

盐生杜氏藻软胶囊中 β 、 β -胡萝卜素 几何异构体组成的测定

惠伯棣¹, 张艳², 叶珊¹

(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)

摘要: 采用 C₃₀-HPLC-PDA-ELSD 系统, 参照已公布的全反式异构体的吸光系数($A_{450}^{1\%}=2500$), 根据 β 、 β -胡萝卜素顺式异构体电子吸收光谱峰面积与 ELSD 质量峰面积之比, 估算出 9- 和 13- 顺式异构体的吸光系数分别为 2018 和 1990。根据其色谱峰面积, 可以准确测量出盐生杜氏藻软胶囊中 β 、 β -胡萝卜素几何异构体的组成。

关键词: β 、 β -胡萝卜素; 几何异构体组成; 吸光系数

Geometrical Isomer Composition Determination of β 、 β -carotene from *Dunaliella salina*

HUI Bo-di¹, ZHANG Yan², YE Shan¹

(1.College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100083, China;

2.College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: In this study, referring to published absorption coefficient ($A_{450}^{1\%}=2500$ at 450 nm) of all E-isomer, the absorption coefficients of 9-, and 13-isomers are deduced as 2018 and 1990, respectively, according to the ratio of their spectroscopic and mass responses (eg. peak areas) on C₃₀-HPLC-PDA-ELSD. According to their chromatographic peak areas, the geometrical isomer composition of β 、 β -carotene from *Dunaliella salina* can be actually assessed.

Key words: β 、 β -carotene; geometrical isomer; C₃₀ column

中图分类号: TS201.24

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0284-04

β 、 β -胡萝卜素(β 、 β -carotene)是一种类胡萝卜素(carotenoid)。其习惯命名为 β -胡萝卜素(β -carotene), 分子式为 C₄₀H₅₆。 β 、 β -胡萝卜素分子由中央多聚烯链和两端的六元环末端基团组成, 为双环结构, 整个分子呈几何中心对称。由于中央共轭多烯链的存在使整个分子具有高度的不饱和性, 可形成多种几何异构体。虽然在自然界中它经常以全反式(all E-isomer)的形式存在, 但也常见其 13- 和 9- 顺式异构体(Z-isomer, 图 1)的存在。

随着生命科学的发展, 有许多证据证明 β 、 β -胡萝卜素与人类的健康有着密切的关系。早在半个世纪前, 人类就知道类胡萝卜素中的 β 、 β -胡萝卜素可在哺乳动物的小肠中水解生成 VA, 进而参与视觉生理代谢。因此, 它被称为 VA 原, 是重要的营养物质。 β 、 β -胡萝卜素类是良好的自由基猝灭剂, 具有良好的抗氧化作用。它可有效地阻断细胞内的链式自由基反应, 因而被认为是治疗和预防由此引起的许多顽疾的理想药物。经过上世纪 90 年代的研究后, 9- 顺式异构体独特的保健功能已渐被人知, 成为人们研究的重点^[1]。 β 、 β -胡

萝卜素已被广泛地应用于功能性食品和食品添加剂中, 制成了多种产品, 如软胶囊等。

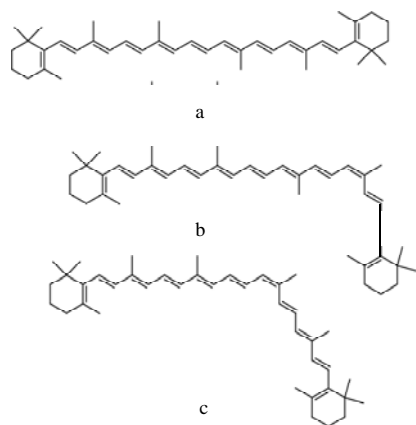
杜氏藻(*Dunaliella salina*)属于绿藻纲, 团藻目, 杜氏藻属, 为单细胞绿藻。杜氏藻体内含有丰富的类胡萝卜素, 主要为 β 、 β -胡萝卜素。其中的 β 、 β -胡萝卜素包括多种几何异构体, 有大量顺式异构体存在。鉴于上述顺式异构体的特殊功能, 作为天然 β 、 β -胡萝卜素资源的杜氏藻倍受关注。显然, 测定杜氏藻产品中 β 、 β -胡萝卜素几何异构体的组成无论是对产品的质量控制在还是对其生物学功能的研究均有重要意义。

