

快速溶剂萃取-超高效液相色谱法测定螺旋藻中 β -胡萝卜素的含量

咸瑞卿, 李启艳, 刁飞燕, 王小兵, 胡德福
(山东省食品药品检验所, 山东济南 250101)

摘要: 本文采用快速溶剂萃取技术结合超高效液相色谱仪, 建立了一种快速提取和测定螺旋藻中 β -胡萝卜素含量的分析方法。利用单因素试验和正交试验对快速溶剂萃取法从螺旋藻中提取 β -胡萝卜素的工艺条件(萃取溶剂、温度、静态萃取时间和循环次数)进行优化, 结果表明最佳工艺为: 石油醚(30~60 °C)为萃取溶剂, 温度120 °C, 萃取时间5 min、静态循环3次。萃取液无需净化, 经稀释过滤后用Agilent Eclipse Pluse C18色谱柱(1.8 μ m, 2.1 mm \times 50 mm)分离, 以甲醇:乙腈(85:15)为流动相, 柱温为25 °C, 采用超高效液相色谱法, 利用二极管阵列检测器于450 nm波长处检测。结果表明: β -胡萝卜素在1~50 μ g/mL范围内呈良好线性关系, 相关系数0.999, 加标回收率为98.65~103.18%, 相对标准偏差为0.68~1.74%, 检测限为0.10 mg/kg。该方法简便、快速、准确、灵敏度高、重现性好, 适用于螺旋藻中 β -胡萝卜素的含量测定及质量评价。

关键词: 快速溶剂萃取; 超高效液相色谱; 螺旋藻; β -胡萝卜素

文章编号: 1673-9078(2014)3-239-243

Determination of β -Carotene in Spirulina by ASE-UPLC

XIAN Rui-qing, LI Qi-yan, DIAO Fei-yan, WANG Xiao-bing, HU De-fu
(Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan, 250101, China)

Abstract: A novel method has been developed for the rapid extraction and determination of β -Carotene in Spirulina by accelerated solvent extraction (ASE) coupled with ultra performance liquid chromatography (UPLC). The ASE parameters (extraction solvent, temperature, static time and cycles) were optimized by Single factor experiment and Orthogonal experiment design in order to maximize the extraction efficiency. The result showed that the optimum condition for extraction was as followed: petroleum ether (30~60 °C) as solvent, extraction temperature of 120 °C, extraction time of 5 min and static loop of three times. The ASE extract was then diluted and determined by UPLC on the Agilent Eclipse Pluse C18 column (1.8 μ m, 2.1 mm \times 50 mm) at 25 °C, using 85% CH₃OH-15% CH₃CN as mobile phase and a Diode array detector at 450 nm. The results showed that the linear ranges of β -Carotene was 1~50 μ g/mL with correlation coefficient higher than 0.999. The recoveries ranged from 98.65% to 103.18% with RSDs of 0.68~1.74% and the limit of detection was 0.10 μ g/kg. The method was simple, rapid and accurate, with high sensitivity and reproducibility, which was suitable for the determination of β -Carotene in Spirulina.

Key words: accelerated solvent extraction; ultra performance liquid chromatography; Spirulina; β -Carotene

螺旋藻是一种营养成分丰富的微型蓝藻, 被联合国粮农组织(FAO)誉为“21世纪最佳的理想食品”, 也被世界卫生组织评为“人类21世纪的最佳保健品”^[1]。它不仅含有高蛋白、多糖、氨基酸、矿物质、不饱和脂肪酸等, 而且富含多种维生素, 特别是 β -胡萝卜素的含量是一般植物的十几至几十倍。 β -胡萝卜素是一种重要的营养添加剂和天然色素, 不仅具有维生素A的生物活性, 而且在增强免疫、预防心血管和退化性疾病、抗癌及抗氧化上都有显著的功效^[2-3]。 β -胡萝卜素是螺旋藻类产品的主要功效成分之

