

C₃₀-HPLC-PDA 分离与鉴定虾青素类化合物初探

裴凌鹏¹, 惠伯棣^{2,*}, 刘蕊², 李京³

(1. 中国中医科学院, 北京 100700; 2. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100083;
3. 首都师范大学生命科学院, 北京 100037)

摘要: 虾青素是一种在食品和药品领域应用广泛的具有预防和治疗疾病的功能因子。由于它在 RP-HPLC 色谱上难以形成良好的色谱峰形, 虾青素及其相关化合物的分离和检测成为一项有难度的工作。本项研究中, 应用 C₃₀-HPLC-PDA 做了一系列工作来分离虾青素类化合物, 主要包括: 虾青素与其双酯的分离、虾青素几何异构体以及降解产物的分离。实验结果表明: 在酸性乙腈-水(流动相 A)和 MTBE(流动相 B)的流动相中, 可以获得良好的分离效果。这一结果使应用 C₃₀-HPLC-PDA 定量分析虾青素类化合物成为可能。

关键词: 虾青素; C₃₀ 柱; HPLC

A Preliminary Investigation into the Separation and Identification of Astaxanthin and Related Compounds by C₃₀-HPLC-PDA

PEI Ling-peng¹, HUI Bo-di^{2,*}, LIU Rui², LI Jing³

(1. China Academy of Chinese Medicine Science, Beijing 100700, China;
2. College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100083, China;
3. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: Astaxanthin was an important functional factor widely applied in food and pharmaceutical products with various disease-protection and disease-treatment functions. The analysis of astaxanthin and related compounds was a difficult task due to their poor peak shapes on RP-HPLC. In this study, a series of effort was made to develop a separation method of astaxanthin-like compounds on C₃₀-HPLC-PDA, including the separations of astaxanthin and its di-esters, geometrical isomers and degradation products. Data from those experiments suggested that by acidic acetonitrile-water (mobile phase A) and MTBE (mobile phase B), fractions mentioned as above were able to be separated successfully. This result is going to form the possibility of their quantization on C₃₀-HPLC-PDA.

Key words: astaxanthin; C₃₀ column; HPLC

中图分类号: 06-33

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0323-04

虾青素(Astaxanthin)是一种含氧的类胡萝卜素, 已经证明具有多种防治疾病功能。其分子结构中的碳骨架由中央多聚烯链和位于两侧的芳香环组成, 并在每个芳香环上各有一个羟基及一个酮基。全反式虾青素的系统命名为全反式 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-, -胡萝卜素, 分子式为 C₄₀H₅₂O₄, 相对分子量为 596.85, 虾青素分子的 C₄₀ 链含多个共轭双键, 故在理论上可以存在多个几何异构体, 其中以全反式异构体最为稳定, 图 1 为虾青素全反式异构体的分子式结构图。由于芳香环

上羟基(-OH)的存在, 其天然产物多数以酯的形式存在^[1]。存在于自然界中的大部分虾青素及其酯为全反式异构体。

虾青素存在于软体动物体、藻体及少数高等植物的花中。目前, 人们关注的虾青素天然资源有: 雨生红球藻、雨生红球藻、法夫酵母、冰凉花和虾壳^[2,3]。除法夫酵母外, 其它资源中虾青素主要以酯的形式存在。

由于其在 RP-HPLC 色谱上难以形成良好的色谱峰形, 虾青素的分离和检测成为一项有难度的工作。本

收稿日期: 2006-07-23

*通讯作者

作者简介: 裴凌鹏(1976-), 男, 讲师, 在读博士, 研究方向为天然产物生物化学与营养。

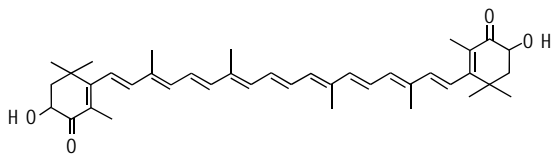


图1 全反式虾青素的分子结构

Fig.1 The molecular structure of all E-astaxanthin

项研究中,应用 C_{30} -HPLC-PDA做了一系列工作来分离虾青素类化合物。 C_{30} 柱子是近几年才在市场上出现的产品。由于 C_{30} 烷基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^[4~6]。另外, C_{30} 固定相较长的烷基链也增加了固定相的疏水性,导致类胡萝卜素的保留时间增加,从而提高了柱子的分离能力^[7]。本文对于应用 C_{30} 柱分离虾青素与其双酯、虾青素几何异构体以及降解产物情况进行了描述。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冰凉花萃取物由北京联合大学应用文理学院惠伯棣老师实验室制备。全反式虾青素参比样品由英国利物浦大学生命科学院提供。所用二氯甲烷、乙醇、丙酮、碘、高锰酸钾和磷酸均为分析纯试剂,购自北京化工厂。用于HPLC流动相的乙腈、甲基叔丁基醚(MTBE)均为色谱纯试剂,购自迪马公司(Dikma Technologies)。

