

南美白对虾不同部位虾青素的提取及特征分析

齐宇¹, 贾喆², 宋茹^{2*} (1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316022; 2. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江舟山 316022)

摘要 [目的]以南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象,研究不同部位虾青素总量、游离型和酯型虾青素相对含量。[方法]分别采用 37 °C 水浴振荡和超声法提取南美白对虾的虾壳、虾壳和虾肉中的虾青素,确定特征吸收波长,分析不同部位和提取方法对虾青素提取效果影响,高效液相色谱法分析游离型和酯型虾青素相对含量。[结果]不同部位南美白对虾的虾青素在 477 nm 均有特征吸收,虾膏中虾青素含量最高,水浴振荡法提取的虾青素总量为(244.92 ± 36.62) μg/g,高于超声提取法的(155.49 ± 7.47 μg/g)。虾膏中酯型虾青素相对含量高于游离型虾青素的相对含量,虾壳中游离型和酯型相对含量接近,而虾肉中则是游离型虾青素相对含量高于酯型虾青素。[结论]南美白对虾不同部位的虾青素组成不同。

关键词 南美白对虾; 虾青素; 不同部位; 提取; 游离型; 酯型

中图分类号 S986 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)18-0188-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.18.051



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Analysis of Extraction and Characteristics of Astaxanthin Derived from Different Parts of *Litopenaeus vannamei*

QI Yu¹, JIA Zhe², SONG Ru^{2*} (1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022; 2. School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract [Objective] *Litopenaeus vannamei* was used as materials, the total astaxanthin (Asta) contents of different parts of *L. vannamei*, as well as the relative contents of free asta and asta esters were investigated. [Method] The methods of 37 °C water bath shaking and 37 °C ultrasonic extractions were performed to extract total asta from shrimp paste, shell and meat. The specific absorbance of asta extracts was assayed. Further, the effects of different extraction parts and methods on the asta content were investigated. [Results] All extracts of *L. vannamei* showed specific absorbance at 477 nm. The highest asta content was detected in the shrimp paste. The total asta content extracted by water bath shaking was (244.92 ± 36.62) μg/g, higher than that of (155.49 ± 7.47) μg/g by ultrasonic extract. Moreover, the shrimp paste had higher relative content of asta esters than free asta. The shrimp shell showed similar relative contents in free asta and asta esters. By comparison, the shrimp meat demonstrated higher relative content of free asta than asta esters. [Conclusion] *L. vannamei* has different asta composition in different parts.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Asta; Different parts; Extraction; Free asta; Astaxanthin ester

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)学名凡纳滨对虾,属于节肢动物门甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、对虾科(Penaeidae)、对虾属(*Penaeus*)、*Litopenaeus*亚属^[1-2]。南美白对虾生长速度快、繁殖周期长,与中国对虾和斑节对虾被称作世界产量较高的三大类养殖虾,也是产量较大的一种养殖虾。南美白对虾的营养价值很高,其中干基蛋白质的含量高达90%,脂肪含量仅为1%,并且富含多种矿物质元素^[2-3]。虾青素(astaxanthin),分子式C₄₀H₅₂O₄,化学名称3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β,β'-胡萝卜素,存在于许多水生动物体内^[4]。虾青素除了具有超强的抗氧化性外,还具有抗癌变和增强免疫等活性^[5]。天然虾青素可以从雨生红球藻和法夫酵母中获取,而虾加工副产物中的虾壳和虾头同样含有虾青素^[6]。但是,关于虾壳、虾头和虾肉中虾青素的分布情况研究还鲜见报道。因此,该研究以南美白对虾为研究对象,比较水浴振荡和超声提取对南美白对虾的虾膏、虾壳和虾肉中虾青素提取效果影响,分析虾青素提取物中游离型和酯型虾青素的相对含量,旨在为南美白对虾的虾青素综合提取及后续活性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

基金项目 国家重点研发计划(2018YFD0901105)。

作者简介 齐宇(1995—),女,辽宁阜新,硕士研究生,研究方向:水产品综合利用。*通信作者,教授,博士,博士生导师,从事水产品加工与贮藏、食品化学与营养方面研究。

