

应用 C_{30} -HPLC-PDA 分离与鉴定番茄红素几何异构体

惠伯棣¹, 李京², 裴凌鹏³

(1. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100083; 2. 首都师范大学生命科学院, 北京 100037;

3. 中国中医研究院, 北京 100009)

摘要:在装备了二极管阵列检测器(PDA)的高压液相色谱(HPLC)上,应用 C_{30} 柱,番茄红素几何异构体获得了良好的分离。色谱条件为: Waters YMC Carotenoid S-5 (4.6×250mm)柱;乙腈-甲醇-三乙胺(5:25:0.05, V/V)为流动相 A, 甲基叔丁基醚-三乙胺(100:0.05, V/V)为流动相 B, 流动相 B 在 8min 内由 0% 线性增至 55%, 而后维持恒定至 35min; 流速 1.0mL/min; PDA 波长范围 260~700nm; 进样量 20μL。根据各组分的色谱行为、光谱特征和在碘催化下发生几何异构的产物分析, 13,13'-顺式番茄红素、11,11'-顺式番茄红素、9,9'-顺式番茄红素和全反式番茄红素 4 个组分被鉴定。本研究的结果奠定了应用 C_{30} -HPLC-PDA 定量检测番茄红素几何异构体的基础。

关键词: 番茄红素, 几何异构体, C_{30} 柱

Abstract: The lycopene geometrical isomers were readily separated by HPLC equipped with photodiode array detector on a C_{30} column under following HPLC conditions: YMCTM Carotenoid S-5 (250×4.6mm), mobile phase A and B were acetonitrile-methanol-TCA (75:25:0.05, V/V) and MTBE-TCA (100:0.05, V/V), respectively. Mobile phase B increased linearly from 0% to 55% (V/V) in the first 8 minutes and then kept constant at the flow rate of 1.0mL/min. Sample injection volume was 20μL. According to its chromatographic behavior, spectral characteristics and geometrical transition catalyzed by iodine, 4 isomers of 13,13'-Z-, 11,11'-Z-, 9,9'-Z- and all E-isomers were identified. Result from this study formed the base to quantify lycopene geometrical isomers by C_{30} -HPLC-PDA.

Key words: Lycopene; geometrical isomer; C_{30} column

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306 (2006)07-0049-04

番茄红素异构体的理化性质有所不同, 二者的电子吸收光谱特征也有所不同。顺式异构体的主吸

收峰与反式异构体的主吸收峰相比, 可以观察到向短波方向发生的“紫移”。单顺式异构体“紫移”幅度较小, 多顺式异构体的紫移幅度较大, 一般超过 20nm^[1]。而且, 顺式异构体在 360nm 处左右会出现一特征吸收峰。由于本项研究中所使用的 HPLC 装备了 PDA, 在分离番茄红素的分离过程中获得这些光谱是很方便的。这些光谱的特征可作为判断番茄红素异构体的重要依据。碘是一个活跃的催化剂, 可以作用于分子的二级结构使分子发生弯曲, 改变构型。番茄红素全反式异构体被碘诱导可形成顺式异构体, 这是一个已知多年的化学反应。在本项研究中, 碘被用来催化诱导从 HPLC 分离出的全反式番茄红素异构化, 生成顺式异构体, 以作为在 HPLC 上对顺式异构体组分鉴定的依据。目前, 核磁共振(NMR)圆二色光谱(CD)等能够鉴定分子几何异构体的设备在我国多数进行番茄红素研究工作的实验室和检测部门中应用得并不普遍。相对而言, 电子紫外-可见吸收光谱设备得到了广泛的应用。这类设备也包括 HPLC 上的 PDA。在这种情况下, 建立以 C_{30} -HPLC-PDA 为基本手段的分离和鉴定番茄红素几何异构体的方法, 对于我国的大多数番茄红素研究和检测机构具有明显的实际意义。本项研究的目的是以 C_{30} -HPLC-PDA 为基本技术, 配合化学性质的验证, 建立分离和鉴定番茄红素几何异构体的方法, 为它们的定量奠定基础。这一方法在 NMR 和 CD 设备并不普遍的我国具有较强的实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

被分离和鉴定的番茄红素组分来自于番茄果实的萃取物; 番茄 购自北京朝来农艺园, 品种为“佳粉 26”; 碘 为分析纯试剂, 购自北京化工厂; 乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)、三乙胺 均为色谱

