

# 不同来源虾青素提取、纯化及定量检测方法的 研究进展

高 岩<sup>1,2</sup>, 邢丽红<sup>1</sup>, 孙伟红<sup>1\*</sup>, 吴旭干<sup>3</sup>, 祖 露<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部极地渔业开发重点实验室, 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 3. 上海海洋大学农业部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘 要:** 虾青素是一种较强的天然抗氧化剂, 能有效淬灭单线态氧和清除自由基, 减少氧化对组织细胞和 DNA 损伤的能力, 能有效防治相关的疾病, 还可用作鱼类和家禽饲料的添加剂, 改善皮肤和肌肉颜色、提高繁殖能力、增加营养及商品价值, 在饲料、食品、医药及化妆品等领域具有广泛的应用。天然虾青素存在于虾蟹外壳、牡蛎、鲑鱼及藻类和真菌中, 其存在形态和结构存在差异。由于虾青素有 3 种光学异构体、多种几何异构体, 且极易与脂肪酸结合形成虾青素单酯、虾青素双酯, 导致虾青素的结构复杂多样, 对虾青素的分析存在许多困难和挑战。本文从虾青素的结构、应用、破壁方法、提取纯化及定量检测方法等方面, 对不同来源的虾青素进行了概述, 以期对虾青素资源的深入研究和开发利用提供参考。

**关键词:** 虾青素; 破壁; 提取; 纯化; 定量检测

## Research progress on extraction, purification and quantitative detection methods of astaxanthin from different sources

GAO Yan<sup>1,2</sup>, XING Li-Hong<sup>1</sup>, SUN Wei-Hong<sup>1\*</sup>, WU Xu-Gan<sup>3</sup>, ZU Lu<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**ABSTRACT:** Astaxanthin is a strong natural antioxidant that can effectively quench singlet oxygen and scavenge free radicals, reduce the ability of oxidation to damage tissue cells and DNA, and effectively prevent oxidation-related diseases. Astaxanthin also can be used as an additive for fish and poultry feed to improve their skin and muscle color, improve reproduction ability, increase nutrition and commercial value, and has a wide range of applications in the fields of feed, food, medicine and cosmetics. Natural astaxanthin is found in shrimp and crab shells, oysters, salmon, algae and fungi, and its existence morphology and structure are different. And astaxanthin has 3 optical isomers, multiple geometric isomers, and is easily combined with fatty acids into astaxanthin monoesters and astaxanthin diesters, resulting in complex and diverse astaxanthin structures. Vulnerability analysis faces many difficulties and challenges. This paper summarized the astaxanthin from different sources in terms of the structure and

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1406805)

Fund: Supported by National Key Research and Development Program (2018YFC1406805)

\*通讯作者: 孙伟红, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为水产品安全性与质量控制。E-mail: sunwh@ysfri.ac.cn

\*Corresponding author: SUN Wei-Hong, Ph. D, Senior Engineer, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.106, Nanjing Road, Shinan District, Qingdao 266071, China. E-mail: sunwh@ysfri.ac.cn

application of astaxanthin, wall breaking methods, extraction and purification, and quantitative detection methods, in order to provide a reference for the in-depth research and development of astaxanthin resources.

**KEY WORDS:** astaxanthin; wall breaking; extraction; purification; quantitative detection

## 1 引 言

虾青素(3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- $\beta,\beta'$ -胡萝卜素, astaxanthin), 又名虾黄素、虾黄质, 是一种含氧类胡萝卜素衍生物, 分子式  $C_{40}H_{52}O_4$ , 分子量 596.86。在自然界中虾青素主要存在于虾蟹外壳、牡蛎、鲑鱼及藻类和真菌中<sup>[1]</sup>, 虾青素不但具有一般类胡萝卜素的化学性质, 还具有非常强的抗氧化活性, 虾青素的抗氧化活性是叶黄素、玉米黄质及  $\beta$ -胡萝卜素的 10 倍, 是维生素 E 的 100 倍, 因此被授予“超级维生素 E”的称号<sup>[2]</sup>。虾青素作为一种强的抗氧化剂不仅可以防止光老化、修复皮肤<sup>[3,4]</sup>、增强免疫力、预防心脑血管疾病等, 还可以作为食品着色剂和抗氧化剂<sup>[5]</sup>, 因此深受国内外食品、医药、化妆品等行业的关注。

本文对不同来源虾青素的结构及应用、提取纯化、检测方法进行了综述, 以期对不同来源虾青素的提取和检测提供依据。

## 2 虾青素

### 2.1 虾青素的结构及存在形式

虾青素结构中的碳骨架是由中央多聚烯链和位于两

侧的芳香环组成, 而且每个芳香环上各有 1 个羟基和 1 个酮基<sup>[6]</sup>, 虾青素的光学异构体见图 1。在虾青素 3 和 3'位置各有 1 个手性中心, 每个手性中心能够形成 S 或 R 结构, 因此可以形成 3 种光学异构体即 3S,3'S, 3R,3'R, 和 3S,3'R。不同来源虾青素的光学异构体比例不同。

虾青素结构中含有 11 个共轭双键和两个  $\beta$ -紫罗兰酮环, 其中 C=C 双键连接的基团排列方式多样, 因此具有多种顺式异构体和旋光异构体<sup>[7]</sup>。如图 2 所示, 合成虾青素和天然虾青素的几何异构体大多为全 E 结构<sup>[8]</sup>, 也存在其他顺式异构体: 9-Z、13-Z、15-Z。虾青素两端的羟基性质极其活泼, 容易与脂肪酸结合形成虾青素酯。根据结合的脂肪酸个数可以分为: 虾青素单酯、虾青素双酯。

综上所述, 虾青素根据其光学异构体、几何异构体、酯化程度和酯化与否可分为很多种。不同来源虾青素存在形式多样, 雨生红球藻主要以 3S,3'S 结构存在, 其所含虾青素均以酯化的形式存在, 并以单酯占多数<sup>[9]</sup>, 南极磷虾主要以 3R,3'R 型存在, 且大多以虾青素酯的形式存在<sup>[10]</sup>。红发夫酵母以酯化的 3R,3'R 结构存在, 人工合成虾青素异构体的 3R,3'R : 3R, 3'S : 3S,3'S 比例为 1 : 2 : 1<sup>[11]</sup>。