收稿日期: 2013-10-20

作者简介: 咸瑞卿(1981-), 男, 主管药师, 研究方向食品保健品检测

通讯作者: 胡德福(1962-), 男, 主任药师, 研究方向食品保健品检测

一, 但在日常检验工作发现螺旋藻产品中 β -胡萝卜素的含量差异非常大, 而且不合格产品较多, 因此检测其含量是控制螺旋藻产品质量的重要方法。目前食品中 β -胡萝卜素多采用常规浸泡法提取, 需用有机溶剂反复提取至提取液无色, 提取液经浓缩后利用氧化铝层析柱净化^[4]。但对于存在大量叶绿素干扰的螺旋藻类样品, 该方法不易判断提取终点, 有机溶剂消耗量大, 提取效率较低, 操作繁琐。 β -胡萝卜素测定以反相高效液相色谱法检测为主^[5-6], 但普遍存在流动相及洗脱程序复杂、与其它类胡萝卜素分离差、分析时间较长等问题。因此开发建立一种快速、可靠、低消耗的 β -胡萝卜素检测方法是加强螺旋藻类产品监管的迫切需求。

快速溶剂萃取技术(ASE)是近年来发展起来的一

种低耗、高效的样品前处理方法,其主要原理是通过高温(50~200 °C)及高压(1000~3000 psi)来破坏溶剂和基质之间的范德华力、氢键和偶极矩,增加物质溶解度和溶质扩散效率,以提高提萃效率。与常用的索氏提取、超声提取、微波萃取技术等方法相比具有耗时少、消耗溶剂少、提取效率高、安全性高及自动化程度高等优点^[7]。ASE方法的开发优化是当前食品检测、药物分析、环境监测等领域的研究热点,有着广阔的应用前景^[8-10]。利用ASE技术快速提取螺旋藻中β-胡萝卜素的方法国内尚未见报道。我们利用单因素试验和正交试验优化了从螺旋藻中提取β-胡萝卜素的快速溶剂萃取工艺,极大提高了样品前处理效率,节约溶剂,同时优化了超高效液相色谱法测定β-胡萝卜素的色谱条件,缩短了分析时间、提高了准确性和灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1 290超效液相色谱仪带二极管阵列检测器; Thermo Fisher ASE-350 快速溶剂萃取仪配10 mL萃取池; Mettler Toledo MS 电子天平; 石油醚(30~60 °C)、丙酮、正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷均为分析纯,使用前超声脱气; 甲醇、乙腈、三氯甲烷均为色谱纯; α-胡萝卜素、β-胡萝卜素标准品(Sigma)。

1.2 β-胡萝卜素标准溶液的配制

精密称取β-胡萝卜素标准品适量,加少量三氯甲烷溶解,石油醚定容,配制成浓度为250 μg/mL标准储备液。精密量取标准储备液,以石油醚定容,配制浓度分别为1.0、10.0、20.0、30.0、50.0 μg/mL的β-胡萝卜素标准溶液,临用前配制。

1.3 样品制备

称取均匀试样1.00 g与等量硅藻土混匀,置于萃取池内,以1.4.1项下萃取条件进行萃取。萃取液用石油醚(30~60 °C)稀释至25 mL,经0.22 μm滤膜过滤后供测定用。

1.4 实验条件

1.4.1 快速溶剂萃取条件

萃取溶剂: 石油醚(30~60 °C); 萃取温度: 120 °C; 静态循环时间: 5 min; 静态循环次数: 3次; 萃取池内压力: 1500 psi; 吹扫时间: 60 s; 冲洗体积: 50%; 仪

器所用气体均为高纯氮。

1.4.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Pluse C18柱(1.8 μm, 2.1 mm×50 mm); 流速: 0.3 mL/min; 流动相: 甲醇-乙腈(85:15), 柱温: 25 °C; 进样量: 2 μL; DAD检测器扫描范围: 300~650 nm; 检测波长: 450 nm。

1.5 数据分析

每个实验重复三次,采用方差分析的方法对数据进行分析,评价各个实验因素对实验结果影响的差异性,确定最优组合提取条件。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 萃取溶剂的选择

