

番茄及其制品中全反式番茄红素和 β -胡萝卜素含量的 C_{30} -HPLC 内标法定量分析

丁 靖, 惠伯棣 *

(北京联合大学应用文理学院, 北京 100191)

摘 要: 目的: 建立 C_{30} -HPLC 内标法对番茄及其制品中全反式番茄红素和 β -胡萝卜素进行同步定量检测方法。方法: 色谱条件: 固定相: YMC Carotenoid column C_{30} 色谱柱 (4.6mm \times 250mm, 5 μ m); 流动相 A: 乙腈: 甲醇 (3:1, V/V); 流动相 B: 甲基叔丁基醚 (MTBE); 流动相 A 与 B 中分别添加体积分数 0.05% 的三乙胺; 洗脱条件: B 在 0~10min 内保持 30%, 在 10~20min 内, B 由 30% 线性增至 90%, 20~30min 内 B 维持在 90%; 流速: 1mL/min; 色谱图检测波长 470nm 和 450nm; 进样量: 20 μ L; 柱温: 室温。内标物为全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛。结果: 此方法的最小定量限为 0.01 μ g/mL。在 0.3~0.6 μ g 范围内, 内标物对全反式番茄红素和 β -胡萝卜素的相对校正因子分别为 1.36 和 1.22, 重复性 RSD 分别为小于 0.50% 和 0.70%, 加样回收率均在 99.00% 以上。结论: 应用本方法可对番茄及其制品中的全反式番茄红素和 β -胡萝卜素进行定量分析。

关键词: 番茄红素; β -胡萝卜素; 8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛; 内标

Quantification of All-*trans*-lycopene and β -Carotene from Tomato and Its Products by Internal Standard Method on C_{30} -HPLC

DING Jing, HUI Bo-di*

(College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective: To establish a simultaneous determination method for all-*trans*-lycopene and β -carotene by internal standard on C_{30} -HPLC. Methods: Stationary phase, YMCTM Carotenoid column C_{30} (4.6 mm \times 250 mm, SOD-5 μ m, Waters); mobile phase A, CH₃CN-MeOH (3:1, V/V); mobile phase B, MTBE; both A and B with the addition of 0.05% triethylamine; elution, 30% B in 0—10 min, a linear increase of mobile phase B from 30% to 90% in 10—20 min and 90% mobile phase in 20—30 min; flow rate, 1 mL/min; PDA wavelength range, 300—600 nm; monitoring wavelength, 470 nm and 450 nm; injection volume, 20 μ L; column temperature, room temperature. Results: Minimum detection limit of this method was 0.01 μ g/mL. In the range of 0.3—0.6 μ g internal standard, relative correction factor of internal standard to all-*trans*-lycopene and β -carotene were 1.36 and 1.22, respectively. The relative standard deviations of reproducibility experiments were 0.50% and 0.70%, respectively. The recovery rates of this method were higher than 99.00%. Conclusion: The established method is suitable for the determination for all-*trans*-lycopene and β -carotene in tomato and its products.

Key words: lycopene; β -carotene; 8'-apo-8'- β -carotenal; internal standard

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)24-0348-07

番茄及其制品(包括番茄酱和番茄沙司等)已经是人类日常生活中必不可少的食物。成熟的番茄果实中含有丰富的类胡萝卜素, 包括大量的番茄红素和一定数量的 β -胡萝卜素^[1]。

番茄红素是胡萝卜素的一种, 英文习惯命名

lycopene, 中文系统命名 ψ, ψ -carotene, 分子式为 $C_{40}H_{50}$, 具有高度开放的不饱和直链结构。番茄红素广泛地存在于番茄、西瓜、柿子、李子、木瓜、芒果、草莓、柑橘类、杏、和桃以及南瓜、萝卜、胡萝卜等水果蔬菜中。其中番茄及其制品中番茄红素含量最

收稿日期: 2010-09-10

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2008BAI58B06)

作者简介: 丁靖(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为类胡萝卜素化学及生物化学。E-mail: ading1110@126.com

* 通信作者: 惠伯棣(1959—), 男, 教授, 博士, 研究方向为类胡萝卜素化学及生物化学。E-mail: bodi_hui@ygi.edu.cn

高, 据统计, 人体所摄取的番茄红素 80% 来自于番茄中。在自然界中除了主要构象全反式番茄红素外, 还存在最常见的 13-、9- 和 5- 三种单顺式异构体^[2]。不同的异构体表现出的生物学功能亦不同。例如: 不同的异构体在相同浓度下, 淬灭单线态氧的能力也不相同, 按能力大小可排列为全反式异构体 > 13 顺式异构体 > 9 顺式异构体^[3]。