收稿日期 2020-01-17

市;无水乙醇,分析纯,购于国药集团;二氯甲烷、甲醇、乙腈均为色谱纯,购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;虾青素标准品,购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 虾青素的提取。冻藏的南美白对虾经流动水解冻,手工剥离虾壳和虾膏,虾壳和虾膏在蒸锅中蒸3 min至变红,虾肉在蒸锅中蒸5 min至肉变红。将虾壳和虾肉分别打碎,取2 g按照1:5(m:V)比例加入10 mL无水乙醇,分别采用水浴振荡(37 °C, 1 h)和超声提取(37 °C, 1 h)2种方式提取虾壳和虾肉中虾青素,虾膏单独用水浴振荡(37 °C, 1 h)提取。混合物经6 000 r/min离心10 min,取上清液用无水乙醇定容至15 mL,备用。提取1次后的虾壳、虾膏和虾肉残渣在相同条件下继续提取2次,上清液定容至15 mL,备用。

1.2.2 总虾青素含量的测定。水浴振荡和超声提取1次的虾膏、虾壳和虾肉虾青素分别在200~800 nm进行紫外可见波谱扫描,确定特征吸收波长。将10 mg虾青素标准品用无水乙醇定容至100 mL棕色容量瓶中,制备100 μg/mL虾青素标准储备液。将虾青素标准储备液用无水乙醇稀释成1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、16.0、32.0 μg/mL虾青素使用液,以无水乙醇调零,测定特征波长下吸光度,绘制虾青素标准曲线。

1.2.3 游离型和酯型虾青素的测定。采用高效液相色谱法^[7]分析虾壳和虾肉中游离型和酯型虾青素含量。具体方法如下:Agilent1260高效液相色谱仪,ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,柱温25 °C,进样量10 μL,

流速 1 mL/min, 0~10 min 用 100% 流动相 A (二氯甲烷: 甲醇: 乙腈: 水 = 5: 85: 5.5: 4.5) 洗脱, 11~35 min 用 100% 流动相 B (二氯甲烷: 甲醇: 乙腈: 水 = 22: 28: 45.5: 4.5) 洗脱。虾青素标准品 (32 $\mu\text{g/mL}$) 在相同条件下洗脱。

1.3 数据统计分析 测定结果采用平均值 \pm 标准差 ($n=3$) 形式来表示, 用 SPSS 19.0 软件进行组间显著性差异比较 ($P<0.05$)。采用 Origin 2019 软件绘制图形。

2 结果与分析

2.1 提取方法和提取次数对南美白对虾虾青素提取效果的影响

2.1.1 紫外可见光谱扫描结果。 分别用 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡和 37 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取南美白对虾的虾膏、虾壳和虾肉中虾青素, 提取液的紫外可见扫描图谱如图 1 所示。由图 1 可知, 南美白对虾不同部位的虾青素提取物均在 477 nm 处出现特征吸收峰, 与杨霞等^[8]报道结果一致。此外, 不同部位南美白对虾的虾青素提取液在 220 和 280 nm 出现与蛋白质、肽类或氨基酸相关吸收峰, 推测与提取体系中含有一定量水 (虾本身含水量高), 结果水溶性或者疏水性蛋白质、肽类或氨基酸被同时提取出来有关。

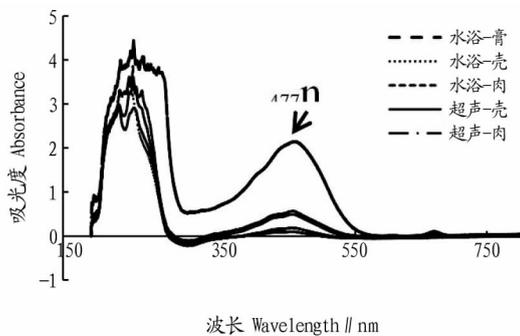


图 1 南美白对虾不同部位的虾青素提取物紫外可见扫描图谱

Fig.1 UV-visible scanning of astaxanthin extracts from *L.vannamei* different parts

2.1.2 提取方法对虾壳、虾膏和虾肉中总虾青素含量的影响。 从图 2 可以看出, 虾青素标准曲线为 $y=0.097x+0.0108$ ($R^2=0.9926$), 表明虾青素在 0~10 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 可用于提取液中虾青素总量的测定。

