

文章编号 :1009-038X(2003)05-0011-04

# 玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素的分离与定性

卢艳杰, 陈正行, 姚惠源  
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 利用溶剂萃取、薄层层析对玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素进行了提取和分离。通过薄层层析的相对迁移率、与  $\text{AgNO}_3$  的显色反应、紫外-可见吸收光谱、高效液相色谱保留时间及液质联用所得到的相对分子质量信息, 对分离所得黄体素和玉米黄素进行了定性研究, 为玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素的进一步研究和开发利用奠定了基础。

**关键词:** 玉米蛋白粉; 黄体素; 玉米黄素; 薄层层析; 液质联用; 反相高效液相色谱  
**中图分类号:** S 513 **文献标识码:** A

## Isolation and Identification of Lutein and Zeaxanthin from Corn Gluten by Thin-Layer Chromatography

LU Yan-jie, CHENG Zheng-xing, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Solvent-extraction and thin-layer chromatography were used to extract and separate lutein and zeaxanthin from corn gluten. Their structures were identified by comparing the  $R_f$  value with the standard, the color reaction with  $\text{AgNO}_3$ , the UV-spectrum, the retention time of RP-HPLC, and the spectrum of LC/MS. The results provided the basic information for the further research.

**Key words:** lutein; zeaxanthin; corn gluten; thin-layer chromatography; LC/MS; RP-HPLC

玉米蛋白粉是湿法玉米淀粉生产过程中的副产物, 主要成分是蛋白质、淀粉及纤维等, 此外, 还含有丰富的类胡萝卜素。由于玉米中的类胡萝卜素主要存在于角质胚乳中, 在湿法生产玉米淀粉的过程中随蛋白质进入到黄浆水中。黄浆水经脱水、干燥后得到富含类胡萝卜素的玉米蛋白粉。玉米中的类胡萝卜素主要是黄体素、玉米黄素(见图 1), 此外, 还含有  $\beta$ -隐黄素、 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、新黄质和金莲花黄素等成分<sup>[1, 2]</sup>。在玉米籽粒中总类胡萝卜素的质量分数为  $0.1 \sim 9.0 \mu\text{g}/\text{g}$ <sup>[3]</sup>; 玉米蛋白粉中的质量分数为  $200 \sim 400 \mu\text{g}/\text{g}$ <sup>[4]</sup>。

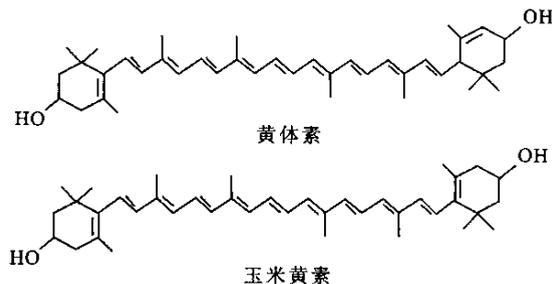


图 1 黄体素和玉米黄素的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of lutein and zeaxanthin

收稿日期 2002-11-27; 修回日期 2003-01-09.

基金项目 国家 863 专项课题项目(2001AA248011)资助课题.

作者简介 卢艳杰(1967-), 女(回族), 河南博爱人, 讲师, 粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生.

黄体素(lutein)和玉米黄素(zeaxanthin)都属于叶黄素类,均为带有羟基的类胡萝卜素,其中黄体素为3,3'-二羟基- $\alpha$ -胡萝卜素,玉米黄素为3,3'-二羟基- $\beta$ -胡萝卜素,二者为同分异构体。20世纪90年代以来,大量的流行病学研究表明,黄体素和玉米黄素具有很多生理功能,例如抗氧化、清除自由基<sup>[5]</sup>、抗癌、减少心血管疾病发病率和视觉保护等,尤其是在预防老年性白内障<sup>[6,7]</sup>和老年黄斑变性<sup>[8,9]</sup>方面的作用正在受到研究者的关注。自然界中的黄体素和玉米黄素主要存在于深绿色食叶蔬菜、花卉、水果、枸杞和黄玉米中。玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素的含量也较高,而且来源丰富,价格低廉,是开发黄体素和玉米黄素的很好的原料。作者对玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素进行了分离和定性鉴别,为进一步研究和开发奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与仪器设备

