

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220020

基于 UPLC 对卤虫体内类胡萝卜素检测方法的建立

陈慧聪¹, 焦烨磊¹, 王伟隆^{1,2,3}, 黄旭雄^{1,2,3}

1. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306;
2. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海海洋大学, 上海 201306;
3. 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 通过优化梯度洗脱条件和类胡萝卜素提取条件, 探索建立基于超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 检测卤虫体内类胡萝卜素组成及含量的有效方法。结果表明: 类胡萝卜素提取选用丙酮-甲醇 (体积比为 2 : 1) 作为提取溶剂, 在超声波处理 30 min、65 °C 浸提 20 min 的条件下提取效果最佳。UPLC 选用 ACQUITY H-Class BEH C18 色谱柱 (1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm) 以及二极管阵列 (PDA) 检测器。梯度洗脱条件: 10% 超纯水 + 90% 甲醇-乙腈溶液 (体积比为 3 : 7) 16 min, 20% 甲基叔丁基醚 + 80% 甲醇-乙腈溶液 (体积比为 3 : 7) 14 min, 流量 0.3 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 25 °C, 检测波长 475 nm。在此条件下可以在 30 min 内有效检测出卤虫初孵无节幼体中的角黄素和海胆酮的含量, 分别为 (572.60 ± 11.60) μg/g 和 (18.02 ± 0.41) μg/g (以干质量计), 且验证了无节幼体内不含虾青素、玉米黄质和 β-胡萝卜素。该方法快速、准确、灵敏、有效, 为后续卤虫类胡萝卜素营养强化及类胡萝卜素代谢模型的建立提供了有效的技术手段。

关键词: 超高效液相色谱; 卤虫; 类胡萝卜素

中图分类号: S963.21⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2022)06-0009-09

Establishment of a Method for Carotenoid Determination in *Artemia* sp. Using UPLC

CHEN Huicong¹, JIAO Yelei¹, WANG Weilong^{1,2,3}, HUANG Xuxiong^{1,2,3}

1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-culture of Aquaculture Animals, Shanghai 201306, China)

Abstracts: In our study an effective method based on ultra performance liquid chromatography (UPLC) that can detect the composition and content of carotenoids in *Artemia* sp. was established via optimizing the conditions of gradient elution and carotenoid extraction. The results showed that the carotenoid extraction procedure for *Artemia* samples was better to use acetone-methanol (volume ratio 2 : 1) solvent with ultrasonic treatment 30 min, then extraction at 65 °C for 20 min. UPLC selected ACQUITY H-Class BEH C18 (1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm) column and photo-diode array (PDA) detector. Gradient elution conditions were 10% ultrapure water + 90% methanol-acetonitrile solution (volume ratio 3 : 7) for 16 min, 20% methyl tert-butyl ether + 80% methanol-acetonitrile solution (volume ratio 3 : 7) for 14min, flow rate 0.30 mL/min, injection volume 10 μL, column temperature 25 °C and detection wavelength 475 nm. Under these conditions, the contents of canthaxanthin and echinenone in newly hatched *Artemia* nauplii can be effectively detected in 30 min, which were (572.60 ± 11.60) μg/g and (18.02 ± 0.41) μg/g (dry weight), respectively. However, no astaxanthin, zeaxanthin, and β-carotene were detected. The optimized UPLC method in the cur-

收稿日期: 2022-01-31; 修回日期: 2022-05-14

基金项目: 沪农科推字(2019)第2-5号; 国家自然科学基金青年科学基金项目(31902385)

作者简介: 陈慧聪(1997—), 男, 上海人, 硕士研究生; 通信作者: 黄旭雄, 教授, xxhuang@shou.edu.cn

rent study has proven fast, accurate, sensitive and effective. Therefore, this method provides an effective technical means for future carotenoids nutrition enhancement in *Artemia* as well as the establishment of carotenoid metabolism model.

Keywords: UPLC; *Artemia* sp.; carotenoids

类胡萝卜素是自然界中分布最广的一类天然色素,主要由植物和微生物合成.动物自身不能合成类胡萝卜素,但可以从食物中吸收并进行有效代谢满足自身的营养需求^[1].近年来,类胡萝卜素类添加剂在水产动物着色、抗氧化、抗应激以及提高繁殖力等生理方面的影响受到了越来越多的关注^[2-5].现已发现有 600 多种类胡萝卜素,其普遍表现为不易溶于水,易溶于脂溶性溶剂,且容易受到环境中氧气、强光、高温和酸的破坏.目前添加在水产动物饲料中的类胡萝卜素主要有胡萝卜素类(以 β -胡萝卜素为主)和叶黄素类(以叶黄素、玉米黄质、角黄素和虾青素为主)两大类.

卤虫(*Artemia* sp.)无节幼体及成虫自身营养丰富,被广泛应用于水产动物幼体及观赏鱼的生物饵料.同时,还可以利用其非选择性滤食特性,作为生物包囊定向传递营养强化剂给水产苗种^[6].虽然卤虫自身不能合成类胡萝卜素,但可以通过食物链进行传递,不仅可以有效满足养殖对象幼苗类胡萝卜素的营养需求,而且可以避免类胡萝卜素在饲料加工过程及直接投喂过程中的分解及异构化.

类胡萝卜素的检测方法主要有紫外-可见分光光度计法^[8]、高效液相色谱(HPLC)^[9]及高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[10]等.紫外-可见分光光度计法灵敏度较低,对微量类胡萝卜素测定结果重现性差.HPLC法具有分离效果好、灵敏度高等特点,但分析时间较长.HPLC-MS/MS相较于HPLC应用范围更广,可分析沸点高、大分子、强极性和热稳定性差的化合物,但使用成本较高.超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)与传统的HPLC相比,具有柱效更高、分离速度更快、灵敏度更高的优点.样品的理化性质会影响类胡萝卜素的萃取,且游离在细胞外的类胡萝卜素不稳定,因此对于不同样品的前处理方式十分重要.提取类胡萝卜素常选用有机溶剂.非极性溶剂如正己烷、石油醚、四氢呋喃(THF)是提取非极性的胡萝卜素或酯化叶黄素的最好选择,而弱极性溶剂如丙酮、乙醇、乙酸乙酯更适合提取弱极性的类胡萝卜素.提取常通过物理化学方法使细胞破碎,促进细胞内类胡萝卜素的释放,主要有索氏提取^[11]、微波辅助提取(MAE)^[12]、超声辅助提取(UAE)^[13]、加压液体萃取

(ASE)^[14]、超临界CO₂萃取(SFE)^[15]等.对于细胞壁较厚的材料也常使用纤维素酶酶解^[16],对于油脂含量过高的样品则可用胆固醇酯酶酶解或皂化的方法辅助提取.

