

HPLC 测定网纹甜瓜类胡萝卜素含量方法研究

沈波¹, 楼志华¹, 谢小波², 徐静珊¹, 王琪¹, 张跃建²

(1. 杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036 2. 浙江省农业科学院 园艺研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 建立了应用高压液相色谱法检测网纹甜瓜果实类胡萝卜素成分的方法, 并比较了 5 种不同的提取溶剂系统对类胡萝卜素含量测定的影响。

关键词: 网纹甜瓜; 类胡萝卜素; 高压液相色谱

中图分类号: S 652.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0054-03

甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 是葫芦科甜瓜属 1a 生蔓性草本植物, 果实香甜, 富含人体所需的糖、维生素、有机酸及矿物质等^[1]。研究表明甜瓜中含有丰富的类胡萝卜素, 其含量和组成不仅与甜瓜果肉颜色密切相关, 而且在增加人体免疫力、预防心血管疾病和防癌抗癌等药用保健特性方面起着重要的作用^[2,3]。

类胡萝卜素类化合物是一类天然化合物, 通常是指 C40 的碳氢化合物 (胡萝卜素) 和它们的氧化衍生物 (叶黄素) 两大类色素的总称。前者常见的有番茄红素和 β 、 γ -胡萝卜素, 其特点是溶于石油醚, 多数都具有 CH 化学式。后者为叶黄素, 亦称胡萝卜醇, 是胡萝卜素的非酸性氧衍生物, 含氧基团有羟基、酮基、醚基、环氧基和类呋喃基, 主要包括隐黄质、玉米黄质、叶黄素、辣椒红等^[2,4]。目前, 类胡萝卜素的分析研究已取得很大进展, 至今已发现超过 600 种天然的类胡萝卜素。然而由于提取溶剂系统和检测方法的不同以及水果蔬菜品种、收获季节、成熟度、保存条件等样品本身的差别, 对同种样品材料的类胡萝卜素的分析结果往往存在很大的差异^[7]。为进一步研究提取溶剂系统对类胡萝卜素分析检测的影响, 采用 5 种不同的提取溶剂进行网纹甜瓜类胡萝卜素含量的测定分析, 以期获得适合甜瓜类胡萝卜素含量测定分析的提取溶剂系统和 HPLC 测定方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以浙哈 1 号网纹甜瓜作为材料, 2007 年 8~11 月种植于浙江省湖州市南太湖农业高科技园区的生产大棚,

单蔓整枝, 1 株 1 瓜。成熟后取果实若干, -75°C 保存待测。

1.2 仪器和试剂

采用 Waters 公司高效液相色谱仪, 2487 型双波长紫外检测器, 717 型进样器, 600 型控制器。色谱柱为 Symmetry C18, $5\ \mu\text{m}$ ($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$), 进样量: 10 μL , 柱温: 30°C , 设定波长为 450 nm。

试验所用氯仿、石油醚、乙酸乙酯、丙酮为国产分析纯, 标准品 β -胡萝卜素、番茄红素、叶黄素为 sigma 公司生产的色谱纯, 甲醇、乙腈、异丙醇为 TEDIA 公司生产的色谱纯。

1.3 样品类胡萝卜素提取溶剂及方法

称取甜瓜果肉 2 g, 液氮研磨后加入 10 mL 提取试剂 (分别为氯仿、石油醚-丙酮、石油醚、乙酸乙酯和乙酸乙酯-丙酮), 震荡提取 5 min 后静止, 重复提取 1 次。将提取液倒入离心管中, 8 000 rpm 冷冻离心 15 min, 除去提取液中的固形物, 取上清液, 重复离心操作 1 次。取上清液用于 HPLC 分析。

1.4 类胡萝卜素标准溶液的制作

3 种类胡萝卜素标准品 β -胡萝卜素、番茄红素、叶黄素, 用丙酮溶解后, 分别配制成 100 mg/L 的标准液。使用前配制成 0.1~1.4 mg/L 的工作溶液。

