

И. В. ДРОБЕЦКАЯ, И. Н. ЧУБЧИКОВА,
А. Б. БОРОВКОВ, Г. С. МИНЮК

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АСТАКСАНТИНА И КАНТАКСАНТИНА У ЗЕЛЁНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Предложен новый вариант методики определения содержания астаксантина и кантаксантина в биомассе зелёных микроводорослей-продуцентов кетокаротиноидов с использованием последовательной одномерной тонкослойной хроматографии на пластинах ПТСХ-АФ-А в двух системах растворителей.

Ключевые слова: микроводоросли, астаксантин, кантаксантин, тонкослойная хроматография

В скрининговых исследованиях по выявлению новых перспективных продуцентов астаксантина (АСТ) и кантаксантина (КАН) – кетокаротиноидов (ККР), успешно применяемых в аквакультуре, медицине, пищевой и косметической промышленности [6, 14, 27], – важнейшее значение имеет корректное определение их содержания в получаемой биомассе. Явление вторичного каротиногенеза отмечено в экстремальных условиях у многих видов зелёных микроводорослей [3, 12, 17, 20, 25, 31, 32], которые, благодаря способности к быстрому росту, могут составить альтернативу известному промышленному продуценту АСТ *Haematococcus pluvialis*. Если у последнего преобладает путь синтеза АСТ с практически полным превращением интермедиатов в конечный продукт (эферы АСТ) [15, 24], то пигментный состав представителей других порядков Chlorophyceae из-за функционирования сразу нескольких биосинтетических путей представлен сложной смесью метаболических предшественников АСТ (адониксантин, адонирубин, гидроксизехиненон, эхиненон, криптоксантин и др.) [16, 23, 27, 30]. Распространённая методика тонкослойной хроматографии (ТСХ) (пластины «Silufol», система ацетон – гексан 25 : 75 [22]), вполне приемлемая для анализа содержания вторичных каротиноидов (КР) у *H. pluvialis* [2], оказалась малоэффективной в отношении других видов водорослей из-за неудовлетворительного отделения фракций АСТ и КАН от вышеуказанных промежуточных метаболитов.

В данной работе предлагается более универсальный вариант методики определения АСТ и КАН с помощью ТСХ на силикагеле, разработанный нами применительно к различным видам Chlorophyceae.

Материал и методы. Для исследований использовали виды из экспериментального фонда культур микроводорослей-продуцентов ККР (полученные из коллекций Киевского национального университета им. Т. Г. Шевченко, Института физиологии растений РАН, Санкт-Петербургского государственного университета), принадлежащие к трем порядкам Chlorophyceae (по [1]): Scenedesmales – *Bracteacoccus giganteus* Bischoff et Bold 1963 (IBSS-87 = ACKU 461-06), *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova 1931 (IBSS-88 = ACKU 506-06), *Chlorella zofingiensis* Donz 1934 (IBSS-20 = CALU-190), *Scenedesmus rubescens* Dangeard 1966 (IBSS-93 = ACKU 647-06), *Scotiellopsis rubescens* Vinatzer 1975 (IBSS-12 = IPPAS H-350); Protosiphonales – *Pseudospongiococcum protococcoides* Громов 1962 (IBSS-10 = CALU-221) и Volvocales – *Ettlia carotinos* Komarek 1989 (IBSS-91 = ACKU 573-06), *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille 1844 (IBSS-16 = LABIK 927-1).

20 – 50 мл культуры микроводорослей с содержанием сухого вещества 0,5 – 1,5 г·л⁻¹ центрифугировали (5 мин при 2 – 4 тыс. об·мин⁻¹, в зависимости от вида водорослей) и промывали осадок клеток дистиллированной водой при том же режиме центрифугирования. Пробирки с сырой биомассой хранили до анализа в морозильной камере не более 3 – 5 дней. Пигменты экстрагировали 100% ацетоном с ионолом (0,01%), растирая биомассу в фарфоровых ступках с кварцевым песком (в вытяжном шкафу при рассеянном свете) или размалывая в вибрационной мельнице Retsch MM 301

© И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, А. Б. Боровков, Г. С. Минюк, 2009

(троекратно по 3 мин при частоте 25 Гц). Объединённые после центрифугирования (5 мин при 4000 об·мин⁻¹) порции экстракта упаривали под вакуумом при 30 – 40 °С, подсушивали в токе N₂ и перерастворяли в 0,5 – 1,0 мл ацетона. Полученные пробы использовали в методических работах по оптимизации хроматографического разделения и идентификации фракций АСТ и КАН у исследуемых видов.

