke selv har analytisk erfaring, men som ville bli direkte berørt av resultatet og dermed ønsket å holde seg orientert om framgangen i arbeidet. Alle medlemmene i Standardiseringsgruppen har sendt sine metoder i sin helhet. Det er gitt en innføring i noen av karotenoidenes kjemiske og fysiske egenskaper, som deres stereokjemi og absorpsjon av lys, som vil kunne påvirke valget av standard metode. Videre er det gitt en kort oversikt over pigment i laksefisk. Analytiske metoder som ekstraksjon av pigment fra muskel og måling av totalt pigment i laksemuskel ved spektroskopi er omtalt. Det er gitt eksempler på ulike HPLC metoder for analyse av pigment i laksemuskel med kromatogram, som alle kan være aktuelle til standardmetoden. Det er flere ulike pigmentkilder til bruk i fôr til laksefisk i dag og som sannsynligvis vil komplisere standardiseringsarbeidet noe. Derfor er det tatt med momenter som kan diskuteres videre.

4.2 Standardiseringsgruppen

Firma	Sted/Adresse/Land	Kontaktperson
Nofima Marin (tidl. Akvaforsk)	6600 Sunndalsøra	Kristin Nerdal
Havlandet Forskningslaboratorium	6901 Florø	Janne Hovden/Kristin Bergsøl Hansen
Nofima Ingrediens (tidl. Fiskeriforskning)	5141 Fyllingsdalen	Jarle Wang-Andersen
Havforskningsinstituttet	5984 Matredalen	Rolf Erik Olsen
NIFES	5804 Bergen	Robin Ørnesrud/Annbjørg Bøkevoll
Skretting ARC	4001 Stavanger	Øyvind Røn
DSM (tidl. Hoffman La-Roche)	Sveits	Joseph Schierle
Eurofins Steins Laboratorium A/S	Danmark	Sabine Meng Jensen
HiST, Matteknologisk utdanning	7004 Trondheim	Marianne Østerlie

Vedlagt (vedlegg 1) finnes en oversikt over standardiseringsgruppens ekstraksjons- og HPLC metoder.

4.3 Referansegruppen

Firma	Sted/Adresse/Land	Kontaktperson
FHL	0305 Oslo	Henrik Stenwig
AquaGen AS	7462 Trondheim	Arne Storset
Havforskningsinstituttet	5817 Bergen	Erik Slinde
Labora AS	8013 Bodø	Inger Alstad
Marine Harvest ASA	5835 Bergen	Ragnar Nordtvedt
NorLab AS	8401 Sortland	Berit Andersen
SINTEF Fiskeri- og havbruk	7465 Trondheim	Misimi Ekrem/Marit Aursand
Senja Lab	9300 Finsnes	Claus Berg
UMB Forskningsavdelingen	1432 Ås	Magny Thomassen
PreBIO AS	Frøya	Marit Midtsian
Mattilsynet. Seksjon fisk og sjømat	Bergen	Marit Fallebø
Nippon Oil Corporation	Yokohama, Japan	Shotaro Uchizawa
Ewos		Karl Østerhus
G.O. Johnsen	Oslo	Siri Johnsen
BioMar	Karmøy	Gudrun Aksdal

4. 4 Møte 1 med standardiserings- og referansegruppen

Det første møte med referansegruppen om standardisering av metode for analyse av pigment i laksefisk ble avholdt ved Britannia Hotel i Trondheim 26. mai 2009.

Møte var et fellesmøte mellom referansegruppen og standardiseringsgruppen og hadde som mål å legge føringer for det praktiske standardiseringsarbeidet.

Det var ønske om å legge FHL metoden nært opp til den kommende CEN metoden. Det er stor grad av mulighet til dette i standardiseringsarbeidet, da lederen av WG9 gruppen, Joseph Schierle også er med i standardiseringsgruppen i FHL.

CEN metoden vil bare komme til å ta for seg pigmentene astaxanthin og canthaxanthin, mens FHL ønker i tillegg til disse pigmentene, å inkludere andre pigmenter som kan komme fra bruken av vegetabiliske oljer i fôret som blant annet lutein og zeaxanthin. Utvikling og kvalitetssikring av en slik metode bør gjøres som et prosjekt i regi av FHL. For å få aksept og bli allment tilgjengelig må metoden publiseres internasjonalt.

Siden standardmetoden for analyse av muskelpigment skal gi et så riktig svar som mulig på det totale pigmentinnhold i muskelen er det da viktigere å få med alle typer pigment som bidrar til farge? Da kan en såkalt karotenoid kolonne for eksempel velges. Denne typen kolonne skiller ikke mellom *trans*- og *cis*-astaxanthin.

Hvilken ekstraksjonsmetode som skal benyttes må bestemmes. Skal det benyttes ekstraksjon med aceton eller ved metode etter Bligh & Dyer/Folch. Ekstraksjonsmiddelet chloroform kan eventuelt erstattes av tetrahydrofuran (THF).

Det ble reist spørsmål om det var noe vits i bruken av butylhydroxytoluene (BHT) ved homogenisering/oppmaling av fisken slik CEN metoden (small scale) beskriver. De små mengdene av BHT (1g/100g fisk) som benyttes vil neppe fordeles jevnt i prøvematerialet. Det er antageligvis bedre å ha BHT i løsemiddelet.

Når referansemetoden er etablert bør et FoU-prosjekt/ringtest-prosjekt se på hvor de ulike rutinemetodene ligger i forhold til referansemetoden.

HiST skulle stå for en runde med metodeutprøving i september 2009. Det ble sendt ut homogeniserte prøver av økologisk laks fra Finmark og norsk oppdrettslaks. Alle laboratoriene skulle bruke tre ulike metoder.

1. HPLC metode 1: Egen versjon av CEN metoden (NB! Avvik fra CEN metoden slik den er dokumentert i dag, skulle nøye beskrives)
2. HPLC metode 2: Metoden de til vanlig brukte
3. Spektrofotometrisk måling av total karotenoid. (En nbeskrevet metode fulgte prøvene)

Etter at resultatene fra metodeutprøvingen er beregnet skulle det kalles inn til et nytt standardiseringsmøte som skal finne sted i Bergen.

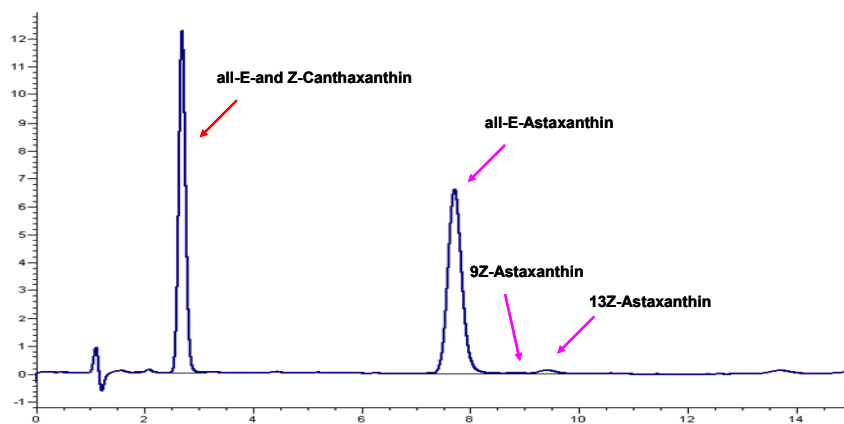
Svar på ringtest nummer 1 finnes under Resultater.

4.5 Møte 2 med standardiseringsgruppen

Det andre møte i standardiseringsgruppen ble holdt i Bergen 16. desember 2009.

Det er nå i mellomtiden fra forrige møte gjennomført en runde med ringtester med økologisk og vanlig oppdrettslaks med 3 ulike metoder; CEN metoden, INTERN metode og SPEKTROFOTOMETRISK METODE. For resultater se kapittel 5.1.

CEN metoden er ikke ferdig utviklet, mens DSM har utviklet en forløper til den europeiske standard metoden. Figur 1 viser kromatogram av canthaxanthin og astaxanthin i fiskemuskel.



Figur 1. Canthaxanthin og astaxanthin i fiskemuskel (DSM presentasjon)

Kromatogrammet er framkommet etter ekstraksjon med aceton, filtrering under redusert trykk og avdamping under nitrogen. Prøven løses deretter i en blanding av n-hexan og aceton. Gangen i analysen er vist i figur 2 og figur 3.

