

HPCE 法研究番茄中类胡萝卜素的动态变化

刘长付¹ 陈媛梅^{1*} 郑彩霞²

(1. 北京林业大学 理学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 本研究建立了高效毛细管电泳法(HPCE)测定番茄中番茄红素和 β -胡萝卜素含量的分析方法。以丙酮:石油醚为溶剂,超声提取番茄中的类胡萝卜素,经分离纯化后作供试液,确定了HPCE法检测番茄中类胡萝卜素的最佳工艺:检测波长为450 nm,运行缓冲液为pH 4.5的HAc-NaAc溶液,电泳电压24 kV,0.5 MPa压力下进样6 s,电泳温度为20 $^{\circ}$ C。最佳工艺下,样品可在16 min内完全分离,线性关系良好。该法准确、快速、简便,可同时检测样品中的番茄红素和 β -胡萝卜素。此外,按照最佳条件对5种不同成熟期的样品进行分析,发现番茄成熟过程中番茄红素的含量逐渐升高, β -胡萝卜素的含量先下降后上升,两者含量均在果实完全成熟时达到最高。

关键词 番茄; 高效毛细管电泳; 番茄红素; β -胡萝卜素; 动态变化

中图分类号 O 657.8

文章编号 1007-4333(2013)04-0084-07

文献标志码 A

Study on dynamic change of carotenoids contents in tomato by HPCE

LIU Chang-fu¹, CHEN Yuan-mei^{1*}, ZHENG Cai-xia²

(1. College of Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract A high performance capillary electrophoresis(HPCE) method was found for measuring the content of lycopene and β -carotene in tomato. The samples were extracted with the mixed solvent of acetone and petroleum ether by ultrasonic treatment, which were used as the test solution after separation and purification. The optimal experimental conditions, such as concentration and pH of buffer, separation voltage, separation temperature and injection time on the separation efficiency were determined first. The experimental conditions were as the followings: detection wave length was 450 nm, running buffer was pH 4.5, HAc-NaAc was 20 mmol/L, electrophoresis voltage was 24 kV, injection time was 6 s with the pressure of 0.5 MPa, electrophoresis temperature was 20 $^{\circ}$ C. The samples could be completely separated in 16 min with a good linear relationship under the above conditions. The proposed method could be simultaneously applied for the determination of lycopene and β -Carotene in tomato plant samples with the advantages of high accuracy, fast separation and simple extraction. Furthermore, the contents of tomato sample with five different ripening periods were measured and analyzed in accordance with the optimal conditions of HPCE. The results indicated that the content of β -carotene was decreased firstly and then gradually increased with the content of lycopene increased during the different mature phases, and both of the contents would peak at the completion of their ripened phases.

Key words tomato; HPCE; lycopene; β -carotene; dynamic change

番茄是一种色泽鲜艳、营养丰富的果蔬,成熟的番茄中含有丰富的类胡萝卜素^[1]。其中番茄红素是一种很强的抗氧化剂,能高效地淬灭单线态氧、清除自由基,对许多癌症有预防和抑制作用,同时能抗衰

老,抗紫外线,预防动脉硬化等^[2-5]。 β -胡萝卜素是一种抗氧化剂,作为合成 V_A 的前体,具体提高免疫力,改善夜盲症和皮肤粗糙,保护黏膜等功能^[6-8]。

HPCE是经典电泳技术与现代微柱相互结合

收稿日期: 2013-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671655)

