

海藻中类胡萝卜素的提取及含量测定*

严小军 范 晓 娄清香 刘晓妹

(中国科学院海洋研究所)

崔玉军 吴真真 陆茂荪

(青岛大学)

许多研究已经表明,类胡萝卜素是分布最广泛、最重要的一类光辅助合成色素。类胡萝卜素具有多种生物学功能:作为化学保护剂可抵抗由植物自身叶绿素的光敏氧化作用引起的有害作用,给人体补充 β -胡萝卜素可有效降低心血管疾病和癌症的发生概率,高摄入富含类胡萝卜素的饮食和降低白内障发生的危险之间有重要联系(Bendich, 1993)。海藻中含有丰富的类胡萝卜素,从结构类型说,通常可以分为三类:胡萝卜素、叶黄素和类胡萝卜素酸。海藻中还含有多种特有的类胡萝卜素,如褐藻黄素、甲藻黄素、硅藻黄素等。直到目前为止,海藻中类胡萝卜素的组成与生理学功能尚没有明确的结论,因而对我国丰富的海藻资源中的类胡萝卜素进行较为系统和全面的化学及生物活性研究已成为摆在我们面前的一个重要课题。本研究选取我国青岛海滨三类大型经济海藻——红、绿、褐藻中资源量丰富的代表性种类作为实验材料,较系统地测定了其中类胡萝卜素的含量,并运用经典的柱层析法对各类胡萝卜素组分进行了分离,通过薄层分析和可见光谱扫描对各分离组分进行了定性、定量分析。

一、材料与amp;方法

1. 海藻的采集和前期处理

实验用的新鲜海藻系青岛海滨大量生长的代表性种类。采集到的样品经鉴定种、属后,用干净的海水洗涤干净,仔细除去海藻表面的附生物及杂质,用吸水纸将海藻表面的水分吸干,进行冷冻干燥,制成干品后待用(冷冻干燥机为 LGJ05 型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂生产)。实验海藻共有 12 种,其种类、采集时间和地点见表 1。

2. 样品的提取、纯化和含量测定

从天然物质中分离类胡萝卜素的方法主要由生物材料的性质、溶剂提取的难易性,

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3792 号。
国家“九五”攻关资助项目, 96-916-04 号。
收稿日期: 2000 年 1 月 5 日。

以及类胡萝卜素的性质和相对重量来决定 (Liaaen-Jensen, 1971)。通过对 Davies (1978), Goodwin (1971) 和 Liaaen-Jensen (1971) 等人的提取和纯化方法进行比较和综合。具体的实验操作方法如下: (1) 取冷冻干燥后的藻样研磨成粉末 (研磨过程中加入碳酸钙, 防止升温时色素被氧化破坏), 加入 90% 的丙酮, 密封遮光置于冰箱中浸泡过夜。将浸泡后的藻渣用丙酮反复抽提, 每浸泡 0.5h 抽提一次, 直至藻渣无色。将抽提液中的丙酮用旋转蒸发器低温蒸干, 仅留少许水相, 再用重蒸后的乙醚萃取水相中的色素, 并溶解出贴壁物; (2) 所得到的乙醚萃取液中加入 1/10 体积的 60% KOH 的甲醇溶液, 于暗处静置 1—2h 进行皂化 (绿、红藻可直接皂化), 皂化后, 在溶液中加入 5% 的 NaCl 溶液使溶剂分层, 上层醚相中含有类胡萝卜素; 下层水相中为皂化后的叶绿素。由于褐藻中含有较多不稳定的类胡萝卜素, 要预处理后才可皂化。褐藻的预处理方法为: 在所得到的乙醚萃取液中加入 84% 的甲醇萃取、分层, 上层醚相中含有叶绿素和类胡萝卜素 (稳定的类胡萝卜素), 可直接用于皂化, 方法同前; 下层醇相中含有叶黄素类 (不稳定的类胡萝卜素), 可通过加入乙醚和水来恢复, 再与皂化后所得的乙醚提取液合并。将皂化后所得到的乙醚相蒸干, 用石油醚 (b. p. 40—60℃) 定容, 采用分光光度法测定类胡萝卜素的总含量 (Jensen, 1978)。