The Assay	
Sample	Fish Fillet, Fish Skin, Shrimp Flesh, Whole Shrimp ...
Extraction	Acetone + BHT + Magnesium Sulfate (Use Polytron or Ultrathurrax)
Filtration	Under Reduced Pressure
Evaporation	Rotary Evaporation or N ₂ -Flush, (Dissolve in Mobile Phase, Adjust to Volume)
HPLC	NP-HPLC

Figur 2. Bestemmelse av astaxanthin i fiskemuskel (DSM. Presentasjon)

	Large Scale	Small Scale
Tissue Sample	10-20 g Pieces	1 g Homogenate
Acetone	3 x 40 ml	3 x 8 ml
Homogenizer	Big	Small
Filtration	Glass Fritt	10 ml Filter Column on SFE-Rack
Evaporation	Rotavapor	N₂- Flush
Samples/Day	ca. 12	ca. 24

Figur 3. Bestemmelse av astaxanthin i fiskemuskel (DSM. Presentasjon)

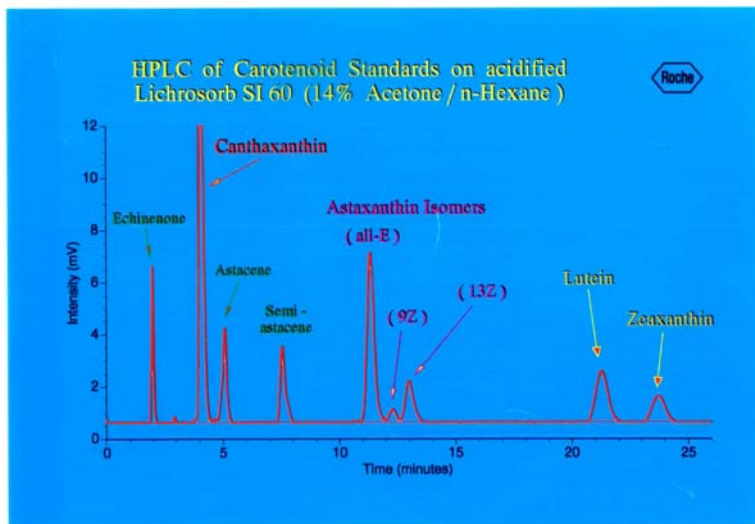
Joseph Schierle (JS) mente at aceton som ekstraksjonsmiddel også ville kunne løse andre karotenoider, selv svær upolare karotenoider som β,β -caroten. Bruken av vannfri magnesiumsulfat er viktig fordi den absorberer vann, cellene vil krympe og fettfasen frigjøres lettere. Etter filtrering med redusert trykk skal filteroppsatsen vaskes i følgende rekkefølge; med vann – etanol og aceton. Etter avdamping skal prøven overføres kvantitativt til en målekolbe (25 ml) for at totalvolumet skal bli riktig. Dette fordi fettene også utgjør et volum.

DSM benytter, stort sett ikke storskala ekstraksjon ikke lenger.

Det er viktig at prøvene homogeniseres når de er litt frosne. DSM tilsetter BHT (Butylhydroxy-toluen) i prøven. JS forklarte at fordelingen av BHT i prøven ikke er kontrollert.

Validering av metoden gjøres med ulike injeksjonsvolumer opp til 200 μ l.

Selektiviteten for metoden er vist i kromatogrammet av ulike standarder i Figur 4. SJ opplyste at cryptoxanthin kokromatograferer (har samme posisjon som) med canthaxanthin. Ellers vil metoden fange opp karotenoider som echinenon, lutein og zeaxanthin hvis disse skulle finnes i fiske muskelen.



Figur 4. Metodens selektivitet. (DSM presentasjon).

I tillegg vil metoden også detektere adonirubin, et rødt karotenoid fra blant annet en jordbakterie og fettsyreestere av astaxanthin. JS mente at også idoxanthin, et nedbrytningsprodukt fra astaxanthin kunne detekteres i det aktuelle HPLC systemet. Dette ble imidlertid avkreftet i etterkant av møtet. Astacen og semiastacen er såkalte artefakter av opparbeidelse av prøven.

Retensjonstider for ulike karotenoider er gitt i Figur 5.

Retention Times	
all-E-Astaxanthin: 7-12 min	
Astaxanthin Esters:	0.10-0.40
all-E- α - and β -Carotene:	0.14
all-E-Echinonone:	0.20
all-E-Canthaxanthin:	0.35
all-E- β -Cryptoxanthin:	0.35
all-E-Astacene:	0.45
all-E-Adonirubin:	0.57
all-E-Semiastacene:	0.66
XZ-Astaxanthin:	0.89-0.94
all-E-Astaxanthin:	1.00
9Z-Astaxanthin:	1.16
13Z-Astaxanthin:	1.22
all-E-Lutein:	1.8
all-E-Zeaxanthin:	1.9

Figur 5. Retensjonstider for ulike karotenoider. (DSM presentasjon)

Som standard referansemetode for FHL ble det enighet om å arbeide videre med CEN metoden og innføre noen mindre modifikasjoner. Dette medfører at aceton skal benyttes som løsemiddel ved ekstraksjon av pigment. Aceton er av de mer miljøvennlige løsemidlene. Kjøretiden for kromatogrammet ved HPLC skal forlenges til 30 min. slik at flere karotenoider enn astaxanthin og cathaxanthin skal detekteres.

I tillegg ble det besluttet å prøve videre med en spektrofotometrisk metode som skulle kunne bestemme total pigment i laksefisken.

Det ble bestemt at det skal være en runde til med laksemuskel ringtester. Det vil bli prøvd å få tak i Skotsk oppdrettlaks hvor det ofte forekommer canthaxanthin i tillegg til astaxanthin i muskelen. Ved andre runde skal bare CEN og SPEKTROFOTOMETRISK metode benyttes.

Joseph Schierle opplyste at videreføring av CEN metoden nå avventer konklusjon og resultater fra en runde nummer to med ringtester fra FHL standardiseringen. Det er ikke utelukket at CEN metoden kan forandres i retning av FHL standardmetoden.

4.6 Møte 3 med standardiseringsgruppen

Det tredje møte ble holdt 4. november 2010 ved Park Inn hotell på Gardermoen. Tanken var at det skulle ende opp i et felles møte med referansegruppen, men ingen fra industrien fant tid til å komme bortsett fra Henrik Steenwiig fra FHL.

Det er nå i mellomtiden fra forrige møte gjennomført en ny runde med ringtester med Canadisk laks homogenisert ved Nutreco 3 ulike metoder; CEN metoden for bestemmelse av astaxanthin og canthaxanthin (som astaxanthin ekvivalenter), spektrofotometrisk metode I (ekstraksjon som CEN metoden) og spektrofotometrisk metode 2 (enkel ekstraksjon). For resultater se kapittel 5.1.

JS opplyste om at ut fra resultatene fra siste ringtest var det nå mulig for han nå å gå videre i arbeidet med CEN metoden.

Den utarbeidete FHL metoden ble lagt fram og godkjent av møtet med følgende forskjeller fra CEN metoden. Metoden er vedlagt (Vedlegg 2.)

- Norske standard for prøveuttak (NS 9401) og for prøvebearbeiding (NS 9404) skal benyttes når hel fisk skal analyseres. I den grad det er mulig gjelder dette også for fileter.
- Konserveringsmiddelet butylert hydroxytouluene (BHT) tilsettes (400mg/1000ml) til ekstraksjonsmiddelet aceton i stedet for i fiskehomogenatet.
- Metoden er bare beskrevet for "small scale"
- Metoden skal gjelde for flere karotenoider enn astaxanthin og cathaxanthin, så som β,β -caroten, lutein og zeaxanthin. Dermed må "running time" i kromatogrammet settes til 30 min.
- Metoden må valideres for cathaxanthin, β,β -caroten, lutein og zeaxanthin.

5. Resultater

Det ble utført to ringtester av laksemuskel i løpet av arbeidet med en metode for analyse av pigment laksefisk.

5.1 Ringtest 1.

Det ble gjennomført en ringtest med fiskemuskel i september 2009 hvor det ble sendt ut homogeniserte prøver som før utsendelse ble nedfrosset til -80°C . Prøvene ble nummerert som følger:

090911: Økologisk lask fra Finmark

090912: Oppdrettslaks fra Rex Star Seafood Lerøy AS.

Prøvene ble deretter sendt frosne og med et fryseelement med ordinær post.

Men det viste seg at prøvemateriale var dårlig homogenisert, en prøvene var av dårlig kvalitet i tillegg til at prøvene var tint under transport.

