

文章编号:1671-6833(2016)05-0043-04

高速逆流色谱法分离红色西瓜瓢粗提物中番茄红素

阮宝玉^{1,2}, 赵文恩¹

(1. 郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001; 2. 食品工业学院 食品工业系, 越南 岘港)

摘要:应用高速逆流色谱法(HSCCC)从红色西瓜瓢粗提取物中分离番茄红素. 在超声波作用下以 $v_{\text{石油醚}}:v_{\text{丙酮}}=2:1$ 作为提取溶剂,从400 g成熟西瓜瓢匀浆中提取粗制番茄红素,至所有色素提取出. 然后用 $v_{n\text{-正己烷}}:v_{\text{乙醇}}:v_{\text{二氯甲烷}}=20:12:7$ 构成的两相溶剂系统进行制备高速逆流色谱分离,从约223 mg粗提物中得到约30 mg番茄红素. 用峰面积归一化法计算,产品纯度为98.3%.

关键词:番茄红素;分离;高速逆流色谱法;西瓜

中图分类号:TS207.3; TS202.3 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1671-6833.2016.05.009

0 引言

番茄红素是具有最强单线态氧和过氧自由基清除活力的一种类胡萝卜素^[1],它能防止过氧亚硝基介导的细胞修饰作用,也能降低因接触过氧化剂引起的脂质过氧化和氧化性DNA损伤^[2]. 流行病学、组织培养和动物研究提供的令人信服证据都表明,番茄红素可防止慢性病发生,有对抗包括前列腺癌和肺癌等广谱癌症的化学防治效果,可降低心血管疾病的发生率,在与炎症关联的几种疾病模型上显示出抗炎效应,对降低骨质疏松和包括阿尔茨海默氏症的神经退行性疾病危险都有健康有益作用^[3-4]. 目前,番茄红素不仅被广泛用于医药、食品和饮料工业(作为食品着色剂),还在化妆品配方中使用. 同时在膳食补充品、功能食品和化学分析领域对高纯度番茄红素的需求日益增加.

番茄红素存在于番茄、红瓢西瓜、红柚、番石榴和木鳖果中,它通常由番茄及其制品中分离和提纯获得^[5,6]. 但是已有报道商品红瓢西瓜中番茄红素达45.1~53.2 $\mu\text{g/g}$ 鲜重(fw),平均含量为48.2 $\mu\text{g/g}$ fw,这比报道的番茄中番茄红素的含量(平均含量30.2 $\mu\text{g/g}$ fw)要高60%^[7]. 最近研究表明,美国50个商品级品种的红瓢西瓜中番茄红素的含量为33~100 mg/kg fw,绝大多数有籽杂交种的平均番茄红素含量为50~70 mg/kg fw. 无籽类型的番茄红素含量高的为70~

90 mg/kg fw,极高的超过90 mg/kg fw^[8]. 由此可见,西瓜是一种提取纯化番茄红素极好的原料.

HSCCC是一种高效分离包括类胡萝卜素在内多种天然产物的技术^[9-11]. 作为一种液-液分配色谱术,HSCCC能避免由于在固定相上不可逆吸附而导致的样品损失或变性,从而有较高的天然产物分离效能和优秀的产物回收率. HSCCC已成功用于从番茄酱中分离番茄红素^[12-14],但对用HSCCC从西瓜中分离番茄红素至今未见有报道,本试验用HSCCC从西瓜瓢的粗提取物中分离番茄红素.

1 试验部分

1.1 仪器

本研究使用TBE-300B高速逆流色谱仪(上海同田生物技术有限公司,中国上海). 仪器装有3个制备型的聚四氟乙烯螺旋分离柱(内径1.6 mm,总容积300 mL)和一个20 mL的进样环路. β 值($\beta=r/R$,其中 r 是从分离柱到支架轴的距离, R 是旋转半径即旋转器的夹持器轴和中心轴之间的距离)从内部端口的0.47变化到外部端口的0.73. 转速0~1 000 r/min可调. 系统装有一个TBP5002泵(流速为:0.1~50 mL/min;增量:0.5 mL/min;压力范围:0~2 MPa). HSCCC系统还配有S型的恒流泵和8823B的UV-Vis检测器(北京新技术研究所),在波长450 nm下监测,运用N2000软件. 通过HX 1050恒温循环仪(张江高科技园区,中国上海)调整实验温度.