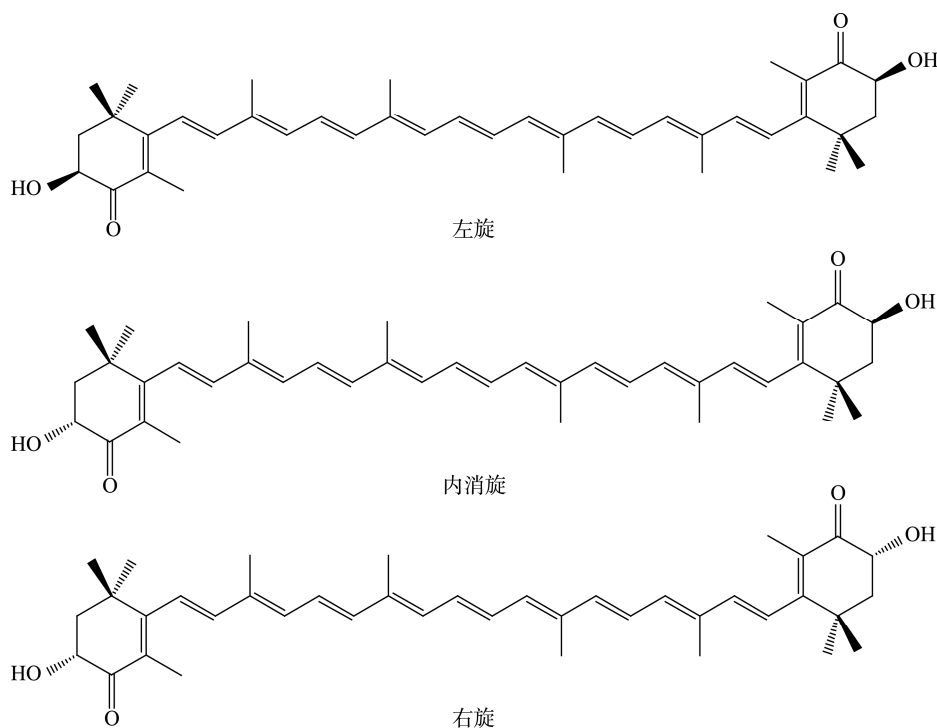


图 1 虾青素的光学异构体

Fig.1 Structure of astaxanthin stereoisomers

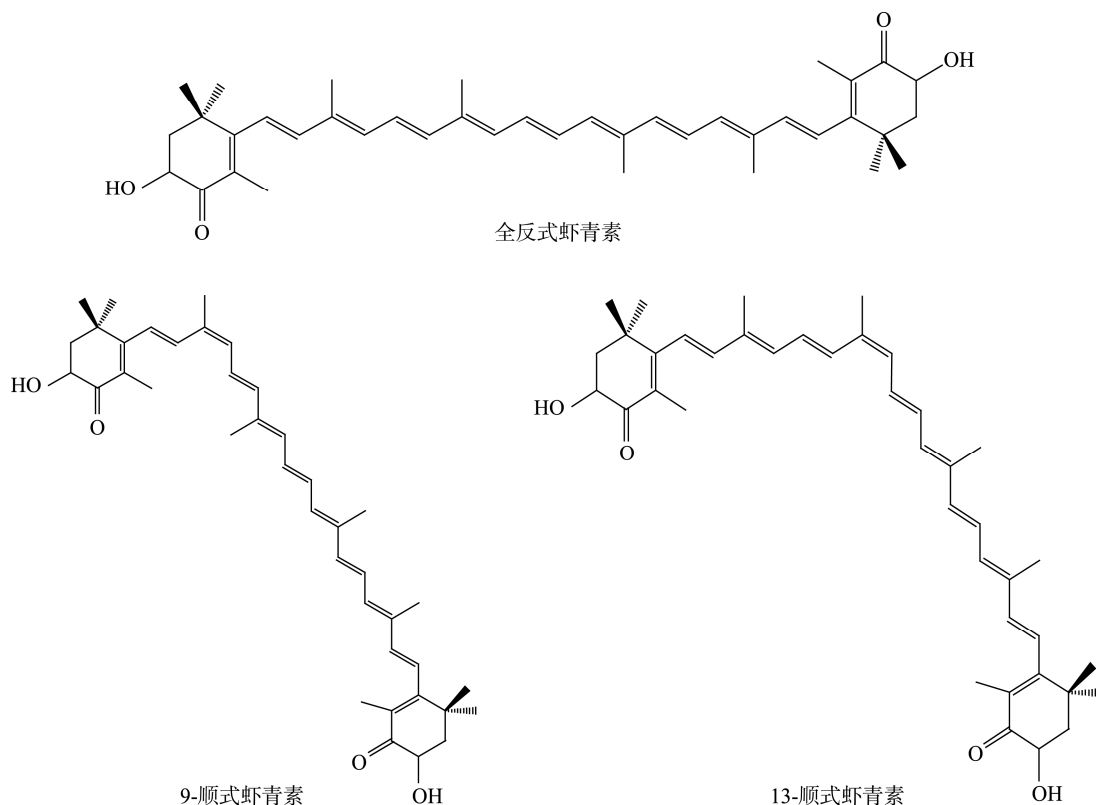


图 2 虾青素的几何异构体

Fig.2 Structure of astaxanthin geometric isomers

## 2.2 虾青素天然来源

天然虾青素按来源可分为微生物来源、天然藻源和各种水产动物: (1)微生物来源的虾青素主要来自红发夫酵母; (2)天然藻源的虾青素主要来自雨生红球藻, 它被公认为天然虾青素的最好生物来源<sup>[12]</sup>; (3)水产甲壳类动物如各种虾、蟹中, 三文鱼、鲑鱼等鱼类以含有虾青素的小虾等水生生物为食, 而使鱼肉呈现橘红色或粉红色。

## 2.3 虾青素的生物活性及应用

虾青素除了可以作为食品着色剂还具有抗氧化、抗癌, 抑制肾、肝等的纤维化等功能。虾青素是迄今为止人类发现自然界最强的抗氧化剂, 可清除紫外线照射产生的自由基, 降低光化学对生物体造成的伤害, 阻止皮肤的光老化, 其抗氧化活性是维生素 E 的 100 倍, 因此被授予“超级维生素 E”的称号。Qian 等<sup>[13]</sup>研究发现, 虾青素能抑制食管鳞状细胞癌; Liu 等<sup>[14]</sup>研究发现虾青素的立体异构体能抑制人结肠癌细胞生长<sup>[15]</sup>。Xie 等<sup>[15]</sup>利用虾青素来抑制人肾的纤维化; Maezawa 等<sup>[16]</sup>研究发现补充虾青素能抑制由氧化应激减弱固定化诱导的骨骼肌纤维化。因此, 虾青素在食品、医药、化妆品等行业具有广泛的应用前景。

## 3 不同来源虾青素的提取方法

虾青素的提取方法包括: 有机溶剂法、超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法、微波萃取法、碱提法、酶法。

雨生红球藻和红发夫酵母是自然界中生产天然虾青素的很好来源, 但由于它们细胞壁较厚, 不仅加大了从中提取虾青素的难度, 而且降低了虾青素的生物利用度, 因此在提取虾青素之前需对此进行破壁处理, 破壁效果的好坏直接影响到虾青素提取量的多少。

### 3.1 破壁方法

常用的虾青素破壁方法有: 机械破壁、生物酶解破壁和化学破壁等。

#### 3.1.1 机械破壁法

机械破壁法包括: 研磨法、高压均质法、超声波法、冻融温差法等, 前 2 种方法不仅在实验室被广泛采用, 由于其操作简便, 也比较适合在工业生产中应用, 但在破碎过程中易引起局部高温而导致虾青素氧化损失。周湘池等<sup>[17]</sup>对匀浆法、冻融温差法、直接研磨法、超声波法和低温研磨法进行了比较, 考察了破壁方法对雨生红球藻中虾青素提取率的影响, 认为液氮低温研磨法是雨生红球藻的较理想的破壁方法。欧阳琴等<sup>[18]</sup>考察了高压均质、超声

波法和冻融温差法等破壁方法对破壁率和虾青素提取率的影响, 认为高压均质法最适合雨生红球藻中虾青素的破壁提取。欧阳琴等<sup>[18]</sup>另有研究发现超声波能有效破除溶质中的细胞壁, 但随着超声波作用强度和作用时间的增加, 空化作用产生的强氧化性自由基增多, 从而导致虾青素的提取率下降, 此法在实验室规模应用较普遍, 处理少量样品时操作简便。

