

# 高效液相色谱法测定保健食品中的虾青素含量

赵唯雯, 高梦楠, 黄汉昌, 常平\*

- (1. 北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心, 北京 100191;
2. 北京联合大学生物活性物质与功能北京市重点实验室, 北京 100191)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法检测保健食品中虾青素含量的分析方法。**方法** 采用油状形态和粉末状形态样品来源的保健食品, 样品经二氯甲烷-甲醇混合溶液(1:3, V:V)提取、NaOH 甲醇溶液皂化后, 经高效液相色谱分离、紫外可见光检测器检测。**结果** 全反式虾青素在 0.25~12.70  $\mu\text{g/mL}$  范围内呈现良好的线性关系, 检出限为 1.09  $\text{ng/mL}$ , 定量限为 3.64  $\text{ng/mL}$ 。油状形态样品虾青素的精密度为 2.4%、回收率为 96.7%。粉末形态样品虾青素的精密度为 2.0%、回收率为 98.6%。在 21.9  $\text{mmol/L}$  以下浓度范围内 NaOH 不会造成虾青素的降解。**结论** 该方法回收率高、精密度良好, 测量结果准确, 可以应用于保健食品中虾青素含量的测定。

**关键词:** 虾青素; 高效液相色谱法; 保健食品

## Determination of astaxanthin in functional food by high performance liquid chromatography

ZHAO Wei-Wen, GAO Meng-Nan, HUANG Han-Chang, CHANG Ping\*

- (1. Testing Center of Health Food Function Determination, College of Arts and science of Beijing Union University, Beijing 100191, China; 2. Beijing Key laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Research Institute of Science and Technology of Functional Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of astaxanthin in health food by high performance liquid chromatography. **Methods** Sample sources of health foods in oil form and powder form were used. The samples were extracted by dichloromethane methanol mixed solution (1:3, V:V) and saponified with NaOH methanol solution. The samples were separated by high performance liquid chromatography and detected by ultraviolet-visible detector. **Results** All *trans* astaxanthin showed good linear relationship in the range of 0.25–12.70  $\mu\text{g/mL}$ , the limit of detection was 1.09  $\text{ng/mL}$ , and the limit of quantification was 3.64  $\text{ng/mL}$ . The precision and recovery of astaxanthin in oil sample were 2.4% and 96.7%, respectively. The precision and recovery of astaxanthin in powder sample were 2.0% and 98.6%, respectively. NaOH did not degrade astaxanthin in the concentration range below 21.9  $\text{mmol/L}$ . **Conclusion** This method has high recovery rate, good precision and accurate measurement results, and is suitable for the determination of astaxanthin in healthy food.

**KEY WORDS:** astaxanthin; high performance liquid chromatography; functional food

基金项目: 北京联合大学科研项目(JZ10202001)

**Fund:** Supported by the Academic Research Projects of Beijing Union University (JZ10202001)

\*通信作者: 常平, 高级实验师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: changping@buu.edu.cn

\*Corresponding author: CHANG Ping, Senior Engineer, Beijing Key laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Research Institute of Science and Technology of Functional Food, Beijing Union University, No.197 Beitucheng Xi Lu, Haidian District, Beijing 100191, China. E-mail: changping@buu.edu.cn

## 0 引言

虾青素是一种类胡萝卜素,又名虾黄质、龙虾壳色素,虾青素存在于生物体内,在虾、蟹、鱼、藻体、酵母和鸟类的羽毛中含量较高<sup>[1-3]</sup>。虾青素是类胡萝卜素生物合成中最高级别的产物,虾青素具有最强的抗氧化性,可以避免细胞老化<sup>[4-6]</sup>。虾青素具有抗癌、增强肌体免疫力、预防心血管疾病等生理活性<sup>[7-9]</sup>。20世纪30年代虾青素已被从虾、蟹的壳中分离出来,但是直到20世纪80年代其生理功能才引起广泛重视。虾青素也常用作水产养殖动物的饲料添加剂,添加量可达80 mg/kg<sup>[10]</sup>。1999年虾青素被美国FDA批准作为膳食补充剂<sup>[11]</sup>。藻类中的雨生红球藻虾青素含量高达干重的5%,被誉为天然虾青素的“浓缩品”,于2010年10月我国卫生部批准雨生红球藻为新资源食品<sup>[12-13]</sup>。

