

# C<sub>30</sub>-HPLC-PDA 分离与鉴定 $\beta$ -胡萝卜素几何异构体

惠伯棣<sup>1</sup>, 李京<sup>2</sup>, 裴凌鹏<sup>3</sup>, 张凌霄<sup>1</sup>, 张艳<sup>2</sup>, 胡雅馨<sup>2</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)

**摘要:** 在装备了二极管阵列(PDA)检测器的HPLC上, 应用C<sub>30</sub>固定相,  $\beta$ -胡萝卜素的几何异构体获得了良好的分离。分离条件为: 固定相=YMC Carotenoid S-5(4.6 × 250mm)柱; 流动相A=乙腈: 甲醇: 三乙胺(75: 25: 0.05, V/V); 流动相B= 甲基叔丁基醚(MTBE)- 三乙胺(100: 0.05, V/V); 线性梯度: B在20min内由0%增至80%; 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'-、11, 11'-、9, 9'-顺式和全反式异构体被鉴定。本研究的结果奠定了应用C<sub>30</sub>-HPLC-PDA定量检测  $\beta$ -胡萝卜素的几何异构体的基础。

**关键词:**  $\beta$ -胡萝卜素; 几何异构体; C<sub>30</sub>柱

## Separation and Identification of $\beta$ -carotene Geometrical Isomers by C<sub>30</sub>-HPLC-PDA

HUI Bo-di<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, PEI Ling-peng<sup>3</sup>, ZHANG Ling-xiao<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, HU Ya-xin<sup>2</sup>

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

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

3. China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100009, China)

**Abstract:** The geometrical isomers of  $\beta$ -carotene were separated by HPLC equipped with a photodiode array (PDA) detector on a C<sub>30</sub> column under conditions as below: stationary phase=YMC<sup>TM</sup> Carotenoid S-5 column (250 × 4.6mm); mobile phase A=acetonitrile-methanol-TCA(75: 25: 0.05, V/V); mobile phase B=MTBE-TCA(100: 0.05, V/V); linear gradient: B increased from 0 to 80%(V/V) in 20 minutes; flow rate: 1.0ml/min. PDA wavelength range: 260~700nm; sample injection volume=20 μl. According to their chromatographic behavior, spectral characters and geometrical transition catalyzed by iodine, 4 isomers of 13, 13'-, 11, 11'-, 9, 9'- and all E-isomers were identified. Result from this study is going to be the base to quantify  $\beta$ -carotene geometrical isomers by C<sub>30</sub>-HPLC-PDA.

**Key words:**  $\beta$ -carotene; geometrical isomer; C<sub>30</sub> column

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0252-04

$\beta$ -胡萝卜素( $\beta$ -Carotene)是一种类胡萝卜素(Carotenoid)。其习惯命名为  $\beta$ -胡萝卜素, 分子式为C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>。 $\beta$ -胡萝卜素只由碳氢两种元素组成, 其分子由中央多聚烯链和两端的六元芳环末端基团组成, 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15, 15'-、13, 13'-、11, 11'-、9, 9'-四种单顺式异构体(Z-isomer, 见图1)的存在<sup>[1]</sup>。

见图1)的存在<sup>[1]</sup>。

$\beta$ -胡萝卜素的生物学功能不同。例如: 在体外抗氧化实验中, 全反式异构体的抗氧化性优于顺式异构体<sup>[2]</sup>。因此, 在检测食品中的  $\beta$ -胡萝卜素含量时, 获得其异构体比例的信息, 对判断食品中  $\beta$ -胡萝卜素的生物学功能以及食品质量有很重要的参考价值。

众所周知,  $\beta$ -胡萝卜素组分可以应用HPLC在C<sub>18</sub>柱上被很好地与其它类胡萝卜素组分分离<sup>[3]</sup>。配合在线的PDA检测器,  $\beta$ -胡萝卜素组分可以在大多数样品

收稿日期: 2006-06-23

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

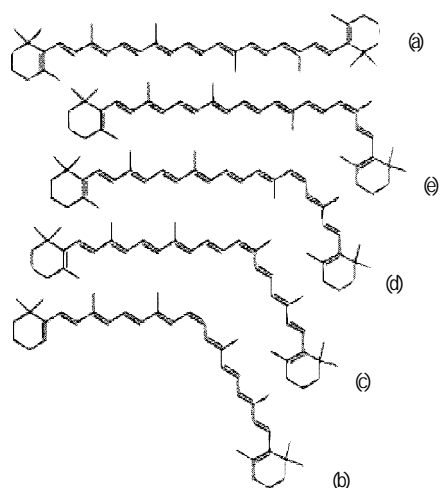


图1  $\beta$ -胡萝卜素全反式和常见顺式异构体结构  
Fig.1 The molecular structures of  $\beta$ -carotene geometrical isomers