收稿日期: 2005-11-14

作者简介: 惠伯棣, 男, 博士, 教授, 研究方向: 类胡萝卜素化学及生物化学。

基金项目: 国家“十五”食品安全重大科技专项课题 (2001BA804A)。

纯试剂,购自迪马公司(Dikma Technologies)。

C_{30} 柱 (MC Carotenoid S-5, Waters), HPLC Waters 600E 溶剂输送系统, PDA-996 二极管阵列检测器, Waters Co.), 分光光度计 (SHIMADZU MultiSpec-1501)。

1.2 实验方法

1.2.1 番茄果实中番茄红素的萃取 准确称取新鲜番茄果实 10g, 于研钵中加 20mL 丙酮研磨, 收集上清液。再分别用 20mL 二氯甲烷研磨 4 次, 收集上清液。合并丙酮和二氯甲烷上清液于分液漏斗中, 弃去水相。负压浓缩有机相至 25mL, 低温避光保存。

1.2.2 C_{30} -HPLC 分离番茄红素异构体 HPLC 条件: 色谱柱: YMC Carotenoid S-5 (4.6×250mm); 流动相 A: 乙腈-甲醇 (1:1, V/V); 流动相 B: MTBE; 流动相 A 与 B 中分别加入 0.05% (V/V) 三乙胺; 线性梯度洗脱: B 在 8min 内由 0% 增加至 55% (V/V); 8~35min 内 B 维持 55%; 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 475nm; PDA 光谱收集范围 260~700nm; 进样量: 20 μ L。根据组分的色谱行为和光谱特征对番茄红素全反式异构体进行鉴定。

1.2.3 全反式番茄红素组分的收集和定量 从 C_{30} -HPLC 上收集全反式番茄红素组分, 用二氯甲烷定容。用分光光度计测量其 480nm 处吸光值, 并根据下面公式计算其含量。

$$x = (A_{xy}) / A_{1\%}^{1\text{cm}} \times 100\%$$

其中:

x = 样品中所含组分的含量 (%);

y = 样品溶液的体积 (mL);

A = 样品的组分 480nm 吸光值;

$A_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 吸光系数, 定义为在 1cm 光程长的比色杯中 1% (V/V) 浓度溶质的理论吸收值, 在此采用值为番茄红素 $\epsilon=3500$ 。

1.2.4 碘诱导生成顺式异构体 配制与番茄红素-二氯甲烷溶液相同浓度 (M/V) 的碘-二氯甲烷溶液, 按 1/20 (V/V) 的比例混合碘溶液与番茄红素溶液, 摇匀, 混合液在日光或距离 40W 日光灯 60cm 处照射 15min, 避光保存产物。

1.2.5 异构反应产物的 C_{30} -HPLC 分离 碘诱导反应的产物在相同的 HPLC 条件下被分离, 根据各组分的色谱行为和光谱特征对其进行鉴定。

2 结果与讨论

2.1 番茄果实萃取物在 C_{30} 柱上的分离

根据文献报道, 极性有所差异的二元梯度洗脱在反相 C_{30} 柱上分离不同极性的天然类胡萝卜素方面已有一些成功的先例^[2-4]。对于极性弱的一相 (流动相 B), 比较共同的观点是使用 MTBE; 对于极性较强的一相 (流动相 A), 一般的观点是甲醇、乙腈和水的组合。考虑到被分离物为不含氧的非极性类胡萝卜

素, 非水流动相是正确的选择。因此, 在本项研究中, 流动相 A 被定为乙腈和甲醇的组合。在这一组合中, 乙腈和甲醇的比例对异构体的分离有一定的影响。经过优化, 最后确定为 75:25。在这个洗脱条件下, 番茄果实萃取物中 3 类类胡萝卜素的洗脱顺序为: 含氧类胡萝卜素 (一般为叶黄素, 量很小) - 具环不含氧类胡萝卜素 (主要为 β -胡萝卜素) - 开环不含氧类胡萝卜素 (主要为番茄红素), 如图 1 所示。本项研究的目的是分离开环类胡萝卜素 (番茄红素) 的几何异构体。显然, 这一分离的合适洗脱条件应为恒定梯度洗脱。因此, 整个洗脱过程分为两步: 第一步为梯度洗脱, 其目的是洗脱并分离含氧类胡萝卜素; 第二步是恒定梯度洗脱, 目的是分离不含氧的类胡萝卜素 (包括番茄红素) 的几何异构体。二者的转换时间应发生在含氧类胡萝卜素和不含氧的具环类胡萝卜素的保留时间之间 (见图 1)。在恒定梯度洗脱的阶段, 流动相 B 的比例会对番茄红素几何异构体的分离产生明显的影响。经过优化, 在本项研究中流动相 B 的比例确定为 55% (V/V)。显然, 无论两步洗脱的转换时间, 还是恒定梯度洗脱中流动相 B 的比例, 二者的确定应根据不同固定相的性质决定。换言之, 二者需根据不同型号和品牌的柱子而优化。图 2 (实线部分) 为在本项研究中收集的番茄果实的丙酮-二氯甲烷萃取液 C_{30} -HPLC 色谱图。由于在本项研究中针对番茄红素的萃取主要采用二氯甲烷作为萃取剂, 故萃取物中含氧类胡萝卜素的比例很小。根据其色谱行为

