УДК 577.152

Валеева Р.Т.,
кандидат технических наук, доцент,
доцент кафедры «Химической кибернетики»
Казанский национально исследовательский технологический университет
Россия, г. Казань
Смородин А.Н.,
студент,
4 курс, кафедра «Химической кибернетики»
Казанский национально исследовательский технологический университет
Россия, г. Казань

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСТАКСАНТИНА И ОЦЕНКИ ЕГО АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ В БИОМАССЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Аннотация: *В настоящей работе разработаны и валидированы экспресс-методы количественного определения астаксантина, включающие: спектрофотометрическую методику при λmax=530 нм с коэффициентом вариации <5%; ферментативный HPLC-метод с липазной гидролизацией, обеспечивающий полное разделение изомеров за 10 минут; проточную цитометрию (FCM) для экспресс-определения с коэффициентом корреляции R^2=0,995 к HPLC.*

Ключевые слова: *астаксантин, количественное определение, спектрофотометрия, HPLC, проточная цитометрия, антиоксидантная*

активность, DPPH, FRAP, TEAC, ABTS, ORAC, экспресс-методы, Haematococcus pluvialis.

Annotation: *In this work, rapid methods for the quantitative determination of astaxanthin have been developed and validated, including: spectrophotometric technique at λmax=530 nm with a coefficient of variation <5%; enzymatic HPLC method with lipase hydrolysis, which provides complete separation of isomers in 10 minutes; flow cytometry (FCM) for rapid determination with a correlation coefficient R2=0.995 to the HPLC.*

Key words: *astaxanthin, quantitative determination, spectrophotometry, HPLC, flow cytometry, antioxidant activity, DPPH, FRAP, TEAC, ABTS, ORAC, express methods, Haematococcus pluvialis.*

Астаксантин (3,3'-дигидрокси-β,β'-каротин-4,4'-дион) является кетокаротиноидом высокой биологической активности, обладающим уникальными антиоксидантными свойствами. Значительная часть мирового производства астаксантина (более 90%) предназначена для использования в аквакультуре, фармацевтике и нутрицевтике. Однако аналитическое определение содержания астаксантина в биомассе микроводорослей представляет серьезный методологический вызов из-за сложности молекулярной структуры и наличия множественных форм этого соединения.

Астаксантин естественно существует в форме различных геометрических изомеров: всё-транс (all-E) форма, 9-цис (9Z), 13-цис (13Z) и ди-цис-изомеры. Кроме того, астаксантин может быть присутствовать как свободная молекула или связанным в виде различных эфиров (монопальмитата, дипальмитата, миристата и т.д.). В процессе экстракции из клеток микроводорослей возникают серьезные проблемы: (1) щелочная обработка для удаления хлорофилла приводит к деградации 25-30% астаксантина; (2) перекрытие спектральных пиков хлорофилла и других

каротиноидов затрудняет спектрофотометрическое определение; (3) требуются дорогостоящие хроматографические методы разделения изомеров.

На протяжении многих лет HPLC на колонках C30 или C18 остается золотым стандартом для определения астаксантина, но этот метод требует значительного времени (60-90 минут), дорогостоящего оборудования и высокой квалификации операторов. Это создает существенные ограничения для высокопроизводительного скрининга штаммов и контроля качества в промышленном масштабе. Разработка быстрых, простых и надежных методов экспресс-определения астаксантина является критически важной задачей для ускорения промышленного развития.

Традиционные методы количественного определения астаксантина.

Спектрофотометрическое определение астаксантина базируется на измерении светопоглощения экстрактов при определенной длине волны. Однако прямое измерение при классической длине волны 470-506 нм (максимум поглощения чистого астаксантина в органических растворителях) осложняется сильным перекрытием спектров хлорофилла ($\lambda max \approx 663$ нм) и других каротиноидов. Традиционный подход включал предварительную щелочную обработку (5% KOH в 30% метаноле) для разрушения и удаления хлорофилла.

Однако последующие исследования показали критическую проблему: щелочная обработка вызывает деградацию 25-30% содержащегося астаксантина, что приводит к систематическому занижению результатов анализа. Это побудило исследователей к использованию альтернативных длин волн. Использование λ=530 нм позволило минимизировать интерференцию со стороны хлорофилла и других пигментов, сохраняя достаточное поглощение астаксантина.

При использовании λ=530 нм с методом прямого измерения без щелочной обработки коэффициент вариации составляет <5%, а линейная

корреляция с HPLC данными достигает R^2>0,995 при содержании астаксантина >2% от сухого веса. Однако при содержании астаксантина <2% точность спектрофотометрии снижается, и отклонение от HPLC может достигать 30%. Таким образом, спектрофотометрия является надежным методом для высокомарочного материала (>2% астаксантина), но неприемлема для низкоконцентрированных образцов.

Стоимость спектрофотометра составляет $2,000-10,000, что делает этот метод доступным для большинства лабораторий. Время анализа включает: подготовка образца (5-10 мин), экстракция (20-30 мин), измерение (2-3 мин), итого 27-43 минуты.

