

经验交流

极大螺旋藻中 β -胡萝卜素的分离纯化及定量测定

胡朝辉, 刘志礼

(南京大学生物科学与技术系藻菌工程实验室, 江苏 南京 210093)

摘要 极大螺旋藻(*Spirulina maximum*)中含有多种营养物质,其中 β -胡萝卜素具有重要的应用价值。利用 β -胡萝卜素极性小的特点,用丙酮-甲醇(体积比为 7:2)溶液对其提取后皂化。采用石油醚萃取,通过氧化铝柱进行色谱分析,用反相高效液相色谱法(RP-HPLC 法)测定了 β -胡萝卜素的含量。方法准确性高、重现性好,平均回收率为 96.8%。

关键词 反相高效液相色谱法;极大螺旋藻; β -胡萝卜素;中性氧化铝柱

中图分类号 O658 **文献标识码** A **文章编号** 1000-871X(2001)01-0085-03

1 前言

近 10 年来,关于 β -胡萝卜素的研究已日益深入。 β -胡萝卜素作为一种高效的抗氧化剂,能有效的清除自由基,抗脂质过氧化,被广泛认为具有防癌、抗癌、抗衰老等药用保健特性,同时也是优良的食品添加剂和营养增强剂。关于 β -胡萝卜素的分离与检测方法很多,主要有柱色谱法、薄层色谱法、纸色谱法^[1]、分光光度法^[2]及 HPLC 法^[3,4]等。

极大螺旋藻(*Spirulina maximum*)是一种丝状微藻,属蓝藻目念珠藻科颤藻纲,目前国内已得到大规模生产,但用该资源生产 β -胡萝卜素在国内尚无正式报道。本实验室在实验过程中发现极大螺旋藻中亦含有非常丰富的 β -胡萝卜素,具有广阔的开发应用前景。国内虽然有关于藻类 β -胡萝卜素的报道,但针对极大螺旋藻中的 β -胡萝卜素的提取分离检测技术的研究尚未见报道。我们吸取国内外有关 β -胡萝卜素测定的经验^[1~6],对极大螺旋藻中 β -胡萝卜素的分离纯化和检测进行了研究,在对其进行提取、皂化、萃取后,通过氧化铝柱进行色谱分析,使 β -胡萝卜素得到进一步纯化。该工艺简便、高效,便于进一步扩大,可用于工业化生产。同时,我们还建立了极大螺旋藻中 β -胡萝卜素的高效液相色谱测试方法,结果令人满意。

2 实验部分

2.1 试剂及设备

极大螺旋藻藻粉,来源于南京大学生命科学院藻类工程实验室。

β -胡萝卜素标准溶液:精确称取 β -胡萝卜素标

准品(Sigma 公司)6 mg,溶于甲醇中,配成质量浓度为 0.03 g/L 的标准溶液。

色谱分析用氧化铝:中性,200 目~300 目(上海五四化学试剂厂)。

所用仪器为 Waters 600 HPLC,996PAD,Hypersil BDS C₈(4.6 mm i. d. $\times$ 150 mm),日立 U3000 紫外-可见分光光度计。所用试剂均为 AR 级。

2.2 样品处理

(1)精确称取藻粉 10 g 置于 100 mL 烧杯中,加入 50 mL 丙酮-甲醇(体积比为 7:2),超声波破壁,至镜检结果认为破壁完全。

(2)抽滤,滤液置于圆底烧瓶中,残渣重新用 20 mL 丙酮-甲醇(体积比为 7:2)提取液提取一次,合并提取液,于旋转蒸发仪上减压抽干。

(3)残渣重新溶解于 50 mL 石油醚中,加入等量的质量分数为 10% 的氢氧化钾的甲醇溶液,接回流冷凝装置,水浴加热,充 N₂ 皂化 20 min。

(4)皂化液于 250 mL 分液漏斗中振荡萃取 8 min,水洗多次至中性,取出 100 μ L 供液相色谱分析用(见图 1-a)。另取少量皂化液在紫外-可见分光光度计上于 300 nm~700 nm 范围内扫描(见图 2-a)。剩余溶液置于旋转蒸发仪中于 40 $^{\circ}$ C 下减压浓缩至干。

(5)取 8 g 氧化铝湿法装柱(0.8 cm i. d. $\times$ 20 cm 玻璃色谱柱),再加少量无水 Na₂SO₄ 及石油醚过柱,取上述干样溶于 3 mL 石油醚中,加样,用体积分数为 3% 的乙酸己酯的石油醚洗脱,弃去部分洗脱液(约 3 mL)后,收集洗脱液,合并后约 35 mL。