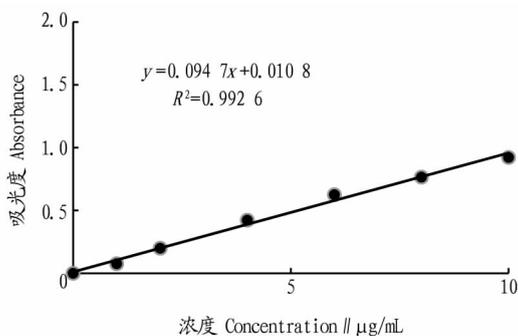
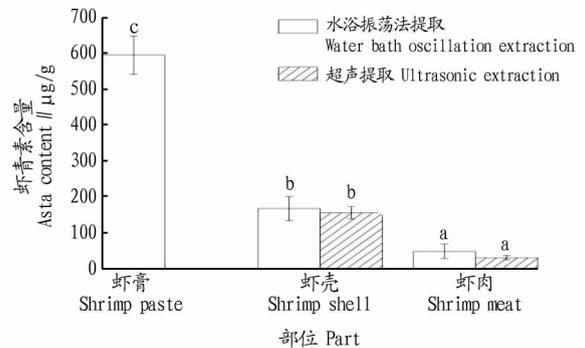


图 2 虾青素标准曲线

Fig.2 Standard curve of astaxanthin

比较水浴振荡和超声萃取的南美白对虾的虾膏、虾壳和虾肉中虾青素含量 (图 3) 发现, 水浴振荡法提取的虾膏中虾

青素含量最高 ($595.85 \pm 53.21 \mu\text{g/g}$), 其次为虾壳 ($168.64 \pm 33.54 \mu\text{g/g}$), 虾肉中虾青素含量最少 ($49.82 \pm 19.96 \mu\text{g/g}$)。超声波具有较好的破壁作用, 但是南美白对虾的虾壳和虾肉经超声提取后虾青素的含量分别为 (157.11 ± 17.09) 和 (31.93 ± 6.27) $\mu\text{g/g}$, 与水浴振荡法提取的虾青素含量无显著性差异 ($P>0.05$)。



注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

图 3 不同提取方法下南美白对虾的总虾青素含量比较

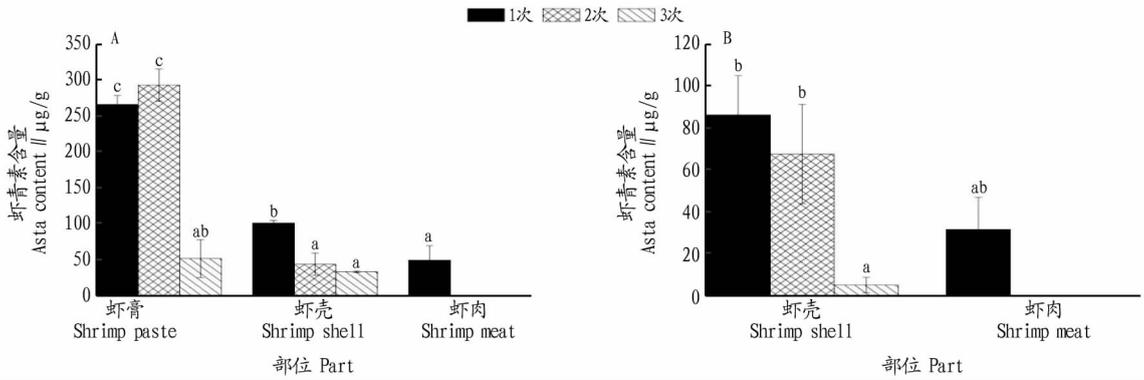
Fig.3 Comparison of total astaxanthin contents extracted by different methods from *L.vannamei* different parts

