

酸性低共熔溶剂提取南极磷虾虾青素及残渣利用

谢章荟¹, 凌杰¹, 陈静怡¹, 程婉婷², 高静^{1*}

(1. 广东药科大学食品科学学院, 广东中山 528400) (2. 广东药科大学公共卫生学院, 广东广州 510000)

摘要: 为实现南极磷虾资源的综合利用, 制备了4种酸性低共熔溶剂进行虾青素的提取, 根据提取条件进行萃取优化, 评估了溶剂的循环利用、提取液的稳定性和抗氧化能力, 最后利用提取残渣作为生物吸附剂。研究表明, 低共熔溶剂酸性增强可显著增加虾青素提取效率, 低共熔溶剂 DL-薄荷醇: 乙酸 (MAA) 在最佳条件下 [提取温度 25 °C, 提取时间 1 h, 固液比 1:10 (g/mL)] 萃取得到的虾青素含量可达 222.96 mg/kg, 具有良好的溶剂循环利用效果和抗氧化能力, DL-薄荷醇: 辛酸 (MOA) 提取液在 4 °C 下表现出良好的色泽和浓度的保持能力。通过拟合也证实了贮藏期间各提取液的色差与虾青素浓度的变化趋势之间具有良好的相关性 (平均 $R^2 > 0.9$)。最后, 提取残渣粗糙多孔, 对阴离子型染料刚果红的吸附率达到 70%。该研究为选择和设计提取天然虾青素的溶剂和南极磷虾的高效利用提供了技术支持。

关键词: 低共熔溶剂; 南极磷虾; 虾青素; 提取; 稳定性; 抗氧化性; 吸附

文章编号: 1673-9078(2025)01-162-172

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1404

Extraction of Astaxanthin from Antarctic Krill by An Acidic Deep Eutectic Solvent and Utilization of Its Residue

XIE Zhanghui¹, LING Jie¹, CHEN Jingyi¹, CHENG Wanting², GAO Jing^{1*}

(1. School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528400, China)

(2. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China)

Abstract: To comprehensively use Antarctic krill resources, four acidic deep eutectic solvents were prepared for astaxanthin extraction. The optimization of the extraction considered the recycling of solvents and stability and antioxidant capacity of the extraction solution. Moreover, the extraction residue was used as a biosorbent. The enhancement of the acidity of deep eutectic solvents significantly increased the extraction efficiency of astaxanthin. The content of astaxanthin obtained by the deep eutectic solvent DL-menthol:acetic acid (MAA) under optimized conditions [extraction temperature: 25 °C ; extraction time: 1 h; solid-liquid ratio 1:10 (g/mL)] was 222.96 mg/kg, with good solvent recycling and antioxidant ability. The DL-menthol:caprylic acid (MOA) extract showed favorable color and concentration stability at 4 °C . A strong positive correlation (average $R^2 > 0.9$) was identified between the chromatism values observed in the deep eutectic solvent extracts and

引文格式:

谢章荟, 凌杰, 陈静怡, 等. 酸性低共熔溶剂提取南极磷虾虾青素及残渣利用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(1): 162-172.

XIE Zhanghui, LING Jie, CHEN Jingyi, et al. Extraction of astaxanthin from Antarctic krill by an acidic deep eutectic solvent and utilization of its residue [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 162-172.

收稿日期: 2023-11-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22078070); 广东省基础与应用基础研究面上项目 (2019A1515010640); 广东省教育厅重点项目 (2022ZDZX4025); 国家级创新训练项目 (202310573001)

作者简介: 谢章荟 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: sgsyxzh@126.com; 共同第一作者: 凌杰 (2002-), 男, 本科生, 研究方向: 天然活性物质的提取和分离, E-mail: 13790952766@163.com

通讯作者: 高静 (1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品活性物质的分离提取及应用, E-mail: gaojing@gdpu.edu.cn

the corresponding astaxanthin concentrations during storage. The extraction residue was rough and porous, and the adsorption rate of the anionic dye Congo red reached 70%. This study provides valuable technical details for the selection and design of solvents for the extraction of natural astaxanthin and the efficient utilization of Antarctic krill.

Key words: deep eutectic solvent; Antarctic krill; astaxanthin; extraction; stability; antioxidant capacity; adsorption

虾青素(3,3'-二羟基- β , β' -胡萝卜素-4,4'-二酮)是具有13个共轭双键的脂溶性酮式类胡萝卜素,可起到抗氧化、抗炎、抗肿瘤免疫反应等作用^[1-3],在食品、医药以及化妆品等领域展现出极高的经济价值和广阔的应用前景。天然虾青素和化学合成虾青素是虾青素的两种主要的获取途径。根据两端的羟基旋光性,虾青素具有左旋(3S-3'S)、内消旋(3R-3'S)、右旋(3R-3'R)三种异构形态。其中内消旋虾青素的抗氧化活性最低,右旋虾青素清除自由基能力最强,而左旋虾青素对于脂质过氧化的抑制作用和免疫活性较强^[4]。天然虾青素因100%的左旋或右旋结构而具有较强的抗氧化生物活性,而化学合成虾青素为三种结构的混合物(左旋:右旋:内消旋=1:1:2),抗氧化活性极小,且生产成本高、存在中间产物和副产物残留的隐患问题,不能直接用于人类^[5]。美国食品与药物管理局(FDA)已经明令禁止化学合成的虾青素进入保健食品市场,因此从生物资源中获取天然虾青素的研究日益受到重视。

南极磷虾是虾青素的天然生物来源之一,加工中产生的约占总质量的75%的副产品、虾头和虾壳常用作低价值的原料或废弃,造成了极大的营养资源浪费^[6]。因此已有多种方法从南极磷虾壳中分离提取高价值分子(几丁质、蛋白质、灰分和虾青素)以实现将废弃物转化为宝贵资源,如油溶法^[7]、有机溶剂萃取法^[8]、酶解法^[9]等方法从虾壳回收虾青素。然而以上方法存在的操作、成本、环境污染等问题限制了其在虾青素提取方面应用。因此寻求分离纯化虾青素的新型溶剂成为了亟待解决的问题。低共熔溶剂(Deep Eutectic Solvents, DES)是氢键受体(Hydrogen Bond Acceptor, HBA)和氢键供体(Hydrogen Bond Donor, HBD)的共晶混合物,具有价廉安全、低毒可持续和可生物降解等优点,均优于普通溶剂天然物质的提取^[10]。亲水性DES成功已用于虾青素的提取,如Zhang等^[11]利用氯化胆碱和1,2-丁二醇组成的DES提取冻干虾副产物中的虾青素,提取量可达146 $\mu\text{g/g}$ 。但是其存在着黏度大而导致的传质困难问题。与亲水性DES和膦基疏水DES相比^[12],百里酚基和薄荷醇基的疏水性DES

