



## 膠囊錠狀食品中蝦紅素之檢驗方法探討

洪甄敏 吳白玟 張淑涵 高雅敏 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

### 摘要

蝦紅素(Astaxanthin)天然存在於藻類(如雨生紅球藻)及蝦蟹殼,亦可由微生物合成,具抗癌與抗發炎之潛在能力。衛生福利部訂定之「以基因改造大腸桿菌(*Escherichia coli*) Ast12菌株發酵生產之食品原料蝦紅素之使用限制及標示規定」中,每日食用限量以蝦紅素計為2 mg。未經水解之蝦紅素產品以高效液相層析儀配合光二極體陣列檢出器(HPLC-PDA)分析,可鑑別其為酯化型及游離型,惟酯化型蝦紅素難以精確定量,故本研究探討以酵素水解方式將酯化型蝦紅素水解成游離型,搭配內部標準品以HPLC-PDA分析建立膠囊錠狀中蝦紅素之檢驗方法。檢體以含0.1% 2,6-二丁基對甲酚(BHT)之丙酮溶液均勻分散,於超音波振盪萃取離心後,取上清液經膽固醇酯酶水解及石油醚萃取,收集上層液後以氮氣吹乾,經含0.1% BHT之丙酮回溶後,以YMC-Carotenoid C30 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm)管柱,搭配甲醇、甲基第三丁基醚及1%磷酸水溶液作為移動相,以流速1.0 mL/min於波長478 nm採用光二極體陣列偵測器檢測。結果顯示,酯化型蝦紅素經酵素作用可完全水解成游離型蝦紅素(包括13-*cis*、all-*trans*及9-*cis*)。確效試驗結果顯示,於粉狀及油狀之空白基質中分別添加以游離型蝦紅素計為2.5 mg/g、5.0 mg/g及12.5 mg/g之酯化型蝦紅素,其同日間平均回收率為92.9-111.2%,變異係數為2.5-4.8%;異日間平均回收率為90.2-107.2%,變異係數為4.4-7.0%,均符合衛生福利部食品藥物管理署食品化學檢驗方法之確效規範,顯示本方法之精密度與準確度均良好。以本方法檢測8件含蝦紅素之市售膠囊食品,檢驗結果皆符合「包裝食品營養標示應遵行事項」中營養標示值誤差允許範圍 $\geq$ 標示值之80%之規範。

**關鍵詞：**蝦紅素、高效液相層析儀、光二極體陣列檢出器、酵素水解

### 前言

#### 一、蝦紅素介紹

在自然界中面臨極度嚴苛的生存環境,藻類會啟動自我保護機制產生蝦紅素(Astaxanthin),絕大多數動物必須經由食用藻類才能獲得,並沉積在肌肉(如鮭魚)或蝦蟹外殼<sup>(1,2)</sup>。研究顯示蝦紅素具有抗氧化活性、抗

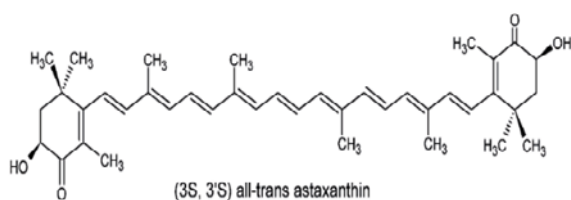
癌與降低血壓等潛在能力<sup>(3)</sup>。目前,市面上的蝦紅素主要分為化學合成及天然物萃取二種,化學合成的蝦紅素產率較高,但目前只能用於添加在飼料當中,並不允許被人體直接食用;天然物萃取的蝦紅素來源有酵母、藻類、魚蝦等,藻類以雨生紅球藻(*Haematococcus pluvialis*)所獲得的蝦紅素含量最高<sup>(1,4,5)</sup>。

蝦紅素屬於類胡蘿蔔素中的葉黃素類

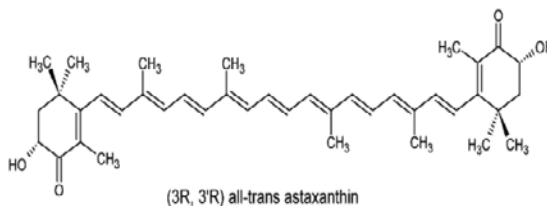
(Xanthophylls)，其結構與類胡蘿蔔素相似，包括以化學鍵結合成多種脂肪酸形成之游離型(Free form)以及單酯或雙酯之酯化型(Ester form)<sup>(6)</sup>。自然界中如蝦蟹、藻類多以穩定的酯

化型存在，並同時存在游離型，紅酵母、化學合成或基改大腸桿菌所產生之蝦紅素則以游離型存在<sup>(7-9)</sup>。蝦紅素及其酯類之化學結構如圖一，分為順式(*Cis*)或反式(*Trans*)之異構物，以