第一作者: 刘长付,硕士研究生,E-mail:liuchf2010@163.com

通讯作者: 陈媛梅,副教授,主要从事天然化合物的提取分离与物理化学性质研究,E-mail:chym1@bjfu.edu.cn

的产物,具有微量、快速、自动化程度高等优点,已被越来越多的应用到药物分析、生命科学、环境监测等领域^[9-13]。有关类胡萝卜素的测定,目前《中国药典》中使用的方法有分光光度法、纸色谱法、薄层色谱法及高效液相色谱法(HPLC)等^[14]。分光光度法虽操作简便,但系统误差较大,同时不能排除其他色素的干扰,只能对总类胡萝卜素而非各组分进行测定,所以在定量分析方面应用较少^[15]。李增光等^[16]采用纸色谱及薄层色谱建立了一种测定番茄红素的方法,但过程复杂,不易定量,精密度差。杜为民等^[17]采用 HPLC,虽能将类胡萝卜素的各组分较好地分离并进行定量分析,但分析时间较长(55 min),不利于快速测定。

番茄成熟过程中颜色变化明显,而前人对此过程中类胡萝卜素的动态变化研究较少,且有关 HPCE 分离检测类胡萝卜素的内容尚未见报道。为此,本研究采用超声提取、HPCE 法来研究此过程中类胡萝卜素的动态变化,以期能为番茄成熟过程中生理代谢的研究提供试验基础,为综合开发与利用番茄资源提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器

试剂:丙酮、石油醚、氯仿、正己烷、乙酸乙酯、无水乙醇、重铬酸钾、硼砂、硼酸、乙酸、乙酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、甲酰胺、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、抗坏血酸均为分析纯,甲醇、乙腈、丙酮、石油醚为色谱纯,试验用水为超纯水。

材料:番茄红素标准品(含量 40.5%)购自 Express Technology Co., Ltd.; β -胡萝卜素标准品(含量 30.9%)购自中国食品药品检定研究院;供试番茄品种为京丹一号,依据植株生长状态、生长期、色泽、硬度等将其成熟过程划分为 5 种不同的时期:青果期(Blue stage),绿色,硬;白果期(White stage),外观开始泛白,硬;橙果期(Orange stage),橙色,较硬;红果期(Red stage),果实全红,较软;紫红果期(Purple stage),深红或紫红色,软。

仪器:HP^{3D}毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司),配有二极管阵列检测器(DAD)及色谱工作站;KQ500DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AR2140 电子天平(美国 Ohaus 公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);PB-10

型 pH 计(德国 Sartorius);Sigma3K-30 离心机(德国 Sigma 离心机有限公司);旋转蒸发器(上海申生科技有限公司)。

1.2 溶液的制备

标准品溶液:准确称取番茄红素 0.300 mg、 β -胡萝卜素 0.100 mg,用色谱纯丙酮:石油醚(体积比为 1.5:1)溶解定容至 100 mL,得到浓度为番茄红素、 β -胡萝卜素的标准品贮备液,冰箱中保存,使用前经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。

样品溶液:取适量同种时期的番茄,清洗去蒂后切成小块,放入研钵中充分研磨,然后准确称取 1.000 g 匀浆,加入适量 BHT 超声提取。

超声提取:溶剂为体积比 1.5:1 的分析纯丙酮:石油醚,超声功率为 450 W,超声温度为 24 $^{\circ}$ C,液料比(mL/g)为 30:1,超声时间 25 min,提取次数 2 次。

提取液经分离萃取,减压浓缩,蒸馏至干^[15,18],再用色谱纯丙酮:石油醚体积比为 1.5:1 定容至 50 mL,最后经 0.45 μ m 滤膜过滤,超声除气 5 min 后作样品待测液。

类胡萝卜素高温、见光易降解,整个实验过程尽量在低温、暗处进行。

1.3 HPCE 方法

分析样品之前,依次用 1 mol/L NaOH、0.1 mol/L NaOH、超纯水和缓冲液各冲洗 3 min。试验结束后依次用 1 mol/L NaOH、超纯水各冲洗 5 min。

以 pH 4.5 的 20 mmol/L HAc-NaAc 溶液为运行缓冲液,加入适量甲醇、乙腈作为添加剂,采用涂层熔融石英毛细管(58.5 cm \times 75 μ m 内径,有效长度 50 cm;河北永年光纤厂),0.5 MPa 压力下进样 6 s,于 450 nm 检测波长、20 $^{\circ}$ C 电泳温度、24 kV 恒定电压下进行 HPCE。所有溶液使用前均需经 0.45 μ m 滤膜过滤,低温超声除气 5 min。