虾青素的化学名称为3,3'-二羟基-4,4'-二酮基β-胡萝卜素,化学分子式为C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>,分子量为596.86。虾青素为脂溶性酮式类胡萝卜素,难溶于水,易溶于大部分有机溶剂,在酸、碱、氧、高温及紫外光条件下均不稳定,易氧化降解。生物体内虾青素以多种形式存在,包括几何异构(全反式、9-顺式、13-顺式等)、立体异构(左旋、右旋和内消旋)和酯化(单酯和二酯)形式<sup>[12]</sup>。全反式虾青素结构式见图1。

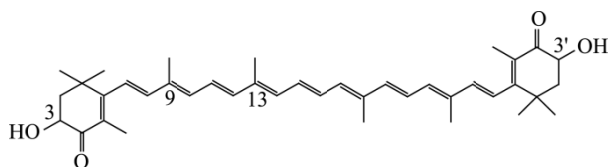


图1 全反式虾青素结构式  
Fig.1 Structure of astaxanthin

目前常用的虾青素含量的分析检测方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和紫外分光光度法<sup>[14-15]</sup>,样品经前处理后将虾青素酯转化成游离态的虾青素,采用不同方法进行测定。紫外分光光度法测定较为简便、容易操作、能完成快速检测的需求,但提取液中可能存在其他类胡萝卜素成分,对虾青素含量的测定产生干扰。高效液相色谱法操作较为复杂,但通过色谱柱可以有效分离出虾青素和其他可能存在的类胡萝卜素杂质以及全反式虾青素、9-顺式虾青素、13-顺式虾青素3种异构体,排除杂质干扰。

目前虾青素虽然广泛作为保健食品的原料,但国家相关部门还未颁布专门应用于准确测定保健食品中虾青素含量的标准方法。目前可以借鉴的标准方法主要有GB/T 31520—2015《红球藻中虾青素的测定 液相色谱法》<sup>[16]</sup>和T/CCCMHPIE 1.23—2016《植物提取物 虾青素油》<sup>[17]</sup>,前法的前处理主要通过氢氧化钠(NaOH)皂化达到由虾青

素酯转化为游离态的目的,试剂简单、成本低廉,但虾青素对酸碱敏感,有可能破坏虾青素;后法则通过胆固醇酯酶水解来转化虾青素酯,相对于皂化更为温和,不易破坏虾青素,但实验中会用到的胆固醇酯酶以及内标物质价格昂贵,且不易保存,增加了实验中的变量因素及实验成本。

本研究采用GB/T 31520—2015《红球藻中虾青素的测定 液相色谱法》<sup>[16]</sup>的测定方法,测定不同性状保健食品中虾青素的含量,重点考察了碱含量对虾青素的降解作用,以期降低产品成本并为检验机构的日常检测提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

甲醇、甲基叔丁基醚(色谱纯,美国Fisher公司);二氯甲烷(色谱纯,天津赛孚世纪科技发展有限公司);丙酮、氢氧化钠(分析纯,北京化工厂责任有限公司);磷酸(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂);2,6-二叔丁基对甲酚(butylated hydroxytoluene, BHT)(化学纯,国药集团化学试剂有限公司);全反式虾青素对照品(纯度97%,加拿大Toronto Research Chemicals公司);9-顺式虾青素对照品、13-顺式虾青素对照品(纯度≥90%,美国Sigma-Aldrich公司)。

实验用保健食品样品为市场采购和收集获得的不同品牌不同剂型的样品,其中1~7为软胶囊,8~12为片剂。取样品1为油状样品的代表,取样品8为粉末状样品的代表进行分析方法学研究。

