

超声波强化提取 RP-HPLC 法测定 β -胡萝卜素熊科¹, 夏延斌¹, 刘蓉²

1(湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙, 410128); 2(湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙, 410128)

摘 要 在结合国内外研究成果的基础上, 采用超声强化样品前处理同时对液相色谱的分离条件进行优化。超声提取条件: 温度 30℃, 样品: 溶剂=1:15(质量与体积或体积与体积之比) 避光提取(30 min+15 min)2 次; 色谱条件为色谱柱: (Inertsil ODS-3, C_{18} 反相柱, 4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: V(甲醇): V(三氯甲烷)=65:35; 紫外检测器波长 450 nm; 流速 1.2 mL/min; 柱温 30℃。结果表明, 该方法具有提取率高、操作时间短、溶剂用量少、灵敏度高、准确度和可靠性强等优点。

关键词 β -胡萝卜素, 超声提取, 反相液相色谱

大量研究证实, β -胡萝卜素的许多生物功能与人类健康有密切关系, 其在抗氧化、解毒、抗癌、预防心血管疾病、防治白内障和保护肝脏方面的生理作用已被越来越多地证实并应用于疾病的预防和治疗^[1-5]。

目前, β -胡萝卜素的测定方法主要有分光光度法^[6]、薄层色谱法^[7]、纸层析法^[8]和高效液相色谱法(HPLC)^[9]等。前 3 种方法过程复杂, 精密度差, 一般用于测定类胡萝卜素总量。而 HPLC 法因其具有分离效果好、选择性强、检测灵敏度高、分离速度快等优点, 已成为 β -胡萝卜素的主要分析检测方法。但目前相关测定方法中样品前处理过程多采用溶剂抽提和浸提^[10], 时间长、效率低、过程较复杂。本文在结合国内外研究成果的基础上, 采用超声强化样品前处理同时对液相色谱的分离条件进行优化, 使该提取检测方法体系具有提取率高、操作时间短、溶剂用量少, 检测简便快捷、灵敏度高、准确度高等优点。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器及试剂

高效液相色谱仪(Agilent 1100 series), 检测器(VWD 紫外检测器 Agilent G1316A), KQ3200DE 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司), 纯水机(Hi-tech instruments Co. Ltd.), 紫外可见分光光度计(UV-2800 尤尼柯仪器有限公司), RE52-3 型旋转蒸发器(上海沪西分析仪器有限公司), 隔膜真空泵 GM-0.33II(天津市腾达过滤器件厂), FW177 中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), ZK 高速自控组织捣碎(江苏省盐城科学仪器厂)。

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2007-01-08; 改回日期: 2007-05-11

β -胡萝卜素标准样(晶体, 95%纯度, Sigma 公司提供); 红心胡萝卜(湖南长沙市售), 所用试剂除三氯甲烷和甲醇为 HPLC 纯, 均为 AR(化学纯)。

1.2 标准品的配制

取 25 mg β -胡萝卜素标准品, 用三氯甲烷定溶于 25 mL 的棕色容量瓶中, 即为 1mg/mL 的标储液。然后进行标定。标储液充氮保存于-26℃以下的冰箱中。用时以三氯甲烷稀释至所需浓度的标准使用液。

1.3 样品提取

1.3.1 果蔬或含水分较多样品

果蔬样品于捣碎机中打碎 1~2 min, 使呈稠糊状匀浆, 取 5.0g(视 β -胡萝卜素含量可适当增加取样量)。称好样品于 100 mL 烧杯中, 按样品: 溶剂=1:15(g: mL) 加入丙酮作为提取溶剂, 同时加入 0.2g BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚), 用薄膜封口避光超声提取 30 min, 收集提取液。重复 1 次上述提取过程, 提取时间分为 15 min。将 2 次提取液合并。

1.3.2 固体样品

样品经粉碎机粉碎后过 60 目筛, 称取 1.0 g 样品。按样品: 溶剂=1:15(g: mL) 加入乙醚作为提取溶剂同时加入 0.2g BHT, 按照 1.3.1 方法提取。