中得到鉴定和定量。因此,  $C_{18}$ -HPLC-PDA 已成为定性、定量检测  $\beta$ -胡萝卜素的常用方法。但是, 其几何异构体的分离在  $C_{18}$  柱上的比较困难。 $C_{30}$  柱的出现使得  $\beta$ -胡萝卜素几何异构体的分离提供了新的选择。1994 年, Sander 等用  $C_{30}$  柱分离多种类胡萝卜素, 并有效地分离出多种几何异构体。可以认为, 由于  $C_{30}$  烷基的链长与类胡萝卜素分子的长度接近, 因而二者的相互作用得到了增强。所以,  $C_{30}$  柱在分离几何异构体时显示出明显的优势。另外,  $C_{30}$  固定相较长的烷基链也增加了固定相的疏水性, 导致非极性类胡萝卜素的保留时间增加, 从而提高了柱效<sup>[4~6]</sup>。

$\beta$ -胡萝卜素异构体的电子吸收光谱不同。顺式异构体的主吸收峰与反式异构体的主吸收峰相比, 其电子吸收光谱发生“紫移”。同时, 顺式异构体在 342~348nm 处会出现一特征吸收峰。这些光谱特征可作为判断  $\beta$ -胡萝卜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其发生弯曲, 改变构型。 $\beta$ -胡萝卜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  $\beta$ -胡萝卜素全反式异构体异构化成顺式异构体, 以作为在 HPLC 上对顺式异构体组分鉴定的依据。

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  $\beta$ -胡萝卜素几何异构体的方法, 为它们的定量奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

在本项研究中使用的番茄果实萃取物由新疆红帆生物科技有限公司提供, 该产品为番茄果皮的超临界  $CO_2$  流体萃取物。番茄品种为“87-5”。 $\beta$ -胡萝卜素 Sigma 公司; 用于异构体诱导的碘和二氯甲烷为分析纯试剂 北京化工厂; 用于 HPLC 分离的乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)三乙胺均为色谱纯试剂 迪马公司(Dikma Technologies)。

$C_{30}$  柱 YMC(型号为 Carotenoid S-5)。HPLC 设备 Waters 公司, 主要包括: 600E 溶剂输送系统和 PDA-996 二极管阵列检测器。分光光度计来自 SHIMADZU, 型号为 Multi Spec-1501。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\beta$ -胡萝卜素溶液的配制

准确称取一定量的  $\beta$ -胡萝卜素, 溶于适量的正己烷中, 使溶液浓度控制在  $\beta$ -胡萝卜素组分在 PDA 检测器上获得的峰高低于 OD 值 1。

#### 1.2.2 碘诱导生成顺式异构体

配制与  $\beta$ -胡萝卜素-正己烷溶液相同浓度(W/V)的碘-正己烷溶液。按 1/20(V/V)的比例混合碘溶液与  $\beta$ -胡萝卜素溶液, 摇匀。混合液在日光或距离 40 W 日光灯 60cm 处照射 15min, 而后避光保存产物。

#### 1.2.3 反应产物的 $C_{30}$ -HPLC-分离

应用  $C_{30}$ -HPLC 对碘诱导前、后的  $\beta$ -胡萝卜素溶液进行分离及组分鉴定。HPLC 条件: 色谱柱: YMC Carotenoid S-5(4.6 × 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%; 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 475nm; PDA 光谱收集范围 260~700nm; 进样量: 20  $\mu$ l。根据其色谱行为和光谱特征对各组分进行鉴定。

#### 1.2.4 番茄果皮萃取物溶液的配制

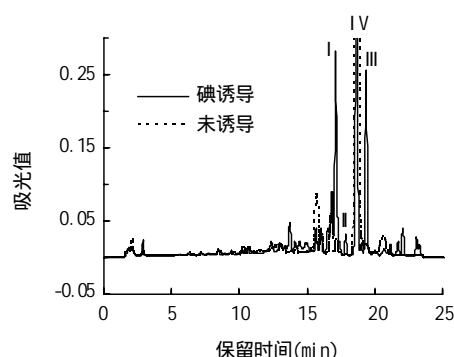
准确称取一定量的番茄果皮的超临界  $CO_2$  流体萃取物, 完全溶于二氯甲烷中, 过滤, 收集过滤液, 低温避光保存。溶液的浓度应当控制在其中  $\beta$ -胡萝卜素的色谱组分峰高低于 OD 值 1 的范围内。如有必要, 可以使用负压旋转干燥仪对溶液进行浓缩。浓缩温度不应超过 45  $^{\circ}C$ 。