### 1.2 仪器与设备

Waters 2695 高效液相色谱(配有可变波长紫外检测器和Empower2 色谱工作站,美国Waters公司);电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KO2200 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);Vortex—Genie 旋涡混合器(美国Scientific industries公司);MD200-2 氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司);超纯水机(上海乐枫生物科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品前处理

准确称取适量样品(精确至0.1 mg)于容量瓶中,加入二氯甲烷-甲醇混合液(1:3, V:V)溶液,超声5 min使样品充分溶解分散,冷却至室温,加二氯甲烷-甲醇(1:3, V:V)溶液定容至刻度,混匀。根据不同样品进行稀释,备用。再精密量取备用溶液5.00 mL于10 mL比色管中,加入0.70 mL的0.1 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液,涡旋混合,充氮气密闭,在4℃冰箱中反应12~15 h。在反应液中加入0.40 mL 2%磷酸-甲醇溶液中和剩余的碱,混匀,在氮气吹扫下定容至5 mL,混匀,用0.45 μm 滤膜过滤,得到HPLC供试液。

#### 1.3.2 色谱条件

色谱柱: C<sub>30</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相:

甲醇+甲基叔丁基醚+1%磷酸梯度洗脱, 洗脱比例见表 1。  
流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 474 nm, 柱温: 25 °C。

表 1 梯度洗脱程序  
Table 1 Gradient elution program

时间/min	甲醇/%	甲基叔丁基醚/%	1%磷酸溶液/%
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
30	81	15	4
35	81	15	4

### 1.3.3 线性关系及最低检出限

以全反式虾青素作为全部异构体的定量依据。称取适量全反式虾青素对照品, 以丙酮溶解定容, 配制标准储备液。测定前以丙酮稀释不同浓度的虾青素标准溶液, 在 1.3.4 色谱条件下测定, 制作标准曲线。

选择不含虾青素的样品作为空白基质, 按 1.3.1 方法进行样品处理, 经 10 次进样, 获得基本噪音值。在此基础上, 向其中加入不同浓度全反式虾青素标准溶液, 分别测定信噪比  $S/N=3$  及  $S/N=10$  时虾青素的检出限和定量限。

### 1.3.5 碱含量对虾青素稳定性的影响

称取适量样品 1 和 8, 按 1.3.1 方法进行样品处理, 但加入不同体积的 NaOH 溶液, HPLC 测定虾青素的含量。通过观察样品含量变化考察碱量对虾青素稳定性的影响。

$$(1.3 \times A_{13\text{-顺式}} + A_{\text{全反式}} + 1.1$$

$$\text{虾青素含量} = \frac{\times A_{9\text{-顺式}} \times C_{\text{全反式标准品}} \times V \times 10^{-3}}{A_{\text{全反式标准品}} \times m} \times f \times 100\%$$

其中,  $A$ : 色谱峰面积, AU;  $C$ : 浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $V$ : 样品的体积,

mL;  $f$ : 稀释倍数, 本方法为 100。

### 1.3.6 精密度

同日内称取 6 份平行( $n=6$ )样品 1 和样品 8, 进行方法精密度实验, 按 1.3.1 方法进行样品处理, HPLC 分析结果。

### 1.3.7 回收率

每组回收率实验称取 6 份适量样品 1 和 8 至容量瓶中, 其中 3 份按照样品中含量的 0.5 倍、1 倍、1.5 倍加入全反式虾青素标准储备液, 另 3 份作为各水平的空白对照, 按 1.3.1 样品处理操作, HPLC 液相分析结果。实验重复 3 次, 计算三水平平均加标回收率( $n=3$ )。

### 1.3.8 日间重复性实验

3 日内每日分别平行称取 3 份( $n=3$ )样品 1 和样品 8, 进行日间重复性实验, 按 1.3.1 方法进行样品处理, HPLC 分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 虾青素的色谱分离测定

