

文章编号:1001-5132(2007)04-0441-05

红球藻虾青素含量测定方法的探讨

陈晓飞, 严小军*

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 研究比较了4种测定雨生红球藻内虾青素含量的方法, 包括Cyanotech公司的测定方法, 荆州天然虾青素有限公司的方法, 氯仿-乙醇混合溶液提取测定方法与高效液相色谱测定法。结果表明: HPLC法测定虾青素的标准曲线 R^2 为0.9996, 保留时间的RSD%为1.580%, 峰面积的RSD%为2.750%, 检出限为 $0.045 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 实测的样品虾青素含量为1.638%。Cyanotech公司的测定结果与HPLC法最接近, 达到1.461%, 在3种分光光度法中测定效果最好, 其他分别只达到了1.250%、1.317%。

关键词: 虾青素; 雨生红球藻; 提取; 高效液相色谱

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

虾青素(Astaxanthin)(3,3'-二羟基- β,β' -胡萝卜素-4,4'-二酮)是一种非维生素A源的酮式类胡萝卜素^[1], 呈鲜红色, 作为一种新型的生物材料, 它具有抗氧化、着色、抗癌及增强免疫等功能^[2], 特别是抗氧化功能超强, 被誉为“超级抗氧化剂”, 且对人体绝对无毒害作用^[3]。目前作为食品和饲料的色素添加剂有着广阔的应用前景, 天然虾青素更是具有重要的医疗保健价值。国际市场价格高于每公斤3000美元, 市场前景非常广阔^[4]。

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种单细胞微藻, 隶属绿藻门、团藻目、红球藻科、红球藻属。由于该藻能大量累积虾青素而呈现红色, 故取名红球藻。雨生红球藻是自然界天然虾青素含量最高的生物, 含量达到干细胞的2%~4%^[5], 因此通过培养雨生红球藻生产虾青素长期以来一

直是藻类研究的一个热点。

目前实验室的虾青素测定方法很多, 提取时间、提取溶剂、测定方法等都有所不同, 而各生产虾青素公司也有不同的测定方法。目前采用的虾青素测定方法主要有高效液相色谱测定法(HPLC)和分光光度测定法, 而我们采用实验室自己建立的高效液相色谱法与荆州天然虾青素有限公司的方法^[6], Cyanotech公司的测定方法^[7], 欧阳琴等^[8]设计的氯仿-乙醇混合溶液提取方法来进行比较, 以此研究各种方法的优劣性。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

藻粉为Cyanotech公司购买的雨生红球藻粉(细

收稿日期: 2007-06-26.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 教育部高等学校科技创新重大培育项目(705028); 科技部国际科技合作项目(国科外[2005]262-0505)。

作者简介: 陈晓飞(1982-), 男, 浙江嘉兴人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 藻类生物技术. E-mail: g05b07070302@email.nbu.edu.cn

*通讯作者: 严小军(1968-), 男, 江苏苏州人, 博士/教授, 主要研究方向: 藻类生物化学. E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

胞已破壁), 虾青素标准品购自 Sigma 公司.

1.2 仪器与设备

UV-7504 紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司); TP300 超声波清洗仪(天鹏电子新技术有限公司); 飞鸽 TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂); XW-80A 涡旋搅拌器(上海精科实业有限公司); 高效液相色谱仪(Waters 公司).

1.3 方法

所有藻粉均加液氮后用研钵研磨 5 min 进行细胞破壁.

1.3.1 荆州天然虾青素有限公司的方法^[6]

(1) 实验方法

精确称取藻粉 20 mg, 置于 10 mL 玻璃离心管, 加入 5 mL 含 5% NaOH、30% 甲醇的水溶液, 70 ℃ 水浴 5 min, 保温过程中经常摇动. 3 000 rpm 离心 3 min, 然后去上清液(叶绿素被抽提到上清液中, 并被强碱破坏), 藻渣备用.