Хроматографические пластины («Silufol» UV-254, «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А и ПТСХ-АФ-В) перед анализом активировали в сушильном шкафу (30 мин при 100° С). Системы растворителей готовили из свежеперегнанных реактивов марок чда, хч. Были апробированы методики, рекомендованные различными авторами для отдельных видов-продуцентов ККР [4, 23, 27, 31, 32], основанные на однократной разгонке проб (в системах ацетон – гексан; этилацетат – бензол и др.) или двухкратной последовательной ТСХ в неполярных и полярных системах на пластинах «Silufol» и «Sorbfil». Ни один из вариантов не дал удовлетворительного разделения фракций. С целью оптимизации методики нами были испытаны другие варианты систем растворителей на основе гексана, бензола, ацетона.

Первичную оценку состава КР микроводорослей проводили путем сравнения хроматограмм их экстрактов с хроматограммами экстрактов зрелых апланоспор *H. pluvialis* и по совместной хроматографии со стандартами. Стандарт КАН получали из цист *Artemia* sp., свободного АСТ – из апланоспор *H. pluvialis* путем омыления эфиров АСТ [28], а также из мышц *Salmon salar*; моно- и диэфиров АСТ – из зрелых апланоспор *H. pluvialis*. Дальнейшую идентификацию фракций, сходных по хроматографической подвижности с АСТ и КАН, осуществляли по химическим тестам на наличие кето- и гидроксогрупп и спектрам поглощения в различных растворителях [28], регистрируемых на приборе СФ-2000.

Результаты и обсуждение. Наилучшее разделение КР водорослевых экстрактов было достигнуто при последовательной ТСХ на пластинах «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10 x 20) с использованием собственной модификации систем растворителей: 1) гексан-ацетон 9 : 1 (v/v) и 2) гексан-бензол-ацетон 5 : 3,75 : 0,8 (v/v) (рис. 1). Этот вариант обладает высокой разрешающей способностью, позволяет нивелировать отрицательное влияние липидов на разделение КР, четко разграничить первичные и вторичные КР, обнаружить ряд промежуточных продуктов биосинтеза АСТ и отделить наиболее важные фракции ККР (моно- и диэфиры АСТ и КАН). У исследованных видов при помощи этой методики выявлено от 11 до 14 фракций (фр.) КР, две из которых являются первичными КР (β-каротин и лютеин), а остальные относятся к группе ККР, что подтверждается положительной качественной реакцией с боргидридом натрия (NaBH₄) [10, 28]. Минорные полярные фракции ККР, имеющие близкие R_f, перед проведением идентификационных тестов собирали с нескольких пластин, концентрировали и дополнительно разделяли в более полярных системах, например, этилацетат-бензол 3 : 7 (v/v) или гексан-бензол-ацетон 5 : 4 : 1,5 (v/v).

Сравнительный анализ фр. № 3, 9, 12 и 7 и их предполагаемых стандартов (соответственно, диэфиров АСТ, моноэфиров АСТ, свободного АСТ и КАН) по хроматографической подвижности и спектральным характеристикам выявил полное совпадение литературным данным их R_f (0,70, 0,33, 0,135 и 0,4, соответственно) (см. рис. 1), идентичность абсорбционных спектров в различных растворителях (рис. 2) и соответствие величин характеристических максимумов поглощения в этих спектрах (табл. 1).

Величины гипсохромных сдвигов в спектрах фр. № 3, 9, 12 (24 – 26 нм) и фр. № 7 (17 – 19 нм) после реакции с NaBH₄ (рис. 3), указывающие на наличие в молекулах КР двух сопряжённых кетогрупп, соответствовали данным, полученным для АСТ [18] и КАН [10].

Анализ приведённых выше характеристик фракций № 3, 7, 9, 12 служит основанием для утверждения об отсутствии в них примесей и последующей идентификации как: фр. № 3 – диэфиры АСТ, фр. № 7 – КАН, фр. № 9 – моноэфиры АСТ, фр. № 12 – свободный АСТ. Дополнительно об этом свидетельствуют результаты реакции ацетилирования (теста на наличие гидроксо-групп [28]), которая была отрицательна для фр. № 7 и положительна для фр. № 12 (с увеличением R_f за счет образования моно- и диацетата АСТ).

