

番茄和胡萝卜中类胡萝卜素的 C<sub>30</sub> 与 C<sub>18</sub> HPLC 分离惠伯棣<sup>1</sup> 李京<sup>2</sup> 孙拿拿<sup>1</sup> 裴凌鹏<sup>3</sup> 廖萍泰<sup>4</sup>(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. 中国中医科学院,北京 100009;4. 兰州医学院公共卫生学院,甘肃 兰州 730000)

**摘要:**为提高胡萝卜素的分离水平,在相同的 HPLC 条件下比较了 C<sub>30</sub> 与 C<sub>18</sub> 柱对番茄和胡萝卜中类胡萝卜素的分离情况。比较的色谱条件为:C<sub>30</sub> 固定相:YMC<sup>TM</sup> Carotenoid S-5 柱(YMC,250 mm ×4.6 mm,5 μl);C<sub>18</sub> 固定相:DIAMONSL<sup>TM</sup> 柱(Dikma Technologies,250 mm ×4.6 mm,5 μl);流动相 A:乙腈+水=9+1;流动相 B:乙酸乙酯;线性梯度洗脱:在前 15 min 内,B 由 0% 增为 100%,随后,B 保持 100%,流速为 1.0 ml/min,检测波长为 450 nm,进样量为 20 μl,室温。从二者色谱图的比较可以看出,C<sub>30</sub> 柱反相高效液相色谱在分离几何异构体上显示出明显的优势,可有效分离成分复杂、多样、结构相似的不含氧类胡萝卜素顺反异构体。可以认为,C<sub>30</sub> 柱在分析食品中类胡萝卜素组分的领域中具有良好的应用前景。

**关键词:**色谱法,高压液相;类胡萝卜素;叶黄素

C<sub>30</sub> and C<sub>18</sub> HPLC Separation of Carotenoids from Plant Foods

HUI Bo-di, LI Jing, SUN Na-na, PEI Ling-peng, LIAO Ping-tai

(College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** For the purpose of improvement in the separation of carotenoids, a comparison of HPLC separation of caoretroids from carrot and tomato by C<sub>30</sub> and C<sub>18</sub> column was made under identical chromatographic conditions as: C<sub>30</sub> stationary phase: YMC<sup>TM</sup> carotenoid S-5 column (YMC, 250 mm ×4.6 mm, 5 μl); C<sub>18</sub> stationary phase: DIAMONSL<sup>TM</sup> column (Dikma Technologies, 250 mm ×4.6 mm, 5 μl). Mobile phase A: acetonitrile-water (9 + 1). Mobile phase B: ethyl acetate; Linearly binary gradient: B increased from 0% to 100% in the first 15 minutes and then kept constantly at the flow rate of 1.0 ml/min; Monitoring wavelength: 450 nm; Sample volume: 20 μl. Comparison of chromatograms by those two stationary phases suggested that C<sub>30</sub>-HPLC exhibited a significant benefit for the separation of various carotenes which are similar in structure and their geometrical isomers. It can therefore be considered that C<sub>30</sub> column has a bright future in the analysis of carotenoids from foodstuffs.

**Key word:** Chromatography, High Pressure Liquid; Carotenoids; Xanthophyll

类胡萝卜素 (Carotenoid) 是一类天然产物的总称。根据其含氧与否,类胡萝卜素可分为含氧的叶黄素 (Xanthophylls) 和不含氧的胡萝卜素 (Carotene)。二者极性差异显著,前者强,后者弱。所以,在吸附型 HPLC 中,比较容易将它们分开。在胡萝卜素中存在众多的几何 (E/Z) 异构体,在自然界中,它们的生物学功能也不同,利用吸附型 HPLC 将其分离相对困难得多。

反相 C<sub>18</sub> 是分离类胡萝卜素时最常用的 HPLC 固定相。配合这种相固定相,应用的流动相主要有 2 类:一类是含水的 (ARP),另一类是无水的 (NARP)。其中,乙腈+水 (9+1)、乙酸乙酯组合是应用得最广泛的一种流动相组合。无论应用哪种流动相,C<sub>18</sub> 固定相分离极性较强的叶黄素均是比较成

