

doi :10.3969/j.issn.1008-6145.2014.01.007

高效液相色谱 – 光电二极管阵列法测定虾青素的含量^{*}

陈伟珠^{1,2}, 张怡评¹, 晋文慧¹, 洪专¹, 易瑞灶¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所 福建厦门 361005; 2. 厦门大学化学化工学院化学系, 化学生物学福建省重点实验室 福建厦门 361005)

摘要 建立虾青素含量测定的高效液相色谱 – 光电二极管阵列法。采用 Purospher STAR RP 18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 – 水 (体积比为 95 : 5) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 482 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。在所选定的液相色谱条件下, 虾青素主峰与其它杂质峰分离良好, 虾青素在 0.2~16 μg/mL 范围内线性良好, 线性相关系数 $r=0.9999$, 检出限为 0.01 μg/mL, 测定结果的相对标准偏差为 0.42% ($n=6$), 平均回收率为 100.4%。该法分析快速准确、灵敏度高、重现性好。

关键词 虾青素; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1008-6145(2014)01-0024-03

Determination of Astaxanthin by High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector

Chen Weizhu^{1,2}, Zhang Yiping¹, Jin Wenhui¹, Hong Zhuan¹, Yi Ruizao¹

(1. The Third Institute of Oceanography of the State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 2. Department of Chemistry and Key Laboratory Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract A method using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with photodiode array detector (PDA) was established for determination of astaxanthin. The separation was performed on Purospher STAR RP 18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-water (Volume ratio was 95 : 5). The detector was photodiode array detector and the variable wavelength detector (VWD) was set at 482 nm. The column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 20 μL. The calibration curve was linear in the range of 0.2–16 μg/mL, and the correlation coefficient was 0.9999. The relative standard deviation of determination results was 0.42% ($n=6$). The average recovery was 100.4%, and the detection limit was 0.01 μg/mL. This method is characteristic of rapidity, accuracy, high sensitivity and good reproducibility.

Keywords astaxanthin; high performance liquid chromatography; content determination

虾青素 (分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$, 全称 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β,β'-胡萝卜素) 是一种天然非维生素 A 源的类胡萝卜素。虾青素广泛存在于虾、蟹、鱼中, 是一种具有超强抗氧化活性的次生类胡萝卜素, 比起类胡萝卜素更容易被吸收和积累, 是迄今为止人类发现自然界最强的抗氧化剂, 其抗氧化活性远远超过现有的抗氧化剂, 虾青素的抗氧化能力是维生素 E 的 550 倍, 茶多酚的 200 倍, 葡萄籽的 60 倍, β-胡萝卜素、玉米黄素、叶黄素和角黄素等类胡萝卜素的 10 倍, 番茄红素的 7 倍, 被称为“超级维生素 E”^[1-3]。虾青素具有抑制肿瘤、抗氧化、抗癌变、增强免疫功能等多方面的生理作用, 可用作抗癌变的预防治疗剂、抗衰老剂、食品着色剂等, 是一种具有很大发展前途的生物工程产品, 因而在食品添加剂、水产养殖、化妆品、保健品和医药工业方面

有着广阔的应用前景^[4-5]。

目前, 虾青素的检测方法有分光光度法^[6-7]、高效液相紫外法^[8-10]、高效液相色谱 – 质谱法^[4-11]。高效液相色谱紫外法由于操作简单成为目前虾青素常规的检测方法。笔者在参考文献的基础上建立了高效液相色谱紫外法检测虾青素的方法, 该方法灵敏度高、测定结果准确。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪: 2695 型, 配有光电二极管阵列检测器 (PDA), 美国 Waters 公司;

^{*} 海洋生物产业化中试技术研发公共服务平台项目 (厦海渔合 [2013]19 号)

联系人: 陈伟珠; E-mail: 13860494805@126.com

收稿日期: 2013-11-20

分析天平:CPA2P型,德国 Sartorius 公司;
超纯水机:Mili-Q型,德国 Millipore 公司;
虾青素标准品:纯度不小于99%,百灵威公司;
2,6-二叔丁基对甲酚(BHT):试剂纯,国药集团化学试剂有限公司;

虾青素标准储备液:40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,精密称取2 mg 虾青素标准品,溶于BHT乙腈溶液,定容至50 mL,充氮气置-18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;

