

蒸发光散射检测器在番茄红素反相 HPLC 定量分析中的应用

惠伯棣¹, 李 京¹, 郑康成¹, 裴凌鹏¹, 廖萍泰²

(1. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100083;

2. 兰州医学院公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 在本项研究中, 应用反相 C₁₈ 高压液相色谱柱对番茄果实中的番茄红素(Lycopene)进行了分离。色谱条件为: C₁₈ 固定相: DIAMONSIL™ 柱; 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 15min 内, B 由 0 增为 100%, 随后, B 保持 100%; 流速为 1.0ml/min, 紫外—可见光检测器波长范围: 260~600nm; 监测波长: 475nm; 进样量为 20μl; 柱温: 室温。经过对漂移管温度, 载气压力及喷嘴温度三参数的摸索, 确定蒸发光散射检测器(ELSD)在检测样品中番茄红素含量时的条件为: 漂移管温度: 45℃; 载气压力: 30psi; 喷嘴温度: 40℃; 增益: 1。以番茄红素纯品为参比样品, 比较了 ELSD 与经常使用的紫外—可见光(UV-VIS)检测器在对番茄红素定量检测时的结果。结果表明: 虽然 ELSD 的灵敏度不及 UV-VIS 检测器, 但完全可以在番茄红素的定量检测中应用。同时, ELSD 可以检测出样品中不带发光基团的其它组分, 从而在检测萃取物及产品纯度时有良好的应用前景。

关键词: 蒸发光散射检测器; 高效液相色谱; 番茄红素

Application of Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) in Lycopene Quantification by RP-HPLC

HUI Bo-di¹, LI Jing¹, ZHENG Kang-cheng¹, PEI Ling-peng¹, LIAO Ping-tai²

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

2. Faculty of Public Health, Lanzhou Medical University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: In this study, lycopene from tomato fruits was separated on HPLC by reversed phase C₁₈ column under the conditions as: C₁₈ stationary phase-DIAMONSIL™ column mobile phase-A ratio of acetonitrile to water (9:1) and mobile phase-B ethyl acetate; linear binary elution gradient: mobile phase B increased from 0 to 100% in the first 15 minutes and later kept 100% consequently; flow rate-1.0 ml/min; UV-VI detection wavelength 260~600nm; monitoring wavelength-475nm; column temperature-ambient temperature. The detection conditions applied for this sample of evaporative light scattering detector (ELSD) were: drift temperature-45℃; carrier gas pressure-30psi; sprayer temperature-40℃; and gain-1. After variation in drift temperature, carrier gas pressure and sprayer temperature, the comparison of quantitative results from ELSD and UV-VIS detector was made with the reference of pure lycopene. Data from the comparison of results suggested that ELSD can be applied in lycopene

收稿日期: 2005-03-23

基金项目: “十五”国家重大科技专项(2001BA804A21)

作者简介: 惠伯棣(1960-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为类胡萝卜素生物化学。

[3] MRutaj, DBazulic, JSapunar-Postruznik, et al. Quinoxaline-2-carboxylic Acid (QCA) in swine liver and muscle[J]. Food Additives and Containants, 1996, 13(8): 879-882.

[4] Electron Capture-GC Determination of carbocox residues in swine liver:

quantitation and confirmation procedure, Animal dry analytical manual, U.S. Department of health and human science. Food and Drug Administration, Centre for Veterinary Medicine, 6/85, 1985.

quantification although its sensitivity is poorer than that of UV-VIS detector. Additionally, ELSD is capable to exhibit information on colorless components from the sample and therefore has a bright future in the application of purity check for the extracts and products of lycopene.

Key words: ELSD; HPLC; lycopene

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0226-04

番茄红素(Lycopene)是一种重要的类胡萝卜素,它广泛存在于水果及蔬菜中,在番茄、杏、番石榴、西瓜、番木瓜、红葡萄中均含有较多的番茄红素,其中,尤以番茄中的含量最为丰富。通常人体所需80%的番茄红素是通过食用番茄及其加工制品而获得的^[1]。

番茄红素由碳、氢两种元素构成,它的分子式为 $C_{40}H_{56}$,分子量536.85,结晶纯品呈深红色。因最早发现于番茄中而得名。近年来的许多研究表明,番茄红素具有抗氧化、防治前列腺疾病、调节机体免疫等重要功能,而逐渐成为国际上的功能食品成分和抗癌防癌研究中心的一个关注点。