在 C₃₀-HPLC 上, β 、 β -胡萝卜素的几何异构体可以获得良好的分离^[2-3]。由于参比样品的匮乏, β 、 β -胡萝卜素顺式异构体的定量需基于其电子吸收光谱范围内的吸光系数。在本研究中使用了蒸发光散射检测器(ELSD)。在 ELSD 上收集番茄红素全反式异构体信号的条件已由惠伯棣等建立完成^[4]。在本项研究中将这一条件应用于 β 、 β -胡萝卜素的信号收集。在实验中, 使用 C₃₀-HPLC-PDA-ELSD 串联系统, 同步收集每个 β 、 β -

收稿日期: 2007-06-26

基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划面上项目(200411417003)

作者简介: 惠伯棣(1959-), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然产物化学、类胡萝卜素化学。E-mail: bodi_hui@ygi.edu.cn



a. 全反式异构体; b. 9-顺式异构体; c. 13-顺式异构体。

图1 β, β -胡萝卜素全反式和常见顺式异构体结构Fig.1 Molecular structures of all E- β, β -carotene and the most commonly encountered Z-isomers

胡萝卜素几何异构体组分的电子吸收光谱和质量信号,由二者峰面积之比推算每个组分的吸光系数,最终实现在 C_{30} -HPLC-PDA 系统上 β, β -胡萝卜素各几何异构体的定量检测。最终根据其色谱峰面积,可以准确测量出盐生杜氏藻软胶囊中 β, β -胡萝卜素几何异构体的组成。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

实验用 β, β -胡萝卜素标准样品(纯度99.9%) Sigma 公司。所检盐生杜氏藻胶囊为(天光牌盐藻胶囊) 天津天光高科技开发有限公司;碘和丙酮(均为分析纯试剂)北京化工厂;用于 HPLC 分离的乙腈、甲醇和甲基叔丁基醚(MTBE)(均为色谱纯试剂) 迪马公司。

YMC Carotenoid S-5 C_{30} 柱、HPLC(含 1575 型溶剂输送系统、PDA-2996 型二极管阵列检测器、2420 型蒸发光散射检测器) Waters 公司; MultiSpec-1501 分光光度计 岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 顺式异构体的制备

配制相同浓度(mg/ml)的 β, β -胡萝卜素-丙酮和碘-丙酮溶液。向 β, β -胡萝卜素-丙酮溶液中滴加碘-丙酮溶液,最终比例为:碘液: β, β -胡萝卜素液=1:20 (V/V)。混合液在日光或距离 40W 日光灯 60cm 处照射 10min,而后避光保存产物。

1.2.2 盐生杜氏藻软胶囊内容物样品溶液的配制

将胶囊壁扎破,收集内容物,称取一定量的内容物溶于丙酮中用于 HPLC 分析。进样前用 $0.45 \mu m$ 滤膜过滤。

1.2.3 C_{30} -HPLC 分离几何异构体

碘诱导的 β, β -胡萝卜素异构体混合液用 C_{30} -HPLC-PDA-ELSD 分离。色谱条件:色谱柱: Waters YMC Caro-

tenoid S-5(4.6 \times 250mm);流动相 A: 乙腈-甲醇(75:25, 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 20min 内由 0% 增加至 80%, 20~25min 内 B 保持在 80%;流速: 1.0ml/min;检测波长: 450nm; PDA 光谱收集范围 260~700nm; ELSD 信号收集条件: 载气压力: 0.21MPa (30Psi), 喷雾器温度: 40 $^{\circ}C$; 飘移管温度: 45 $^{\circ}C$; 进样量: 20 μl 。根据其色谱行为和光谱特征对各组分进行鉴定。

1.2.4 β, β -胡萝卜素几何异构体的量与其色谱峰面积的关系

配制不同浓度的几何异构体样品液,在上述色谱和检测条件下测定各组分在 PDA 和 ELSD 检测器上的峰面积。回归各异构体含量与其峰面积间的关系。回归同一异构体组分在不同检测器上峰面积间的关系。

1.2.5 顺式异构体吸光系数的估算

一般情况下,用于定量分析的吸光系数是指该化合物在 λ_{max} 处的吸光系数。 β, β -胡萝卜素全反式异构体于 450nm 处的吸光系数已被报道,如 $A_{1\%}^{1cm}$ 一般在 2500 左右。