Tre ulike metoder skulle benyttes hvis det var mulig

1. CEN metoden
2. INTERN metode (Den metoden labene benytter selv)
3. En SPEKTROFOTOMETRISK metode (Enkel metode skrevet for anledninger)

September 2009. Ringtest 1 Muskel av økologisk laks (090911) og ordinær laks (090912). Resultater fra de kollaborative avprøvingene./ Results of the collaborative studies.

Prøve nr. Sample nr.	090911- M CEN	090911- M INTERN	090911-M SPEKTER	090912- M CEN	090912- M INTERN	090912-M SPEKTER
Oppgitt mengde fra frabrikk i mg/kg Given amount from factory in mg/kg	-	-	-	-	-	-
Antall prøver/ paralleller No of parallels	2	2	2	2	2	2
Antall lab No of labs	6	6	7	6	6	7
Gjennomsnittsverdien / mean \bar{x}	5,53	5,86	6,56	6,35	6,59	6,84
Repeterbarhet, standard avvik / Repeatability, standard deviation (s_r)	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,6
Repeterbarhet, relativ / Repeatability- limit (RSD_r) (%)	3,9	6,4	1,19	5,8	7,5	8,7
Repeterbarhets grense / Repeatability limit (r) $2,8 \times s_r$	0,6	0,8	1,2	1,0	1,4	1,7
Reproduserbarhet, standard avvik Reproducibility, standard deviation (s_r)	0,4	0,7	1,3	1,2	1,4	1,6
Reproduserbarhet, relativ / Reproducibility, relative (RSD_R) (%)	7,0	11,6	20,4	18,2	21,2	23,0
Reproduserbarhets grense / Reproducibility limit (R) ($2,8 \times s_R$)	1,1	1,9	3,7	3,2	3,9	4,4
Horrrat Verdi /Horrrat value (Ho_R)	0,57	0,94	1,69	1,50	1,76	1,92

Horrrat Verdi CEN (gjennomsnitt metode):1,04

Horrrat Verdi INTERN (gjennomsnitt metode):1,35

Horrrat Verdi SPEKTER (gjennomsnitt metode):1,81

Gjennomsnitt økologisk laks (CEN+INTERN metoder) = 5,70 ± 0,23 mg/kg

Gjennomsnitt ordinær laks (CEN+INTERN metoder) = 6,47± 0,17 mg/kg

Prøvene viste seg å være dårlige (luktet ikke godt) og ikke helt homogenisert. I tillegg var forsendelsen ikke optimal.

For å kunne si at metoden som benyttes er god og forståelig for alle slik at forskjellen mellom de enkelte laboratorienes resultater er minst mulig, skal den såkalte Horrrat verdien være mindre enn 1. For den økologiske laksen (090911) viser metodene CEN og INTERN gode resultater. Disse metodene er ikke så gode for oppdrettslaksen (090912), noe som kan skyldes at det var dårlig kvalitet på prøven fra start. Den SPEKTROFOTOMETRISKE metoden var ukjent og enkelt beskrevet og kommer dårlig ut (gir store forskjeller i resultat fra de ulike laboratorene). Men middelverdiene av mengde pigment avviker likevel ikke mye fra resultatene fra de andre metodene.

5.2 Ringtest 2.

Den andre ringtesten av laksemuskel ble gjennomført i april 2010 med ferdig homogeniserte prøve av Canadisk laks. Prøvenummeret var: 100411 Canadisk laks

Metodene som ble benyttet var:

1. CEN-metoden som skulle rapportere mengde astaxanthin og canthaxanthin (som astaxanthin ekvivalenter).
2. SPEKTROFOTOMETRISK METODE 1. (Total karotenoid skulle rapporteres. Samme ekstraksjonsmetode som metode 1.).
3. SPEKTROFOTOMETRISK METODE 2. (Total karotenoid skulle rapporteres. Enkel ekstraksjonsmetode)

April 2010. Ringtest av laksemuskel (100411.M). Revidert november 2010 Resultater fra de kollaborative avprøvingene./ *Results of the collaborative studies.*

Prøve nr. <i>Sample nr.</i>	100411-M CEN- Astax	100411-M CEN- Canthax	100411-M CEN-total	100411-M Spekter 1	100411-M Spekter 2
Opgitt mengde fra fabrikk i mg/kg <i>Given amount from factory in mg/ kg</i>	-	-	-	-	-
Antall prøver/ paralleller <i>No of parallels</i>	2	2	2	2	2
Antall lab <i>No of labs</i>	7	6	6	6	4
Gjennomsnittsverdien / <i>mean \bar{x}</i>	5,25	2,56	7,83	7,08	6,78
Repeterbarhet, standard avvik / <i>Repeatability, standard deviation (s_r)</i>	0,2	0,1	0,3	3,2	0,5
Repeterbarhet, relativ / <i>Repeatability- limit (RSD_r) (%)</i>	4,3	4,1	4,2	5,3	7,5
Repeterbarhets grense / <i>Repeatability limit (r) $2,8 \times s_r$</i>	0,9	0,3	0,9	1,1	1,4
Reproduserbarhet, standard avvik <i>Reproducibility, standard deviation (s_r)</i>	0,7	0,2	1,0	3,2	2,8
Reproduserbarhet, relativ / <i>Reproducibility, relative (RSD_R) (%)</i>	14,0	9,2	12,7	45,6	41,8
Reproduserbarhets grense / <i>Reproducibility limit (R) ($2,8 \times s_R$)</i>	2,1	0,7	2,8	11,9	7,9
Horrrat Verdi / <i>Horrrat value (Hor)</i>	1,12	0,67	1,01	3,83	3,49

Horrrat Verdi CEN- Astaxanthin: 1,12
Horrrat Verdi CEN- Canthaxanthin: 0,67
Horrrat Verdi CEN- Total: 1,01
Horrrat Verdi SPEKTER 1 3,83
Horrrat Verdi SPEKTER 2: 3,49

JS sa seg svært fornøyd med resultatene fra CEN metoden hvor Horratverdiene 1,12 og 0,67 og 1,01 for analyse av henholdsvis astaxanthin, canthaxanthin og totalt pigment. Resultatene kunne derved benyttes til det videre arbeid med CEN-metoden.

5.3 Andre resultat

De fleste laboratoriene i standardiseringsgruppen var villig til å bytte til en framtidig, felles CEN metode hvis dette ble påkrevd. Noen laboratorier kan komme til å bruke sine intern metode og benytte den offisielle CEN metoden til å validere intern metoden.

NIFES ved Robin Ørnsrud har sagt seg villig til å validere metoden for andre pigmenter en astaxanthin når de er klare for det (1-2 år?).

En diskusjon kom opp om det virkelig er mulig å kalibrere og standardisere alle rutinemetodene opp mot referansemetoden og gjennomføre ringtester. Flere mente at måling av pigment med fargekart og fargevifte ville være vanskelig å gjennomføre i ringtester på grunn av individuelle forskjeller og forskjeller langs filetene i prøvefiskene når det gjelder pigment. I tillegg var det tvil om hvor ofte næringen virkelig målte farge selv. En mulig rutinemetode som kunne være med i ringtestene var instrumentelt målt farge (Minolta) for der kunne det samme homogenatet som laboratoriene brukte også benyttes.

Er det et marked for å lage en enkel spektrofotometrisk metode for å måle total mengde pigment til bruk industrien? Dette må industrien selv avgjøre.

6. Videre utfordringer for FHL

De utarbeidete FHL referanse metoden må publiseres internasjonalt når den er ferdig validert.

Hvis rutinemetodene skal korreleres mot referansemetoden må rutiner for ringtester (sammenlignende metode utprøving) for analyse av pigment i muskel fra laksefisk utvikles og beskrives og det sendes ut innbydelse til å delta i ringtestene.

Korrelasjon av rutinemetodene mot standard referanse metode kan gjøres i et prosjekt hvor så mange ulike referansemetoder, forskningsmetoder og den nylig utviklede metoden som mulig benyttes på samme det materialet. Materialet (laks/ørret) bør få for tilsatt flere karotenoider enn astaxanthin og canthaxanthin.

Skal standardmetoden for analyse av astaxanthin i pelletert før oppdateres i forhold til standard metoden som er utviklet for pigment i laksefisk?