鉴于类胡萝卜素对水产动物的重要生理作用及卤虫作为营养载体的便利性,开展卤虫类胡萝卜素强化是提升卤虫饵料价值的重要途径.本研究以卤虫初孵无节幼体为研究对象,探究卤虫体内类胡萝卜素的最好提取及检测方法,为开展卤虫类胡萝卜素的代谢研究和有效营养强化奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

卤虫初孵无节幼体由产自渤海湾的卤虫休眠卵孵化所得,冷冻干燥后,于-20℃冰箱避光保存用于实验.采用超高效液相色谱仪ACQUITY UPLC H-Class(美国Waters公司),配有ACQUITY H-Class BEH C18色谱柱(1.7 μ m, 2.1 mm \times 150 mm)以及二极管阵列(PDA)检测器,用于类胡萝卜素的分离和测定.

5种类胡萝卜素标准储备液的配制:选用购自美国Sigma公司的标准品虾青素(纯度 \geq 97%)、玉米黄质(纯度 \geq 95%)、角黄素(纯度 \geq 95%)、海胆酮(纯度 \geq 95%)和 β -胡萝卜素(纯度 \geq 95%),分别称取1 mg上述标准品,用正己烷配制成50 μ g/mL的5种类胡萝卜素标准储备液,低温避光保存.

胆固醇酯酶溶液的配制:称取2.5 mg胆固醇酯酶(49 U/mg,上海源叶生物科技有限公司),用0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)溶解并定容于25 mL容量瓶中,胆固醇酯酶溶液需现配现用.

无水乙醇、丙酮、石油醚、正己烷,分析纯,美国Collins公司;甲醇、乙腈,色谱纯,德国Merck公司;甲基叔丁基醚(色谱纯)、超纯水(色谱纯)、BHT(纯度 \geq 97.0%),德国CNW公司;无水硫酸钠、氢氧化钠、浓盐酸,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;氮气,上海利旦工业气体有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

5种类胡萝卜素单一标准溶液(单标):分别移取

5 种类胡萝卜素标准储备液 1.0 mL 置于 5 个 10 mL 容量瓶中, 用氮气吹脱至干, 用含 0.1% BHT 的甲醇-乙腈(体积比为 3 : 7)溶液配制成 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的类胡萝卜素单一标准溶液, 0.22 μm 亲水滤膜过滤后进行检测。

5 种类胡萝卜素混合标准溶液(混标): 分别移取类胡萝卜素标准储备液 0.04、0.20、0.40、1.00、4.00 mL 置于 5 个 10.0 mL 容量瓶中混合均匀, 用氮气吹干, 加入含 0.1% BHT 的甲醇-乙腈(体积比为 3 : 7)溶液, 分别将其配制成 0.2、1.0、2.0、5.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 5 个质量浓度的类胡萝卜素混合标准溶液, 0.22 μm 亲水滤膜过滤后进行检测。

1.2.2 仪器条件的优化

选用超纯水、甲基叔丁基醚和甲醇-乙腈(体积比为 3 : 7)溶液分别作为流动相 A、B 和 C。在柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 、进样量 10 μL 、检测波长 475 nm 条件下, 通过调节洗脱阶段 3 种流动相的梯度洗脱程序, 设定移动相流量为 0.2 ~ 0.3 mL/min。通过比较 5 种类胡萝卜素标准品的出峰效果, 优化调节色谱条件, 用于后续样品检测。

1.2.3 卤虫样品前处理条件的优化

称取卤虫初孵无节幼体冻干样品 0.1 g 置于 10 mL 离心管中, 加入 3 mL 提取剂, 充分涡旋振荡, 冰浴超声波处理, 在适宜温度、黑暗条件下浸提后, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上层清液, 提取过程重复 3 次, 合并上清液后用氮气吹干。加入 3.0 mL 甲醇-乙腈(体积比为 3 : 7)溶液复溶后, 经 0.22 μm 亲水滤膜过滤至进样瓶中备检。实验过程中, 通过分别比较 6 种不同混合提取剂, 即丙酮-甲醇(体积比为 2 : 1)^[17]、无水乙醇-石油醚(体积比为 1 : 1)^[18]、丙酮-石油醚(体积比为 3 : 7)^[19]、丙酮-乙腈(体积比为 3 : 2)^[20]、正己烷-丙酮-乙醇(体积比为 2 : 1 : 1)^[21]和丙酮-乙醇(体积比为 1 : 1)^[22], 以及超声波处理时间(0、15、30、60、90、120 min)、浸提温度(25、35、45、55、65 $^{\circ}\text{C}$)和浸提时间(10、20、40 min), 优化卤虫样品类胡萝卜素的提取条件。

在此基础上, 比较直接提取、胆固醇酯酶酶解和碱性皂化对卤虫初孵无节幼体中类胡萝卜素提取效果的影响。

胆固醇酯酶酶解方法: 参照孔凡华等^[23]的方法, 将卤虫类胡萝卜素提取液, 经过氮气吹干后依次加入 2 mL 丙酮、2 mL Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH = 7)和 1.0 mL 胆固醇酯酶(5 U/mL)溶液, 振荡混合后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器内振荡酶解 60 min, 取出冷

却至室温, 依次加入 1 g 无水硫酸钠和 5 mL 石油醚, 在涡旋振荡器上振荡 1 min, 静置分层后, 将上层溶液转移至另一个 50 mL 离心管中, 再加入 5 mL 石油醚。重复 2 次后, 合并上清液。