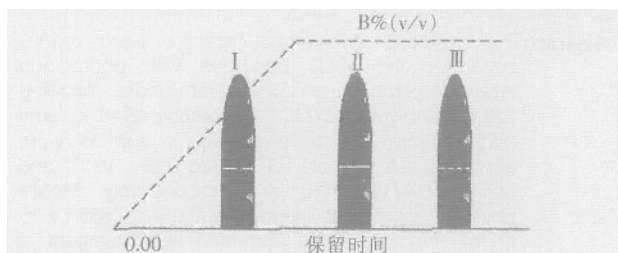


图1 番茄果实萃取物中类胡萝卜素的洗脱顺序和流动相B比例变化示意图
I=含氧类胡萝卜素; II=具环不含氧类胡萝卜素;
III=开环不含氧类胡萝卜素。

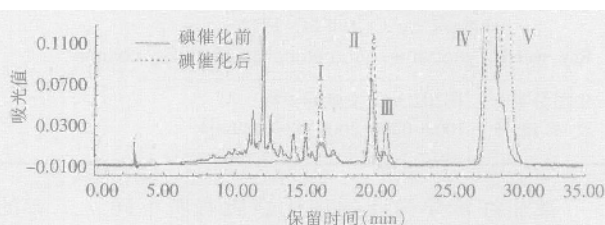


图2 番茄果实的丙酮-二氯甲烷萃取液反相 C_{30} 柱高效液相色谱图

色谱条件见 2.2 节。组分鉴定: I=13,13'-顺式番茄红素; II=11,11'-顺式番茄红素; III=9,9'-顺式番茄红素; IV=全反式番茄红素。

和光谱特征,峰 IV 被鉴定为全反式番茄红素组分。

2.2 顺式异构体的鉴定

碘可以诱导类胡萝卜素全反式异构体主要产生 9-9' 顺式异构体、11-11' 顺式异构体和 13-13' 顺式异构体,这一反应已被认识并应用在类胡萝卜素化学中有 70 年的历史了。在本项研究中,这一反应被用于诱导番茄红素全反式异构体发生几何异构,主要产生 3 种顺式异构体。反应产物的 C_{30} -HPLC 色谱图(见图 2 虚线部分)显示,全反式番茄红素峰(V 峰)前 3 个峰(即峰 I、II 和 III)的峰高明显增加,而且全反式番茄红素峰高度有所降低。这一变化的原因是部分全反式异构体经碘诱导转化为顺式异构体。在所有碘诱导反应的产物中均能检测出峰 V,其保留时间比全反式异构体稍长,电子吸收光谱与全反式异构体完全重合。该组分被推测为在碘诱导下全反式异构体向顺式异构体转化时的中间体。

根据文献报道,由于分子在一个双键处发生了顺式异构,在番茄红素的电子吸收光谱上 362nm 处会出现一个峰(吸收段),这个峰被 Koyama 等人称为“顺式峰”(is-peak),分子中发生顺式异构的部分被称为“cis-band”。同时,与全反式异构体比较,顺式异构体主吸收峰的最大吸收波长(λ_{max})也会发生轻度的“紫移”。图 2 中的 I、II、III 及 IV 号峰的电子吸收光谱图在 362nm 左右与全反式异构体的光谱比较可以看到有明显的峰存在,见图 3。同时,与 V 号峰的光谱比较, I、II、III、IV 号峰光谱主吸收峰和顺式吸收峰的 λ_{max} 发生了 8~10nm 和 5~7nm 的“紫移”,见图 4。这些光谱特征的变化提供了将 I、II、III 及 IV 号峰鉴定为番茄红素顺式异构体的平行证据^[1]。