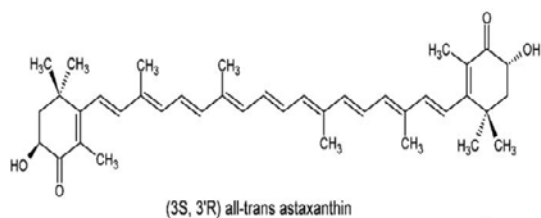
(A)



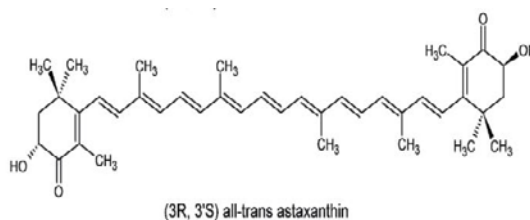
(B)



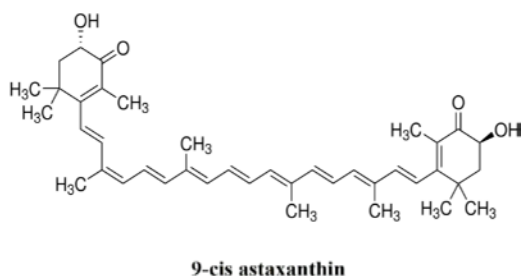
(C)



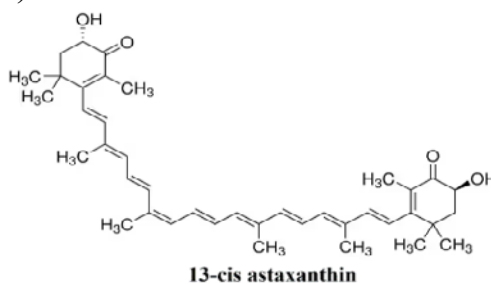
(D)



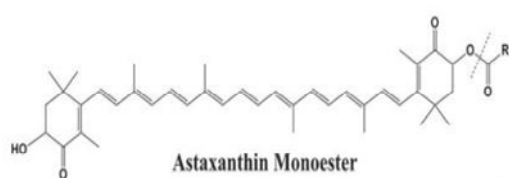
(E)



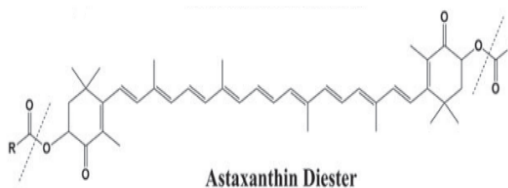
(F)



(G)



(H)

(Zhou *et al.*, 2019)

圖一、不同型態蝦紅素之化學結構



順式較不穩定，故自然界中的蝦紅素大部分多屬於反式異構物<sup>(10)</sup>。

## 二、蝦紅素之國內外使用規範

歐洲食品安全局(European Food Safety Authority)於蝦紅素之每日建議最大攝取量為4 mg，並將其訂為食用色素<sup>(11)</sup>；而美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)於每日攝取量訂為12 mg，並准許作為動物飼料用之色素<sup>(12)</sup>。我國衛生福利部2021年3月11日訂定之「以基因改造大腸桿菌Ast12菌株發酵生產之食品原料蝦紅素之使用限制及標示規定」，每日食用限量為2 mg<sup>(13)</sup>。本研究配合行政管理所需與符合保健產品市場之趨勢，建立食品中蝦紅素之檢驗方法供外界參考。

## 材料與方法

### 一、試驗樣品

8件膠囊錠狀食品檢體，其中1件為健康食品查驗登記申請之檢體，其餘7件則購自藥粧店及網路商城。確效試驗之空白粉狀樣品為自行配製(含玉米澱粉32%、乳糖32%、澱粉32%、硬脂酸鎂2%及二氧化矽2%)，油狀樣品為不含該成分之市售油狀膠囊。

### 二、試藥、溶劑與標準品

#### (一)試藥及試劑

甲醇、丙酮、石油醚及甲基第三丁基醚(methyl tert-butyl ether)均採用液相層析級，鹽酸及無水硫酸鈉均採用試藥級，皆購自美國Avantor公司(Delaware, PA, USA)。2,6-二丁基羥基甲苯(2,6-Butylated hydroxytoluene, BHT)採用試藥級，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)。膽固醇酯酶(Cholesterol esterase from *Pseudomonas fluorescens*, 6.25 U/mg)、鹽酸、磷酸(85%)、三羥甲基胺基甲烷

(tris(hydroxymethyl)amino methane)及十水合硫酸鈉均採用試藥級，皆購自美國Sigma-Aldrich公司(Saint Louis, MO, USA)。

#### (二)對照標準品

對照用標準品全反式蝦紅素(all-*trans*-Astaxanthin，純度99.5%)、9-順式-蝦紅素(9-*cis*-Astaxanthin，純度94.9%)與13-順式-蝦紅素(13-*cis*-Astaxanthin，純度90.3%)，皆購自美國Sigma-Aldrich公司(Saint Louis, MO, USA)。對照用標準品酯化型蝦紅素(Astaxanthin ester)及內部標準品β-衍-8'-胡蘿蔔醛(β-apo-8'-Carotenal，純度100%)，皆購自美國USP公司(North Bethesda, MD, USA)。