2 结果与分析

2.1 流动相的确定和标准液的测定

在色谱条件的探讨上, 流动相的选择是关键。为此在试验中设计了 4 种流动相: ① 乙腈; ② V(乙腈): V(异丙醇) = 40:60; ③ 采用梯度洗脱, 起始时 V(乙腈): V(异丙醇) = 85:15, 8 min 后流动相配比改为 60:40, 18 min 后变化为 50:50; ④ 采用梯度洗脱, 起始时流动相 V(乙腈): V(异丙醇): V(甲醇) = 65:15:20, 12 min 后流动相配比改为 30:50:20, 25 min 后恢复 65:15:20 的配比。

图 1 为 4 种流动相在 450 nm 下的类胡萝卜素混合标样 (β -胡萝卜素、番茄红素、叶黄素) 的 HPLC 图谱。由

第一作者简介: 沈波 (1965), 男, 浙江象山人, 博士, 教授, 现主要从事植物生理学研究工作。E-mail: bshen65@hzncnc.com.

通讯作者: 张跃建 (1963), 男, 浙江龙游人, 本科, 副研究员, 现主要从事甜瓜育种研究工作。E-mail: zhang292001@yahoo.com.cn.

基金项目: 杭州市高校重点实验室科技创新资助项目 (20070232H11)。

收稿日期: 2009-06-20

于 β -胡萝卜素极性最弱,所以一般最后才出峰。从图1A可看出, β -胡萝卜素未被洗脱下来,且基线噪声过大,为此要增加流动相的洗脱能力,将流动相调整为②,增加了弱极性的异丙醇。可看出洗脱能力明显增强(图1B), β -胡萝卜素顺利的被洗脱下来,保留时间为10.32 min。但是 β -胡萝卜素、番茄红素、叶黄素3种物质的极性差异较大,为了能使3种物质在同一条件下同时检测分析,并尽可能的减少分析的时间,为此采用梯度洗脱方法,并调整乙腈和异丙醇的比例(流动相③)。如图1C所示,3种物质可以得到较好的分离, β -胡萝卜素、番茄红素、叶黄素的保留时间分别为22.36、18.11、6.05 min,同时整个分析时间控制在0.5 h内。但该试验分析的主要物质 β -胡萝卜素由于可能存在异构体而具有较大的干扰,分离度不佳。需要进一步的调整流动相。在流动相④中,通过加入甲醇来改善流动相的选择性,从而提高 β -胡萝卜素异构体间的分离度(图1D),此时 β -胡萝卜素的分离效果明显改善,基线分离,时间缩短,达到分离检测要求。

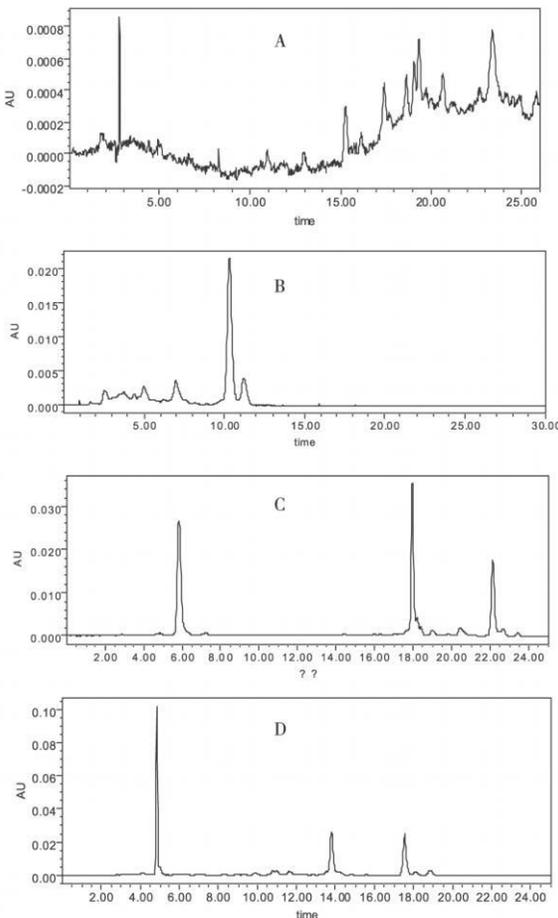


图1 不同流动相条件下类胡萝卜素标准液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of carotenoid standards under different mobile phase

