高效液相色谱检测红球藻中虾青素的技术研究

赵小林,刘秋平,赵秀琳,庞黎明,张思静,牛之瑞,王亚琴,马雪涛,谭建林*

云南省产品质量监督检验研究院,国家热带农副产品质量检验检测中心,云南 昆明

收稿日期: 2024年2月18日: 录用日期: 2024年5月2日: 发布日期: 2024年5月13日

摘 要

优化高效液相色谱法检测红球藻中虾青素的条件和方法。使用乙醇 - 甲醇(1:3)提取红球藻样品,经0.1 mol/L氢氧化钠 - 甲醇皂化后,用0.2 mL 2%磷酸 - 甲醇中和剩余碱后,采用高效液相色谱法测定。总虾青素在0.1~10 μ g/mL范围内线性良好($R^2 \ge 0.999$),方法定量限10 mg/kg。在添加水平为10 mg/kg和50 mg/kg时,回收率为91%~100%,相对标准偏差低于1.0%。该方法较GB/T 31520-2015中使用甲醇 - 叔丁基甲醚 - 磷酸为流动相,二氯甲烷 - 甲醇(1:3)作为提取液,经0.1 mol/L氢氧化钠 - 甲醇皂化后,用0.4 mL 2%磷酸 - 甲醇中和剩余碱后,结果更准确、稳定、灵敏,且更为环保,能够满足红球藻中总虾青素检测与确证需要。

关键词

高效液相色谱法,红球藻,虾青素

Technical Study on the Detection of Astaxanthin in *Haematococcus* by High Performance Liquid Chromatography

Xiaolin Zhao, Qiuping Liu, Xiulin Zhao, Liming Pang, Sijing Zhang, Zhirui Niu, Yaqin Wang, Xuetao Ma, Jianlin Tan*

National Tropical Agricultural By-Products Quality Inspection and Testing Center, Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Kunming Yunnan

Received: Feb. 18th, 2024; accepted: May 2nd, 2024; published: May 13th, 2024

Abstract

To optimize the conditions and methods for the determination of astaxanthin in *Haematococcus* by high-performance liquid chromatography (HPLC). The *Haematococcus* samples were extracted *通讯作者。

文章引用: 赵小林, 刘秋平, 赵秀琳, 庞黎明, 张思静, 牛之瑞, 王亚琴, 马雪涛, 谭建林. 高效液相色谱检测红球藻中虾青素的技术研究[J]. 食品与营养科学, 2024, 13(2): 184-190. DOI: 10.12677/hjfns.2024.132023

using ethanol-methanol (1:3), saponified by 0.1 mol/L sodium hydroxide-methanol, and then determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) after neutralization of the remaining alkali with 0.2 mL 2% phosphoric acid-methanol. The linearity of total astaxanthin was good in the range of 0.1~10 µg/mL (R2 \geq 0.999), and the limit of quantification of the method was 10 mg/kg. The recoveries ranged from 91% to 100% at the spiked levels of 10 mg/kg and 50 mg/kg with the relative standard deviations (RSDs) lower than 1.0%. Compared with GB/T 31520-2015, the method used methanol-tert-butyl-methyl ether-phosphoric acid as mobile phase, dichloromethane-methanol (1:3) as extraction liquid, was saponified by 0.1mol/L sodium hydroxide-methanol, and neutralized by 0.4mL 2% phosphoric acid-methanol, the results were more accurate, stable, sensitive, and environmentally friendly. It can meet the need for the detection and confirmation of total astaxanthin in Haematococcus.