3. 海藻中各种类胡萝卜素组分的柱层析分离

将提取出来的样品浓缩至 2 mL, 形成高浓度的溶液, 使样品均匀地吸附于硅胶柱 (30 mm × 200 mm, 硅胶 100—200 目, 青岛海洋化工厂)。洗脱液为正己烷和乙酸乙酯的梯度溶液, 分别为 1:1, 1:2, 1:3 (v:v), 逐渐增加洗脱液中极性溶剂的比例, 以便洗下吸附于柱上的极性较大的色素组分, 对于个别较难洗下的组分可用纯乙酸乙酯或含 1% 丙酮的乙酸乙酯溶液洗脱。由于类胡萝卜素本身具有比较明显的颜色, 故按不同颜色的色层来进行分离组分的收集, 收集到的组分用旋转蒸发器蒸干, 然后用丙酮溶解并定容至一定体积。将定容后的组分用遮光纸包住, 放在冰箱中保存, 待薄层分析和光谱测定用。层析板为硅胶 G 板 (尺寸为 50 mm × 100 mm, 青岛海洋化工厂), 展层剂为正己烷。

表 1 实验海藻采集的时间、地点

海藻名称	采集时间	采集地点
褐藻		
1. 鼠尾藻 (<i>Sargassum thunbergii</i>)	1998.4	青岛太平角
2. 海黍子 (<i>Sargassum kjellmanianum</i>)	1998.4	青岛太平角
3. 裙带菜 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	1998.4	青岛太平角
4. 海带 (<i>Laminaria japonica</i>)	1999.4	市售
红藻		
5. 条斑紫菜 (<i>Porphyra yezoensis</i>)	1999.4	青岛太平角
6. 石花菜 (<i>Gelidium amansii</i>)	1999.4	青岛太平角
7. 鸭毛藻 (<i>Symphycaradia latiuscula</i>)	1999.4	青岛太平角

续表 1

海藻名称	采集时间	采集地点
8. 金膜藻 (<i>Chrysomenia wrightii</i>)	1999.4	青岛太平角
绿藻		
9. 缘管浒苔 (<i>Enteromorpha linza</i>)	1998.4	青岛太平角
10. 刺松藻 (<i>Codium fragile</i>)	1999.4	青岛太平角
11. 小球藻 (<i>Chlorella</i> sp.)	1999.4	海洋所提供
12. 雨生红球藻 (<i>Haematococcus pluvialis</i>) [*]	1999.4	海洋所提供

* 为淡水种

4. 海藻中各种类胡萝卜素组分的光谱特性及定性定量分析

标准类胡萝卜素试剂为 α -胡萝卜素 (Sigma 公司)、 β -胡萝卜素 (Merck 公司)、玉米黄素 (Genay 公司)、 β -隐藻黄素 (Genay 公司)、角黄素 (Genay 公司)。褐藻黄素按照 Yan (1999) 从羊栖菜中分离纯化的方法制备。

各类胡萝卜素组分用 DU-650 型分光光度计 (美国 Beckmann 公司) 进行可见波长扫描, 确定特征吸收峰, 并测定最大吸收波长处的吸光度。根据各类胡萝卜素标准物的特征吸收峰 (Strain *et al.*, 1944; Davies, 1978; Goodwin, 1980) 薄层分析, 以及从吸附上洗脱时的相对位置来确定该色素, 并计算各色素的含量 (Davies, 1978)。

实验海藻中主要类胡萝卜素的最大吸收波长和比消光系数见表 2。

表 2 海藻中主要类胡萝卜素的最大吸收波长和比消光系数 (Davies, 1978)

类胡萝卜素名称	最大吸收波长/nm (溶剂为丙酮)	比消光系数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$
α -胡萝卜素	442—448	2710
β -胡萝卜素	449—454	2500
褐藻黄素	444—449	1600
叶黄素	445	2500
玉米黄素	449—452	2340
三色堇黄素	440—442	2400
β -隐藻黄素	450—453	2460
虾青素	472—480	2100
β -zeacarotene	425—428	1940