番茄红素分子结构中具有的发色团(Chromophore)使其在紫外-可见光区有着独特的电子吸收光谱。这成为对其进行定性、定量测定的依据。因此,最常用的番茄红素定性、定量方法即紫外-可见光谱(UV-VIS)法。

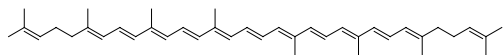


图1 番茄红素的分子结构

Fig.1 Molecular structure of lycopene

高效液相色谱(HPLC)作为色谱技术的一个分支,是在20世纪60年代末期,在经典液相色谱法的基础上发展起来的分离技术。该技术自从诞生起就被应用于类胡萝卜素类化合物的分离与分析中,并显示出良好的可靠性。

反相 C_{18} 是分离类胡萝卜素时最经常使用的固定相。配合反相固定相,主要应用的流动相有两类:一类是含水的(Aqueous reversed-phase, ARP),另一类是无水的(Non-aqueous reversed-phase, NARP)。其中,乙腈-水、乙酸乙酯流动相组合是应用得最广泛的一种流动相组合^[2~6]。

蒸发光散射检测器(ELSD)是上世纪60年代出现的一种质量检测器。它对有质量的物质都能进行检测,而不需其分子结构中具有发光基团。这在一定程度上弥补了其它HPLC检测器的不足,特别是检测无电子和分子吸收光谱信号的化合物时,显示出一定的优越性。其原理是将样品与流动相的混合物通过喷射变为细小的液滴,这些液滴通过加热的漂移管时,流动相组分被挥发,剩余的样品组分固体颗粒呈雾状进入散射室,对

入射光进行散射,光电倍增管将接收的散射光信号转换为电信号,数据处理系统可对信号进行处理、输出^[7]。

本项研究在HPLC上串联了两种检测器—UV-VIS和ELSD,分别对样品进行检测,并通过对两种检测器所得结果的比较,探讨在对番茄红素的定量分析中应用ELSD的可行性及其优缺点。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

Waters 高压液相色谱仪,主要包括:Waters 2420蒸发光散射检测器, Waters 2996 二极管阵列检测器及 Waters 600E 溶剂输送系统。

用于番茄红素组分萃取的丙酮、石油醚(BP: 30~60℃)均为分析纯(AR)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(Chromatography grade)试剂,购自迪马公司(Dikma Technologies);番茄红素标准样品(纯度>99.9%)购自Sigma公司;番茄果实购自本地超市。

1.2 样品制备

取一定量新鲜番茄果实于研钵中,加入一定量(1:4, W/V)的丙酮,重复研磨萃取至残渣和萃取液至无色。收集、合并萃取液,移至分液漏斗中,加入石油醚及适量水,进行液-液萃取,弃去下相,收集上相。氮气吹拂除去部分石油醚,使残留液浓缩至适当浓度,−20℃充氮保存^[8]。

1.3 色谱条件

色谱条件为: C_{18} 固定相:DIAMONSIL™柱;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15min内,B由0%增为100%,随后,B保持100%;流速为1.0ml/min,紫外-可见光检测器波长范围:260~600nm;监测波长:475nm;进样量为20μl;柱温:室温。组分鉴定方法见参考文献^[9,10]。