由天然的安全成分构成,并且具有低黏度的优势。Pitacco等^[13]的研究利用百里香酚:油酸(3:1)组成的疏水性DES对虾青素的提取效率显著(83%),虾青素储存中的抗氧化性能维持表现优越。另外,有关虾壳提取的研究仍集中于营养物质的获取,有关提取后残渣的利用讨论鲜有报道。因此从南极磷虾壳中分离提取虾青素、合理利用虾壳提取残渣可以提高相关产业的附加值,有助于减少废物排放,降低环境负荷,实现南极磷虾资源的可持续利用。

据文献报道,虾青素在酸性溶液中的溶解度显著高于中性、碱性溶液^[14]。因此基于相同条件下薄荷醇较百里香酚具更低的熔点和密度、天然无毒特性,本研究采用薄荷醇为氢键受体、以脂肪酸为氢键供体,构建了4种酸性疏水DES,考察了溶剂种类、提取温度、提取时间、固液比对虾青素提取收率的影响,研究了DES提取的循环利用情况。进一步比较了不同温度下各提取液中虾青素的稳定性、抗氧化活性。最后分析提取后虾壳残渣的结构特点并考察虾壳残渣研究对化学染料的吸附效果。本研究为低共熔溶剂在虾青素的萃取和残渣应用提供理论依据,以期南极磷虾产品开发与该资源的综合利用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南极磷虾粉(南极科考队);虾青素分析标准品(纯度 $>98\%$),上海阿拉丁生化科技有限公司;次甲基蓝(纯度 $\geq 98.5\%$),天津市大茂化学试剂厂;刚果红(纯度 $\geq 97\%$),天津市大茂化学试剂厂;DPPH标准品[2,2-联苯基-1-苦基肼基(含10%~20%苯)](HPLC级,纯度 $>97\%$),上海Aladdin化学试剂公司;氢氧化钠(纯度 $\geq 98\%$),天津市大茂化学试剂厂;无水乙醇(纯度 $\geq 99.7\%$),天津市大茂化学试剂厂。DL-薄荷醇(纯度 $\geq 98\%$),上海阿拉丁生化科技有限公司;丙酸、戊酸、辛酸(纯度均 $\geq 99\%$),上海阿拉丁生化科技有限公司;冰醋酸(纯度 $\geq 99.5\%$),广东光华科技有限公司;甲醇、乙腈、二氯甲烷(纯度均 $\geq 99.9\%$),

赛默飞世尔科技(中国)有限公司。所有分离用有机试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

UV-1800 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津制作所; CR-10 色差仪, 康光光学仪器有限公司; HH-6 数显电子恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司; AW120 型分析天平, 日本岛津公司; KY-ZNCL-BS-6 型磁力搅拌器, 上海秋佐科学仪器有限公司; Synergy H1 型多孔功能微孔板检测仪, 美国 Biotek; Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; ST 16R 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; SHA-CA 水浴恒温振荡器, 常州奥华仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酸性低共熔溶剂的制备

采用加热搅拌法按照 1:2 摩尔比于 60 °C 下恒温搅拌, 直至溶液变为均一透明, 冷却至室温后备用^[15]。

表 1 DESs 的简称以及 HBA 与 HBD 摩尔比

Table 1 Abbreviation of DESs and molar ratio of HBA and HBD

编号	HBA	HBD	摩尔比	简称	参考文献
DES-1	DL-薄荷醇	乙酸	1:2	MAA	[16]
DES-2	DL-薄荷醇	丙酸	1:2	MPA	[16]
DES-3	DL-薄荷醇	戊酸	1:2	MVA	[16]
DES-4	DL-薄荷醇	辛酸	1:2	MOA	[16]

1.3.2 虾青素的提取

将南极磷虾粉粉碎并过 50 目筛网, 得到粗细均匀的粉末。按一定固液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL)准确称取上述粉末加入提取溶剂(二氯甲烷、甲醇、MAA、MPA、MVA、MOA)中, 恒温(25、30、35、40、45 °C)振荡提取一定时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h)。提取完成后, 在 10 000 r/min 转速条件下常温离心 10 min 取上清液待测定。

1.3.3 高效液相色谱测定虾青素含量

将提取液充分离心, 取 1 mL 虾青素上清液于 10 mL 棕色容量瓶中定容, 过 0.45 μm 有机膜待用。液相色谱条件^[17]: C18 色谱柱, 柱温 30 °C, 流动相为甲醇:乙腈:二氯甲烷:水=28:42.5:25:4.5(体积比)(A)、甲醇(B), 流量 1.00 mL/min, 检测波长

474 nm, 进样量 20 μL。虾青素的提取量(X)和提取效率(EE)分别用式(1)和(2)计算:

$$X = \frac{C \times V \times d}{m} \quad (1)$$

$$EE = \frac{X}{Y} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

X—虾青素的提取量, mg/kg;

C—虾青素质量浓度, mg/mL;

V—提取样品的体积, mL;

d—稀释倍数;

m—称取的虾壳粉质量, g;

EE—虾青素的提取效率, %;

Y—虾壳粉中虾青素的含量, mg/kg。

1.3.4 低共熔溶剂萃取的循环性能研究

在最佳条件下萃取后, 将固液混合物过滤, 并在不除去目标物的情况下重复使用溶剂, 重新萃取虾壳 3 次。在同等萃取条件下萃取后, 测定溶液中虾青素的增量, 从而判断低共熔溶剂的循环性能。

1.3.5 稳定性测定

1.3.5.1 颜色变化

将提取液离心后取其上清液, 分别在 4、25 和 50 °C 下于阴暗处储存 14 d。每隔一天观察外观以及使用色差仪测定颜色变化, 颜色用 L^* 值表示(亮度)、 a^* 值 [(+) 红色和 (-) 绿色] 和 b^* [(+) 黄色和 (-) 蓝色]。利用等式(3)计算总色差 $\Delta E^{[18]}$:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (3)$$

式中:

ΔL^* 、 Δa^* 、 Δb^* —分别表示初始样品与 t 时刻样品的 L^* 、 a^* 、 b^* 的差值。

1.3.5.2 浓度变化

将提取液进行离心后, 取其上清液, 然后在 4、25 和 50 °C 下于阴暗处储存 14 d。每隔一天采用酶标仪测定虾青素浓度。根据 Li 等^[16]的研究采用零级动力学和一级动力学研究虾青素的降解:

零级常数:

$$C = C_0 - k_0 t \quad (4)$$

一级常数:

$$\ln C/C_0 = -k_1 t \quad (5)$$

降解率:

$$\omega = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

C_0 —虾青素在初始时的质量浓度, mg/mL;