收稿日期:2016-04-01;修订日期:2016-06-14

作者简介:阮宝玉(1979—),男,越南岘港人,郑州大学博士研究生,主要从事食品化学研究,E-mail:ngbangoc@yahoo.com.

1.2 试剂

高效液相色谱分析用色谱级的乙腈和甲醇为天津四友精细化学品有限公司产品, HSCCC 用其他有机溶剂为国产分析纯级, 氯仿经纯化后用于高效液相色谱分析。

1.3 红瓢西瓜番茄红素粗提物的制备

按文献[15]的方法稍加修改提取番茄红素粗提取物。为防止提取时番茄红素降解和异构化, 使用棕色玻璃仪器, 提取过程在弱光下进行。取 400 g 成熟西瓜瓢匀浆, 超声波作用下以 $v_{\text{石油醚}}:v_{\text{丙酮}}=2:1$, 按固液比约 1:3 (g/mL) 提取至瓜瓢所有颜色除去。提取物用布氏漏斗抽滤。合并滤液并转移至分液漏斗, 用 250 mL 蒸馏水洗涤 3 次, 洗出水溶物。排出水相, 再用 100 mL 蒸馏水洗涤有机相。在低于 35 °C 下将有机相旋蒸至干, 干燥物在零下 80 °C 的氮气中保存。

1.4 两相溶剂系统和样品液的制备

无固相支持物, 溶质的保留完全取决于其在相互平衡的两相体系之间的分配比率, 即分配系数 K 。 K 值通过分离漏斗的分配实验获得, 依据公式 $K = C_{\text{固定相}}/C_{\text{流动相}}$ 计算获得。在前期实验的基础上, 本分离纯化选用由 $v_{n\text{-正己烷}}:v_{\text{乙腈}}:v_{\text{二氯甲烷}}=20:12:7$ 构成的两相溶剂系统。在使用前室温下用力摇动分液漏斗 2 min 以使混合溶剂彻底平衡, 然后静置 2 h, 两相溶剂分开。样品液是将红瓢西瓜粗提取物溶于 HSCCC 溶剂系统的下相获得, 15 mL 样品溶液中含有约 223 mg 番茄红素粗品。

1.5 高速逆流色谱分离过程

HSCCC 以反相模式运行。在固定相(上相)填充柱子之后, 开启逆流分配系统开关, 然后以 850 r/min 转速运行装置, 这时将流动相(下相)以 1.5 mL/min 的流速泵入柱子首端。为实现色素的有效分离, 在流体动力平衡建立后立即将溶于下相中的样品通过注射器经由进样器注入柱中。柱温设定为 25 °C, 用 UV-Vis 检测器在 450 nm 下连续监测柱子的流出液, 收集峰值部分流出液, 以获得番茄红素。

1.6 高效液相色谱法(HPLC)对 HSCCC 样品的分析

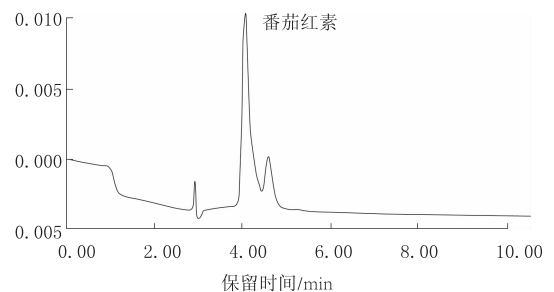
高效液相色谱分析在配有 1525 泵和 2998 光电二极管阵列检测器的 Waters 液相色谱系统上进行, 用 Empower Software (Waters) 进行数据分析。将 10 μL 溶于流动相的样品经 0.45 mm 的膜过滤后注射入高效液相色谱柱 (Water Spherisorb 5 μm ODS2 4.6 \times 250 mm)。对第一轮和第二轮 HSCCC 收集产物分析时使用的流动相为 $v_{\text{乙腈}}:v_{\text{甲醇}}:v_{\text{氯仿}}=7:2:1$, 进行产物纯度分析和鉴别时使用的新流动相为 $v_{\text{乙腈}}:v_{\text{甲醇}}:v_{\text{氯仿}}=5:3:2$ 。流速为