碱性皂化方法: 参照文献方法^[24-25], 将卤虫类胡萝卜素提取液置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 0.02 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液, 静置于 5 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光皂化 60 min; 加入 5 mL 超纯水和 5 mL 石油醚, 在涡旋振荡器上振荡 1 min; 静置分层后, 将上层溶液转移至另一个 50 mL 离心管中, 再加入 5 mL 石油醚。重复 2 次, 合并的上清液经氮气吹干后, 用 3.0 mL 甲醇-乙腈(体积比为 2 : 1)溶液将其完全溶解, 经 0.22 μm 亲水滤膜过滤至进样瓶中备检。

1.2.4 回收率及精密度

分别向加入不同已知量的类胡萝卜素混合标准物质(3、6、12 μg)的离心管中加入 0.1 g 卤虫样品, 按照优化后的提取方法获得提取液, 氮气吹干后, 用 3.0 mL 甲醇-乙腈(体积比为 2 : 1)溶液将其完全溶解, 经 0.22 μm 亲水滤膜过滤后测定样品类胡萝卜素含量, 每个添加浓度平行测定 6 次, 计算回收率。

$$P = \frac{x_1 - x_0}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: P 为加入的标准物质的回收率, %; m 为加入的标准物质的质量, μg ; x_1 为加标试样的测定值, μg ; x_0 为未加标试样的测定值, μg 。

以回收率评价方法的准确度, 根据相对标准偏差考察方法的重现性。

1.3 数据分析处理

用与仪器配套的 Empower 3.0 工作软件完成数据采集。用 IBM SPSS Statistics 26.0 统计分析软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 并采用 Duncan's 法进行多重比较检验, 不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。用 OriginLab 2018 进行科学绘图及图片处理。

2 结果与分析

2.1 超高效液相色谱法色谱条件的优化

2.1.1 流动相比例的选择

以单个类胡萝卜素标准溶液和 5 种类胡萝卜素混标作为测试液, 通过调节流动相中 A、B、C 的比例, 当流动相为 100% C 时, 虾青素(Ax)、玉米黄质(Zea)、角黄素(Can)、海胆酮(Ech)和 β -胡萝卜素(β -Car)标准溶液的保留时间分别为 2.75、3.44、4.53、

11.32、28.49 min(图 1). 考虑到虾青素、玉米黄质、角黄素的出峰间距小, 实际样品分析中多个色素及其他物质的干扰可能影响分离度, 将流动相调整为

5% A + 95% C. 此时虾青素、玉米黄质、角黄素标准溶液的保留时间分别为 4.43、8.00、15.25 min, 海胆酮、 β -胡萝卜素 1 h 内未被检出(图 2).

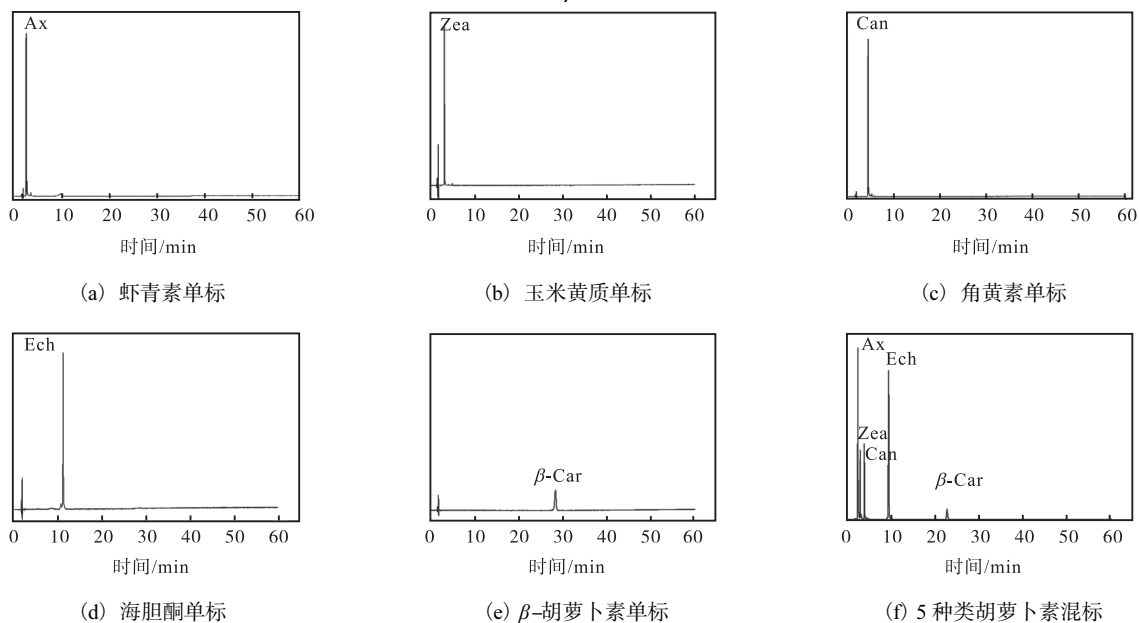


图 1 流动相比例为 0% A + 0% B + 100% C 时 5 种类胡萝卜素标准品的出峰效果图

Fig. 1 Peak curves of five carotenoid standards with mobile phase of 0% A + 0% B + 100% C