玉米蛋白粉:河南驻马店制药厂提供;黄体素:纯度90%,Fluka公司产品; $\beta$ -胡萝卜素:纯度97%,Fluka公司产品;硅胶G:青岛海洋化工厂生产;体积分数95%乙醇、丙酮、氧化镁、无水乙醇、石油醚、甲苯、正己烷、无水硫酸钠、硝酸银、甲醇、二氯甲烷、氢氧化钾均为分析纯;乙腈:色谱纯,美国Tedia公司产品;甲醇:光谱纯;羧甲基纤维素钠:食品级;工业酒精。

RE-52AA型旋转蒸发器;SHB-III型水循环真空泵;94-2型定时恒温磁力搅拌器;UV-1100型紫外/可见分光光度计;101-A型电热鼓风干燥箱;Waters Platform ZMD 4 000液质联用仪。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 类胡萝卜素的提取** 玉米蛋白粉与工业酒精(含质量浓度为0.01 g/dL BHT)以料液比  $m(g):V(\text{mL})$  为1:15进行混合,磁力搅拌2 h,过滤,滤饼重复提取至滤液无色为止,合并滤液,减压回收溶剂。用含0.01 g/dL BHT的丙酮溶解类胡萝卜素并沉淀玉米醇溶蛋白。丙酮溶液经无水硫酸钠过滤脱水,滤液即为类胡萝卜素提取液,用于下一步的分离和检测。以上操作均应在避光条件下进行。

**1.2.2 薄层层析分离** 分别以硅胶和氧化镁为固定相,对玉米类胡萝卜素混合物进行薄层层析分离<sup>[10]</sup>。硅胶薄层板的制备:硅胶G与0.5 g/dL的羧甲基纤维素钠溶液以  $m(g):V(\text{mL})=1:2.5$  的比例混合均匀,在玻璃板(20 cm×20 cm或10 cm×20 cm)上铺成约2 mm厚的薄层,室温下静置30 min,

于105℃烘箱中活化0.5~1 h,取出,置于干燥器中备用;氧化镁薄层板的制备:氧化镁与0.5 g/dL的羧甲基纤维素钠溶液以1:3.9的比例混合均匀,在玻璃板(20 cm×20 cm或10 cm×20 cm)上铺成约2 mm厚的薄层,室温下静置4~6 h,于35~37℃烘箱中在加湿状态下保持8~12 h,置于干燥器中备用;展开剂(硅胶板): $V(\text{石油醚}):V(\text{正己烷}):V(\text{丙酮})=2:2:1$ ;氧化镁板: $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=65:35$ 。展距:15~18 cm。

**1.2.3 硝酸银甲醇溶液喷雾法初步鉴定黄体素和玉米黄素** 饱和  $\text{AgNO}_3$  甲醇溶液:称取2.8 g  $\text{AgNO}_3$ 溶于100 mL甲醇中。将类胡萝卜素溶液用薄层层析展开,取出层析板,用氮气将溶剂吹干,用喉头喷雾器均匀地将饱和  $\text{AgNO}_3$  甲醇溶液喷在展开后的层析板上,观察各分离组分的颜色变化<sup>[11]</sup>。

**1.2.4 紫外-可见吸收光谱的扫描** 将薄层层析收集的各组分进行紫外-可见吸收光谱扫描,获得各收集组分的紫外-可见吸收光谱谱图。

**1.2.5 黄体素、玉米黄素的液质联用分析** 样品:经氧化镁薄层层析分离所得各类胡萝卜素组分的丙酮溶液(含0.01 g/dL BHT)。液相色谱条件:色谱柱:Dikma HPLC Column, Diamonsil C18(4.6 cm×25 cm);流动相A: $V(\text{乙腈}):V(\text{二氯甲烷})=60:40$ ;流动相B: $V(\text{乙腈}):V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷})=80:18:2$ ;梯度洗脱:先用流动相B洗脱5 min,而后采用10 min的线性梯度后,流动相B降为0%,而流动相A由0%升至100%,流动相A保持100% 5 min;后保持5 min的线性梯度,使流动相A由100%降到0%,流动相B由0%升至100%,继续保持5 min,洗脱结束。体积流量:1 mL/min;进样量:10  $\mu\text{L}$ ;检测器:紫外-可见多波长检测器,检测波长:448.5 nm;质谱条件:离子方式APCI<sup>+</sup>,源温度120℃;放电针电压3.69 kV;取样锥孔电压27 V;APCI探针温度300℃;光电倍增器650 V;气体体积流量3.8 L/h;MS质量范围350~800<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄体素、玉米黄素的薄层层析分离