### 3.1.2 生物酶解破壁法

酶解提取法具有反应温度温和、污染少等方面的优点, 适合绿色工业化生产。但其耗时较长, 容易造成虾青素及其他类胡萝卜素的降解。蜗牛酶为细胞破壁的常用酶, 属于混合酶, 包括纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等 20 多种酶。张睿钦<sup>[19]</sup>采用 1% 的蜗牛酶对雨生红球藻厚壁孢子进行了破壁研究, 37 °C 酶解 5 h 后破壁率几乎为 0, 认为是由于其孢子壁厚且结构紧密, 难被蜗牛酶分解。此外, 酶法破壁后还会增加后续分离的难度。周锦珂等<sup>[20]</sup>利用纤维素酶催化分解破坏雨生红球藻细胞壁结构, 然后采用乙醇萃取虾青素。结果表明, 酶解提取法的最佳工艺条件为: pH 值设为 4.5、酶解温度为 45 °C、酶的添加量为 1.5%、酶解时间为 15 h。该条件下虾青素的提取率为 94.6%, 比直接采用乙醇提取的方法高 61.5%。Zhao 等<sup>[21]</sup>比较了经纤维素酶和果胶酶预处理后的雨生红球藻的虾青素分离产率。研究发现, 果胶酶预处理后的雨生红球藻中虾青素的释放率显著高于纤维素酶( $P < 0.05$ ), 酶水解时间也较短。在溶酶系统中, 产物抑制是一个不容忽视的问题, 比如甘露糖对蛋白酶有抑制作用, 葡萄糖抑制葡聚糖酶。产物抑制可能是导致胞内物质释放率低的一个重要因素, 所以今后的研究中, 解决这一问题也将是使酶法破壁提取虾青素运用于工业生产的关键之一。

### 3.1.3 化学破壁法

酸解和碱解也用于雨生红球藻的破壁处理, 破壁效果较好且成本低廉, 但会存在溶剂残留毒性, 且在一定程度上引起类胡萝卜素的降解。任晓丽等<sup>[22]</sup>探讨了不同破壁方法对雨生红球藻中虾青素提取的影响, 结果表明, 酸解和酶解处理能够显著提高类胡萝卜素的提取效率, 且碱解处理能水解酯化虾青素, 使得游离虾青素含量显著提高, 同时细胞内的甘油三酯也发生明显降解。倪辉等<sup>[23]</sup>从酸的种类、酸的浓度、液料比、破壁温度及时间等方面来评价酸法破壁在红发夫酵母虾青素提取中的应用价值, 结果表明, 乳酸比盐酸和醋酸更适合用于红发夫酵母的破壁处理; 酸的浓度、破壁温度等因素对虾青素的提取得率影响较大, 而酸处理时间和液料比对虾青素的提取得率影响不大。卢宝驹等<sup>[24]</sup>研究在高温湿热条件下, 低浓度盐酸对红发夫酵母破壁而提取其胞内虾青素的工艺, 研究发现在饱和蒸汽压 0.1 MPa (121 °C), 盐酸浓度 0.5 mol/L, 液料比(V/W)30 mL/g, 破壁时间 2 min 条件下, 虾青素的提取率为(84.8±3.2)%。

二甲基亚砜是一种既溶于水又溶于有机溶剂的极性溶剂, 是一种良好的渗透增强剂, 也常用于红发夫酵母的破壁处理。由于红发夫酵母的细胞壁由糖蛋白等成分组成, 且有研究发现二甲基亚砜可以进入细胞使溶于其中的蛋白变性<sup>[25]</sup>, 因此二甲基亚砜可以使红发夫酵母的细胞壁结构遭到破坏, 将虾青素很好地溶解出来。另外, 二甲基亚砜破壁对虾青素的结构破坏极小<sup>[26]</sup>。黄莹等和张琇等都利用二甲基亚砜对红酵母破壁实验, 结果表明, 其破壁效果好, 对虾青素本身的破坏作用较小<sup>[26,27]</sup>。化学破壁法由于存在溶剂残留问题, 提取出来的虾青素很难应用于食品及医药工业中。

### 3.1.4 破壁新技术

目前, 已经开发了各种现代提取方法用于提取活性组分, 例如脉冲电场(pulsed electric field, PEF)、高压微流化(high-pressure microfluidisation, HPMF)、离子液体(ionic liquids, ILs)等新兴技术。PEF 的应用可能通过细胞膜的瞬时透化和细胞区室之间带电物质的电泳运动而对细胞造成致命性损伤或诱导亚致死应激。已有一些学者研究利用 PEF 从微藻中提取不同有价值化合物。HPMF 是一种新兴技术, 用于乳状液的高速冲击、强剪切、瞬时降压、高频振动、气蚀和超高压(高达 200 Mpa), 大分子的改性和生物活性成分的提取<sup>[28]</sup>。与传统的高压均质相比, HPMF 具有不同的阀, 腔室设计和更高的工作压力。ILs 由松散保持的阳离子和阴离子组成, 其特征在于可忽略的蒸气压、低熔融温度、优异的热稳定性和化学稳定性。此外, 由于其溶解纤维素的高容量, Choi 等<sup>[29]</sup>研究了离子液体混合物对小球藻脂质提取的影响, 结果表明, ILs 是一种可用于回收小球藻中脂质和蛋白质的新型细胞破碎技术。Aadil 等<sup>[30]</sup>比较了从雨生红球藻中提取虾青素的细胞壁破坏的各种技术 PEF, 超声(ultrasound, US)、HPMF、HCl 和 ILs 的效率。结果表明, ILs、HCl 和 HPMF 处理对细胞破坏最有效, 虾青素提取率超过 80%, PEF 和 US 对细胞壁的破坏效率较低。与传统破壁技术相比, PEF、HPMF 和 ILs 等新兴破壁技术, 对虾青素影响较小, 实验过程中所用溶剂较少, 耗时短、节能环保。

## 3.2 虾青素的提取方法

### 3.2.1 溶剂提取

虾青素为脂溶性色素, 溶剂的选择既要考虑到虾青素的溶解度, 又要考虑它的极性, 极性太弱不利于溶剂向细胞内渗透。常用的有机溶剂有二氯甲烷、氯仿、二甲基亚砜、甲醇、丙酮等。当单一溶剂提取效果不理想时, 几种溶剂联合使用可以增大提取效率。邢涛等<sup>[31]</sup>从雨生红球藻中提取虾青素, 最佳工艺为: 以乙酸乙酯作为提取溶剂, 料液比为 1 : 10, 在 45 °C 下提取 180 min, 虾青素得率为 98.51%。华晓曼等<sup>[32]</sup>从红发夫酵母中提取虾青素, 以二甲基亚砜为提取溶剂, 在浸提温度 40 °C 条件下, 浸提 30 min,

虾青素提取量最大。张晓燕等<sup>[33]</sup>以二氯甲烷为提取溶剂提取南极磷虾壳中的虾青素,最佳工艺条件是料液比为 1:5(g/mL)、提取温度为 30 °C、提取时间为 7 h,提取级数为 2 级。溶剂直接萃取的效果较好,但提取时间长,需要加以辅助技术,常与超声波萃取、超高压萃取、微波萃取等方法联用以提高萃取效率。然而丙酮和其他有机溶剂具有较低的沸点,挥发性和中等毒性,这可能在食品加工过程中同时引起安全和健康问题。