#### 1.2.5 萃取物的 $C_{30}$ -HPLC 分离

HPLC 条件: 色谱柱: YMC Carotenoid S-5(4.6 × 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 8min 内由 0 增加至 55%(V/V)、在 8~35min 内维持 55%; 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 475nm; PDA 光谱收集范围 260~700nm; 进样量: 20  $\mu$ l。根据其色谱行为和光谱特征对各组分进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 碘诱导反应产物的 C<sub>30</sub>-HPLC- 分离



色谱条件：见 1.2.3 节。组分鉴定：I=13, 13'- 顺式异构体；II=11, 11'- 顺式异构体；III=9, 9'- 顺式异构体；IV= 全反式异构体。

图2  $\beta$ -胡萝卜素-正己烷溶液经过碘诱导前和后的 C<sub>30</sub>-HPLC 色谱图

Fig.2 C<sub>30</sub>-HPLC chromatogram of  $\beta$ -carotene-hexane solution before and after iodine catalyzed

图2为  $\beta$ -胡萝卜素-正己烷溶液经过碘诱导前和后的 C<sub>30</sub>-HPLC 分离色谱图。已有的结果表明：碘在诱导类胡萝卜素类化合物前反式异构体转化成顺式异构体时，生成的 13, 13'-、11, 11'- 和 9, 9'- 顺式异构体的比例最大。从图2中可以观察到：碘诱导后，组分 I、II、III 的峰面积则增长最多。故收集其电子吸收光谱进行观察。

### 2.2 顺式异构体的鉴定

由于分子在一个双键处发生了顺式异构，在  $\beta$ -胡萝卜素的电子吸收光谱上 342~348nm 处会出现一个峰(吸收段)。这个峰被称为“顺式峰”(cis-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

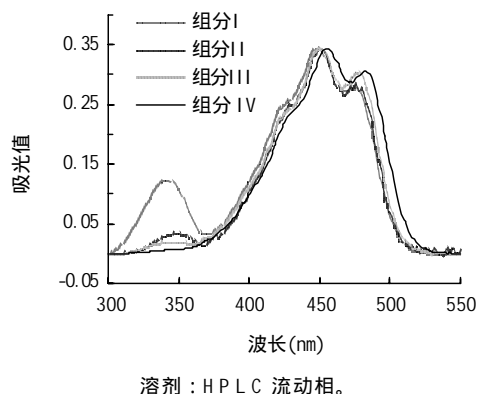
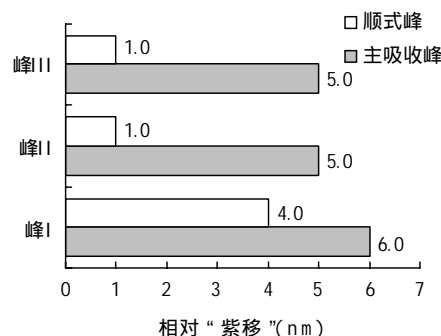


图3  $\beta$ -胡萝卜素几何异构体的电子吸收光谱特征比较  
Fig.3 Electronic absorption spectral comparison of  $\beta$ -carotene geometrical isomers

( $\lambda_{max}$ ) 也会发生轻度的“紫移”。图3中的 I、II、III 及 IV 号峰的电子吸收光谱图在  $\lambda_{max}=342\sim 347\text{nm}$  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 IV 号峰的光谱比较，I、II、III 号峰光谱主吸收峰和顺式吸收峰的  $\lambda_{max}$  分别发生了 5~6nm 和 1~4nm 的“紫移”，见图4。这些光谱特征的变化提供了将 I、II、III 号峰鉴定为  $\beta$ -胡萝卜素顺式异构体的证据。



全反式异构体主吸收峰与顺式峰的  $\lambda_{max}$  分别为 455nm 和 347nm。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  $\lambda_{max}$  与顺式异构体相关波长之差。溶剂：HPLC 流动相。

图4  $\beta$ -胡萝卜素顺式异构体的相对“紫移”比较

Fig.4 Relative spectral shift comparison of Z,  $\beta$ -carotenes

### 2.3 几何异构体的洗脱顺序

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。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。减小幅度的比较见图5。根据这一观察，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。