按照 HPLC 色谱条件, 全反式虾青素、9-顺式虾青素、13-顺式虾青素能得到很好的分离, 3 种虾青素异构体标准品的色谱峰见图 2。油状样品 1 号经萃取和皂化前处理后, 虾青素酯类和 3 种异构体的虾青素色谱峰分别见图 3 和图 4。从色谱图可知, 一方面虾青素酯类化合物能够被皂化成虾青素, 另一方面虾青素异构体均能得到很好地分离, 在检测波长内没有杂质峰的干扰。其中全反式虾青素占有所有虾青素异构体含量的主要部分, 且分离良好, 本研究选择其作为主要定量计算依据。

采用全反式虾青素作线性实验, 结果表明全反式虾青素浓度在 0.25~12.70  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 线性关系良好, 回归方程为  $Y=103023.6X+2015$ ,  $r=1.0000$ 。

当全反式虾青素信噪比  $S/N=3$  时, 检出限为 1.09 ng/mL; 当  $S/N=10$  时, 定量限为 3.64 ng/mL。

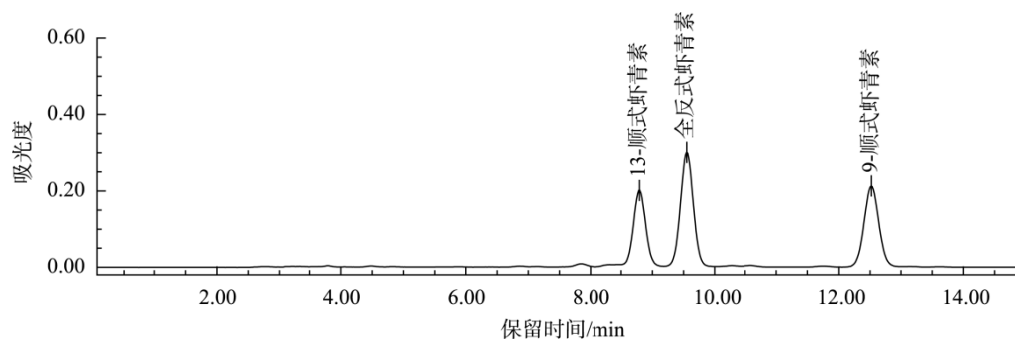


图 2 全反式虾青素、9-顺式虾青素、13-顺式虾青素对标准品色谱图

Fig.2 Standard chromatograph of astaxanthin, 9-cis-astaxanthin, 13-cis-astaxanthin