根据各组份的保留时间和电子吸收光谱与纯品的比较,可对各组份定性。各类胡萝卜素组份的定量测定采用外标法完成。色谱设备和方法的重复性良好(误差<7%)。

1.4 ELSD 条件

本项研究所使用的Waters 2420蒸发光散射检测器有四个可调的条件参数,即:漂移管温度,载气流量、

喷嘴温度及增益^[11]。通过在上述色谱条件下分离番茄红素纯品所得结果的评价优化和确定各项参数。检测器所使用的载气为氮气。

1.5 番茄红素含量与峰面积的回归

在上述色谱条件下,分离不同量的番茄红素纯品所得番茄红素组分峰的峰面积与其量进行回归计算,确定二者的数量关系。

1.6 番茄红素的ELSD检测下限测定

虽然ELSD检测下限的计算公式已经确定,但在本项研究中,判定番茄红素ELSD检测下限的标准仍为:信噪比 $\leq 2:1$ 。

1.7 番茄果实中番茄红素的定量检测

采用外标法。测定方法见参考文献[6]。

2 结果与讨论

2.1 ELSD参数的优化与确定

本项研究为首例使用ELSD对番茄红素进行定量分析的尝试。因此,检测条件的优化与确定在本项研究工作中占有十分重要的地位。

在蒸发光散射检测器的应用中,漂移管温度是对色谱结果影响最大的一个参数。在选择漂移管温度时所追求的优化指标为:较小的噪音振幅及较低的基线水平。番茄红素是热敏性物质,超过45℃就会降解损失。另一方面,低于40℃的漂移管温度又会使流动相挥发不完全,造成基线过高。换言之,对于番茄红素及其它类胡萝卜素组分来讲,可选择的漂移管温度范围只有40~45℃。因此,在本项研究中,漂移管温度选定为45℃,未对漂移管温度的变化对色谱结果的影响进行探讨。

当漂移管温度为45℃时,对载气流量做条件优化,所得结果如图2所示。从理论上讲,载气压力越高,流量越大,雾化液滴越小,流动相挥发越完全。由图2可见,载气压力在30~40psi时,组分峰面积的变化达到一个平台区。在本项研究中,最终选定的载气压力为30psi。

由于喷嘴温度控制系统只由加热装置构成,低于30

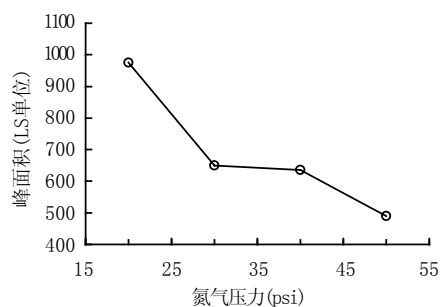


图2 氮气压力对峰面积的影响

Fig.2 The effect of nitrogen pressure to peak area

℃的设置很难达到。而喷嘴温度需比漂移管温度低至少5℃。因此,由于漂移管温度确定在45℃,喷嘴温度的变化范围只能在30~40℃。由图3可见最佳喷嘴温度为40℃。

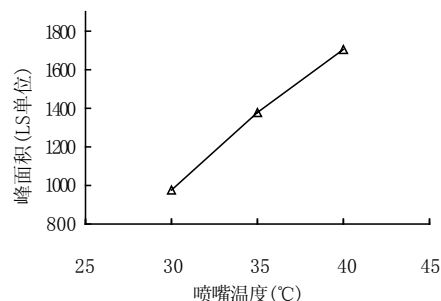


图3 喷嘴温度对峰面积的影响

Fig.3 The effect of sprayer temperature on peak area

综上所述,最终确定的检测参数为:漂移管温度:45℃;载气压力:30psi;喷嘴温度:40℃。在本项研究中,ELSD的增益(Gain)一直保持在1,并获得了良好的组分信号。

2.2 番茄红素含量与峰面积的回归

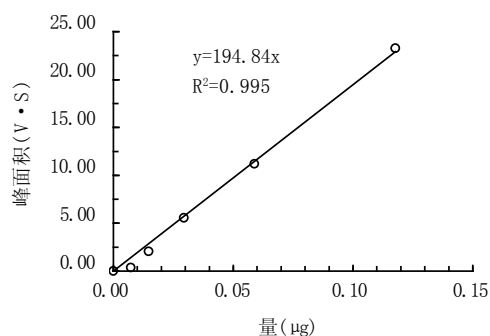


图4 UV-VIS检测器所测得的番茄红素量对其峰面积的线性回归关系

Fig.4 A linear co-relationship between the amount and peak area of lycopene monitored by UV-VIS detector

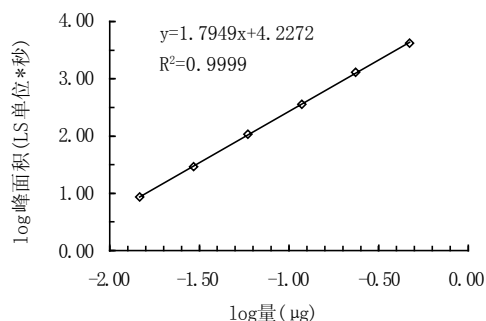
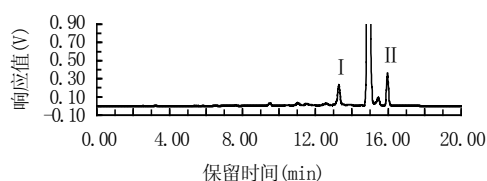