离心管中加入 3 mL 含有少量醋酸(5 滴 10 mL) 的 DMSO(二甲基亚砜), 摇匀, 70 ℃ 保温 5 min, 保温过程中要不断摇动离心管. 3 000 rpm 离心 3 min, 将上清液移入 10 mL 容量瓶, 重复至少 3 次, 使剩余离心管底部的藻渣无颜色或很浅的颜色.

将 1 次或几次收集的上清液用 DMSO 精确定容至 10 mL, 取 1 mL 放入另 1 个 10 mL 容量瓶中, 用 DMSO 精确定容至 10 mL.

将待测溶液放入 1 cm 光径比色皿中, 在 492 nm 波长下测定吸光值 A , DMSO 作空白对照.

(2) 计算公式

溶液中虾青素的浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$):

$$C_1 = \frac{A_{492} \times 1\,000}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100}, A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2\,200.$$

藻粉中虾青素的含量:

$$C_2 = (C_1 \times 100 / 20) \times 100\%.$$

1.3.2 美国Cyanotech公司的测定方法^[7]

(1) 实验方法

称取 25 mg 干燥藻粉, 放入 10 mL 离心管中, 加 3 g 石英砂. 在离心管中加入 5 mL DMSO, 45 ~

50 ℃ 水浴 30 min, 每 10 min 涡旋振荡 15 s(共计 3 次). 3 000 rpm 离心 5 min 使细胞物质沉淀, 将上清液转入 25 mL 容量瓶中.

再往离心管中加入 5 mL 丙酮, 涡旋振荡 30 s, 3 000 rpm 离心 5 min 使细胞物质沉淀, 将上清液转入 25 mL 容量瓶中, 丙酮抽提至少 3 次, 直至上清液基本无色(吸光值小于 0.05).

用丙酮定容至 25 mL, 盖上容量瓶, 轻微振荡混合, 吸取 5 ~ 7 mL 放入离心管, 再次 3 000 rpm 离心以除去前面步骤中带入的颗粒物.

在 474 nm 波长下测定最大吸光值, 丙酮作空白对照. 如果吸光值大于 1.25, 则必须对样品用丙酮稀释后再测, 稀释倍数一般为 1:7.

(2) 计算公式

$$\text{类胡萝卜素质量}(\text{mg}) = \frac{\text{最大吸光值 } A}{250} \times 25 \text{ mL}(\text{丙酮}) \times \text{稀释倍数}.$$

$$\text{虾青素}(\%) = \frac{\text{类胡萝卜素质量}(\text{mg})}{\text{样品质量}(\text{mg})} \times 80\%.$$

$$\text{虾青素}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{\text{类胡萝卜素质量}(\text{mg}) \times 80\%}{25 \text{ mL} \times 8}.$$

1.3.3 氯仿-乙醇混合溶液提取方法^[8]

(1) 实验方法

取 10 mg 干燥的藻粉, 加入到 10 mL 离心管中, 再在离心管中加入 5 mL 的 5% KOH、30% 甲醇的混合溶液, 50 ℃ 下处理 15 min, 以去除叶绿素. 用蒸馏水洗 2 次, 3 000 rpm 离心, 然后去除上清液. 在去除上清液后的藻渣中加 5 mL 氯仿:乙醇($v/v=1:1$) 的混合溶液, 40 ℃ 下水浴 45 min, 保温过程中要经常振荡. 然后 3 000 rpm 离心 5 min, 取上清液. 再用氯仿:乙醇的混合溶液定容至 10 mL 容量瓶中. 轻微振荡混匀, 再在 487 nm 下测定最大吸光值. 如果吸光值过高, 可适当稀释 5 倍后再测.