C —虾青素在时间 t 时的质量浓度, mg/mL;

k_0 —零级降解速率常数, d^{-1} ;

k_1 —一级降解速率常数, d^{-1} ;

t —时间, d;

ω —虾青素降解率, %。

虾青素质量浓度降低 50% 所需的时间称为降解半衰期 ($t_{1/2}$, d), 采用 Borba 等^[19] 的实验方法计算提取液中虾青素的半衰期 $t_{1/2(d)}$:

$$t_{1/2(d)} = \ln(2)/k_1 \quad (7)$$

1.3.6 抗氧化活性测定

以 DPPH 自由基清除效率评价虾青素提取液的抗氧化活性。将 80 μ L 不同质量浓度的含虾青素的低共熔溶剂提取液加入到 120 μ L 的 0.1 mmol/L DPPH 的乙醇溶液中。充分混匀后, 避光孵育 30 min。使用酶标仪在 517 nm 波长下测定每种溶液的吸光度。DPPH 自由基清除率计算如下^[20]:

$$D = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (8)$$

式中:

D —DPPH 自由基清除率, %;

A_0 —DPPH 乙醇溶液的吸光度;

A_1 —含 DPPH 的虾青素溶液的吸光度;

A_2 —不含 DPPH 的虾青素溶液的吸光度。

1.3.7 虾壳残渣对化学染料的吸附

配置 5 mg/L 的亚甲基蓝和 150 mg/L 的盐酸刚果红染料溶液并分别调节 pH 值为 4 和 12, 各移取 50 mL 于 100 mL 的锥形瓶中。分别投加 0.05 g 处理过的虾壳残渣于亚甲基蓝和盐酸刚果红染液进行吸附实验, 使用紫外分光光度计分别在 496.5 nm 和 664 nm 处测量刚果红及亚甲基蓝溶液的吸光度, 并按照下式计算总吸附率 (脱色率) 和总吸附量^[21,22]。

$$\eta = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100\% \quad (9)$$

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m} \quad (10)$$

式中:

η —染料的吸附率, %;

q_e —吸附量, mg/g;

C_0 —溶液中染料初始质量浓度, mg/L;

C_e —吸附后溶液中染料质量浓度, mg/L;

V —溶液体积, L;

m —投加吸附剂的质量, g。

1.3.8 提取残渣的扫描电镜分析

分别选取两种染料吸附效果最佳的单因素虾壳残渣以及未经处理的虾壳粉末, 用双面胶带贴于载物台上, 放入表面处理剂中喷金后, 以扫描电子显微镜在 0.1 t 的真空度下扫描, 放大 1 500 倍后观察。扫描电镜工作条件为高压 20 kV, 工作距离 15 mm。

1.4 数据处理方法

所有试验均 3 次平行测定, 计算平均值和相对平均偏差。Origin 2023 及 Excel 软件用于作图及回归拟合实验数据。

2 结果与讨论

2.1 虾青素的提取

2.1.1 提取溶剂的影响

溶剂对虾青素的溶解度大小直接反映出其提取虾青素的能力。本研究采用了 2 种有机溶剂 (二氯甲烷、甲醇) 与 4 种酸性 DESs 进行虾青素提取的对比。由图 1a 可知, 总体而言虾青素在 DESs 中的提取效果低于有机溶剂, 这是因为虾青素作为弱极性化合物, 根据相似相容原理其在弱极性溶剂二氯甲烷中的溶解度较大。虾青素在 4 种酸性 DESs 中的提取效率符合以下规律 MAA (HBD: 乙酸) > MPA (HBD: 丙酸) > MVA (HBD: 戊酸) > MOA (HBD: 辛酸), 即酸性越强提取效果越佳, 这与课题组先前研究的虾青素溶解性顺序一致^[23]。在 MAA 中提取量和提取效率分别达到 201.11 mg/kg, 76%。对比 Sharayei 等^[24]使用的有机溶剂 [石油醚: 丙酮: 水 (15:75:10)] 提取短沟对虾青素最大可得 48.47 μ g/g 干物质的提取量, MAA 表现出更优秀的溶解能力, 其短碳链利于虾青素的溶解, 而且具有环境友好的显著优势。因此后续研究选择 MAA 作为虾青素的提取溶剂。

2.1.2 提取温度

由图 1b 可知, 在 25~45 $^{\circ}$ C 内, 随着提取温度的升高, 虾青素收率呈逐渐下降的趋势, 在 25 $^{\circ}$ C 最高, 可达到 180.70 mg/kg 以及 68% 的提取效率。温度升高破坏 HBA 和 HBD 之间的氢键网络, 导致 DES 黏度降低, 促进虾青素在溶剂中的传质和溶

解^[25]。但温度继续升高易导致虾青素分子中的羟基和酮基受热分解，还会破坏细胞导致虾青素流出损失。所以随着提取温度的升高，虾青素收率呈缓慢下降的趋势^[26,27]。综合考虑各因素条件下，选择25℃作为最佳提取温度。