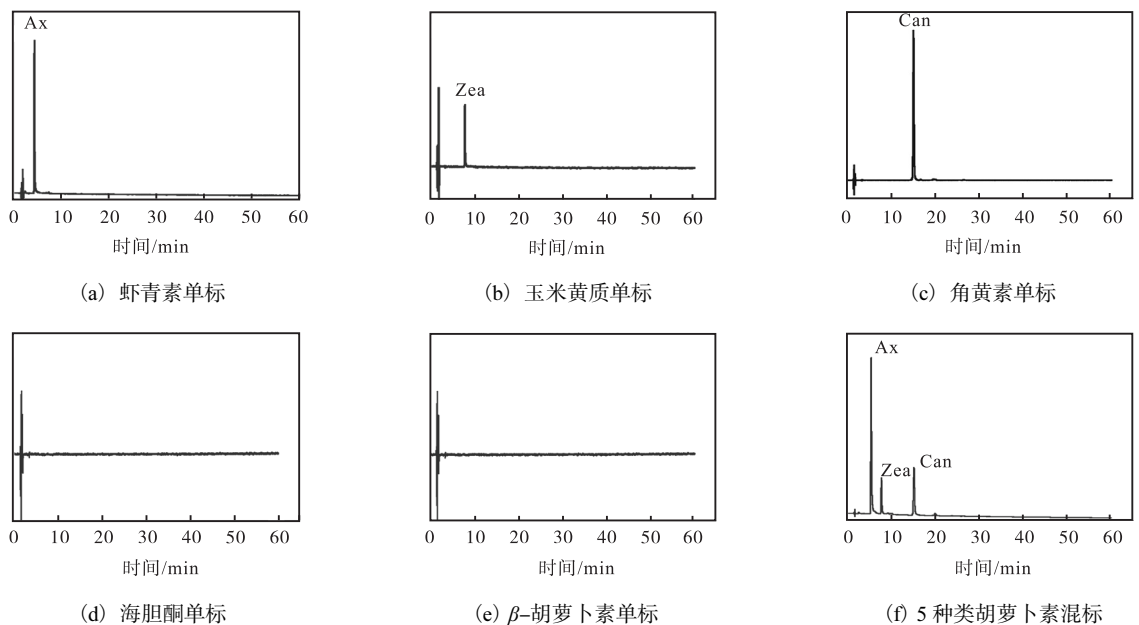


图 2 流动相比例为 5% A + 0% B + 95% C 时 5 种类胡萝卜素标准品的出峰效果图

Fig. 2 Peak curves of five carotenoid standards with mobile phase of 5% A + 0% B + 95% C

当流动相为 10% A + 90% C 时, 虾青素、玉米黄质、角黄素标准溶液的保留时间分别为 7.94、12.13、25.61 min, 海胆酮、 β -胡萝卜素 1 h 内未被检出(图 3). 可见增大流动相极性(A 的比例增加, C 的比例降低), 有利于提升虾青素、玉米黄质、角黄素的分离效果, 但不利于海胆酮、 β -胡萝卜素的分离和检

测. 考虑到实测样品中可能的溶剂效应及类胡萝卜素之间的极性差异, 故选择初始流动相为 10% A + 90% C, 并在角黄素被检出后(30 min 后)尝试进行梯度洗脱. 在降低极性最强的水相 A 占比, 适量提高甲基叔丁醚的比例, 发现 4 种不同洗脱条件均对海胆酮和 β -胡萝卜素具有良好的分离效果, 随着流动相中

甲基叔丁基醚比例的增加, 海胆酮和 β -胡萝卜素的出峰时间也随之提早(图 4)。考虑检测时间以及甲基叔丁基醚非极性很强, 比例过高会导致色谱柱的柱压增

高, 降低色谱柱的使用寿命等因素, 初步选择洗脱条件为: 初始流动相 10% A + 90% C 30 min, 20% B + 80% C 30 min 进行后续的实验。

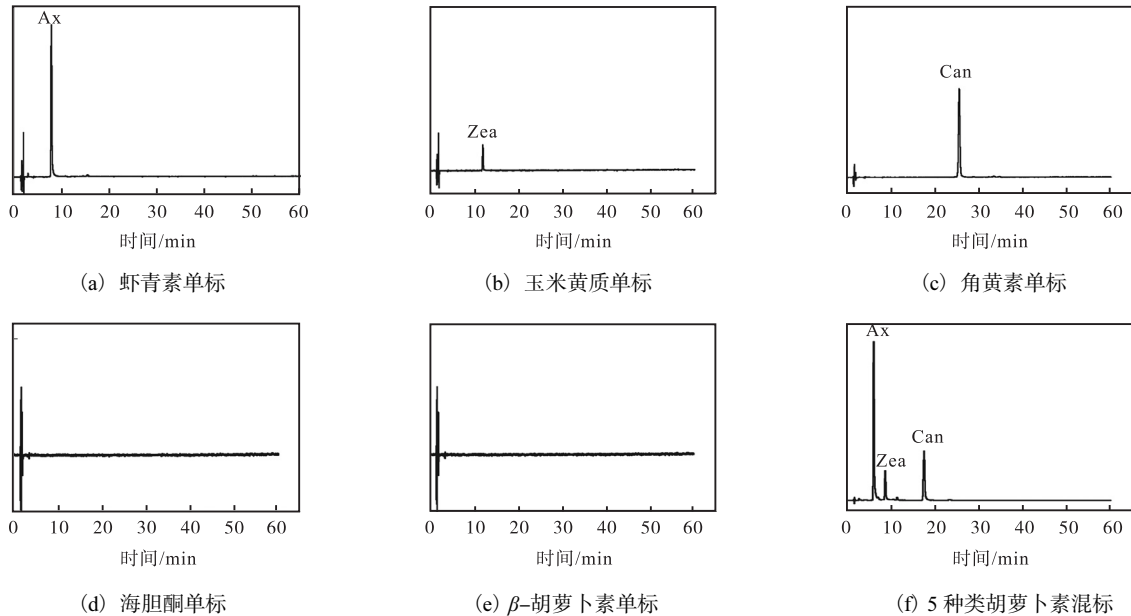


图 3 流动相比例为 10% A + 0% B + 90% C 时 5 种类胡萝卜素标准品的出峰效果图

Fig. 3 Peak curves of five carotenoid standards with mobile phase of 10% A + 0% B + 90% C