7. Konklusjon

Det ble laget en rapport som et grunnlagsdokument for starte opp arbeidet i prosjektet. Det ble gitt en bakgrunn og målene for prosjektet ble satt. Førdustri, oppdrettsnæring, frittstående laboratorier, mattilsyn og forskningsinstitusjoner ble gjort kjent med og invitert inn i arbeidet med standardisering av pigmentanalyse i muskel fra laksefisk. Som et resultat av dette ble det nedsatt en Standardiseringsgruppe på 9 personer og en Referansegruppe på 15 personer. Referansegruppen besto av representanter for næringen som ikke selv har analytisk erfaring, men som ville bli direkte berørt av resultatet og dermed ønsket å holde seg orientert om framgangen i arbeidet. Alle medlemmene i Standardiseringsgruppen sendte sine interne metoder inn til leder av prosjektet som et grunnlag

Det var ønske om å legge FHL referansemetode nært opp til den kommende CEN metoden. Det er stor grad av mulighet til dette i standardiseringsarbeidet, da lederen av WG9 gruppen, Joseph Schierle også er med i standardiseringsgruppen i FHL. CEN metoden vil bare komme til å ta for seg pigmentene astaxanthin og canthaxanthin, mens FHL ønsker i tillegg til disse pigmentene, å inkludere andre pigmenter som kan komme fra bruken av vegetabiliske oljer i fôret som blant annet lutein og zeaxanthin.

Det er gjennomført 2 metodeutprøvinger (ringtester) med laks som inneholder både astaxanthin og canthaxanthin. Den siste gav lovende resultater som Joseph Schierle ville ta med seg i det videre arbeidet med CEN metoden.

Det er kommet til enighet om en FHL referansemetode som ligger nært opp til CEN metoden bortsett fra på noen punkter.

De fleste laboratoriene i standardiseringsgruppen var villig til å bytte til en framtidig, felles CEN metode hvis dette ble påkrevd. Noen laboratorier kan komme til å bruke sine intern metode og benytte den offisielle CEN metoden til å validere intern metoden.

Det ble gitt noen utfordringer til FHL for å fullføre arbeidet med en referansemetode for analyse av pigment i fiskemuskel.

VEDLEGG 2

TIDLIGERE BRUKTE METODER

LABORATORIUM	Innveid mengde	Ekstraksjonmetode	HPLC metode	Kommentarer
Nofima Marin Tidligere Akvaforisk	1-2 g med 4 desimaler i sentrifugerør	Vann:MeOH:Chloroform = 3:3:9 Sentrifugeres ved 3000 rpm, 10 min. 3 ml kloroformfase dampes inn. Løses i 2 ml Hexan:acetone Sprøytefiltreres før HPLC analyse	Nitrill kolonne Mobilfase: Hexan:acetone = 80:20 Run time: 12 min. Deteksjon ved 470 nm	Detekterer all-E og Z astaxanthin (alle Z-ene?) canthaxanthin og idoxanthin
DSM Small scale	100g muskel + 1g BHT Homogeniseres. Veig inn 1 g + 1g Mg-sulfat i en SPE kolonne	Tilsett 8 ml acetone i SPE kolonnen homogeniser med ultra-turax Tapp av i et sentrifugerør. Gjenta 2 ganger til. Damp av og løs resten i 3 ml hexan :acetone = 86:14 Overfør til 10 ml målekolbe, vask røret med 2x3 ml hexan:acetone og fyll opp med hexan:acetone. Overfør noe til en LC vial og sentrifuger ved 2500 g	LiChrosorb Si60 kolonne. Modifisert Mobilfase: Hexan:acetone = 86:14 Deteksjon ved 470 nm Flow 1,2 ml/min.	Detekterer all-E og Z astaxanthin Og canthaxanthin, adonirubin, lutein og zeaxanthin
Skretting	10,10 g i en 250 ml erlenmeyer kolbe +	Tilsett 40 ml acetone, bland godt og flush med nitrogen. La stå i 45 min. Dekanter over i en mørk flaske og flush. Gjenta acetone ekstraksjonen med 2x25 ml. for laks og 3x25 for ørret. Filtrer med vannsug og mål volumet. Sentrifuger 10 ml ved 4000 rpm i 4 min.	Vydac 218 TP 54 kolonne Mobilfase: ? Deteksjon: 470 nm Run time:15 min. Deteksjon ved 470 nm	Mobilfase ikke oppgitt Detekterer all-E og Z astaxanthin og canthaxanthin. Kan Vydac kolonnen detektere andre pigmenter?
NIFES	Ca. 1g fra et homogenat i et 30 ml sentrifugerør	Tilsett 3 ml vann + 3ml MeOH. Whirlmixer i 20s.La stå noen min. Sentrifuger 15 min v/3000rpm ved 18 grader. Overfør 2 ml av kloroformfase i et rør og damp av under nitrogen. Prøven løses i 1ml hexan. Filtrer m/ sprøytefilter	LiChrosorb Si60 kolonne. Modifisert Mobilfase acetone:heptan - 14:86 Deteksjon ved 470 nm	Detekterer all-E og Z astaxanthin og canthaxanthin
Eurofins	ca. 25 g fisk i blender 50g Na-sulfat	Tilsett ca. 100ml acetone. Mix. Henstand. Acetone filtreres gjennom foldefilter i slipkolbe Gjenta ekstraksjonen med minst 3x25 ml acetone. Samlet acetone inndampes i rotavapor v/<50 grader. Når nesten tørr, løs prøven i 20ml hexan:acetone-86:14 Fortynn i målekolbe til 50 ml. Filtrer i sprøytefilter	LiChrosorb Si60 kolonne. Modifisert Mobilfase acetone:hexan - 14:86 Run time 20 min. Flow 1,2 ml Deteksjon ved 470 nm	Detekterer all-E og Z astaxanthin, canthaxanthin, lutein og zeaxanthin, samt astaxanthin estere For å få med alle caroteneodene må stopptid settes til 30 min.

LABORAOTIRUM	Innveid mengde	Ekkstraksjonmetode	HPLC metode	Kommentarer
Havlandet	1,00 g homogenat + 1g Mg-sulfat i en SPE-kolonne	Tilsett 10ml aceton til stengt SPE-kolonne. Mix med ultra-turax. Åpne ventil og tapp av i rundkolbe. Gjenta til fiskekjøttet er fargeløst. Damp in i rotavapor v<50 grader til tørrhet. Tilsett 3 ml hexan:aceton=86:14. Overfør målekolbe (25 ml) og gjenta med 3ml aceton. Fyll opp målekolben Filtreres gjennom sprøytefilter	LiChrosorb Si60 kolonne. Modifisert Mobilfase aceton:heptan - 14:86 Flow 1,2 ml Deteksjon ved 470 nm	Detekterer all-E og Z astaxanthin,
Nofima Ingrediens Tidligere Fiskeriforskning	20g muskel i 250ml flaske	Tilsett 100 ml abs. Alkohol. Homogeniseres i ca. 2 min. Overfør til 250 ml målekolbe. Skyll målekolben flere gang m/diklometan. Fyll nesten til merke med diklometan. La den stå mørkt i 1 time. Rens på SPE kolonner	LiChrosorb Si60 kolonne. Modifisert Mobilfase aceton:hexan - 14:86 Flow 1,2 ml Deteksjon ved 470 nm	Detekterer all-E og Z astaxanthin, Cantaxanthin?
Havforskningsinstituttet Matre	1g homogenat + ca 2g Na-sulfat i ekstraksjons-Målekolber (10 ml) settes inn i ekstraksjons apparatet	Tilsettes 3 ml aceton. Bland m/spatel. Står i 10min. Tappes ned i målekolben Gjenta 2 ganger. Skyll m/1ml aceton (=tilsatt 10 ml). Rist og henstand. Prøven overføres til HPLC vials	2 stk koblet Chromospher 5 C18 Mobilfase: Acetonitril:Diklometan: MeOH/Propionsyre/vann -61:20:19 Deteksjon ved 476nm Flow?	Detekterer astaxanthin og cantaxanthin Ikke isomere.
CEN/TC 275	100g muskel + 1g BHT Homogeniseres. Veig inn 1 g + 1g Mg-sulfat i en SPE kolonne	Tilsett 8 ml aceton i SPE kolonnen homogeniser med ultra-turax Tapp av i et sentrifugerør. Gjenta 2 ganger til. Damp av og løs resten i 3 ml hexan :aceton = 86:14 Overfør til 10 ml målekolbe, vask røret med 2x3 ml hexan:aceton ogf fyll opp med hexan:aceton. Overfør noe til en LC vial og sentrifuger ved 2500 g	LiChrosorb Si60 kolonne. Modifisert Mobilfase: Hexan:aceton = 86:14 Deteksjon ved 470 nm Flow 1,2 ml/min.	Detekterer all-E og Z astaxanthin, og canthaxanthin
Nippon Oil Corpration (NOC)	Homogeniser fiske-muskel og vei inn 3 g i et på forhånd veid rør	Tilsett 1 ml vann + 5 ml THF:MeOH (20:1). Vortex i 5 min. Tilsett 10 ml hexan, mix og sentrifuger v/ 3000rpm i 10 min, Overfør det øverste laget til en 50 ml målekolbe. Gjenta 2 ganger	2 stk koblet Si100-kolonner (250mm) Mobil fase hexan:THF:MeOH (40:20:1), v/v	Detekterer astaxanthin, men ikke isomere. Andre carotenoider; canthaxanthin, adonirubin, echinenone, beta-caroten, adonixanthin