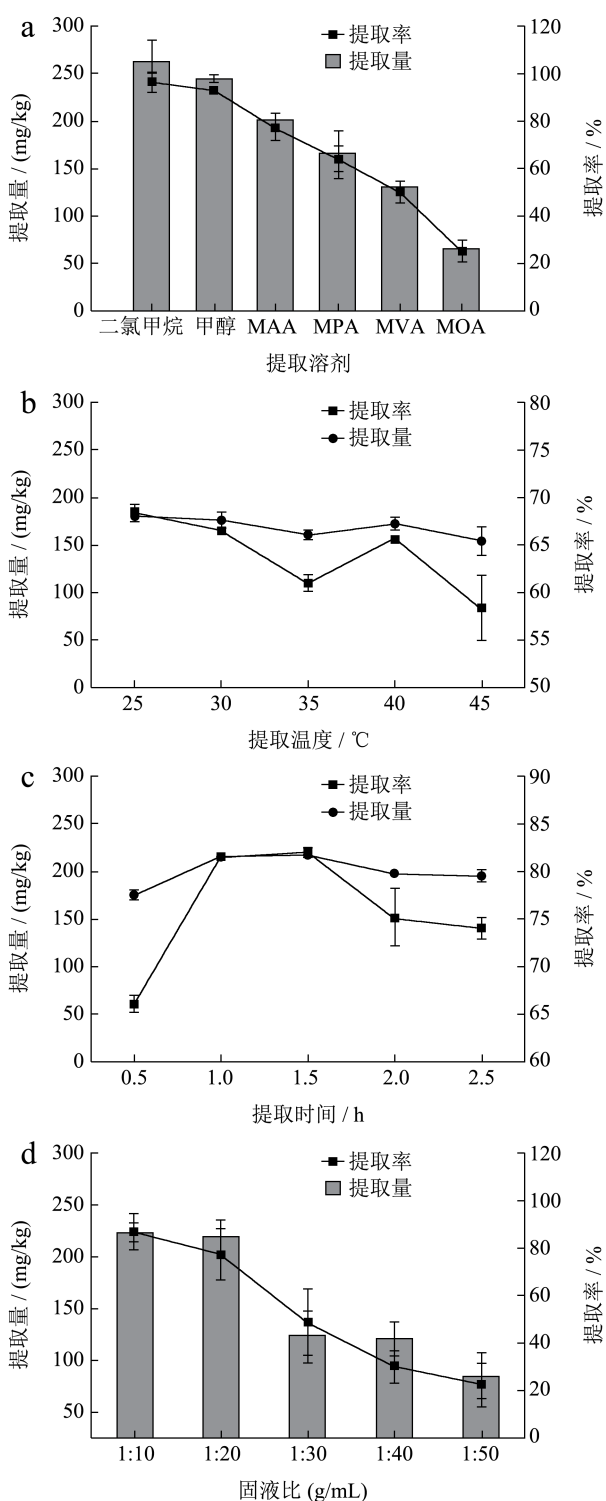


图1 不同因素对虾青素提取量和提取效率的影响
Fig.1 Effects of different factors on the extraction amount and extraction efficiency of astaxanthin

2.1.3 提取时间

提取时间对实现高提取效率具有重要作用。图1c显示，虾青素收率随着提取时间的增加(0.5~1.5 h)呈逐渐上升的趋势，在1.5 h时达到最高；但1.5 h后提取时间的进一步增加使得收率略微下降。结果表明提取时间的增加促进虾青素在溶剂中的溶解，使物料与溶剂拥有足够的接触时间，从而获得更高收率。然而随着提取时间增加，会导致虾青素氧化分解增加和/或顺式异构体转化为反式^[28,29]。由于提取1 h与1.5 h的虾青素收率几乎相等，所以基于对能源的节约考虑，选择1 h作为最佳提取时间。

2.1.4 固液比

固液比通过影响溶质和溶剂之间的相互渗透作用而影响虾青素在溶剂中的降解。由图1d图可以看出，在固液比1:10~1:50 (g/mL)的范围内，随着提取溶剂的增加，虾青素收率呈明显下降的趋势。固液比为1:10 (g/mL)时虾青素收率达到最大，为222.96 mg/kg。说明在固液比为1:10 (g/mL)时虾青素已提取完全。所以综合考虑成本与含量，选择1:10 (g/mL)作为提取的最佳固液比。

2.2 低共熔溶剂的循环性能研究

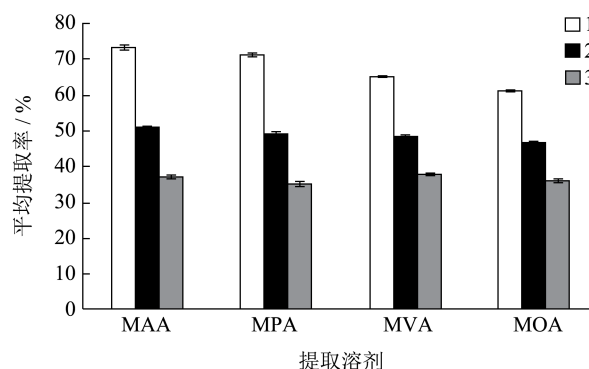


图2 低共熔溶剂的循环利用情况
Fig.2 Deep eutectic solvents recycling

与有机溶剂体系相比，DES具有可回收循环利用的优势。有研究表明可以通过调节水相的pH值的方式回收DL-薄荷醇与茴香醇摩尔比为1:5的天然DES^[30]。如图2所示，将4种DESs直接回收利用，重复萃取虾青素，发现它们的虾青素提取率在随着提取次数的增加而下降，但重复利用2次后仍有着将近50%的提取率。效果最佳的MAA在第一次提取时提取率可以达到75%，第2次提取仍然保持51%。这证明了DES作为绿色溶剂有着良好的循环利用性能。由于溶剂在循环利用过程中大量损耗，南极磷虾壳

与溶剂接触不完全,未能达到充分溶解,因此虾青素的收率在多次循环利用过程中呈下降趋势。

2.3 稳定性

2.3.1 颜色变化

颜色变化是虾青素降解最直观的表现。含有虾青素的提取液初始颜色为暗红色。提取液在贮藏0~14 d后未出现显著差异,无明显的降解、分层和颜色变化,表明富含虾青素的提取液在14 d内保持相对稳定。所有提取液在4 °C和25 °C条件下的外观没有变化,表明在低温下提取液对虾青素有一定的保护作用。相比而言,50 °C储存条件下虾青素提取液均表现出颜色变浅,这归因于高温会加速虾青素的降解。其中由于二氯甲烷的强挥发性,在50 °C贮藏第2天时含虾青素的二氯甲烷提取液已挥发完全。为了进一步分析虾青素在溶剂中的稳定性,在4、25、50 °C下研究了提取液的色差值(ΔE)。在图3中可以观察到,所有DESs的 ΔE 值都遵循50>25>4 °C和MAA>MPA>MVA>MOA的趋势,例如MAA提取液的 ΔE 值在50 °C(9.54)贮藏4 d后比在4 °C(2.16)高4.4倍左右,MOA提取液在在4 °C(4.05)贮藏4 d后比在25 °C时(5.71)低。温度升高造成的虾青素氧化和异构化程度增加是色泽变化的重要原因,氧化反应产生的产物如环氧化物和羟基化合物等无色化合物以及同时发生的虾青素异构化都会导致虾青素的优势色-红色和黄色变浅甚至消失^[31,32]。以上结果说明所有低共熔溶剂的虾青素提取液的色泽均可以在低温下保持良好,其中以MOA为最佳。

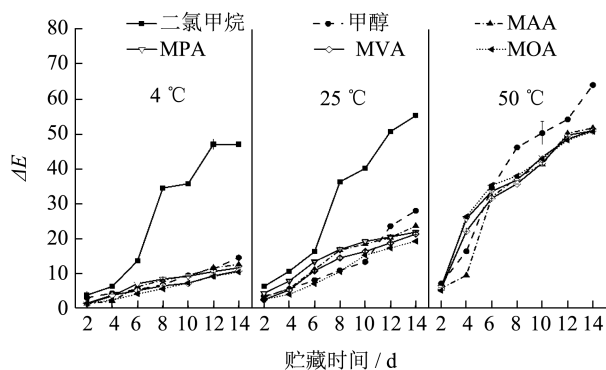


图3 虾青素提取液在4、25、50 °C下贮藏14 d的色差变化
Fig.3 Color changes of astaxanthin extracts stored at 4, 25, 50 °C for 14 days