番茄中存在的 β -胡萝卜素(中文系统命名 β , β -胡萝卜素, 英文系统命名 β , β -carotene)以全反式构型为主(图 1), 完全成熟后体内一般含有 5%~7% 甚至含量更高的顺式异构体。最常见的顺式异构包括 13- 和 9- 顺式异构体^[4]。当遇热、光照或酸时, β -胡萝卜素均可能异构化。如在食品中含有 β -类胡萝卜素的全反式异构体变成相应的顺式异构体(9- 或 13- Z - β -胡萝卜素), 其作为 VA 源的活性就会降低, 甚至失去 VA 活性, 从而降低了其在食品中作为 VA 源的营养价值。

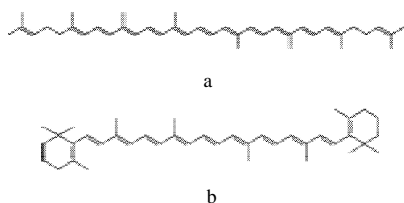


图 1 全反式番茄红素(a)和 β -胡萝卜素(b)的分子结构
Fig.1 Molecular structures of all-trans-lycopene and β -carotene

番茄及其制品被认为是人类番茄红素营养的主要来源, β -胡萝卜素(VA 源)的重要来源。二者全反式异构体的含量是评估番茄及其制品营养品质的重要指标^[5]。

类胡萝卜素的高压液相色谱分离始于 20 世纪 70 年代, 至今, 在 C_{18} 固定相上已经发展了一些比较成熟的方法。其缺点是不能实现对类胡萝卜素几何异构体的分离。 C_{30} 固定相是近 20 年在市场上出现的商品, 其键合链长为 30 个碳, 可以实现番茄红素几何异构体的分离^[6]。在本项研究中, 尝试选择全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛(图 2)为内标物, 优化已建立的对番茄红素和 β -胡萝卜素全反式异构体的 C_{30} -HPLC 分离方法^[6-9], 使内标物与目标化合物之间、各个目标化合物之间都可达到理想的分离效果, 建立对二者进行定量分析的方法。

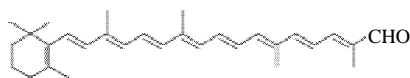


图 2 全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛的分子结构
Fig.2 Molecular structure of all-trans-8'-apo-8'- β -carotenal

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

食用番茄(应季)、番茄酱和番茄沙司 市购; 番茄红素软胶囊 新疆红帆生物科技有限公司。

甲醇、乙腈和甲基叔丁基醚(MTBE)均为色谱纯 Dikma Technologies 公司; 三乙胺(AR) 北京益利精细化学品有限公司; 丙酮、石油醚(BP: 60~90℃)、正己烷、二氯甲烷(AR) 北京化工厂; 番茄红素(L9879, 纯度为 90%~95%)、 β -胡萝卜素参比样品(C4582, 纯度 \geq 95%)、全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛(纯度 $>$ 96% (UV))(所有参比样品使用前均未进一步纯化) Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

YMC Carotenoid column C_{30} 色谱柱(4.6mm \times 250mm, 5 μ m) Waters 公司; LC-20A 和 SPD-M20A、HPLC、MultiSpec-1501 分光光度计 日本岛津公司。

1.3 参比样品工作液的配制

1.3.1 内标物贮备液的配制

准确称取全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛参比样品 0.01200g(准确到 0.00001g), 用正己烷定容到 10mL 棕色容量瓶中。取 1.25mL 溶液稀释定容至 50mL 棕色容量瓶中。在紫外分光光度计上以正己烷为背景收集 200~700nm 光谱。测得定溶液中全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛的最大吸收波长(λ_{max}) = 455nm, 吸光度(A)为 0.610663。根据已有的报道, 全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛的 $A_{1\%}^{1cm} = 2640$ (正己烷)^[10], 按 Beer-Lambert 定律计算定溶液的质量浓度为 92.5 μ g/mL。定溶液充氮后于-80℃下进行深度冻存。

1.3.2 番茄红素参比样品贮备液的配制

精确(至 0.00001g)称取番茄红素参比样品 0.00100g, 加入 1mL 二氯甲烷溶解, 转移至 10mL 棕色容量瓶中, 用石油醚定容至 10mL, 配制成 100 μ g/mL 的贮备液, 保存于-80℃冰箱中。在 24h 之内使用石油醚配成质量浓度适当的工作液, 用于 HPLC 分析。