## 三、儀器與設備

(一)超高效液相層析儀(Acquity UPLC<sup>®</sup> H-class, Waters Corporation, USA)。

(二)漩渦混合器(Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)。

(三)超音波振盪器(Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH, Germany)。

(四)恆溫振盪水浴槽(SB-7D, 臺灣海博特股份有限公司，臺灣)。

(五)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, USA)。

(六)氮氣濃縮裝置(TurboVap<sup>®</sup> LV, Biotage, Sweden)。

(七)去離子水製造機(Millipore milli-Q, Millipore, USA)。

## 四、試劑之調製

(一)含0.1% BHT之丙酮溶液

稱取BHT 0.5 g，以丙酮溶解使成500 mL。

(二)50 mM三羥甲基胺基甲烷溶液

稱取三羥甲基胺基甲烷0.606 g，加去離子



水90 mL溶解，以鹽酸調整pH值至7.0，再加去離子水使成100 mL。

(三)膽固醇酯酶溶液

稱取6.25 U/mg之膽固醇酯酶64 mg，以50 mM三羥甲基胺基甲烷50 mL溶液溶解使成8 U/mL。

## 五、移動相溶液之配製

(一)移動相溶液A：甲醇。

(二)移動相溶液B：甲基第三丁基醚。

(三)移動相溶液C：取磷酸11.8 mL，加去離子水使成1,000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液C。

## 六、內部標準溶液之配製

取 $\beta$ -衍-8'-胡蘿蔔醛內部標準品約5 mg，精確稱定，以含0.1% BHT之丙酮溶液溶解並定容至25 mL，作為內部標準原液，冷凍避光儲存。臨用時取適量內部標準原液，以含0.1% BHT之丙酮溶液稀釋至20  $\mu\text{g/mL}$ ，供作內部標準溶液。

## 七、標準溶液之配製

(一)全反式蝦紅素標準溶液

取全反式蝦紅素對照用標準品約10 mg，精確稱定，以含0.1% BHT之丙酮溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光儲存。臨用時取適量標準原液及內部標準原液混合，以含0.1% BHT之丙酮溶液稀釋至0.1~50  $\mu\text{g/mL}$  (含內部標準品濃度10  $\mu\text{g/mL}$ )，供作標準溶液。

(二)酯化型蝦紅素標準溶液

取酯化型蝦紅素對照用標準品約10 mg，精確稱定，以含0.1% BHT之丙酮溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光儲存。臨用時取適量標準原液以含0.1% BHT之丙酮溶液稀釋至500  $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

(三)9-順式-蝦紅素標準溶液及13-順式-蝦紅素標準溶液

分別取9-順式-蝦紅素與13-順式-蝦紅素對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以含0.1% BHT之丙酮溶液溶解並定容至2 mL，作為標準原液，冷凍避光儲存。臨用時分別取適量標準原液以含0.1% BHT之丙酮溶液稀釋至50  $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

## 八、檢液之調製<sup>(註)</sup>

將檢體均質混勻後，取約100 mg，精確稱定，粉狀檢體先以去離子水5 mL分散，再加入含0.1% BHT之丙酮溶液40 mL；油狀檢體加入含0.1% BHT之丙酮溶液45 mL，漩渦混勻，於超音波振盪30分鐘，以含0.1% BHT之丙酮溶液定容至50 mL，以3,000  $\times\text{g}$ 離心5分鐘，收集上清液。取上清液2 mL，置於15 mL離心管中，加入內部標準溶液1 mL及膽固醇酯酶溶液3 mL，漩渦混勻，37°C水浴中反應1小時，每隔15分鐘取出漩渦混勻。加入十水合硫酸鈉1 g及石油醚2 mL，漩渦混勻30秒，以3,000  $\times\text{g}$ 離心3分鐘，收集上層液於含無水硫酸鈉1 g之15 mL離心管中，下層液再加入石油醚2 mL，重複上述萃取步驟直至上下層皆為無色，合併上層液，以氮氣吹乾，殘留物以含0.1%BHT之丙酮溶液2 mL溶解，經濾膜過濾後，供作檢液。

註：本實驗全程需避光。

## 九、高效能液相層析儀分析條件

(一)光二極體陣列檢出器：定量波長478 nm。

(二)層析管：YMC Carotenoid C30，5  $\mu\text{m}$ ，內徑4.6  $\times$  250 mm。

(三)層析管溫度：25°C。

(四)樣品注入量：20  $\mu\text{L}$ 。

(五)流速：1.0 mL/min。

(六)移動相溶液：依第五節配製之溶液，以下



列條件進行分析。

時間(min)	A (%)	B (%)	C (%)
0.0→23.0	79→79	17→17	4→4
23.0→23.5	79→66	17→30	4→4
23.5→28.0	66→16	30→80	4→4
28.0→30.0	16→16	80→80	4→4
30.0→30.1	16→79	80→17	4→4
30.1→35.0	79→79	17→17	4→4