1.2 主要仪器

C_{30} 分离柱(YMC Carotenoid S-5, Waters);HPLC(Waters 600E溶剂输送系统,PDA-2996二极管阵列检测器,Waters Co.);分光光度计(SHIMADZU MultiSpec-1501)。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

取少许冰凉花提取物置离心管中,加入适量二氯甲烷,超声振荡并离心,取上清液。全反式虾青素参比样品亦溶于二氯甲烷中,离心,取上清液。

1.3.2 虾青素的几何异构化

取少量全反式虾青素结晶,用二氯甲烷溶解,吸取少量溶液用紫外-可见分光光度计测得其吸光度值。根据公式-1计算其浓度。

$$x = (A \times y) / A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \quad (1)$$

式中, x 为样品中所含组分的含量(g); y 为样品溶液的体积(ml); A 为样品的组分480nm吸光度值; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为吸光系数,定义为在1cm光程长的比色杯中1%(W/V)浓度溶质的理论吸收值。在此采用值为2100。

根据虾青素溶液浓度,称量一定量的碘,配制与虾青素溶液相同浓度的碘-二氯甲烷溶液。将两种溶液按照1:2(V/V)比例混合,距40W日光灯60cm处照射15min。

1.3.3 虾青素的降解

配制1.55mg/ml的虾青素二氯甲烷溶液。再分别称取高锰酸钾2.4575g,无水碳酸钠3.75g,将二者溶解在25ml蒸馏水中。按1:10(V/V)将高锰酸钾溶液加入到虾青素溶液中,超声振荡2h,收集有机相,反应过程注意避光隔氧。

1.3.4 HPLC分离

1.3.4.1 冰凉花萃取物的HPLC分离

色谱条件:色谱柱:Waters YMC Carotenoid S-5 (4.6 × 250mm);酸性流动相A:乙腈-水(9:1),每100ml流动相A中加入15μl磷酸;流动相B:甲基叔丁基醚(MTBE);线性梯度洗脱:0~10min:B为25%;10~20min:B由25%升至75%;25~30min:B维持在75%。流速:1.0ml/min;检测波长:485nm;波长范围:250~600nm;进样量:20μl。根据各组分的色谱行为和光谱特征对其定性。

1.3.4.2 异构化产物的HPLC分离

色谱条件:同1.3.4.1节。恒度梯度洗脱:B为25%。

1.3.4.3 降解产物HPLC分离

色谱条件:同1.3.4.1节。线性梯度洗脱:0~15min:B由0%升至80%。

2 结果与分析

2.1 冰凉花萃取物的HPLC分离

图2、3为虾青素参比样品和冰凉花萃取物的HPLC色谱图。从二者的比较可以看出:图3中有一保留时间与图2中全反式虾青素组分峰保留时间一致的峰,可初步判定为虾青素单体。图4为这一组分的电子吸收光谱图。经比较,它与参比样品的光谱特征完全一致。这为该组分的定性提供了进一步的证据。此外,从图3可以看出:在该色谱条件下,冰凉花萃