1.3.3 液体油类样品

取 2 mL 样品。按 V(样品): V(溶剂)=1:15 加入乙醚作为提取溶剂, 同时加入 0.2 g BHT, 依 1.3.1 方法提取。

将上述 1.3.1、1.3.2、1.3.3 的合并液离心过滤(3 000 r/min, 10 min)。真空浓缩(水浴温度为 40℃)。用丙酮溶解定容至 10 mL 棕色容量瓶, 经 0.45 μ m 滤膜过滤后进行色谱分析。根据样品中 β -

胡萝卜含量和检测器的灵敏度,必要时可以改变稀释浓度。

1.4 谱条件

色谱柱:(Inertsil ODS-3, C_{18} 反向柱, 4.6 mm×250 mm, 5 μ m);流动相:V(甲醇):V(氯仿)=65:35;紫外检测器波长 450 nm;流速 1.2 mL/min;柱温 30℃;进样量 10 μ L。采用外标面积归一法测得样品含量。 β -胡萝卜素标准样品及样品色谱图见图 1 所示。

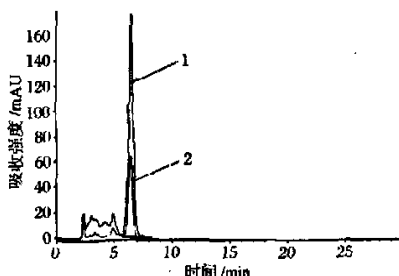


图 1 分别为 β -胡萝卜素标准品和样品中 β -胡萝卜素色谱峰

图 1 β -胡萝卜素标准样品及样品色谱图

1.5 分析方法

分别吸取标准液及样品提取液 10 μ L 注入色谱仪,以 1.4 的色谱条件进行 HPLC 分析,用标准物质谱峰的保留时间定性;用外标多点校准法,以峰面积定量。

1.6 β -胡萝卜素含量计算方法:

$$X = C \times V \times 95\% / 1000$$

式中: X 为 β -胡萝卜素含量, mg/g (mg/mL); C 为准曲线上查到的 β -胡萝卜素含量, 单位为 ng/ μ L; V 为定容体积, 单位为 mL; M 为样品质量或体积, 单位为 g 或 mL; 95%, 为 β -胡萝卜素标准样品纯度, 单

位%。同时测定或重复测定 β -胡萝卜素结果偏差绝对值 $\leq 10\%$ 。

2 结果与分析

2.1 样品预备处理条件的选择

2.1.1 提取溶剂的选择

β -胡萝卜素的提取常用石油醚、三氯甲烷、丙酮、乙醚、乙醇和乙酸乙酯以及这些溶剂按比例复合作为提取剂^[11~13]。分别对这些溶剂及其复合剂进行了考察。研究中发现,针对不同的样品条件而采用不同的提取剂有更好的效果。乙醚沸点低,溶解脂肪和脂溶性组分能力强,它能提取样品中游离态脂肪,而细胞组织内所包含的及成分中结合的脂类却不能充分提取。因此,乙醚适用于烘干磨细,不易潮解的固体样品或脂类含量高,与组织成分结合的脂类少的样品。而新鲜果蔬和含水分多的样品,采用复合提取剂并没有最佳提取效果,且有些在提取过程形成乳浊液阻碍了 β -胡萝卜素的溶出。极性的丙酮能与水混溶,同时可以使结合态脂质游离出来,所以直接采用丙酮有更很好的提取效果。

2.1.2 提取方法和条件的确定

常用的提取方法有抽提法、振荡提取法和浸提回流法等。这些方法预处理复杂,提取时间长,溶剂消耗量大。超声波强化提取有提取简单、溶剂量小和时间短的特点。以温度、物料比、时间和提取次数为提取研究因素,采用均匀试验设计进行分析,结果表明:温度控制在 30℃ 左右,按样品:溶剂=1:15(质量与体积或体积与体积之比)避光超声提取(30 min + 15 min)2 次,对 β -胡萝卜素提取有最好的效果。不同提取方法的比较结果如表 1 所示。