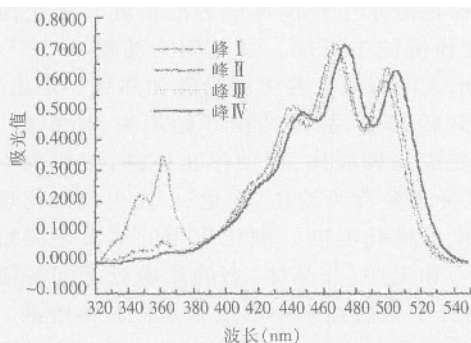


图 3 番茄红素几何异构体的电子吸收光谱特征比较

2.3 顺式异构体的洗脱顺序

根据文献报道,类胡萝卜素分子发生顺式异构的位置越靠近分子的对称中心,顺式特征峰越高^[1]。从图 3 中可以观察到, I、II、III 号色谱峰的光谱中顺式特征峰高逐渐减小,减小的幅度在图 5 中给予了量化表达。根据这一观察,可以判定 I 号峰为 13-13' 顺式异构体、II 号峰为 11-11' 顺式异构体、III 号峰为 9-9' 顺式异构体。

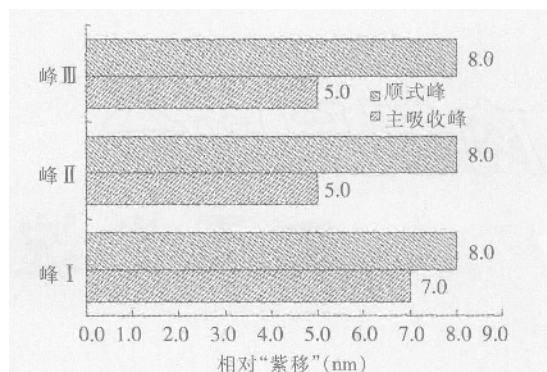


图 4 番茄红素顺式异构体的相对“紫移”比较

图中所示的相对“紫移”为:全反式异构体主吸收峰与顺式峰的最大吸收波长与顺式异构体相关波长之差。在此,全反式异构体主吸收峰与顺式峰的最大吸收波长分别为 473nm 和 370nm。

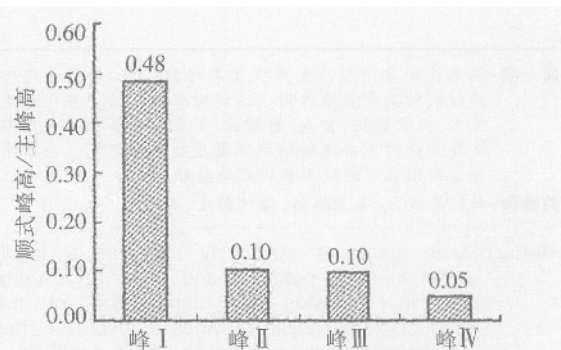


图 5 番茄红素几何异构体顺式特征峰信号强度的比较

形成这一洗脱顺序的原因可以用一种称为“草丛效应”的理论予以解释。由于其主链上基团的空间位阻均等,番茄红素分子为典型的链状分子。从全反式异构体异构为顺式异构体时,番茄红素分子的构型发生变化,分子由原来的直线型转变为折线型。根据反相 C_{30} 高效液相色谱分离原理中的“草丛效应”,直线型分子比折线型分子可以更深的插入到由无数 C_{30} 长链平行排列所形成的固定相“草丛”中(见图 6),因此更不易被流动相洗脱出来,从而增加了它的保留时间。所以,全反式异构体比顺式异构体在分离过程中有保留时间延长的特点。在 13,13'-、11,11'-、9,9'-三种异构体中,分子发生异构的位置逐渐偏向分子末端。因此,它们可以插入固定相“草丛”中的长度依次增长,即与固定相结合的牢固性依次增强。当

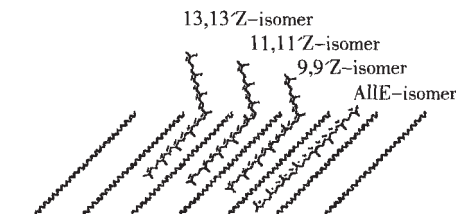


图 6 C_{30} -HPLC“草丛效应”示意图

(下转第 54 页)