1.3.3 β -胡萝卜素参比样品贮备液的配制

精确(至 0.00001g)称取 β -胡萝卜素参比样品 0.00100g, 加入 1mL 二氯甲烷溶解, 转移至 10mL 棕色容量瓶中, 用二氯甲烷定容至 10mL, 配制成 100 μ g/mL 的贮备液, 保存于-80℃冰箱中。在 24h 之内用二氯甲烷配成质量浓度适当的工作液, 用于 HPLC 分析。

1.3.4 混合参比样品溶液的配制

精确量取全反式番茄红素、全反式 β -胡萝卜素和内标物全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛的参比样品贮备液, 用正己烷:丙酮(75:25, V/V)将 3 种参比样品混合物溶解、定容于 10mL 棕色容量瓶中, 使得混合溶液中全

反式 β -胡萝卜素、全反式番茄红素和内标物最终的质量浓度分别为 $30 \mu\text{g/mL}$ 。混合液于 -80°C 下进行深度冻存, 用于 HPLC 分析。

1.4 色谱条件

C_{30} 固定相: YMC Carotenoid column C_{30} 色谱柱 ($4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相 A: 乙腈: 甲醇 (3:1, V/V); 流动相 B: 甲基叔丁基醚 (MTBE); 流动相 A 与 B 中分别添加体积分数 0.05% 的三乙胺; 在 0~10min 内, B 维持在 30%, 在 10~20min 内 B 由 30%~90%, 在 20~30min, B 维持在 90%; 流速: 1mL/min ; PDA 光谱收集范围: 300~600nm; 色谱图监测波长: 内标物和全反式 β -胡萝卜素: 450nm, 全反式番茄红素: 470nm; 柱温: 室温; 进样量: $2.0 \mu\text{L}$ 。

1.5 样品处理

将 6 个同批次色泽均匀的番茄果实 (200~250g) 分别切成碎块, 混匀。各取 1/4 质量的碎块合并放入捣碎机中。捣碎前加入 1g 碳酸钠以中和细胞破碎时释放出的有机酸。捣碎 3 次, 每次 90s。准确 (至 0.0001g) 称取 0.5g 果实匀浆置于研钵中, 加入 0.1mL 内标物储备液、4 倍体积的丙酮和加少量石英砂, 研磨、静置, 用滴管小心移出上清液, 再加入等体积的丙酮。重复 (6 次) 提取直至上清液和残渣均为无色。合并收集上清液于分液漏斗中, 加入等体积的正己烷和水摇匀后静置分层, 弃去下相。用等体积蒸馏水洗涤上相 2~3 次。收集上相, 用氮气吹干, 充氮气保存于 -80°C 冰箱中, 24h 内用于 HPLC 分析。分析前将提取物用正己烷定容到 1mL EP 管中, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。所有操作均在暗光下进行, 使用棕色玻璃器皿盛放溶液, 以阻止目标化合物光敏氧化降解的发生。

准确 (至 0.0001g) 称取 0.5g 番茄沙司, 如上所述进行萃取。萃取前加入 0.1mL 内标物储备液。

准确 (至 0.0001g) 称取 0.2g 番茄酱, 如上所述进行萃取。萃取前加入 0.1mL 内标物储备液。

1.6 重复性与回收率评价

将番茄红素和 β -胡萝卜素贮备液各取出 1mL 放入 10mL 容量瓶中, 用二氯甲烷定容至 10mL , 配制成 $10 \mu\text{g/mL}$ 的工作液。

准确称取同批次番茄果实匀浆物 0.5g, 提取之前各加入 1.5mL 番茄红素和 0.2mL β -胡萝卜素工作液, 按 1.5 节方法处理样品, 进行内标法定量分析, 重复 6 次, 计算相对标准偏差 (RSD) 和回收率。

准确称取 0.2g 番茄酱和 0.5g 番茄沙司, 提取之前各加入 2mL 番茄红素和 0.05mL β -胡萝卜素工作液、 8mL 番茄红素和 0.6mL β -胡萝卜素工作液进行处理, 按照同样的方法计算相对标准偏差 (RSD) 和回收率。