(2) 计算公式

$$\text{虾青素含量 } C(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) =$$

$$\text{吸光值 } A / \text{消光系数 } \alpha.$$

$$\text{虾青素含量}(\%) = \frac{C \times 10 \text{ mL} \times 5}{10 \text{ mg}} \times 100\%.$$

1.3.4 高效液相色谱分析测定

Nova-Pak C18 色谱柱(150 mm×3.9 mm, 5 μm, 美国Waters公司);流动相A为水,流动相B为甲醇;洗脱梯度:10% A, 90% B(0 min);10% A, 90% B(1 min);0% A, 100% B(10 min);0% A, 100% B(20 min). 流速 1 mL·min⁻¹;检测器为Waters 996 光电二极管阵列检测器;光谱扫描波长范围 300 ~ 700 nm, 检测波长为 476 nm;进样量为 10 μL.

(1) 检测波长的选择. 雨生红球藻中含有多种色素,其各种组分的吸收峰在 300 ~ 670 nm 之间,游离虾青素和虾青素酯的吸收峰在 470 ~ 480 nm 之间,因此分析选用检测波长为 476 nm.

(2) 用外标峰面积法测定线性关系. 准确吸取一定体积的虾青素标准储备液,配制成 6 份质量浓度不同的标准样品,分别取 10 μL 进样. 由色谱工作站处理数据,以虾青素质量浓度为横坐标,相应峰面积为纵坐标,绘制虾青素含量的标准曲线.

(3) 精密度实验. 将一标准溶液平行测定 6 次,计算各组分的峰面积和保留时间的相对标准偏差.

(4) 雨生红球藻中虾青素的提取. 取 10 mg 藻粉,加液氮后用研钵研磨 5 min 进行细胞破壁,加入 3 mL 丙酮,涡旋震荡 15 s,置 50 °C 水浴 30 min,每隔 10 min 震荡 15 s,3 500 rpm 离心 10 min,取上清液,再加入 2 mL 丙酮,涡旋震荡 15 s 后再次离心,重复以上操作直到藻体变白色. 将虾青素丙酮提取液用氮气吹干,用 25 mL 甲醇定容后贮存于 -20 °C 冰箱备用.

2 结果与讨论

2.1 HPLC 分析方法的建立

用外标峰面积法测定结果,标准虾青素 HPLC 图谱如图 1 所示,实验样品提取得到的虾青素的 HPLC 图谱如图 2 所示.

由色谱工作站处理数据,以虾青素的质量浓度

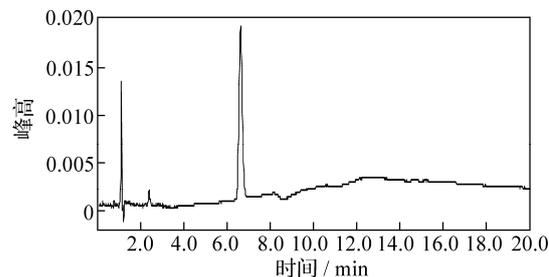


图1 标准虾青素 HPLC 图谱

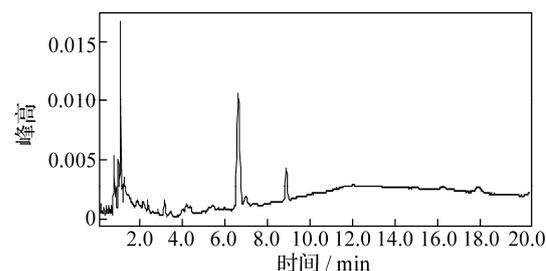


图2 藻粉中提取的虾青素 HPLC 图谱

为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,得到虾青素的标准曲线,如图 3 所示, $y = 32\ 202x + 12\ 122$, $R^2 = 0.999\ 6$. 以标准品的峰高等于 2 倍基线噪音时虾青素的量作为检出限,则虾青素的检出限为 0.045 μg·mL⁻¹.