根据β-胡萝卜素性质脂溶性的特点,优选常用提取溶剂石油醚(30~60 °C)、丙酮、正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷进行提取。分别取均匀试样1.00 g与等量硅藻土混匀,置于萃取池内,在温度120 °C,静态循环1次,萃取时间5 min的固定条件下分别用上述溶剂萃取,测定萃取液中的β-胡萝卜素含量,计算β-胡萝卜素得率,实验结果如图1所示: 提取溶剂为石油醚时得率最高,所以提取溶剂优选石油醚。

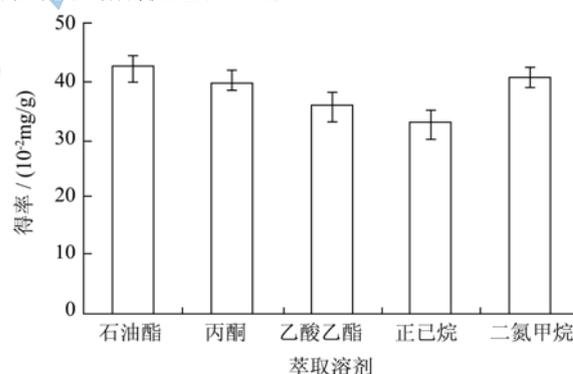


图1 提取溶剂对β-胡萝卜素得率的影响

Fig.1 Effect of solution on extraction

2.1.2 萃取温度的影响

分别取均匀试样1.00 g与等量硅藻土混匀,置于萃取池内,石油醚为萃取溶剂,静态循环1次,静态萃取时间为5 min的固定条件下,分别在80、100、120、140、160 °C进行萃取,测定萃取液中的β-胡萝卜素含量,计算β-胡萝卜素得率,实验结果见图2: 在120 °C时,得率最高。但随着温度的继续增加,得率则有所下降,这可能是由于β-胡萝卜素在高温下易被分解的缘故。因此,萃取温度120 °C最为合适。

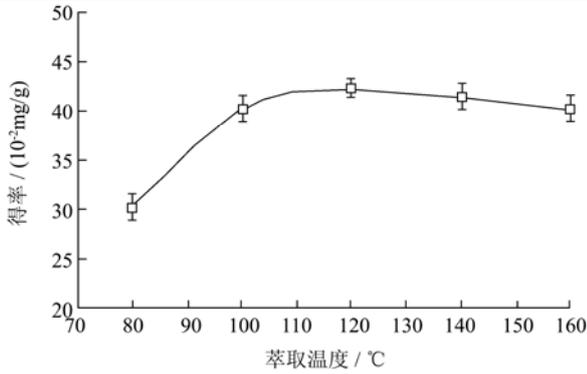


图2 萃取温度对β-胡萝卜素得率的影响

Fig.2 Effect of temperature on extraction

2.1.3 静态循环时间的影响

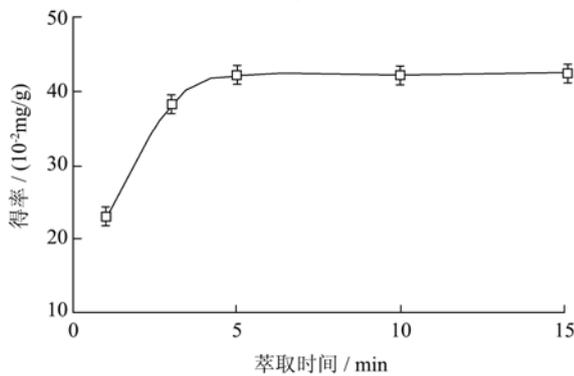


图3 萃取时间对β-胡萝卜素得率的影响

Fig.3 Effect of time on extraction

分别取均匀试样1.00 g与等量硅藻土混匀，置于萃取池内，石油醚为萃取溶剂，在温度120℃，静态循环1次的固定条件下，静态萃取时间分别在1、3、5、10、15 min进行萃取，测定萃取液中的β-胡萝卜素含量，计算β-胡萝卜素得率，实验结果见图3：β-胡萝卜素得率随着时间增加而增加，在5 min的时候达到最大值，但随着时间继续加长，得率变化不明显，5 min左右为最佳萃取时间。

