高效液相色谱法测定番茄及其制品中的番茄红素

薛　颖[1]　武兴德[2]　陈　杭[2]
(1. 北京市疾病预防控制中心,北京　100013;2. 北京市农林科学院蔬菜中心,北京　100089)

番茄红素是一种天然红色素,主要存在于番茄、西瓜、葡萄等蔬菜、水果中。与β-胡萝卜素一样,番茄红素也是种类众多的类胡萝卜家庭中的一员。

番茄红素不仅是天然、无毒、安全、理想的食品色素,80年代后期研究结果更表明:番茄红素还具有优越的生理功能。[1~3]

由于人体组织不能自身合成番茄红素,必须通过摄入加以补充,其中最主要的来源就是番茄及其制品(番茄酱、番茄沙司、番茄汁等),因此应对番茄及其制品中番茄红素的含量进行准确定量。长期以来,番茄红素的测定均是以光谱法为基础,[4,5]依靠前处理除去黄色素等各种杂质,再行提取番茄红素进行测定,前处理极为繁琐,且稍有不慎,即会影响测定结果。因此我们对液相色谱测定番茄红素含量的方法进行了研究。

1　材料与方法

1.1　材料

(1) 番茄由本研究中心番茄课题提供。对采收的样品迅速进行冷冻干燥处理,粉碎,置棕色瓶中,密封,真空干燥箱中避光保存,并尽快测定。(2) 新疆番茄粉。(3) 市售番茄酱。

试剂　丙酮、无水乙醇、石油醚(沸程30 ℃~60 ℃)、乙酸乙酯、三氯甲烷等均为分析纯;乙腈、甲醇为色谱纯;番茄红素为Sigma公司产品(纯度为90 %~95 %,番茄中提取);超纯水(大于17 MΩ)。

仪器　岛津10A*vp*高效液相色谱仪,旋转蒸发仪。

1.2　试样制备

标样的配制　将番茄红素用三氯甲烷和乙酸乙酯配制成一定浓度梯度的标准溶液,临用新配。

准确称取番茄冻干粉0.500 0 g、番茄酱或番茄沙司1.000 0 g于具塞三角瓶中,加提取液(干粉用丙酮提取液,番茄制品用丙酮+乙醇=9+1混合液)25.0 mL,摇匀,盖上瓶塞用超声波分别提取15~20 min,干粉提取1次,番茄酱和沙司提取2次。取提取液20.0 mL,置分液漏斗中,加入10 mL石油醚混匀,加入10 mL蒸馏水进行萃取,分取石油醚,剩余水相加入10 mL石油醚进行再萃取,合并2次石油醚相,再加水10 mL进行萃取,弃水相,除去水溶性成分,取石油醚相置旋转蒸发仪上,40 ℃~45 ℃蒸干,用1.0 mL乙酸乙酯溶解,经0.45 μm微孔膜过滤后进行液相色谱测定。

1.3　方法

色谱柱Nova-pak C_{18}(3.9 mm×300 mm);流动相乙腈∶三氯甲烷(92∶8);检测波长470 nm;流速1.0 mL/min;柱温35 ℃;进样量10 μL。

2　结果与讨论

2.1　不同提取剂对番茄红素提取的影响

本试验采用丙酮+乙醇(3+2)混合液和纯丙酮作为提取剂,对番茄干粉进行提取,测定结果表明2种提取剂对番茄红素的提取效果相差不大,但纯丙酮的效果略好于丙酮+乙醇混合液(见表1)。

对番茄酱采用纯丙酮、丙酮+乙醇(3+2)混合液和丙酮+乙醇(9+1)混合液3种提取剂进行提取,测定结果显示对于含水量较大的番茄酱等试样,选择含有乙醇的混合提取剂提取比较完全,其中以丙酮+乙醇(9+1)混合液的效果最佳(结果见表2)。

若考虑到蔬菜中多种类胡萝卜素联合测定,可选用混合提取剂,但应注意适当加大提取液相比和延长提取时间。

2.2　不同提取时间和提取次数对番茄红素提取的影响

本试验采用了不同的提取时间(15 min和30 min)、不同的提取次数(1,2,3次)和相同的提取相比[试样/溶剂(w/v)]为1∶40对番茄干粉中的番茄红素进行提取,测定结果表明不论何种提取剂和提取相比,15 min 1次均可提取完全,且无需进行多次提取(结果见表1),从表1中显示的结果可见,若用纯丙酮作为提取剂,15 min即可提取完全,而若采用混合提取剂,则提取时间应适当增加为宜。