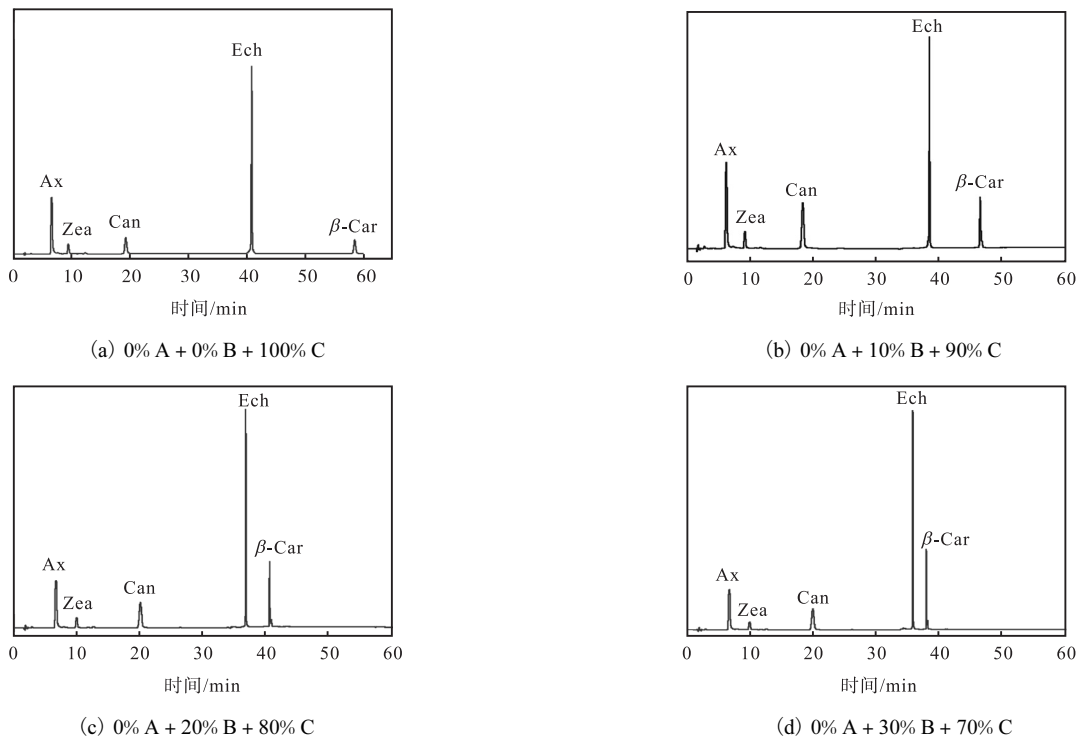


图 4 30 min 后流动相中甲基叔丁基醚的比例改变对海胆酮和 β -胡萝卜素出峰效果的影响

Fig. 4 Effects of the change of proportion of methyl tert-butyl ether in mobile phase after 30 min on the peaks of echinone and β -carotene

2.1.2 流量对出峰效果的影响

由于流量与色谱柱的柱压成正比, 流量越大, 柱压越高。流动相流量为 0.30 mL/min 时, 在上述优化

的洗脱条件下色谱柱的柱压较为安全; 当流量设置超过 0.30 mL/min 时, 柱压过大, 将影响色谱柱的使用寿命, 因此在上述实验选择的流动相梯度洗脱条件下

分别选用了 0.20、0.25、0.30 mL/min 的流量,测试 5 种类胡萝卜素混标的出峰效果. 如图 5 所示,流量越大,5 种类胡萝卜素保留时间越早,且峰间距明显. 在优化后的梯度洗脱条件(10% A + 90% C, 16 min;

20% B + 80% C, 14 min) 下,选择流动相的流量为 0.30 mL/min 时,可以将原定 30 min 改变洗脱条件时间点提前到 16 min,缩短了检测时间,提高了测定效率(图 6).

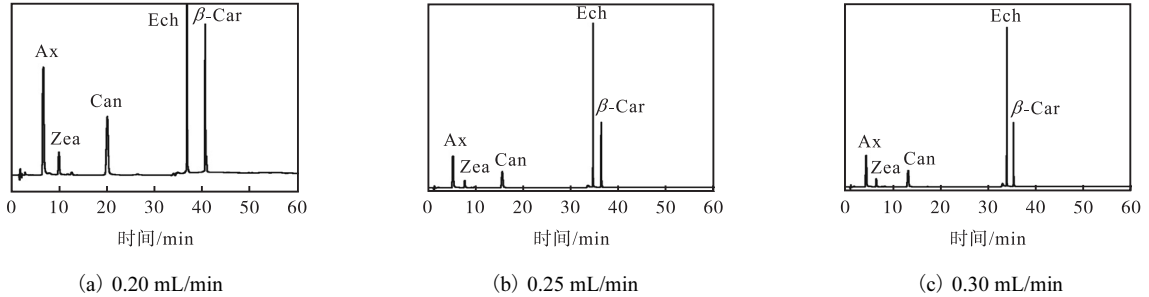


图 5 不同流量对 5 种类胡萝卜素出峰效果的影响

Fig. 5 Effects of different flow rates on the peaks of five carotenoids

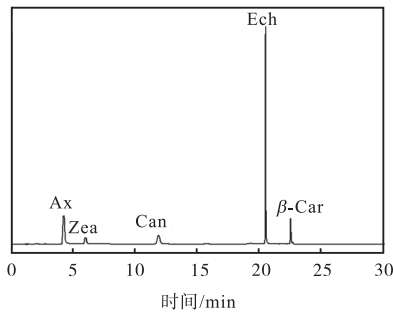


图 6 优化后的梯度洗脱条件下 5 种类胡萝卜素的出峰效果

Fig. 6 Peak curves of five carotenoids under optimized gradient elution conditions

2.1.3 线性关系考察

将 0.2、1.0、2.0、5.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 个不同浓度梯度的类胡萝卜素混合标准品,在优化后的梯度洗脱条件下,以峰面积(x)为横坐标,质量浓度(y)为纵坐标作图,绘制标准曲线. 当各化合物信噪比(S/N)为 3 时的质量浓度定义为方法的检测限(LOD),各化合

物的线性方程、相关系数(r)、检测限见表 1.

