

应用高效液相色谱检测红法夫酵母胞内虾青素的含量

肖冬光 李贤宇 郝 珩 史文玉

(天津科技大学食品科学与生物工程学院,天津 300222)

摘 要 采用高效液相色谱法定量地测定了红法夫酵母胞内虾青素的含量。色谱条件为:色谱柱 Kromasil C₁₈, 5 μm (250 \times 4.6) mm;流动相为 V(甲醇):V(乙腈)=9:1;流速 1.4 mL/min;检测波长 478 nm;柱温为室温。

加标回收率为 98.2%~100.8%。

关键词 虾青素,红法夫酵母,高效液相色谱

虾青素(Astaxanthin;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 原的类胡萝卜素,广泛存在于虾、蟹、某些藻类及真菌中。纯的虾青素是暗红棕色粉末,熔点 224 $^{\circ}\text{C}$,不溶于水,具脂溶性,易溶于 CHCl_3 、丙酮、苯和二硫化碳等有机溶剂。水产养殖业是现阶段虾青素最大的市场,主要用于大马哈鱼、鲑鱼和虾的饲料中,以改善它们皮和肉的颜色^[1,2]。此外,虾青素还是一种断链抗氧化剂,具有抗氧化、抗癌变、增强免疫等功能,可用作抗癌变预防治疗剂、抗衰老剂、食品着色剂等等,是一种具有很大发展前途的生物工程产品^[3,4]。研究快速准确的虾青素检测技术,初步建立定性、定量分析酵母胞内虾青素的方法是十分必要的。

1 材料与方法

1.1 仪 器

美国 Lab Alliance 系列:SSI PC2000 型高压液相色谱仪,SSI III 型高压泵,MODEL 500 型紫外-可见检测器,ANASTAR 工作站;WFZ75 系列紫外-可见光谱仪。

1.2 菌种和主要试剂

红法夫酵母(AS2.1557,中科院微生物所);虾青素标准品(98%,美国 Sigma 公司),甲醇(HPLC),乙腈(HPLC),丙酮(AR),二氯甲烷(AR)。

1.3 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈, 5 μm , 250 \times 4.6 mm;流动相:V(甲醇):V(乙腈)=9:1;流速:1.4 mL/min;检测波长:478 nm;柱温:室温;进样量:20 μL 。

1.4 虾青素标准溶液的配制

精确称取 10 mg 虾青素标准品,先用少量二氯甲烷溶解,再用甲醇定容至 100 mL 容量瓶中,制成 0.1

mg/mL 浓度的溶液。精确量取适量上述溶液,用甲醇分别稀释制成 0.001,0.002,0.003,0.004,0.005 mg/mL 的虾青素标准溶液。

1.5 红发夫酵母中虾青素的提取^[5]

称取鲜酵母(摇瓶培养 84 h)0.3 g,酸热处理 5 min,冰水迅速冷却,然后离心取菌体,并用蒸馏水洗涤 3 次。加入 6 mL 丙酮避光振荡提取 30 min,离心,取上清液待测。

1.6 鲜酵母干含量的测定

精确称取上述鲜酵母 10 g 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重(m),计算其干含量(w);

$$\text{计算公式为: } w = \frac{m}{10} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 虾青素标样的光谱扫描

取少量 0.1 mg/mL 虾青素标准液,稀释至合适的浓度后,用 WFZ75 系列紫外-可见光谱仪进行扫描,结果如图 1。由图 1 可知虾青素在 478 nm 波长处有最大吸收。由此,确定高效液相色谱的检测波长为 478 nm。

