

文章编号 :1009 - 038X(2001)03 - 0299 - 03

HPLC 分离测定红心薯中类胡萝卜素

吉宏武¹ , 施兆鹏²

(1. 无锡轻工大学食品学院 , 江苏无锡 214036 ; 2. 湖南农业大学茶学系 , 湖南长沙 410128)

摘 要 :应用高效液相色谱法分离和测定红心薯中类胡萝卜素。样品制备采用已烷-丙酮-乙腈-甲苯混合溶剂与 40% 氢氧化钾甲醇溶液浸提、皂化的方法 , 使用 Nova-Pak C₁₈ 不锈钢柱 , 乙腈-三氯甲烷-叔丁醇作三元流动相 , 流量线性梯度洗脱等色谱条件 , 在 440 nm 波长下检测 , 红心薯中主要类胡萝卜素得到了较好的分离。以外标定量法对红心薯中的 4 种主要类胡萝卜素(β -胡萝卜素 , 叶黄素 , 茋黄质 , 新黄质) 进行了定量 , 结果较为满意。

关键词 :红心薯 ; 类胡萝卜素 ; 高效液相色谱 ; 分离测定

中图分类号 : S531

文献标识码 : A

HPLC Separation and Determination of Carotenoids in *Ipomoea batatas*

Ji Hong-wu¹ , Shi Zhao-peng²

(1. School of Food Science and Technology , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036 , China ; 2. Hunan Agricultural University , Changsha 410128 , China)

Abstract : The carotenoids from *Ipomoea batatas* were separated and determined by HPLC. Results show that the main carotenoids in *Ipomoea batatas* can be successfully separated in 10min with detection at 440nm by extracting the sample in hexane -acetone-ethanol-toluene and 40% potassium hydroxide methanol for twelve hours , employing Nova-Pak C18 stainless steel column (3.9 $\times$ 150 mm) , using acetonitrile -chloroform-methyl carbinol (83:15:2) as flow phase , applying linear gradient eluting with the rate of flow , with the temperature of column at 25 $^{\circ}$ C. Four kinds of main carotenoids from *Ipomoea batatas* were determined by external standards.

Key words : *Ipomoea batatas* ; carotenoids ; HPLC ; separation and determination

红心薯属于旋花科甘薯属作物 , 其糖分含量高 , 口感好 , 色泽鲜艳。类胡萝卜素是其重要成分 , 作者采用高效液相色谱法对红心薯中类胡萝卜素进行了分离与测定。

1 材料与设备

1.1 材料

红心薯 购自湖北省咸宁市农贸市场。

1.2 标准样

β -胡萝卜素 Sigma 公司产品 , 湖南省测试研究所赠 ; 叶黄素、茋黄质、新黄质样品 柱层析与薄板层析法制备。

1.3 主要试剂

正己烷 , 乙腈 , 三氯甲烷 , 甲苯 , 丙酮 , 叔丁醇 , 液态纯氮 , 无水乙醇 , 无水硫酸钠 , 氢氧化钾。用于 HPLC 的试剂均经过重蒸 , 用作提取等其它方面的

收稿日期 2000 - 10 - 08 ; 修订日期 2001 - 03 - 23。

作者简介 : 吉宏武 (1962 -) , 男 , 湖北通山人 , 食品科学博士研究生。

万方数据

试剂均为分析纯.

1.4 主要仪器设备

System Gold 系列高效液相色谱仪 Beckman 公司生产 ;TCM 温控系统及溶剂过滤脱气真空泵 , Waters 公司生产 .

2 实验方法

2.1 标准样的制备与证实

叶黄质 , 萹黄质 , 新黄质参照文献 [1, 2] 介绍的方法从狗牙根中制备 , 制得的各种色素组分经氮气吹干 , 用重蒸三氯甲烷溶解 , 进行薄板层析与 UV / VIS 扫描 , 将测得的类胡萝卜素各种特性与文献标准对照 , 同时参照各色素在正相色谱 (柱色谱与薄层色谱) 与反相色 HPLC 中的色谱顺序行为进行相互印证各色素的身份 [3] , 各色素纯度用 HPLC 进行检验 , 不纯者用薄层色谱法进一步分离 . 被证实的 4 种类胡萝卜素合并按下述色谱条件进行分析 , 其色谱图如图 1 所示 .