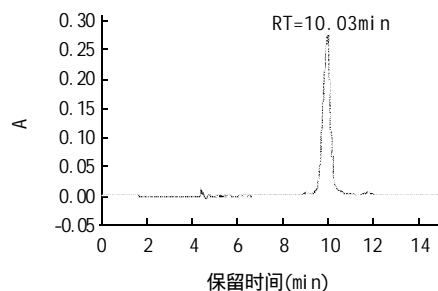


图2 全反式虾青素参比样品的HPLC色谱图

Fig.2 The HPLC chromatogram of astaxanthin reference sample

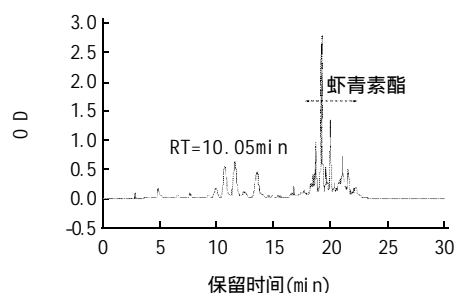


图3 冰凉花萃取物的HPLC色谱图
Fig.3 The HPLC chromatogram of Adonis extracts

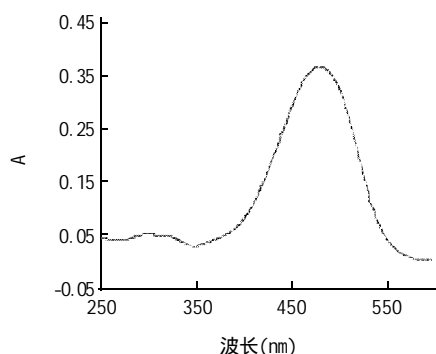
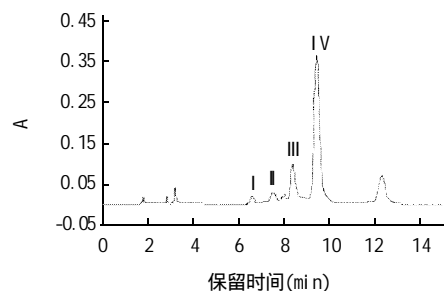


图4 冰凉花萃取物中保留时间为10.05min的组分电子吸收光谱图
Fig.4 The electronic absorption spectrum of fraction at 10.05min from Adonis extracts

取物中的虾青素单体与酯获得了较好的分离。图中16~23min这个时间段内出现的峰群为虾青素酯峰。事实上, 虾青素酯的极性远远小于单体的极性。虽然虾青素单体与其酯具有相同的生色团而表现出相似的光谱特征, 但仍可根据其保留时间(极性)的不同对其定性。从图3的峰面积积分结果可以看出: 冰凉花萃取物中虾青素主要以酯的形式存在。同时, 可以认为酸性流动相可以在 C_{30} -HPLC上有效地改善酮基类胡萝卜素的峰型。

2.2 几何异构化产物的分离

图5为碘诱导反应产物的HPLC色谱图。图5上组



组分鉴定: I=9, 9'-顺式异构体; II=11, 11'-顺式异构体; III=13, 13'-顺式虾青素单体; IV=全反式虾青素单体。

图5 碘诱导反应产物的HPLC色谱图
Fig.5 The HPLC chromatogram of iodine-induced product

分I-IV的电子吸收光谱见图6。从图6可以看出: 由于分子在一个双键处发生了顺式异构, 虾青素分子的电子吸收光谱上出现一个峰(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(λ_{max})也会发生轻度的“紫移”。通过组分II和III与组分IV的电子吸收光谱图在362~368nm段的比较可以看到这一顺式吸收峰的存在, 而组分I的顺式吸收峰在310~315nm段。同时, 组分I、II、III的 λ_{max} 发生了6~8nm的“紫移”。

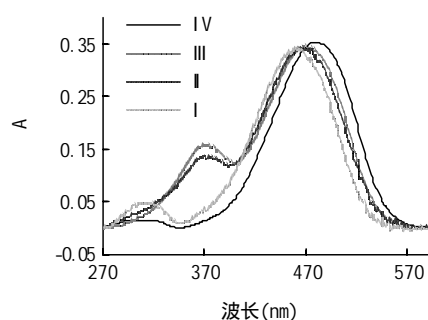
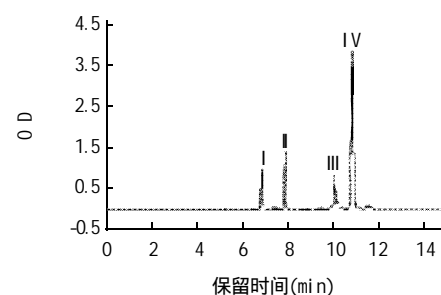


图6 虾青素几何异构体光谱比较
Fig.6 Spectral comparison of geometrical isomers

类胡萝卜素分子发生顺式异构的位置越靠近分子的中心, 顺式峰越高。从图6中可以观察到: 组分I、II、III的光谱中顺式峰高逐渐增加。据此, 组分鉴定为: I=9, 9'-顺式异构体; II=11, 11'-顺式异构体; III=13, 13'-顺式异构体; IV=全反式异构体。