分别采用硅胶和氧化镁作为固定相,对玉米类胡萝卜素提取液中的多种类胡萝卜素进行了薄层层析,2种固定相的薄层层析见图2,3。

从展开情况来看,硅胶板对极性相对较弱的类胡萝卜素的分离较好,但对极性相对较强的类胡萝卜素组分的分离效果较差,目标组分黄体素与另一组分未能得到分离。氧化镁板对极性相对较强的类

胡萝卜素组分的分离较好,黄体素也得到了很好的分离.

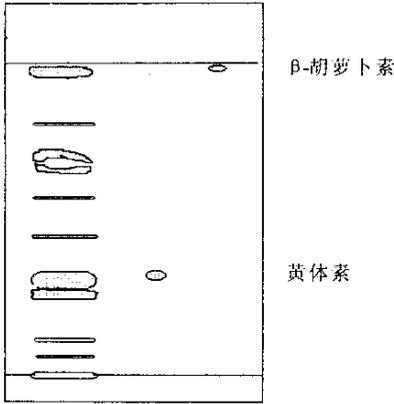


图 2 硅胶板薄层层析

Fig.2 The chromatography of carotenoids on silica gel thin-layers

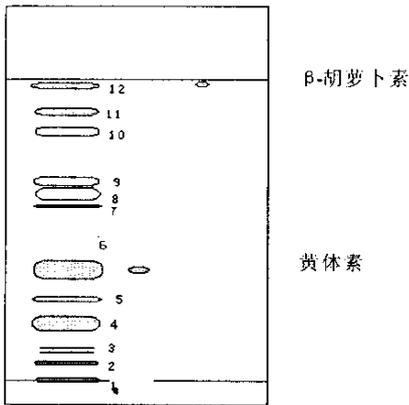


图 3 氧化镁板薄层层析

Fig.3 The chromatography of carotenoids on magnesium oxide thin-layers

### 2.2 硝酸银甲醇溶液喷雾实验

有研究认为,银离子可与双键化合物形成有一定稳定性的化合物.1990年,Isaken M.和 Francis G. W.<sup>[13]</sup>将此特性应用于类胡萝卜素的分离与鉴定,发现含有不同末端基团的类胡萝卜素经喷雾饱和  $AgNO_3$  甲醇溶液后,其颜色发生不同的变化.含有  $\beta$ -末端基团的类胡萝卜素经喷雾  $AgNO_3$  甲醇溶液后,颜色发生变化的情况与所含  $\beta$ -末端基团的数量有关:(1)含有一个  $\beta$ -末端基团的类胡萝卜素,在喷雾  $Ag^+$  后颜色呈桔黄色(2)含有 2 个  $\beta$ -末端基团的类胡萝卜素,喷雾  $Ag^+$  后颜色呈亮红色(3)无  $\beta$ -末端基团的类胡萝卜素,喷雾  $Ag^+$  后颜色不变(4)  $\epsilon$ -末端基团对喷雾  $Ag^+$  后所产生的颜色变化无影响,其结构见图 4.