在 PDA 检测器上,一种 β, β -胡萝卜素顺式异构体的量与其在检测波长处的色谱峰面积呈正线性相关关系,符合朗伯-比尔定律。如果在 ELSD 检测器上,这种顺式异构体的量与其峰面积间亦存在正线性相关关系,则可回归其在 PDA 和 ELSD 上峰面积之间的线性相关关系,并计算其斜率。最终,按下列方法估算这种顺式异构体的吸光系数^[5]。

$$A_z = A_E \times \frac{K_z}{K_E} \quad (1)$$

式中: A_z 为顺式异构体吸光系数; A_E 为全反式异构体吸光系数; K_z 为顺式异构体斜率,即 PDA 峰面积/ELSD 峰面积; K_E 为全反式异构体斜率,即 PDA 峰面积/ELSD 峰面积。

1.2.6 几何异构体的定量检测

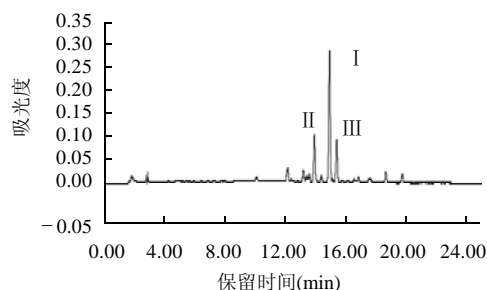
根据朗伯-比尔定律,按下列公式计算 β, β -胡萝卜素异构体的含量。

$$x = \frac{A_y}{100000 A_{1\%}^{1cm}} \quad (2)$$

式中: x 为样品中所含的 β, β -胡萝卜素异构体的量(g); y 为样品溶液的体积(ml); A 为样品中各组分的峰面积($mV \cdot s$); $A_{1\%}^{1cm}$ 为吸光系数,为在 1cm 光程长的比色杯中 1% (W/V) 浓度溶质的理论吸收值,计算 β, β -胡萝卜素全反式异构体含量时采用值为 $\epsilon = 2500(450nm)$ 。

2 结果与分析

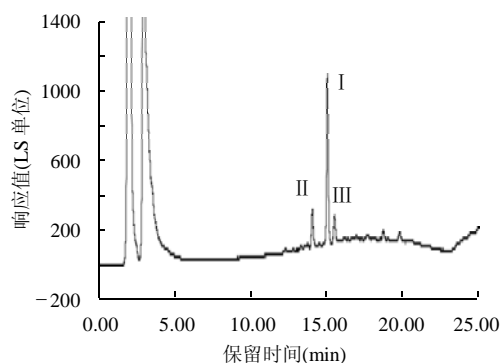
2.1 几何异构体在 C₃₀-HPLC-PDA-ELSD 上的分离与鉴定



I. 全反式异构体; II. 13-顺式异构体; III. 9-顺式异构体。

图2 β, β-胡萝卜素全反式异构体经碘诱导后 C₃₀-HPLC-PDA 色谱图

Fig.2 C₃₀-HPLC-PDA chromatogram of iodine-induced all E-β, β-carotene



I. 全反式异构体; II. 13-顺式异构体; III. 9-顺式异构体。

图3 β, β-胡萝卜素全反式异构体经碘诱导后 C₃₀-HPLC-ELSD 色谱图

Fig.3 C₃₀-HPLC-ELSD chromatogram of iodine-induced all E-β, β-carotene

图2、3分别为全反式β, β-胡萝卜素异构体经碘诱导后 C₃₀-HPLC-PDA 与 C₃₀-HPLC-ELSD 的色谱图。根据各组分的色谱行为和光谱特征结合参考文献所介绍的方法为其定性。

2.2 β, β-胡萝卜素几何异构体量与其 ELSD 峰面积的相关性

据李京等^[5]的报道,在被测得类胡萝卜素物质浓度较低时,ELSD 检测器的信号与其量间存在线性关系。如图4所示,当样品中全反式β, β-胡萝卜素浓度在 5.6~32.5mg/ml 范围内时,其量与 ELSD 上的组分峰面积呈现良好的线性关系。