VEDLEGG 2

UTARBEIDET METODE

Determination of pigments in fish flesh by HPLC

This method is developed in a project financed by Norwegian Seafood Federation (FHL). The work was directed by Marianne Østerlie, Sør-Trøndelag University College (HiST) in corporation with the feed industry and research institutes. This method is developed in co-operation and contemporaneous to the same work in CEN. The scope of this

Contents		Page
1	Scope.....	23
2	Principle.....	23
3	Reagents.....	24
4	Apparatus	26
5	Calibration	26
6	Procedure	28
7	HPLC	29
8	Calculation.....	30
Annex A (informative) Validation for astaxanthin		32
Annex B (informative) Typical chromatograms		34
Bibliography.....		37

Scope

This document specifies a method for the determination of pigments in fish flesh by high performance liquid chromatography (HPLC). The method can be applied at a range above 0.02 mg/kg.

For sampling whole fish or fish fillets the Norwegian quality cut (NS 9401) and the Norwegian quality standard preparation should be used (NS 9404).

The method should not be applied to the determination of canthaxanthin in poultry tissues, egg yolks and shrimp tissues due to a possible interference of canthaxanthin with cryptoxanthin and xanthophyll esters sometimes present in these matrices.

Principle

Fish flesh is extracted by homogenizing the tissue in acetone. The extract is filtered and evaporated at reduced pressure using a rotary evaporator or a flow of nitrogen at 50°C. The residue is dissolved in a mixture of *n*-heptane and acetone and analysed by an isocratic normal-phase HPLC.

The HPLC system effectively separates astaxanthin and canthaxanthin and other carotenoids found in fish flesh as e.g. β -carotene, lutein and zeaxanthin. The main geometrical isomers of astaxanthin are separated from each other and from oxidation products of astaxanthin, astacene and semi-astacene. In contrast, the isomers of canthaxanthin are not separated.

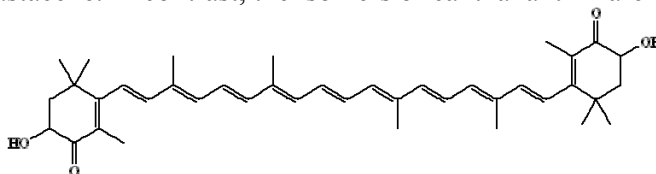


Figure 1 — all-E-Astaxanthin

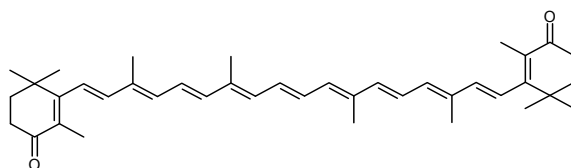


Figure 2 — all-E-Canthaxanthin

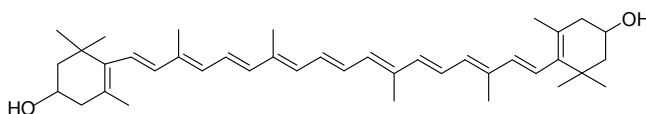


Figure 3 — Zeaxanthin

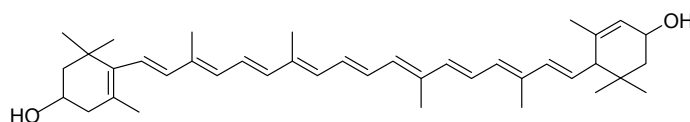
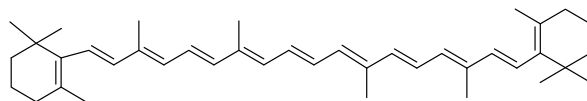


Figure 4 — Lutein

Figure 5 — β -Caroten

Reagents

General

During the analysis, unless otherwise stated, use only reagents of recognized analytical grade, e.g. pro analysis (p.a.).

Magnesium sulfate, anhydrous, purity (complexometric) > 98%

Phosphoric acid, volume fraction is 85 %, purity (acidimetric) \geq 85%

Butylated hydroxytoluene (BHT), purity (GC) > 99%

Tetrahydrofuran, purity (GC) > 99%, stabilized with 0.025% 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (BHT)

Cyclohexane, purity (GC): > 99%

n-Heptane, purity (GC): > 99%

Acetone, purity (GC): > 99% added BHT (400 mg per 1000 ml)

Ethanol, absolute, purity (GC): > 99%

Methanol, purity (GC): > 99%

Reference substances of all-E-astaxanthin, all-E-canthaxanthin, zeaxanthin, lutein and $\beta\beta$ -caroten, purity (HPLC): > 95%

Store reference substances under nitrogen or argon at approximately -20 °C. Traces of oxygen destroy the substances.

HPLC mobile phase solvent, isocratic

Mix 86 parts per volume of *n*-heptane (0) with 14 parts per volume of acetone (0).

Preparation of astaxanthin standard solution, $\rho = 1.5 \text{ mg/ml}$

Weigh approximately 1.5 mg of the reference substance of all-E-astaxanthin (0) and 1 g of BHT (0) into a 100 ml volumetric flask. Dissolve in approximately 5 ml of tetrahydrofuran (3.5) and dilute to the mark with tetrahydrofuran. Support dissolution by ultrasonic treatment. Transfer an aliquot of 10 ml of this solution into a 100 ml volumetric flask and add approximately 85 ml of *n*-heptane (3.7). The mixture cools and contracts. Warm the solution to room temperature and dilute to the mark with *n*-heptane. This results in an astaxanthin concentration of approximately 1,5 mg/l in a mixture of 9 parts per volume of *n*-heptane and 1 part per volume of tetrahydrofuran.

Preparation of canthaxanthin standard solution, $\rho = 1.5 \text{ mg/ml}$

Weigh approximately 1.5 mg of the reference substance of all-E-canthaxanthin (0) and 1 g of BHT (0) into a 100 ml volumetric flask. Dissolve in approximately 5 ml of tetrahydrofuran (3.5) and dilute to the mark with tetrahydrofuran. Support dissolution by ultrasonic treatment. Transfer an aliquot of 10 ml of this solution into a 100 ml volumetric flask and add approximately 85 ml of cyclohexane (0). The mixture cools and contracts. Warm the solution to room temperature and dilute to the mark with cyclohexane. This results in a canthaxanthin concentration of approximately 1.5 mg/l in a mixture of 9 parts per volume of cyclohexane and 1 part per volume of tetrahydrofuran.

Preparation of zeaxanthin standard solution, $\rho = 1.5 \text{ mg/ml}$

Weigh approximately 1.5 mg of the reference substance of zeaxanthin (0) and 1 g of BHT (0) into a 100 ml volumetric flask. Dissolve in approximately 5 ml of tetrahydrofuran (3.5) and dilute to the mark with tetrahydrofuran. Support dissolution by ultrasonic treatment. Transfer an aliquot of 10 ml of this solution into a 100 ml volumetric flask and add approximately 85 ml of ethanol (3.9). The mixture cools and contracts. Warm the solution to room temperature and dilute to the mark with ethanol. This results in a zeaxanthin concentration of approximately 1.5 mg/l in a mixture of 9 parts per volume of ethanol and 1 part per volume of tetrahydrofuran.

Preparation of lutein standard solution, $\rho = 1.5 \text{ mg/ml}$

Weigh approximately 1.5 mg of the reference substance of lutein (0) and 1 g of BHT (0) into a 100 ml volumetric flask. Dissolve in approximately 5 ml of tetrahydrofuran (3.5) and dilute to the mark with tetrahydrofuran. Support dissolution by ultrasonic treatment. Transfer an aliquot of 10 ml of this solution into a 100 ml volumetric flask and add approximately 85 ml of ethanol (3.9). The mixture cools and contracts. Warm the solution to room temperature and dilute to the mark with ethanol. This results in a lutein concentration of approximately 1.5 mg/l in a mixture of 9 parts per volume of ethanol and 1 part per volume of tetrahydrofuran.