表 1 5 种类胡萝卜素 UPLC 法检测的线性方程、相关系数及检测限

Tab. 1 Linear equation, correlation coefficient and detection limit of five carotenoids with UPLC detection method

名称	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性方程	r	检测限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
虾青素	0 ~ 20	$y = 2 \times 10^{-6} x$	1.000 0	0.02
玉米黄质	0 ~ 20	$y = 4 \times 10^{-6} x$	0.999 4	0.02
角黄素	0 ~ 20	$y = 5 \times 10^{-6} x$	1.000 0	0.02
海胆酮	0 ~ 20	$y = 6 \times 10^{-6} x$	0.999 1	0.02
β -胡萝卜素	0 ~ 20	$y = 8 \times 10^{-6} x$	0.996 7	0.05

2.2 卤虫样品前处理的优化

2.2.1 提取溶剂的选择

由于样品的基质、含水率以及类胡萝卜素的组成不同,不同的提取溶剂对于不同样本的提取效率有所不同,因此提取溶剂的选择是十分必要的^[26]. 选取 6 种不同的提取溶剂,比较不同提取溶剂对同一批卤虫初孵无节幼体样本中类胡萝卜素的提取效果(表 2).

表 2 提取溶剂对卤虫初孵无节幼体类胡萝卜素提取效果的影响 (n = 3)

Tab. 2 Effects of extraction solvent on the extraction of carotenoids in newly hatched *Artemia nauplii* (n = 3)

提取溶剂	虾青素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	玉米黄质/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	角黄素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	海胆酮/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	β -胡萝卜素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
丙酮-甲醇(体积比为 2 : 1)	—	—	526.50 ± 6.78^a	17.22 ± 0.05^a	—
乙醇-石油醚(体积比为 1 : 1)	—	—	458.81 ± 0.54^b	12.03 ± 0.21^c	—
丙酮-石油醚(体积比为 3 : 7)	—	—	449.88 ± 1.65^c	11.22 ± 0.13^d	—
丙酮-乙腈(体积比为 3 : 2)	—	—	427.88 ± 2.27^c	11.22 ± 0.13^d	—
正己烷-丙酮-乙醇(体积比为 2 : 1 : 1)	—	—	452.90 ± 0.63^c	12.06 ± 0.08^c	—
丙酮-乙醇(体积比为 1 : 1)	—	—	436.48 ± 1.62^d	12.77 ± 0.04^b	—

注: —表示未检出

丙酮-甲醇(体积比为 2 : 1)对卤虫样品中类胡萝卜素的提取能力最好,对角黄素和海胆酮的提取量(以干质量计)分别为 $(526.50 \pm 6.78) \mu\text{g/g}$ 和 $(17.22 \pm$

$0.05) \mu\text{g/g}$,显著高于其他混合提取溶剂($P < 0.05$).

6 种提取溶剂均未能从卤虫初孵无节幼体中提取并检测到虾青素、玉米黄质和 β -胡萝卜素,表明渤

海湾产卤虫休眠卵的初孵无节幼体中不含有虾青素、玉米黄质和 β -胡萝卜素。

2.2.2 超声波处理时间对提取效率的影响

超声波具有机械效应、空化效应及热效应, 通过破坏细胞, 增加提取溶剂分子的运动速率以增强溶剂穿透力, 达到快速提取目标成分的目的^[20]。但超声时

间过长、强度过大会导致空化过程中羟自由基和氢自由基的形成和积累, 从而导致类胡萝卜素的降解^[27]。如表 3 所示: 超声波处理 30 min 对卤虫初孵无节幼体内角黄素和海胆酮的提取量均显著高于其他组别 ($P < 0.05$), 角黄素和海胆酮最高提取量 (以干质量计) 为 $(526.50 \pm 6.78) \mu\text{g/g}$ 和 $(17.22 \pm 0.05) \mu\text{g/g}$ 。

表 3 超声波处理时间对卤虫初孵无节幼体内类胡萝卜素提取效率的影响 ($n = 3$)

Tab. 3 Effects of ultrasound time on the extraction efficiency of carotenoids in newly hatched *Artemia nauplii* ($n = 3$)

超声时间/min	虾青素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	玉米黄质/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	角黄素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	海胆酮/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	β -胡萝卜素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
0	—	—	507.27 ± 8.12^b	16.95 ± 0.14^a	—
15	—	—	511.86 ± 6.61^{ab}	16.94 ± 0.08^a	—
30	—	—	526.50 ± 6.78^a	17.22 ± 0.05^a	—
60	—	—	489.74 ± 15.20^c	16.40 ± 0.17^b	—
90	—	—	471.30 ± 6.56^d	16.05 ± 0.14^c	—
120	—	—	444.43 ± 3.51^e	15.48 ± 0.38^d	—

注: —表示未检出

2.2.3 浸提温度及时间对提取效率的影响

提高浸提温度可以增加分子运动速率, 并且可以使有机试剂挥发速度加快, 使封闭的提取环境内的压强增大, 加快提取效率, 但是温度过高会使类胡萝卜素发生降解, 因此选择合适的浸提温度和浸提时间对提高回收率十分重要。浸提温度和时间对色素提取效率均有极显著影响 (表 4), 且两个因素之间存在交互作用 (表 5), 在 65°C 提取 20 min, 角黄素和海胆酮的提取量 (以干质量计) 最高, 分别为 $(575.89 \pm 2.30) \mu\text{g/g}$ 和 $(17.96 \pm 0.16) \mu\text{g/g}$ 。

表 4 浸提时间和温度对卤虫初孵无节幼体角黄素和海胆酮提取效率的影响 ($n = 3$)

Tab. 4 Effects of extraction time and temperature on the extraction efficiency of canthaxanthin and echinone in newly hatched *Artemia nauplii* ($n = 3$)