2 结果与讨论

综合电泳图谱的峰形、分离度、出峰时间以及仪器所能提供的条件等多方面因素,并且尽量使番茄红素和 β -胡萝卜素的分析条件相统一,对 HPCE 的分离条件进行了考察。分离条件包括分离介质、电泳电压、进样时间和电泳温度,而分离介质的性能与所用缓冲液的种类、pH、浓度以及添加剂等密切相关。

2.1 缓冲液体系的确定

2.1.1 缓冲液种类

依次使用磷酸盐、硼酸盐、醋酸盐、Tris-HCl 等

缓冲体系进行试验。结果表明, HAc-NaAc 缓冲液对检测光波的吸收最低, 这是由于 HAc-NaAc 缓冲液为极性有机溶剂, 更有利于样品在缓冲液中充分地分离散开, 故选择 HAc-NaAc 作缓冲液。

2.1.2 添加剂

依次使用 SDS、甲醇、乙醇、乙腈、甲酰胺进行试验。结果表明, 上述添加剂对分离效果均有一定程度的改善, 但甲醇、乙腈作为添加剂时的改善效果最佳。原因是加入适量的甲醇、乙腈, 一方面增加了 HAc-NaAc 缓冲液对相对弱极性、疏水性溶质的溶解度, 另一方面改变了毛细管壁的性质, 使得电渗流增加, 溶质的保留时间缩短。综合考虑选择甲醇、乙腈作添加剂。