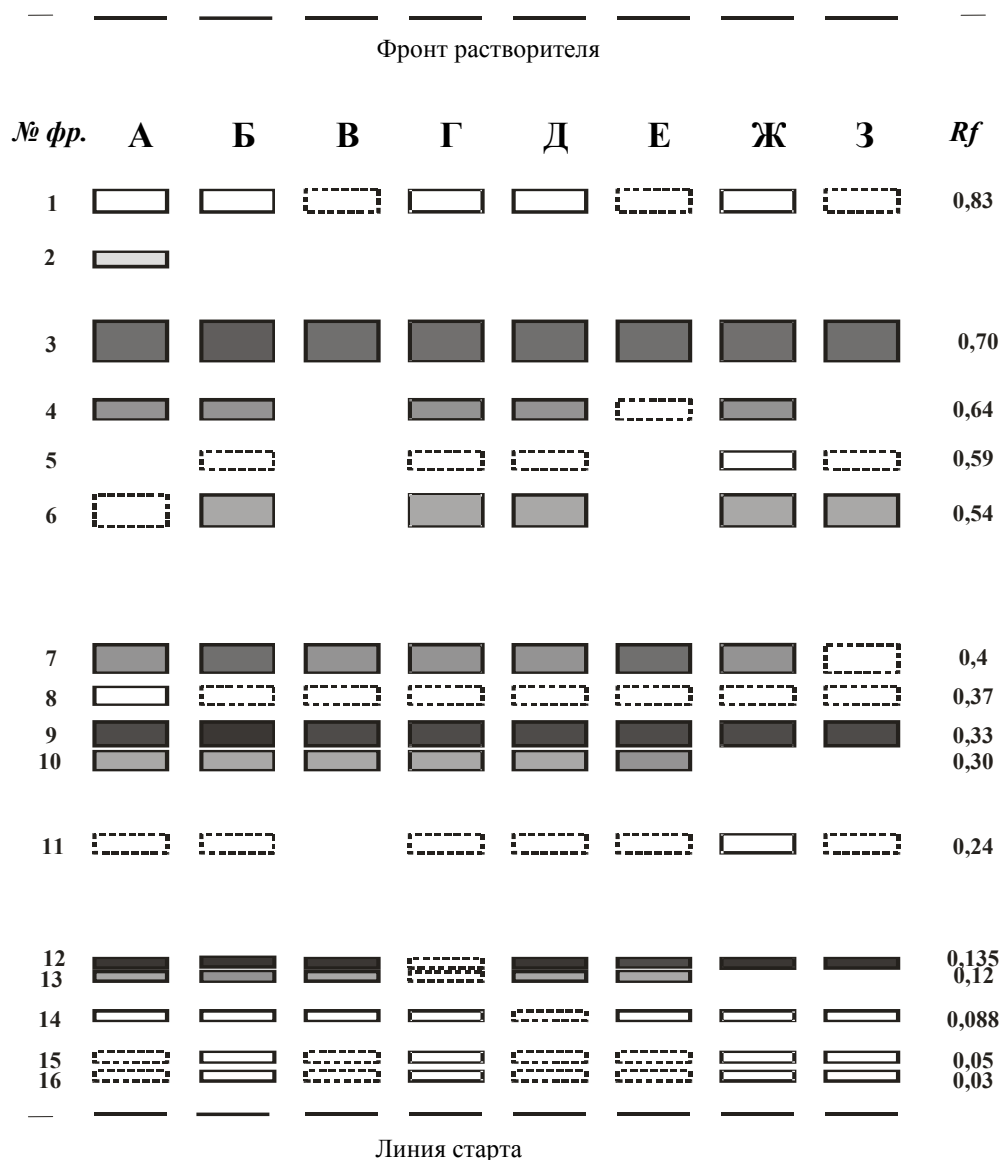


Рисунок 1. Схема хроматограмм ацетоновых экстрактов пигментов различных видов Chlorophyceae: А – *Chlorella zofingiensis*; Б – *Scotiellopsis rubescens*; В – *Scenedesmus rubescens*; Г – *Bracteacoccus minor*; Д – *Bracteacoccus giganteus*; Е – *Pseudospongiococcum protococcoides*; Ж – *Ettlia carotinos*; З – *Haematococcus pluvialis*. 1 – β-каротин, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13 – неидентифицированные (неид.) ККР, 3 – диэфиры АСТ, 7 – КАН, 9 – моноэфиры АСТ, 12 – свободный АСТ, 14 – лютеин/зеаксантин, 15 – ХЛ а, 16 – ХЛ в. Пунктирной линией отмечены фракции в следовых количествах

