

利用高效液相色谱法测定 雨生红球藻中虾青素含量

赵立艳, 赵广华, 陈芳, 吴继红, 胡小松*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 利用高效液相色谱法对雨生红球藻中的虾青素含量进行了测定。色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250×4.6mm), 流动相为二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=5:85:5:5, 流速 1mL/min, 检测波长 480nm, 柱温 25℃。虾青素在 1.896~18.96μg/mL 范围内线性关系良好, $r=0.9999$, RSD=1.12% ($n=6$), 回收率为 99.69%~102.6%。本方法简便快速, 定量准确, 重现性好。

关键词 高效液相色谱, 雨生红球藻, 虾青素

Abstract: An HPLC method was developed for the determination of astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis*. The chromatography condition was: Kromasil C₁₈ (250×4.6mm) column, a mixture of dichloromethane, methanol, acetonitrile and water (5:85:5:5) as mobile phase, flow rate of 1mL/min, detect wavelength at 480nm, column temperature at 25℃. A good linearity was shown in the concentration range of 1.896~18.96 μg/mL ($r=0.9999$), RSD was 1.12% ($n=6$), and the recovery was 99.74%~102.05%. The method has been proven to be convenient, quick, accurate and with good reproducibility.

Key words: HPLC; *Haematococcus Pluvialis*; astaxanthin

中图分类号: TS254.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)05-0177-02

虾青素 (astaxanthin) 化学名称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β-胡萝卜素, 是一种非维生素 A 原的类胡萝卜素。虾青素具有多种生物功能: 如具有很强的抗氧化功能, 能清除体内由紫外线照射产生的自由基, 调节降低由光化学引起的危害, 对紫外线引起的皮肤癌有很好的疗效, 增强免疫力, 具有抗癌、抗肿瘤的功能等^[1]。目前主要作为人类的高级保健食品、药品, 以及水产养殖动物和家禽、家畜的饲料添加剂。随着虾青素多种生理功能的发现, 在国内外引起

了虾青素的研究热潮。雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是很好的虾青素来源, 它含有 0.5%~2.0% (干基) 的虾青素, 被认为是自然界中天然虾青素含量最高的生物。国外已有用 HPLC 测定雨生红球藻中虾青素的报道^[2,3], 国内陈勇等^[4]也建立了 HPLC 测定雨生红球藻中虾青素含量的方法, 另外, 还有测定虾壳及酵母发酵液中虾青素含量的报道^[5,6], 但许多方法的分离时间较长或分离组分较少。因此, 建立快速、准确的虾青素分析测定方法, 是雨生红球藻开发利用的前提和基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

虾青素标准品 购自 Sigma 公司; 雨生红球藻藻粉 购于荆州天然虾青素有限公司; 甲醇、二氯甲烷、乙腈 均为国产色谱纯, 其余为分析纯。

KQ-200DB 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; HZQ-C 空气浴振荡器 哈尔滨市东明医疗仪器厂; KNAUER K-1001 泵, KNAUER UV K-2501 检测器, Kromasil C₁₈ 柱 (250×4.6mm), TDL-5-A 离心机, AY120 型电子天平。

1.2 实验方法

1.2.1 虾青素的提取 准确称取冻干的雨生红球藻粉 100mg, 加 5mL 溶剂 (二氯甲烷:甲醇=1:3), 25℃振荡提取 3h, 3000r/min 离心 15min, 收集上清液, 再向残渣中加入溶剂, 重复离心, 至残渣灰白色, 合并上清液, 定容, 即为虾青素粗提物。向粗提物中加 1/3 体积 2% KOH 的甲醇溶液, 黑暗环境下, 室温皂化 8h, 得到皂化后的提取物, 保存于 -20℃ 备用。

1.2.2 虾青素含量的测定 准确称量虾青素标准品 23.7mg, 用氯仿定容至 50mL 为贮备液。取虾青素贮备液分别配制成浓度分别为 1.896、3.792、7.584、11.376、14.568、18.96μg/mL 的溶液, 每个浓度平行进

收稿日期: 2005-09-07 * 通讯联系人
作者简介: 赵立艳 (1977-), 女, 在读博士。
基金项目: 国家 863 项目。

三针,取峰面积的平均值,绘制标准曲线。虾青素粗提物上样前过 0.45 μ m 膜过滤,流动相为二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=5:85:5:5,使用前流动相超声脱气 30min。流速 1mL/min,检测波长 480nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。