1.0 mL/min。

2 结果与讨论

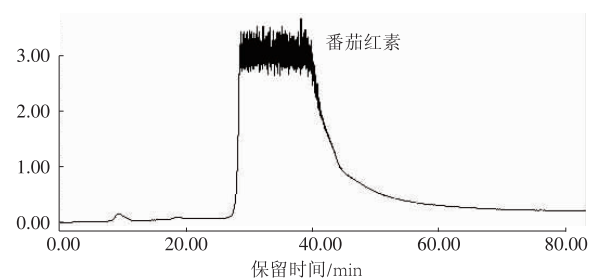
在将红瓢西瓜色素粗提取物溶于流动相后进行 HPLC 分析, 红瓢西瓜的色素主要为番茄红素。图 1 是 HPLC 分析的红瓢西瓜色素粗提取物的色谱图。由于 2 min 保留时间之前的吸收干扰, 依 450 nm 处吸收得到的总峰面积计算得出的粗提取物中只含有 47.6% 的番茄红素。

红色西瓜瓢的色素粗提取物直接用来进行 HSCCC 分离如图 2 所示。合适的非水性两相溶剂系统是利用 HSCCC 达到纯化的关键点, 参考高效液相法分析类胡萝卜素最常用溶剂, 并避免使用毒性较大的氯仿, 选择 n -正己烷、乙腈和二氯甲烷 3 种溶剂。经多次 HSCCC 分离试验, 发现体积比为 20:12:7 的 n -正己烷:乙腈:二氯甲烷溶剂系统可达到理想的番茄红素分离效果。正如图 2 在 450 nm 吸收所示, 随着 HSCCC 分离操作的进行番茄红素得到分离纯化, 主峰包括几乎全部目标化合物番茄红素。



HPLC 条件: 色谱柱: Water Spherisorb 5 μm ODS2 4.6 \times 250 mm; 流动相: 乙腈/甲醇/氯仿 (7:2:1, $v/v/v$); 流速: 1.0 mL/min。

图 1 红瓢西瓜色素粗提取物在 450 nm 处的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of the crude extract from red watermelon flesh detected at 450 nm

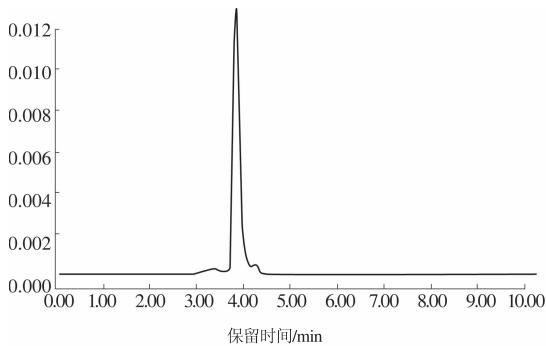


HSCCC 条件: 溶剂系统: n -己烷/乙腈/二氯甲烷 (20:12:7, $v/v/v$); 流速: 1.5 mL/min; 转速: 850 rad/min。