功的,但对结构类似的胡萝卜素及其异构体的分离是困难的<sup>[1-4]</sup>。C<sub>30</sub> 固定相是上个世纪 90 年代才研发成功的一种反相吸附固定相<sup>[5]</sup>。由于 C<sub>30</sub> 烷基的链长大致与胡萝卜素分子的长度相当,因而二者的相互作用得到了增强。因此,人们期望胡萝卜素及其异构体在 C<sub>30</sub> 固定相上可以得到更好的分离。

番茄和胡萝卜中含有丰富的类胡萝卜素类化合物,主要为胡萝卜素,是我国消费者饮食结构中重要的类胡萝卜素营养成分源。本项研究在相同的 ARP 流动相组合条件下,对 C<sub>30</sub> 与 C<sub>18</sub> 固定相分离番茄和胡萝卜中类胡萝卜素及其异构体的情况进行了比较。

## 1 材料与方法

1.1 材料 Waters 高压液相色谱仪,主要包括:Waters 2996 二极管阵列检测器及 Waters 600E 溶剂

基金项目:国家“十五”科技重大专项(2001BA804A21)

作者简介:惠伯棣 男 副教授 博士

输送系统。

用于类胡萝卜素组分萃取的二氯甲烷、丙酮、石油醚(BP:30~60)均为分析纯试剂,购自北京化工厂。用于 HPLC 流动相的乙腈、乙酸乙酯均为色谱级试剂,购自迪马公司(Dikma Technologies)。-胡萝卜素、-胡萝卜素及番茄红素全反式异构体参比样品购自 Sigma 公司。

1.2 样品的选择与制备 将 -胡萝卜素、-胡萝卜素及番茄红素全反式异构体参比样品用丙酮定容。分别取 1 g 新鲜番茄果实和胡萝卜组织于研钵中,每次加入 4 ml 的丙酮,重复研磨萃取至残渣和萃取液无色。之后,收集、合并萃取液,移至分液漏斗中,加入等体积的石油醚及水,使之分层,弃去下相,反复加入与上相体积的水洗涤上相,收集上相,在 45℃、-0.06 MPa 条件下减压蒸馏,除去部分石油醚,使残留液定容至 1 ml, -20℃ 充氮保存。

1.3 色谱条件 C<sub>30</sub> 固定相: YMC<sup>TM</sup> Carotenoid S-5 柱(YMC, 250 mm × 4.6 mm, 5 μl); C<sub>18</sub> 固定相: DIAMONASIL<sup>TM</sup> 柱(Dikma Technologies, 250 mm × 4.6 mm, 5 μl); 流动相 A: 乙腈 + 水 = 9 + 1; 流动相 B: 乙酸乙酯; 线性梯度洗脱: 在前 15 min 内, 流动相 B 由 0% 增为 100%, 随后, 流动相 B 保持 100%, 流速为 1.0 ml/min, 检测器波长设定范围为 260~600 nm, 检测波长为 450 nm, 进样量为 20 μl; 柱温: 室温; 组分鉴定方法: 根据其色谱行为(如保留时间)和光谱特征<sup>[6,7]</sup>。

## 2 结果与讨论

2.1 胡萝卜中类胡萝卜素的分离 - 及 - 胡萝卜素互为端基几何异构体。二者参比样品的保留时间在 C<sub>18</sub> 柱上相同, 电子吸收光谱见图 1。胡萝卜的组织细胞中含有丰富的 - 及 - 胡萝卜素, 图 2 为胡萝卜组织丙酮萃取物 C<sub>18</sub> 柱的分离色谱图。显然, 萃取物中二者的分离效果不够理想。

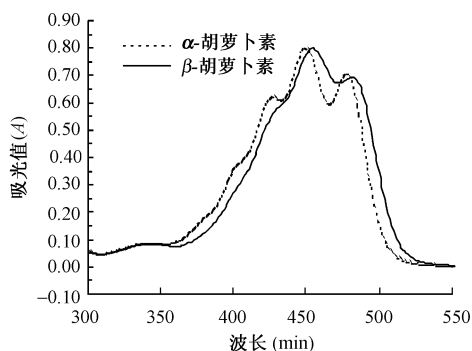
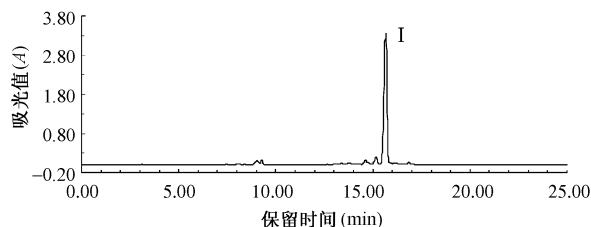