对番茄酱的提取时间均为15 min,提取相比[试

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

样/溶剂(w/v)]为 1∶25,结果表明宜采用丙酮 + 乙醇(9 + 1)混合液提取 2 次,这样提取效率可达到 93 %(见表 2)。因此实验时提取时间延长至 20 min,提取效率得到了进一步提高。

表 1　番茄粉中番茄红素提取条件的比较

提取剂及提取时间	丙酮 + 乙醇 = 3 + 2 15 min			丙酮 + 乙醇 = 3 + 2 30 min			丙酮 15 min			丙酮 30 min		
提取次数	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③
测定结果 ng/10 μL	725.1	-	-	766.0	-	-	785.4	-	-	777.1	-	-

注:- 表示未检出。

表 2　番茄酱中番茄红素提取条件的比较　ng/10 μL

提取剂及提取次数	丙酮 + 乙醇 = 3 + 2			丙酮 + 乙醇 = 9 + 1			丙酮		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③
测定结果	1190.8	489.0	334.8	1427.6	396.7	140.4	1110.8	267.9	121.4
所占份额 %	59.11	24.27	16.62	72.66	20.19	7.46	74.05	17.86	8.09

2.3　不同放置时间的影响

番茄红素很容易氧化,因此提取后的试样应该尽快测定,但实际工作中,对试样逐一提取、测定又显得非常麻烦,甚至不太可能,需要试样在一定时间内保持相对稳定,所以我们进行了如下实验:把 1 份番茄红素标准样和 2 份番茄红素试样,在不同时间分别测定,记录每次测定的峰高,进行比较,结果见表 3。从表 3 的结果不难看出:在室温下(25 ℃以下)放置 3 h 以内和冰箱冷冻室(- 18 ℃)保存 1 d,对测定结果不会产生太大的影响。

表 3　不同放置时间对番茄红素测定的影响

	0 h 峰高	3 h 峰高	3 h 损失率 %	18 h 峰高	18 h 损失率 %
标准样	781265	771718	1.22(室温)	NT	NT
试样 1	327530	330388	- 0.87(室温)	NT	NT
试样 2	125445	NT	NT	126856	- 1.12(- 18 ℃)

注:NT 表示未进行实验。

2.4　回收率实验

取同 1 份番茄试样,每份准确称取 0.250 0 g,共 10 份,其中 5 份按干样 100 μg/g 加入番茄红素标准样,混匀后,与另外 5 份试样一样,均加入 25.0 mL 丙酮,同上超声波提取 15 min 后测定,计算,其加入回收率为 101.72 %。

2.5　几种类胡萝卜素的分离图谱

在如前所述的色谱条件下,番茄红素与蔬菜中其他主要的类胡萝卡素,如α- 胡萝卜素、β- 胡萝卜素、叶黄素等可以得到很好的分离,[6] 分离图谱如图 1 所示。由于番茄中的类胡萝卜素绝大部分是番茄红素,完熟红果中几乎不含α- 胡萝卜素、β- 胡萝卜素,青果中含有较大量的叶黄素,番茄酱等制品中更是以番茄红素为主,因此,如果仅是针对番茄红素的测定,整个测定时间可缩短至 8 min,这样就可以减少测定时间。

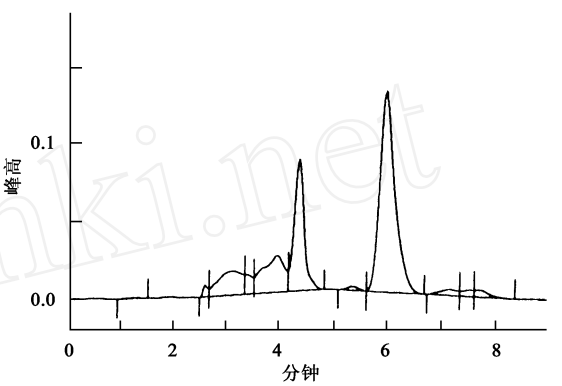

图 1　几种类胡萝卜素的分离图谱

1. 叶黄素;2. 番茄红素;
3.α- 胡萝卜素;4.β- 胡萝卜素

2.6　番茄红素的校正曲线和最小检出限

2.6.1　校正曲线

把番茄红素配成 100、20、4 μg/mL 溶液,采用不同浓度做校正曲线,进样体积为 10 μL。以峰高为纵坐标,以绝对进样量为横坐标绘制校正曲线(图 2),线性关系良好,$r = 0.9999$。