1.7 检测下限测定

按信噪比 $R_{\text{SN}}=2$ 测定并计算内标物及全反式番茄红素和 β -胡萝卜素的检测下限。

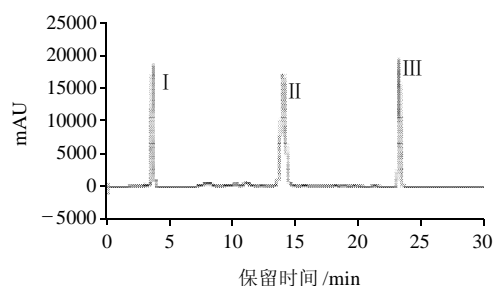
1.8 样品含水量的测定

准确 (至 0.0001g) 称取番茄果实匀浆于玻璃表面皿 ($\phi=10\text{cm}$) 中, 在 70°C 负压 (-0.08MPa) 干燥箱中烘至质量恒定。用减质量法称量样品干质量。每个样品做 6 个平行, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 全反式番茄红素、 β -胡萝卜素和全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛的色谱行为及光谱特征

图 3 为全反式番茄红素、 β -胡萝卜素和全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛的色谱行为。图 4 为组分 I、II 和 III 的电子吸收光谱。根据其光谱特征和已有的报道^[11], 三者可以定性。图 3、4 表明: 1) 全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛与其他二者有良好分离。全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛组分的保留时间较短, 距全反式番茄红素和 β -胡萝卜素组分较远。如果将此方法应用到其他样品中, 如光合组织 (含有丰富的叶绿素和多种含氧类胡萝卜素) 提取物和动物血清及肝脏提取物 (含有多含氧类胡萝卜素) 时, 全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛组分的检测信号可不受干扰。2) 根据惠伯棣等^[11]的报道, 三者中顺式异构体的比例很少, 可以将其作为全反式异构体的参比样品使用; 3) 全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛的最大吸收波长与全反式 - β -胡萝卜素的接近, 二者均可采用 450nm 为检测波长。全反式番茄红素的检测波长宜为 470nm 。但在 PDA 上, 同时获得 450nm 和 470nm 的色谱图是完全可行的。



I 为全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛; II 为全反式 - β -胡萝卜素; III 为全反式番茄红素。

图 3 参比样品混合物的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of mixed reference samples

目前, 已用到包括全反式 -8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛、 β -胡萝卜素的 C_{45} 类似物、 β -胡萝卜素的 C_{50} 类似物、(2R,2'R)-2,2'-二甲基- β -胡萝卜素以及非类胡萝卜素类的苏丹红 I 在内的物质作为类胡萝卜素检测的内标

物。相比之下, β -胡萝卜素的 C_{50} 类似物的低溶解性和易降解性对分析检测来说不是很理想, 并且其最大波长在 502nm, 距离天然胡萝卜素的平均最大波长 450nm 较远。 β -胡萝卜素的 C_{45} 类似物和(2R,2'R)-2,2'-二甲基- β -胡萝卜素目前尚无法商业获得, 只能通过各实验室自行合成获得。苏丹红 I 作为非类胡萝卜素与目标化合物在结构上无相似性, 且其具有强烈的致癌作用, 对分析人员的健康不利^[12-14]。

综上所述, 选择全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛作为全反式番茄红素和 β -胡萝卜素的内标是具有可行性的。

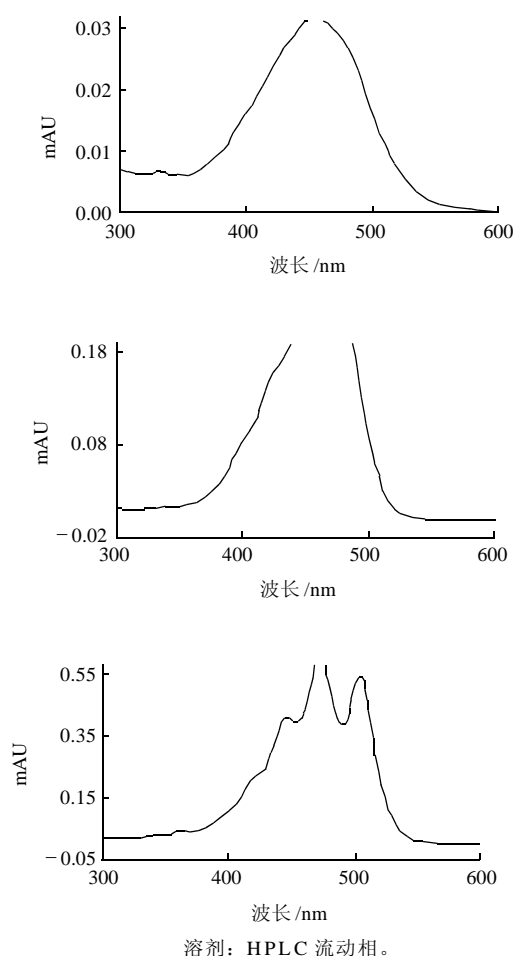


图4 组分 I(a)、II(b)和III(c)的电子吸收光谱

Fig.4 Electronic absorption spectra of fraction I, II and III

2.2 相对校正因子的测定

绝对校正因子的定义见式(1):