图 1 - 及 - 胡萝卜素参比样品的的电子吸收光谱

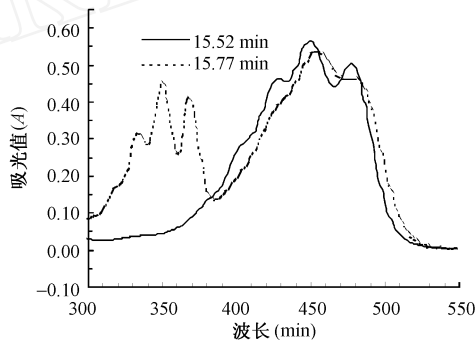
从图 2 可见组分 I 的色谱峰保留时间为 15.65 min。图 3 为从 PDA 检测器上收集的该色



色谱条件: 见 1.3。组分鉴定: = 混合物

图 2 胡萝卜石油醚萃取物的 C<sub>18</sub> - HPLC 色谱图

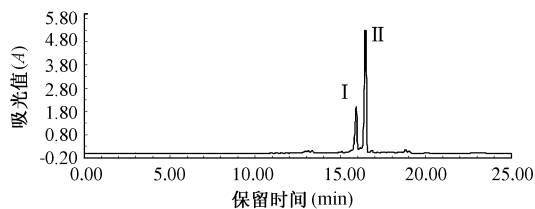
峰左肩(15.52 min)和右肩(15.77 min)的电子吸收光谱图。峰的左肩光谱与 -胡萝卜素参比样品的光谱(见图 1)特征相符合, 右肩光谱与 -胡萝卜素参比样品的光谱(见图 1)特征相符合。同时, 右肩光谱中还出现一最大吸收峰为 350 nm 的组分信号。该组分的光谱与六氢番茄红素(Phytofluene)的光谱特征相符合。因此, 可以认为该色谱峰含有多种组分。根据所得到的光谱信息, 该峰可以被认为由 -胡萝卜素、-胡萝卜素和六氢番茄红素 3 种组分组成。



溶剂: HPLC 流动相

图 3 组分的电子吸收光谱

图 4 为胡萝卜组织丙酮萃取物 C<sub>30</sub> 柱的分离色谱图。图中峰 和 的保留时间与 -胡萝卜素和 -胡萝卜素参比样品的保留时间一致。其电子吸收光谱如图 5 所示, 并与参比样品的光谱(见图 1)特征一致。因此, 组分 和 被分别鉴定为 -胡萝卜素和 -胡萝卜素。比较图 2 和 4, 可以看出, 在相同的条件下, C<sub>18</sub> 柱对 - 和 -胡萝卜素的分离不及 C<sub>30</sub> 柱。



色谱条件: 见 1.3。组分鉴定: = -胡萝卜素; = -胡萝卜素

图 4 胡萝卜石油醚萃取物的 C<sub>30</sub> HPLC 色谱图

2.2 番茄中类胡萝卜素的分离 番茄红素全反式

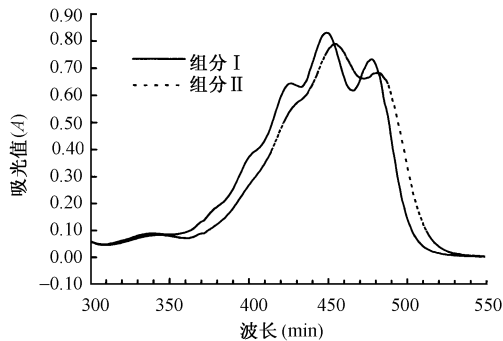


图5 组分 I 和 II 的电子吸收光谱

异构体参比样品在  $C_{18}$  柱上进行色谱分离时,其电子吸收光谱见图 6。番茄果实中含有丰富的番茄红素,并还含有一定量的  $\beta$ -胡萝卜素。图 7 为番茄果实组织丙酮萃取物的  $C_{18}$  HPLC 色谱图。图中峰 I 和 II 的保留时间分别与番茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素参比样品的保留时间一致。二者的电子吸收光谱图见图 8,并与参比样品吸收光谱(图 1 及图 6)特征相符合。可见,二者可以在  $C_{18}$  柱上获得良好的分离。

