

文章编号: 1673 1689(2010)05-0698-06

Cosmosil Cholester-HPLC 法 分离番茄红素异构体的研究

张连富^{* 1,2}, 张环伟²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 番茄红素是一种由 11 个共轭双键和 2 个非共轭双键组成的直链型多不饱和烯烃。由于分子中双键数目较多, 番茄红素有很多空间异构体。对 COSMOSIL Cholester-HPLC 法分离番茄红素异构体的方法进行了研究并优化了分离条件。最终确定的试验条件如下: 流动相为 V(四氢呋喃): V(乙腈) = 10: 90, 进样量 20 μ L, 流速 1 mL/min, 检测波长 472 nm。此试验条件下进行的重复性试验表明, 该方法分离效果比较理想, 重复性良好。

关键词: 番茄红素; 异构体; 分离; Cholester 色谱柱

中图分类号: O 657. 72

文献标识码: A

Study on the Separation of Lycopene Isomers Via Cosmosil Cholester-HPLC System

ZHANG Lianfu^{* 1,2}, ZHANG Huanwei²

(1. State Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lycopene is a polyunsaturated carotene with 11 conjugated and 2 nonconjugated carbon-carbon double bonds. Because of its 13 double bonds, lycopene is susceptible to isomerize and isomerization may influence its bioactivity. In this paper, the authors studied the methodology of lycopene isomers detection via COSMOSIL Cholester-HPLC system. The optimized conditions were as follows: a mixture of tetrahydrofuran and acetonitrile (10: 90, v/v) was used as mobile phase and its flow rate was 1 mL/min, the injection volume was 20 μ L, and the separating was monitored at 472 nm. Confirmatory test was done and the result showed that this HPLC system was effective in lycopene isomers detection with ideal resolution and fairly good repeatability.

Key words: lycopene; isomers; separation; Cholester column

收稿日期: 2009-12-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD27B03); 江苏省自然科学基金项目(BK2009517); 食品科学与技术国家重点实验室资助项目(SKLF-TS-200912)。

* 通信作者: 张连富(1967-), 男, 河北唐山人, 教授, 工学博士, 主要从事功能性食品研究。

Email: lianfu@jiangnan.edu.cn

番茄红素(Lycopene)是一种由 11 个共轭双键和 2 个非共轭双键组成的直链型多不饱和烯烃, 分子式 $C_{40}H_{56}$ 。由于番茄红素分子中含有的双键数目较多, 分子不能内旋转、刚性较强, 所以比较容易受光、热、氧、酸等因素的影响而产生空间异构体^[1-2]。目前的研究发现, 食物中(如番茄酱中)天然存在的番茄红素以全反式结构为主(90%~98%), 而人体的血清和肾上腺等组织中含有的番茄红素主要是以顺式结构为主(79%~88%)——膳食与人体组织中番茄红素空间构型的差异性提示我们: 顺式结构的番茄红素可能更有利于被人体吸收, 如果对含番茄红素食物原料进行处理并提高其中顺式结构比例, 就有可能提高产品的生物价并在此基础上大幅提高其生物活性作用^[3]。为了弄清上述问题, 就必须获得人体中常见番茄红素空间异构体的单体并进行体内、体外试验研究, 而实现番茄红素不同异构体的分离是实现上述目标的首要前提。为此, 作者本文即对 HPLC 分离番茄红素异构体这种方法进行研究。

由于番茄红素各异构体间在极性、分子大小等方面差异很小(图 1), 要实现他们之间的分离比较困难。目前国内外普遍采用的分离方法是高效液相色谱法, 主要有两种方式: 一种是采用 C30 柱来分离, 但 C30 柱对分离不同类胡萝卜素效果较好, 对番茄红素的顺反异构体的分离效果则不是很理想^[46]; 另一种是 Schierle J 等建立的利用 3 根 Nucliosil 300-5 正相色谱柱联用的方法对番茄红素的异构体进行分离, 这种方法实现了顺反异构体的分离, 但对顺式异构体间的分离效果也不十分理想。而且, 3 根色谱柱联用在实际操作中也有很大的麻烦, 需要长时间的平衡操作才能使色谱柱达到平衡状态^[7]。