BHT乙腈溶液:10 mg/mL,2.5 g BHT溶解于250 mL乙腈;

甲醇、乙腈:色谱纯,德国 Merck 公司;

盐酸、氢氧化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

30%双氧水:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 HPLC 色谱条件

色谱柱:Purospher STAR RP 18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;流动相:甲醇-水(体积比为95:5),流速为1.0 mL/min;检测波长:482 nm;进样量20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的选择

固定流速为1.0 mL/min,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,比较甲醇-水体系和乙腈-水体系作流动相对虾青素进行分离的效果。结果表明,甲醇-水体系的分离效果稍优于乙腈-水体系,所以选择甲醇-水体系作为流动相体系。考察甲醇-水的不同配比对分离效果的影响,最终选择甲醇-水(体积比为95:5)作为流动相。色谱图如图1所示。

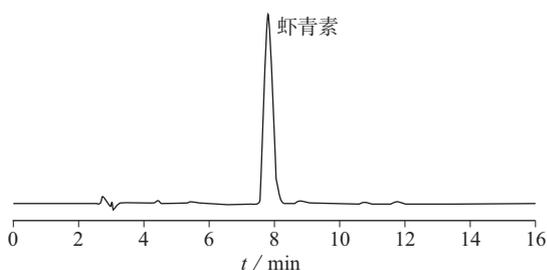


图1 虾青素标准溶液的色谱图

2.2 专属性考察

量取适量体积的虾青素储备液,配制成质量浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,分别加入HCl(1 mol/L), NaOH(1 mol/L), 30% H_2O_2 ,高温加热进行强酸、强碱、氧化及加热破坏试验,结果显示各降解产物均可与虾青素良好分离,色谱图如图2所示。

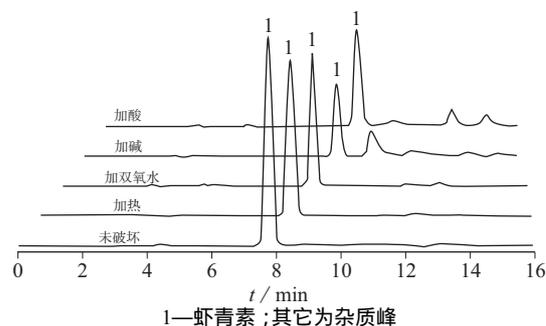


图2 在强酸、强碱、氧化及加热破坏试验下的虾青素谱图对照

2.3 标准曲线及检出限、定量限

分别精密量取不同体积的虾青素储备液稀释至刻度并摇匀,得到质量浓度为0.2, 0.4, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准工作溶液,按1.2色谱条件进行分析,结果见表1。以色谱峰面积(Y)对溶液质量浓度(X, $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行线性回归,得回归方程为 $Y=147780X-3453.8$,线性相关系数 $r=0.9999$ 。结果表明,虾青素在0.2~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈现良好的线性。以 $S/N=3$ 计算得检出限为0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以 $S/N=10$ 计算得定量限为0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表1 虾青素标准工作溶液测定结果

标准溶液质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积
0.2	26438
0.4	50476
1.0	179969
2.0	341185
4.0	555376
8.0	1083947
16.0	2408283

2.4 回收试验

取虾青素标准品适量,精密称定,分别用BHT乙腈溶液溶解并定容配制不同质量浓度水平的溶液各3份,作为供试溶液进行回收试验,结果见表2。由表2可知,平均回收率为96.6%~105.2%,相对标准偏差为2.52%,表明本法测定结果准确可靠。

表2 回收试验结果

实际含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
8.00	7.80	97.5	100.4	2.52
7.84	7.57	96.6		
8.32	8.75	105.2		
9.60	9.79	102.0		
9.76	9.96	102.0		
9.28	9.29	100.1		
6.40	6.43	100.5		
6.58	6.60	100.3		
6.08	6.07	99.8		

2.5 精密度试验

取一定体积虾青素储备液,加BHT乙腈溶液配

制成 4 μg/mL 虾青素溶液,作为供试溶液。精密吸取 20 μL 进样,连续进样 6 次,结果见表 3。结果表明,本法精密度良好。

表 3 精密度试验结果

峰面积	RSD/%
554 568 555 450 549 560 552 680 553 998 555 890	0.42

2.6 稳定性试验

取 4 μg/mL 虾青素供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定,记录峰面积,结果见表 4。由表 4 可知,供试品溶液在 24 h 内相对稳定。