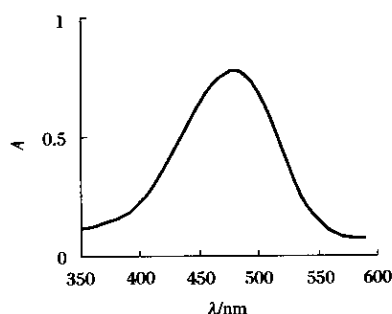


图 1 虾青素标准溶液的扫描光谱

2.2 虾青素标准品的色谱图及标准曲线

对不同的流动相进行实验发现,以甲醇和乙腈的组合流动相效果最佳,其最优比例为 V(甲醇):V

第一作者:硕士,教授。

收稿时间:2004-09-23;改回时间:2004-10-20

(乙腈)=9:1,对不同的流动相流速进行考察得到流动相的最佳流速为1.4 mL/min。在此条件下虾青素标准品的色谱图如图2所示。

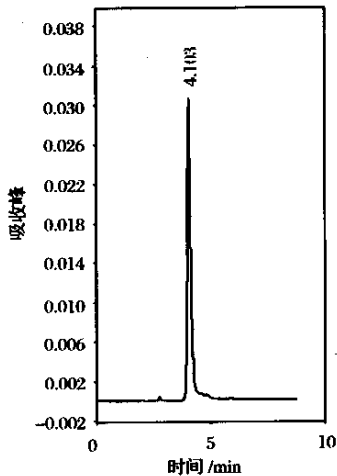


图2 虾青素标准溶液的色谱图

将1.4节中配置的虾青素不同浓度的标准溶液分别进行检测,绘制出虾青素浓度-峰面积标准曲线,如图3所示。由图3可以看出,虾青素标准品在较低的浓度下(1.0~6.0 μg/mL)峰面积与浓度线性关系良好($R^2=0.9994$)。

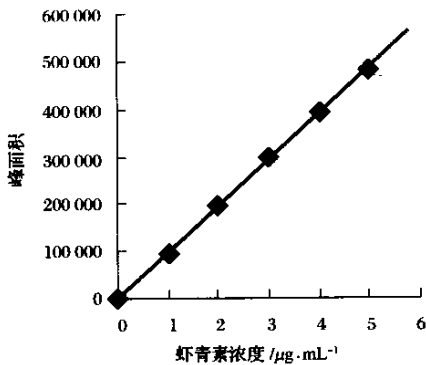


图3 虾青素的标准曲线

2.3 酵母提取液的色谱图

在实验中的色谱条件下,对上述红发夫酵母提取液进行检测,色谱图如图4所示。从图4可以看出,虾青素主峰与其他杂质峰获得了较好的分离。

2.4 加标回收率实验(表1)

2.5 酵母提取液实测结果重现性实验

测定3种不同浓度的酵母提取液中虾青素的含量,分别重复测定6次,考察其重现性,测定的结果如表2所示。从表2可以看出,对于不同的酵母提取液而言,6次实验结果的重现性较好($RSD=0.88\% \sim 1.05\%$)。

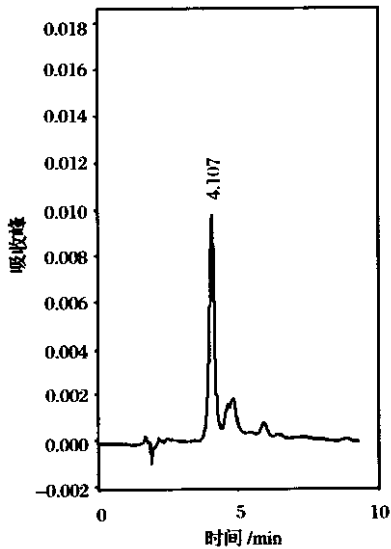


图4 酵母提取液的色谱图

表1 加标回收率实验结果

试验次数	提取液浓度 /μg·mL ⁻¹	添加量 /μg·mL ⁻¹	实测浓度 /μg·mL ⁻¹	检出量 /μg·mL ⁻¹	回收率 /%
1	1.92	2.51	4.45	2.53	100.8
2	1.92	5.02	6.97	5.05	100.6
3	2.47	7.53	9.90	7.43	98.7
4	2.47	10.04	12.33	9.86	98.2

表2 重现性实验结果 μg/mL

试验次数	1	2	3	4	5	6	RSD/% (n=6)
提取液1	2.47	2.46	2.51	2.42	2.44	2.47	0.88
提取液2	3.21	3.17	3.21	3.24	3.15	3.14	1.05
提取液3	3.71	3.77	3.74	3.79	3.67	3.71	0.94

2.6 红法夫酵母胞内虾青素的含量

由1.5、1.6、2.2及2.3节可以得到以下计算公式:

$$X = \frac{A \times 6}{97347 \times 0.3 \times w}$$

其中:X——酵母胞内虾青素的含量(μg/g干细胞);
A——提取液色谱中虾青素主峰的峰面积;
6——酵母提取液的总体积(mL);
97347——虾青素标准曲线斜率;
0.3——被提取的鲜酵母质量(g);
w——鲜酵母的干含量(%)。

3 结 论

由扫描光谱可知,虾青素标准品溶液在478 nm处有最大吸收,虾青素标准品溶液在较低的浓度下(1.0~6.0 μg/mL)峰面积与浓度线性关系良好;在本色谱条件下,酵母提取液色谱图中虾青素主峰与其

他杂质峰能够获得较好的分离,虾青素的加标回收率为 98.2% ~ 100.8%。酵母提取液实测结果重现性实验表明,对于不同浓度的酵母提取液而言,实验结果的重现性较好($RSD = 0.88\% \sim 1.05\%$)。