Keywords

High Performance Liquid Chromatography, Haematococcus, Astaxanthin

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



Open Access

1. 引言

虾青素是一种天然的萜烯类不饱和化合物,其分子结构中含有 2 个 β-紫罗酮环和 11 个共轭双键[1]。虾青素是一种断链抗氧化剂,具有极强的抗氧化性[2],虾青素的抗氧化能力是维生素 C 的 6000 倍,是白藜芦醇的 3000 倍,是维生素 E 的 1000 倍,是花青素的 700 倍,是番茄红素的 1800 倍,是茶多酚的 320 倍及是胡萝卜素的 10 倍,是自然界中唯一能够通过人体血脑屏障的类胡萝卜素,具有许多对人类健康有益的生理活性[3]。同时,有抑制肿瘤发生,增强免疫力,清除体内自由基等多方面的生理作用[4],对紫外线引起的皮肤癌有很好的治疗效果,对糖尿病引起的眼病也有防治作用[5],虾青素可以抑制高脂肪饮食导致的体质量和脂肪组织的增加,具有调节脂质代谢和肠道微生物群的功能,防止高脂饮食引起的肥胖[6],并有改善高脂所致肝代谢紊乱的节律性调节作用[7]。虾青素在保健品、医药、化妆品、食品添加剂及水产养殖等方面具有广阔的应用前景[1] [8] [9]。虾青素的制备方法包括天然提取[10]和化学合成[11]两种。化学合成虾青素同天然虾青素在架构、功能、应用及安全性等方面差别显著,其稳定性、抗氧化活性和着色性也明显低于天然虾青素,因此进行大规模生产一般倾向于天然虾青素的提取。

红球藻是一种淡水单细胞绿藻,隶属绿藻门、团藻目、红球藻科、红球藻属。该藻能大量累积虾青素而呈现红色,故名红球藻[12]。红球藻是自然界中虾青素含量最丰富的生物,其虾青素积累量最高可达5.0%,被誉为天然虾青素的"浓缩品"。红球藻中虾青素无论是在功能还是在安全性等方面都具有其它来源的虾青素无法比拟的优势[13] [14] [15]。因此红球藻被认为是天然虾青素最好的生物来源,具有很高的营养价值和药用价值[16]。

我国 GB 2760-2014《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》[17]规定食品中抗氧化剂的最大使用量分别为 0.1~0.2 g/kg,但对虾青素没有限量要求,检测标准分别为 GB/T 31520-2015《红球藻中虾青素的测定液相色谱法》[18]和 SN/T 3053-2009《进出口动物源性中角黄素、虾青素的检测方法》[19]。目前国内外检测虾青素的方法主要有分光光度计法[20]、液相色谱法[21]、高效液相色谱法 - 质谱法[22]。GB/T31520-2015《红球藻中虾青素的测定液相色谱法》方法前处理成本高、检测时间长、其有机试剂有较强的毒性。而本方法通过对提取试剂、皂化液、流动相的优化,建立了红球藻的快速分析方法。前处

理过程大大缩短了检测时间、降低成本,更重要的是替换了有较强毒性的二氯甲烷和叔丁基甲醚,无论是对人体健康还是环境也有一定的保护作用,为相关生产企业以及研究机构提供技术参考。

2. 材料与方法

2.1. 试剂与仪器

甲醇、乙腈、乙醇:色谱纯,德国默克集团;氢氧化钠:优级纯,四川西陇化工有限公司;磷酸:色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司;2,4二叔丁基对甲酚:优级纯,阿拉丁试剂上海有限公司;全反式虾青素:纯度 \geq 99.0%,艾吉析科技(上海)有限公司;9-顺虾青素、13-顺虾青素:纯度 \geq 99.0%,SIGMA公司;红球藻:本地市场采购。

LC-20 高效液相色谱仪:日本岛津公司;色谱柱:C18,5 μ m,4.6×250 mm,Spolar HPLC PACKED COLUMN;0.1 mg 和 0.01 mg 分析天平:瑞士梅特勒公司;TGL-20B 高速离心机:上海科学仪器厂;KQ-800DE 超声清洗仪:昆山市超声仪器有限公司;涡旋震荡器:广州台宁科技有限公司;20~200 uL、10~1000 uL 移液枪:德国 Eppendorf 公司。

2.2. 试验方法

2.2.1. 标准溶液配制

全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素标准储备液(100 μ g/mL): 分别精确称取全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素标准品各 1 mg 于 10 mL 棕色容量瓶中,用丙酮溶解后定容至 10 mL。放置 -20° C 冰箱避光保存,有效期 1 个月。

全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素混合标准中间工作溶液(10 μg/mL): 分别吸取全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素标准溶液各 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用丙酮定容至 10 mL,放置−20℃ 冰箱避光保存,有效期一周。

全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素混合标准工作溶液:吸取适合体积的混合标准中间工作液,采用梯度稀释的方式配制成混合标准工作溶液,浓度为: 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μg/mL,现配现用。