Figure 1. The scheme of thin-layer chromatograms of acetone-extracted pigments from different Chlorophyceae species: А – *Chlorella zofingiensis*; Б – *Scotiellopsis rubescens*; В – *Scenedesmus rubescens*; Г – *Bracteacoccus minor*; Д – *Bracteacoccus giganteus*; Е – *Pseudospongiococcum protococcoides*; Ж – *Ettlia carotinos*; З – *Haematococcus pluvialis*. 1 – β-carotene, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13 – unidentified ketocarotenoids (uniden. KC), 3 – astaxanthin (AST) diesters, 7 – canthaxanthin, 9 – AST monoesters, 12 – free AST, 14 – lutein/zeaxanthin, 15 – chlorophyll a, 16 – chlorophyll b. The fractions with trace amounts of pigments are indicated by a dotted line

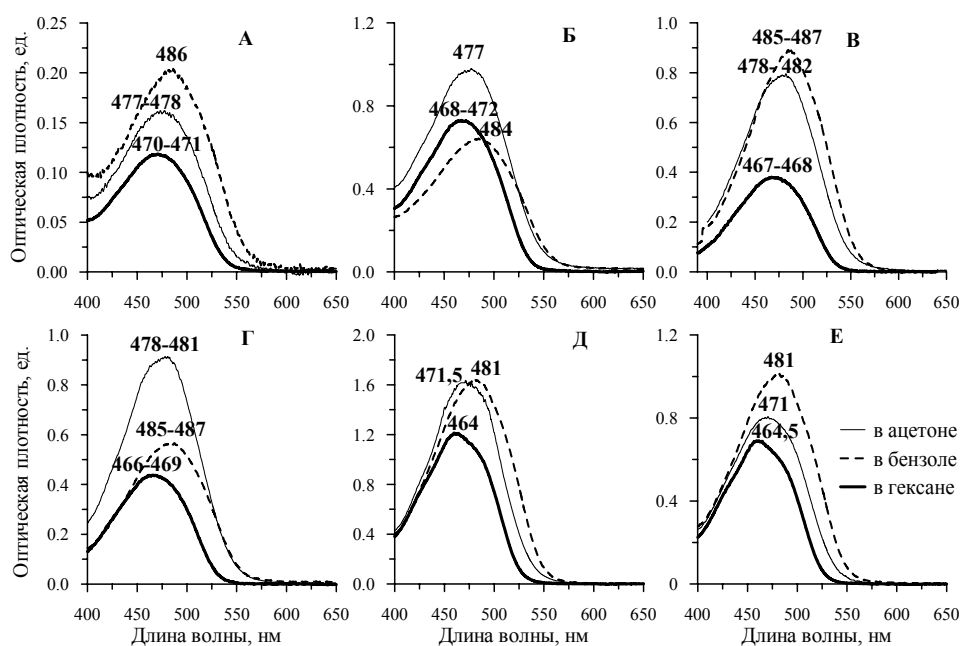


Рисунок 2. Абсорбционные спектры в различных растворителях стандарта свободного астаксантина (А), стандарта кантаксантина (Е) и фракций 12 (Б), 9 (В), 3 (Г), 7 (Д)
Figure 2. Absorption spectra in different solvents of free astaxanthin standard (A), canthaxanthin standard (E) and fractions 12 (B), 9 (B), 3 (Г), 7 (Д)

Таблица 1. Максимумы в абсорбционных спектрах кетокаротиноидов в различных растворителях
Table 1. Absorption maximums of ketocarotenoid spectra in different solvents