2.6.2　最小检出限

在信噪比(绝对灵敏度/噪音)为 2 时,番茄红素的最小检出下限为 0.47×10^{-9} g,即 0.47 ng。

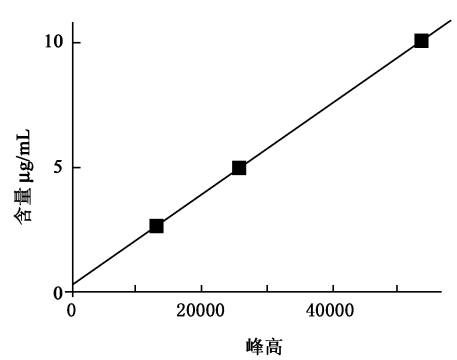

图 2　番茄红素的校正曲线

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 4　番茄及其制品中的番茄红素含量

试样名称	成熟度	测定值 mg/100 g
番茄粉(新疆)		162.75(1)
加工番茄(新疆)		76.99(1)
佳粉 15	成　熟	3.39(1)
红果品系	成　熟	18.56(1)
	刚转熟	5.12(1)
CXD188	近　熟	9.58(1)
	成　熟	12.90(1)
	过　熟	19.63(1)
CXD203	刚转熟	4.48(1)
	成　熟	7.35(1)
	完　熟	7.55(1)
	过　熟	12.36(1)
T5019	刚转熟	5.11(1)
	成　熟	6.43(1)
	完　熟	15.57(1)
	过　熟	23.61(1)
青果品系	青　果	0.06(1)
××番茄酱		82.91
×××牌番茄酱(北京)		105.66
×××番茄酱(天津)		83.16
×××番茄沙司(上海)		14.05
××××番茄沙司(马来西亚)		2.91
××番茄沙司(厦门)		18.17
×××番茄沙司(辣)(上海)		7.15

注:(1)为干重。

2.7　番茄及其制品中番茄红素含量的测定

在确定了 HPLC 法测定番茄红素的条件后,我们应用该方法对番茄酱和几种番茄在不同果实成熟度时番茄红素的含量进行了测定,并与国标法(分光光度法)的测定结果进行了比较,取得了一致的结果(结果另发)。表 4 显示的是用 HPLC 法测定的结果。

高效液相色谱法采用直接对试样进行提取的方法,再通过色谱柱把其中的番茄红素与其他杂质分离后测定,这样既减少了光谱法由于两步处理而可能造成的误差,提高了其检测的准确性,又简化了前处理。而且由于整个处理及测定过程可控制在 30～40 min 内完成,缩短了检测时间,因而更有利于生产过程中产品质量的监测,且适用于较大批量试样的测定。

参考文献:

[1] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997. 105.

[2] Norman I K. Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention[J]. The Society of Experimental Biology and Medicine, 1998, 95—97.

[3] 孙庆杰,丁霄霖. 番茄红素的保健作用与开发[J]. 食品与发酵工业,1997,23(4):72—75.

[4] GB10474—89. 番茄制品中番茄红素的测定[S].

[5] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1993. 547—548.

[6] 宋曙辉,薛颖,武兴德. 高效液相色谱测定蔬菜中的类胡萝卜素[J]. 华北农学报,2001,4.

[收稿日期:2002-01-14]

中图分类号:R15;S601;O657.7+2　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1004-8456(2002)05-0017-03

保健食品中的甘草酸的测定方法

杨永红　赵　珊　孙开奇　罗仁才

(北京市疾病预防控制中心,北京　100013)

甘草酸是甘草中含有的三萜类物质,属酸性皂甙,甙原为甘草次酸,其钙、钾盐是甘草的主要甜味成分。甘草酸具有肾上腺激素类作用,亦有消炎、抑制病毒、促进脂肪代谢等作用。目前已有许多保健食品使用甘草作为其原料之一,而且甘草酸也已用于临床,但保健食品中的甘草酸的测定方法尚未见报道。本文参照有关文献,[1,2] 应用反相 HPLC 法测定保健食品中的甘草酸,方法的特异性、准确度、精密度均较满意,本方法可用于测定保健食品中的甘草酸。

1　材料与方法

1.1　材料

2690 HPLC 系统 Waters 公司产品。

996 紫外检测器。

C18 柱(4.6 mm×200 mm)超声波提取器。

20%乙醇水溶液　取无水乙醇 20 mL,用水定容为 100 mL,摇匀。

冰醋酸　保证试剂。

乙腈　色谱纯。

甘草酸标准溶液　精密称取甘草酸标准品 10.0 mg,用 20%乙醇溶解并定容为 10.0 mL,混匀,此液每毫升含甘草酸 1.0 mg。

1.2　试样处理

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net