$$f_i = \frac{m_i}{A_i} \quad (1)$$

式中: m_i 为被测物的质量; A_i 为在检测响应信号(峰面积); f_i 为单位峰面积所代表的某组分的含量。

相对校正因子的定义见式(2):

$$f_i' = \frac{f_i}{f_s} \quad (2)$$

式中: f_i 和 f_s 分别为被测物和内标物的绝对校正因子, f_i' 表示相对校正因子。在本项研究中, 需要分别测定全反式番茄红素和 β -胡萝卜素(被测物)对全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛(内标物)的相对校正因子。根据公式(3)计算组分 i (全反式番茄红素和 β -胡萝卜素)的质量浓度:

$$\rho_i = \frac{A_i V_i \rho_s}{f_i' A_s V_s} \quad (3)$$

式中: ρ_i 为样品中组分 i 的质量浓度; V_i 为样品的进样体积; A_i 为组分 i 的峰面积; ρ_s 、 V_s 和 A_s 分别为内标物的质量浓度、进样体积和峰面积。

2.2.1 相对校正因子的测定

相同质量浓度的全反式番茄红素、 β -胡萝卜素与内标物全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛在色谱图上具有不同的响应值(即峰面积), 并呈现出一定的相关性, 结果见表 1、2。

2.2.2 被测物含量的计算

由表 1 可知, 全反式番茄红素的相对校正因子为 1.36, 故可得到样品中全反式番茄红素的计算公式:

$$\rho_i = \frac{A_i V_s \rho_s}{1.36 A_s V_i} \quad (4)$$

式中: ρ_i 为样品中全反式番茄红素的质量浓度, V_i 为样品的进样体积, A_i 为全反式番茄红素的峰面积; V_s 和 A_s 分别为内标物的质量浓度、进样体积和峰面积。

同样, 全反式 β -胡萝卜素的相对校正因子为 1.22,

表1 内标物和全反式番茄红素的相对校正因子

Table 1 Relative correction factors of internal standard and all-*trans*-lycopene

	进样量/ μg					
	0.30	0.36	0.39	0.45	0.54	0.60
全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛/ $(\mu\text{V} \cdot \text{s})$	1006139.72	1063625.38	1196344.32	1371666.70	15537862.80	1691237.19
全反式番茄红素/ $(\mu\text{V} \cdot \text{s})$	1340178.11	1475780.22	1659927.75	1819199.44	2107887.80	2275192.32
相对校正因子	1.33	1.39	1.40	1.32	1.35	1.34
平均值 \pm 标准偏差	1.36 \pm 0.03					

表2 内标物和全反式β-胡萝卜素的峰面积及相对校正因子
Table 2 Relative correction factors of internal standard and all-trans-β-carotene

	进样量/μg					
	0.30	0.36	0.39	0.45	0.54	0.60
全反式-8'-阿朴-8'-β-胡萝卜素醛/(μV·s)	981004.785	1037054.37	1166457.78	1337400.34	1515255.72	1648987.46
全反式β-胡萝卜素/(μV·s)	1154042.26	1306557.50	1475275.63	1585989.63	1836707.46	2002898.41
相对校正因子	1.18	1.26	1.26	1.19	1.20	1.21
平均值±标准偏差	1.22 ± 0.04					

故可得到计算样品中全反式β-胡萝卜素的公式：

$$\rho_i = \frac{A_i V_s \rho_s}{1.22 A_s V_i} \tag{5}$$

式中：ρ_i为样品中全反式β-胡萝卜素的质量浓度；V_i为样品的进样体积；A_i为全反式β-胡萝卜素的峰面积；ρ_s、V_s和A_s分别为内标物的质量浓度、进样体积和峰面积。

2.2.3 相对校正因子计算公式的准确性

表3 相对校正因子计算公式准确性(番茄果实)

Table 3 Precision for the calculation of relative correction factors (raw tomato)