二、结果与讨论

1. 类胡萝卜素的总含量

表 3 为采用分光光度法分别对褐藻、红藻和绿藻中的几个代表性种类进行的类胡萝

卜素总含量的测定结果。绿藻中类胡萝卜素的总含量普遍高于褐藻和红藻，其中刺松藻中类胡萝卜素的含量最高，可达 4.56 mg/g（干重），缘管浒苔和小球藻中类胡萝卜素的含量分别为 2.10 mg/g（干重）和 3.00 mg/g（干重）；褐藻中海黍子和裙带菜的类胡萝卜素含量相对较高，分别为 1.80 mg/g（干重）和 1.86 mg/g（干重）；红藻中条斑紫菜和鸭毛藻的类胡萝卜素的含量相对较高，分别为 1.83 mg/g（干重）和 1.77 mg/g（干重）。因此，上述藻种可作为较重要的资源种。

表 3 海藻中类胡萝卜素的总含量/mg·g⁻¹干重

褐藻	总含量	红藻	总含量	绿藻	总含量
鼠尾藻	1.41	条斑紫菜	1.83	缘管浒苔	2.10
海黍子	1.80	石花菜	0.54	刺松藻	4.56
裙带菜	1.86	鸭毛藻	1.77	小球藻	3.00
海带	0.78	金膜藻	0.90	雨生红球藻	0.06

从表 3 中可看出，褐藻中海带和红藻中石花菜的类胡萝卜素含量相对较低，可能是由于这两种海藻的细胞壁上有很厚的胶质物，研磨时很难将其细胞壁磨碎，故不能彻底地释放所含的类胡萝卜素。类胡萝卜素可通过测定其在提取物中的吸光度来计算含量，但这种测定方法不是很精确。由于大多数类胡萝卜素的比消光系数在 2 500 附近，故在类胡萝卜素总含量的测定公式中取 2 500 作为平均比消光系数，但对于褐藻中的大量组分褐藻黄素来说，其比消光系数仅为 1 600，比 2 500 低得多，因此计算结果会造成褐藻中类胡萝卜素的含量均偏低，这属于实验的系统误差，应寻求更合理的计算公式（纪明侯，1997）。另外，由于实验中可能会受到光、氧、热、酸等一种或几种因素的影响，为了测定提取过程中藻样的损失率，实验中用了已知含量的 β -胡萝卜素标准物进行平行测定，得到该过程中的损失率约为 10% 左右，因此该实验方法会对实验结果造成一定偏差。

2. 类胡萝卜素的定性、定量分析

经过柱层析，将薄层层析和光谱分析数据与标品比较，海藻中各种类胡萝卜素组分的定性、定量分析结果见表 4（褐藻）、表 5（红藻）、表 6（绿藻）。由于部分纯化的类胡萝卜素没有标品参照，因此，表中列出的类胡萝卜素总量小于 100%，已知的类胡萝卜素占总量的 75%—90%，但金膜藻除外，它含有较多无法确定的类胡萝卜素，需要进一步确定。

表 4 褐藻中各种类胡萝卜素组分的含量分布/mg·g⁻¹干重和百分比/%

色素名称	鼠尾藻		海黍子		裙带菜		海带	
	含量	百分比	含量	百分比	含量	百分比	含量	百分比
褐藻黄素	0.724	51.3	0.680	37.8	1.141	61.3	0.475	60.9
β -胡萝卜素	0.078	5.5	0.110	6.1	0.158	8.5	0.065	8.3
三色萘黄素	0.213	15.1	0.292	16.8	—	—	0.112	14.4
角黄素	—	—	0.448	24.9	—	—	—	—
β -zeacarotene	—	—	—	—	0.186	10.0	—	—

表 5 红藻中各种类胡萝卜素组分的含量分布/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重) 和百分比/%

色素名称	条斑名称		石花菜		鸭毛藻		金膜藻	
	含量	百分比	含量	百分比	含量	百分比	含量	百分比
α -胡萝卜素	0.228	15.7	0.123	22.8	0.062	3.5	0.185	20.6
叶黄素	0.234	12.8	0.129	23.9	—	—	0.230	25.6
β -胡萝卜素	0.029	1.6	—	—	—	—	—	—
玉米黄素	0.621	67.9	—	—	—	—	—	—
三色堇黄素	—	—	0.194	35.8	0.579	32.7	—	—