Preparation of β,β -carotene standard solution, $\rho = 1.5 \text{ mg/ml}$

Weigh approximately 1.5 mg of the reference substance of β,β -carotene (0) and 1 g of BHT (0) into a 100 ml volumetric flask. Dissolve in approximately 5 ml of tetrahydrofuran (3.5) and dilute to the mark with tetrahydrofuran. Support dissolution by ultrasonic treatment. Transfer an aliquot of 10 ml of this solution into a 100 ml volumetric flask and add approximately 85 ml of ethanol (3.9). The mixture cools and contracts. Warm the solution to room temperature and dilute to the mark with ethanol. This results in a β,β -carotene concentration of approximately 1.5 mg/l in a mixture of 9 parts per volume of ethanol and 1 part per volume of tetrahydrofuran.

Preparation of solution of heat-isomerized carotenoids (control solution)

Dissolve approximately 1.5 mg of all-E-astaxanthin (0), 1.5 mg of all-E-canthaxanthin (0), 1.5 mg of zeaxanthin (3.11), 1.5 mg of lutein (3.11), 1.5 mg of β,β -carotene (3.11) and 0,5 g of BHT (0) in 10 ml of tetrahydrofuran (0) in a 500 ml volumetric flask. Dilute this solution with approximately 200 ml of a mixture of 86 parts per volume of n-heptane (3.7) and 14 parts per volume of acetone (0). Reflux for 1 h in a water bath at a temperature of 80 °C. Cool

to room temperature and dilute the solution to the mark with the mixture of n-heptane and acetone. Pour the mixture into a dispenser bottle, mix well, leave at room temperature overnight and dispense into a large number of HPLC vials. Immediately seal the vials carefully with septa made from polytetrafluoroethylene (PTFE) and silicone and store them at approximately 23 °C in the dark.

Apparatus

Knife mill, suitable for food with grinding chamber volume of approx. 1000 ml

Sintered glass frit, porosity 3 (16-40 μm), diameter: approx. 6 cm (used in 6.1)

Dispersing instrument Hand-held dispersing instrument for approx. 1-250 ml e.g. with 12 mm diameter aggregate

Nitrogen flow evaporator, with heating block and holder for pipettes

Spectrophotometer, wavelength range 190-900 nm, wavelength accuracy: ≤ 1 nm

Centrifuge, bench laboratory centrifuge for at least 2500 g

Balance, with readability of 0.01 mg, precision (std dev.) of ± 0.015 mg, capacity 205g

Solid phase extraction manifold, steel needles (0,90mm x 55 mm) attached to the valve outlets

SPE columns, 25 ml reservoirs, plastic, equipped with a 10 micron bottom fritts

HPLC chromatographic system, with column thermostat and UV/visible or diode array detector

Calibration

General

Standard solutions are prepared at single concentrations (3.13 to 3.18), measured by spectrophotometry immediately after preparation (5.2), and then injected into the HPLC (5.3). The response factors of the carotenoids are determined from the total peak areas of the chromatograms and the concentrations measured by spectrophotometry.

Since the method involves one-level calibrations it is recommended to control the linearity of the HPLC after implementation or any change of the system. For this purpose, the standard solutions can be diluted with a mixture of 86 parts per volume of n-heptane (3.7) and 14 parts per volume of acetone (0). The correlation coefficient of the regression line (forced through zero) should exceed 0.98.

Determination concentration of standard solution with spectrophotometry

Within one hour after preparation, measure the concentration of all-E-astaxanthin or all-E-canthaxanthin or zeaxanthin or lutein or β,β -carotene by spectrophotometry at the respective absorption maximum using n-heptane (3.7) as a blank. Calculate the mass concentration (ρ) in milligram per milliliter of the standard solution using the following equations:

$$\rho_{\text{all-E-astaxanthin}} = \frac{A_{\text{max}} \times 10\,000}{2\,100} \quad (1)$$

where

- A_{max} is the absorbance value at the absorption maximum;
- 10 000 is the scaling factor;
- 2 100 is the $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value of all-E-astaxanthin. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value is the theoretical absorption of a 1 % solution of all-E-astaxanthin in a 1 cm cuvette at approximately 470 nm (λ_{max}) in *n*-heptane, see [1].

$$\rho_{\text{all-E-canthaxanthin}} = \frac{A_{\text{max}} \times 10\,000}{2\,200} \quad (2)$$

where

- A_{max} is the absorbance value at the absorption maximum;
- 10 000 is the scaling factor;
- 2 200 is the $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value of all-E-canthaxanthin. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value is the theoretical absorption of a 1 % solution of all-E-canthaxanthin in a 1 cm cuvette at approximately 466 nm (λ_{max}) in cyclohexane, see [2].

$$\rho_{\text{zeaxanthin}} = \frac{A_{\text{max}} \times 10\,000}{2\,540} \quad (3)$$

where

- A_{max} is the absorbance value at the absorption maximum;
- 10 000 is the scaling factor;
- 2 540 is the $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value of zeaxanthin. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value is the theoretical absorption of a 1 % solution of zeaxanthin in a 1 cm cuvette at approximately 450 nm (λ_{max}) in ethanol, see [2].

$$\rho_{\text{lutein}} = \frac{A_{\text{max}} \times 10\,000}{2\,550} \quad (4)$$

where

- A_{max} is the absorbance value at the absorption maximum;
- 10 000 is the scaling factor;
- 2 550 is the $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value of lutein. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value is the theoretical absorption of a 1 % solution of lutein in a 1 cm cuvette at approximately 445 nm (λ_{max}) in ethanol, see [2].

$$\rho_{\text{beta-caroten}} = \frac{A_{\text{max}} \times 10\,000}{2\,620} \quad (5)$$

where

- A_{max} is the absorbance value at the absorption maximum;
- 10 000 is the scaling factor;

2 550 is the $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value of β -caroten. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ value is the theoretical absorption of a 1 % solution of β -caroten in a 1 cm cuvette at approximately 450 nm (λ_{max}) in ethanol, see [2].

Determination response factor of standard solution with HPLC

Within three hours after preparation, inject at least six aliquots of 20 μl of each standard solution into the HPLC system. Determine the total peak areas of the chromatograms (including the peaks of the all-E-isomer, of eventually present Z-isomers and impurities, but excluding the solvent peak). The peak area of all-E-astaxanthin or all-E-canthaxanthin should exceed 95 % of the respective total peak area of the chromatogram.

Calculate the response factors (RF), in area units $\times\text{l}/\text{mg}$, for the individual pigments from the mean total peak areas obtained from all chromatograms and from the individual pigments concentrations measured by spectrophotometry using the following equation:

$$RF = \frac{A_{\text{total}}}{\rho} \quad (6)$$

where

A_{total} is the mean total peak area from all chromatograms of the individual pigments standard solutions, in area units;

ρ is the spectrophotometrically measured individual pigments concentration in the standard solution, in mg/l .

The standard solutions should only be used at the day of preparation.

Control of the response of the HPLC system

It is not necessary to re-calibrate the HPLC every day if the system is not changed. Instead, the constancy of response of the HPLC system can be checked via control solutions (3.18) which are analysed along with each set of samples. These controls are solutions of heat-isomerised mixtures of canthaxanthin, astaxanthin, and other carotenoids, concentrations of which have been found to be stable at approximately 23 °C in darkness over at least 3 months. As long as the carotenoid concentrations measured in these control solutions do not exceed defined tolerance limits (e.g. 5% of the initial value), the existing calibration can be applied. The HPLC system has to be re-calibrated if the tolerance limits are exceeded. This control procedure accounts for the fact that carotenoid reference materials are expensive and difficult to be stored (should be kept strictly under exclusion of oxygen, e.g. in closed ampoules).

Procedure

Small scale extraction

Homogenize approximately 100 g of fish tissue with a knife mill (0). Weigh, to the nearest 1 mg, approximately 1 g of the homogenate and approximately 1 g of magnesium sulfate (0) into a 25 ml plastic SPE-column equipped with a 10 μm -fritt at the bottom (0). Insert the column into a closed valve of a solid-phase extraction manifold (0). Add 8 ml of fresh made acetone added BHT (0) and blend the mixture with a dispersing instrument (0). Open the valve and suck the extract through the frit into a 35 ml test tube using vacuum. Repeat extraction and filtration with two additional portions of 8 ml acetone.

Evaporate the combined filtrates under a flow of nitrogen at 50 °C. Dissolve the dry and often oily residue in approximately 3 ml of a mixture of 86 parts per volume of *n*-heptane (3.7) and 14 parts per volume of acetone (0) and transfer the solution into a 10 ml volumetric flask.