2.3 几何异构 PDA 和 ELSD 峰面积的相关

如图5~7所示,不同浓度的 13-顺式异构体、9-顺式异构体和全反式异构体样品在 PDA 和 ELSD 上的峰面积。之间显示出正线性关系。

2.4 顺式异构体吸光系数的估算

以全反式异构体吸光系数为基准,根据式(1),可

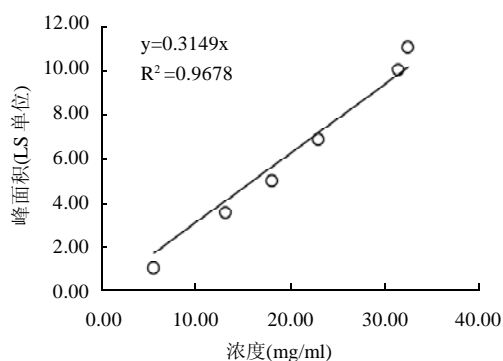


图4 全反式异构体量与其 ELSD 峰面积响应值的相关性

Fig.4 Correlation of response from ELSD and amount of all E-isomer

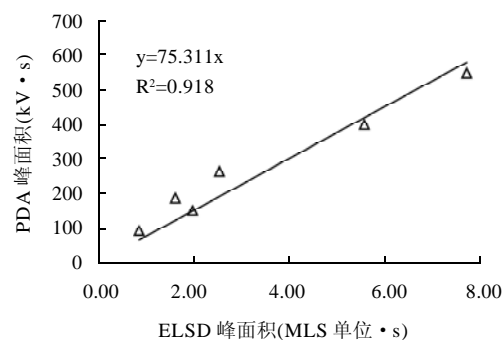


图5 13-顺式异构体 PDA 与 ELSD 峰面积的相关

Fig.5 Correlation of PDA response and ELSD response of 13Z-isomer

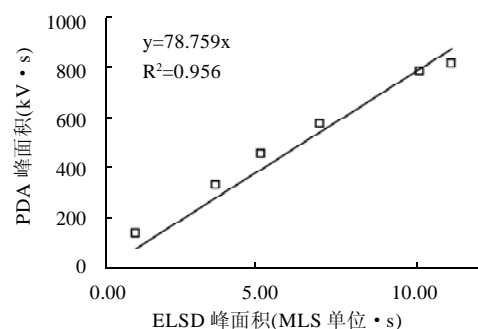


图6 9-顺式异构体 PDA 与 ELSD 峰面积的相关

Fig.6 Correlation of PDA response and ELSD response of 9Z-isomer

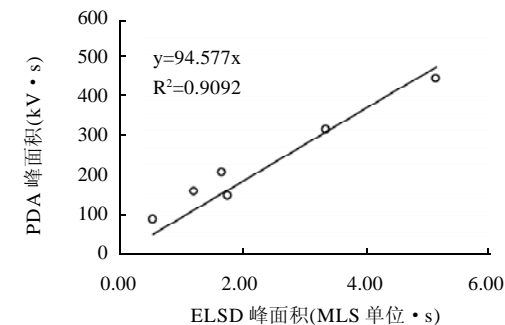


图7 全反式异构体 PDA 与 ELSD 峰面积的相关

Fig.7 Correlation of PDA response and ELSD response of all E-isomer

估算出顺式异构体的吸光系数(见表1)。

表1 β, β -胡萝卜素顺式异构体吸光系数的估算

Table 1 Estimation results of absorptivity of β, β -carotene E-isomer

异构体种类	全反式异构体	9,9'-顺式异构体	13,13'-顺式异构体
KZ*	94.577	78.759	75.311
吸光系数($A_{1\text{cm}}^{1\%}$)	2500	2018	1990

注: *: 见式(1); **: 光程为1cm时浓度为1%(W/V)的溶液吸光系数。

2.5 几何异构化对分子电子吸收光谱特征的影响

当 β, β -胡萝卜素全反式异构体发生异构化时, 其光谱特征亦发生变化。所有顺式异构体与全反式异构体相比, 在342nm处会出现一特征性吸收峰, 亦称“顺式峰”。同时, 当全反式异构体发生顺式构型变化时, 其电子吸收光谱主吸收段发生明显“紫移”, λ_{max} 紫移可达9nm(图8)。从图8可以看出: 顺式异构化位置越靠近分子中部, 电子吸收光谱“紫移”越明显。