2.2 线性范围

在确定的最佳流动相条件下,对不同浓度的 β -胡萝卜素、番茄红素、叶黄素标准溶液进行HPLC测定分析。以质量浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标作图(图2)。结果显示,在0.1~1.4 mg/L的浓度范围内线性关系良好, β -胡萝卜素、叶黄素和番茄红素的相关系数分别为0.9998、0.9992和0.9716。

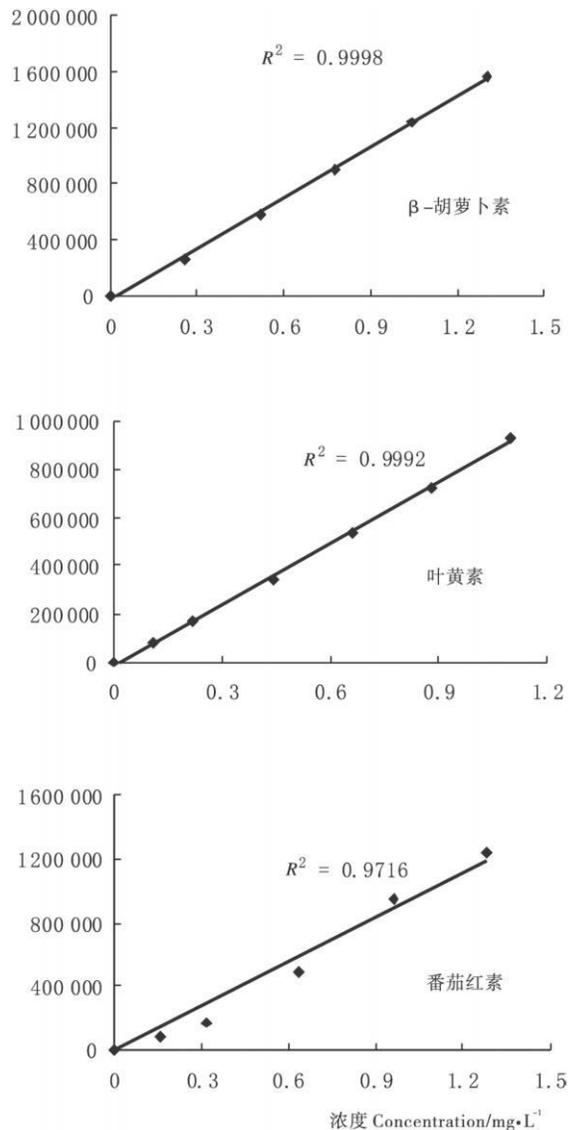


图2 类胡萝卜素标准品浓度(mg/L)与色谱峰面积的关系

Fig. 2 Correlation between carotenoid standards concentration and peak areas

2.3 不同提取溶剂对类胡萝卜素含量的影响

取2 mL甜瓜提取液,用微孔过滤膜过滤后进行甜瓜类胡萝卜素含量的HPLC分析(图3)。从图3可知在甜瓜样品中未检测到叶黄素和番茄红素含量,仅有 β -胡萝卜素。对不同提取溶剂系统获得的甜瓜样品提取液的HPLC分析(图4)显示,采用石油醚-丙酮作为提取