2.3.2 浓度变化

在储存期间,所有处理条件提取液中的虾青素

浓度均有着不同程度的降低,50 °C下贮藏的二氯甲烷提取液因在第二天即挥发完全而无法测量浓度。虾青素含有大量的共轭双键,在贮存过程中容易异构化和氧化,会被氧化反应降解^[33]。如图4所示相对于有机溶剂,低共熔溶剂提取液的虾青素浓度下降程度较小,尤其在4 °C和25 °C时变化程度较低。虾青素浓度在各个温度下都表现出MOA>MVA>MPA>MAA的趋势,例如在4 °C下保存14 d的MVA的降解率分别仅25.75%,当贮藏温度提高到50 °C时降解率增加68.94%。图5显示了虾青素的MAA提取液别在4、25、50 °C下贮藏7 d的HPLC色谱图。可观察到本研究中的虾青素提取液在色谱图中显示出与虾青素标准品光谱保留时间相近的峰,特征峰的保留时间分别在10、12、15 min,证明本研究选用的溶剂可成功提取虾青素。在4、25、50 °C下贮藏7 d后的虾青素HPLC图谱特征峰峰面积均出现下降情况,其中4 °C下贮藏7 d的峰面积变化最小,50 °C下贮藏7 d的峰面积大大降低,指示在50 °C下贮藏7 d时虾青素损失量最大。以上研究表明温度越高,虾青素氧化程度越大,导致浓度降低^[34]。

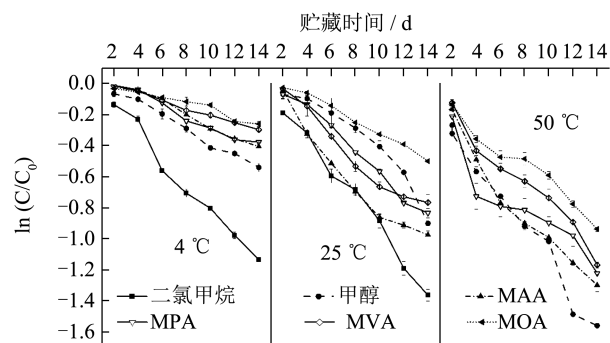


图4 虾青素提取液在4、25、50 °C下贮藏14 d的浓度变化
Fig.4 Concentration changes of astaxanthin extracts stored at 4, 25, 50 °C for 14 days

从列于表2的动力学参数可以明显看出,一阶动力学模型中 R^2 平均值(0.941 2)高于零阶动力学模型 R^2 平均值(0.837 8),表明一阶动力学参数能够更好地描述虾青素在不同储藏温度下的浓度变化。这也与先前得出的虾青素的降解符合一阶动力学规律的说法相符合^[35]。另外,降解速率常数 k_0 和 k_1 在4 °C时 k_1 的数值明显低于25 °C和50 °C,这再次表明提取液中的虾青素在较高的温度下比在较低的温度下降解得更快。此外我们还利用了一阶动力学模型得到的降解速率常数 k_1 计算了虾青素的半衰期 $t_{1/2(d)}$,以评估提取液中虾青素的稳定性。每种提取液的 $t_{1/2(d)}$ 都随着温度的升高而降低,例如不同

提取液在 4 °C 下的半衰期为 MOA (35.01) > MVA (28.64) > MPA (20.39) > MAA (19.80)。结果表明, MOA 具有浓度保持的优势, 这可能是因为其酸性较弱, 而虾青素在长期弱酸性以及过酸环境下会影响其稳定性^[14,36]。

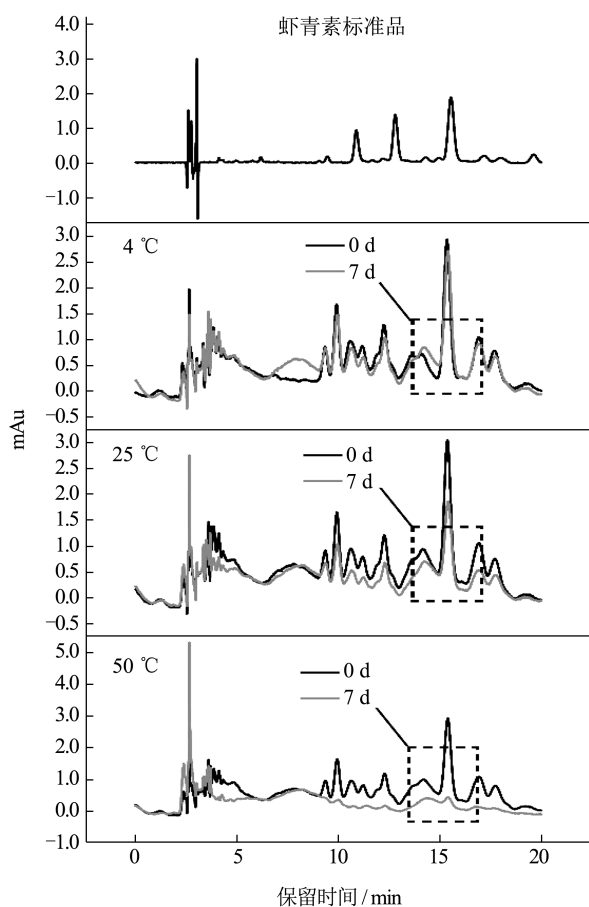


图 5 虾青素 MAA 提取液在 4、25、50 °C 下贮藏 7 d 的高效液相色谱图比较

Fig.5 Comparison of high performance liquid chromatography of astaxanthin MAA extracts stored at 4, 25 and 50 °C for 7 days

2.3.3 浓度与颜色的相关性

提取液色差 (ΔE) 和虾青素浓度的变化有着类似的随贮藏时间和温度的增加而下降的模式, 因此对测定的颜色参数 (L^* 、 a^* 、 b^*) 和虾青素浓度进行拟合, 拟合曲线方程如表 3 所示, 各温度下的虾青素提取液体系的色差参数与浓度之间都有着较

高的 R^2 值 (平均 $R^2 > 0.9$)。例如在 4 °C 下贮藏第 6 天的 MAA 提取液颜色参数 L^* 、 a^* 、 b^* 分别为 81.48、24.34、65.42, 带入线性方程得出虾青素的质量浓度为 0.041 mg/mL, 实际测量的质量浓度为 0.039 mg/mL, 偏差较小。线性关系表明通过检测提取液的颜色参数可以科学准确地分析贮藏过程中虾青素浓度变化, 简化虾青素在溶液中贮藏期间的稳定性监测。