样品号	1	2	3	4	5	
全反式番茄红素	计算质量浓度(μg/mL)	5.80	8.79	11.60	14.80	17.30
	测量质量浓度(μg/mL)	5.85	8.80	11.65	14.73	17.25
	相对误差/%	0.85	0.11	0.43	0.48	0.29
全反式-β-胡萝卜素	计算质量浓度(μg/mL)	0.85	1.29	1.71	2.17	2.54
	测量质量浓度(μg/mL)	0.84	1.31	1.73	2.15	2.50
	相对误差/%	1.20	1.53	1.16	0.93	1.60

表4 相对校正因子计算公式准确性(番茄酱)

Table 4 Precision for the calculation of relative correction factors (tomato paste)

样品号		1	2	3	4	5
全反式番茄红素	计算质量浓度/(μg/mL)	8.79	10.21	13.09	16.22	20.10
	测量质量浓度/(μg/mL)	8.85	10.19	13.13	16.35	20.19
	相对误差/%	0.68	0.20	0.30	0.80	0.45
全反式-β-胡萝卜素	计算质量浓度/(μg/mL)	0.19	0.21	0.27	0.34	0.41
	测量质量浓度/(μg/mL)	0.19	0.21	0.26	0.33	0.40
	相对误差/%	1.60	1.40	1.12	1.49	1.74

表5 相对校正因子计算公式准确性(番茄沙司)

Table 5 Precision of the calculation of relative correction factors (tomato sauce)

样品号		1	2	3	4	5
全反式番茄红素	计算质量浓度(μg/mL)	20.21	26.89	31.65	42.78	49.91
	测量质量浓度(μg/mL)	20.25	26.93	31.68	42.80	49.90
	相对误差/%	0.20	0.15	0.10	0.05	0.02
全反式-β-胡萝卜素	计算质量浓度(μg/mL)	1.68	2.24	2.64	3.57	4.16
	测量质量浓度(μg/mL)	1.70	2.27	2.60	3.60	4.12
	相对误差/%	1.20	1.32	1.54	0.83	0.97

采用标准曲线的方法验证相对校正因子计算公式(即使用内标物代替参比样品)的准确性。各取番茄红素和

β-胡萝卜素贮备液，分别用二氯甲烷配制成系列质量浓度为100.00、80.00、60.00、40.00、20.00、10.00、0 μg/mL的工作液。各取20 μL进行HPLC分析，色谱条件见1.4节。做质量浓度-峰面积线性回归，得到回归曲线和方程，计算R²值。可得番茄红素的回归方程：y=212181x，R²=0.9738；β-胡萝卜素的回归方程：y=176817x，R²=0.9853。相对误差以公式计算质量浓度对回归方程测量浓度的偏差百分比来计算，结果见表3~5。由表5可得，使用全反式-8'-阿朴-8'-β-胡萝卜素醛作为内标物的番茄果实、番茄酱和番茄沙司中全反式番茄红素及全反式β-胡萝卜素的相对误差全部都小于5%，因此可以说明用内标物作为参比样品替代物来计算番茄及其制品中的全反式番茄红素和全反式β-胡萝卜素的计算公式是准确的。

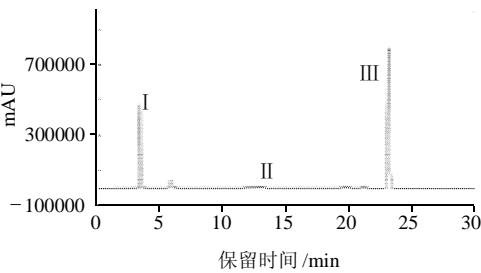
2.3 重复性与回收率分析

表6~8分别为番茄果实、番茄酱和番茄沙司提取物的重复性与回收率分析结果。其中番茄果实、番茄酱和番茄沙司中全反式番茄红素的重复性的相对标准偏差(RSD)均小于0.50%，而全反式-β-胡萝卜素的重复性的相对标准偏差均小于0.70%，故说明系统的重复性良好；同时3种样品中全反式番茄红素和β-胡萝卜素的加样回收率均大于99.00%，均有较高的回收率。

2.4 内标物的检测下限

按信噪比R_{SN} = 2计算，检出下限为0.01 μg/mL。

2.5 番茄及其制品中全反式番茄红素和β-胡萝卜素质量浓度检测



I为全反式-8'-阿朴-8'-β-胡萝卜素醛；II为全反式-β-胡萝卜素；III为全反式番茄红素。

图5 番茄果实提取物的HPLC色谱图
Fig.5 HPLC chromatogram of raw tomato extract

表6 重复性与回收率分析(番茄果实, $n=6$)Table 6 Assessments for reproducibility and recovery rates of the established method (raw tomato, $n=6$)