除了采用有机溶剂提取之外,近来有学者利用可切换的溶剂来从雨生红球藻中提取虾青素。可切换的溶剂是可以转换亲水亲油特性的一种特殊液体,在通入或者去除二氧化碳(即用低热量、惰性气体鼓泡)的情况下可逆地从一种形式切换到另一种形式,包括可转换亲水性溶剂(switchable hydrophilicity solvents, SHS)和可转换极性溶剂(switchable polar solvents, SPS),它们不挥发且不易燃,从而避免溶剂回收过程中的挥发或蒸馏。SHS 与水的混溶性是完全可逆的。Huang 等<sup>[34]</sup>通过利用一种 SHS: 二甲氨基环己烷,建立了从湿雨生红球藻中提取虾青素的新方法,提取效率达到 87.2%。史博文等<sup>[35]</sup>采用单因素以及正交试验优化了利用 SHS: 二甲氨基环己烷,从雨生红球藻中提取虾青素的工艺,在提取温度 35 °C,提取时间 24 h,提取料液比 1:20 g/mL 条件下,虾青素提取率最高,达到氯仿-甲醇提取的总虾青素含量的 85.48%。采用可切换的溶剂提取虾青素无需使用其他破坏细胞的试剂或高能耗设备,且溶剂系统通过除去 CO<sub>2</sub> 进行再循环利用,节能环保。

超分子溶剂萃取最近也被开发应用于雨生红球藻中虾青素的提取工艺中。超分子溶剂(supramolecular solvent, SUPRAS)由两亲性的纳米结构液体(例如,羧酸,烷醇,烷基硫酸盐和烷基酚)制成。其作为虾青素转移液相载体,具有多种功能,即提取、封装和稳定化。最近有研究表明与超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)相比,采用 SUPRAS 和纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carriers, NLC)组合(称为 SUPRAS-NLC)从雨生红球藻中提取虾青素更高效。使用 SUPRAS-NLC 回收的虾青素产量为(71±4)%。此外,这些 SUPRAS-NLCs 溶剂能够保持虾青素的抗氧化活性,并在 4 °C 下稳定长达 180 d<sup>[36]</sup>。

### 3.2.2 超临界 CO<sub>2</sub> 辅助提取

把气体压缩到临界点以上,使之成为超临界状态,此流体对溶质的溶解能力就会大大增强。超临界萃取(supercritical fluid extraction, SCF)技术就是利用超临界状态下的 CO<sub>2</sub> 具有气体和液体的双重特性,通过改变温度和压力来调整流体的性质,从而对样品中的目标物质进行萃取的方法。有学者发现在研究液体或固体物质在超临界流体中的溶解度时发现,如果向纯溶质和超临界 CO<sub>2</sub> 所组成的二元体系中加入第 3 组分即夹带剂,结果可以改变原来溶质的溶解度,从而获得更好的提取效果。

邹书慧<sup>[37]</sup>探究了超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取中夹带剂、萃取温度、萃取压力、分离温度及分离压力几个因素对雨生红球藻中虾青素萃取的影响,并通过单因素实验确定了虾青素最佳提取工艺条件:萃取压力为 35 MPa,萃取温度为 35 °C,夹带剂为等体积混合的甲醇与丙酮溶液,分离釜的压力为 5 MPa,温度为 25 °C。翁婷等<sup>[38]</sup>从萃取温度、萃取压力和夹带剂用量优化了超临界 CO<sub>2</sub> 萃取南极磷虾中虾青素的工艺条件。Krichnavaruk 等<sup>[39]</sup>,以 70 °C,40 MPa,3 mL/min,在无夹带剂的条件下提取雨生红球藻中的虾青素,提取率为(25.40±0.79)%,而在 10%大豆油做夹带剂,最高提取率达到(36.36±0.79)%。此外,选用了橄榄油、大豆油和乙醇 3 种不同的夹带剂进行实验,结果显示添加 10%橄榄油作夹带剂的提取率最高。Cheng 等<sup>[40]</sup>在微流体反应器中用低压超临界 CO<sub>2</sub> 法提取破碎的雨生红球藻中的虾青素,并通过光学通道实时监控萃取过程,发现使用橄榄油和乙醇助溶剂,在 8 MPa 下以 30 s 的速度可以完成近乎完全(约 98%)的虾青素的提取比未使用助溶剂要快 1800 倍。

### 3.2.3 负压空化法

采用负压手段产生气流形成气泡,在气液固三相中强化传质的方法叫负压空化法。其原理是利用负压空化气泡产生强烈的空化效应和机械振动,造成目标物颗粒细胞壁快速破裂,胞内物质被释放;同时负压空化效应使细胞膜和细胞壁的通透性加大,提取溶剂得以瞬间进入,大大促进胞内物质向介质释放、扩散和溶解过程,从而使提取过程在极短时间内完成,是一种全新的提取方法,可在不破碎细胞的前提下,一部完成虾青素的提取。

刘莉娜<sup>[41]</sup>首次运用负压空化提取法成功解决了红发夫酵母鲜物料在不破碎细胞壁的前提下进行提取的难题,大大降低了生产成本,简化了生产工艺。徐竞等<sup>[42]</sup>通过正交试验确定了负压空化法提取虾壳中虾青素的最佳工艺参数:提取溶剂是浓度 80%的乙醇溶液,提取时间为 35 min,料液比为 1:20,通气量为 0.2 m<sup>3</sup>·h<sup>-1</sup>。

### 3.2.4 微波辅助提取法

微波辅助提取法是利用微波能进行物质萃取的一种新发展起来的技术,是使用适合的溶剂在微波反应器中从天然植物、矿物或动物组织中提取各种化学成分的技术和方法。微波可以使强极性分子溶剂产生瞬间极化,并以一定的频率做极性变换运动,使细胞破裂,从而使虾青素快速溶解出来。该方法快速高效、工艺简单、节省投资,可用于工业化生产。肖小华等<sup>[43]</sup>以水产品中的虾为原料,研究不同微波辅助萃取(microwave-assisted extraction, MAE)条件对虾青素萃取率的影响,结果表明,萃取温度、萃取时间和萃取溶剂对萃取效果影响较大;萃取温度既影响虾青素的萃取速率,也对其分解速率有明显影响。赵晓燕等<sup>[44]</sup>用变频微波法辅助萃取雨生红球藻中虾青素,实验最优条件为以混合有机溶剂为提取剂,液料比为 200:1、提取温

度为 45 °C, 提取 20 min, 在此条件下, 虾青素提取率为 36.88%。

### 3.2.5 超声波辅助提取法

超声波辅助提取的基本原理是利用超声波产生的空化、振动、粉碎、搅拌等综合效应, 造成细胞壁快速破裂, 达到提取细胞内容物的过程。该方法可以缩短提取时间和有效提高效率。齐计英等<sup>[45]</sup>采用响应面法优化雨生红球藻虾青素的超声提取工艺, 最佳工艺条件为超声功率 200 W、时间 30 min、超声提取温度 25 °C, 在此条件下提取率可达 1.045%, 与预测值 1.05%相近。徐煜等<sup>[46]</sup>优化了雨生红球藻中虾青素萃取工艺条件, 确定了超声波辅助提取虾青素的最佳工艺参数: 料液比 1:377, 超声时间 5.19 min, 超声波功率为 145 W, 虾青素含量实际测定值为 2.896%, 与预测值为 2.931%相近, 在该条件下, 雨生红球藻虾青素含量明显提高。