鉴于目前所采用的色谱柱都存在一定的缺点, 作者尝试利用 Cosmosil Cholesterol 色谱柱来实现番茄红素各异构体之间的分离: Cosmosil Cholesterol 柱是 Nacalai Tesque Inc. 开发的反相体系的 HPLC 柱, 采用胆甾醇键合硅胶填料, 具有与传统的烷基键合 C18、C30 硅胶填料一样的疏水性, 因而其对功能基的选择能力几乎相同; 但在分子形状特别是空间立体异构体的识别能力上 Cholesterol 柱的性能非常高。等利用此种色谱柱对 ceriporic acid 异构体进行了分离, 取得了较好的分离效果^[8]。考虑到 ceriporic acid 异构体分离与番茄红素空间异构体的分离具有一定程度的相似性(图 2), 作者对 Cosmosil Cholesterol HPLC 体系分离番茄红素空间异构体进行了尝试。

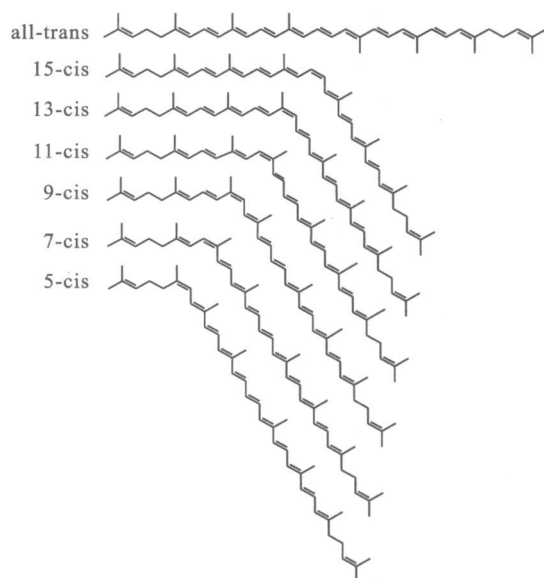


图 1 番茄红素的几种常见的顺反异构体

Fig. 1 Structure of the all-trans/cis- isomers of lycopene

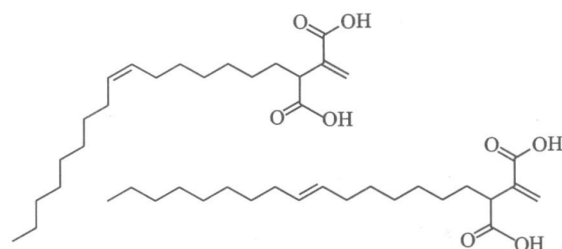


图 2 Ceriporic acid 结构图

Fig. 2 Structure of Ceriporic acid isomers

1 材料与方法

1.1 试验材料

全反式番茄红素(纯度 90%): 华北制药股份有限公司产品。

乙腈: AP, 上海凌峰化学试剂有限公司产品; 四氢呋喃: AP, 上海试四赫维化工有限公司产品; 乙酸乙酯: AP, 国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 试验仪器

UV-2102 PCS 型紫外可见分光光度计; 高效液相色谱仪 I (P3000 型高压输液泵, UV3000 可变波长紫外/可见分光检测器): 北京创新通恒科技有限公司产品; 高效液相色谱仪 II (Waters 2695 型 HPLC, Waters 996 二极管阵列检测器; Masslynx 工作站); 色谱柱: Cosmosil Cholesterol 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

1.3 试验方法

1.3.1 异构化番茄红素样品的制备 参照 Pierre Lambelet 等^[9]的方法进行顺式化处理: 称取 0.020 0 g 的番茄红素溶于 100 mL 乙酸乙酯中热回流 24 h。通过对反应前后的样品进行全波长扫