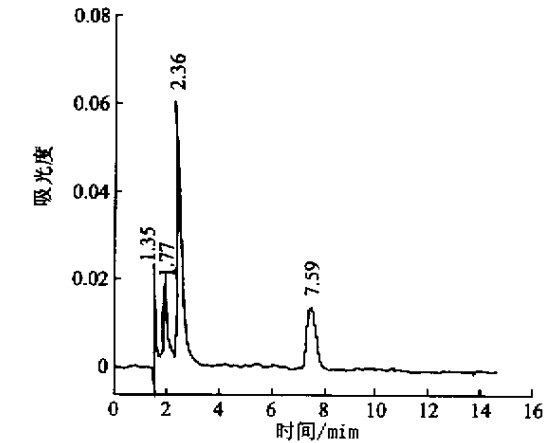


图 1 狗牙根提取的类胡萝卜素标准色谱图
Fig.1 The chromatogram of carotenoid standards from dogtoothgrass (*Cynodon dactylon*) by HPLC

2.2 色谱条件

色谱柱 : D 3.9 mm $\times$ 150 mm Nova-Pak C_{18} 不锈钢柱 , 载体颗粒直径为 5 μ m . 流动相及洗脱程序 : $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{三氯甲烷}} : V_{\text{叔丁醇}} = 83 : 15 : 2$, 0 ~ 2 min , 0.8 mL/min , 2 min 后为 1 mL/min . 检测波长 : 440 ± 10 nm , 进样量 5 μ L .

2.3 试样制备

准确称取红心薯的肉质部分 2.0000 g 于预冻的研钵中 , 用剪刀剪碎 , 加 2 mL 冰冻提取剂 ($V_{\text{己烷}} : V_{\text{丙酮}} : V_{\text{乙醇}} : V_{\text{甲苯}} = 10 : 7 : 6 : 7$) 研磨至匀浆 , 转入 50 mL 容量瓶内 , 研钵与研棒用 5 mL 提取剂洗涤 , 洗涤液一并转入容量瓶 , 接着向容量瓶加 10 mL 提

取剂及 1 mL 40% 氢氧化钾甲醇溶液 , 摇匀后在氮气保护、室温、黑暗条件下放置 12 h , 再加正己烷 15 mL , 并用 10 % 硫酸钠溶液定容 , 加 1.0 g 氯化钠去除乳化现象 , 轻轻摇动后搁至分层 , 分出上相于 50 mL 容量瓶中 , 用正己烷定容 . 取 25 mL 经氮气浓缩至干 , 然后用 1.0 mL 三氯甲烷溶解 , 用 0.5 μ L 微孔薄膜过滤器过滤即得待测液 [4, 5] . 用微量注射器吸 5 μ L 按上述色谱条件进行分析 , 其色谱图如图 2 所示 .

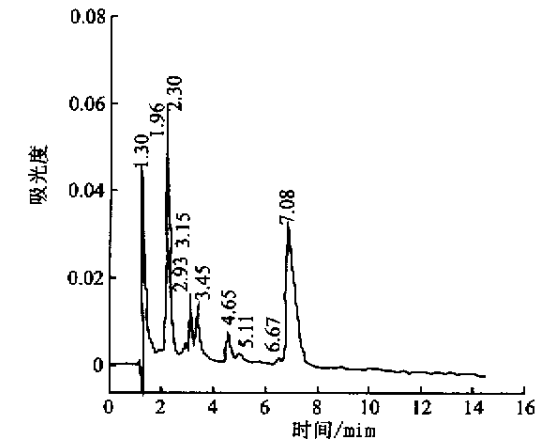


图 2 红心薯中类胡萝卜素提取物色谱图
Fig.2 The HPLC chromatogram of carotenoid extracts from *Ipomoea batatas*

2.4 定性分析

采用保留值定性 . 标准样混合液与试样进样量均为 5 μ L , 两者交叉进样 , 比较标样混合液与试样组分峰的保留时间加以定性 .

2.5 定量测定

2.5.1 采用外标法定量 配制一系列不同质量浓度的标准溶液 , 按上述色谱条件分别测定峰面积 , 以峰面积 - 进样量按线性回归方法求得其 4 种主要类胡萝卜素线性回归方程 , 相关系数与线性范围如表 1 .