Wash the test tube with two further portions of 3 ml of the mixture of *n*-heptane and acetone and combine the solutions with the extract in the volumetric flask.

Dilute to the mark with the mixture of *n*-heptane and acetone, shake, and fill an aliquot of the turbid solution into a HPLC vial. Centrifuge the vial at approximately 2 500 g and use the clear supernatant into the HPLC.

HPLC

Conditions

- Analytical separating column, for example LiChrosorb® Si60, (particle size of 5 µm, length of 125 mm, inner diameter of 4 mm);
- Flow rate: 1,2 ml/min;
- Running time 30 minutes
- Pressure: 50-80 bar;
- Temperature: ambient (e.g. T = 23 °C);
- Injection volume: 10 µl to 100 µl;
- Detection: VIS at $\lambda = 470$ nm.

In order to avoid tailing of the astaxanthin peaks, the stationary phase is modified by pumping a solution of 1 g of phosphoric acid (3.3) dissolved in 100 ml of methanol (3.10) through the packed column for 1 h at a flow rate of 1 ml/min. The column is then washed with mobile phase (0) at a flow rate of 1.2 ml/min for at least 5 h. Then the column is inserted into the HPLC system. The acid-modification is maintained for more than one year if the stationary phase is not exposed to polar solvents like e.g. water.

Retention times

The retention of all-E-astaxanthin is 7 min to 12 min.

Table 1 — Relative retention times compared to all-E-astaxanthin

Isomer	Approximate relative retention time, in min
Other Z-astaxanthin isomers	0,89 to 0,94
9Z-astaxanthin	1,16
13Z-astaxanthin	1,22
Esters of astaxanthin and other xanthophylls with fatty acids	0,10 – 0,40
all-E-β-carotene	0,14
all-E-echinenone	0,20

all-E-and Z-isomers of canthaxanthin ¹	0,35
all-E-β-cryptoxanthin	0,35
all-E-astacene	0,46
all-E-adonirubin	0,56
all-E-semiastacene	0,66
all-E-lutein	1,8
all-E-zeaxanthin	1,9

Calculation

Calculate the mass fraction of total astaxanthin, $w_{\text{total-asta}}$, and the other pigments in milligram per kilogram using equation (8);

$$w_{\text{total-asta}} = \frac{(A_{\text{all-E}} + A_{9Z} \times 1,2 + A_{13Z} \times 1,6 + A_{XZ}) \times V}{m \times RF_{\text{Ast}}} \quad (7)$$

where

- $A_{\text{all-E}}$ is the peak area of all-E-astaxanthin, in area units;
- A_{9Z} is the peak area of 9Z-astaxanthin, in area units;
- A_{13Z} is the peak area of 13Z-astaxanthin, in area units;
- A_{XZ} is the peak area of other Z-isomers of astaxanthin, in area units;
- m is the sample amount, in g;
- RF_{Ast} is the response factor of all-E-astaxanthin, in area units \times l/mg;
- 1,2 is the relative response factor of 9Z-astaxanthin;
- 1,6 is the relative response factor of 13Z-astaxanthin.

The relative response factors take into account that at the given HPLC conditions, the specific responses of 9Z- and 13Z-astaxanthin are 1,2 and 1,6 times lower than that of the all-E-astaxanthin [3].

Calculate the mass fraction of total canthaxanthin, $w_{\text{total-cantaxanthin}}$ and other pigments, in milligram per kilogram using equation (9);

$$w_{\text{total-canta}} = \frac{A_{\text{all-E+Z}} \times V}{m \times RF_{\text{all-E-can}}} \quad (8)$$

where

- $A_{\text{all-E+Z}}$ is the peak area of all-E- and Z-canthaxanthin, in area units;
- V is the dilution factor, in ml;
- m is the sample amount, in g;
- $RF_{\text{all-E-can}}$ is the response factor of all-E-astaxanthin, in area units \times l/mg.

Calculate the dilution factor, V , in millilitre, using equation (10):

¹) Geometrical isomers of other carotenoids than astaxanthin are not separated and occur in the same peak

$$V = V_1 \times \frac{20}{V_{inj}} \quad (11)$$

where

V_1 is the final volume of extract, in ml;

20 is the injection volume of the standard solutions used for calibration, in μl ;

V_{inj} is the injection volume of the extract, in μl .

Annex A (informative)

Validation for astaxanthin

A.1 Selectivity

The HPLC system provides a near base-line separation of all-E-astaxanthin, 9Z-astaxanthin and 13Z-astaxanthin. These isomers are well separated from the potential oxidation products of astaxanthin, astacene and semi-astacene and from other carotenoids potentially present in fish tissue (e.g. canthaxanthin, adonirubin, lutein and zeaxanthin).

A.2 Linearity

Astaxanthin was heat-isomerised as described above (see preparation of control solution, 3.15) and diluted into solutions with total astaxanthin concentrations ranging from 0,001 mg/l to 5 mg/l. The solutions were injected in aliquots of 20 µl into the HPLC system. The response of total astaxanthin was linear in the range of 0,01 mg/l to 5 mg/l showing a correlation coefficient R^2 of 0,9999. At 0,005 mg/l the peak height of all-E-astaxanthin exceeded the baseline noise by factor 3 (= detection limit).

Taking into account the sample amounts, the dilutions, and a maximum injection volume of 100 µl, the following analytical limits were calculated:

Detection limit (LOD):

- 0,002 mg/kg (large scale extraction);
- 0,005 mg/kg (small scale extraction).

Lower quantification Limit (LOQ):

- 0,01 mg/kg (large scale extraction)
- 0,02 mg/kg (small scale extraction)

A.3 Extraction efficacy

Re-extraction of the residue left after the described routine extractions released 2,6 % (large scale) or 0,5 % (small scale) of the totally extracted astaxanthin. This corresponds to an efficacy of the routine extraction procedures of 97,4 % (large scale) and 99,5 % (small scale).

A.4 Recovery

Fish flesh homogenate was spiked with heat-isomerised astaxanthin (see preparation of control solution, 3.15) at 2 to 5 fold amounts of the endogeneous astaxanthin and analysed following the present method. The spiked astaxanthin could be recovered by 98,5 % (large scale extraction, n = 6) and 99,6 % (small scale extraction, n = 5).

A.5 Precision

Fish fillets were pooled, homogenized using a knife mill, divided into portions, and analysed in several replicates. The found total astaxanthin contents varied with a residual standard deviations (RSD) of 3,6 % for the large scale extraction (fifteen replicate analyses, conducted by three technicians at the same day) resulting in a Horrat value of 0.32 (mean astaxanthin concentration: 9.58 mg/kg). Using the small scale extraction procedure, seven replicate analyses conducted by one technician at the same day gave a residual standard deviation of 1,0 % corresponding to a Horrat value of 0.1 (mean astaxanthin concentration was 4.54 mg/kg).

A.6 Robustness

Before starting with the small scale extraction in 1999, the large scale extraction procedure of the present method was routinely used in a industrial laboratory for longer than a decade. In total, until today with both assay variants more than ten thousand of flesh samples from trout and various salmon species were analysed. Thereby, the method proved to be reliable and rugged. The HPLC system of the present method is also used for the analysis of astaxanthin in feedstuffs.

Validation for canthaxanthin, zeaxanthin, lutein, and β , β -carotene are missing