(6)将洗脱液置于旋转蒸发仪中抽真空浓缩至干,得到桔红色 β -胡萝卜素纯品。

收稿日期 2000-04-01

作者简介 胡朝辉(1970-),男,讲师,现为江苏省南京大学生物系在职硕士生,电话(025)3595352,E-mail:hzhbio@263.net。

通讯联系人:刘志礼,男,教授,博士生导师。

2.3 定性和定量

将所得纯品溶于 80 mL 甲醇中,取出适量,稀释 4 倍,供高效液相色谱分析,结果见图 1-b。另取

适量样品和标准品分别在紫外-可见分光光度计上于 300 nm~700 nm 范围内扫描,结果分别见图 2-b 和图 2-c。

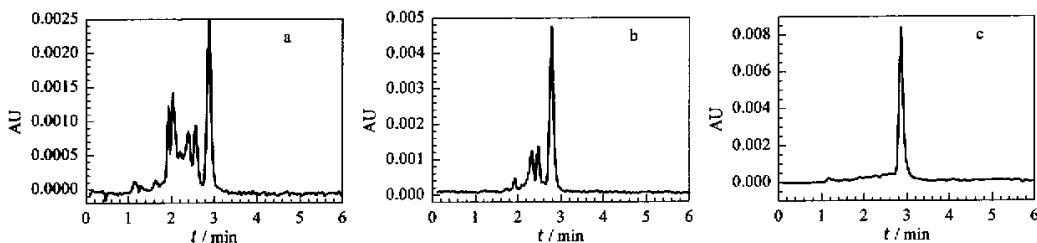


图 1 样品及标准品的 HPLC 图谱

Fig.1 Chromatograms of the sample and the standard β -carotene

a. The sample before chromatography on an Al_2O_3 column ; b. The sample after chromatography on an Al_2O_3 column ; c. The standard β -carotene.

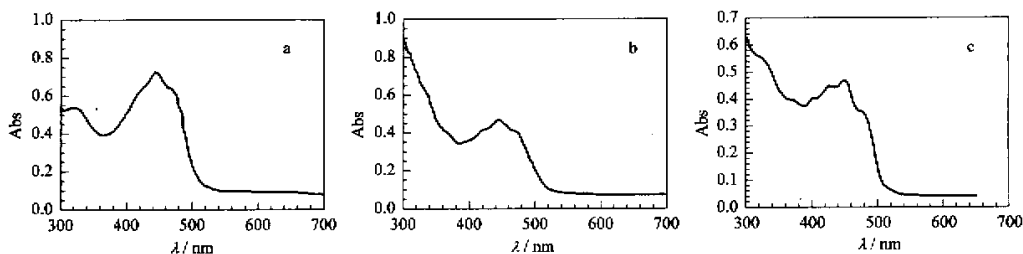


图 2 样品及标准品在 300 nm~700 nm 范围内的扫描图

Fig.2 The scanning spectra of the sample and the standard β -carotene

a. The sample before chromatography on an Al_2O_3 column ; b. The sample after chromatography on an Al_2O_3 column ; c. The standard β -carotene.

2.4 标准曲线的绘制

分别取标准溶液(0.03 g/L) $2\ \mu\text{L}$ 、 $4\ \mu\text{L}$ 、 $6\ \mu\text{L}$ 、 $8\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 注入 HPLC 柱,即分别注入 β -胡萝卜素 0.06 μg 、0.12 μg 、0.18 μg 、0.24 μg 、0.3 μg 。以峰面积为 Y , β -胡萝卜素的含量(μg)为 X ,得线性回归方程为 $Y = 1.873\ 74 \times 10^5 X - 5.651\ 18 \times 10^2$, $r = 0.999\ 15$,线性范围为 0.06 μg ~0.3 μg 。图 1-c 为 β -胡萝卜素标准品的 HPLC 图谱。

2.5 分析条件

流动相为甲醇-乙酸己酯(体积比为 30:70),流速 1 mL/min,检测波长 540 nm,进样量 3 μL 。

2.6 回收率试验

取 5 份样品,每份 10 g,分别加入已知量的 β -胡萝卜素标准品,按照前述样品处理方法进行处理并测定,得平均回收率为 96.8%。

2.7 精密度测定

另取 5 份样品,每份 10 g,重复“2.2”项操作。取 3 μL 样品溶液进样,得其中 β -胡萝卜素含量的平均值为 0.163 μg ,相对标准偏差为 0.809%。