表 6 绿藻中各种类胡萝卜素组分的含量分布/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重) 和百分比/%

色素名称	缘管浒苔		刺松藻		小球藻		雨生红球藻	
	含量	百分比	含量	百分比	含量	百分比	含量	百分比
α -胡萝卜素	0.067	3.2	0.159	3.5	0.078	2.6	—	—
β -胡萝卜素	0.132	6.3	0.335	7.4	0.786	26.2	—	—
玉米黄素	0.790	37.6	1.747	38.3	—	—	—	—
叶黄素	0.563	26.8	1.314	28.8	—	—	—	—
三色堇黄素	0.212	10.1	0.786	17.2	—	—	—	—
β -隐藻黄素	0.107	5.1	—	—	—	—	—	—
虾青素	—	—	—	—	—	—	0.045	75.0

从表中可以发现以下规律:

(1) 褐藻 (表 4) 在我们所研究的褐藻中类胡萝卜素种类较少, 且含量分布变化不大, 主要有褐藻黄素、 β -胡萝卜素、三色堇黄素。褐藻的特征色素——褐藻黄素是其区别于其他海藻的一个明显特征, 该色素约占其类胡萝卜素总含量的 40% 以上, 在海带目中甚至高达 60% 以上。在这些实验海藻中尚未发现 α -胡萝卜素。褐藻中的主要色素通常是 β -胡萝卜素、三色堇黄素和类胡萝卜素, 其中主要是褐藻黄素, 这一结果与 Jensen (1966) 的结果相似。

Jensen (1966) 认为, 褐藻中的胡萝卜素含量高于叶黄素类, 而褐藻黄素含量比胡萝卜素和其他叶黄素的总和都要多。在海带科和翅藻科中褐藻黄素含量超过了 50%, 但在马尾藻科中这一特点却不很明显, 其褐藻黄素的含量较少, 特别是海黍子的褐藻黄素含量不超过 40%, 并且在我们的实验结果中还发现叶黄素类的含量明显高于胡萝卜素类。

(2) 红藻 (表 5) 在我们研究的红藻中, 通常都含有 α -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄素, 只在紫菜中发现有 β -胡萝卜素, 且含量仅占 1.6%, 是 α -胡萝卜素的 1/10 左右, 而在其他几种红藻中未检测到 β -胡萝卜素, 推测可能是由于 β -胡萝卜素含量较低, 在提取过程中损失掉了, 或者是根本就不存在于这些红藻中。Strain (1958, 1966) 指出, 红藻中普遍存在的类胡萝卜素形式是碳氢化合物 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素, 以及它们相应的 3-羟基衍生物叶黄素和玉米黄素, 且都具有与高等植物相应色素相同的手性结构。我们的结果证实了这一结论。

这些色素之间一般在含量上有很大的差异, 如玉米黄素通常超过叶黄素, 而在红藻中却很少出现这种情况。 α -胡萝卜素是紫菜和石花菜中含量较多的胡萝卜素类色素,

其含量约占类胡萝卜素总量的 15%—20% 左右,而在鸭毛藻中其含量只有约 3.5%。叶黄素类的含量明显高于胡萝卜素类,其中玉米黄素一般在 30%—40%,而在紫菜中却占将近 70%,叶黄素通常在 20% 左右。在石花菜和鸭毛藻中还含有较大量的三色堇黄素。在这些红藻中胡萝卜素和叶黄素的比值从 1:1 到 1:9,变化范围很大。

(3) 绿藻 (表 6) 绿藻中类胡萝卜素含量较高,种类较为丰富,在这些实验绿藻中通常含有 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素、三色堇黄素和玉米黄素。结果表明,绿藻通常含有与高等植物叶绿体中相同的主要类胡萝卜素,有 β -胡萝卜素、叶黄素、三色堇黄素、新叶黄素和玉米黄素,结果与相关的文献报道一致 (Goodwin, 1971; Strain, 1966; Hager *et al.*, 1970)。玉米黄素是一种在高等植物叶绿体中偶尔含有的少量组分,但在绿藻门中却分布广泛。