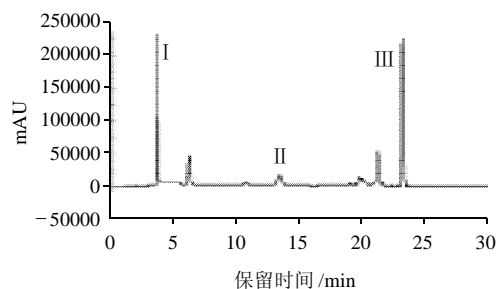
检测结果		重复次数						平均值	RSD/%
		1	2	3	4	5	6		
全反式番茄红素	样品含量/($\mu\text{g/mL}$)	15.11	15.11	15.11	15.11	15.11	15.11	15.11	
	添加量/($\mu\text{g/mL}$)	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	
	检出量/($\mu\text{g/mL}$)	30.08	29.98	30.15	30.09	30.07	30.10	30.09	0.24
	回收率/%	99.90	99.56	100.13	99.93	99.86	99.97	99.89	0.19
全反式- β -胡萝卜素	样品含量/($\mu\text{g/mL}$)	2.22	2.22	2.22	2.22	2.22	2.22	2.22	
	添加量/($\mu\text{g/mL}$)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	
	检出量/($\mu\text{g/mL}$)	4.18	4.16	4.19	4.20	4.16	4.23	4.19	0.31
	回收率/%	99.05	98.57	99.28	99.52	98.57	100.24	99.21	0.64

表7 重复性与回收率分析(番茄酱, $n=6$)Table 7 Assessments for reproducibility and recovery rates of the established method (tomato paste, $n=6$)

检测结果		重复次数						平均值	RSD/%
		1	2	3	4	5	6		
全反式番茄红素	样品含量/($\mu\text{g/mL}$)	22.84	22.84	22.84	22.84	22.84	22.84		
	添加量/($\mu\text{g/mL}$)	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00		
	检出量/($\mu\text{g/mL}$)	42.82	42.79	42.81	42.77	42.80	42.84	42.81	0.08
	回收率/%	99.95	99.88	99.93	99.84	99.91	100.00	99.92	0.06
全反式- β -胡萝卜素	样品含量/($\mu\text{g/mL}$)	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46		
	添加量/($\mu\text{g/mL}$)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50		
	检出量/($\mu\text{g/mL}$)	0.95	0.96	0.96	0.94	0.95	0.95	0.95	0.59
	回收率/%	99.58	99.79	100.01	98.23	99.89	99.38	99.48	0.66

表8 重复性与回收率分析(番茄沙司, $n=6$)Table 8 Assessments for reproducibility and recovery rates of the established method (tomato sauce, $n=6$)

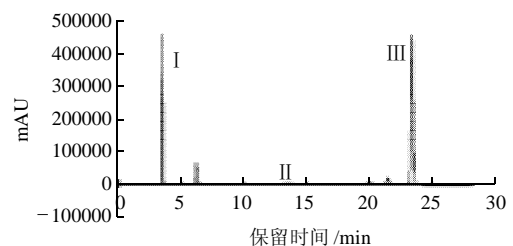
检测结果		重复次数						平均值	RSD/%
		1	2	3	4	5	6		
全反式番茄红素	样品含量/($\mu\text{g/mL}$)	76.08	76.08	76.08	76.08	76.08	76.08		
	添加量/($\mu\text{g/mL}$)	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00		
	检出量/($\mu\text{g/mL}$)	156.02	156.10	156.01	155.98	156.06	155.91	156.01	0.43
	回收率/%	99.96	100.00	99.96	99.94	99.99	99.89	99.96	0.39
全反式- β -胡萝卜素	样品含量/($\mu\text{g/mL}$)	6.22	6.22	6.22	6.22	6.22	6.22		
	添加量/($\mu\text{g/mL}$)	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00		
	检出量/($\mu\text{g/mL}$)	12.19	12.17	12.10	12.20	12.22	12.21	12.18	0.36
	回收率/%	99.75	99.59	99.02	99.84	100.02	99.92	99.65	0.36



I 为全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛; II 为全反式- β -胡萝卜素; III 为全反式番茄红素。

图6 番茄酱提取物的 HPLC 色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of tomato paste extract



I 为全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛; II 为全反式- β -胡萝卜素; III 为全反式番茄红素。