## 十、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各20 µL，分別注入高效液相層析儀中，依第九節進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中蝦紅素之含量(mg/g)<sup>(註)</sup>：

檢體中蝦紅素之含量(mg/g) =

$$\frac{C \times V}{M \times 1,000}$$

C：由all-trans、9-cis及13-cis蝦紅素之波峰面積乘上其相對感應因子(分別為1.0、1.1及1.3)所得之波峰總面積，依標準曲線求得檢液中蝦紅素之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(50 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：檢體中蝦紅素之含量，以游離型蝦紅素計。

## 十一、方法確效

依據衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)公布之「食品化學檢驗方法之確效規範<sup>(14)</sup>」進行確效試驗，評估本研究檢驗方法之準確度(Accuracy)、精密度(Precision)及定量極限(Limit of Quantification, LOQ)。

### (一)標準曲線

標準曲線至少包括5種不同濃度，線性迴歸方程式之相關係數不應低於0.99，檢液

中待測物濃度應在標準曲線之線性範圍內。

### (二)準確度及精密度試驗

於同日及異日進行添加回收試驗，將適當濃度之酯化型蝦紅素標準溶液添加至空白樣品中，添加濃度以游離型蝦紅素計分別為0.25、0.5及1.25 mg/g，各濃度皆進行同日及異日5重複試驗，依前述流程製成檢液，並計算其回收率及變異係數(Coefficient of variation, CV)以評估是否符合食品化學確效規範要求。

### (三)定量極限之評估

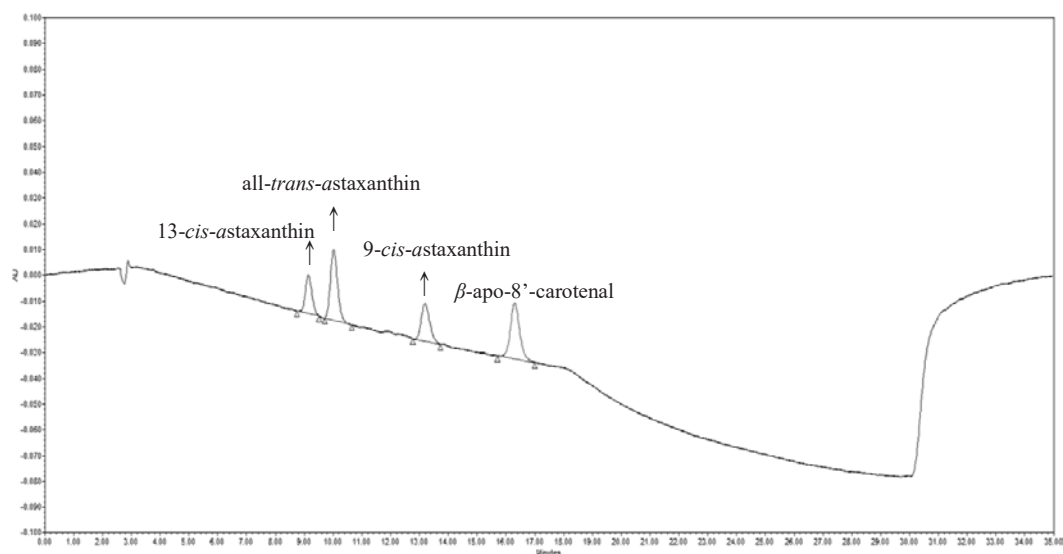
分別將適當濃度之酯化型蝦紅素標準溶液添加至空白樣品中，添加濃度以游離型蝦紅素計為0.25 mg/g，依前述流程製成檢液，層析圖譜中待測物波峰之訊號/雜訊比(Signal/noise Ratio, S/N) ≥ 10，並評估其回收率及重複性是否符合食品化學確效規範要求。