3 结果与讨论

(1)由图 1-b 及图 1-c 可知,在本实验条件下, β -胡萝卜素与其他组分得到很好的分离。根据定量

线性回归方程可知所测定的样品液中 β -胡萝卜素含量为 54 mg/L。将其乘以稀释倍数 4 得到 218 mg/L,再乘以总体积 80 mL,然后除以 10 g(干重),得到藻粉中 β -胡萝卜素的含量为 1.74 mg/g。

(2)提取溶剂的选择:我们的试验证明,丙酮有利于 β -胡萝卜素的提取,甲醇有利于 β -胡萝卜素以外的其他色素的提取。图 3 为单独用甲醇提取后,经皂化及石油醚萃取后所得样品的 HPLC 图。由图 3 与图 1-a 比较的结果可知,丙酮更有利于 β -胡萝卜素的提取。实验亦证明单独用一种溶剂提取的效果不理想,采用本实验采用的提取溶剂效果较好,文献[2]亦证明了这一结果。

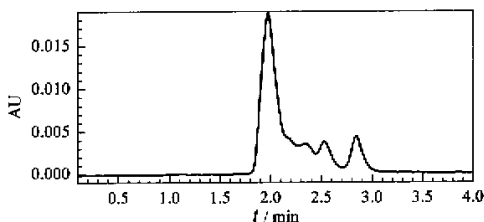


图 3 单独用甲醇提取,经皂化及石油醚萃取后样品的 HPLC 图谱

Fig.3 Chromatogram of the sample extracted with methanol, saponified and extracted with petroleum ether

(3) 流动相的选择 :先后采用甲醇-乙酸己酯的体积比为 98:2 45:55 35:65 结果均不如体积比为 30:70 时分离效果好 ,最终选择流动相为 V(甲醇):V(乙酸己酯)= 30:70。

(4) β -胡萝卜素易被氧化 ,因此实验过程在充 N_2 及密封条件下进行。本实验未考虑极大螺旋藻藻粉在收获及保存期间 β -胡萝卜素含量的损失。

(5) 极大螺旋藻中的 β -胡萝卜素在不同的外界条件下含量不同 ,如 pH、温度、光强、盐浓度、氮浓度等因素对其含量均有影响 ,这方面工作尚有待研究。

(6) 极大螺旋藻中含有极丰富的 β -胡萝卜素 ,且具有生长周期短、易于大规模养殖等特点 ,从中提取 β -胡萝卜素具有巨大的开发应用价值。

参考文献 :

[1] HU Hui-ling ,LUO Jin-sheng. Sea-Lake Salt&Chemical Industry ,1996 25(6) 37-38

胡慧玲 ,罗金生 . 海湖盐与化工 ,1996 25(6) 37-38
[2] LIANG Jing-juan ,PANG Zong-wen. Industrial Microbiology ,1997 27(2) 21-24
梁静娟 庞宗文 . 工业微生物 ,1997 27(2) 21-24
[3] LI Zhong ,PENG Guang-hua ,CHEN Lu et al. Chinese Journal of Chromatography ,1997 15(6) 537-538
李 忠 彭光华 陈 露 等 . 色谱 ,1997 15(6) 537-538
[4] WANG Xiao-yi ,JIANG Meng-jun ,ZHANG Shu-fen et al. Chinese Journal of Chromatography ,1995 13(2) : 145-146
王小逸 姜孟军 张淑芬 等 . 色谱 ,1995 13(2) :145-146
[5] Brubacher G ,Muller W ,Southgate D A T. Method for the determination of vitamins in food. Singapore : Elsevier Applied Science Publishers ,1991. 33-50
[6] HE Zhao-fan ,XIONG Lü-yun. Acta Nutrimenta Sinica , 1991 13(2) :166-170
何照范 熊绿芸 . 营养学报 ,1991 13(2) :166-170

Determination and Purification of β -Carotene in Spirulina Maximum

HU Zhao-hui , LIU Zhi-li

(Lab of Algal and Bacterial Technology , Department of Biological Science and Technology , Nanjing University , Nanjing 210093 , China)

Abstract :There are several kinds of nutritious materials in Spirulina maximum ,and β -carotene is one of the most important materials. Because β -carotene is of low polarity ,for purification it was extracted with the mixture of acetone and methanol in the ratio of 7:2(V/V) ,then saponified , and extracted with petroleum ether , purified with column packed with neutral Al_2O_3 . Its content was determined by reversed-phase HPLC. This method is accurate and the results are reproducible. The average recovery was 96.8% .
Key words :reversed-phase high performance liquid chromatography ; Spirulina maximum ; β -carotene ; neutral alumina column