万方数据

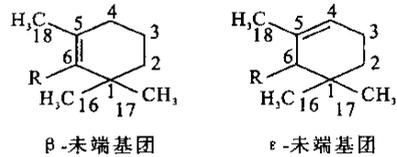


图 4 类胡萝卜素的  $\beta$ -末端基团和  $\epsilon$ -末端基团结构

Fig.4 The  $\beta$ - and  $\epsilon$ -end group structures of carotenoids

对展开后的薄板喷雾  $AgNO_3$  甲醇溶液后,发现黄体素标样的颜色由黄色变为桔黄色;图 3 上的 6<sup>#</sup> 组分亦由黄色变为桔黄色,说明其分子结构中含有一个  $\beta$ -末端基团,这与黄体素的分子结构是相符的;图 3 的 4<sup>#</sup> 组分由桔黄色变为亮红色,说明其分子结构中含有 2 个  $\beta$ -末端基团,这与玉米黄素的分子结构是相符的,由此,初步推断 4<sup>#</sup> 组分为玉米黄素,6<sup>#</sup> 组分为黄体素.

### 2.3 紫外-可见吸收光谱扫描

图 3 显示的 6<sup>#</sup>、4<sup>#</sup> 组分通过紫外/可见吸收光谱进一步定性.图 5 和图 6 分别为黄体素标样和 6<sup>#</sup> 组分在丙酮溶液中的吸收光谱.6<sup>#</sup> 组分的吸收波长为 422 nm、445 nm ( $\lambda_{max}$ ) 和 477 nm(无水乙醇为溶剂)或 424 nm、447.5 nm ( $\lambda_{max}$ ) 和 475 nm(丙酮为溶剂),与黄体素标样具有相同的最大吸收波长和相似的吸收峰形.

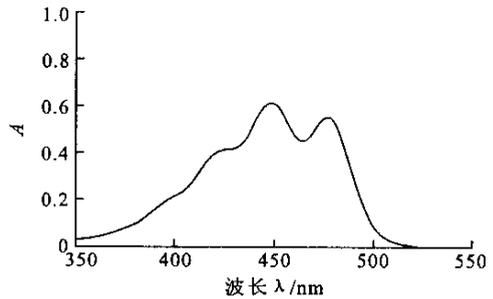


图 5 黄体素标样吸收光谱(溶剂:丙酮)

Fig.5 The UV-spectrum of standard lutein (solvent: acetone)

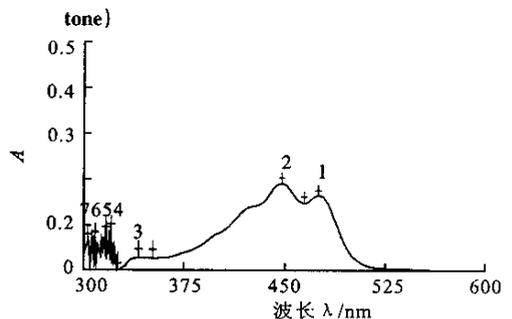


图 6 TLC 6<sup>#</sup> 组分吸收光谱(溶剂:丙酮)

Fig.6 The UV-spectrum of the component TLC 6<sup>#</sup> (solvent: acetone)

氧化镁 TLC 4<sup>#</sup>组分的相对迁移率比黄体素略小, AgNO<sub>3</sub> 显色反应表明, 其分子结构中含有 2 个 β-末端环, 与玉米黄素的相符. 将此组分收集并用无水乙醇溶解, 进行紫外-可见吸收光谱扫描, 其吸收波长为 428 nm、452 nm(λ<sub>max</sub>)和 477 nm, 与文献报道的玉米黄素的吸收光谱一致<sup>[13]</sup>, 见图 7.

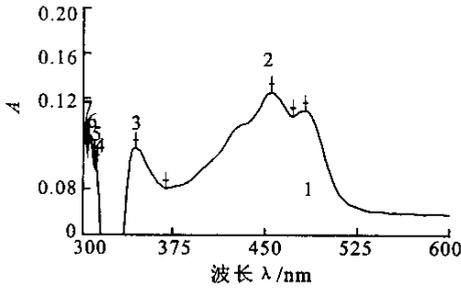


图 7 氧化镁 TLC4<sup>#</sup>组分吸收光谱 (溶剂: 无水乙醇)

Fig. 7 The UV-spectrum of the component TLC4<sup>#</sup> (solvent: absolute ethanol)

### 2.4 液质联用分析结果

薄层层析各分离组分经 LC/MS 分析, 确定 4<sup>#</sup>组分纯度为 82.66%, 其中主要组分的相对分子质量为 568. 结合其液相保留时间, 可判断此组分为玉米黄素; 6<sup>#</sup>组分的纯度为 86.77%, 其中主要组分的相对分子质量为 568, 结合其液相保留时间见图 8~10, 可判断此组分为黄体素.