表 1 4 种主要类胡萝卜素标准曲线数据
Tab.1 Standard curve data of four kinds of main carotenoids

色 素	回归方程	相关系数	线性范围
β -胡萝卜素	$Y_1 = 0.0234X_1 + 0.0022$	0.9900	20 ~ 150
叶黄质	$Y_2 = 0.0129X_2 + 0.0010$	0.9970	20 ~ 120
萹黄质	$Y_3 = 0.0003X_3 + 0.0007$	0.9100	1 ~ 15
新黄质	$Y_4 = 0.0005X_4 + 0.0004$	0.8329	1 ~ 15

注 : Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 分别为 β -胡萝卜素 , 叶黄质 , 萹黄质 , 新黄质的质量 (ng) ; X_1, X_2, X_3, X_4 分别为其对应的峰面积

2.5.2 测定 取一份试样 (2.0000 g) 设置 5 个重

复 按前述方法进行前处理与 HPLC 测定 ,计算出 4 种类胡萝卜素含量的平均值 ,标准偏差与变异系数如表 2.

表 2 红心薯中 β -胡萝卜素 ,叶黄质 ,堇黄质与新黄质的含量

Tab.2 The quantitative data of β -carotene ,lutein ,violaxanthin and neoxanthin in <i>Ipomoea batatas</i> ng/g				
试样序号	β -胡萝卜素	叶黄质	堇黄质	新黄质
1	36.21	10.12	0.21	0.59
2	36.23	9.76	0.21	0.55
3	35.97	9.94	0.22	0.54
4	36.22	9.75	0.21	0.57
5	36.21	9.93	0.20	0.57
$\bar{X}$	36.17	9.90	0.21	0.56
S.D	0.11	0.15	0.01	0.02
CV/%	0.30	1.50	3.38	3.57

3 结果与讨论

1)试样制备要考虑提取率 ,纯度与抽提的条件等因素 .采用预冷冻的四元溶剂($V_{\text{己烷}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{乙醇}}$

: $V_{\text{甲苯}}=10:7:6:7$)与 40% 氢氧化钾甲醇在氮气、暗处、浸提皂化 12 h ,不仅提取率高 ,样品纯度好 ,同时因抽提溶剂及工具均进行了预冷冻 ,在无氧与遮光条件下进行 ,从而减少了色素的降解与氧化.

2)比较了 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{三氯甲烷}}=78:22$, $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{四氢呋喃}}=80:20$ 及 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{叔丁醇}}=83:15:2$, $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{水}}=83:15:2$ 几个组合的流动相对红心薯中类胡萝卜素的分离效果. 结果表明 :以 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{叔丁醇}}=83:15:2$ 组合 ,配合流量线性梯度洗脱效果最佳 ,而以甲醇作主溶剂构成的洗脱系统 ,因柱压较高 ,对柱伤害大 ,另外 ,当辅溶剂比例超过 20% 时易产生大量气泡 ,导致检测困难.

3)将标准混合液与试样液交叉反复进样 ,验证峰面积与保留时间的重现性 .使用标准曲线的数据对 β -胡萝卜素 ,叶黄质 ,堇黄质 ,新黄质的峰面积进行定量 .得到 4 种类胡萝卜素的变异系数在 0.30% ~ 3.57% ,含量愈高的组份变异系数愈小 ,说明重现性与组份含量成正相关.

4)对于回收率的研究 ,将 3 种不同浓度的 β -胡萝卜素加到原料中 ,按前述样品制备方法与色谱条件进行测定 ,平均回收率为 96.4% .

参考文献 :

[1] CHEN B H . Characterization of major carotenoids in water convolvulus (*Ipomea aquatic*)By open column ,thin layer and high-performance liquid chromatography[J]. **J Chromatography** ,1991 ,543 :147 ~ 155 .
[2] CHEN B H . Separation of carotenoids in Turf bermrda Grass by high-performance liquid chromatography [J]. **J Chromatography** ,1987 ,393 :297 ~ 304 .
[3] 吉宏武 ,王增盛 ,施兆鹏 . 茶类胡萝卜素的高效液相色谱测定法[J]. 茶叶科学 ,1997 ,17 (2) 225 ~ 230 .
[4] KHACHIKECT Fredrik . Separation ,identification and quantification of the major carotenoids and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography[J]. **J Agri Food chem** ,1986 ,34 :606 ~ 616 .
[5] 中国农科院茶叶研究所 . 茶树生理及茶叶生化实验手册[M]. 北京 : 农业出版社 ,1983 .

(责任编辑 朱 明)