溶剂时,测定的β-胡萝卜素含量最高,为0.21 mg/L,其次分别为乙酸乙酯、氯仿和乙酸乙酯-丙酮,在相同条件下,石油醚的提取效果最差。

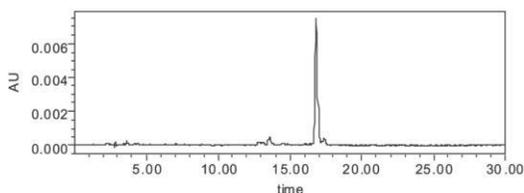


图3 网纹甜瓜样品中的β-胡萝卜素色谱图

Fig.3 Chromatogram of β-carotene in netted melon sample

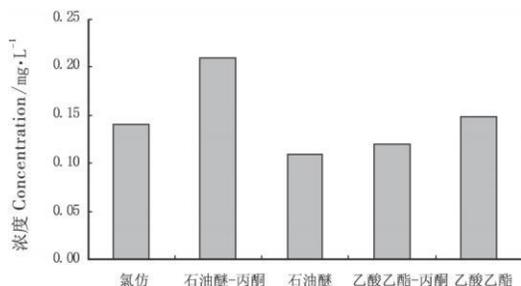


图4 不同提取溶剂测定的甜瓜β-胡萝卜素浓度

Fig.4 β-carotene concentration of netted melon under different extraction solvent

3 讨论

以石油醚-丙酮作为网纹甜瓜的提取溶剂,能把极性较强的类胡萝卜素较好地提取出来。充分的研磨以及重复提取可提高色素的提取效率。结果显示,采用石油醚-丙酮作为提取溶剂时,所获得的β-胡萝卜素含量最高。研究表明,不同的水果蔬菜含有的类胡萝卜素成分和含量差异较大,且较单一^[8],这与该试验网纹甜瓜浙哈1号中没有检测到叶黄素和番茄红素的结果是一致的,说明它们的含量极低而检测不出。

参考文献

[1] 马克奇,陈年来,王鸣.甜瓜优质栽培理论与实践[M].北京:中国农业出版社,2001.

[2] 惠伯棣.类胡萝卜素化学及生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2005.

[3] 李炜,蔺定运.厚皮甜瓜果肉颜色与类胡萝卜素关系的研究[J].西北农业学报,1997,6(1):65-68.

[4] Rodriguez-Amaya D B. Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables[J]. Journal of Food Composition and Analysis 2000, 13: 641-647.

[5] Bartley G E, Scolnik P A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health[J]. Plant Cell, 1995, 7: 1027-1038.

[6] 韩雅珊.类胡萝卜素的功能研究进展[J].中国农业大学学报,1999,4(1):5-9.

[7] 康保珊,赵文恩,焦凤云,等.不同提取溶剂系统对类胡萝卜素总量的影响[J].食品工业科技,2007,28(1):84-86.

[8] 陶俊,张上隆,徐建国,等.柑橘果实主要类胡萝卜素成分及含量分析[J].中国农业科学,2003,36(10):1202-1208.

Study on Method of Carotenoid Content in Netted Melon by HPLC

SHEN Bo¹, LOU Zhi-hua¹, XIE Xiao-bo², XU Jing-shan¹, WANG Qi¹, ZHANG Yue-jian²

(1. College of Life and Environmental Sciences Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036, China; 2. Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China)

Abstract: The high performance liquid chromatographic method had been established to determine carotenoid contents in netted melon at present paper. Meanwhile, the effect of five different extraction solvent systems on carotenoid contents measured was compared.

Key words: Netted melon; Carotenoid; HPLC

温室蔬菜可利用大葱除菌防病

大葱是百合科,2年生、耐寒且适应性强的蔬菜。大葱叶片可挥发具有辛辣气味的硫化丙烯,其根系能分泌杀菌物质,两者能有效地抑制空气和土壤中的多种病原菌传播、侵染或杀死病原菌,使蔬菜植株的发病率,明显下降。

用栽植过大葱的土壤配制床土:配制床土一般选用田土,最好选择栽植过大葱的土壤。如果没有栽植过大葱的土壤,则把田土运进温室内,铺成15cm厚,栽植大葱,待大葱生长1个月左右,就可拔出大葱,用其土配制床土,这样能

减少育苗期土传病害的发生。

育苗温室内多栽大葱:在温室育苗期间,尽可能利用温室内四周及空地,多栽植大葱。密闭良好的温室,早晨进入温室时,若能嗅到辛辣的硫化丙烯气味,杀菌效果较好。