2.1.4 静态萃取次数的影响

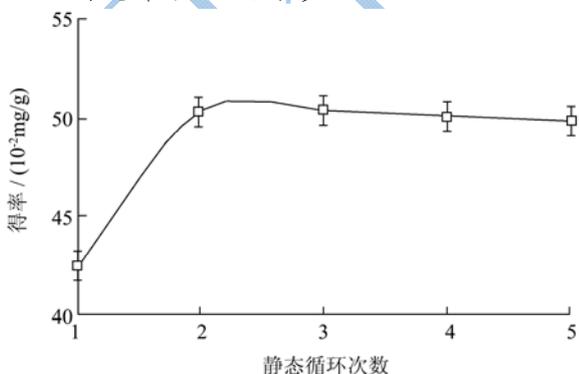


图4 萃取次数对β-胡萝卜素得率的影响

Fig.4 Effect of frequency on extraction

分别取均匀试样1.00 g与等量硅藻土混匀，置于萃取池内，石油醚为萃取溶剂，在温度120℃，静态萃

取时间5 min的固定条件下，分别萃取1、2、3、4、5次，测定萃取液中的β-胡萝卜素含量，计算β-胡萝卜素得率，实验结果见图4：静态循环2次即可达到较好的萃取率，继续增加循环次数得率未见显著改善。从效益方面来考虑，2~3次应为最佳提取次数。

2.2 正交试验

在单因素试验所得结果的基础上，选取萃取温度、静态萃取时间、静态循环次数等因素，设计了L₉(3⁴)正交试验，其因素水平见表1、正交试验结果见表2、3所示。

表1 正交试验设计因素水平表

水平	因素			
	A (萃取温度/°C)	B (静态萃取时间/min)	C (静态循环次数/次)	D (误差)
1	100	3	1	1
2	120	5	2	2
3	140	8	3	3

表2 正交试验结果

水平	因素				得率 / (10 ⁻² mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	41.82
2	1	2	2	2	42.08
3	1	3	3	3	42.99
4	2	1	2	3	49.08
5	2	2	3	1	50.85
6	2	3	1	2	49.12
7	3	1	3	2	46.85
8	3	2	1	3	45.72
9	3	3	2	1	45.80
k ₁	42.30	45.92	45.55	46.16	
k ₂	49.68	46.22	45.65	46.02	
k ₃	46.12	45.97	46.90	45.93	
R	7.38	0.30	1.35	0.23	

表3 正交试验各因素显著性分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	P值
A	81.8798	2	1043.0548	19	<0.05
B	0.1537	2	1.9580	19	>0.05
C	3.3604	2	42.8076	19	<0.05
D	0.0785	2	1	19	
误差	0	2			

由表3可知，与误差项比较，A因素（萃取温度）

和C因素(静态循环次数)均具有统计学意义($P < 0.05$), B因素(静态萃取时间)无统计学意义($P > 0.05$)。从试验结果的数据分析中可知,影响 β -胡萝卜素得率的主要顺序为萃取温度>静态循环次数>静态萃取时间,其中萃取温度的影响最为显著,静态萃取时间影响效果不明显,这可能与快速溶剂萃取法原本萃取时间就很短有关系,三因素的适宜组合为 $A_2B_2C_3$,即:石油醚为萃取液,温度 $120\text{ }^\circ\text{C}$,静态循环3次,萃取时间5 min,该结果与单因素实验结果得出的最优组合基本一致,因此综合考虑确定其为最佳组合。

2.3 色谱条件的优化

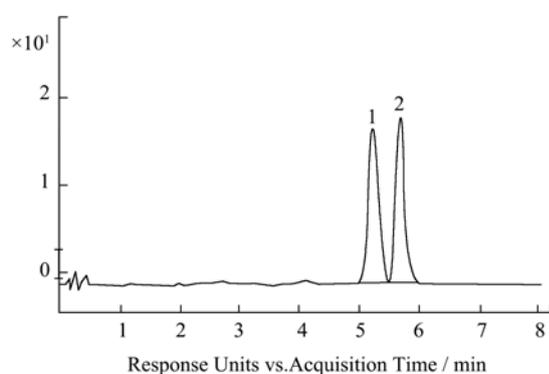


图5 α -胡萝卜素(1)与 β -胡萝卜素(2)标准品混合溶液色谱图(450 nm)