Фракция	Максимумы в спектрах поглощения, нм					
	гексан		бензол		ацетон	
	эксперим. данные	литерат. данные	эксперим. данные	литерат. данные	эксперим. данные	литерат. данные
АСТ свободный, стандарт	470 – 471	472 [23] 468 [19, 26]	484 – 486	484 [23, 26, 31]	477 – 478	477 [23] 480 [8, 19, 28]
Фр. № 12 из <i>S. rubescens</i>	468 – 472	469 [31]	484	485 [8, 28]	477	475 [17, 31]
Фр. № 9 из <i>S. rubescens</i> , <i>C. zofingiensis</i>	469 – 471		484 – 486		476 – 478	
Фр. № 9 из <i>E. carotinosa</i>	467 – 468		485 – 487		478 – 482	
Фр. № 3 из <i>C. zofingiensis</i> , <i>S. rubescens</i>	468 – 469	468 [21]	484 – 487	486 [21]	476 – 478	
Фр. № 3 из <i>E. carotinosa</i>	466 – 469		485 – 487		478 – 481	
КАН, стандарт	464 – 465	466 [31]	481	478 [31]	471	468 [17]
Фр. № 7 из <i>C. zofingiensis</i> , <i>S. rubescens</i>	464	467 [23] 464 – 465 [11]	481	480 [23] 484 [8]	471 – 471,5	471,5 [19] 472 [23,18, 19, 31]

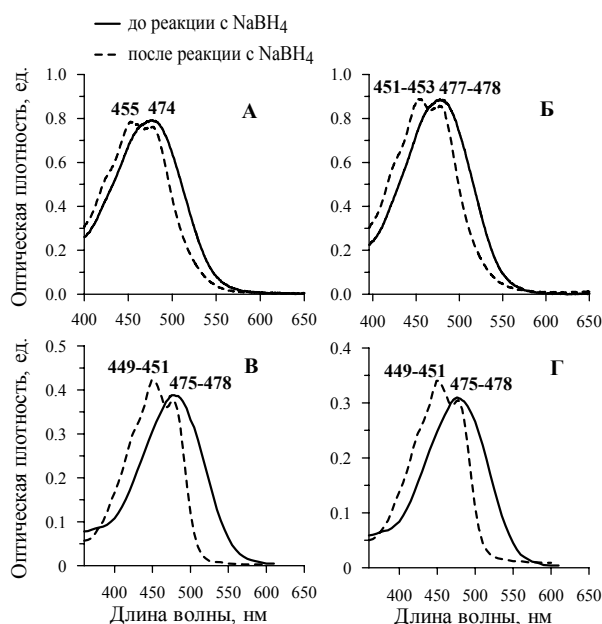


Рисунок 3. Изменение абсорбционных спектров кетокаротиноидов из зелёных микроводорослей после реакции восстановления с NaBH_4 в 95%-ном этаноле: А – кантаксантин (фр. № 7), Б – свободный АСТ (фр. № 12), В – моноэфиры АСТ (фр. № 9), Г – диэфиры АСТ (фр. № 3)

Figure 3. Changes of visible light absorption spectra of green microalgae ketocarotenoids after reduction with NaBH_4 in 95% ethanol: А – canthaxanthin (fraction №7), Б – free astaxanthin (AST) (fraction №12), В – AST monoesters (fraction № 9), Г – AST diesters (fraction № 3)

Остальные фракции ККР еще предстоит точно идентифицировать с помощью всего комплекса общепринятых спектроскопических, химических и хроматографических методов [7, 28], что на данный момент затруднено из-за отсутствия соответствующих стандартов. Неид. ККР фр. № 2, 4, 10, 13, судя по величине гипсохромных сдвигов (7 – 9 нм), являются монокетокаротиноидами. Изменение абсорбционных максимумов в зависимости от растворителя (табл. 2), а также величины R_f (см. рис. 1), позволяют предположить, что фр. № 2 – эхиненон; фр. № 4 – эфиры гидроксизехиненона; фр. № 5 – диэфиры адониксантина, фр. № 6 – эфиры адонирубина, фр. № 10 – моноэфиры адониксантина, фр. № 11 – свободный адонирубин, фр. № 13 – свободный адониксантин. Проверка правильности этого предположения будет выполнена в следующих наших исследованиях.

Таблица 2. Максимумы в абсорбционных спектрах неидентифицированных кетокаротиноидов в различных растворителях

Table 2. Absorption maximums of unidentified ketocarotenoid spectra in different solvents

Фракция	Максимумы в спектрах поглощения, нм		
	гексан	бензол	ацетон
Фр. № 2	459 (482)	471 (491)	461 (474)
Фр. № 4	452-454 (475)	470 (490)	457 (481)
Фр. № 5	459-462	476-477	465-468
Фр. № 6	462-463	483-487	479-481
Фр. № 10	453-454 (471)	463-466 (482-483)	455-460 (472)
Фр. № 11	461-465	482-485	468-478
Фр. № 13	452-454 (475)	464-467 (482-483)	454-457 (475)

Примечание: в скобках указано плечо.