表 5 脂肪对玉米淀粉糊化黏度的影响

油脂 (%)	开始糊化温度 (°C)	峰值黏度 (dU)	峰值温度 (°C)	95°C的黏度 (dU)
10	89.50	242	94.80	236
15	86.90	240	94.80	235
20	85.60	237	94.70	230

表 6 分离蛋白对玉米淀粉黏度的影响

分离蛋白 (%)	开始糊化温度 (°C)	峰值黏度 (dU)	峰值温度 (°C)	95°C的黏度 (dU)
1.0	78.60	238	90.80	232
1.5	72.30	238	91.00	224
2.0	68.55	238	91.30	219

中,相对地减少了膨胀糊化淀粉颗粒的水分,对淀粉有如较少的在水中糊化,颗粒膨胀困难,糊化温度和黏度都增高。但由于试验条件中水含量较大,因此,本试验葡萄糖浓度对玉米淀粉糊化温度和黏度影响不大。

2.5 脂肪对玉米淀粉糊化黏度的影响

将样品配制成浓度为 6% 的淀粉乳液,另分别加入 4.5、6.75、9.0mL 油脂,配成 10%、15%、20% 的油脂溶液并加入淀粉样品的 5% 的大豆蛋白做乳化剂,在沸水浴中加热至完全糊化,冷却至室温,测其黏度,结果见表 5。

从表 5 中可看出,随着脂肪含量的增高,玉米淀粉开始糊化温度降低,峰值温度基本不变;峰值黏度、95°C 的黏度也随之降低。

2.6 分离蛋白对不同淀粉黏度的影响

将样品配制成浓度为 6% 的淀粉乳液,另分别加入 1%、1.5%、2% 的分离蛋白,在沸水浴中加热至完全糊化,冷却至室温,测其黏度。同时以蒸馏水配制同浓度的样品液,测其黏度,其差值大小说明分离蛋白对黏度的影响效果,结果见表 6。

从表 6 中可看出,随着分离蛋白含量的增高,玉

米淀粉开始糊化温度降低,峰值温度、峰值黏度基本保持不变,95°C 的黏度也随之降低。

3 结论

玉米淀粉的糊化温度较高,几乎不受葡萄糖、pH 的影响,耐酸性较强;随着 NaCl 含量的增加,玉米淀粉开始糊化温度、峰值温度增高,峰值黏度、95°C 的黏度增加;随着脂肪含量的增高,玉米淀粉开始糊化温度降低,峰值温度基本不变,峰值黏度、95°C 的黏度也随之降低;随着分离蛋白含量的增高,玉米淀粉开始糊化温度降低,峰值温度、峰值黏度基本保持不变,95°C 的黏度也随之降低。

参考文献:

- [1] L LIU, J H HAN. Film-forming Characteristics of Starch [J]. Food Engineering and Physical Properties, 2005,1(11): E31-E3.
- [2] 田颖,袁绍军.食用变性淀粉的特性及应用开发[J].食品研究与开发,2002,23(6):6971.
- [3] 杜连起.新型食品添加剂——玉米淀粉磷酸酯在食品中的应用[J].冷饮与速冻食品工业,2003,9(2):24~26.

参考文献:

- [1] 惠伯棣主编.类胡萝卜素化学及生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2005.245~257.
- [2] C H Lin, B H Chen. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2003,1012:103~109.
- [3] C Emenhiser, L C Sander, et al. Separation of Geometrical Carotenoid Isomers in Biological Extracts Using a Polymeric C₃₀ Column in Reversed -Phase Liquid Chromatography[J]. J Agric Food Chem,1996,44:3887~3893.
- [4] C Emenhiser,L C Sander, et al. Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed phase liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1995, 707: 205~216.

(上接第 51 页)

流动相像一阵风吹过固定相“草丛”时,它们被流动相带走所需要的时间(即洗脱时间)依次延长。因此,13,13'-顺式异构体最先被洗脱出来,之后顺次是 11-11' 和 9-9' 顺式异构体及全反式异构体。

3 结论

本项研究的结果表明,应用 C₃₀-HPLC-PDA 色谱系统,在乙腈-甲醇(流动相 A)和 MTBE(流动相 B)的线性梯度洗脱条件下,13,13'-顺式番茄红素、11,11'-顺式番茄红素、9,9'-顺式番茄红素和全反式番茄红素 4 个组分可获得良好的分离。根据其电子吸收光谱特征,辅助以化学反应验证,这 4 个组分可被鉴定。这一结果奠定了应用 C₃₀-HPLC-PDA 定量检测番茄红素几何异构体的基础。