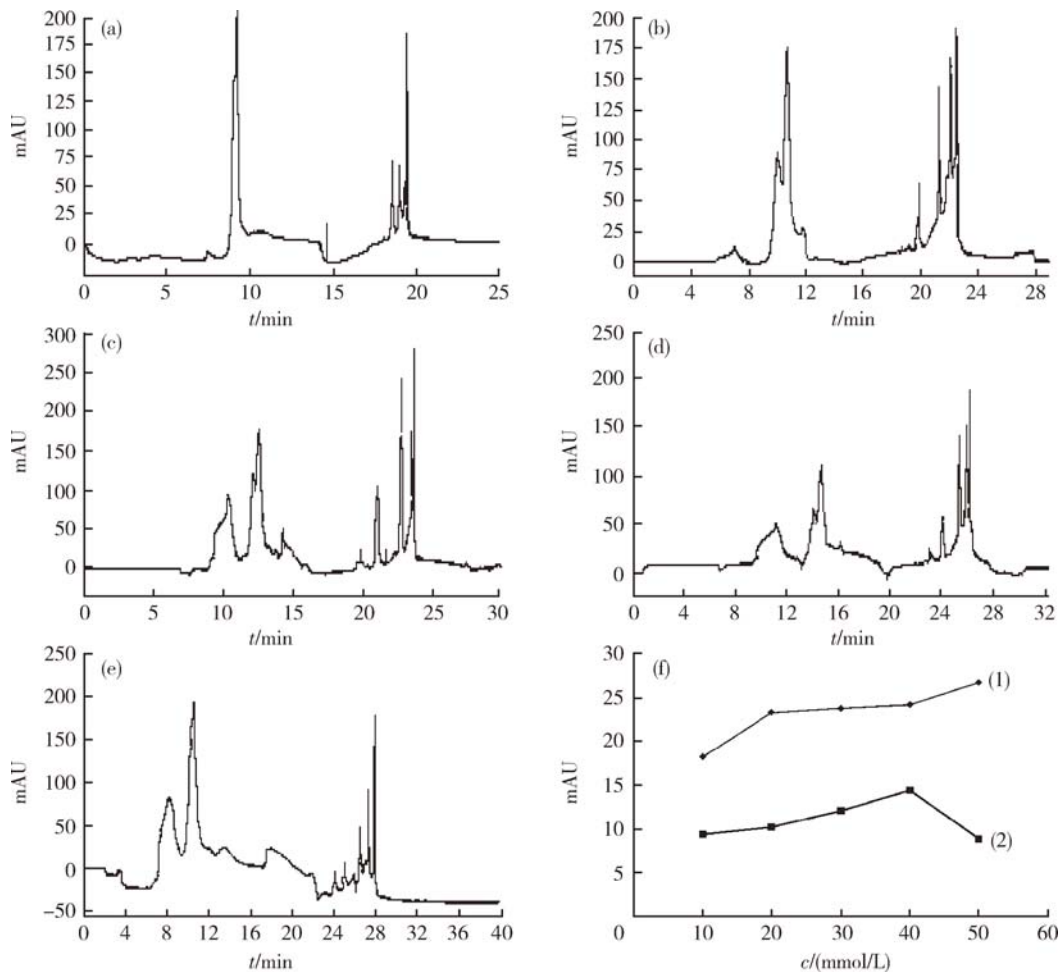
2.1.3 缓冲液 pH

pH 一方面影响溶质组分的电离度; 另一方面影响电渗流的大小。考察了 pH 为 4.0、4.5、5.0、

5.5、6.0 的 HAc-NaAc 缓冲液对分离效果的影响。结果表明, 上述 pH 下, 标准品溶液均有一定程度的分离, pH 4.0 时的分离效果较弱, pH 4.5 时的分离效果较好且出峰时间较短, pH 5.0、5.5 时, 分离效果不佳, pH 6.0 时基线不稳。综合考虑, 选择 HAc-NaAc 缓冲液的 pH 为 4.5。

2.1.4 缓冲液浓度

缓冲液浓度影响缓冲容量的大小, 通常缓冲容量随浓度的增大而增大, 然而缓冲液浓度增大时, 溶质在毛细管内迁移速度下降, 迁移时间延长。考察了浓度为 10、20、30、40 和 50 mmol/L 的 HAc-NaAc 缓冲液对分离效果的影响。结果见图 1, 迁移时间随着缓冲液浓度的增加而延长, 而浓度为 10 mmol/L 时分离度较低, 30、40、50 mmol/L 时基线稳定性差。综合考虑, 选择 HAc-NaAc 缓冲液的浓度为 20 mmol/L。



(a) 10 mmol/L; (b) 20 mmol/L; (c) 30 mmol/L; (d) 40 mmol/L; (e) 50 mmol/L; (f) 1: Lycopene; 2: β -Carotene

图 1 不同缓冲液浓度时的 HPCE 图谱 ((a)~(e)) 及对出峰时间 (f) 的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of buffer on HPCE fingerprint and peak time

2.2 电泳条件的选择

2.2.1 检测波长

考察了检测波长为 448、450、470、480 和 500 nm 时的 HPCE 图谱^[19-20]。结果表明,在上述 5 个波长下番茄红素的灵敏度均较高,而其中 448 nm 波长下最高,而 β -胡萝卜素的灵敏度只在 450 nm 波长下较高。综合考虑,选择检测波长为 450 nm。

2.2.2 电泳电压

高电压是 HPCE 具有高效、快速等特点的主要原因,但电压过大,分离度将受到影响。考察了电泳电压为 18、20、22、24、26 和 28 kV 时对分离效果的影响。结果表明,随着电压增大,迁移时间变短,但当电压为 26 和 28 kV 时,基线不稳且噪声明显增大。综合考虑,选择电泳电压为 24 kV。

2.2.3 电泳温度

温度不仅影响分离的重现性,而且影响缓冲液的粘度、样品的电离等方面,进而影响分离效率。考察了电泳温度为 10、15、20、25 和 30 °C 时对分离效果的影响。结果表明,随着温度的升高,出峰时间缩短,但 25 和 30 °C 时分离度下降,且测得含量降低。从分离度、出峰时间和避免降解等方面综合考虑,选