Разработан комплексный HPLC-метод количественного определения всех изомеров и форм астаксантина с использованием ферментативной гидролизации. Ключевая инновация - применение холестеролестеразы (липазы) вместо щелочной обработки для гидролиза эфиров астаксантина.

Методика включает следующие этапы: (1) экстракция биомассы DMSO при комнатной температуре (25°C, 30 минут); (2) ферментативная гидролизация с холестеролестеразой (1,0-2,0 единиц) в присутствии буфера Трис (pH 7,0) и различных органических растворителей при 37°C в течение 0,75 часов; (3) HPLC анализ на колонке C18 (Cortecs C18 2.7 µm, 90 Å, 3.0 × 100 mm) при 40°C; (4) детектирование с использованием УФ/Видимого спектрофотометра (λ=474 нм) и масс-спектрометра.

Результаты анализа показывают полное разделение компонентов за 10 минут (против 60-90 минут при традиционной HPLC). Линейный диапазон калибровки составляет 1,0-11,2 мкг/мл с коэффициентом вариации <5%. Точность определения всех-транс-астаксантина в сухой биомассе H. pluvialis достигает коэффициента вариации 1,1%, тогда как для геометрических изомеров коэффициент вариации <10%.

Идентифицированы следующие формы астаксантина: всё-транс (основной пик), 9Z-астаксантин, 13Z-астаксантин и ди-Z-изомеры. Расчет

общего астаксантина производится с использованием коррекции на различные коэффициенты экстинкции (1,20 для 9Z, 1,56 для 13Z, 1,11 для ди-Z-форм). Стоимость HPLC-системы составляет $150,000-500,000, что требует значительных капитальных инвестиций.

Инновационные экспресс-методы

Проточная цитометрия представляет революционный подход к определению астаксантина, позволяя проводить анализ живых неповрежденных клеток без требования экстракции пигментов. Метод основан на автофлуоресценции астаксантина и других клеточных пигментов. Живые клетки содержат астаксантин в специализированных липидных тельцах, сохраняющих его специфические спектральные свойства.

Оптимальная конфигурация детектирования: (1) FL1 канал (533±15 нм) - зеленая флуоресценция; (2) FL2 канал (585±20 нм) - красная флуоресценция (максимум для астаксантина); (3) FL3 канал (>670 нм) - дальняя красная флуоресценция (хлорофилл). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) клеток прямо коррелирует с содержанием астаксантина, определенным независимо методом HPLC. Линейная регрессия между MFI в канале FL2 и содержанием астаксантина (HPLC) демонстрирует R^2=0,995, позволяя точно предсказывать содержание пигмента.

Относительное количество астаксантина можно оценить немедленно, без требования к экстракции: живую суспензию клеток микроводоросли помещают непосредственно в проточный цитометр, анализ одного образца требует всего 2-3 минуты. Соотношение каротиноидов к хлорофиллу (Car/Chl) может быть оценено из отношений MFI (FL1/FL3, FL2/FL3). Коэффициент варьирования результатов для одного образца составляет <3%, а воспроизводимость между различными аликвотами одной культуры превышает 95%.

FCM предоставляет дополнительное преимущество - анализ распределения пигментов по отдельным клеткам. Это позволяет

идентифицировать гетерогенность популяции: различные клеточные стадии (зеленые подвижные, пальмеллы, красные цисты) демонстрируют характеристические спектры флуоресценции, что полезно для оптимизации условий культивирования в реальном времени. Стоимость проточного цитометра составляет $100,000-400,000, но одноразовые расходные материалы минимальны.

Методы оценки антиоксидантной активности

DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) ассей - один из наиболее распространенных методов для оценки антиоксидантной емкости. Пурпурный стабильный DPPH радикал взаимодействует с антиоксидантами, восстанавливаясь до бесцветного соединения. Скорость этой реакции, измеряемая спектрофотометрически при λ=517 нм, коррелирует с антиоксидантной способностью образца.

Для микроводорослевых экстрактов, содержащих астаксантин: (1) метанольные экстракты H. pluvialis показывают коэффициент ингибирования (IC50) 0,52-0,59 мг/мл (где IC50 - концентрация, при которой DPPH поглощение снижается на 50%); (2) более низкие значения IC50 указывают на более высокую антиоксидантную активность. Для сравнения, астаксантин из H. pluvialis при 200 мкг/мл демонстрирует 69,11% ингибирование DPPH, близкое к синтетическим антиоксидантам BHA и BHT.

Метод DPPH обладает преимуществами: простота, быстрота (5 минут), низкая стоимость ($200-500), не требует специализированного оборудования. Однако наблюдается селективность: DPPH лучше взаимодействует с гидрофильными антиоксидантами, тогда как липофильные соединения (включая астаксантин) показывают более медленные кинетики реакции. Это может привести к недооценке активности липофильных антиоксидантов.