## 結果與討論

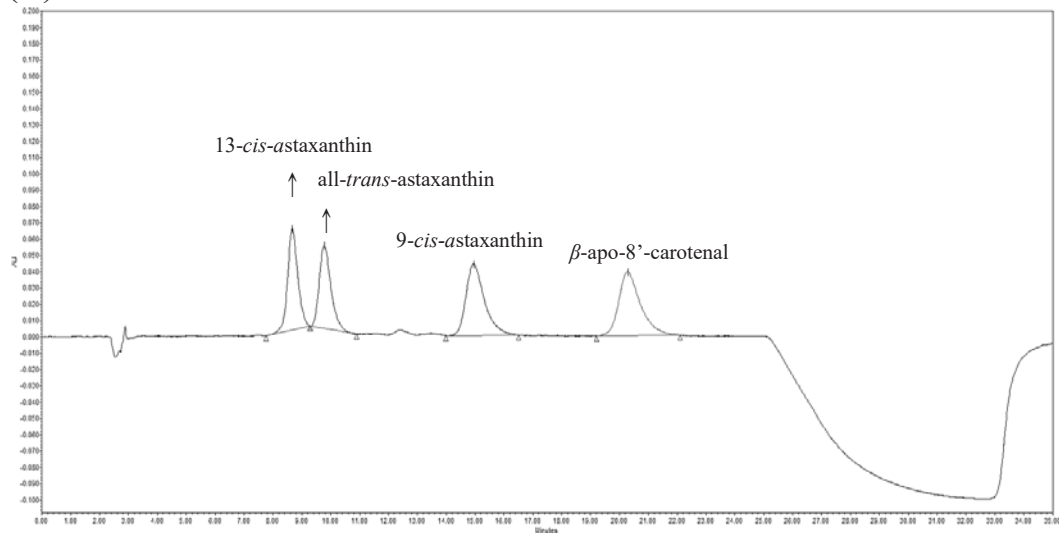
### 一、層析條件之探討

本研究按照USP 38<sup>(15)</sup>方法之移動相梯度進行分析，0-15分鐘移動相A (甲醇)由81%降至66%、移動相B (甲基第三丁基醚)由15%升至30%，15-23分鐘移動相A由66%降至16%、移動相B由30%升至80%，結果3支標準品與內部標準品之波峰於層析圖譜之基線非呈現水平，且有往下傾斜之趨勢，此可能會導致定量有不準確情形發生，故調整移動相A及B之比例，使其在分析23分鐘內維持等梯度分析(移動相A及B分別為79%及17%)，促使基線呈現平穩，增進定量之準確度。移動相比比例調整前後之圖譜如圖二所示，調整後4支波峰皆有良好之分離，故後續使用調整後之移動相進行試驗。

(A)



(B)



圖二、移動相比比例調整前(A)與調整後(B)之HPLC圖譜

## 二、酵素水解條件之探討

### (一) 酵素水解條件

取粉狀及油狀樣品各一件，分別加入4、6及8 U/mL膽固醇酯酶溶液，於37°C水解45

及60分鐘，結果如表一所示，隨膽固醇酯酶活性與水解時間之增加，蝦紅素之檢測值亦增加，另水解條件以8 U/mL膽固醇酯酶溶液於37°C下水解60分鐘有最高之檢測值，故後續將選定8 U/mL膽固醇酯酶溶液

表一、酵素水解條件對油狀及粉狀檢體中蝦紅素之萃取效果

檢體型態	膽固醇酯酶活性 (U/mL)	水解時間 (min)	檢測值(n=3) (mg/g)
油狀	4	45	7.30
		60	8.01
	6	45	7.57
		60	8.19
	8	45	8.29
		60	8.99
粉狀	4	45	2.52
		60	2.51
	6	45	2.54
		60	2.56
	8	45	2.54
		60	2.60

於37°C下水解60分鐘作為酵素水解條件。

#### (二)內部標準品之使用

以一件粉狀檢體參照USP 38<sup>(15)</sup>水解條件進行測試，評估有無內部標準品對於蝦紅素檢測值之影響。結果顯示，在無內部標準品下其蝦紅素檢測值為0.57 mg/粒，檢測值為標示值之83%，而添加內部標準品下，其蝦紅素檢測值為0.61 mg/粒，檢測值為標示值之86%，顯示內部標準品可有效校正試驗過程中所造成的誤差，故後續將添加內部標準品進行蝦紅素之含量測定。

#### (三)驗證USP 38方法之相對感應因子

USP 38方法係使用all-*trans*蝦紅素製作標準曲線，將酯化型蝦紅素經酵素水解後產生3支游離型蝦紅素(包括13-*cis*、all-*trans*及9-*cis*)之波峰面積先乘上其相對感應因子(分別為1.3、1.0及1.1)，再予以加總，所得之波峰總面積再依標準曲線求得檢液中蝦紅素之濃度。為驗證此計算方式，本研究使用3項游離型蝦紅素標

準品(包括13-*cis*、all-*trans*及9-*cis*)搭配內部標準品( $\beta$ -衍-8'-胡蘿蔔醛)分別製作0.1-50  $\mu\text{g/mL}$ 標準曲線，線性迴歸方程式於13-*cis*、all-*trans*及9-*cis*蝦紅素分別為 $y=0.0890x+0.0047$ 、 $y=0.0662x-0.0005$ 及 $y=0.0722x+0.0031$ ，其相關係數(R)皆大於0.9998。將各標準曲線之斜率分別除以all-*trans*蝦紅素之斜率可得相對感應因子，結果顯示，經計算之相對感應因子於13-*cis*、all-*trans*及9-*cis*蝦紅素分別為1.3、1.0及1.1，與USP 38所提供之相對感應因子相同，故可依照其公式進行蝦紅素含量計算，以解決標準品價格昂貴之問題。