2.2.2. 样品前处理

样品制备:将包衣过的红球藻放入研磨器中研磨至粉末,后密封保存并标记,于0~20℃保存。

样品提取: 称取 0.1 g 样品于研磨器中,加入 2 mL 乙醇 - 甲醇溶液(1:3)研磨,研磨至没有颗粒感,把样液转移至 10 mL 棕色容量瓶中,反复加入提取液至研磨器中冲洗,直至无色,最后定容至 10 mL。超声提取 30 min,6000 r/min 离心 6 min,取 5 mL 上清液于 10 mL 比色管中,加入 0.2 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠 - 甲醇,旋涡混合 1 min,充入氮气,用封口膜封好,放入 5 \mathbb{C} 冰箱皂化 14 h,皂化后加入 0.2 mL 2% 磷酸 - 磷酸中和剩余碱,旋涡混合 1 min,用氮气吹至 5 mL,过滤上机测定。

注: 如果样品检测浓度超出标液溶液浓度,稀释至标准工作溶液的范围再进行检测。

2.2.3. 仪器条件

采用 Spolar HPLC PACKED COLUMN 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温 30℃; 流速 1 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长: 474 nm; 流动相 A: 甲醇, B: 乙腈; 等度洗脱程序: 70% A: 30% B。

3. 结果与分析

3.1. 色谱柱的选择

分别采用 Agilent TC-C18 色谱柱(150 mm 4.6 mm 5 μm)、Spolar HPLC PACKED COLUMN (4.6mm ×

250 mm 5 μm),发现分别采用 Agilent 5 TC-C18 色谱柱不适合红球藻虾青素的分析,存在两个目标峰分不开(具体是哪两个峰)的情况,采用 Spolar HPLC PACKED COLUMN 色谱柱分析时,三个目标峰完全分离,峰形较好,无拖尾现象,因此选择 Spolar HPLC PACKED COLUMN 进行分析(如图 1 所示)。

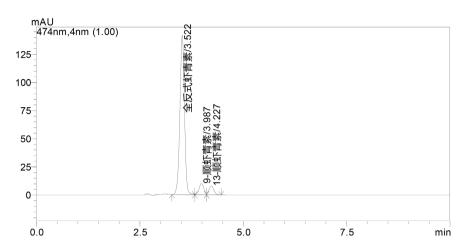


Figure 1. Chromatograms of three astaxanthin standard solutions 图 1.3 种虾青素标准物质色谱图

3.2. 流动相的优化

流动相分别采用 0.05%磷酸 - 乙腈、1%磷酸 - 叔丁基甲醚 - 乙腈、甲醇 - 乙腈进行研究,发现 0.05%磷酸 - 乙腈的响应相对于 0.05%磷酸 - 叔丁基甲醚 - 乙腈和甲醇 - 乙腈较低,而 1%磷酸 - 叔丁基甲醚 - 乙腈和甲醇 - 乙腈的响应相差不大,由于叔丁基甲醚的毒性比甲醇大,且费用较高,出于环保、人员安全、成本的角度来说,选择甲醇 - 乙腈进行分析最佳。结果如图 2 所示。

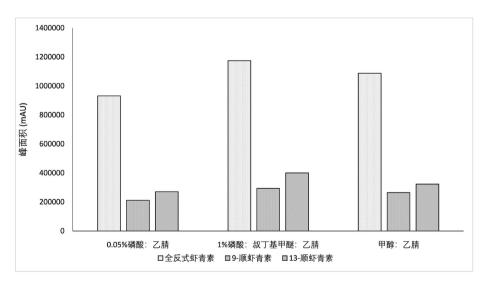


Figure 2. Optimization comparison of mobile phases **图 2.** 流动相的优化对比

3.3. 提取试剂优化

样品经过 2.2.2 节方法提取,分别加入配制好二氯甲烷 - 甲醇(1:1)、二氯甲烷 - 甲醇(1:2)、二氯甲烷

- 甲醇(1:3)、二氯甲烷 - 甲醇(1:4)、乙醇 - 甲醇(1:1)、乙醇 - 甲醇(1:2)、乙醇 - 甲醇(1:3)及乙醇 - 甲醇(1:4) 进行提取,比较不同提取试剂对提取效果的影响。结果如图 3 所示,乙醇 - 甲醇(1:3)提取试剂效果最好。