2.4 抗氧化活性

虾青素具有的不饱和双键、全反式异构体的分子结构、两端的羟基和不饱和酮基, 均能吸引自由基的未配对电子或向自由基提供电子, 可提高自由基清除率, 由此增强提取液的抗氧化能力^[14]。图 6 显示, 所有含虾青素的样品均具有显著的浓度依赖性的 DPPH 自由基清除活性, 表明虾青素的存在可以提高溶剂的抗氧化活性。各提取溶剂中虾青素的 DPPH 自由基清除率遵循以下顺序: MAA > MPA > MVA > MOA > 甲醇 >> 二氯甲烷。在质量浓度 0.08 mg/mL 时, 含虾青素的 MAA 提取液中 DPPH 清除率达到最高 96.16%, 而 MOA 在同等浓度下的 DPPH 清除率为 75.62%。此外 MAA 表现出了最低的半抑制质量浓度 (IC_{50}) 5.68 μ g/mL, 比 MOA 的 15.36 μ g/mL 低了 2.7 倍。这都证明采用的酸性 DESs, 特别是 MAA 与虾青素具有抗氧化的积极协同作用。

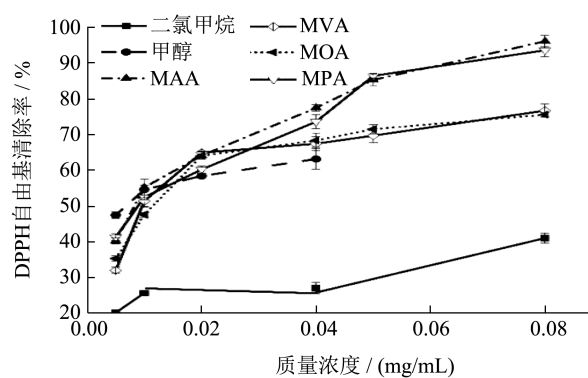


图 6 虾青素提取液的抗氧化活性比较

Fig.6 Comparison of the antioxidant activity of astaxanthin extracts

表 2 虾青素在不同温度和溶剂中拟合的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of astaxanthin in different temperatures and solvents

温度/℃	提取溶剂	零阶常数		一阶常数		
		k_0	R^2	k_1	R^2	$t_{1/2d}$
4	二氯甲烷	-0.008 6	0.985 9	-0.062 2	0.975 9	11.14
	甲醇	-0.006 5	0.989 7	-0.135 2	0.984 9	5.13
	MAA	-0.001	0.926 7	-0.035	0.977	19.80
	MPA	-0.001 4	0.930 5	-0.034	0.969 6	20.39
	MVA	-0.001	0.972 2	-0.024 2	0.993 9	28.64
	MOA	-0.000 7	0.942 1	-0.019 8	0.938 4	35.01
25	二氯甲烷	-0.009 8	0.958 0	-0.008 0	0.907 0	8.66
	甲醇	-0.007 2	0.996 5	-0.155 8	0.984 0	4.45
	MAA	-0.002 3	0.854	-0.077 3	0.942 5	8.97
	MPA	-0.001 4	0.979 9	-0.068 9	0.986 6	10.06
	MVA	-0.002 2	0.925 6	-0.059 2	0.943 3	11.71
	MOA	-0.001 2	0.961 6	-0.040 5	0.989	17.11
50	甲醇	-0.001 8	0.877 0	-0.191 2	0.968 4	3.63
	MAA	-0.002 3	0.662 7	-0.100 2	0.934 1	6.92
	MPA	-0.002 1	0.061 9	-0.093 7	0.628 9	7.40
	MVA	-0.001 3	0.817 2	-0.08	0.955 7	8.66
	MOA	-0.002	0.825 4	-0.065 7	0.948 6	10.55

表 3 虾青素的浓度与颜色参数的关系

Table 3 Relationship of the astaxanthin concentration and color parameters

温度/℃	提取溶剂	拟合方程	R^2
4	二氯甲烷	$y=0.130\ 11+0.004\ 1L^*-0.004\ 72a^*-2.35\ 068E-4b^*$	0.942 3
	甲醇	$y=-0.300\ 19+0.005\ 4L^*-0.011\ 43a^*+0.001\ 22b^*$	0.883 4
	MAA	$y=0.163\ 34-0.001\ 71L^*-6.001\ 71E-5a^*+2.877\ 01E-4b^*$	0.981 3
	MPA	$y=0.081\ 5-0.001\ 33L^*+0.001\ 36a^*+2.580\ 24E-4b^*$	0.923 3
	MVA	$y=0.101\ 21-4.613\ 73E-4L^*+0.003\ 96a^*-0.002\ 06b^*$	0.976 6
	MOA	$y=-0.070\ 28+4.935\ 54E-4L^*+8.901\ 85E-4a^*+8.886\ 6E-4b^*$	0.867 5
25	二氯甲烷	$y=0.02101+0.00388L^*+5.00608E-4a^*-0.00169b^*$	0.954 5
	甲醇	$y=0.396\ 78-0.003\ 88L^*-0.002\ 13a^*+1.993\ 55E-4b^*$	0.949 7
	MAA	$y=0.121\ 9-0.001\ 89L^*-0.001\ 61a^*+0.001\ 57b^*$	0.918 3
	MPA	$y=-0.087\ 99+4.879\ 48E-4L^*+0.001\ 56a^*+6.148\ 89E-4b^*$	0.940 2
	MVA	$y=-0.066\ 67+2.520\ 72E-5L^*+0.001\ 43a^*+7.214\ 09E-4b^*$	0.978 4
	MOA	$y=0.011\ 25-4.048\ 05E-4L^*+8.223\ 06E-4a^*+5.252\ 8E-4b^*$	0.986 7
50	甲醇	$y=-0.001\ 6L^*+0.003\ 19a^*-4.383\ 06E-4b^*$	0.984 1
	MAA	$y=-0.147\ 72+0.001\ 5L^*+6.090\ 48E-4a^*+7.324\ 35E-4b^*$	0.895 0
	MPA	$y=-0.098\ 59+8.789\ 01E-4L^*-6.897\ 35E-5a^*+8.806\ 03E-4b^*$	0.923 3
	MVA	$y=0.150\ 16-0.001\ 62L^*-1.082\ 51E-4a^*-8.545\ 79E-5b^*$	0.989 5
	MOA	$y=-0.008\ 15-5.418\ 71E-6L^*-3.647\ 87E-4a^*+8.843\ 02E-4b^*$	0.977 7