### 3.2.6 其他方法

尽管有机溶剂提取、超临界 CO<sub>2</sub> 辅助提取、负压空化等方法提取虾青素具有较高的提取率, 但由于酸碱、有机溶剂的残留, 限制了虾青素在食品、添加剂和药物等领域中的应用。因此, 开发使用无毒溶剂有效提取虾青素是有必要的。最近有学者利用液体双相浮选(liquid biphasic flotation, LBF)系统从雨生红球藻中提取虾青素。LBF 是一种气泡辅助分离系统, 结合了溶剂升华和液体双相系统的工作原理。液体双相系统由 2 个水相组成, 通过将目标化合物选择性吸附在气泡(例如氮气或氧气)上, 从而将目标化合物由一个相(例如, 富盐底部相)提取到另一相(例如, 有机溶剂相)中<sup>[47]</sup>。其中, 目标化合物在气泡上的吸附是基于化合物的表面活性和气泡的界面特性。Khoora 等<sup>[48]</sup>选用食品级的 2-丙醇和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 组成 LBF 系统, 从雨生红球藻中提取虾青素, 提取效率为(99.84±0.05)%。该方法经济有效、具有大规模提取天然虾青素的可行性且采用食品级原料, 可提高环境安全性及其在食品、制药和化妆品行业中的应用。

## 3.3 虾青素的分离纯化方法

经初步提取后的虾青素提取物含有低极性脂质、糖脂、有机酸碱或无机盐等多种杂质, 这些杂质不仅会影响虾青素的稳定性和色度, 也会对虾青素的分析检测造成干扰。纯化的目的就是将这些杂质去除, 使目标产物纯度最大化。目前常用的纯化方法有: 薄层层析法、柱层析法及高效液相色谱法。

### 3.3.1 薄层层析法

薄层层析法是以涂布于支持板上的支持物作为固定相, 以合适的溶剂为流动相, 对混合样品进行定性及定量分析、分离和鉴定的一种层析分离技术。在分析虾青素类化合物的过程中, 通常以硅胶和氧化铝作为固定相, 以石油醚、正己烷及丙酮等作为展开剂, 可快速实现游离虾青

素和虾青素单、双酯间的分离。丛心缘等<sup>[49]</sup>通过考察 11 种展开剂体系对不同形态虾青素的分离效果, 发现  $V(\text{正己烷}):V(\text{丙酮}):V(\text{乙酸})=8:2:0.2$  作为展开剂时, 分离的虾青素双酯、单酯及游离虾青素比移值(retention factor value, Rf) 值分别为: 0.86、0.70、0.47。

### 3.3.2 柱层析法

柱层析技术又称为柱色谱技术, 主要原理是根据样品混合物中各组分在固定相和流动相中分配系数不同, 经多次反复分配将组分分离开来。与其他纯化方法相比, 该方法操作简单、设备成本低廉, 分离纯化程度高。由于虾青素属于弱极性化合物, 与脂肪酸结合后的虾青素酯极性更小, 因此多采用硅胶为固定相, 以石油醚-乙酸乙酯或石油醚-丙酮作为洗脱体系, 分离极性存在差异的游离虾青素、虾青素单酯和虾青素双酯。杨磊等<sup>[50]</sup>采用连续中压硅胶柱层析纯化虾青素含量高于 20% 的红发夫酵母, 分离工艺条件为: 不锈钢中压层析柱装填 120~160 μm 层析硅胶, 以石油醚:1,2-二氯乙烷:丙酮(体积比)为 5:2.5:1 作洗脱剂, 负载量为 1:7, 可以得到纯度大于 97% 的虾青素产品, 平均回收率大于 60%。连续中压硅胶柱层析法与传统常压硅胶柱层析法相比, 有以下优点: 溶剂用量少、层析填料价格低、生产周期短、分离效果好宜于实现连续工业化生产。

### 3.3.3 高效液相色谱法

高效液相色谱法是用高压输液泵将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱, 经进样阀注入待测样品, 由流动相带入柱内, 在柱内各成分被分离后, 依次进入检测器进行检测, 从而实现对待样品的分析。反相-高效液相色谱法目前已经成为虾青素类化合物和类胡萝卜素分离必须使用的方法之一。其常以 C<sub>18</sub> 柱或 C<sub>30</sub> 柱作为固定相, 由于虾青素和虾青素酯是一系列极性相近的疏水性化合物, 因此疏水性较强的 C<sub>30</sub> 柱更能与虾青素类化合物有较强的相互作用, 分离虾青素酯效果更好。流动相常为甲醇-乙腈体系、甲醇-叔丁基甲醚体系等, 需要时常常加少量的酸或碱来改善峰的对称性。孙伟红等<sup>[51]</sup>将南极磷虾及其制品提取液皂化后, 采用 YMC-Carotenoid C<sub>30</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm,) 分离, 经甲醇、叔丁基甲醚和 1% 磷酸水溶液为流动相进行高效液相色谱法分析。

制备高效液相色谱法分离纯化虾青素是在传统的分析型高效液相色谱法的基础上发展起来的一种高效分离纯化技术, 该方法因简单易行、经济快速及纯度高等优势, 是制备天然产物的重要手段, 广泛应用于多种物质单体标准品的制备。杨成等<sup>[7]</sup>采用 Kinetex C<sub>18</sub> 半制备柱(5 μm, 250 mm × 10 mm), 以水-甲酸和乙腈-甲酸为流动相, 通过半制备高效液相色谱仪来分离纯化不同虾青素异构体, 纯化所得全反式虾青素的纯度为 92.9%, 9 顺-虾青素的纯度达 95.3%, 而 13 顺-虾青素的纯度达 91.8%。Yuan 和 Chen

等<sup>[52]</sup>采用半制备高效液相色谱法从 1 g 干的雨生红球藻细胞中得到 32.2 mg 反式-虾青素。

## 4 虾青素的定量检测方法

目前虾青素的检测方法有紫外-可见分光光度法 (ultraviolet-visible spectrophotometry, UV)、薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC)、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 及高效液相色谱-质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS)。

### 4.1 紫外-可见分光光度法

紫外-可见分光光度法是在 190~800 nm 波长范围内测定物质的吸光度, 用于鉴别、杂质检查和定量测定的方法。定量时, 在最大吸收波长处测量一定浓度样品溶液的吸光度, 并与一定浓度的标准品溶液的吸光度进行比较或采用吸收系数法求出样品溶液的浓度。由于虾青素类化合物在可见光区域内具有特征吸收, 因此可采用 UV 法定量。该方法简单快速、适用范围广、成本低, 但也存在一定的缺点。用分光光度法测定的虾青素含量要比高效液相色谱法偏高, 原因是: 除了虾青素之外, 其他类胡萝卜素如叶黄素、角黄素和  $\beta$ -胡萝卜素也可能被认为是虾青素。甚至, 叶绿素和一些没有任何健康益处的虾青素降解产物也被误包含在虾青素中, 有学者发现通过分光光度法测定的虾青素含量可夸大 20%~30%<sup>[53]</sup>。Li 等<sup>[54]</sup>测定雨生红球藻粗提物中虾青素的最佳工作波长, 研究发现在 530 nm 处的吸光度和虾青素含量之间存在良好的线性关系, 且在此工作波长下, 可以避免叶绿素和其他类胡萝卜素的影响, 也可以避免其他未知的干扰。因此, 在 530 nm 处时的测量值更接近样品中真实虾青素的含量。