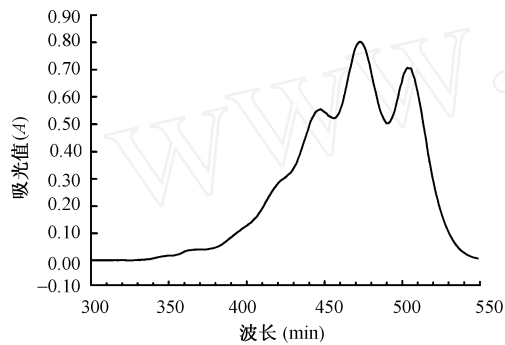
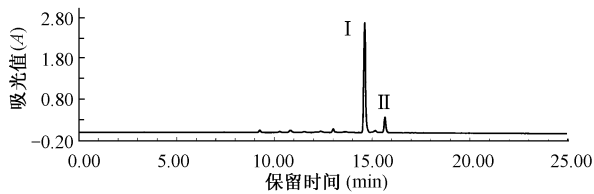


图6 番茄红素全反式异构体参比样品电子吸收光谱



I = 番茄红素; II =  $\beta$ -胡萝卜素

图7 番茄石油醚萃取物的  $C_{18}$  柱高压液相色谱图组分鉴定

图 9 为番茄果实组织丙酮萃取物  $C_{30}$  柱的分离色谱图。图中峰 I 和 II 的保留时间分别与  $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素参比样品的保留时间一致。二者的电子吸收光谱图见图 10,并与参比样品吸收光谱特征相符合。显然,二者亦可在  $C_{30}$  柱上获得良好的分离。但洗脱顺序发生了变化, $\beta$ -胡萝卜素先于番茄红素被洗脱出来。这种现象的发生是因固定相表面上烷基链的增长导致其对胡萝卜素的吸附选择性发生改变所致。

除了分离不同种类的胡萝卜素外, $C_{30}$  柱显示出

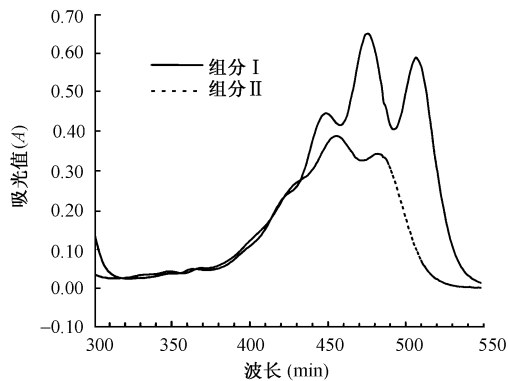
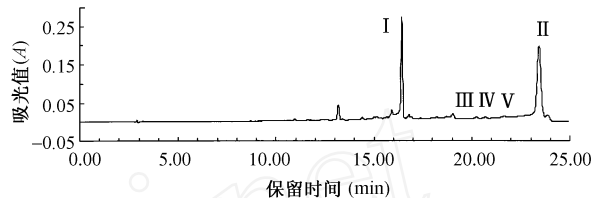


图8 组分 I 和 II 的电子吸收光谱



色谱条件:见 1.3 节。组分鉴定: I =  $\beta$ -胡萝卜素; II = 全反式番茄红素; III = 13-13' 顺式番茄红素; IV = 11-11' 顺式番茄红素; V = 9-9' 顺式番茄红素

图9 番茄石油醚萃取物的  $C_{30}$  柱高压液相色谱图

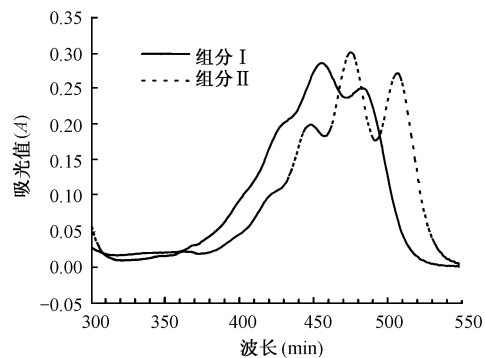


图10 组分 I 和 II 的电子吸收光谱

有效分离番茄红素几何异构体的能力。图 11 为组分 III、IV 及 V 的电子吸收光谱图比较。与全反式异构体(组分 II)相比,番茄红素顺式异构体(组分 III、IV 和 V)在其电子吸收光谱的 363 nm 处会出现