图7 番茄沙司提取物的 HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC chromatogram of tomato sauce extract

表9 不同样品中反式番茄红素和 β -胡萝卜素的含量Table 9 Contents of all-trans-lycopene and all-trans- β -carotene in different samples

样品	番茄果实	番茄酱	番茄沙司
全反式番茄红素的干基含量/($\mu\text{g/g}$)	835.63	3142.64	4123.78
全反式 β -胡萝卜素的干基含量/($\mu\text{g/g}$)	128.34	67.24	337.17

由图5~7可知,番茄红素和 β -胡萝卜素在番茄加工成番茄酱和番茄沙司过程中反顺异构的比例(峰面积之比)分别为:番茄红素由670.34变为2.33和10.02; β -胡萝卜素由73.34变为2.08和30.32,表明异构化明显^[15-16]。

根据公式(4)、(5)可计算出各样品中所含全反式番茄红素和 β -胡萝卜素的量,结果见表9。

3 结 论

本研究结果表明:运用 C_{30} -HPLC色谱系统,以乙腈:甲醇(3:1, V/V)作为流动相A,甲基叔丁基醚(MTBE)作为流动相B,在线性梯度洗脱条件下,内标物全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛、番茄红素和 β -胡萝卜素可以获得良好的分离,同时三者的最大吸收波长均在450nm附近,且具有相似的光谱特征,故选择全反式-8'-阿朴-8'- β -胡萝卜素醛作为参比样品的替代物可行。使用内标物建立的相对校正因子计算公式经过验证,其在计算番茄及其制品中全反式番茄红素和 β -胡萝卜素含量时的相对误差均小于5%,证明计算公式准确且重复性好。采用内标物替代法进行番茄果实及其不同制品中全反式番茄红素和 β -胡萝卜素含量的测定,方法切实可行,结果准确,为研究不同异构体的生物学功能和效价及生理功能提供了参考。

参考文献:

- [1] 刘沐霖,惠伯棣,庞克诺.番茄及其制品中番茄红素含量的 C_{18} -HPLC-PDA定量分析[J].食品科学,2007,28(7):453-456.
- [2] 刘沐霖,惠伯棣,庞善春.番茄红素人工合成与天然产物的鉴定[J].食品科学,2007,28(9):462-466.
- [3] 李京,惠伯棣.几何异构化对番茄红素淬灭单线态氧功能的影响[J].食品科学,2007,28(8):104-107.
- [4] 惠伯棣,张艳,叶珊.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[J].食品科学,2008,29(6):284-287.
- [5] 庞善春,惠伯棣,刘沐霖.天然番茄红素软胶囊的生产工艺和质量控制点分析[J].食品科学,2007,28(8):619-624.
- [6] 惠伯棣,李京,裴凌鹏.应用 C_{30} -HPLC-PDA分离与鉴定番茄红素几何异构体[J].食品工业科技,2006(7):49-54.
- [7] 惠伯棣,李京,孙拿拿,等.番茄和胡萝卜中类胡萝卜素的 C_{30} 与 C_{18} HPLC分离[J].中国食品卫生杂志,2006(4):289-292.
- [8] 李京,惠伯棣.秋橄榄果实中番茄红素含量与几何异构体组成分析[J].食品工业科技,2006(10):64-65.
- [9] 李京,惠伯棣.番茄红素在体内代谢中的几何异构体组成变化[J].食品科学,2008,29(9):591-594.
- [10] VASQUEZ-CAICEDO A L, SRUAMSIRI P, CARLE R, et al. Accumulation of all-trans- β -carotene and its 9-cis and 13-cis stereoisomers during postharvest ripening of nine thai mango cultivars[J]. Agric Food Chem, 2005, 53: 4827-4835.
- [11] 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.
- [12] KHACHIK F, SPANGLER C J, SMITH J C, Jr. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum[J]. Anal Chem, 1997, 69: 1873-1881.
- [13] KHACHIK F, BEECHER G R. Application of a C-45-P-carotene as an internal standard for the quantification of carotenoids in yellow/orange vegetables by liquid chromatography[J]. J Agric Food Chem, 1987, 35: 732-738.
- [14] XU F, YUAN Q F, DONG H R. Determination of lycopene and β -carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard[J]. Journal of Chromatography B, 2006, 838: 44-49.
- [15] 刘翔,惠伯棣,张爽,等.中式烹饪对番茄中类胡萝卜素组成的影响[J].食品科学,2008,29(11):98-101.
- [16] 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.