### 4.2 薄层色谱法

薄层色谱法不仅可以用来分离纯化虾青素类化合物, 还可以结合扫描分析来对虾青素进行定量。Huang 等<sup>[55]</sup>采用高效薄层色谱法 (high performance thin layer chromatography, HPTLC), 来测定南极磷虾油中虾青素含量。本研究以正己烷:丙酮(7:2, *V:V*)为流动相, 高性能硅胶为固定相, 该硅胶可在 10 min 内完成 HPTLC 分离, 并结合 TLC 扫描仪进行光密度分析, 虾青素回收率为 98.53%。

### 4.3 高效液相色谱法

目前, 采用高效液相色谱法对虾青素定量研究较多, 大多数通过将样品的虾青素及虾青素酯提取液皂化后, 采用  $C_{18}$  或  $C_{30}$  柱及以甲醇/水或甲醇/乙腈体系为流动相进行液相分析, 并通过外标法对虾青素定量计算。孙伟红等<sup>[51]</sup>建立一种准确测定南极磷虾及其制品中虾青素含量的高效液相色谱方法。首先将样品经无水  $MgSO_4$  去除水分, 以丙

酮作为提取溶剂, 在虾青素类化合物提取液中加入 N-丙基乙二胺填料分散固相萃取净化, 经 NaOH-甲醇溶液皂化后, 以 YMC-Carotenoid  $C_{30}$  为色谱柱, 经甲醇、叔丁基甲基醚和 1%磷酸水溶液的流动相进行梯度洗脱, 紫外检测器测定。该方法操作简便、准确度高。高洁等<sup>[56]</sup>建立了一种应用 Asta-E-H 脂肪酶定量检测雨生红球藻萃取物中虾青素的方法。首先将样品提取物经新型脂肪酶 Asta-E-H 催化水解后, 再采用外标法在  $C_{30}$ -HPLC 上对游离态虾青素进行定量。该方法重复性好、灵敏度和回收率高、反应副产物(如虾红素和顺式异构体)少。陈伟珠等<sup>[57]</sup>建立虾青素含量测定的高效液相色谱-光电二极管阵列法。以 Purospher STAR RP 18 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m) 为色谱柱, 甲醇-水(体积比为 95:5) 为流动相, 光电二极管阵列检测器鉴定。

### 4.4 高效液相色谱-质谱联用法

LC-MS 是在高效液相色谱的基础上连接一个质谱的检测方法。该技术结合了液相色谱的分离能力和质谱的高特异性检测的优点。质谱是一种测量离子质荷比的仪器, 其基本原理是各组分在离子源中生成不同质荷比的带正电荷或者负电荷的离子。经电场的加速作用, 形成离子束, 在质量分析器中将生成的离子按照不同的质荷比分开测定其质量, 从而确定物质组成。

自然界中虾青素更多以酯的形式存在, 液相色谱法不能完全分辨虾青素酯的分子种组成, 进而无法深入了解不同物种的虾青素酯的异同。Grynbaum 和 Takaichi 等<sup>[58,59]</sup>利用 LC-MS 技术鉴定了虾和微藻中的虾青素酯, 但由于仪器的局限性, 仅能检测出几种含量较高的虾青素酯。随着检测技术的进步, 质谱的精密度更高, 发现的虾青素酯的种类越来越多。Holtin 等<sup>[60]</sup>利用 LC-MS 技术从雨生红球藻中鉴定出 8 种虾青素单酯和 3 种虾青素双酯。丛心缘等<sup>[49]</sup>建立了南极磷虾中游离虾青素及虾青素酯的高效液相色谱-高分辨质谱分析方法, 从南极磷虾鉴定出 9 种虾青素单酯和 18 种虾青素双酯, 比前人研究的南极磷虾中虾青素酯种类更丰富, 并利用峰面积对虾青素单酯及虾青素双酯进行相对百分含量定量。

## 5 结论

虾青素在食品、医药及化妆品行业具有广泛的应用前景, 优化和改进虾青素的提取和定量检测方法十分必要。目前在虾青素提取和检测方面还存在很多困难与挑战, 比如在破壁方面, 传统破壁方法——机械破壁法简单易行, 高压均质法和低温研磨法对雨生红球藻的破壁率和提取率较高, 但耗时长、耗能多; 酶解法反应温和、污染少, 适用于绿色化工业生产, 但其存在产物抑制问题; 酸解和碱解成本低廉、破壁效果好但存在溶剂残留且在一定程度上会引起虾青素及其他类胡萝卜素的降解。然而新兴的几种

破壁新技术: PEF、HPMF 和 ILs 耗时短、节能环保、对虾青素影响小。在提取时, 常常用有机溶剂提取法, 该方法存在溶剂残留问题, 限制了其在食品和医药行业的应用; 超临界 CO<sub>2</sub> 提取法具有环保节能、高效等优势, 但主要适用于实验室研究, 在工业应用方面的研究有待改进。然而, 近来有学者开发利用可切换的溶剂、超分子溶剂等多功能绿色溶剂来从雨生红球藻中提取虾青素, 无需使用高能设备, 节能环保; 另有学者利用液体双相浮选系统从雨生红球藻中提取虾青素, 该方法经济有效、可大规模使用且采用食品级原料, 可提高环境安全性及其在食品、制药和化妆品行业中的应用。在纯化方面, 薄层色谱法和高效液相色谱法仅适用于实验室的少量制备; 而连续中压硅胶柱层析法溶剂用量少、分离效果好宜于实现连续工业化生产, 但纯度较低, 因此进一步开发大批量制备纯化纯度较高的虾青素的方法是有重大意义的。在检测方面, UV 法和薄层色谱法定量不准, LC-MS 法对人员和设备要求比较高, 而 HPLC-UV 法是目前常用的检测方法, 其能分离虾青素的多种几何异构体, 可以比较准确的对虾青素进行定量分析。随着虾青素提取和检测技术的成熟, 关于虾青素结构的分析会越来越多, 可以更加全面地了解虾青素使其更好地应用于生产和生活中。