2 结果与讨论

2.1 虾青素的标准曲线

以虾青素含量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果如图 1 所示。曲线方程为:

$$y=284016x-721.1, r=0.9999.$$

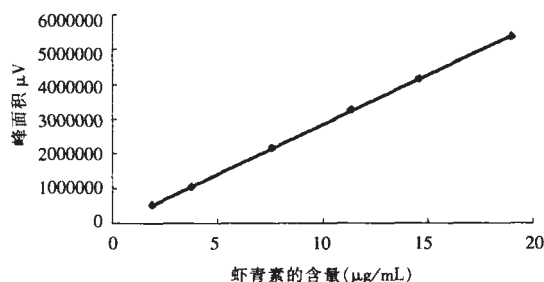


图 1 虾青素的标准曲线

2.2 精密度和准确度

用浓度为 7.584 μ g/mL 的虾青素标准溶液平行进样 6 次,峰面积和保留时间见表 1。峰面积的 RSD 为 1.12%,保留时间的 RSD 为 0.94%。峰面积基本不变,无杂峰。

表 1 该方法的精密性

序号	峰面积 (μ V)	保留时间 (min)
1	2182404	6.412
2	2164088	6.442
3	2184047	6.455
4	2142501	6.346
5	2151900	6.354
6	2209202	6.304

取测定浓度为 3.088 μ g/mL 的样品溶液,加入不同浓度的虾青素标准溶液,每个样平行测 3 次,求平均值,计算回收率。回收率=(加标测定值-试样测定值)/加标量 \times 100%,结果见表 2。

表 2 加样回收率

加入浓度 (μ g/mL)	测定值 (μ g/mL)	回收率 (%)	RSD(%)
7.584	10.6696 \pm 0.0072	99.97	0.14
11.376	14.7604 \pm 0.02272	102.6	0.31
14.568	17.6106 \pm 0.04315	99.69	0.49

2.3 样品的测定

取皂化后的粗提物,按标样条件进行测定。图 2 和图 3 分别是虾青素标准品和雨生红球藻提取物的 HPLC 图,1 号峰为虾青素。

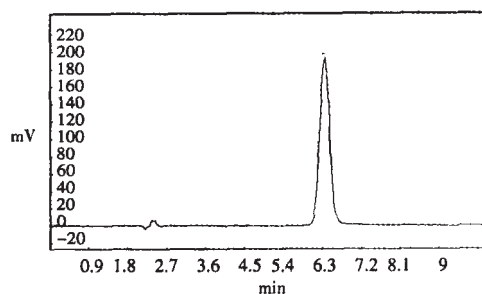


图 2 虾青素标准品

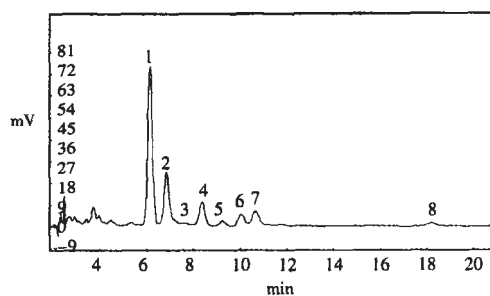


图 3 雨生红球藻粗提物

3 结论

本方法用于雨生红球藻中虾青素含量的测定,具有简便快速、准确、重复性好的特点,在 25min 内雨生红球藻粗提物中组分可以被洗脱出来,虾青素峰与其他峰能被较好地分离。因此,该方法可以用于雨生红球藻中虾青素的定性、定量测定。

参考文献:

- [1] Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(5): 210~216.
- [2] Jian-Ping Yuan, Feng Chen. Chromatographic separation and purification of trans-astaxanthin from the extracts of Haematococcus pluvialis[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 3371~3375.
- [3] Jian-Ping Yuan, Feng Chen. Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga Chlorococcum sp by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 925: 133~137.
- [4] 陈勇,李德法,陆文清,等. 测定雨生红球藻中虾青素及其他色素含量的高效液相色谱法[J]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 28~31.
- [5] 谢虹,张慧碧,何国,等. 高效液相色谱法测定虾青素的含量[J]. 粮食与饲料工业, 2003(1): 46~37.
- [6] 许培雅,郑裕国,沈寅初. 分光光度法测定红法夫酵母中虾青素含量[J]. 浙江工业大学学报, 2001, 29(2): 120~123.

权威 · 核心 · 实用 · 全面