2.3 虾青素降解产物的HPLC分离



组分鉴定: I、II、III为降解产物; IV为全反式虾青素。

图7 全反式虾青素降解产物色谱图
Fig.7 The chromatogram of all-E-astaxanthin degradation products

图7全反式虾青素降解产物色谱图。从图7可以看出: 在高锰酸钾的作用下, 全反式虾青素(组分IV)部分被降解为不同极性的3个产物, 分别为组分I、组分II和组分III。其光谱特征与全反式虾青素有所不同(见图8)。

响应面法优化猕猴桃果浆酶解工艺参数研究

汪志君¹, 韩永斌², 顾振新^{2,*}, 张丽华²

(1. 扬州大学食品科学与工程学院 江苏 扬州 225001;

2. 南京农业大学 农业部农畜产品加工与质量控制重点实验室 江苏 南京 210095)

摘 要: 本文研究果胶酶反应温度和作用时间及酶用量对猕猴桃果浆出汁率、果汁澄清度和乙醇不溶物的影响, 采用通用旋转设计和响应面分析猕猴桃果浆酶解最优条件。结果表明, 猕猴桃果浆的最佳酶解条件为: 反应温度为 45℃, 作用时间为 113min, 果胶酶用量为 0.013%, 在此条件下, 猕猴桃果浆预测出汁率达到 83.30%, 乙醇不溶物 0.98g/100ml, 果汁的澄清度为 81.47%。验证试验表明, 响应面优化后得到猕猴桃果浆出汁率、果汁澄清度和乙醇不溶物回归方程的相关系数分别为 0.958、0.904 和 0.922。

关键词: 猕猴桃; 果胶酶; 出汁率; 澄清度; 乙醇不溶物

Optimization of Pectinase Usage in Pretreatment of Kiwi fruit Juice for Clarification by Response Surface Methodology

WANG Zhi-jun¹, HAN Yong-bin², GU Zhen-xin^{2,*}, ZHANG Li-hua²

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China;

2. Key Laboratory of Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Kiwi fruit pulp, treated with pectinase at different duration (40~141min), temperatures (37~54℃) and various

收稿日期: 2006-08-10

*通讯作者

基金项目: 江苏省科技招标项目 (ZB2003046)

作者简介: 汪志君 (1953-), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品贮藏加工。

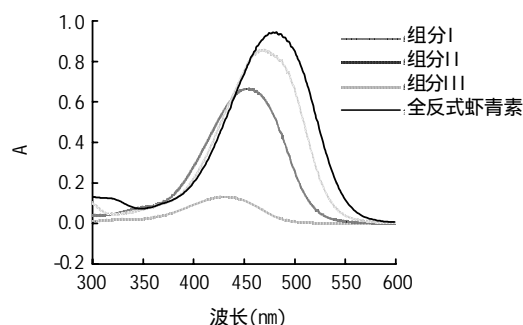


图8 虾青素各降解产物光谱图

Fig.8 Spectra of all-E-astaxanthin degradation products

3 结 论

本项研究的结果表明: 应用 C₃₀-HPLC-PDA 色谱系统, 在酸性的乙腈-水 (90:10; 流动相 A) 和乙酸乙酯 (流动相 B) 的线性梯度洗脱条件下, 虾青素全反式异构体可以与酯得到很好的分离, 13, 13'-, 11, 11'-, 9, 9'-

顺式异构体和全反式异构体能获得良好的分离, 全反式异构体与其降解产物也能得到分离。这些结果证明了 C₃₀-HPLC-PDA 色谱系统是完全可以应用于检测虾青素类化合物的可行性。

参考文献:

- [1] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京: 中国轻工出版社, 2005. 231-240.
- [2] 张晓丽, 刘建国. 虾青素的抗氧化性及其在营养和医药应用方面的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 258.
- [3] 魏东, 臧晓南. 大规模培养雨生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状[J]. 中国海洋药物, 2001, (5): 4-8.
- [4] B E Kohler. In Carotenoids in photosynthesis[J]. Chem Rev, 1993, 93: 41.
- [5] B E Kohler. Biological functions and activities of animal carotenoids[J]. J Chem Phys, 1990, 93: 5838.
- [6] 惠伯棣, 张西, 李京. 反相 C₃₀ 柱在 HPLC 分析类胡萝卜素中的应用[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 264-269.
- [7] 惠伯棣, 李京. 应用 C₃₀-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): 50-52.