时间/min	温度/ $^\circ\text{C}$	角黄素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	海胆酮/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
10	25	513.19 ± 0.82^k	12.42 ± 0.04^b
	35	522.26 ± 1.22^j	13.98 ± 0.15^e
	45	531.42 ± 1.00^h	15.75 ± 0.15^d
	55	545.70 ± 0.77^f	16.20 ± 0.13^c
	65	558.98 ± 1.31^{cd}	17.02 ± 0.11^b
20	25	541.47 ± 1.62^g	14.68 ± 0.12^{ef}
	35	564.26 ± 2.30^b	14.71 ± 0.08^{ef}
	45	559.54 ± 3.05^c	15.99 ± 0.04^{cd}
	55	557.27 ± 1.64^{cd}	16.09 ± 0.05^c
	65	575.89 ± 2.30^a	17.96 ± 0.16^a
40	25	528.78 ± 1.64^{hi}	14.40 ± 0.09^f
	35	526.20 ± 2.30^i	14.90 ± 0.10^e
	45	539.44 ± 1.57^e	16.14 ± 0.13^c
	55	555.67 ± 1.01^{de}	16.14 ± 0.13^b
	65	552.82 ± 1.95^c	17.85 ± 0.41^a

表 5 方差分析

Tab. 5 Variance analysis

类别	因素	Ⅲ类平方和	自由度	均方	F	显著性
角黄素	时间	12 311.46	2	6 155.73	641.3	**
	温度	9 809.59	4	2 452.39	255.49	**
	交互	2 555.34	8	319.42	33.28	**
	误差	287.97	30	9.59		
	总计	26 192 169.88	45			
海胆酮	时间	2.19	2	1.09	194.23	**
	温度	20.74	4	5.19	920.93	**
	交互	1.46	8	0.18	32.44	**
	误差	0.17	30	0.006		
	总计	2 792.52	45			

2.2.4 不同脱脂方法对提取效率的影响

由于有些样品细胞壁较厚, 在匀浆或研磨过程中不易被完全破坏, 使胡萝卜素无法完全释放, 并且有些样品中脂肪含量较高, 如果不进行皂化, 会出现提取不完全和提取时出现乳化现象, 浓缩时残留脂质, 因此对于不同样本中类胡萝卜素的提取, 应选择适宜的脱脂方法。如表 6 所示: 直接提取对于角黄素的提取量显著高于酶解组和皂化组 ($P < 0.05$), 为 $(572.60 \pm 11.60) \mu\text{g/g}$ 。由于酶解和皂化过程延长了样品在碱性和高温条件下的处理时间, 加速了样品中角黄素的降解, 导致角黄素的提取效率降低, 而不同脱脂方法对于海胆酮的提取效率均无显著性影响 ($P > 0.05$), 因此对于卤虫样品选择直接提取即可。

2.2.5 加标回收率和精密度

按照 1.2.4 节的方法测定方法的回收率和精密度 (以相对标准偏差表示), 实验结果见表 7。3 种不同浓度水平的虾青素的加标回收率 99.36% ~ 100.32%, 精密度 0.75% ~ 1.72%; 玉米黄质的加标回收率

98.33% ~ 100.46%, 精密度 0.85% ~ 1.43%; 角黄素的加标回收率 99.40% ~ 100.40%, 精密度 0.97% ~ 1.83%; 海胆酮的加标回收率 99.11% ~ 100.95%, 精密

度 0.84% ~ 1.49%; β -胡萝卜素的加标回收率 99.58% ~ 100.36%, 精密度 0.37% ~ 0.88%. 这表明方法的回收率好, 精密度高.

表 6 不同脱脂方法对卤虫初孵无节幼体内类胡萝卜素提取效率的影响 ($n=3$)

Tab. 6 Effects of different degreasing methods on the extraction efficiency of carotenoids in newly hatched *Artemia nauplii* ($n=3$)

脱脂方法	虾青素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	玉米黄质/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	角黄素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	海胆酮/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	β -胡萝卜素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
直接提取	—	—	572.60 ± 11.60^a	18.02 ± 0.41	—
酶解	—	—	545.10 ± 5.86^b	17.72 ± 0.06	—
皂化	—	—	486.36 ± 5.92^c	18.11 ± 0.18	—

注: —表示未检出

表 7 方法的回收率和精密度 ($n=6$)

Tab. 7 Method recoveries and relative standard deviations ($n=6$)

组分	回收率/%			相对标准偏差/%		
	3 μg	6 μg	12 μg	3 μg	6 μg	12 μg
虾青素	100.07	100.32	99.36	0.97	1.72	0.75
玉米黄质	98.33	100.46	99.24	1.00	1.43	0.85
角黄素	99.40	100.40	100.98	0.97	1.83	1.42
海胆酮	100.50	100.95	99.11	1.49	0.91	0.84
β -胡萝卜素	99.58	100.36	99.59	0.37	0.88	0.58

3 结 论

建立了超高效液相色谱(UPLC)测定卤虫体内类胡萝卜素的方法. 采用丙酮-甲醇(体积比为 2 : 1)溶剂直接提取, 超声 30 min, 65 °C 浸提 20 min, 可最大程度提取卤虫无节幼体中的角黄素和海胆酮. 梯度洗脱条件优化为: 初始流动相为 10% A(超纯水) + 90% C(甲醇与乙腈体积比为 3 : 7) 16 min, 20% B(甲基叔丁基醚) + 80% C(甲醇与乙腈体积比为 3 : 7) 14 min, 流量为 0.30 mL/min, 柱温为 25 °C, 检测波长 475 nm, 进样量 10 μL , 能在 30 min 内有效分离检测到 5 种类胡萝卜素, 虾青素、玉米黄质、角黄素、海胆酮、 β -胡萝卜素的保留时间分别为 4.20、5.98、11.84、20.42、22.43 min, 且峰形良好, 间距清晰. 在 0 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内 5 种类胡萝卜素峰面积和质量浓度呈线性关系, 相关系数均大于 0.996 7. 对 5 种类胡萝卜素的加标回收率为 98.33% ~ 100.98%, 精密度为 0.37% ~ 1.83%. 提取条件优化实验表明, 产自渤海湾的卤虫初孵无节幼体角黄素和海胆酮的提取量(以干质量计)分别为 $(572.60 \pm 11.60) \mu\text{g}/\text{g}$ 和 $(18.02 \pm 0.41) \mu\text{g}/\text{g}$, 且未检测到虾青素、玉米黄质和 β -胡萝卜素.