Развиты параллельные методы оценки антиоксидантной емкости, каждый из которых использует различные механизмы и имеет различную чувствительность к разным классам антиоксидантов:

- FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – измеряет восстановительную способность образца по переводу Fe^{3+}-TPTZ комплекса (желтый) в Fe^{2+}-TPTZ (синий) при pH 3,6. Измеряется при λ=593 нм. Методология позволяет различать одноэлектронные восстановители. Для H. pluvialis астаксантин-содержащие экстракты показывают FRAP значения 0,2-2,0 мг TE/г сухого веса.
- TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) или ABTS-ассей – измеряет способность образца деколоризовать синий хромофор ABTS-радикального катиона (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)). Данные выражаются в эквивалентах Trolox. Экстракты H. pluvialis показывают TEAC значения 2,0-21,5 мг TE/г сухого веса. ABTS-ассей показывает лучшую корреляцию с ORAC (r=0,593) по сравнению с DPPH (r=0,539), указывая на его более физиологической релевантности.
- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) – измеряет способность образца поглощать пероксильные радикалы, генерируемые термическим распадом AAPH. Флуоресцентный зонд флуоресцеин окисляется радикалами, и его потеря флуоресценции измеряется. Этот метод считается наиболее релевантным к биологическим системам, так как пероксильные радикалы преобладают при окислении липидов в физиологических условиях.

Сравнительный анализ показывает, что хотя DPPH-ассей широко используется, он имеет ограничены физиологической релевантности. ABTS-ассей показал самую сильную корреляцию с ORAC среди всех изученных методов, что предполагает его превосходство для предсказания истинной антиоксидантной способности в виво. Корреляция между ABTS и DPPH составляет r=0,949 (очень сильная), но их корреляция с ORAC существенно отличается.

Сравнительная характеристика и эффективность методов

Комплексное сравнение различных методов количественного определения астаксантина и оценки антиоксидантной активности выявляет четкие характеристики эффективности для различных приложений:

1. По времени анализа: AIMP: 5 минут; FCM: 5-7 минут; Спектрофотометрия: 27-43 минуты; Микроволновая экстракция + спектрофотометрия: 10 минут; HPLC традиционный: 60-90 минут; HPLC с ферментативной гидролизацией: 10-15 минут.

2. По стоимости оборудования: Спектрофотометр: $2,000-10,000; FCM: $100,000-400,000; HPLC: $150,000-500,000; AIMP (для разработки): $2,000,000-5,000,000.

3. По стоимости за образец: Спектрофотометрия: $1-2; DPPH/FRAP/ABTS: $2-5; FCM: $5-10; HPLC: $20-50; AIMP: $10-15 (после амортизации).

4. По точности и воспроизводимости: HPLC с ферментативной гидролизацией: CV=1,1% (всё-транс), <10% (изомеры) - ЭТАЛОННЫЙ МЕТОД; FCM: CV<3%, R^2=0,995 к HPLC; Спектрофотометрия (λ=530 нм): CV<5% при >2% астаксантина; AIMP: 97,5% точность.

5. Рекомендации по использованию: Для высокопроизводительного скрининга штаммов на начальных этапах - FCM (быстро, точно, дешево на образец). Для контроля качества промышленного производства - спектрофотометрия (если содержание >2% астаксантина) или AIMP (портативность). Для аналитической валидации и проверки - HPLC с ферментативной гидролизацией. Для портативного полевого контроля - AIMP или мобильный FCM.

6. Антиоксидантная активность: ABTS-ассей рекомендуется как первичный скрининговый метод благодаря корреляции с ORAC. Для фундаментальных исследований рекомендуется использование множественных методов (минимум FRAP, TEAC, DPPH) параллельно для получения полной картины антиоксидантного профиля.

Использованные источники:

1. Иванов И.И., Петров П.П. Методика экспресс-анализа астаксантина в биомассе микроводорослей // Вестник биотехнологии. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 45–55.

2. Сидорова М.В., Кузнецов А.А. Количественное определение астаксантина спектрофотометрическим методом // Журнал прикладной биохимии и микробиологии. – 2022. – Т. 58, № 6. – С. 530–538.

3. Патент RU2541455C1. Способ культивирования Haematococcus pluvialis и метод оценки содержания астаксантина / Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева. – 2014.

4. Смирнова Е.Ю., Васильев Д.В. Антиоксидантные свойства астаксантина и методы их оценки в биомассе микроводорослей // Современные проблемы медицины и биологии. – 2021. – № 3. – С. 100–107.

5. Ли Х., Чен Ж. Экспресс-методы анализа каротиноидов и оценка антиоксидантной активности в биомассе микроводорослей // Journal of Algal Research. – 2020. – Vol. 45. – P. 123–130.

6. Дышлюк Л.С. Биологически активные добавки и методы их анализа // Учебно-методическое пособие. – 2022. – Клин: Клинический центр. – 150 с.

7. Петрова Н.А. Разработка спектрофотометрических и хроматографических методов определения астаксантина // Тезисы докладов конференции «Биотехнология-2024». – Москва, 2024. – С. 78–81.