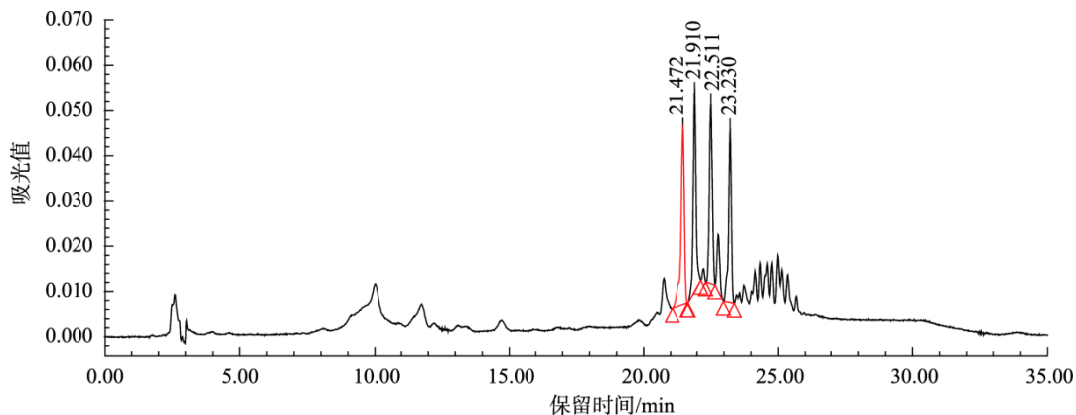


图 3 样品 1 皂化前虾青素类化合物的色谱图

Fig.3 Chromatogram of astaxanthin before saponification

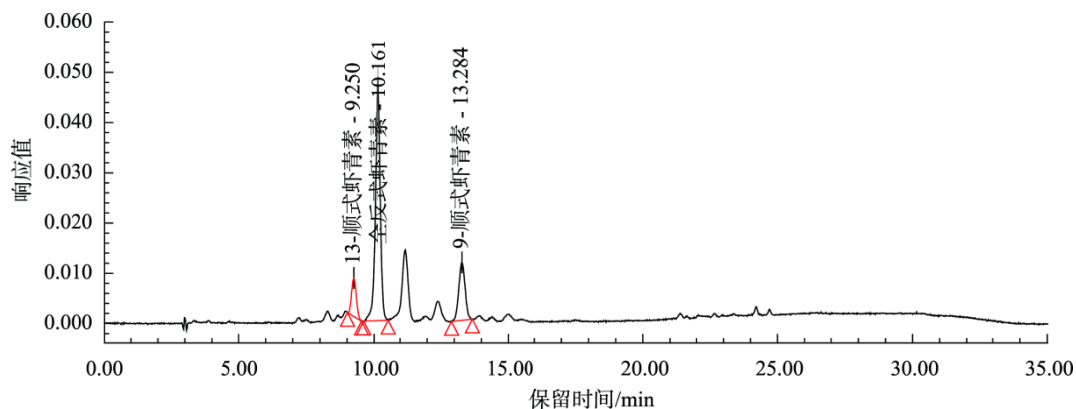


图 4 样品 1 皂化后虾青素类化合物的色谱图

Fig.4 Chromatogram of astaxanthin after saponification in sample 1

## 2.2 碱量对虾青素稳定性的影响

皂化后游离虾青素在碱性条件下不稳定,因此皂化过程的碱量使用成为前处理过程中的关键因素。碱量过少则皂化不完全,过多则破坏游离出的虾青素,因此本研究对氢氧化钠的用量进一步测试。本研究参照国家标准方法,以添加 0.70 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 为起点(终浓度为 12.3 mmol/L),选择 NaOH 的终浓度为 12.3~73.7 mmol/L 进行测试,结果见表 2。当 NaOH 浓度低于 21.9 mmol/L 时虾青素含量稳定,NaOH 浓度大于 35.94 mmol/L 时虾青素含量下降,而 NaOH 浓度达到 73.7 mmol/L 时虾青素含量最低。

采用较高的 NaOH 终浓度为 21.9 mmol/L 时,进行全反式虾青素的回收率实验,回收率可达到 95.7%(见表 3),表明 NaOH 浓度低于 21.9 mmol/L 时虾青素含量稳定。

## 2.3 方法精密度结果

用油状样品 1 号和粉末状样品 8 号同时进行方法精密度测试,结果见表 4,表明该方法测定虾青素含量的精密度良好,方法可靠。

表 2 不同 NaOH 浓度对虾青素稳定性的影响

Table 2 Effects of different NaOH concentrations on the stability of astaxanthin

碱浓度/(mmol/L)	样品 1 含量/%	样品 8 含量/%
12.3	2.11	0.138
16.7	2.10	0.140
21.9	2.10	0.141
35.9	1.80	0.099
73.7	0.22	0.015

表 3 21.9 mmol/L NaOH 时虾青素的加标回收率

Table 3 Recoveries of astaxanthin at 21.9 mmol/L NaOH

加标水平	加标量/ $\mu\text{g}$	回收量/ $\mu\text{g}$	回收率/%
0.5 倍	505	492	97.5
1 倍	1011	967.5	95.7
1.5 倍	2022	1948	96.4

表 4 方法的精密度结果( $n=6$ )  
Table 4 Precision of the analyzed method result ( $n=6$ )