Четкое разделение фракций ККР при использовании новой методики ТСХ позволяет проводить анализ содержания АСТ и КАН в подготовленных пробах по следующей схеме. Одну аликвоту из пробы (0,05 – 0,10 мл) наносят на пластину, а другую растворяют в определённом объеме 80% ацетона (5 – 10 мл) для спектрофотометрического определения содержания суммарных КР по уравнениям [29]: $[\text{КР}] = (1000 D_{470} - 3,27 [\text{Хл } a] - 104 [\text{Хл } e])/198$; $[\text{Хл } a] = 12,21 D_{663} - 2,81 D_{646}$; $[\text{Хл } e] = 20,13 D_{646} - 5,03 D_{663}$; где $[\text{КР}]$,

[Хл а], [Хл в] – концентрации суммарных КР, хлорофиллов (Хл) а и в (мкг/мл) в ацетоновом экстракте, а D₄₇₀, D₆₆₃ и D₆₄₆ – экстинкции экстракта (ед.опт. пл.) на максимумах поглощения КР, Хл а и в, соответственно. Фракции АСТ и КАН элюируют 100% ацетоном, измеряют объемы и экстинкции элюатов в области характеристических максимумов поглощения в 100% ацетоне. Для расчёта концентрации АСТ используют коэффициент удельной экстинкции 2177,4 [13], КАН – 2200 [19] с последующим определением относительного содержания АСТ и КАН в суммарных КР (%).

Заключение. Предлагаемый вариант ТСХ с использованием модифицированных систем растворителей обеспечивает хорошее разделение фракций вторичных КР у различных видов зеленых микроводорослей. Данная методика позволяет корректно количественно определять содержание АСТ и КАН в биомассе видов-продуцентов.

1. Костіков І. Ю., Романенко П. О., Демченко Е. М. і інш. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
2. Минюк Г. С., Терентьева Н. В., Дробецкая И. В. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales) // Альгология. – 2007. – 17, № 2. – С. 148 – 159.
3. Чубчикова И. Н., Минюк Г. С., Дробецкая И. В. и др. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экология моря – 2009. – Вып. 77 – С. 77 – 83.
4. Antia, N.J. & Cheng, J.Y. The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae // British Phycol. J. – 1982. – 17. – P. 39 – 50.
5. Bhosale P., Bernstein P.S. Microbial xanthophylls // Appl Microbiol Biotechnol. – 2005. – 68, No 4. – P. 445 – 455
6. Bjerkeng B. Carotenoids in Aquaculture: Fish and Crustaceans // Carotenoids. – Vol. 4: Natural Functions. – Basel: Birkhauser Verlag, 2008. –P. 237 – 254.
7. Britton G. TLC of Carotenoids / Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. – Boca Raton: CRC Press, 2008. – P. 543-574.
8. Britton G. UV/Visible spectroscopy // Carotenoids. Vol 1B: Spectroscopy, Chapter 2. – Basel: Birkhäuser, 1995. – P. 13 – 62
9. Chapman D. J. Formation and analysis of secondary carotenoids // Experimental phycology. A laboratory manual / Eds. Lobban C.S, Chapman D.J, Kremer B. – Cambridge University Press, 1988. – P. 104 – 110.
10. Cooney J. J., Marks H. W., Smith A. M. Isolation and identification of canthaxanthin from *Micrococcus roseus* // J. Bacteriol. – 1966. – 92, No 2. – P. 342 – 345.
11. Czeżuga B., Czerpak R. Investigations on the pigments of the *Apus cancriformis* (Bosc.) (Crustacea: Branchiopoda) // J. Hydrobiologia – 1970. – 35, No 1. – P. 163 –173.
12. Czygan F.-C. Primäre und sekundäre Carotenoide in chlorokokkalen Algen // Arh. Hydrobiol. Suppl. – 1982. – 60, No 4. – P. 470 – 488.
13. Derivation of astaxanthin light absorption coefficients in different solvents // Technical report 1004.001. – Aquasearch Inc., 1999. – <http://www.fda.gov>.
14. Eonseon J., Polle J. E., Lee H. K. et al. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application // J. Microbial. Biotechnol. – 2003. – 13, N. 2. – P. 165 – 174.
15. Fan L., Vonshak A., Gabbay R., Hirshberg J., Cohen, Z., Boussiba S. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine // Plant Cell Physiol. – 1995. – 36. – P. 1519 – 1524.
16. Fraser P.D., Miura Y., Misawa N. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes // J. Biol. Chem. – 1997. – 272. – P. 6128-6135.
17. Grung M., Metzger P., Liaaen-Jensen S. Algal carotenoids 53; secondary carotenoids of Algae 4; secondary carotenoids in the green alga *Botryococcus braunii*, race L, new strain // J. Biochemical systematics and ecology. – 1994. – 22, No 1. – P. 25 – 29.
18. Hirschberg J., Harker M. Carotenoid-producing bacterial species and process for production of carotenoids using same // US Patent 5935808 – 1999.

19. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Bjørnland T. Data for identification of 47 key phytoplankton pigments / Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. – UNESCO Publishing: Paris, France, 1997. – P. 493 – 553.
20. Kopecký J., Schoefs B., Loest K. et al. Microalgae as source for secondary carotenoid production: a screening study // Algological Studies. – 2000. – **98**. – P. 153 – 168.
21. Laatsch H., Schwab D. Identification and quantification of carotenoids and carotenoid esters from the foraminiferan *Allogromia laticollaris* Arnold // J. Foraminif. Res. – 1984. – **14**, No 1. – P. 36 – 49.
22. Liaaen - Jensen S., Andrewes A. G. Analyses of carotenoids and related polyene pigments // Meth. Microbiol. – 1985. – **18**. – P. 235 – 255.
23. Liu B.-H., Lee Y.-K. Composition and biosynthesis pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. // Biotechnol. Lett. – 1999. – **21**. – P. 1007 – 1010.
24. Lorenz R.T., Cysewski G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin // Trends Biotechnol. – 2000. – **18**, No 4. – P. 160 – 167.
25. Margalith P.Z. Production of ketocarotenoids by microalgae // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **51**. – P. 431 – 438.
26. Negro J. J., Garrido-Fernandez J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*) // Comp. Biochem. Physiol. – 2000. – **126**, No 3. – P. 347 – 352.
27. Qin S., Liu G. X., Hu Z. Y., The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) // Process Biochem. – 2008. – **43**. – P. 795 – 802.
28. Rodriguez-Amaya D. B. A guide to carotenoid analysis in foods / Washington: ILSI Press, 2001. – 71 p.
29. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Physiol. – 1994. – **144**. – P. 307–313.
30. Yuan J.-P., Chen F., Liu X., Li X.-Z. Carotenoid composition in green microalga *Chlorococcum* // Food Chem. – 2002 – **76**, No 3 – P. 319-325.
31. Zhang D. H., Lee Y. K., Ng M. L., Phang S. M. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. // J. Appl. Phycol. – 1997. – **9**. – P. 147 – 155.
32. Zang D. H., Lee Y.-K. Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. strain MA-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – P. 537 – 540.

Інститут біології южних морей НАН України
г. Севастополь, Україна

Получено 12.12.2009

І. В. ДРОБЕЦЬКА, І. М. ЧУБЧИКОВА, А. Б. БОРОВКОВ, Г. С. МІНЮК

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АСТАКСАНТИНА І КАНТАКСАНТИНА У ЗЕЛЕНИХ МІКРОВОДОРСТЕЙ МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Резюме

Запропоновано новий варіант методики визначення вмісту астаксантина і кантаксантина в біомасі зелених мікроводоростей-продуцентів кетокаротиноїдів з використанням послідовної одномірної тонкошарової хроматографії на пластинках ПТСХ-АФ-А в двох системах розчинників.

Ключові слова: мікроводорості, астаксантин, кантаксантин, тонкошарова хроматографія

I. V. DROBETSKAYA, I. N. CHUBCHIKOVA, A. B. BOROVKOV, G. S. MINYUK

DETERMINATION OF ASTAXANTHIN AND CANTHAXANTHIN CONTENT OF GREEN MICROALGAE BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY METHOD

Summary

A new method for determination of astaxanthin and canthaxanthin content in ketocarotenoid-producing green microalgae by sequential one-dimensional thin layer chromatography on "Sorbfil" plates ПТСХ-АФ-А in two solvent systems has been proposed.

Key words: microalgae, astaxanthin, canthaxanthin, thin layer chromatography