2.1.3 提取次数对虾膏、虾壳和虾肉中总虾青素含量的影响。 进一步研究了水浴振荡和超声提取次数对虾膏、虾壳和虾肉中虾青素提取效果的影响, 结果见图 4。从图 4 可以看出, 虾膏经水浴振荡提取 3 次时, 虾青素含量为 (52.01 ± 16.41) $\mu\text{g/g}$, 显著低于提取 1 次和 2 次的虾青素含量 ($P<0.05$)。水浴振荡下, 虾壳中虾青素提取 1 次后含量达到 (101.59 ± 3.52) $\mu\text{g/g}$, 显著高于提取 2 次的虾青素含量 ($44.12 \pm 15.49 \mu\text{g/g}$) ($P<0.05$), 虾肉中虾青素则是在提取 1 次后已经基本提取完全。在超声破壁作用下, 虾壳经 2 次提取后虾青素含量无显著性差异 ($P>0.05$), 虾肉中虾青素同样是提取 1 次后基本提取完全。但是, 值得注意的是超声法提取出来的虾壳总虾青素含量 ($159.79 \mu\text{g/g}$) 低于水浴振荡法提取的虾壳总虾青素含量 ($179.10 \mu\text{g/g}$)。虾青素分子具有多不饱和结构, 易受到光、热、氧等因素影响而发生降解^[5,9]。研究发现超声处理能够使全反式虾青素降解为无色未知物质, 而且这种降解作用随着超声功率的增大和作用时间的延长而加强^[9]。图 4 中虾壳和虾肉经过超声提取后, 总虾青素含量降低应与超声处理导致部分虾青素降解有关。

2.2 南美白对虾不同部位游离型和酯型虾青素含量比较 高效液相法分析水浴振荡法提取的南美白对虾的虾膏、虾壳和虾肉游离型和酯型虾青素分布, 结果见图 5。从图 5 可以看出, 虾青素标准品 (游离型) 在 8 min 附近有特征吸收峰, 根据洗脱时间定性可知南美白对虾的虾膏、虾壳和虾肉中均含有游离型虾青素。虾青素六元环上的羟基能够与脂肪酸结合形成虾青素脂肪酸酯^[8,10]。虾青素酯类在 477 nm 附近也有特征吸收, 但是因为疏水性高于游离型, 所以洗脱时间长, 出峰时间晚。结合文献报道^[7], 推测图 5 中 28~40 min

色谱峰应为酯型虾青素。通过积分峰面积得出,虾膏中游离型和酯型虾青素的相对含量分别为38%和62%,虾壳中游离型和酯型虾青素相对含量接近,而虾肉中游离型虾青素相对含量达

到60%。由此可见,南美白对虾的虾膏、虾壳和虾肉中虾青素存在形式具有差异性,游离型和酯型虾青素在南美白对虾的虾膏、虾壳和虾肉中比例分别为2:3、1:1和3:2。



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图4 水浴振荡法(A)和超声法(B)提取次数对南美白对虾不同部位虾青素提取效果的影响

Fig.4 Effect of extraction times of water bath oscillation method (A) and ultrasonic method (B) on the extraction effect of astaxanthin from different parts of *Penaeus vannamei*