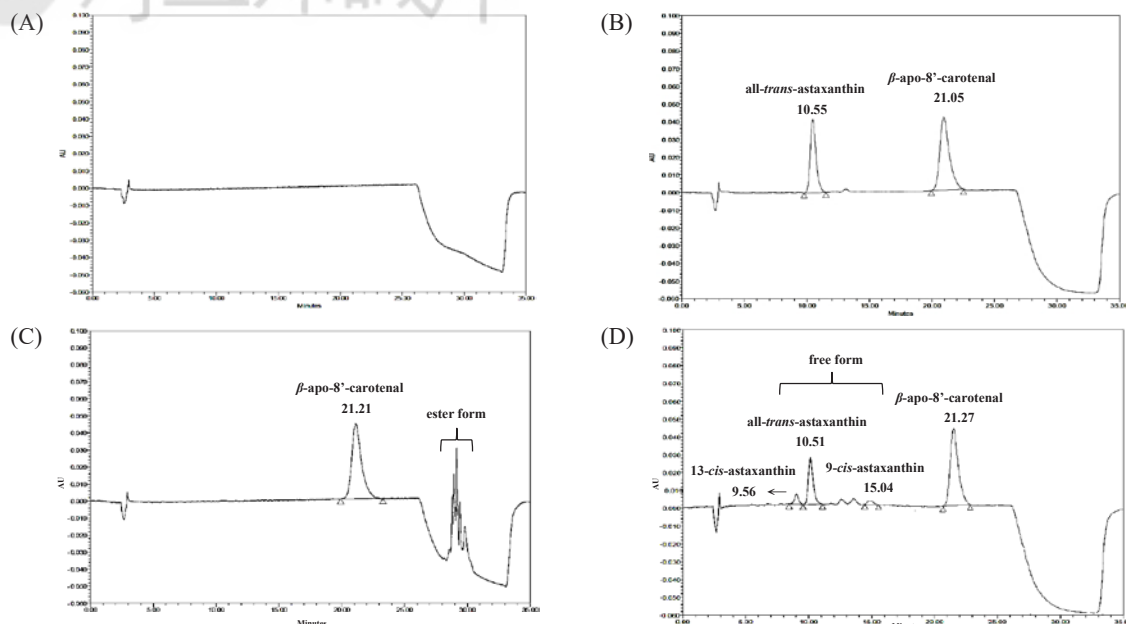
### 三、確效試驗

目前酯化型蝦紅素標準品僅能購得由雨生球紅藻所萃取者，且文獻中指出酯化型蝦紅素組成複雜，包含游離型、單酯及雙酯，若直接以高效液相層析法分析雨生球紅藻中之蝦紅素，恐無法有效分離其具體組成，故酯化型蝦紅素須先以酵素水解為游離型，再以游離態蝦紅素標準品進行檢測。

#### (一)專一性及標準曲線

將空白樣品依本方法流程分析所得之層析圖譜如圖三(A)，與all-*trans*蝦紅素標準品及內部標準品之層析圖譜如圖三(B)比對，亦比對經酵素水解前後之酯化型蝦紅素標準品及內部標準品之層析圖譜如圖三(C)及(D)，其中13-*cis*、all-*trans*、9-*cis*蝦紅素及內部標準品之滯留時間分別為9.56、10.51、15.04及21.27分鐘，於空白樣品之層析圖譜中並無明顯干擾波峰出現。本方法以all-*trans*蝦紅素為標準品，其定量方式採用標準曲線搭配內部標準品，標準曲線範圍於0.1-50  $\mu\text{g/mL}$ ，線性迴歸相關係數為0.9998，評估結果皆符合確效規範<sup>(14)</sup>。

#### (二)準確度及精密度



圖三、空白樣品(A)、全反式蝦紅素標準品及內部標準品(B)與酯化型蝦紅素標準品及內部標準品未經酵素水解(C)及經酵素水解(D)之HPLC圖譜

酯化型蝦紅素以游離型蝦紅素計，於添加濃度0.25、0.5及12.5 mg/g進行添加回收試驗，結果如表二，同日間平均回收率為92.9-111.2%，變異係數為2.5-4.8%；異日間平均回收率為90.2-107.2%，變異係數為4.4-7.0%之間，顯示方法之準確度及精

密度符合確效規範<sup>(14)</sup>。

### (三) 定量極限之評估

依材料與方法十一、(三)節「定量極限之評估」所得膠囊錠狀食品之定量極限評估結果，蝦紅素於定量極限(以游離態計為0.25 mg/g)之平均回收率為93%，變異係數為