样品编号	平均值/%	RSD/%
样品 1	2.08	2.4
样品 8	0.140	2.0

## 2.4 方法回收率测定结果

以样品 1 和样品 8, 同时进行全反式虾青素三水平加标回收测定, 全反式虾青素回收率测定结果见表 5。结果表明, 该方法的回收率稳定, 其间无含量损失。

## 2.5 日间重复性结果

油状样品 1 号和粉末状样品 8 号经 3 日重复实验, 结果见表 6, 虾青素不同日间测量含量稳定、精密度良好, 表明本方法日间重复性好。

## 2.6 样品中虾青素含量的测定结果

依据以上样品前处理和色谱分析条件, 采用

12.3 mmol/L 的 NaOH 浓度皂化, 对 12 个保健食品中的虾青素含量进行测定, 其中样品 1~7 为软胶囊剂型, 样品 8~12 为固体剂型。结果见表 7, 表明不同样品的虾青素测定精密度均比较高、数值可靠, 该方法可以应用于保健食品中虾青素含量的测定。

## 3 结 论

目前我国还没有颁布测定保健食品中虾青素含量的标准方法, 本文研究了保健食品中虾青素的测定方法, 建立了样品二氯甲烷-甲醇混合溶液提取、NaOH 甲醇溶液皂化、高效液相色谱法分离的分析方法。前处理条件为二氯甲烷-甲醇混合溶液为 1:3(V/V), NaOH 皂化浓度为 12.3~21.9 mmol/L, 色谱分析条件为 C<sub>30</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、柱温 25 °C, 流动相为甲醇+甲基叔丁基醚+1%磷酸梯度洗脱、流速 1.0 mL/min, 检测波长 474 nm。对市场常见的油状来源及固体状来源 2 种剂型的样品分别进行了检测方法学研究, 研究表明样品中虾青素的回收率高、精密度良好, 测量结果准确。本方法可应用于保健食品中虾青素含量的测定。

表 5 方法的回收率结果( $n=3$ )  
Table 5 Recoveries of the analyzed method result ( $n=3$ )

样品编号	加标水平	加标量/μg	回收量/μg	回收率/%	RSD/%	均值%
样品 1	0.5 倍	52.58	51.18	97.3	1.75	96.7
	1 倍	105.2	101.3	96.4	0.88	
	1.5 倍	157.7	152.1	96.4	1.14	
样品 8	0.5 倍	13.68	13.35	97.6	1.23	98.6
	1 倍	27.35	26.32	96.2	0.85	
	1.5 倍	41.02	41.78	101.9	1.42	

表 6 样品 1 和 8 号日间重复性结果( $n=3$ )  
Table 6 Sample 1 and 8 daytime repeatability result ( $n=3$ )

时间	油状样品 1 号		粉末样品 8 号	
	平均含量/%	RSD/%	平均含量/%	RSD/%
第 1 d	2.04		0.141	
第 2 d	2.09	1.3	0.141	1.6
第 3 d	2.05		0.145	

表7 不同样品中虾青素含量测定结果

Table 7 Determination results of various samples

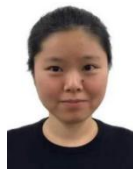
样品编号	n 值	样品含量/%	RSD/%
1	6	2.08	2.4
2	3	1.16	1.8
3	3	0.328	2.4
4	3	3.92	2.2
5	3	3.55	2.4
6	3	1.25	2.9
7	3	0.484	2.4
8	6	0.140	2.0
9	3	0.284	2.7
10	3	0.103	3.0
11	3	0.329	2.9
12	3	0.261	2.6