择电泳温度为 20 °C。

2.2.4 进样时间

选择恰当的进样时间,既能保证灵敏度的要求,又能获得良好的分离效果。在进样压力为 0.5 MPa 固定不变时,考察了进样时间为 2、4、6、8 和 10 s 时对分离效果的影响。结果表明,随着进样时间的增加,峰面积加大,且对分离效果有影响。进样时间为 2 和 4 s 时基线相对不稳,进样时间为 8 和 10 s 时的分离度不如 6 s 的好。综合考虑,选择进样时间为 6 s。

2.3 标准曲线的建立

分别吸取一定量的标准品贮备液,配置一系列浓度的番茄红素和 β -胡萝卜素的标准溶液。

按照“1.3”中的最佳 HPCE 条件对各标准液分别平行进行 5 次试验,以质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线。结果见图 2。由图可知,番茄红素和 β -胡萝卜素分别在 0.03~0.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.01~0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,峰面积与质量浓度线性关系良好。线性方程分别为番茄红素: $y=179.78x+1.04$, $r^2=0.9978$; β -胡萝卜素: $y=171.89x+1.72$, $r^2=0.9949$ 。

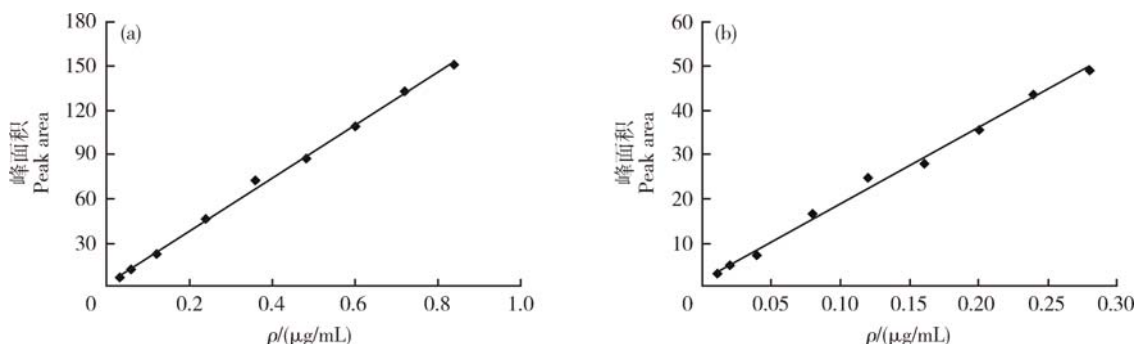


图 2 番茄红素和 β -胡萝卜素标准曲线

Fig. 2 Standard curves of Lycopene (a) and β -Carotene (b)

2.4 相关试验

2.4.1 精密度试验

取含番茄红素 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 β -胡萝卜素 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品溶液,在最佳 HPCE 条件下重复进样 5 次,求得番茄红素和 β -胡萝卜素出峰时间的 RSD 分别为 0.39% 和 0.13%,峰面积的 RSD 分别为 0.73% 和 0.99%。表明本方法的精密度高,结果准确。

2.4.2 重复性试验

取同种时期的样品 5 份,按照“1.2”制备供试

液,在最佳 HPCE 条件下进行 5 次试验。测得样品中番茄红素和 β -胡萝卜素出峰时间的 RSD 分别为 0.54% 和 0.16%,含量的 RSD 分别为 0.35% 和 1.25%,表明本方法的重复性好,稳定性高。