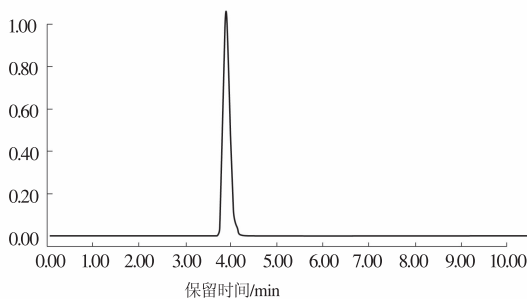
图 2 制备 HSCCC 对红瓢西瓜色素粗提取物中番茄红素的分离

Fig. 2 Lycopene isolation of the crude extract from red watermelon flesh by preparative HSCCC separation

经过两轮 HSCCC 可从 400 g 红西瓜瓤中获得约 223 mg 粗提物,进而得到约 30 mg 番茄红素.用 HPLC 对 HSCCC 分离的产物进行纯度鉴别,如图 3(a)所示,第一轮 HSCCC 后所得番茄红素产物纯度是 87%.为得到更高纯度的番茄红素制品,通过进行第二轮 HSCCC 将第一轮 HSCCC 的产物做进一步分离,所得番茄红素产物的纯度提高到 98.3% (图 3(b)),条件与图 1 相同.



(a) 第一轮 HSCCC 分离的番茄红素产物 HPLC 色谱图



(b) 第二轮 HSCCC 分离的番茄红素产物 HPLC 色谱图

图 3 HSCCC 分离的番茄红素产物 HPLC 色谱图

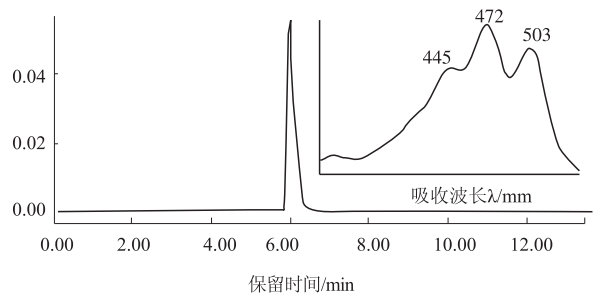
Fig. 3 HPLC chromatogram of lycopene product isolated by first run (a) and second run (b) of HSCCC.

HPLC 分析使用新的流动相之后,第二轮 HSCCC 分离得到的番茄红素样在 HPLC 色谱图上显示的仍是单一峰(图 4(a)),而从 Sigma 公司购置的番茄红素标样的纯度显示仅 94.05% (图 4(b)).此外,对 HSCCC 分离得到的纯度 98.3% 番茄红素样进行鉴别,其在 HPLC 色谱图上的保留时间(RT)与标样一致,光谱学数据(图 4(a)插入图,最大吸收三峰波长为 445、472、503 nm; % III/II = 65)与文献记载的数据完全一致^[16],进一步证实了样品的番茄红素属性.

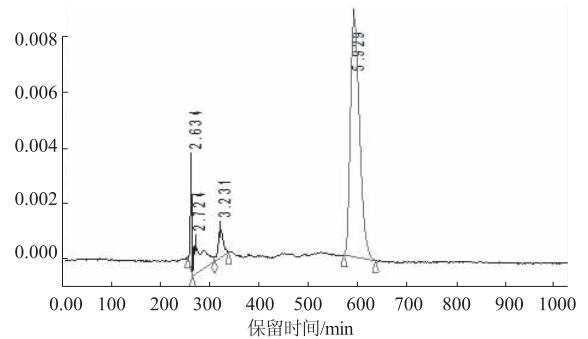
3 结论

本试验为首次采用 HSCCC 从红色西瓜瓤粗提取物分离获得番茄红素,通过使用确定的 $v_{n-正己烷}:v_{乙腈}:v_{二氯甲烷} = 20:12:7$ 两相溶剂系统获得纯度为 98.3% 番茄红素,该方法对用于从其他富

含番茄红素水果中分离高纯度番茄红素具有很好的指导借鉴意义.