## 参考文献

- [1] 张晓燕, 刘楠, 周德庆. 天然虾青素来源及分离的研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 264–267.  
ZHANG XY, LIU N, ZHOU DQ. Study on the source and extraction of natural astaxanthin [J]. Food Mach, 2012, 28(1): 264–267.
- [2] 周庆新, 刘婷婷, 杨鲁. 虾青素的来源、生物功效及吸收代谢研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(16): 214–219.  
ZHOU QX, LIU TT, YANG L. Recent progress in sources, biological function, absorption and metabolism characteristics of astaxanthin [J]. Food Res Dev, 2017, 38(16): 214–219.
- [3] 钟雨彤. 虾青素的生理功能与应用领域[J]. 科技展望, 2016, 26(23): 290.  
ZHONG YT. The physiological functions and application fields of astaxanthin [J]. Sci Technol, 2016, 26(23): 290.
- [4] WU D, XU H, CHEN J, *et al.* Effects of astaxanthin supplementation on oxidative stress [J]. Int J Vitam Nutr Res, 2020, 90(1–2): 179–194.
- [5] KURAJI M, MATSUNO T, SATOH T. Astaxanthin affects oxidative stress and hyposalivation in aging mice [J]. J Clin Biochem Nutr, 2016, 59(2): 79–85.
- [6] HIGUERA-CLAPARA I, FELIZ-VALENZUELA L, GOYCOOLEA FM. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications [J]. Crit Rev Food Sci, 2006, 46(2): 185–196.
- [7] ZHANG L, WANG H. Multiple Mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin [J]. Mar Drugs, 2015, 13(7): 4310–4330.
- [8] CHENG CH, GUO ZX, YE CX, *et al.* Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under high temperature stress [J]. Fish Physiol Biochem, 2018, 44(1): 209–218.
- [9] VISIOLI F, ARTARIA C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: Mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps [J]. Food Funct, 2017, 8(1): 39–63.
- [10] 李浩明, 高蓝. 虾青素的结构、功能与应用[J]. 精细化工, 2003, 20(1): 32–36.  
LI HM, GAO L. Astaxanthin: chemical structure, biological functions and usage [J]. Fine Chem, 2003, 20(1): 32–36.
- [11] 董宝莲, 郭玲. 虾青素的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(8): 821–824.  
DONG BL, GUO L. Research progress of astaxanthin [J]. China J Clin Pharm, 2019, 35(8): 821–824.
- [12] 姚康飞, 张瑞莲, 刘晓娟, 等. 不同立体构型的虾青素抗脂质过氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(10): 86–94.  
YAO KF, ZHANG RL, LIU XJ, *et al.* Studies on anti-lipid peroxidation activity of different stereoisomeric astaxanthin [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2018, 18(10): 86–94.
- [13] 贺青华, 李勇超, 王文娟, 等. 雨生红球藻虾青素的制备及生物活性研究进展[J]. 中国酿造, 2016, 35(11): 35–38.  
HE QH, LI YC, WANG WJ, *et al.* Research progress of preparation and bioactivity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. China Brew, 2016, 35(11): 35–38.
- [14] 孔庆龙, 荆雯, 张晓南, 等. 软糖类产品中虾青素的检测及稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 269–275.  
KONG QL, JING W, ZHANG XN, *et al.* Research on the detection and stability of astaxanthin in soft candy products [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(3): 269–275.
- [15] 张旭, 冉景丞, 杨卫诚, 等. 贵州草海小龙虾虾青素提取条件及含量测定[J]. 河北渔业, 2019, (4): 14–18.  
ZHANG X, RAN JC, YANG WC, *et al.* Extraction conditions and content determination of astaxanthin from crayfish in Lake Caohai, Guizhou province [J]. Hebei Fish, 2019, (4): 14–18.
- [16] GB/T 31520—2015 红球藻中虾青素的测定 液相色谱法[S].  
GB/T 31520—2015 Determination of astaxanthin in *Haematococcus*—High performance liquid chromatography method [S].
- [17] T/CCCMHPIE 1.23—2016 植物提取物 虾青素[S].  
T/CCCMHPIE 1.23—2016 Plant extract-Astaxanthin [S].

(责任编辑: 王欣)

## 作者简介



赵唯雯, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 659173929@qq.com



常平, 高级实验师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: changping@buu.edu.cn