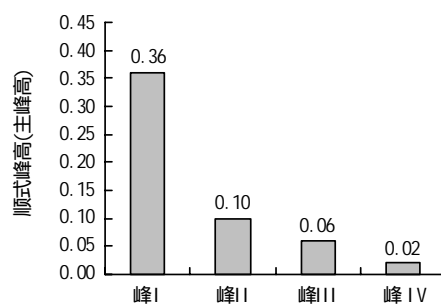


图5  $\beta$ -胡萝卜素几何异构体顺式特征峰相对强度比较  
Fig.5 Comparison of cis-peak relative intensity between  $\beta$ -carotene geometrical isomers

### 2.4 番茄果皮中 $\beta$ -胡萝卜素几何异构体的分离与鉴定

番茄果皮中含有丰富的类胡萝卜素，除番茄红素外，还有一定的  $\beta$ -胡萝卜素。番茄果皮超临界流

# 淡竹叶中黄酮类化合物的提取研究

张胜帮, 赵玲玲  
(温州大学应用技术学院, 浙江 温州 325035)

**摘要:** 为了研究淡竹叶中黄酮类化合物提取方法。本文采用超声波-醇提-酯萃法, 研究了提取的各种影响因素, 通过正交试验设计, 寻找最佳提取条件。试验结果表明, 以 60% 乙醇为溶剂, 固液比为 1:30, 经 20kHz 超声波提取 30min, 再经 70℃ 水浴回流 3h 为最佳, 在最佳实验条件下得到 2.27% 的收率。在试验影响因素中, 影响程度从大到小依次为溶剂 > 回流温度 > 超声时间 > 超声强度 > 回流时间 > 溶剂浓度 > 固液比。

**关键词:** 淡竹叶; 黄酮类化合物; 超声波-醇提-酯萃法; 提取

## Study on Extraction Method of the Flavones in the Herbal Lophatheri

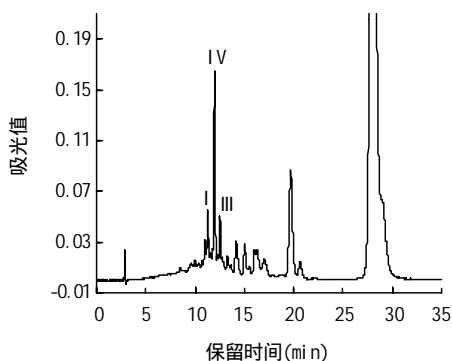
ZHANG Sheng-bang, ZHAO Ling-ling  
(College of Applied Technology, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

**Abstract:** To study the way of the flavonoid compounds extracted. The ultrasound-grade to-esters-crafts act was used, the various factors influencing extraction through orthogonal tests designed to find the best conditions was studied. The experimental

收稿日期: 2006-08-09

作者简介: 张胜帮(1964-), 男, 副教授, 研究方向为食品资源开发与分析化学。

体萃取物含有一定比例的, -胡萝卜素几何异构体, 在食品添加剂产品中具有一定的代表性。图6为番茄果皮的丙酮-二氯甲烷萃取液反相C<sub>30</sub>柱高效液相色谱图。根据组分I、III、IV与碘诱导反应产物中相关化合物电子吸收光谱的比较, 鉴定组分I、III、IV分别为13, 13'-、9, 9'-顺式和全反式异构体。



色谱条件: 见1.2.5节。组分鉴定: I=13, 13'-顺式异构体; III=9, 9'-顺式异构体; IV=全反式异构体。

图6 番茄果皮的丙酮-二氯甲烷萃取液反相C<sub>30</sub>柱高效液相色谱图

Fig.6 C<sub>30</sub>-RP-HPLC chromatogram of extract from tomato fruit skin

## 3 结论

本项研究的结果表明: 应用C<sub>30</sub>-HPLC-PDA色谱系统, 在乙腈-甲醇(75:25; 流动相A)和MTBE(流动相B)的线性梯度洗脱条件下, -胡萝卜素的13, 13'-、11, 11'-、9, 9'-顺式异构体和全反式异构体4个组分获得了良好的分离。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C<sub>30</sub>-HPLC-PDA检测, -胡萝卜素几何异构体的基础。

## 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. 245-257.
- [2] 廖平泰, 惠伯棣, 等. 叶黄素的体外抗氧化功能[J]. 食品与发酵工业, 2005, (4): 46-49.
- [3] 惠伯棣, 等. 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.
- [4] 惠伯棣, 等. 反相C<sub>30</sub>柱在HPLC分析类胡萝卜素中的应用[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 264-269.
- [5] 惠伯棣, 等. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, (5).
- [6] 惠伯棣, 等. 应用C<sub>30</sub>-HPLC-PDA分离与鉴定番茄红素几何异构体[J]. 食品工业科技, 2006, (6).