### 3 结论

采用氧化镁薄层层析可使玉米蛋白粉类胡萝卜素提取液中的黄体素和玉米黄素得到较好的分离. 薄层层析 6<sup>#</sup>组分可判断为黄体素, 判定依据如下: (1) TLC 中 R<sub>f</sub> 值与标样黄体素一致; (2) 紫外吸收光谱与标样黄体素一致; (3) 层析后喷雾 AgNO<sub>3</sub> 甲醇溶液所产生的颜色变化与标样黄体素一致; (4) HPLC 保留时间与标样黄体素一致; (5) LC/MS 检测出相对分子质量为 568.

氧化镁薄层层析 4<sup>#</sup>组分可判断为玉米黄素, 判定依据如下: (1) 层析后喷雾 AgNO<sub>3</sub> 甲醇溶液所产生的颜色变化表明此组分含有 2 个 β-尾端基, 与玉米黄素的分子结构一致; (2) 吸收光谱与文献报道的玉米黄素相一致; (3) HPLC 保留时间与黄体素十分接近, 但吸收光谱存在差异, 说明此组分为结构与黄体素相似的类胡萝卜素; (4) LC/MS 检测出相对分子质量为 568.

研究表明, 氧化镁薄层层析可以作为分离黄体素和玉米黄素的一种有效手段, 也可作为制备高纯度黄体素和玉米黄素的一种方法, 为进一步研究其功能特性, 提供了制备途径.

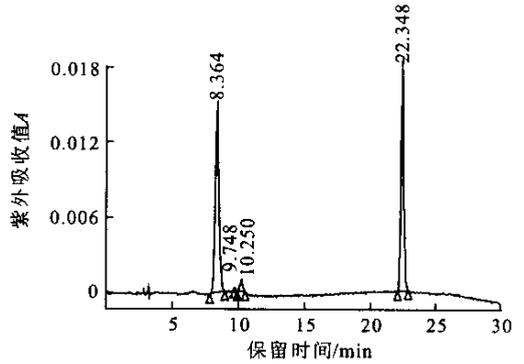


图 8 黄体素、β-胡萝卜素标样 HPLC 图谱

Fig. 8 The HPLC spectrum of standard lutein and β-carotene

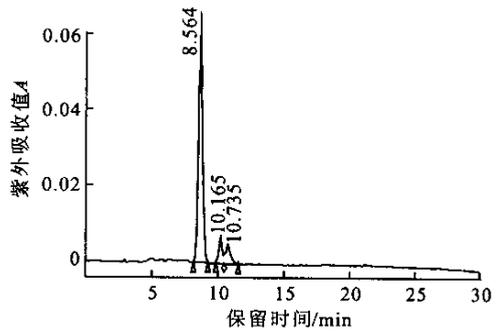


图 9 氧化镁 TLC 4<sup>#</sup>组分 HPLC 图谱

Fig. 9 The HPLC spectrum of the component TLC 4<sup>#</sup>

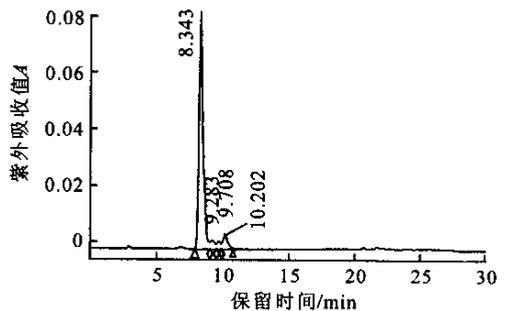


图 10 氧化镁 TLC 6<sup>#</sup>组分 HPLC 图谱

Fig. 10 The HPLC spectrum of the component TLC 6<sup>#</sup>

(下转第 24 页)

479-486.