Fig.5 Chromatogram of α -Carotene(1) and β -Carotene(2) (450 nm)

因 β -胡萝卜素极性极小,且易被其他类胡萝卜素干扰,反相HPLC法测定多采用C18色谱柱和多组分流动相梯度洗脱,多存在分析时间长、有机试剂消耗量大、分离度差等问题。本实验采用超高效液相色谱法,以 α -胡萝卜素与 β -胡萝卜素的分离度、峰形及分析时间为指标,分别研究了乙腈-三氯甲烷、甲醇-乙腈-三氯甲烷和甲醇-乙腈等不同配比的流动相的色谱行为。试验结果表明:使用Zorbax Eclipse Plus C18色谱柱,在甲醇-乙腈(85:15)的体系下等度洗脱,即可满足分离度要求。对流速(0.2、0.3、0.4 mL/min)和柱温(20、25、30 $^\circ\text{C}$)考察发现:提高流速或柱温均可缩短分析时间,但都会导致 α -胡萝卜素与 β -胡萝卜素分离度降低。综合考虑分离度和分析时间,最终确定最佳条件为:流动相为甲醇-乙腈(85:15),流速0.3 mL/min,柱温 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。在此条件下峰型良好, α -胡萝卜素与 β -胡萝卜素分离完全(分离度1.5),且分析时间大大缩短,出峰情况见图5。利用DAD检测器在300~600 nm范围内进行扫描, β -胡萝卜素在450 nm和475 nm有特征吸收,且450 nm吸收最大,所以优选450 nm为检测波长。

2.4 线性范围和检出限

在设定的色谱条件下,对不同浓度标准系列溶液进行分析,实验结果表明,各组分的浓度与其峰面积呈良好的线性关系。以3倍信噪比确定最低检出限。线性范围、线性方程、相关系数及检出限见表3。

表4 线性范围、线性方程、相关系数和检出限

Table 4 Linear range, Regression equation, correlation coefficient and detection limits				
待测成分	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	线性方程	相关系数 R	检出限/(mg/kg)
β -胡萝卜素	1~50	$Y=50.004X-5.505$	0.9998	0.10

2.5 方法回收率试验

取3份平行样品,每份0.50 g,分别加入一定量的 β -胡萝卜素标准品,依法提取测定,结果见表4。结果表明方法回收率良好,测量结果可靠。

表5 加标回收率试验(n=3)

Table 5 Results of the recovery test (n=3)				
样品中含量/ μg	加入量/ μg	测定值/ μg	回收率/%	RSD/%
256	148	402	98.65	
261	148	408	99.32	0.68
259	148	404	97.97	
255	247	501	99.60	
256	247	505	100.81	0.84
260	247	505	99.19	
256	346	613	103.18	
259	346	604	99.71	1.74
261	346	610	100.87	

2.6 仪器精密度、稳定性和重复性试验

精密吸取 β -胡萝卜素标准溶液($20.0\text{ }\mu\text{g/mL}$) $2\text{ }\mu\text{L}$,在1.4节色谱条件下进行5次重复实验,在此方法下的色谱峰保留时间波动小于0.1 min,峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.42%,表明 β -胡萝卜素保留时间的精密度符合分析要求,实验结果准确可靠,仪器的精密度良好。

将1.3项下的供试品溶液,于室温下保存在棕色样品瓶内,分别在放置1、6、12、18、24、36、48、72 h后进样,其峰面积测定值的日内RSD为1.12%,日间RSD为10.25%。表明24 h内上述样品的稳定性较好,样品的日间检测结果差异较大。 β -胡萝卜素对光、温度、氧都比较敏感,因此应该在当日完成,如需隔日测定