α -胡萝卜素一般含量很少,约为 2%—3%, α -和 β -的比值在 1:2 左右,而在小球藻中该比值达到 1:10,可能是小球藻对于 β -胡萝卜素特异性富集的结果。叶黄素和玉米黄素是含量较高的组分,各约占类胡萝卜素总量的 1/3。在缘管浒苔和松藻中胡萝卜素类与叶黄素类的比值稳定在 1:8 左右。在缘管浒苔中还出现了少量的 β -隐藻黄素,而在其他的绿藻中却未发现此色素。另外,淡水种的雨生红球藻中仅鉴定出虾青素,占类胡萝卜素总量的 75%,而其他分离得到的类胡萝卜素由于光谱特征不明显,无法加以确证。

参 考 文 献

- 纪明侯, 1997, 海藻化学, 科学出版社, 481—482.
- Bendich, A., 1993, Biological Functions of Dietary Carotenoids, *Ann. N. Y. Acad. Soc.*, 691: 61—63.
- Davies, B. H., 1978, Carotenoids, In: "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (Goodwin, T. W., ed.), Academic Press, London, Vol. 2, 2nd, 38—165.
- Goodwin, T. W., 1971, Algal carotenoids, In: "Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry" (Stewart, W. D. P., ed.), Blackwell Scientific Publications, London, 176—205.
- Goodwin, T. W., 1980, The biochemistry of the carotenoids, Chapman and Hall, London, 16—27.
- Hager, A. and H. Stransky, 1970, Das carotenoidmuster und die Verbreitung des lightinduzierten Xanthophyllecyclus in Verschiedenen Algenklassen, Grünalgen, *Arch. Microbiol.*, 72: 68—83.
- Jensen, A., 1966, Carotenoids of Norwegian brown seaweeds and of seaweed meals, *Norweg. Inst. Seaweed Res.*, Report No. 13: 25—54.
- Jensen, A., 1978, Chlorophylls and carotenoids, In: "Handbook of physiological methods" (Hellebust, J. A. *et al.*, ed.), Cambridge University Press, 59—70.
- Liaaen-Jensen, S., 1971, Isolation, Reactions - In: "Carotenoids" (Isler, O., ed.), Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 63—73.
- Strain, H. H., W. M. Manning and G. Hardin, 1944, Xanthophylls and carotenes of diatoms, brown algae, dinoflagellates, and sea-anemones, *Biol. Bull.*, 86: 169—191.
- Strain, H. H., 1958, Chloroplast pigments and chromatographic analysis, 32nd Annual Priestley Lecture, Penn. State Univ. Algal Physiology and Biochemistry (Stewart, W. D., ed.), Blackwell Scientific Publications, London, 176—205.
- Strain, H. H., 1966, Fat soluble chloroplast pigments: Their identification and distribution in various Australian plants, In: "Biochemistry of Chloroplasts" (Goodwin, T. W., ed.), Vol. 1, Academic Press, 387—406.
- Yan, X. J., 1999, Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed, *Biosci. Biochem.*

Biotechnol., 63: 605—607.

ISOLATION AND QUANTIFICATION OF CAROTENOIDS FROM MARINE ALGAE*

Yan Xiaojun, Fan Xiao, Lou Qingxiang, Liu Xiaomei

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences*)

Cui Yujun, Wu Zhenzhen, Lu Maosun

(*Qingdao University*)

ABSTRACT

Carotenoids are one group of the most widespread and important pigments, and one of the major sources of natural carotenoids is seaweed. By chemical extraction, chromatography and spectroscopy, identification and quantification of carotenoids were carried out in various seaweeds, including Chlorophyta, Rhodophyta and Phaeophyta. It was demonstrated that carotenoid content in green algae is the highest, usually two or three times more than the other two. The structural analogs of carotenoids in green algae are also more variable than those in red and brown algae. The major carotenoids are zeaxanthin and lutein in green algae, zeaxanthin and violaxanthin in red algae, fucoxanthin and violaxanthin in brown algae. Among the seaweeds investigated, *Codium fragile* is the most potential resources for carotenoids with high content and structural variations. The chemical composition and contents of carotenoids could be used as possible markers of chemotaxonomy in marine algae.

* Contribution No. 3792 from Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.