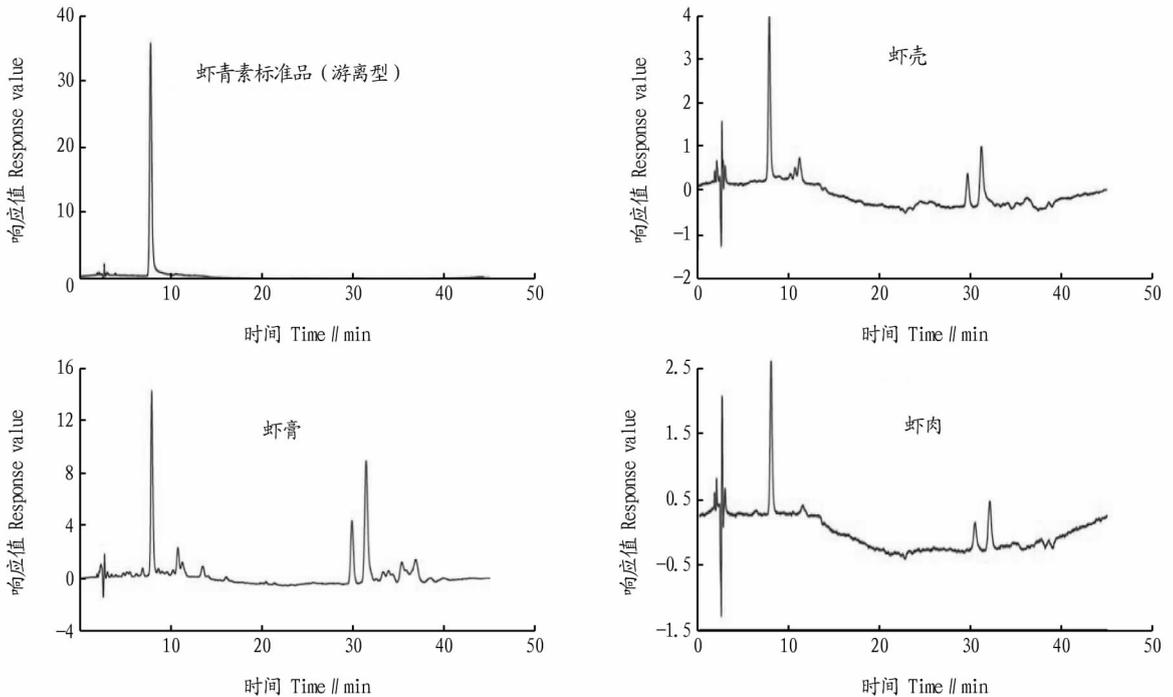


图5 白对虾不同部位游离型和酯型虾青素液相色谱图

Fig.5 HPLC of free astaxanthin and astaxanthin esters in different parts of *L. vannamei*

3 结论

南美白对虾的虾青素在477 nm有典型吸收峰,水浴振荡法提取的虾青素总量高于超声提取法。虾膏、虾壳和虾肉中均含有游离型和酯型虾青素,但是虾膏中虾青素以酯型为主,虾壳中游离型和酯型虾青素含量接近,虾肉中虾青素则以游离型为主。所以,南美白对虾不同部位的虾青素组成不同。

参考文献

- [1] 韦振娜. 凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)对植物蛋白源的利用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.
- [2] 蔡生力. 对虾养殖最新研究和进展——第三届世界华人虾类养殖研讨会综述[J]. 渔业现代化, 2002(2): 3-6.

- [3] 陈琴, 陈晓汉, 谢达祥, 等. 不同盐度养殖的南美白对虾含肉率及其肌肉营养成分[J]. 海洋科学, 2001, 25(8): 16-18.
- [4] 赵立艳. 雨生红球藻中虾青素的分离提取及其性质的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [5] HIGUERA-CIAPARA I, FÉLIX-VALENZUELA L, GOYCOOLEA F M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2006, 46(2): 185-196.
- [6] 张婧, 商建伟, 贺瑶, 等. 南美白对虾虾头中虾青素的提取工艺及稳定性[J]. 中国渔业质量与标准, 2014, 4(1): 43-52.
- [7] 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.

(下转第193页)

试验室检测分析要求。

2.3 方法重复性 分别称取含有胺鲜酯、多效唑、烯效唑的 3 批次样品,每批次样品称取 6 份,按该方法进行样品前处理,采用同样的色谱条件,对 6 份样品连续进样,结果见表 2。由表 2 可知,方法重复性符合一般色谱方法验证的要求。

表 2 方法重复性
Table 2 Method repeatability

植物生长调节剂 Plant growth regulator	样品平均含量 Sample average content//%	RSD (n=6) %
胺鲜酯 Diethyl aminoethyl hexanoate	0.171	4.84
多效唑 Paclobutrazol	4.794	4.44
烯效唑 Uniconazole	0.361	4.72

表 3 方法的加标回收率

Table 3 Standard recovery of the method

植物生长调节剂 Plant growth regulator	添加水平 Adding level mg	平均测定值 Average measured value//mg	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
胺鲜酯 Diethyl aminoethyl hexanoate	0.1	0.083 4	83.4	5.05
	0.5	0.480 5	96.1	5.56
	1.0	0.970 9	97.1	0.92
多效唑 Paclobutrazol	0.1	0.090 0	90.0	3.83
	0.5	0.481 7	96.3	1.62
	1.0	0.967 4	96.7	1.60
烯效唑 Uniconazole	0.1	0.080 6	80.6	5.67
	0.5	0.435 2	87.0	3.71
	1.0	0.960 7	96.1	1.02