**Annex B
(informative)**

Typical chromatograms

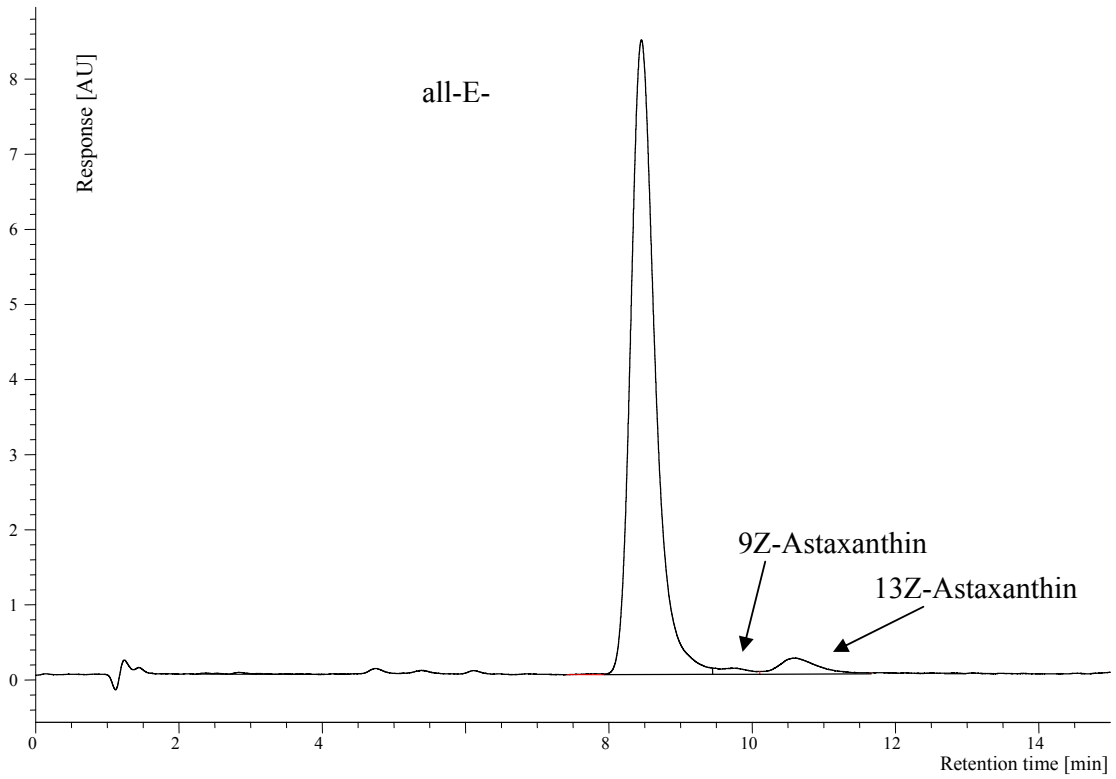


Figure B.1 — Chromatogram of a fillet extract of a trout fed with astaxanthin

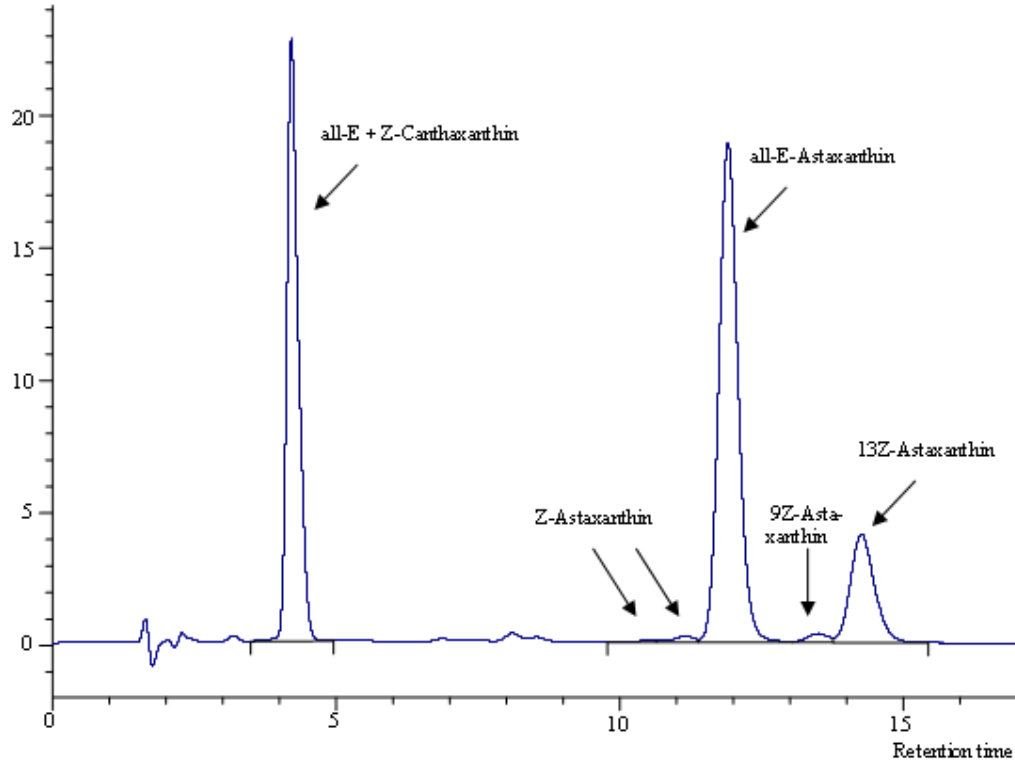


Figure B.2 — Chromatogram of a control solution with heat-isomerized astaxanthin and canthaxanthin

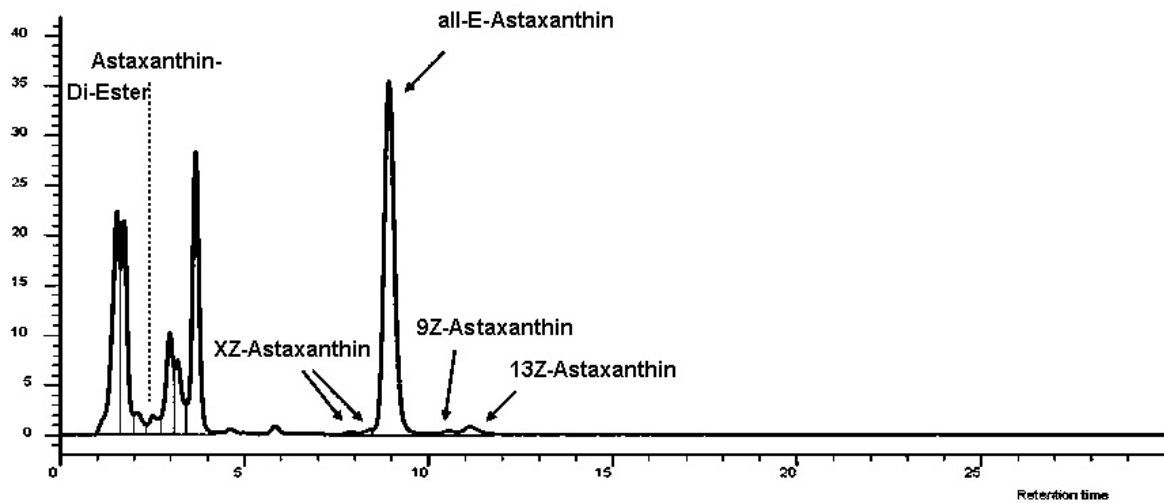


Figure B.3 — Chromatogram of a control solution with both free astaxanthin (*all-E*- and *Z*-isomers) and esterified astaxanthin.

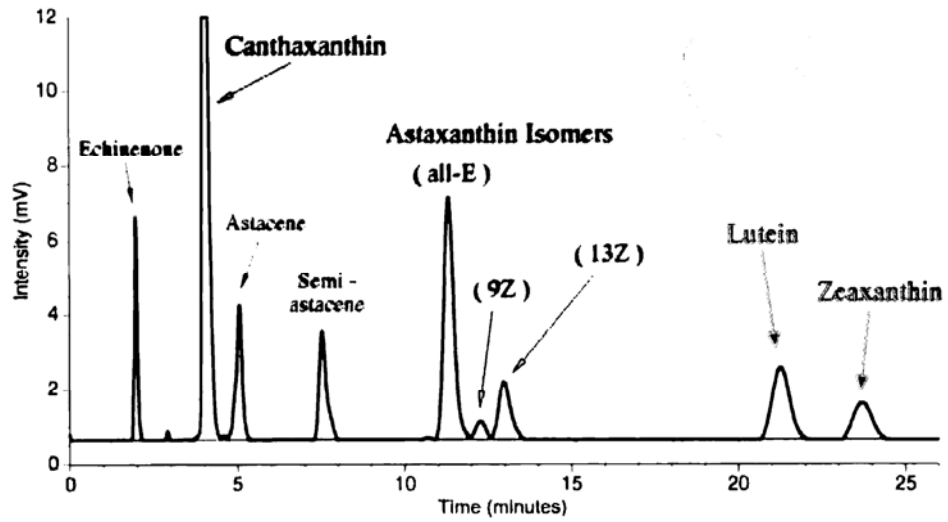


Figure B.3 — Chromatogram of carotenoid standards.

Bibliography

- [1] Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, ISBN 3-7643-2909-2, 0-8176-2909-2, p. 57 (1995)
- [2] Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, J.Chr. Bauernfeind (Ed.), Academic Press, New York, USA, ISBN 0-12-082850, pp. 860, 888 (1981)
- [3] W. Schüep and J. Schierle in Carotenoids, Volume 1A: Isolation and Analysis; G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.); Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, ISBN 3-7643-2908-4, pp 273-276 (1995)
- [4] Carotenoids, Hanbook, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (Eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, ISBN 3-7643-6180-8, (2004)