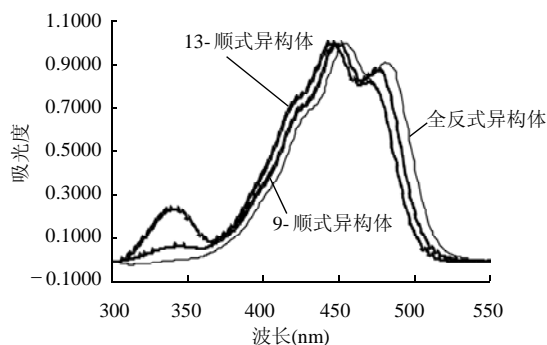


图8 β, β -胡萝卜素几何异构体的电子吸收光谱图

Fig.8 Electronic absorption spectra of β, β -carotene geometrical isomers

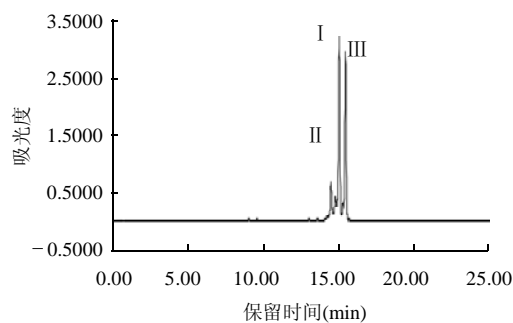
实际上, β, β -胡萝卜素全反式异构体的顺式异构化除了导致光谱精细特征发生变化外, 其光吸收强度也有所改变。与全反式异构体相比, 顺式异构体在 λ_{max} 处的吸光能力下降, 同时, 在342nm处的吸光能力上升, 形成顺式特征峰。顺式异构位置越靠近分子中心, 二者的变化值越大。这一消长规律在客观上反映了 β, β -胡萝卜素全反式异构体分子顺式异构化所导致的在 λ_{max} 处的吸光系数下降与顺式特征峰强度增加之间的关系^[6]。

2.6 盐生杜氏藻软胶囊内容物中 β, β -胡萝卜素几何异构体组成

图9为盐生杜氏藻软胶囊内容物的 C_{30} -HPLC色谱图。根据其色谱行为和光谱特征可对其中各 β, β -胡萝卜素几何异构体组分进行定性。

由于 β, β -胡萝卜素顺式异构体参比样品的缺乏, 在一般的检测中只能根据其色谱的峰面积进行测定, 其结果见图10(a)。这样做是以各组分的吸光系数相同为前

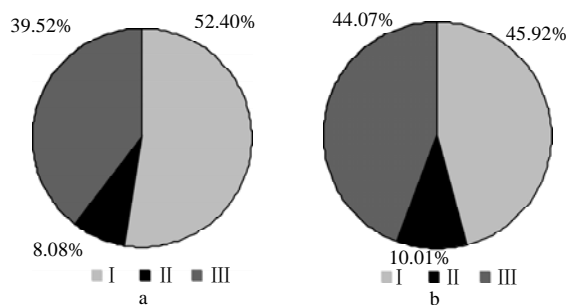
提的。本研究的结果表明: 各 β, β -胡萝卜素顺式异构体的吸光系数是不同的。根据各组分色谱的峰面积, 经过吸光系数的换算, 所得结果见图10(b)。显然, 图10(b)所示结果更真实地反映了盐生杜氏藻软胶囊内容物中 β, β -胡萝卜素几何异构体组成。



I.全反式异构体; II.13-顺式异构体; III.9-顺式异构体。

图9 盐生杜氏藻软胶囊内容物的 C_{30} -HPLC色谱图

Fig.9 C_{30} -HPLC-PDA chromatogram of *Dunaliella salina* soft-gel capsule containing



a.色谱峰面积结果; b.经过吸光系数换算的结果。I.全反式异构体; II.13-顺式异构体; III.9-顺式异构体。

图10 盐生杜氏藻软胶囊内容物中 β, β -胡萝卜素几何异构体的组成

Fig.10 Geometrical isomer composition of β, β -carotene from *Dunaliella salina* soft-gel capsule containing

参考文献:

- [1] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [2] 惠伯棣, 张茜, 文镜. 反相 C_{30} 柱在HPLC分析类胡萝卜素中的应用[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 264-269.
- [3] 惠伯棣, 李京, 裴凌鹏, 等. C_{30} -HPLC-PDA分离与鉴定 β, β -胡萝卜素几何异构体[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 252-255.
- [4] 惠伯棣, 李京, 郑康成. 蒸发光散射检测器在番茄红素反相HPLC定量分析中的应用[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 226-230.
- [5] 李京, 惠伯棣, 魏建华. 应用 C_{30} -HPLC-PDA-ELSD估算番茄红素顺式异构体吸光系数[J]. 中国食品学报, 2007(1): 125-130.
- [6] 惠伯棣, 刘沐霖, 庞克诺, 等. 食品中类胡萝卜素几何异构体组成的 C_{30} -HPLC检测[J]. 中国食品添加剂, 2007(2): 201-210.