表二、酯化型蝦紅素添加於粉狀及油狀膠囊錠狀食品空白基質中之回收試驗結果

檢體基質	游離型蝦紅素添加量 <sup>c</sup> (mg/g)	同日間(n=5)		異日間(n=10)	
		平均回收率 (%)	CV (%)	平均回收率 (%)	CV (%)
粉狀 <sup>a</sup>	0.25	92.9	2.5	91.3	4.4
	0.50	103.6	2.6	101.3	5.0
	1.25	105.2	4.0	107.2	4.4
油狀 <sup>b</sup>	0.25	94.1	3.7	90.2	6.7
	0.50	111.2	4.8	107.1	7.0
	1.25	97.6	3.9	101.0	5.2

<sup>a</sup> 自行配製之膠錠空白基質配方為玉米澱粉32%、乳糖32%、澱粉32%、硬脂酸鎂2%、二氧化矽2%

<sup>b</sup> 市售購買之油狀基質配方為魚油、明膠、亞麻仁籽油、冷壓橄欖油、甘油、向日葵籽油、南瓜籽油、小麥胚芽油、月見草油、玄米油、維生素E、二氧化鈦、向日葵籽油、氧化鐵、大豆卵磷脂、迷迭香油

<sup>c</sup> 酯化型蝦紅素依COA換算為游離型蝦紅素之添加量

2.5%，且13-*cis*、all-*trans*與9-*cis*蝦紅素之S/N比分別為11.1、43.6及13.3，皆符合確效規範S/N比 $\geq 10$ 之要求，其回收率及變異係數亦符合確效規範<sup>(14)</sup>，故本研究之定量極限訂為0.25 mg/g，以游離型蝦紅素計。

## 六、本研究檢驗方法之產品適用性驗證

由於目前尚無以基因改造大腸桿菌Ast12菌株發酵生產之蝦紅素所製造之產品，故本研究市售產品之選擇，主要以原料成分標示中含蝦紅素之膠囊錠狀食品為主，以建立之方法進行方法適用性驗證。由未酵素水解之圖譜得知，測試之樣品中蝦紅素係以酯化型存在，查看其成分標示，蝦紅素來源為紅藻，與文獻<sup>(7-9)</sup>中提及雨生紅球藻含酯化型蝦紅素之論述相同。分析結果如表三，8件產品之蝦紅素含量為2.58-15.41 mg/g，檢測值為標示值之92-112%，皆符合「包裝食品營養標示應遵行事項」檢測值需大於標示值80%之規定<sup>(16)</sup>，顯示本方法適用於檢驗市售含蝦紅素之膠囊錠狀食品。

## 結 論

表三、市售膠囊錠狀產品中蝦紅素之檢驗方法適用性驗證評估

編號	膠囊型態	檢測值(n=3)		標示值	檢測值/ 標示值
		(mg/g)	(mg/粒)	(mg/粒)	(%)
S1	粉狀	2.59	0.65	0.69	94
S2		2.58	0.98	1.00	98
S3		7.30	3.36	3.00	112
S4		15.41	6.60	6.00	110
S5	油狀	8.91	3.68	4.00	92
S6		4.56	2.08	2.00	104
S7		10.60	3.34	3.00	111
S8		9.67	3.37	3.00	112

本研究配合行政管理之需求，建立蝦紅素分析方法，確效結果皆符合食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」<sup>(14)</sup>，並已於2024年2月17日公開「膠囊錠狀食品中蝦紅素之檢驗方法(TFDAA0101.00)」<sup>(17)</sup>，可作為市售相關產品之標示符合性評估之參考檢驗方法。

## 參考文獻

1. 周鑫佑、吳聖馨、王惠民。2020。蝦紅素回顧：合成、萃取以及在皮膚醫藥上之應用。臺灣化學工程學會專輯，67: 54-63。
2. 蔣真祝、陳淑德。2016。萃取雨生紅球藻中蝦紅素及其安定性之研究。國立宜蘭大學國立宜蘭大學生物資源學院碩士在職專班碩士論文。
3. Nagaraj, P., Rajaram, M., Arulmurugan, P., Baskaraboopathy, A. and *et al.* 2012. Antiproliferative potential of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* Flotow on human hepatic cancer (HEPG2) cell line. Biomed. Prev. Nutr. 2(3): 149-153.
4. Chronis, M., Christopoulou, V.M., Papadaki, S., Stramarkou, M. and *et al.* 2021. Optimization of mild extraction methods for the efficient recovery of astaxanthin, a strong food antioxidant carotenoid from microalgae. Chem. Eng. Trans. 87: 151-156.
5. Lin, G.B., Lee, S.Y., Lee, E.K., Haam, S.J. and *et al.* 2002. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. Biochem. Eng. J. 11(2): 181-187.
6. Zhou, Q.X., Yang, L., Gu, C.X. and Xue, C.H. 2019. Thermal stability and oral absorbability of astaxanthin esters from *Haematococcus pluvialis* in Balb/c mice. J. Sci. Food Agric. 99: 3662-3671.