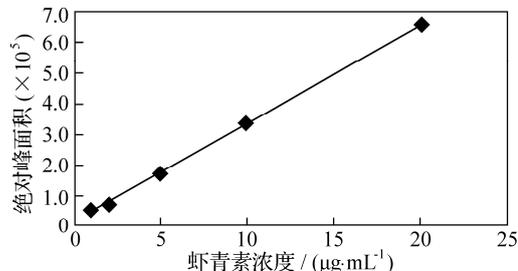


图3 标准虾青素 HPLC 分析的浓度与峰面积工作曲线图

精密度实验结果:将一标准溶液平行测定 6 次,计算各组分的峰面积、保留时间及它们的相对标准偏差,结果见表 1.

表1 虾青素 HPLC 分析方法的精密度指标($n=6$)

化合物	保留时间		峰面积	
	Rt/min	RSD/%	(A ± s) / 10 ⁵ μV	RSD/%
虾青素	6.619±0.07	1.58	6.5472±0.18	2.75

2.2 分光光度法与 HPLC 方法的参数比较

从提取试剂、破壁方法、测定波长和摩尔吸光系数 4 个方面进行方法的参数比较,见表 2. 可看

出:提取试剂都不同,测定波长略有差别,而破壁方法除 Cyanotech 公司多加石英砂研磨,其他一样.

表 2 4 种方法的参数比较

方法	提取试剂	破壁方法	测定波长/nm	摩尔吸光系数
荆州天然虾青素有限公司的方法	DMSO+醋酸	液氮研磨	492	220
美国 Cyanotech 公司的测定方法	DMSO+丙酮	液氮研磨+石英砂	474	242
氯仿-乙醇混合溶液提取方法	氯仿:乙醇	液氮研磨	487	228
高效液相色谱分析测定方法	丙酮	液氮研磨	476	242

2.3 红球藻虾青素含量实测结果比较

表 3 是采用 4 种方法得到的最终虾青素的百分含量,可以看出,如果以 HPLC 定量分析的虾青素含量作为标准参照,采用美国 Cyanotech 公司的分析方法得到的含量值为 HPLC 法的 89%,而其他 2 种方法约为 HPLC 法的 80%.

表 3 4 种方法得到的虾青素含量

测定方法	藻粉质量/mg	虾青素含量/%	与 HPLC 比较/%
荆州天然虾青素有限公司的方法	20	1.250	76.3
美国 Cyanotech 公司的测定方法	25	1.461	89.2
氯仿-乙醇混合溶液提取方法	10	1.317	80.4
高效液相色谱分析测定方法	10	1.638	100

2.4 讨论

从表 3 中可以看到,在 3 种分光光度法中,美国 Cyanotech 公司的方法得到的虾青素含量比其他 2 种要高,达到 HPLC 测得的 89.2%,其他 2 种分别只达到了 76.3%和 80.4%.造成测定的虾青素含量差异的原因主要是:

(1) 提取溶剂

溶剂的选择对于虾青素的提取是非常重要的.荆州天然虾青素有限公司的方法的提取试剂是二甲基亚砜(带醋酸).二甲基亚砜能溶于乙醇,丙醇,

苯和氯仿等大多数有机物,被誉为“万能溶剂”,广泛用作溶剂和反应试剂^[9].醋酸能迅速渗入细胞组织,会使组织膨胀,有助于二甲基亚砜的渗入.因此能有效提取虾青素.

Cyanotech 公司采用的是先用二甲基亚砜后丙酮提取,丙酮是许多物质的良好溶剂.丙酮的极性较高,虾青素的溶解度虽然较差,但是由于是亲水性溶剂,易于渗透进入细胞中,加上配合二甲基亚砜提取,有较高的提取效率.

欧阳琴等^[8]采用的氯仿-乙醇混合溶液提取方法是用 1:1 的氯仿和乙醇混合试剂提取.但他们的的方法中没有进行二甲基亚砜的测试,因此和上述 2 种方法没有进行直接比较.