描,出现了文献中报道的 362 nm 处的顺式峰(图 3)。说明此样品中已经含有了顺式异构体,可以用于分离,摸索试验条件。

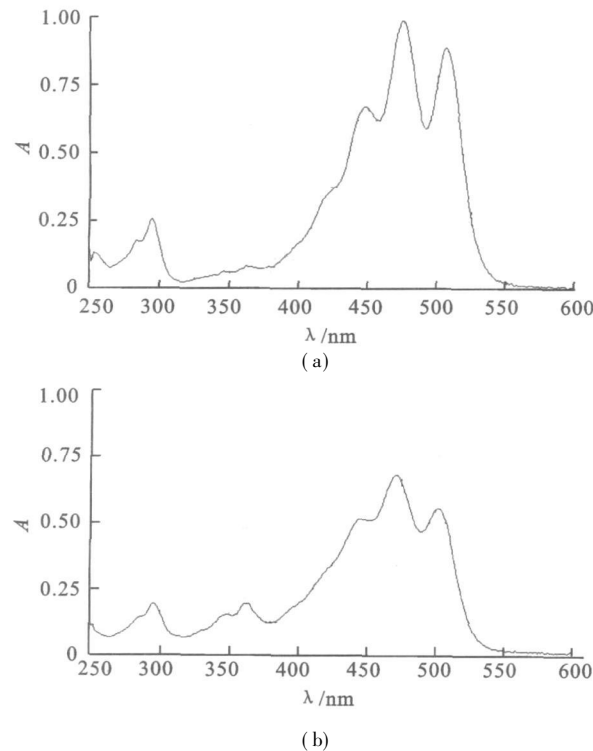


图 3 反应前后的全波长扫描图谱

Fig. 3 UV Visible spectra of lycopene samples before and after isomerization

1.3.2 检测方法 对反应前后的样品进行全波长扫描,确定样品中含有番茄红素顺式异构体;用高效液相色谱仪 I 对流动相比比例、进样量、流速等试验条件进行优化,将出峰个数、分离度 R 及峰形等 3 个指标作为分离效果的判断标准,得出最佳分离条件;用高效液相色谱仪 II 进行不同仪器间的重复性试验。

2 试验结果与讨论

2.1 流动相的选择

综合考虑各种试剂的性质和对番茄红素的溶解性性质,选取的试验溶剂为四氢呋喃、乙酸乙酯与乙腈。选取的两种流动相为: A) 乙酸乙酯: 乙腈, B) 四氢呋喃(THF): 乙腈。

从色谱图中可以看出,两种流动相在相同的配比条件下均对样品中的物质达到了分离的目的,分离出的峰的个数也相同。对各峰的分离程度和峰形等方面来看,结果也大致相同,采用流动相 A 的分离度 ($R_{min}=1.7$) 要稍好于用流动相 B ($R_{min}=1.3$)。但是从保留时间来看,用 A 为流动相的保留时间($t_R=68$ min)明显长于 B ($t_R=42$ min),这样造成了分离成本的增加,所以试验采用四氢呋喃和乙腈作为流动相。