#### 参考文献

- [1] 裴晖, 朱晓立. 虾青素的结构与功能 [J]. 食品工程, 2007, (1): 16-18.  
Qiu H. Astaxanthin structure and function [J]. Food Eng, 2007, (1): 16-18.
- [2] Félixvalenzuela L. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2006, 46(2): 185-196.
- [3] Davinelli S, Nielsen ME, Scapagnini G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review [J]. Nutr, 2018, 10(4): 522-534.
- [4] Komatsu T, Sasaki S, Manabe EY, et al. Preventive effect of dietary astaxanthin on UVA-induced skin photoaging in hairless mice [J]. PLoS One, 2017, 12(2): 171-178.
- [5] Zhou T, Wang X, Yun J, et al. Stability application and research of astaxanthin integrated into food [J]. Mater Sci Eng, 2018, 394(2): 1-6.
- [6] 孙伟红. 不同来源虾青素的分离制备及其构效关系[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.  
Sun WH. Isolation and preparation of astaxanthin from different sources and the structure-activity relationship [D]. Qingdao: China Ocean University, 2015.
- [7] 杨成. 含氧类胡萝卜素异构体的制备纯化、吸收代谢及对肠道功能的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2018.  
Yang C. Xanthophyll Isomers: Rapid preparation, purification, metabolic fate and their effects on the intestinal function [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [8] Turujman SA, Wamer WG, Wei RR, et al. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin [J]. J Aoac Int, 1997, 80(3): 622.
- [9] 张晓娜, 惠伯隼, 裴凌鹏, 等. 功能因子虾青素研究概况[J]. 中国食品添加剂, 2017, 7(8): 208-214.  
Zhang XN, Hui BD, Pei LP, et al. Research progress on functional factor of astaxanthin [J]. China Food Addit, 2017, (8): 208-214.
- [10] Zhang S, Sun X, Liu D. Preparation of (3R, 3'R)-astaxanthin monoester and (3R, 3'R)-astaxanthin from Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) [J]. Eur Food Res Technol, 2015, 240(2): 295-299.
- [11] 孙伟红, 林洪, 翟毓秀, 等. 红发夫酵母中 3R, 3'R-虾青素的分离纯化和结构鉴定[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 79-82.  
Sun WH, Lin H, Zhai YX, et al. Separation, purification and identification of (3R, 3'R)-trans-Astaxanthin from *phaffia rhodozyma* [J]. Food Sci, 2014, 35(11): 79-82.
- [12] Kamath BS, Vidhyavathi R, Sarada R, et al. Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(18): 8667-8673.
- [13] Qian X, Tan C, Yang B, et al. Astaxanthin increases radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma through inducing apoptosis and G2/M arrest [J]. Dis Esophagus, 2017, 30(6): 1-7.
- [14] Liu X, Song M, Gao Z, et al. Stereoisomers of astaxanthin inhibit human colon cancer cell growth by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(41): 7750-7759.
- [15] Xie X, Chen Q, Tao J. Astaxanthin promotes Nrf2/ARE signaling to inhibit HG-induced renal fibrosis in GMCs [J]. Mar Drugs, 2018, 16(4): 117.
- [16] Maezawa T, Tanaka M, Kanazashi M, et al. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress [J]. J Physiol Sci, 2016, 67(5): 1-9.
- [17] 周湘池, 刘必谦, 曾庆国, 等. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)破壁方法对虾青素提取率的影响[J]. 海洋与湖泊, 2006, 37(5): 424-429.  
Zhou XC, Liu BQ, Zeng QG, et al. The best cell-wall breaking method for extracting astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. [J]. Oceane Et Limnol Sin, 2006, 37(5): 424-429.
- [18] 欧阳琴, 陈兴才, 黄亚治. 雨生红球藻提取虾青素不同机械破壁方法的研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2005, 33(1): 111-117.  
Ou YQ, Chen XC, Huang YZ. Study on extracting astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by various mechanical methods [J]. J Fuzhou Univ(Nat Sci Ed), 2005, 33(1): 111-117.
- [19] 张睿钦. 雨生红球藻细胞转化及虾青素的提取[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.  
Zhang RQ. Study on *Haematococcus pluvialis* transformational conditions and astaxanthin extraction [D]. Qingdao: China Ocean University, 2012.
- [20] 周锦珂, 李金华, 葛发欢, 等. 酶法提取雨生红球藻中虾青素的新工艺研究[J]. 中药材, 2008, 31(9): 131-133.  
Zhou JK, Li JH, Ge FH, et al. Study on new technology of enzymatic extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. J Chin Med Mater, 2008, 31(9): 131-133.
- [21] Zhao X, Zhang X, Liu H, et al. Enzyme-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its stability and antioxidant activity [J]. Food Sci Biotechnol, 2019, 28(1): 1637-1647.
- [22] 任晓丽, 陈林, 刘天中, 等. 破壁方法对雨生红球藻湿藻生物质中虾青素提取的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 116-123.  
Ren XL, Chen L, Liu TZ, et al. The effect of cell-wall disruption methods on astaxanthin extraction from wet algal biomass of *Haematococcus pluvialis* [J]. Chin J Food Sci, 2018, 18(12): 116-123.
- [23] 倪辉, 何国庆, 吴光斌, 等. 酸法破壁条件对法夫酵母虾青素提取效果的影响[J]. 农业工程学报, 2005, 21(3): 176-180.