2.5 提取残渣对染料的吸附

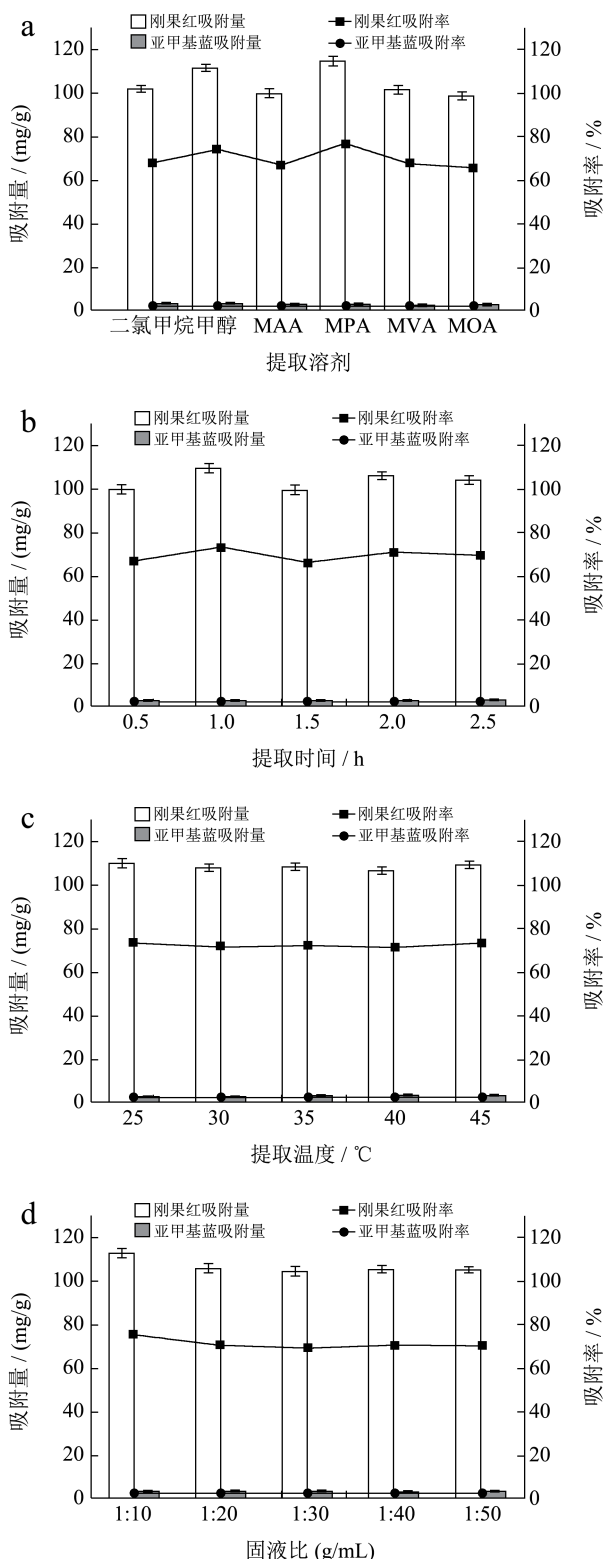


图7 残渣对刚果红及亚甲基蓝染料的吸附量和吸附率
Fig.7 Adsorption capacity and adsorption rate of residue to Congo red and methylene blue

为了实现虾壳的综合利用,进一步研究了提取后虾壳残渣作为生物吸附剂用于吸附化学染料(阴

离子、阳离子染料)的吸附效果。从图7中可以看到,各单因素虾壳残渣对刚果红染料去除率平均可达70%左右,而亚甲基蓝染料的吸附率很低,平均为2%,提取后虾壳残渣中主要成分为甲壳素,甲壳素含有乙酰氨基和少量氨基,酸性较强的条件下易质子化而带正电荷,对阴离子类的染料具有更强的静电作用,因此对水中的刚果红染料呈现出更有吸附能力^[37-39]。由图8可以看出,未处理的南极磷虾壳表面光滑,呈现致密的多层结构。酸性低共熔液对虾壳具有较强的浸润能力,处理后南极磷虾壳发生不同程度的弯曲和断裂,多层结构的完整性受到严重破坏,主要呈现凹凸不平的片状层叠和多孔结构,增大了虾壳的比表面积,因此可作为一种潜在的生物吸附剂。

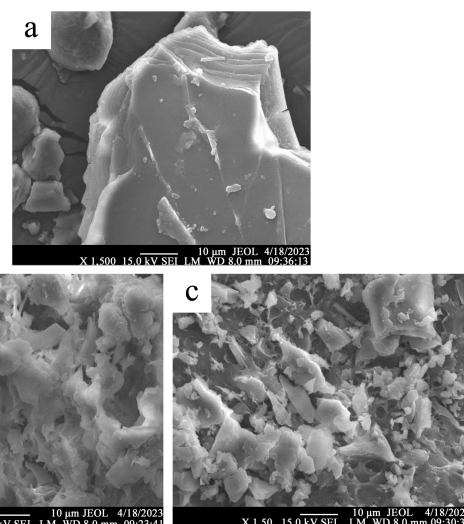


图8 虾壳提取前后的扫描电镜微观结构图(×1500)
Fig.8 Sem microstructure of shrimp shell before and after extraction (×1500)

注: a 为未处理, b 为 MAA 提取, c 为 MPA 提取。

3 结论

本文采用的4种酸性 DESs 作为萃取体系从南极磷虾壳中提取虾青素的效率高、循环性能佳,可以显著增强虾青素的稳定性和抗氧化活性,虾青素在 MAA 中的抗氧化活性和提取效果最强,在 MOA 中的稳定性最佳。虾青素的提取液的色差值与虾青素浓度均呈现良好的线性关系,可以通过检测色差参数监测贮藏期间虾青素的稳定性。此外酸性 DESs 可以破坏虾壳的致密组织,形成多孔疏松的结构,对阴离子型染料的吸附效果较优,对阳离子型染料有一定吸附性能,是一种经济高效的染料废水吸附材料。将来应探索可兼容提取效果、稳定性、