3 结论

利用该试验建立的方法检测水溶肥料、有机肥料等多种肥料产品中植物生长调节剂含量,操作简单快捷、结果准确,可以推广到药肥产品中植物生长调节剂的检测,能够为促进肥料行业健康发展和政府的肥料监管工作提供技术依据。

参考文献

- [1] 何瑞,刘艾平,曹玉广.植物生长调节剂使用中的安全问题[J].中国卫生监督杂志,2003,10(2):99-101.
- [2] 夏循峰,胡宏.我国肥料的使用现状及新型肥料的发展[J].化工技术与开发,2011,40(11):45-48.
- [3] 吴燕,耿书德,史长江,等.DA-6 对滁菊幼苗生长及叶片氮代谢的影响[J].核农学报,2014,28(12):2283-2289.
- [4] 郑先福.剖析:植调剂“十个药害案例”[J].营销界(农资与市场),2013(18):36-39.
- [5] 王竞红,多多,多效唑对 6 种草坪草苗期抗旱性影响的研究[J].草业学报,2014,23(6):253-258.
- [6] 周永进,吴文革,许有尊,等.烯效唑对不同落谷密度机插水稻秧苗素质及产量的影响[J].南京农业大学学报,2014,37(5):19-26.
- [7] 成妙金,戴兰芳,祝木金.毛细管柱气相色谱法定量分析胺鲜酯[J].现代

2.4 方法的加标回收率 称取肥料样品(约 0.2 g),分别设高、中、低 3 个添加水平,每个水平 6 个重复。按该方法进行样品前处理,采用同样的色谱条件依次对样品进行检测,分别计算高、中、低 3 个浓度的加标回收率,结果见表 3。由表 3 可知,3 种植物生长调节剂在不同添加水平的平均回收率在 80.6%~97.1%,精密度(RSD)为 0.92%~5.67%,回收率及精密度均符合检测分析要求,能够满足肥料产品中植物生长调节剂的检测需求。

2.5 肥料样品检测 应用该试验建立的处理方法和条件,对市场上 100 批次肥料样品进行检测。结果显示,3 种植物生长调节剂均有检出,其中胺鲜酯的检出率最高,为 11%,说明在肥料中违禁添加植物生长调节剂的现象普遍存在。

代农药,2009,8(4):35-36.

- [8] 徐国锋,聂继云,李静,等.GC/ECD 测定葡萄中多效唑和烯效唑的残留[J].农药,2014,53(10):736-738.
- [9] 邵金良,樊建麟,林涛,等.高效液相色谱法同时测定果蔬中 5 种植物生长调节剂残留[J].食品安全质量检测学报,2015,6(8):3255-3261.
- [10] 张敏,闫超杰,付海滨,等.固相萃取净化-高效液相色谱测定水果中赤霉素,多效唑,烯效唑残留量[J].食品与发酵工业,2014,40(2):192-195.
- [11] 宋莹,张耀海,黄霞,等.气相色谱-串联质谱法快速检测水果中的多效唑残留[J].分析化学,2011,39(8):1270-1273.
- [12] 潘志明,周路明,黄琼,等.食品中胺鲜酯的气相色谱-质谱联用仪测定方法研究[J].世界科技研究与发展,2015,37(2):134-137.
- [13] MA L Y,ZHANG H Y,XU W T, et al.Simultaneous determination of 15 plant growth regulators in bean sprout and tomato with liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry[J].Food Anal Methods,2013,6(3):941-951.
- [14] 叶倩,黄健祥,孙玲,等.QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定叶类蔬菜中 5 种植物生长调节剂的残留[J].农药学报,2017,19(5):589-596.
- [15] 郭虹,任武洁,魏玉霞,等.分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 7 种植物生长调节剂[J].中国卫生检验杂志,2018,28(6):660-663.

(上接第 190 页)

- [8] 杨霞,张志胜,郑乾魏,等.超临界 CO₂ 萃取南美白对虾青素的工艺优化[J].农业工程学报,2013,29(S1):294-300.

- [9] 张丽瑶,张华敏,王志祥,等.超声处理对虾青素稳定性和抗氧化性的影响[J].食品与药品,2018,20(4):264-267.
- [10] 杨澍.南美白对虾中虾青素类化合物在贮藏及加工过程中变化规律的研究[D].青岛:中国海洋大学,2015.