通过以上方法对红发夫酵母提取液进行检测,说明应用外标法可以精确地计算出酵母胞内虾青素的含量。

参 考 文 献

1 Whyte, John N C. Pigmentation and composition of flesh of Atlantic salmon fed diets supplemented with the yeast *phaffia*

rhodozyma[J]. North American Journal of Aquaculture, 2001, 63(1):52~57

2 Whyte John N C, Sherry Kathleen L. Pigmentation and composition of flesh of Atlantic salmon fed diets supplement with the yeast *phaffia rhodo zyma*[J]. North American Journal of Aquaculture, 2001, 63(1) 52~57

3 刘子怡,沈奇佳. 虾青素的生物活性及开发应用前景[J]. 中国海洋药物, 1997, 63(3):46~48

4 Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoid[J], Pure & Appl Chem, 1991, 63:141~146

5 杨文,吉春明. 一种简单的胞壁破壁方法[J]. 微生物学通报, 1995, 22(1):58

The Determination of Intracellular Astaxanthin of *Phaffia rhodozyma* by HPLC

Xiao Dongguang Li Xianyu Hao Yue Shi Wenyu

(College of Food Science and Bio-engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300222, China)

ABSTRACT The concentrations of intracellular astaxanthin of *phaffia rhodozyma* were determined quantitatively by HPLC. The chromatography conditions were: Kromasil C₁₈, 5 μ m, (250 \times 4.6)mm column, methanol-acetonitrile(9:1) as mobile phase at 1.4 mL/min, detection wavelength 478nm, room temperature. The recovery was 98.2% ~ 100.8%.

Key words astaxanthin, *phaffia rhodozyma*, HPLC

我国巧克力制品发展概况

行业动态

据全国 20 个大城市(上海、北京、广州、天津、成都、哈尔滨等)进行监测显示:巧克力制品在这 20 个城市已被广泛接受,各城市的这一消费群体约占其总人口的比例为 30% ~ 60%,但各地消费水平存在一定差距。其中上海消费巧克力制品的数量最大,约占所调查城市总消费量的 18.5%,其次是北京和天津。目前在这些城市巧克力市场消费已形成品牌效应,即几个著名的品牌主宰市场的主要份额,其中以“德芙”、“吉百利”占领先地位。

巧克力行业已经逐渐形成集中垄断状态,即最大的 4 家巧克力企业占有市场 70% 的份额。其市场结构的特征是产量与价格出现相对稳定,然而影响着其他企业巧克力制品的发展选择,即加快促进寻求与开发巧克力制品的差异和多样性来适应与满足不同人群的消费需求。

监测结果显示:女性对巧克力制品的偏好大于男性,其中尤以年轻女性的购买倾向格外明显。其次,购买巧克力制品的频率与年龄结构有很大关系,低年龄人群的购买频率较高,出现了高频率购买比例呈现低年龄化的规律。同时,调查也反映出青少年已成为巧克力制品消费的主体。调查表明,35 岁以下人群的消费比例很高,其中 15 ~ 24 岁的人群是自身消费的主体,而 35 岁以上人群消费者绝大多数是为儿童购买,其中 35 ~ 44 岁的人群所占比例高达 86.30%。

近年来国内巧克力企业开发巧克力制品的品种类型大多集中在模注巧克力方面。与过去不同的是,模注产品的品种类型已由单一的巧克力基料与仿巧克力基料转变为双色多层或复合夹心模制产品。这类模制产品无论就质感还是香味都较单一的模制产品有更多的改进与丰富,更由于浇注机械和模具的不断更新,新的复合夹心模制产品外观亮丽挺括令人瞩目。因此,此类产品进入市场后受广大消费者的青睐,市场旺盛需求的信息理所当然成为企业追求与发展新品的目标,从近期这类巧克力专用机械生产线的踊跃订货来看,开发新的具有巧克力风味的复合型模制产品成为我国巧克力产业近期开发的一大热点。

美国开发出新型啤酒瓶盖内衬垫

信息窗

美国发明了一种新型的啤酒瓶盖内衬垫,其显著特点是当啤酒瓶内压接近啤酒瓶所能承受的极限压力时可自动放气。此种内衬垫不仅在中等压力(约 5×10^5 Pa)下呈现出优异的密封性,以确保啤酒这一对气味极其敏感的饮品,既不会发生因环境中污染物(如 O₂)的渗入而导致的变质,也不会发生因瓶内 CO₂ 的外泄影响啤酒的口感,而且从食品安全的角度出发,这种新型的内衬垫在啤酒瓶内压接近瓶子所能承受的极限压力(约 12×10^5 Pa)时所具有的自动放气的功能,避免了啤酒由于长时间暴露在高温或阳光下,瓶内自动产生的高压所引起的瓶子的破碎或爆炸带来的危险(胡向蔚 孙明超)。