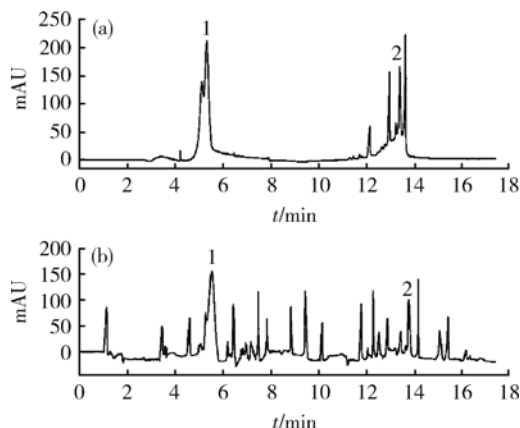
2.4.3 回收率试验

准确称取已知含量的红果期样品 1.00 g,加入不同含量的标准品溶液进行回收率试验。重复 5 次,测得番茄红素和 β -胡萝卜素的平均回收率分别为 97.2% 和 95.0%,RSD 分别为 1.67% 和 1.25%,表明本方法回收率高,可行性好。

2.5 红果期样品测定

2.5.1 定性测定

按照“1.2”中的方法制备标准液与供试液,在最佳条件下进行 HPCE,得到图谱(图 3)。样品在 16 min 内即能得到较好的分离,所需时间比 HPLC (55 min)显著缩短。比对出峰时间可知样品中含有



(a) Standard sample; (b) Samples: 1, Lycopene; 2, β -Carotene

图 3 标准品及样品图谱

Fig. 3 HPCE fingerprints of standard sample (a) and sample (b)

番茄红素($t=5.34$ min, RSD=0.54%)与 β -胡萝卜素($t=13.39$ min, RSD=0.16%)。

2.5.2 定量测定

对所得图谱进行积分,分别得到两者的峰面积,然后依据标准曲线求得对应含量(表 1)。

2.5.3 不同成熟期样品的测定

2.5.3.1 不同成熟期 HPCE 图谱

按照上述最佳提取、检测方法,分别对不同成熟期番茄中的类胡萝卜素提取液进行分析,结果见图 4。

2.5.3.2 不同成熟期含量变化

依据图谱,利用标准曲线可得到不同成熟期中番茄红素和 β -胡萝卜素的含量,结果见表 2、图 4。

番茄红素:青果期内检测不到,白果期开始出现,此后随着成熟进程的推进,番茄红素开始大量形成、积累,至紫红果期含量达到最高。

β -胡萝卜素:青果期内即有少量的 β -胡萝卜素生成,进入白果期含量略有下降,橙果期含量回复并上升,在其后的时期中,果实内 β -胡萝卜素稳步积累,至紫红果期达到最高。

表 1 不同成熟期样品测定结果

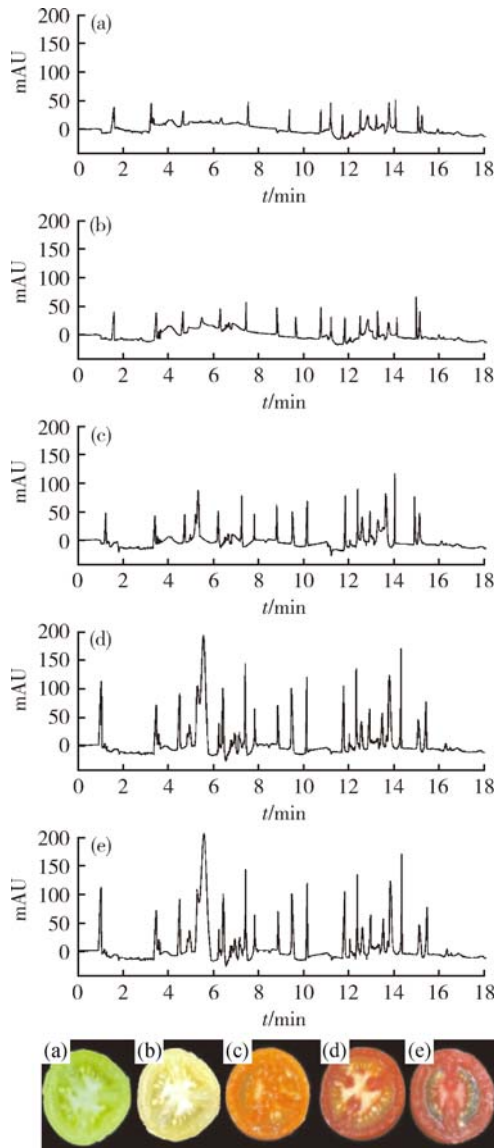
Table 1 Determination results of sample($n=5$) in five ripening stage