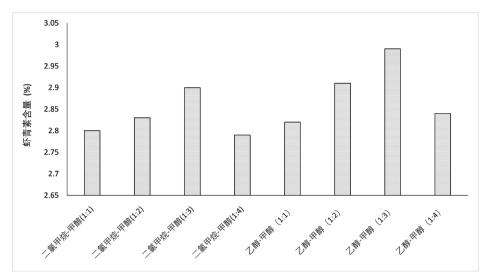


Figure 3. Comparison of extraction reagent effects 图 3. 提取试剂效果对比

3.4. 皂化液的优化

样品经过 2.2.2 节方法提取,加入 0.05~0.8 mL 的皂化液(氢氧化钠-甲醇),比较不同皂化液体积对皂化效果产生的影响。结果如图 4 所示,皂化液的量为 0.2 mL 时,皂化液皂化效果最好,到 0.4~0.8 mL 时,4 个目标化合物的含量没有明显的变化,因此选择 0.2 mL 皂化液皂化。

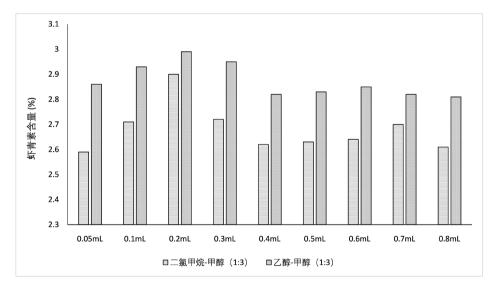


Figure 4. Comparison of different volumes of saponification solutions 图 4. 不同体积皂化液对比

3.5. 方法评价

对 0.1~10 μg/mL 的全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素混合标准溶液进行测定,外标法定量,

采用 2.3 仪器条件进行测定,以标准溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,由表 1 可见,各标准曲线相关系数(r2)均大于 0.999,相关性良好。

选取含有虾青素的样品,在试样中添加全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素的混合标准溶液,分别进行 0.05%和 0.1%的加标回收试验,每份样品检测 6 次,实验结果表明本方法的回收率为96.3%~99.7%,相对标准偏差小于 2.37%。样品加标量和回收率的试验数据见表 1。

Table 1. Linear equation, correlation coefficient, spiked recovery rate, relative standard deviation (n=6) of three types of astaxanthin compared to different volumes of saponification solutions

表 1.3 种虾青素的线性方程、相关系数、加标回收率、相对标准偏差(n=6)

名称	线性方程	相关系数 R ²	本底值 %	测定值 %	添加量 %	回收率 %	精密度 %
全反式虾青素	$Y = 9.25e^6X - 0.128$	0.9994	0.164	0.212	0.05	96.3	2.37
				0.261	0.1	98.6	1.33
9-顺虾青素	$Y = 3.71e^5X - 5.41e^3$	0.9994	0.0720	0.120	0.05	97.2	0.77
				0.168	0.1	98.7	0.83
13-顺虾青素	$Y = 3.08e^5X - 4.24e^3$	0.9998	0.0491	0.0978	0.05	99.3	1.05
				0.147	0.1	99.6	0.51

注: 9-顺虾青素和 13-顺虾青素没有折算校正因子。

3.6. 样品的检测结果

采用本检验方法对市场上采购 15 批红球藻进行全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素检测,15 批红球藻中都检测出虾青素,含量在 0.18~2.99%,实验数据见图 5。

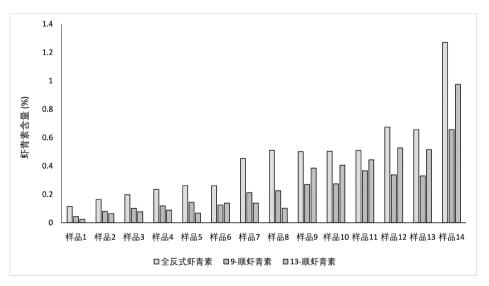


Figure 5. 15 batches of sample testing results **图 5.** 15 批样品检测结果

4. 小结和讨论

本方法用乙醇 - 甲醇进行提取, 氢氧化钠 - 甲醇皂化, 使虾青素酯转化成游离态的虾青素, 优化了色谱条件和前处理条件, 建立了红球藻中全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素的高效液相色谱检测