- Ni H, He GQ, Wu GB, *et al.* Effects of disrupting conditions on extracting astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by acid method [J]. *J Agric Eng*, 2005, 21(3): 176–180.
- [24] 卢宝驹. 高温湿热酸法破壁提取法夫酵母胞内虾青素[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(7): 1285–1292.
- Lu BJ. Technological process of cell disruption for extracting astaxanthin from *phaffia rhodozyma* by acid method under autoclave conditions [J]. *J Biotechnol*, 2008, 24(7): 1285–1292.
- [25] Smondyren AM, Berkowitz ML. Molecular dynamics simulation of DPPC bilayer in DMSO [J]. *Biophysical J*, 1999, 76(5): 2472–2478.
- [26] 张琇, 李娜, 曹晓虹, 等. 红酵母虾青素提取工艺的优化[J]. *食品科技*, 2011, 36(1): 196–199.
- Zhang X, Li N, Cao XH, *et al.* Optimization of conditions for extracting astaxanthin from *Rhodozyma* [J]. *Food Technol*, 2011, 36(1): 196–199.
- [27] 黄莹, 王凯, 董丛丛, 等. 二甲亚砜法破壁条件对法夫酵母虾青素提取效果的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(15): 212–217.
- Huang Y, Wang K, Dong CC, *et al.* Effects of disrupting conditions on extracting astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by DMSO method [J]. *Food Ind Technol*, 2017, 38(15): 212–217.
- [28] Gong K, Deng L, Shi A, *et al.* High-pressure microfluidisation pretreatment disaggregate peanut protein isolates to prepare antihypertensive peptide fractions [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2017, 52(8): 1760–1769.
- [29] Choi SA, Oh YK, Jeong MJ, *et al.* Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris* [J]. *Renew Energ*, 2014, 65(5): 169–174.
- [30] Aadil RM, Liu ZW, Cheng JH, *et al.* The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus Pluvialis* [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2018, 53(9): 2212–2219.
- [31] 邢涛, 张慧, 祁琳琳, 等. 从雨生球藻中提取虾青素的工艺研究[J]. *中国食品添加剂*, 2018, 177(11): 143–148.
- Xing T, Zhang H, Qi LL, *et al.* Study on the extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *China Food Addit*, 2018, 177(11): 143–148.
- [32] 华晓曼, 王心哲, 南博, 等. 红法夫酵母发酵生产虾青素提取工艺优化[J]. *食品工业*, 2017, 38(3): 56–58.
- Hua XM, Wang XZ, Nan B, *et al.* Optimization of extraction condition for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* fermentation [J]. *Food ind*, 2017, 38(3): 56–58.
- [33] 张晓燕, 刘楠, 朱兰兰, 等. 响应面法优化南极磷虾壳中虾青素提取条件的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(23): 188–191.
- Zhang XY, Liu N, Zhu LL, *et al.* Optimization of extracting astaxanthin from *Antarctic krill* shell by response surface methodology [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(23): 188–191.
- [34] Huang WC, Liu H, Sun W, *et al.* Effective astaxanthin extraction from wet *Haematococcus pluvialis* using switchable hydrophilicity solvents [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2018, 6(2): 1560–1563.
- [35] 史博文, 孙维维, 姜晓明, 等. 可切换亲水溶剂提取虾青素及其纳米粒抗氧化性探究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(18): 165–170.
- Shi BW, Sun WW, Jiang XM, *et al.* Extraction of astaxanthin by switchable hydrophilic solvents and antioxidant activity of astaxanthin nanoparticles [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(18): 165–170.
- [36] Salatti-Dorado JA, García-Gómez D, Rodríguez-Ruiz V, *et al.* Multifunctional green supramolecular solvents for cost-effective production of highly stable astaxanthin-rich formulations from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Food Chem*, 2019, 279: 294–302.
- [37] 邹书慧. 超临界CO<sub>2</sub>萃取雨生红球藻中虾青素等有效成分的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古工业大学, 2009.
- Zou SH. A study on extracting astaxanthin and other effective components from *Haematococcus pluvialis* by supercritical carbon dioxide [D]. Huhehaote: Mongolia Industrial University, 2009.
- [38] 翁婷. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取南极磷虾油及虾青素工艺研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Weng T. Extraction of antarctic krill (*Euphausia superba*) oil including astaxanthin by supercritical carbon dioxide [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [39] Krichnavaruk S, Shotipruk A, Goto M, *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent [J]. *Bioresource Technol*, 2008, 99(13): 5556–5560.
- [40] Cheng X, Qi ZB, Burduny T, *et al.* Low pressure supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* demonstrated on a microfluidic chip [J]. *Bioresource Technol*, 2018, 250: 481–485.
- [41] 刘莉娜. 负压空化法高效提取虾青素的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2006.
- Liu LN. Study on efficient extraction of astaxanthin by negative pressure cavitation [D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2006.
- [42] 徐竞. 正交试验优化天然虾青素的提取工艺研究[J]. *南方水产科学*, 2008, 4(2): 73–78.
- Xu J. Study on the extraction of natural astaxanthin by orthogonal test [J]. *South China Fish Sci*, 2008, 4(2): 73–78.
- [43] 肖小华, 王家玥, 李攻科. 微波辅助萃取虾中虾青素的研究[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(11): 128–131.
- Xiao XH, Wang JY, Li GK. Study on microwave-assisted extraction of *Astaxanthin* from shrimp [J]. *J Instrum Anal*, 2010, 29(11): 128–131.
- [44] 赵晓燕, 陈军, 陈锋亮, 等. 变频微波法辅助萃取雨生红球藻中虾青素的研究[J]. *食品科技*, 2014, 39(3): 188–193.
- Zhao XY, Chen J, Chen FL, *et al.* Microwave-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Food Sci Technol*, 2014, 39(3): 188–193.
- [45] 齐计英, 姚依婧, 岑琴, 等. 响应面法优化雨生红球藻虾青素的超声提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(6): 313–316.
- Qi JY, Yao YJ, Cen Q, *et al.* Optimization of ultrasonic extraction technology of astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36(6): 313–316.
- [46] 徐煜, 张琳, 李亚鹤, 等. 雨生红球藻中虾青素萃取工艺优化[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(1): 98–102.
- Xu Y, Zhang L, Li YH, *et al.* Optimization of extracting process of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Biology*, 2017, 34(1): 98–102.
- [47] Leong HY, Ooi CW, Law CL, *et al.* Application of liquid biphasic flotation for betacyanins extraction from peel and flesh of *Hylocereus polyrhizus* and antioxidant activity evaluation [J]. *Sep Puri Technol*, 2018, 201: 156–166.
- [48] Khoo KS, Chew KW, Ooi CW, *et al.* Extraction of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using liquid biphasic flotation system(Article) [J]. *Biores Technol*, 2019, 290: 1–7

- [49] 丛心缘, 孙伟红, 张辉珍, 等. 南极磷虾中不同形态虾青素的分离制备、结构鉴定及含量分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(2): 174–178.  
Cog XY, Sun WH, Zhang HZ, *et al.* Separation, structure identification and content analysis of different forms of astaxanthin in antarctic krill [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(2): 174–178.
- [50] 杨磊, 卫蔚, 刘婷婷, 等. 连续中压硅胶柱层析纯化法酵母虾青素[J]. 化工进展, 2010, 29(6): 1125–1128.  
Yang L, Wei W, Liu TT, *et al.* Successive purification of astaxanthin by column chromatography [J]. Chem Ind Eng Prog, 2010, 29(6): 1125–1128.
- [51] 孙伟红, 邢丽红, 冷凯良, 等. 高效液相色谱法测定南极磷虾及其制品中虾青素的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1248–1253.  
Sun WH, Xing LH, Leng KL, *et al.* Determination of astaxanthin in Antarctic krill and its products by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(4): 1248–1253.
- [52] Yuan JP, Chen F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Food Chem, 2000, 68(4): 443–448.
- [53] Cysewski G, Capelli B. Natural *Astaxanthin*: King of the carotenoids [M]. Cyanotech Corporation, 2007.
- [54] Li Y, Miao F, Geng Y, *et al.* Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus* crude extract spectrophotometrically [J]. Chin J Oceanol Limn, 2012, 30(4): 627–637.
- [55] Huang M, Liu D. High-performance thin layer chromatography determination of astaxanthin in *Euphausia superba* [J]. Chem Nat Compd, 2013, 49(1): 145–147.
- [56] 高洁, 宫平, 惠伯棣, 等. 一种应用 Asta-E-H 脂肪酶定量检测雨生红球藻萃取物中虾青素的方法[J]. 中国食品添加剂, 2018, 176(10): 93–102.  
Gao J, Gong P, Hui BD, *et al.* A method of detecting astaxanthin content in *Haematococcus pluvialis* extracted by lipase Asta-E-H [J]. China Food Addit, 2018, 176(10): 93–102.
- [57] 陈伟珠, 张怡评, 晋文慧, 等. 高效液相色谱-光电二极管阵列法测定虾青素的含量[J]. 化学分析计量, 2014, 23(1): 24–26.  
Chen WZ, Zhang YP, Jin WH, *et al.* Determination of astaxanthin by high performance liquid chromatography with photodiode array detector [J]. Chem Anal Mete, 2014, 23(1): 24–26.
- [58] Grynbaum MD, Hentschel P, Putzbach K, *et al.* Unambiguous detection of astaxanthin and astaxanthin fatty acid esters in krill (*Euphausia superba* Dana) [J]. J Sep Sci, 2005, 28(14): 1685–1693.
- [59] Takaichi S, Matsui K, Nakamura M, *et al.* Fatty acids of astaxanthin esters in krill determined by mild mass spectrometry [J]. Comp Biochem Phys, 2003, 163(2): 317–322.
- [60] Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, *et al.* Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 395(6): 1613–1622.

(责任编辑: 王欣)

### 作者简介



高岩, 硕士, 主要研究方向为水产品安全性与质量控制。

E-mail: 1156873972@qq.com



孙伟红, 高级工程师, 博士, 主要研究方向为水产品安全性与质量控制。

E-mail: sunwh@ysfri.ac.cn