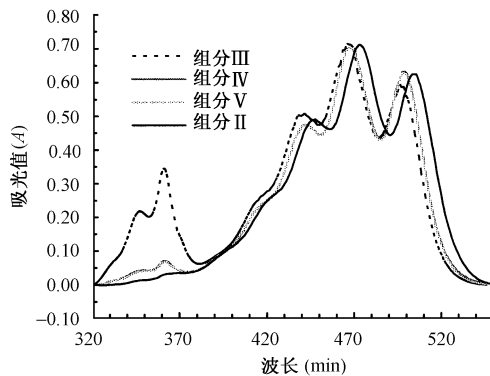


图11 番茄红素几何异构体的电子吸收光谱特征比较

# 总黄曲霉毒素 ELISA 定量检测方法的研制

江涛 柳桢 郑佳 李敏 计融

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**为敏感、特异和快速地检测食品中总黄曲霉毒素的污染水平,在抗总黄曲霉毒素单克隆抗体的基础上,研制了间接竞争 ELISA 检测方法,包被抗原为 AFB<sub>1</sub>-BSA,包被量为0.062 5 μg/ml,抗体工作浓度为 1:1.6 ×10<sup>6</sup>。该方法对黄曲霉毒素 B + G 标准品的最低检出浓度为0.13 ng/ml,对样品的最低检出量为1.50 μg/kg。校正曲线的线性范围为 0.26~20.00 ng/ml,线性方程  $y = -0.4463x + 0.3532$  ( $R^2 = 0.9915$ );对黄曲霉毒素 B + G 50%的抑制浓度为 2.08 ng/ml;对玉米 2 个加标水平的平均回收率分别为 94.56%和 112.05%,对花生 2 个加标水平的平均回收率分别为 87.50%和 85.60%。该方法所用抗总黄曲霉毒素单克隆抗体对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的交叉反应率分别为 100%、57.5%、104%和 19%,与其它真菌毒素无交叉反应。

**关键词:**黄曲霉毒素类;抗体,单克隆;酶联免疫吸附测定

一特征吸收峰,并且发生顺式异构的位置越靠近分子中部该特征吸收峰越高<sup>[3]</sup>。根据已有文献[8,9]的报道以及图9所显示的各组分光谱特征,鉴定:组分为 13,13' 顺式番茄红素;组分为 11,11' 顺式番茄红素;组分为 9,9' 顺式番茄红素。

从图7和图9的比较可以看出,在相同洗脱条件下,C<sub>30</sub>柱与 C<sub>18</sub>柱比较,番茄红素顺式异构体在 C<sub>30</sub>柱子上不再与全反式异构体存在于一个组分中,而得到了分离。达到这种分离效果的主要原因是 C<sub>30</sub>固定相具有更长的烷基链,导致固定相的疏水性增加,从而使番茄红素的保留时间延长,进而提高了柱效,最终能够较好地将顺、反式异构体分离。

## 参考文献

[1] Young A J, Britton G, eds. Carotenoids in photosynthesis [M]. London: Chapman and Hall, 1993. 409-416.  
 [2] Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, eds. Carotenoids (1A) Basel [M]. Boston and Berlin: Birkhäuser, 1995. 169-284.  
 [3] 惠伯棣,文镜,裴凌鹏,主编.类胡萝卜素化学及生物化学[M].北京:中国轻工出版社,2005.117-129.

[4] 惠伯棣,欧阳清波,曾悦.植物食品中类胡萝卜素的高压液相色谱检测[J].中国食品添加剂,2002,(5):72-82.  
 [5] Riemersma R A, Wood D A, Macintyre C C, et al. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, E and carotene[J]. Lancer, 1991,(337):1-5.  
 [6] Tsukida K, Saiki K, Takii, et al. Separation and determination of cis/trans- carotenes by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr,1982,(245):359-364.  
 [7] Lin C H, Chen B H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 2003, (1012):103-109.  
 [8] Emenhiser C, Sander L C. Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C<sub>30</sub> column in reversed-phase liquid chromatography [J]. J Agric Food Chem,1996,(44):3887-3893.  
 [9] Emenhiser C, Sander L C, Schwartz S J. Capability of a polymeric C<sub>30</sub> stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed phase liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1995,(707):205-216.

[收稿日期:2006-03-22]

中图分类号:R15;O657.72 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2006)04-0289-04

基金项目:国家“十五”科技重大专项(2001BA804A20)

作者简介:江涛 男 副研究员

通讯作者:计融 男 研究员