7. Yang, S., Zhou, Q.X., Yang, L., Xue, Y. and *et al.* 2015. Effect of thermal processing on astaxanthin and astaxanthin esters in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Oleo Sci.* 64(3): 243-253.
8. Ambati, R.R., Phang, S.M., Ravi, S. and Aswathanarayana, R.G. 2014. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. *Mar. Drugs* 12: 128-152.
9. Ramirez, J.P. and Hinojosa, C.O. 2014. Stability of astaxanthin in yogurt used to simulate apricot color, under refrigeration. *Food Sci. Technol.* 34(3): 559-565.
10. 張瑞仁、程凱若、林浩業、林玉儒等。2020。用以製備蝦紅素之重組多核苷酸序列及其用途。中華民國智慧財產局發明說明書公告本TW 1681052 B。
11. European Food Safety Authority. 2019. Safety of astaxanthin for its use as a novel food in food supplements. [<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5993>]
12. Daniells, S. 2011. FDA passes 12 mg new dietary ingredient petition for astaxanthin. [<https://www.nutraingredients-usa.com/Article/2011/09/16/FDA-passes-12-mg-New-Dietary-Ingredient-petition-for-astaxanthin>]
13. 衛生福利部。2021。訂定「以基因改造大腸桿菌(*Escherichia coli*) Ast12菌株發酵生產之食品原料蝦紅素(astaxanthin)之使用限制及標示規定」。110年3月11日衛授食字第1101300104號。  
[<http://consumer.fda.gov.tw/Food/MaterialDetail.aspx?nodeID=160&id=17559>]
14. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。110年11月1日公布。[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f637713826789525112&type=2&cid=38868>]
15. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2015. The United States Pharmacopeia 38, Dietary supplements: astaxanthin esters. pp. 5892-5893. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD, USA.
16. 衛生福利部。2018。包裝食品營養標示應遵行事項。2018年3月31日衛授公字第1071300530號公告修訂。  
[<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=26968>]
17. 衛生福利部食品藥物管理署。2024。膠囊錠狀食品中蝦紅素之檢驗方法(TFDAA0101.00)。  
[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f638436109088137155&type=2&cid=46160>]



## Method Evaluation for Astaxanthin in Foods in Capsule or Tablet Form

JEN-MIN HUNG, PAI-WEN WU, SHU-HAN CHANG, YA-MIN KAO, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

### ABSTRACT

Astaxanthin naturally exists in the algae such as *Haematococcus pluvialis* and the shells of shrimp and crab. It can also be synthesized by microorganisms, considered as a potential activity of anti-cancer and anti-inflammatory. Furthermore, astaxanthin derived from food materials fermented from genetically modified *Escherichia coli* Ast12 strains has a daily consumption limit of 2 mg, as stipulated by the using restrictions and labeling regulations announced by the Ministry of Health and Welfare (MOHW) in Taiwan. Astaxanthin products, whether in ester for free form, can be identified by high performance liquid chromatography (HPLC) with a photodiode array detector (PDA) without the need for hydrolysis. Esterified astaxanthin is difficult to quantify accurately, therefore, we established an analytical method for astaxanthin in foods in capsule or tablet form by enzymolysis for esterified astaxanthin to yield free astaxanthin with an internal standard by HPLC-PDA in this study. The sample was uniformly dispersed and extracted with 0.1% 2,6-butyated hydroxytoluene (BHT) in acetone under ultrasonication. After centrifugation, the supernatants were hydrolyzed by cholesterol esterase and extracted with petroleum ether. The combined petroleum ether layer was evaporated to dryness using a stream of nitrogen, and dissolved in acetone containing 0.1% BHT. After filtration, the filtrate was analyzed by a YMC-Carotenoid C30 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm) column at 25°C using methanol, methyl tert-butyl ether and 1% phosphate solution as the mobile phase by a gradient elution of 1.0 mL/min and detected at 478 nm by HPLC-PDA. The results showed that enzymolysis completed converted esterified astaxanthin into free astaxanthins, including 13-*cis*, all-*trans* and 9-*cis*. The method validation was performed by spiking astaxanthin ester at the levels of 2.5 mg/g, 5.0 mg/g and 7.5 mg/g as free form into the blank sample, respectively. The average recoveries of astaxanthin ester in intra-day were between 92.9 and 111.2%, and the coefficients of variation were between 2.5 and 4.8%. The average recoveries of astaxanthin esters in inter-day were between 90.2 and 107.2%, and the coefficients of variation were between 4.4 and 7.0%. The above results showed that this method could provide high precision and accuracy, and comply with the validation guideline of the chemical testing method published by the Taiwan Food and Drug Administration (TFDA). Eight products with astaxanthin labeling were assayed by this method. The results showed that the ratios of the detected values to the labeled values of astaxanthins were all in compliance, meeting the regulation



that the allowable error range of nutrition label values should be  $\geq 80\%$  of the labeled value, as specified in the Regulations on Nutrition Labeling for Prepackaged Food Products.

Key words: astaxanthin, high performance liquid chromatography, photodiode array detector, enzymatic hydrolysis