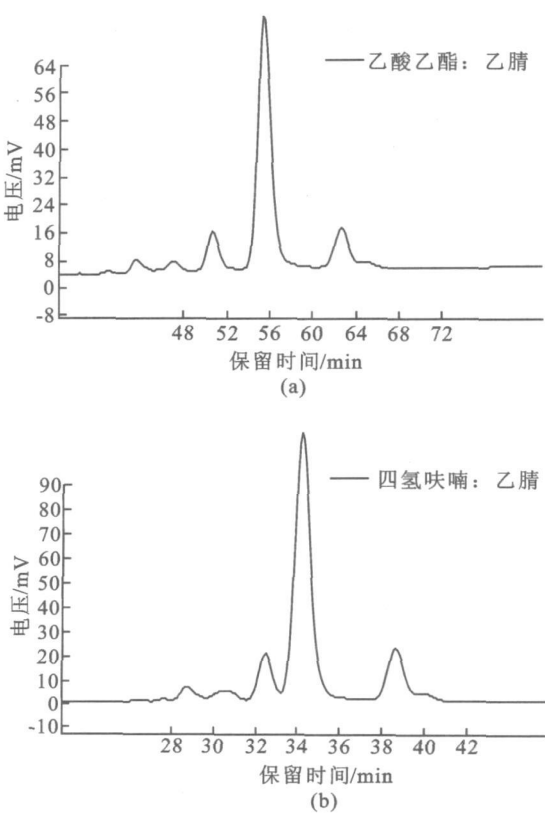
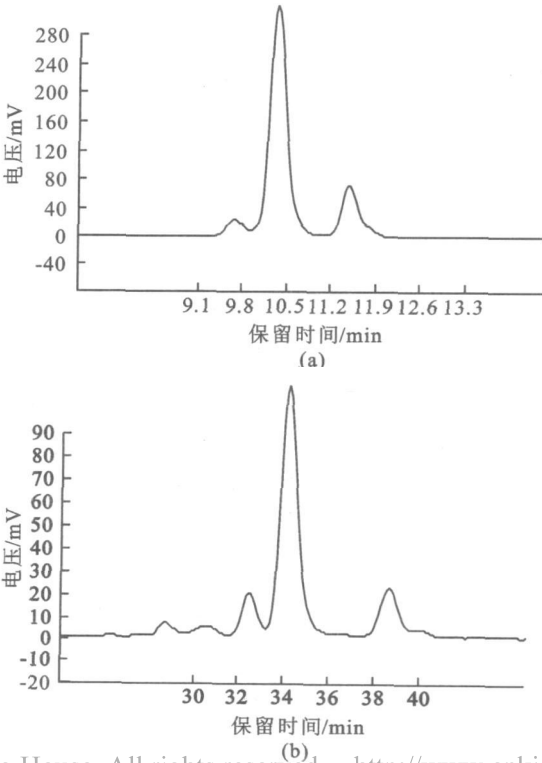


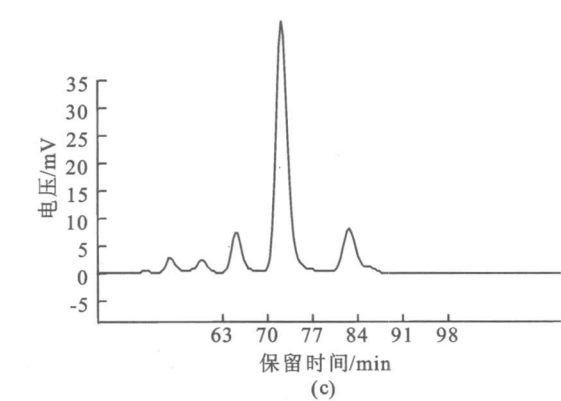
图 4 不同流动相条件下分离样品的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of isomerized lycopene using different mobile phase

2.2 流动相比比例的确定

由上步选取流动相后,选择不同比例的流动相来进行试验,采取 $V(THF):V(乙腈)=25:75、10:90、5:95$ 3 个比例来进行试验,试验结果如图 5。





(a)、(b)、(c) 的流动相组成分别是 V(四氢呋喃)：V(乙腈) = 25：75、10：90、5：95

图 5 不同流动相比例下分离样品的色谱图
Fig. 5 Chromatograms of isomerized lycopene using different mobile phase ratio

由上图可知,随着流动相中极性物质乙腈含量的增加,番茄红素异构体的分离效果越好。在 V(THF)：V(乙腈)= 25：75 时,只分出了 3 个峰。当两者的比例达到 10：90 时,可以分出 5 个峰,分离效果较好。但是当两者的比例达到 5：95 时,分离效果与 10：90 相似,但保留时间几乎延长了一倍。流动相比比例采用 10：90 的比例来进行试验。