抗氧化为一体的萃取系统,多领域应用提取残渣,以进一步实现虾壳的综合利用、推进虾加工行业的绿色经济、环境友好的高质量发展。

参考文献

- [1] BABALOLA J A, LANG M, GEORGE M, et al. Astaxanthin enhances autophagy, amyloid beta clearance and exerts anti-inflammatory effects in *in vitro* models of Alzheimer's disease-related blood brain barrier dysfunction and inflammation [J]. *Brain Research*, 2023, 1819: 148518.
- [2] REN P F, YU X Y, YUE H, et al. Dietary supplementation with astaxanthin enhances anti-tumor immune response and aids the enhancement of molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma [J]. *Food & Function*, 2023, 14(18): 8309-8320.
- [3] HE W, WANG H, TANG C, et al. Dietary supplementation with astaxanthin alleviates ovarian aging in aged laying hens by enhancing antioxidant capacity and increasing reproductive hormones [J]. *Poultry Science*, 2023, 102(1): 102258.
- [4] 孙伟红.不同来源虾青素的分离制备及其构效关系研究[D].青岛:中国海洋大学,2016.
- [5] FANG N, WANG C, LIU X, et al. De novo synthesis of astaxanthin: From organisms to genes [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 92(10): 162-171.
- [6] XUEJIAO, CHEN, QIXING, et al. Recovery of chitin from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) shell waste by microbial deproteinization and demineralization [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2017, 26(10): 1210-1220.
- [7] 钱建瑛,王雨露,李恒,等.利用沼虾废弃物制备富含虾青素的食用油和虾露调味液的工艺研究[J].*中国调味品*, 2022,47(11):99-104.
- [8] 李念,陈露珠,安鑫,等.三种虾壳中虾青素提取工艺优化及其抗氧化活性比较[J].*上海海洋大学学报*,2022, 31(1):298-308.
- [9] 孙兆远,侯会绒,孔令伟.结合型虾青素酶法水解工艺的研究[J].*食品研究与开发*,2017,38(12):35-39.
- [10] MBOUS Y P, HAYYAN M, HAYYAN A, et al. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-Promises and challenges [J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(2): 105-134.
- [11] ZHANG H, TANG B, ROW K H. A green deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted method to extract astaxanthin from shrimp byproducts [J]. *Analytical Letters*, 2014, 47(5): 742-749.
- [12] LEE Y R, ROW K H. Comparison of ionic liquids and deep eutectic solvents as additives for the ultrasonic extraction of astaxanthin from marine plants [J]. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*, 2016, 39: 87-92.
- [13] PITACCO W, SAMORÌ C, PEZZOLESI L, et al. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with hydrophobic deep eutectic solvents based on oleic acid [J]. *Food Chemistry*, 2022, 379: 132156.
- [14] CHENG W, XIAN F, ZHOU Z, et al. Solubility and stability of carotenoids in ammonium-and phosphonium-based ionic liquids: Effect of solvent nature, temperature and water [J]. *Molecules*, 2023, 28(8): 3618.
- [15] ABBOTT A P, CAPPER G, DAVIES D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chemical Communications*, 2003, 1: 70-71.
- [16] LI Y, HU K, HUANG C, et al. Improvement of solubility, stability and antioxidant activity of carotenoids using deep eutectic solvent-based microemulsions [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 217: 112591.
- [17] WANG S, MENG Y, LIU J, et al. Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using DMSO extraction and lipase-catalyzed hydrolysis pretreatment [J]. *Algal Research*, 2018, 35: 427-431.
- [18] LEE W J, TAN C P, SULAIMAN R, et al. Storage stability and degradation kinetics of bioactive compounds in red palm oil microcapsules produced with solution-enhanced dispersion by supercritical carbon dioxide: A comparison with the spray-drying method [J]. *Food Chemistry*, 2020, 304: 125427.
- [19] BORBA C M, TAVARES M N, MACEDO L P, et al. Physical and chemical stability of beta-carotene nanoemulsions during storage and thermal process [J]. *Food Research International*, 2019, 121: 229-237.
- [20] VEERURAJ A, LIU L, ZHENG J X, et al. Evaluation of astaxanthin incorporated collagen film developed from the outer skin waste of squid *Doryteuthis singhalensis* for wound healing and tissue regenerative applications [J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2019, 95: 29-42.
- [21] DAI L Q, YAO Z T, YANG W Y, et al. Crab Shell: A potential high-efficiency and low-cost adsorbent for dye wastewater [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2017, 26(8): 4991-4998.
- [22] DOTTO G L, SANTOS J M N, RODRIGUES I L, et al. Adsorption of methylene blue by ultrasonic surface modified chitin [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 446: 133-140.
- [23] 程婉婷,陈世钰,贤凤,等.酸性低共熔溶剂的理化特性及其与虾青素溶解度的相关性研究[J].*化学试剂*,2023, 45(2):106-113.
- [24] SHARAYEI P, AZARPAZHOOH E, ZOMORODI S, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of

- astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell [J]. Ultrason Sonochem, 2021, 76: 105666.
- [25] OMAR K A, SADEGHI R. Physicochemical properties of deep eutectic solvents: A review [J]. Journal of Molecular Liquids, 2022, 360: 119524
- [26] 魏荣男,沈建,谈佳玉,等.热处理对南极磷虾品质特性及虾粉得率的影响[J].海洋渔业,2018,40(2):235-241.
- [27] ZHAO T, YAN X, SUN L, et al. Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91: 354-361.
- [28] SAINI R K, KEUM Y S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments [J]. Food Chemistry, 2018, 240: 90-103.
- [29] AHMED F, LI Y, FANNING K, et al. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from [J]. Food Research International, 2015, 74: 231-236.
- [30] CAO J, SU E. Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry [J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 314: 127965.
- [31] SÁNCHEZ C A O, ZAVALETA E B, GARCÍA G R U, et al. Krill oil microencapsulation: Antioxidant activity, astaxanthin retention, encapsulation efficiency, fatty acids profile, *in vitro* bioaccessibility and storage stability [J]. LWT, 2021, 147: 111476.
- [32] NIAMNUY C, DEVAHASTIN S, SOPONRONNARIT S, et al. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 87(4): 591-600.
- [33] CHRISTOPHERSEN A G, JUN H, JØRGENSEN K, et al. Photobleaching of astaxanthin and canthaxanthin [J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1991, 192(5): 433-439.
- [34] ROCHA G A, FÁVARO-TRINDADE C S, GROSSO C R F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules [J]. Food and Bioproducts Processing, 2012, 90(1): 37-42.
- [35] YANG L, QIAO X, GU J, et al. Influence of molecular structure of astaxanthin esters on their stability and bioavailability [J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128497.
- [36] CHEN Y, SU W, TIE S, et al. Advances of astaxanthin-based delivery systems for precision nutrition [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 127: 63-73.
- [37] KLIMIUK E, FILIPKOWSKA, et al. The effect of pH and chitin preparation on adsorption of reactive dyes [J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2003, 12(5): 575-588.
- [38] 王鹏,戴亚东,张佳佳,等.低共熔溶剂制备虾壳基固体酸及其催化性能研究[J].功能材料,2022,53(12):12230-12236.
- [39] ZHOU N. Adsorption of Congo red from aqueous solution onto shrimp shell powder [J]. Adsorption Science & Technology, 2018, 36(5-6): 1310-1330.