由于氯仿等溶剂亲水性很差,溶剂不容易进入细胞中,因此提取率不高^[10].而丙酮的极性较高,属亲水性溶剂,易于渗透进入细胞中,因此提取率比氯仿高.而二甲基亚砜属于高极性溶剂,虾青素溶解度小,但属于亲水性溶剂,提取率还可以,但在本次实验中采用二甲基亚砜提取得到的虾青素含量最低,证明其实际提取能力弱于丙酮和氯仿.

(2) 有机溶剂

各种有机溶剂从雨生红球藻细胞萃取虾青素的原理是溶剂通过细胞壁进入细胞,使得色素溶解在有机溶剂中从而通过扩散作用进入溶液,这是一种固-液萃取过程^[8].含有很高的虾青素的藻细胞的细胞壁很厚,在没破壁或破壁不完全的条件下虾青素很难提取出来,因此在提取前必须进行破壁处理,且破壁效果的好坏对于提取虾青素的效果有着直接的影响. Cyanotech 公司的测定方法在提取过程中放入石英砂不断地振荡细胞,起一定的破壁作用,因此在破壁效果上优于其他 2 种分光光度法,提取效果也就相对较好,这是最重要的原因.

经过以上分析,我们认为最精确测定虾青素含量的方法是 HPLC 法,但由于比较费时,仪器要求也较高,因此如果想要快速而较精确测定虾青素时,可以采用 Cyanotech 公司的测定方法.

参考文献:

- [1] 董庆霖, 赵学明, 马红武. 生物技术生产虾青素研究的最新进展[J]. 生物加工过程, 2004(5):18-24.
- [2] Dewitt S Goodman, Helen S Huang, Masamitsu Kanai, et al. The enzymatic conversion of all-trans carotene into retinal[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1967, 242(15):3 543-3 554.
- [3] 魏东, 吴汪黔生. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 在诱导条件下积累虾青素的调控理论研究新进展[J]. 中国海洋药物, 2002(2):60-64.
- [4] Lorenz R T, Cysewski G R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin[J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12:499.
- [5] 魏东, 臧晓南. 大规模培养雨生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状[J]. 中国海洋药物, 2001(5):4-8.
- [6] Boussiba S, Fan L, Vonshar A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Methods Enzymology, 1992, 213: 386-391.
- [7] Zhang Wan, Hron R J. Extraction, composition, and stability of pigments from crawfish shell waste[J]. Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture, 1995, 19:255-268.
- [8] 欧阳琴, 陈兴才, 黄亚治. 雨生红球藻虾青素提取工艺条件研究[J]. 福建轻纺, 2003, 12(12):9-13.
- [9] 石建明, 张绍军, 陶然. 粗二甲基桉枫除盐新工艺研究[J]. 无机盐工业, 2006, 12(38):37-39.
- [10] 金龙飞. 天然虾青素的应用和制备[J]. 山西食品工业, 2003(3):9-12.

Comparative Analysis of Quantitation of Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*

CHEN Xiao-fei, YAN Xiao-jun*

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The four methods of quantization of astaxanthin content in *Haematococcus pluvialis* are investigated and compared. The four methods are that proposed by Cyanotech company, the one used by Jingzhou natural Astaxanthin Inc, the one of mixture solution of chloroform and ethanol, and the one from high performance liquid chromatography (HPLC). The results show that the R^2 of graph standard of astaxanthin content is 0.9996, the RSD% of R_t is 1.58%, the RSD% of peak area is 2.75%, the detective limit is $0.045 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the sample's astaxanthin content is found to be 1.638%, as detected by HPLC. The result of 1.4611% is found to be the closest to that reported by the method of Cyanotech company, and the other two reach only 1.25% and 1.317%. In conclusion, the method of Cyanotech company is best among three methods using spectrophotometer.

Key words: astaxanthin; *Haematococcus pluvialis*; extract; HPLC

CLC number: TS201.21

Document code: A

(责任编辑 史小丽)