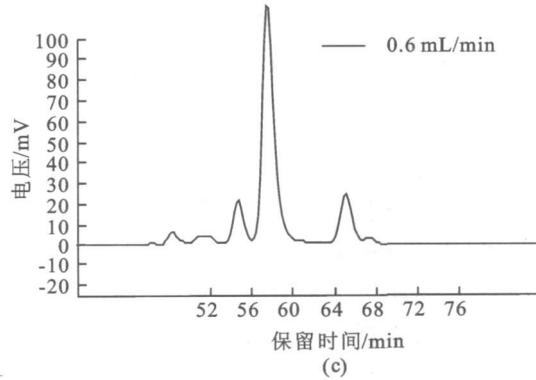
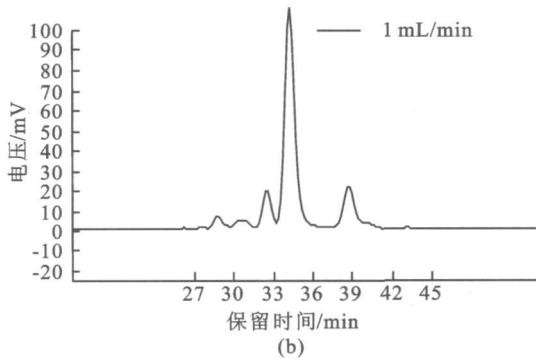
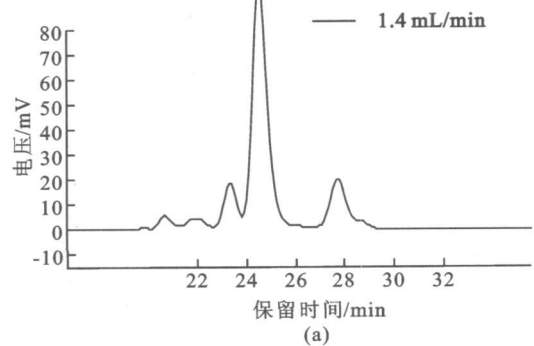
2 3 流动相流速的确定

流动相的流速对番茄红素异构体分离效果有一定的影响,根据本试验所采用的仪器的性质和承载能力,采用的流量为 1.4、1.0、0.6 mL/min 3 个梯度。

流动相的流速对峰的分离效果的影响并不是十分明显(图 6)。当流量低时,分离效果稍好,但保留时间太长,减短了仪器的使用寿命。当流量增大时,泵的压力过大,对仪器的损害也是很大的。采用了比较常用的流量 1 mL/min。

2 4 进样量的确定

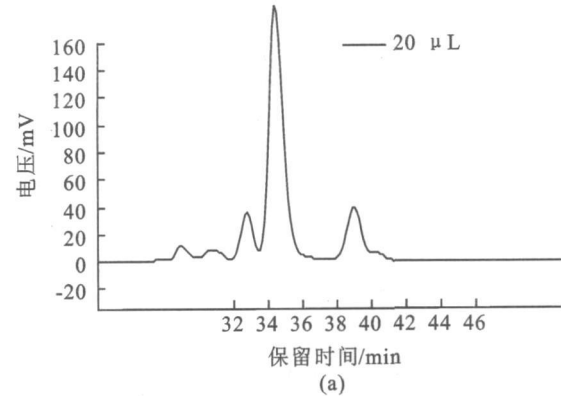
研究了进样量对番茄红素异构体分离效果的影响,由于进样阀的最大容积(20 μL)的限制,所以采用的进样量为 20 μL 和 10 μL。



a、b、c 分别是流量为 1.4 mL/min、1.0 mL/min、0.6 mL/min

图 6 流动相不同流速分离样品的色谱图
Fig. 6 Chromatograms of isomerized lycopene using different mobile phase flow rate

试验结果表明(图 7),在进样量为 20 μL 时,分离度和 10 μL 进样的结果没有大的区别。采用高效液相色谱仪 II 检测的 30 μL 进样,分离度小于 20 μL 进样,由于样品量太大,柱子的载量有一定的限度,流动相在没有将前种物质完全洗脱出来的时候,后种物质已经溶解于流动相中被洗脱出来,所以若进样量过大,分离效果不是很好。采用的 10 μL 和 20 μL 进样对分离效果无明显影响,则采用 20 μL 的进样量将有利于试验效率的提高。



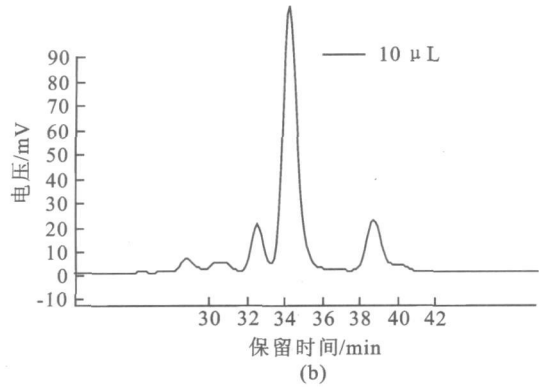


图 7 不同进样量下分离样品的色谱图
Fig. 7 Chromatograms of isomerized lycopene under different sample injection