必须保存在低温冰箱中,且测定前需恢复到室温以免影响样品的浓度。

取同一样品6份,按1.3项下处理方法处理后,分别进样2 μL ,以外标法测定其含量。结果表明:样品中 β -胡萝卜素含量的RSD为1.0%,表明该法重复性良好。

2.7 样品检测情况

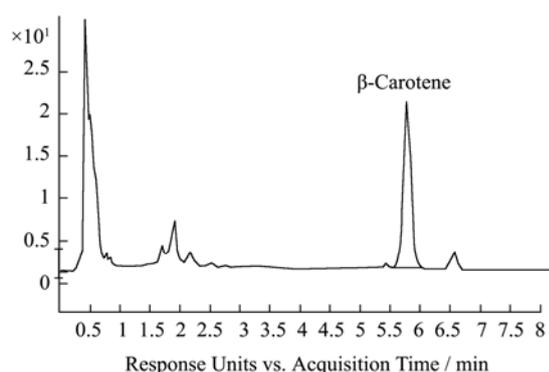


图6 典型样品的色谱图(450 nm)

Fig.6 Chromatogram of the sample (450 nm)

利用该方法对从市场抽样到的11批螺旋藻类保健食品(其中软胶囊1批,片剂10批)进行测定,典型样品的色谱图见图6。 β -胡萝卜素的含量范围为21.24~114.52 mg/100 g,参考企业标准的限值规定,3批样品不合格,不合格率27.3%。检测结果显示不同厂家、不同批次的螺旋藻类保健食品中 β -胡萝卜素含量差异较大,且不合格率较高,需加强对该类产品的监管。

3 小结

3.1 本文采用ASE方法提取螺旋藻中 β -胡萝卜素,优化的萃取工艺与传统的提取方法相比,前处理时间小于30 min,有机溶剂用量小于30 mL,能够节约超过80%的时间和有机溶剂消耗,在螺旋藻中 β -胡萝卜素的检测及开发应用中具有较强的实用价值。

3.2 UPLC有分离度高、检测灵敏度高、分析时间,节省流动相等优点。因为 β -胡萝卜素在C18色谱柱上保留很强,常规HPLC法测定保留时间长且与其它类胡萝卜素分离度低,利用优化的UPLC条件在保证分离度的前提,极大缩短了分析时间(6 min),节约了流动相,因此UPLC法是一种适合于 β -胡萝卜素测定的液相色谱方法。

参考文献

- [1] 曾文炉,蔡昭铃,欧阳藩.二十一世纪的理想食品-螺旋藻[J]. 生物工程进展,2001,21(5):29-35
ZENG Wen-lu, CAI Zhao-ling, OU Yang-fan, et al. The ideal nourishment resources for the next-century-The spirulina [J]. Progress In Biotechnology, 2001, 21(5): 29-35
- [2] Guedes A C, Amaro H M, Malcata F X. Microalgae sources of carotenoids [J]. Marine Drugs, 2011, 9: 625-644
- [3] 刘洪岩,辛乃宏. β -胡萝卜素的研究进展[J].盐业与化工, 2013, 42(1):18-21
LIU Hong-yan, XIN Nai-hon. Research Progress on β -Carotene [J]. Journal of Salt and Chemical Industry, 2013, 42(1): 18-21
- [4] GB/T 5009.83-2003 食品中胡萝卜素的测定[S]
- [5] 宋曙辉,薛颖.高效液相色谱法测定蔬菜中的类胡萝卜素[J]. 华北农学报,2001,16(3):92-97
SONG Shu-hui, XUE Ying. Determination of Carotinoids in Different Vegetables by High Performance Liquid Chromatography [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2001, 16(3): 92-97
- [6] Oliver J, Palou A. Chromatographic determination of carotenoids in foods [J]. Journal of Chromatography. A, 2000, 881: 543-555
- [7] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation [J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(6): 1033-1039
- [8] Pearson C H, Cornish K, Rath D J. Extraction of natural rubber and resin from guayule using an accelerated solvent extractor [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 43(5): 506-510
- [9] Cassazza A A, Aliakbarian B, Samntta E, et al. Highpressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47: 399-405
- [10] Paulius K, Petras R V, Audrius P, et al. Accelerated solvent extraction of lipids from Amaranthus spp. seeds and characterization of their composition [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 54(2): 528-535