图5 ELSD所测得的番茄红素量对数值对其峰面积对数值的线性回归关系

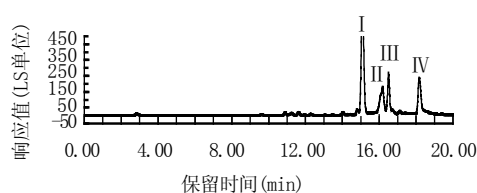
Fig.5 A linear co-relationship between the amount (in logarithmic scale) and peak area (in logarithmic scale) of lycopene monitored by ELSD



色谱条件为: C_{18} 固定相: DIAMONSIL™ 柱; 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, 紫外-可见光检测器波长范围: 260~600 nm; 监测波长: 475 nm; 进样量为 20 μ l; 柱温: 室温。组分鉴定: I = 番茄红素; II = β -胡萝卜素。

图6 番茄果实提取物的 PDAD-HPLC 色谱图

Fig.6 HPLC profile of extracts from tomato fruit



色谱条件见图6。ELSD 条件为: 漂移管温度: 45℃; 载气压力: 30 psi; 喷嘴温度: 40℃; 增益: 1。组分鉴定: I = 番茄红素; II = β -胡萝卜素; III = 无发色基团未知物; IV = 无发色基团未知物。

图7 番茄果实提取物 ELSD-HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC profile of extracts from tomato fruit

图4及5分别显示了UV-VIS与ELSD所测得的番茄红素量对其峰面积的线性回归关系。

比较图4和5可以看出, 在ELSD上所获得的番茄红素量对数值与其峰面积对数值的数量关系呈现良好的线性关系, 完全可以根据其对番茄红素进行定量测定。但是, 在现有检测条件下, ELSD的检测下限为0.0147 μ g。其灵敏度显然不如UV-VIS检测器。

2.3 番茄果实中番茄红素的定量检测

图6及7为番茄果实中番茄红素提取物的UV-VIS-HPLC和ELSD-HPLC色谱图。

采用外标法对番茄果实样品中的番茄红素含量进行定量检测。从PDAD-HPLC所得结果为: 0.7424 mg/g(干重); 从ELSD-HPLC所得结果为: 0.7391 mg/g(干重)。二者结果相近。

3 结 论

通过对PDAD-HPLC与ELSD-HPLC分析结果的比较, 可以认为应用ELSD对番茄果实中番茄红素进行定量分析是完全可行的。由于ELSD这种检测器不仅可以测出样品中的番茄红素含量, 还可检测出其它没有发色基团物质的存在, 这种检测器在检验番茄红素提取物和富含番茄红素产品的纯度时具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 范立梅. 浅谈番茄红素的生理功能[J]. 生物学通报, 1999, (9).
- [2] Britton G, Young A J. In carotenoids in photosynthesis (Young, A J and Britton, G, eds.) Chapman and Hall[M]. London, 1993. 409-416.
- [3] Britton G. In Carotenoids (1A) (Britton, G, Liaaen-Jensen, Sand Pfander, H, eds.) Birkhäuser. Basel[M]. Boston and Berlin, 1995. 269-284.
- [4] Goodwin T W Britton G. In Plant pigments (Goodwin, T W, ed.) [M]. London: Academic Press, 1988. 61-67.
- [5] 惠伯棣, 文镜, 等. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 中国轻工出版社, 2004. 117-129.
- [6] 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.
- [7] 魏决, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术[J]. 色谱, 2000, (9): 398-401.
- [8] 王强, 韩雅珊, 戴蕴青, 等. 反相高效液相色谱法同时测定番茄中5种类胡萝卜素[J]. 色谱, 1997, (15): 534-536.
- [9] K Tsukida, K Saiki, T Takii, et al. Separation and determination of cis/trans- β -carotenes by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1982, 245: 359-364.
- [10] C H Lin, B H Chen. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 2003, 1012: 103-109.
- [11] 冯埃生, 邹汉法, 汪海林, 等. 影响高效液相色谱/挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(6): 414-417.