方法,该方法前处理过程快速、环保,方法精密度和线性关系均满足红球藻种全反式虾青素、9-顺虾青素、13-顺虾青素的分析检测要求。红球藻中的虾青素具有极强的抗氧化性、抗炎、促进心血管健康、增强免疫力、清除自由基等有益功效,因此广泛应用于医疗、食品、化妆品和水产动物养殖的饲料添加剂等方面。红球藻作为天然虾青素的最佳来源,随着我们对这种独特藻类的了解不断加深,其重要性和潜在应用可能会进一步增加。

参考文献

- [1] 赵英源, 刘俊霞, 陈姝彤, 等. 虾青素生理活性的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2020, 39(3): 80-88.
- [2] 江利华,柳慧芳,郝光飞,等. 虾青素抗氧化能力研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 350-354.
- [3] 孟昂, 赵晓燕, 朱运平, 等, 天然色素虾青素的功能性研究进展[J], 粮油食品科技, 2019, 27(5); 49-54,
- [4] Chintong, S., Phatvej, W., Rerk-Am, U., et al. (2019) In vitro Antioxidant, Antityrosinase, and Cytotoxicactivities of Astaxanthin from Shrimp Waste. Antioxidants, 8, Article 128. https://doi.org/10.3390/antiox8050128
- [5] 李勇超, 贺青华, 刘瑞雪, 等. 雨生红球藻源虾青素对糖尿病小鼠的降糖作用及其机制[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 355-359.
- [6] Wang, J.H., Liu, S.W., Wang, H., et al. (2019) Xanthophyllomyces dendrorhous-Derived Astaxanthin Regulates Lipid Metabolism and Gut Microbiota in Obese Mice Induced by a High-Fat Diet. Marine Drugs, 17, Article 337. https://doi.org/10.3390/md17060337
- [7] 左正宇, 邵阳, 刘杨, 等. 虾青素调节肝脂代谢与昼夜节律基因表达[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 165-172.
- [8] Lin, W.N., Wen, Y.T. and Tsai, R.K. (2018) Neuroprotective Effect of Astaxanthin in a Rat Model of Anterior Ischemic Optic Neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **59**, Article 2498.
- [9] Dong, S.Z., Huang, Y., Zhang, R., et al. (2014) Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga Haematococcus pluvialis. The Scientific World Journal, 2014, Article ID: 694305. https://doi.org/10.1155/2014/694305
- [10] 班磊, 尤建伟. 虾青素制备方法的研究进展[J]. 化工管理, 2019(21): 31-32.
- [11] 陈丹, 汪锋, 蒋珊, 等. 虾青素化学和生物合成研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 445-453.
- [12] 于广利, 赵峡编. 糖药物学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2012.
- [13] 陈涛, 邵泽彻, 杨福梅, 等. 雨生红球藻中天然虾青素的应用研究[J]. 农业工程技术, 2023, 43(15): 76-77.
- [14] 余小元, 谢子健, 曹月琴, 等. 虾青素的主要来源物种——雨生红球藻[J]. 生物学通报, 2022, 57(2): 7-11.
- [15] 黄静雯, 谭惠文, 林怡妤, 等. 虾青素毒性的研究图谱分析及安全性评价[J]. 广东化工, 2023, 50(8): 102-104.
- [16] 李艳, 高静. 雨生红球藻天然虾青素提取研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 211-217.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760-2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京: 标准出版社, 2014.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 31520-2015 红球藻中虾青素的测定液相色谱法[S]. 北京:标准出版社, 2015.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, SN/T 2327-2009 进出口动物源性食品中角黄素、虾青素的检测方法[S]. 北京:标准出版社, 2009.
- [20] 张泳, 厉妙沙, 吴嘉圣. 分光光度计法测定虾青素[J]. 浙江化工, 2015, 46(9): 51-54.
- [21] 赵立艳, 赵广华, 陈芳, 等. 利用高效液相色谱法测定雨生红球藻中虾青素含量[J]. 食品工业科技, 2006, 27(5): 177-178.
- [22] 雷凤爱. 雨生红球藻中虾青素的分离纯化及异构体的分析研究[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古工业大学, 2009.