2 5 重复性试验

为了检测试验条件的可靠性,在以上试验确定的试验条件的基础上,进行重复性试验。图 8 为高效液相色谱仪 I 分离的色谱图。同时,进行了不同仪器间的验证性试验,采用高效液相色谱仪 II 对样品进行重复性试验,得到的试验结果如图 9 所示。

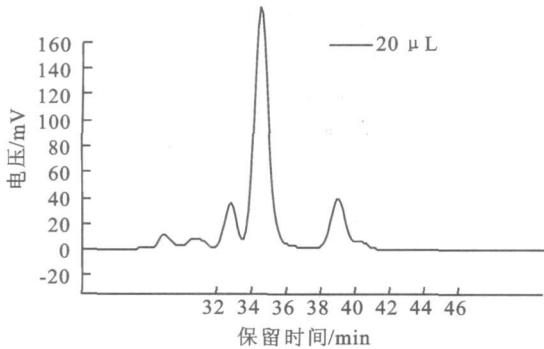


图 8 高效液相色谱仪 I 分离的色谱图
Fig. 8 Chromatogram of sample using HPLC I

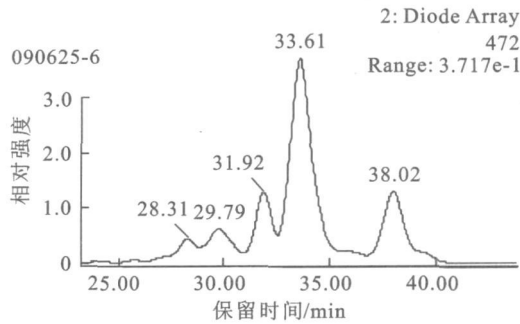


图 9 高效液相色谱仪 II 分离的色谱图
Fig. 9 Chromatogram of sample using HPLC II
从上面两张色谱图可以看出,作者所确定的试验条件对样品中的组分实现了分离。对分出的组分进行初步鉴定,从全波长扫描图得出以上 5 个峰为同类型物质,可以认定为番茄红素的异构体。所以,此试验条件可以用于番茄红素异构体的分离。与 Pierre Lambelet 等^[9]所采用的 3 根正相柱联用的方法相比,在对样品进行了同样的处理后进行分离,分离到了 5 个色谱峰,而且最小分离度也达到了 1.3,基本可以将各个峰分开,并且此方法操作简便,平衡时间短。而 3 根正相柱联用的方法只分出了 4 个色谱峰,操作较复杂。所以本试验基本达到预期效果。

在所确定的测定条件下,异构化处理前番茄红素样品(全反式)的色谱图及其中主要组分(全反式番茄红素,响应时间为 33.95 min)的 UV-Vis 光谱如图 10、11 所示。对比处理后的色谱图可知,所确定的番茄红素异构体分离条件适当,操作稳定,重现性良好。