(a) HSCCC 分离的番茄红素 HPLC 色谱图



(b) 购买的番茄红素标样 HPLC 色谱图

图 4 用新流动相 ($v_{乙腈}:v_{甲醇}:v_{氯仿} = 5:3:2$) 分析的番茄红素样 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of lycopene analysed using new HPLC flow phase (acetonitrile: methanol: chloroform (5:3:2))

参考文献:

- [1] ERDMAN J W, FORD N A, LINDSHIELD B L. Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function[J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 483 (2): 229 - 235.
- [2] KIM J Y, LEE J S, HAN Y S, et al. Pretreatment with lycopene attenuates oxidative stress-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells [J]. Biomol Ther, 2015, 23 (6): 517-524.
- [3] WANG Y, CUI R, XIAO Y, et al. Effect of carotene and lycopene on the risk of prostate cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies[J]. PLoS ONE, 2015, 10 (10): e0140415.
- [4] MCENENY J, WADE L, YOUNG I S, et al. Lycopene intervention reduces inflammation and improves HDL functionality in moderately overweight middle-aged individuals [J]. J Nutr Biochem, 2013, 24 (1): 163 - 168.
- [5] POOJARY M M, PASSAMONTI P. Optimization of extraction of high purity all-trans-lycopene from tomato pulp waste [J]. Food Chem, 2015, 188: 84-91.
- [6] NAVIGLIO D, CARUSO T, IANNECE P, et al. Charac-

- terization of high purity lycopene from tomato wastes using a new pressurized extraction approach [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(8): 6227 - 6231.
- [7] USDA-NCC. Carotenoid Database for US Foods 1998 [Online]. Available: www.nal.usda.gov/fric/food-comp/ [2001].
- [8] PERKINS P, COLLINS J K, DAVIS A R, et al. Carotenoid content of 50 watermelon cultivars [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(7): 2593 - 2597.
- [9] AMAN R, CARLE R, CONRAD J, et al. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1074(1/2): 99-105.
- [10] BALDERMANN S, REINHARD A, KOHLER N, et al. Application of high-speed counter-current chromatography for the isolation of 9-cis-neoxanthin from fresh spinach [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1151(1/2): 183 - 186.
- [11] SKALICKA-WOZNIAK K, GARRARD I. Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed [J]. *Phytochem Rev*, 2014, 13: 547 - 572.
- [12] WEI Y, ZHANG T, XU G, et al. Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of lycopene from crude extract of tomato paste [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 929(1/2): 169 - 173.
- [13] BALDERMANN S, ROPPETER K, KOHLER N, et al. Isolation of all-trans lycopene by high-speed counter-current chromatography using a temperature-controlled solvent system [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1192(1): 191 - 193.
- [14] 姚佳, 蒲彪. 番茄红素提取工艺及检测方法的研究进展 [J]. *食品与发酵科技*, 2010, 46(3): 18 - 21.
- [15] KANG B, ZHAO W, HOU Y, et al. Expression of carotenogenic genes during the development and ripening of watermelon fruit [J]. *Sci Hort*, 2010, 124(3): 368 - 375.
- [16] BRITTON G, LIAAEN-JENSEN S, PFANDER H. *Carotenoids handbook* [M]. Basel: Birkhäuser, 2004.

Isolation of Lycopene from the Crude Extract of Red Watermelon Flesh by High-speed Counter-current Chromatography

RUAN Baoyu^{1,2} ZHAO Wenen¹

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Faculty of Food Industry, College of Food Industry, Danang, Vietnam)

Abstract: High-speed counter-current chromatography (HSCCC) was applied to the isolation of lycopene from the crude lycopene extract of red watermelon flesh. The crude lycopene extract was obtained from the homogenized flesh of ripened fruit extracted with petroleum ether and acetone (ratio 2:1, *v/v*) under supersonic wave conditions. The preparative high-speed counter-current chromatography with a two-phase solvent system composed of *n*-hexane: acetonitrile: dichloromethane (20:12:7, *v/v/v*) was performed obtaining lycopene with a purity of 98.3% from the crude extract.

Key words: lycopene; isolation; high-speed counter-current chromatography; watermelon