组分 Component	1 One	2 Two	3 Three	4 Four	5 Five	平均值 Average	相对标准偏差/% RSD
番茄红素/ $(\mu\text{g}/\text{g})$ Lycopene	21.23	21.25	21.14	21.21	21.07	21.18	0.35
番茄红素/min Lycopene	5.40	5.39	5.38	5.35	5.33	5.34	0.54
β -胡萝卜素/ $(\mu\text{g}/\text{g})$ β -Carotene	5.21	5.19	5.15	5.05	5.11	5.14	1.25
β -胡萝卜素/min β -Carotene	13.39	13.41	13.42	13.38	13.37	13.39	0.16

表 2 不同成熟期的番茄其类胡萝卜素含量的动态变化

Table 2 Dynamic change of carotenoids contents in tomato during its ripening course($n=5$) $\mu\text{g}/\text{g}$

组分 Component	青果期 Blue stage	白果期 White stage	橙果期 Orange stage	红果期 Red stage	紫红果期 Purple stage
番茄红素 Lycopene	0.00	0.74	3.90	21.18	30.72
β -胡萝卜素 β -Carotene	1.58	1.26	3.49	5.14	8.48



(a) 青果期 Blue stage; (b) 白果期 White stage; (c) 橙果期 Orange stage; (d) 红果期 Red stage; (e) 紫红果期 Purple stage.

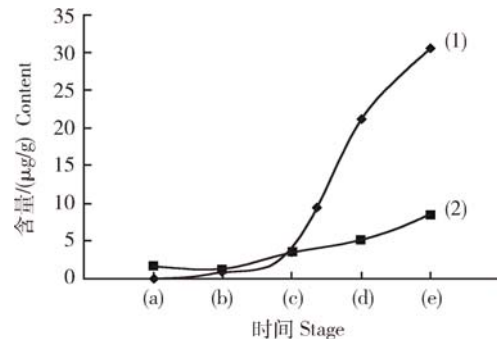
图 4 不同成熟期样品类胡萝卜素的 HPCE 图谱

Fig. 4 β -Carotene HPCE fingerprints of samples during its ripening course

2.5.3.3 结果分析

番茄红素的形成、积累受果实发育过程中一系列类胡萝卜素合成基因的表达水平调控。在番茄成熟过程中,合成番茄红素上游基因的 mRNA 表达水平提高,而向下游 β -胡萝卜素等转化酶基因的 mRNA 表达水平下降,因此番茄红素含量逐渐升高。

在果实从青果期向白果期转变的过程中, β -胡萝卜素含量略有下降,可能是因为番茄红素的合成消耗了 β -胡萝卜素合成的前体。此外,由青果期向



(a) 青果期 Blue stage; (b) 白果期 White stage; (c) 橙果期 Orange stage; (d) 红果期 Red stage; (e) 紫红果期 Purple stage.
1: 番茄红素 lycopene ; 2: β -胡萝卜素 β -carotene.