表 4 稳定性试验结果

时间/h	0	2	4	8	12	24
峰面积	552 346	553 460	548 652	550 136	547 698	554 880
RSD/%	0.51					

3 结语

建立了高效液相色谱测定虾青素含量的方法,该方法的检出限低于文献报道方法的检出限且线性范围宽,回收率好,灵敏度高,精密度好,可满足虾青素相关产品的检测分析。

参考文献

[1] Liu Xuebo, Toshihiko Osawa. Cis-astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications 2007, 357: 187-193.

[2] Li Huabin, Chen Feng. Preparative isolation and purification of

astaxanthin from the microalga chlorococcum sp by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography A 2001, 925: 133-137.

[3] Shimidzu N. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms[J]. Fishries Science, 1996, 62(1): 134-137.

[4] Miao Fengping, Lu Dayan, Li Yeguang, et al. Characterization of astaxanthin esters in Haematococcus pluvialis by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry 2006, 352: 176-181.

[5] 张明祥, 赵建国. 国内外虾青素的研究进展[J]. 粮食与饲料工业 2002(1): 26-28.

[6] Tolasa S, Cakli S, Ostermeter U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid[J]. European Food Research and Technology 2005(6): 787-791.

[7] 许培雅, 郑裕国, 沈寅初. 分光光度法测定红发夫酵母中虾青素含量[J]. 浙江工业大学学报 2001, 29(2): 120-135.

[8] 姜森, 杨贤庆, 李来好, 等. 高效液相色谱法测定虾壳中的虾青素[J]. 2010, 31(20): 371-375.

[9] 张玉珍, 刘喆. 高效液相测定虾青素的含量[J]. 中国食品添加剂 2007(4): 151-152.

[10] 何康昊, 邹晓莉, 刘祥, 等. 反相高效液相色谱-二极管阵列检测蛋黄中的角黄素和虾青素[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(1): 113-117.

[11] 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]. 呼和浩特:内蒙古工业大学, 2009.

《宇航计测技术》简介

《宇航计测技术》创刊于 1981 年,是国家科委批准的国家级技术性刊物。《宇航计测技术》曾荣获国家、北京市和航天系统优秀科技期刊奖;为我国首批中文核心期刊、计量核心期刊和国家统计用刊;目前,本刊已成为《中国学术期刊》(光盘版),《中国导弹与航天文摘》(CAMA)与《中国期刊网》全文收录用刊。

中国标准刊号为 ISSN1000 - 7202/CN11 - 2052/V,全国各地邮局均可订阅,邮发代号:18-123。

广告经营许可证:京丰工商广字第 0013 号。

主编:周谦 电话:010-68383695 传真:010-68383627

通信地址:北京市 9200 信箱 24 分箱《宇航计测技术》编辑部 邮编:100076

《宇航计测技术》2013 年第 6 期目录

- 基于 RTX 的三轴仿真转台实时控制方法与实现
- 雷达天线机电轴一致性标定方法研究
- 多种互瞄条件下立方镜准直传递方法研究
- 激光标线仪校准方法研究
- 高温小型化转速传感器研制
- 差动变压器式位移传感器的仿真建模研究
- 数字式光栅测量系统角速率测量不确定度评定
- 提高低导热材料表面温度均匀性方法的研究
- 平流层飞艇热力学验证温度测量方法研究
- 电流源在微力矩器校准中的无差激励应用研究

- 较矩天平固定方式及预紧力矩对其测量影响的研究
- 某型无人机运动学建模与分析
- 小型无人机伞降回收运动分析
- 基于 CAN 总线的等效器的设计与实现
- 单站 GPST/GLONASS 时差监测研究
- 交流阻抗测量系统中交流小电流测量方法
- 无人机载高速摄影系统数据实时传输与存储
- 一种低成本 UHF RFID 芯片集中 CP 测试方法
- 无人机低空小捷径飞行研究
- 基于改进 BP 算法的复杂武器系统健康状态评估