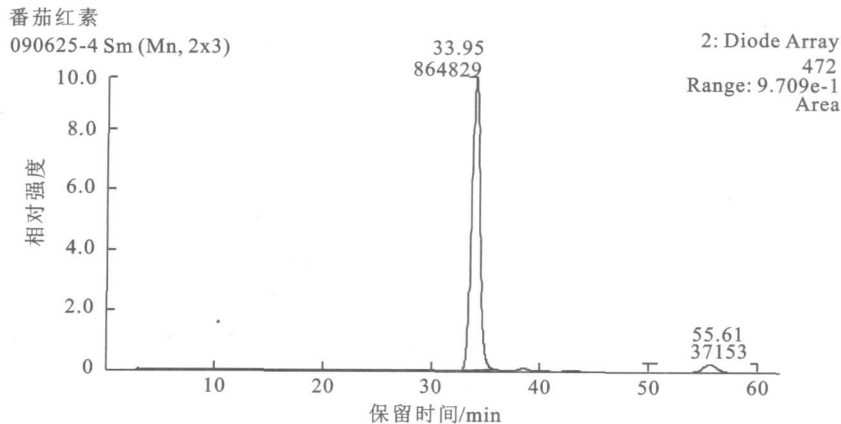


图 10 标准番茄红素样品的液相色谱图
Fig. 10 Chromatogram of standard all trans lycopene sample

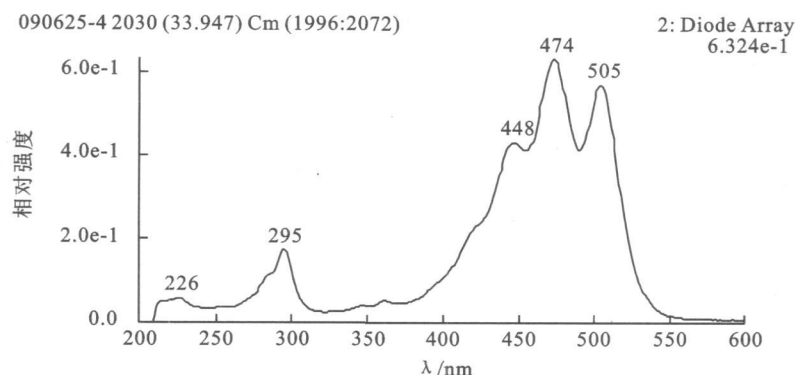


图 11 标准番茄红素样品的 UV Vis 光谱图

Fig. 11 UV Visible spectra of satandard all-trans lycopene sample

3 结 语

通过对 Cosmosil Cholest 柱分离番茄红素异构体的条件进行优化试验,得到了一种可以较好分离番茄红素异构体的方法,并确定了分离条件为:流动相为 $V(\text{四氢呋喃}):V(\text{乙腈})=10:90$,进样量 $20\ \mu\text{L}$,流量 $1\ \text{mL}/\text{min}$,检测波长 $472\ \text{nm}$ 。并在

此试验条件下进行了重复性试验,证明了此方法的重现性较好。与 Schierle J 等建立的 3 根 Nucleosil 300-5 正相色谱柱联用法^[7]相比,作者所使用的方法操作简便,避免了由于 3 柱串联所造成的漂移,易于实现色谱柱的平衡;与 C30 柱法^[4+6]相比,本方法对各顺式峰的分离效果更好些,分离效果基本达到完全分离要求。

参考文献 (References):

- [1] L Zechmeister, P Tuzson. Spontaneous isomerization of lycopene[J]. **Nature**, 1938, 141(5): 249– 250.
- [2] John shi, Yuzhu dai, Yukio kakuda, et al. Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato puree[J]. **Food Control**, 2008(19): 514– 520.
- [3] Steven K Clinton, Curt Emenhiser, Steven J Schwartz, et al. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate[J]. **Cancer Epidemiology**, 1996(5): 823– 833.
- [4] Curt Emenhiser, Lane C Sander, Steven J Schwartz. Capability of a polymeric C_{30} stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed phase liquid chromatography[J]. **Journal of Chromatography A**, 1995(707): 205– 216.
- [5] Jafar Muhammad EL-Qudah. Identification and quantification of major carotenoids in some vegetables[J]. **American Journal of Applied Sciences**, 2009, 6(3): 492– 497.
- [6] Volker Bonn, Ni Luh Puspitasari Nienaber, Mario G Ferruzzi, et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002(50): 221– 226.
- [7] Schierle J, Bretzel W, Buhler I, et al. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma[J]. **Food Chemistry**, 1997, 59(3): 459– 465.
- [8] Tsuzuki W, Ushida K. Preparative separation of cis- and trans-isomers of unsaturated fatty acid methyl esters contained in edible oils by RP-HPLC[J]. **Lipids**, 2009, 44(4): 373– 379.
- [9] Pierre Lambelet, Myriam Richelle, Karlheinz Bortlik, et al. Improving the stability of lycopene Z-isomers in isomerised tomato extracts[J]. **Food Chemistry**, 2009(112): 156– 161.

(责任编辑: 朱明)