- [ 2 ] 卓训文, 梁兰兰. 新型微生物多糖——结冷胶[J]. 粮食与油脂, 2001, 9: 34-35.
- [ 3 ] Emako Miyoshi, Tomohisa Takaya, Katsuyoshi Nishinari. Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solution[J]. **Carbohydrate Polymers**, 1996, 30: 109-119.
- [ 4 ] Kunio Nakamura, Yutaka Tanaka, Masao Sakurai. Dynamic mechanical properties of aqueous gellan solutions in the sol-gel transition region[J]. **Carbohydrate Polymers**, 1996, 30: 101-108.
- [ 5 ] Sanderson G R, Bell V L, Clark R C, *et al.* Gums and Stabilisers for the Food Industry 4[M]. Oxford: Oxford University Press, 1988. 219-229.
- [ 6 ] Tang J, Tung M A, Zeng Y. Gelling properties of gellan solutions containing monovalent and divalent cations[J]. **Journal of Food Science**, 1997, 62(4): 688-692.
- [ 7 ] T Van Vliet. Effect of concentration on the rheology and serum separation of tomato suspension[J]. **Journal of Texture Studies**, 2002, 33: 91-104.
- [ 8 ] Tang J, Mao R, Tung M A, *et al.* Gelling temperature, gel clarity and texture of gellan gels containing fructose or sucrose[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2001, 44: 197-209.
- [ 9 ] Morris E R. Conformational and rheological transitions of welan, rhamsan and acylated gellan[J]. **Carbohydrate Polymers**, 1996, 30: 165-175.
- [ 10 ] Rodriguez-Hernandez A I, Tecante A. Dynamic viscoelastic behavior of gellan-*t*-carrageenan and gellan-xanthan gel[J]. **Food Hydrocolloids**, 1999, 13: 59-64.

(责任编辑: 李春丽, 杨勇)

(上接第14页)

## 参考文献:

- [ 1 ] Blessin C W. Carotenoids of corn and sorghum I. analytical procedure[J]. **Cereal Chem**, 1962, 39: 236-242.
- [ 2 ] Blessin C W, Brecher J D, Dimler R J. Carotenoids of corn and sorghum V, distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow dent corn[J]. **Cereal Chem**, 1963, 40: 582-586.
- [ 3 ] 王璋. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 474-477.
- [ 4 ] Muralidbara H S, Minn P. Process for recovering xanthophylls from corn gluten[P]. 美国专利: 005602286A, 1997.
- [ 5 ] Olmedilla B, Granado F, Blanco I, *et al.* Lutein in patients with cataracts and age-related macular degeneration: a long-term supplementation study[J]. **J Sci Food Agric**, 2001, 81: 904-909.
- [ 6 ] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.
- [ 7 ] Jacques P F, Chylack L T. Epidemiologic evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention[J]. **Am J Clin Nutr**, 1991, 53: 352-355.
- [ 8 ] Seddon J M, Ajani U A, Sperduto R D, *et al.* Dietary carotenoids, vitamin A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration[J]. **J Am Med Assoc**, 1994, 272: 1413-1420.
- [ 9 ] Markus Dethler, Tobias Glaser, Konra Kohler, *et al.* Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereo isomers in spinach and in retina[J]. **Anal Chem**, 2001, 73: 667-674.
- [ 10 ] Sadowski R, Wojcik W. Chromatography of chloroplast carotenoids on magnesium oxide thin layer[J]. **Journal of chromatography**, 1983, 262: 455-459.
- [ 11 ] Isaksen M, Francis G W. Silver ion spray reagent for the discrimination of  $\beta$ - and  $\epsilon$ -end groups in carotenoids on thin-layer chromatogram[J]. **Chromatographic**, 1990, 29(7/8): 363-365.
- [ 12 ] Yecheng Tan, Lane C S. Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization[J]. **Journal of Mass Spectrometry**, 1996, 31: 975-981.
- [ 13 ] Francisco D V, Octavio Paredes-Lopez. Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles[J]. **J Agric Food Chem**, 1997, 45: 1097-1102.
- [ 14 ] Khachik F, Beecher G R, *et al.* Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma[J]. **Anal Chem**, 1992, 64: 2111-2122.

万方数据

(责任编辑: 杨萌)