参考文献:

[1] BRITTON G, LIAAEN-JENSEN S, PFANDER H, et al.

Carotenoids: biosynthesis and metabolism[J]. Quarterly review of biology, 1998, 76(2) : 393900.

[2] MERCHIE G, KONTARA E, LAVENS P, et al. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) [J]. Aquaculture research, 1998, 29(8) : 579-585.

[3] PARISENTI J, BEIRAO L H, MARASCHIN M, et al. Pigmentation and carotenoid content of shrimp fed with *Haematococcus pluvialis* and soy lecithin [J]. Aquaculture nutrition, 2011, 17(2) : 530-535.

[4] WANG W L, ISHIKAWA M, KOSHIO S, et al. Effects of dietary astaxanthin supplementation on juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. Aquaculture, 2018, 491: 197-204.

[5] ZHU S, PORTMAN M, CLEVELAND B M, et al. Replacing fish oil and astaxanthin by microalgal sources produced different metabolic responses in juvenile rainbow trout fed 2 types of practical diets [J]. Journal of animal science, 2021, 99(1) : 403.

[6] 林秀春. 卤虫的应用及存在问题 [J]. 莆田高等专科学校学报, 1999(4) : 15-18.

[7] YABUZAKI J. Carotenoids database : structures , chemical fingerprints and distribution among organisms [J]. Database, 2017, 2017(1) : bax004.

[8] 邹德喜, 严彪, 李贺. 不同品种沙棘果实的 β -胡萝卜素测定与分析 [J]. 辽宁农业科学, 2013(3) : 22-24.

[9] 兰韬, 闫娜, 裴栋, 等. 高效液相色谱法测定鸡蛋、鸡肉中五种类胡萝卜素物质 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(20) : 261-267.

[10] OUYANG M, HUANG Y, WANG Y, et al. Stability of carotenoids and carotenoid esters in pumpkin (*Cucurbita maxima*) slices during hot air drying [J]. Food chemistry, 2021, 367: 130710.

[11] CARDENAS-TORO F P, ALCAZAR-ALAY S C, COUTINHO J P, et al. Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: experimental and economical evalu-

- ation[J]. Food and bioproducts processing, 2015, 94: 90-100.
- [12] BHUDSAWAN H, SAKAMON D. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: extraction of carotenoids from carrot peels[J]. Journal of food engineering, 2014, 126: 17-26.
- [13] YAN F, FAN K, JIE H E, et al. Ultrasonic-assisted solvent extraction of carotenoids from rapeseed meal: optimization using response surface methodology[J]. Journal of food quality, 2016, 38(6): 377-386.
- [14] STRATI I F, GOGOU E, OREOPOULOU V. Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste[J]. Food and bioproducts processing, 2015, 94: 668-674.
- [15] HOSSEINI S R P, TAVAKOLI O, SARRAFZADEH M H. Experimental optimization of SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Dunaliella sauna*[J]. Journal of supercritical fluids, 2017, 121: 89-95.
- [16] SOWBHAGYA H B, CHITRA V N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2010, 50(2): 146-161.
- [17] 张海涛, 蒋文艳, 淡瑞芳. 胡萝卜粉中类胡萝卜素的提取工艺优化[J]. 甘肃农业大学学报, 2012, 47(5): 139-142.
- [18] 郑坚强, 叶豪, 司俊玲, 等. 响应面优化萃取宁夏枸杞类胡萝卜素工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 197-201.
- [19] 王岁楼, 谢雯丽. 红辣椒中类胡萝卜素提取方法及工艺条件优化研究[J]. 农产品加工, 2020(21): 39-41.
- [20] 李小玉, 肖丽凤, 杨懋勋. 超声萃取-超高效液相色谱法快速测定烤烟中的类胡萝卜素[J]. 化工时刊, 2019, 33(12): 10-13.
- [21] 倪玉洁, 马文霞, 谢倩, 等. 超声辅助提取福橘果皮类胡萝卜素的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 162-167.
- [22] 蒋耀瑛, 霍湘芸, 董子钰, 等. 红叶石楠提取类胡萝卜素的工艺条件研究[J]. 农产品加工, 2020(1): 29-31.
- [23] 孔凡华, 徐佳佳, 郭倩, 等. 高效液相色谱法测定虾青素油中虾青素的含量[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(6): 214-220.
- [24] YUAN J P, CHEN F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. Food chemistry, 2000, 68(4): 443-448.
- [25] 苏芳. 类胡萝卜素在藻虾蟹鱼中的结构分布特征及虾青素异构化研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2018: 23-24.
- [26] SAINI R K, KEUM Y S. Carotenoid extraction methods: a review of recent developments[J]. Food chemistry, 2018, 240: 90-103.
- [27] PINGRET D, FABIANO-TIXIER A S, CHEMAT F. Degradation during application of ultrasound in food processing: a review[J]. Food control, 2013, 31(2): 593-606.

责任编辑: 郎婧

(上接第8页)

- [37] SÁNCHEZ-OSUNA M, CORTÉS P, LEE M, et al. Non-canonical LexA proteins regulate the SOS response in the Bacteroidetes[J]. Nucleic acids research, 2021, 49(19): 11050-11066.
- [38] SASSANFAR M, ROBERTS J W. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*: the involvement of DNA replication[J]. Journal of molecular biology, 1990, 212(1): 79-96.
- [39] HIGUCHI K, KATAYAMA T, IWAI S, et al. Fate of DNA replication fork encountering a single DNA lesion during oriC plasmid DNA replication in vitro[J]. Genes to cells, 2003, 8(5): 437-449.
- [40] D'ARI R. The SOS system[J]. Biochimie, 1985, 67(3/4): 343-347.
- [41] RADMAN M. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis[EB/OL]. [2022-04-03]. <https://www.osti.gov/biblio/4213519>.
- [42] BRIDGES B A. Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis: II: the inducible SOS hypothesis[J]. DNA repair, 2005, 4(6): 725-739.
- [43] ZHAO X, DRLICA K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress[J]. Current opinion in microbiology, 2014, 21: 1-6.

责任编辑: 郎婧