图 5 番茄后熟过程中类胡萝卜素的含量变化曲线

Fig. 5 Curve of carotenoids contents in tomato during its ripening course

白果期转变的过程中,叶绿素的降解也同样导致番茄中光合产物的积累量下降。但达到一定程度后,合成 β -胡萝卜素上游基因的 mRNA 表达水平提高, β -胡萝卜素含量又逐渐恢复并上升。

3 结论

本研究首次采用 HPCE 对类胡萝卜素进行研究,建立了 HPCE 定性、定量研究番茄中番茄红素和 β -胡萝卜素等类胡萝卜素的方法。在最佳 HPCE 条件下,类胡萝卜素提取液在 16 min 内可以得到较好的分离。

对不同成熟期的番茄进行研究,结果表明:在番茄成熟过程中番茄红素的含量逐渐增加, β -胡萝卜素的含量先下降后上升,2 种类胡萝卜素的含量均在果实完全成熟时达到最高。

与 HPLC 相比,HPCE 具有灵敏度高、时间短、用量少和检测范围广等优点。本研究扩展了《中华药典》中 HPCE 的应用范围,丰富了番茄成熟过程中生理代谢的内容,为类胡萝卜素的深入研究奠定了实验基础和理论依据。

参 考 文 献

[1] 姜建国,王飞,陈倩. 类胡萝卜素功效与生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2008:55-63
 [2] Cao Y H, Wang Y, Yuan Q. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis [J]. Chromatographia, 2004, 59: 135-140
 [3] 卢红梅,梁逸曾. 高效液相色谱法测定食物中的类胡萝卜素

- [J]. 色谱, 2005, 23(1): 57-62
- [4] 赵文恩, 黄进勇, 王文峰, 等. 类胡萝卜素与二氧化氮自由基(NO_2^\cdot)的反应[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(3): 556-558
- [5] 齐国鹏, 赵锁奇. 超临界流体色谱分析番茄红素[J]. 分析化学, 2002, 30(12): 1477-1480
- [6] Bai N S, He K, Zhou Z, et al. Flavonoids from *Rabdosia rubescens* exert anti-inflammatory and growth inhibitory effect against human leukemia HL-60 cells [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122: 831-835
- [7] Solar A, Usenik V. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut [J]. *Plant Science*, 2006, 170: 453-461
- [8] 伊爱芹, 陈媛梅, 郑彩霞. 高效毛细管电泳法测定加杨叶芦丁含量的动态变化[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(6): 9-12
- [9] 陈义. 毛细管电泳技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 23-58
- [10] Heck J M L, Oliemanb C, Schenninkc A, et al. Estimation of variation in concentration, hosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis[J]. *Int Dairy J*, 2008, 18: 548-555
- [11] 童敬, 饶钦雄, 郭平, 等. 猪饲料中 3 种大环内酯类药物的高效毛细管电泳 (HPCE) 检测方法[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(1): 117-122
- [12] 韦寿莲, 莫金垣. 高效毛细管电泳分离/电导检测麻黄碱和伪麻黄碱[J]. 高等学校化学学报, 2003, 31(2): 225-228
- [13] Flora S J. Role of free radicals and antioxidants in health and disease[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 53: 1-2
- [14] 李媛, 陈媛梅, 郑彩霞. 高效毛细管电泳法测定毛白杨雄花芽中的 IAA 与 GA_3 [J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 128-132
- [15] 程林丽, 安洪泽, 沈建忠, 等. 牛奶中 4 种阿维菌素类药物的高效液相色谱快速测定[J]. 中国农业大学学报, 2010, 15(4): 95-98
- [16] Deng B Y, Kang Y H, Li X F, et al. Determination of erythromycin in rat plasma with capillary electrophoresis detection of tris (2, 2- bipyridyl) rut henium (II) [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 857: 136-141
- [17] 杜为民, 郑彩霞, 邓文红, 等. 高压液相色谱法测定番茄果实中的 α -、 β -胡萝卜素和番茄红素[J]. 食品工业科技, 2006, 11(7): 194-195
- [18] Li J W, Fan L P, Ding S D, et al. Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube[J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(2): 454-460
- [19] 李林霞, 崔耀文, 沈建忠, 等. 猪肉中莫西克汀残留高效液相色谱-荧光检测方法的建立[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(1): 84-87
- [20] Hu M, Hu C Q. Identification of the components of 16-membered macrolide antibiotics by LC/MS [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 535: 89-99

责任编辑: 袁文业