表 1 不同提取方法对分析结果的影响

提取方法	抽提法(6h)	抽提法(8h)	浸提回流法(8h)	振荡提取法(8h)	超声波提取法(1h)
β -胡萝卜素含量/mg·g ⁻¹	1.906 0	1.987 8	1.893 8	1.972 3	1.997 6

2.2 检测器和检测波长的选择

研究中类胡萝卜素的高效液相色谱法采用紫外检测器。它具有检测灵敏度高,检测范围宽等特点,是一种常用检测器。为了确定检测波长,将 β -胡萝卜素标液在 800~190 nm 波长范围间隔 0.2 nm,以中速进行紫外可见扫描,结果如图 2 所示。

从图 2 可以看到 β -胡萝卜素紫外吸收波长基本在 400~500 nm,在 450 nm 下有较大的吸收峰,且在此条件下杂峰对测定干扰较少,故选择 450 nm 作为

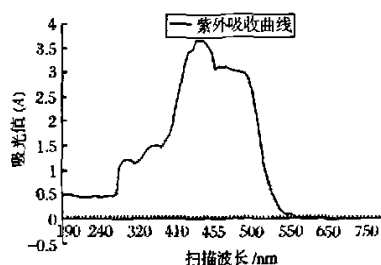


图 2 β -胡萝卜素紫外光谱特征

检测波长。

2.3 进样量的选择

研究使用的高效液相色谱仪为手动进样器,样品通过六通阀上的定量环定量注射到色谱系统中,用外标定量分析时,最好向定量环中注射大于其定量体积3倍的样品。经试验发现,当进样量为 $10\ \mu\text{L}$ 时,实验结果中保留时间的重复性,峰形和峰间分离度都较好,所以选择采用 $10\ \mu\text{L}$ 定量环进样。

2.4 色谱柱和流动相的选择

HPLC 分离类型和色谱柱的选择,主要取决于样品性质。反相 C_{18} 柱已经被广泛应用于 β -胡萝卜素的分离。本实验采用 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪,比较了4种常用色谱柱 Inertsil ODS-3, C_{18} 反相柱 ($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$), Zorbax XDB- C_{18} 反相柱 ($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$), Zorbax XDB- C_{18} 反相柱 ($4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$), Zorbax SB- C_{18} 反相柱 ($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$)。其中 Inertsil ODS-3 系列 C_{18} 反相柱金属等杂质总和的含量较低,柱压小,分离度高,可以满足 β -胡萝卜素的分离。

同时用选出的色谱柱对文献报道的几种色谱条件进行了比较研究^[14-16],结果表明:流动相为 $V(\text{甲醇}) : V(\text{氯仿}) = 65 : 35$; 紫外检测器波长 $450\ \text{nm}$; 流速 $1.2\ \text{mL/min}$; 柱温 $30\ ^\circ\text{C}$ 的色谱条件下 β -胡萝卜素峰形尖锐而且对称,与其他色素和杂质分离较好。

最后,对研究得出的超声波强化溶剂提取 RP-HPLC 检测 β -胡萝卜素的方法体系进行实际样品测定。测定色谱图如图 3(a、b、c)。

图 3(a、b、c)分别为鲜胡萝卜、胡萝卜粉和胡萝卜软胶囊中 β -胡萝卜素色谱图。

2.5 线性回归方程、线性范围和最低检出限

在 $10.0 \sim 1\ 000.0\ \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,用配制好的 $1\ \text{mg/mL}$ 的 β -胡萝卜素标准液配制一系列标准液按 1.3 的处理方法及 1.4 的色谱条件重复进样,结果如图 4 所示。

用信号峰面积(Y)和 β -胡萝卜素标准液浓度(X)进行线性回归,回归方程为 $Y = 609\ 57.751\ 3X - 783.433\ 91$,相关系数为 $R = 0.999\ 76$ 。实验结果表明, β -胡萝卜素在 $10.0 \sim 1\ 000.0\ \mu\text{g/mL}$ 浓度间呈良好的线性,最低检出限为 $5.0\ \text{ng/mL}$ 。

2.6 精密度实验

准确吸取 β -胡萝卜素标准液,用 CHCl_3 配成 $0.10\ \text{mg/mL}$ 的溶液,按 1.3 的处理方法及 1.4 的色

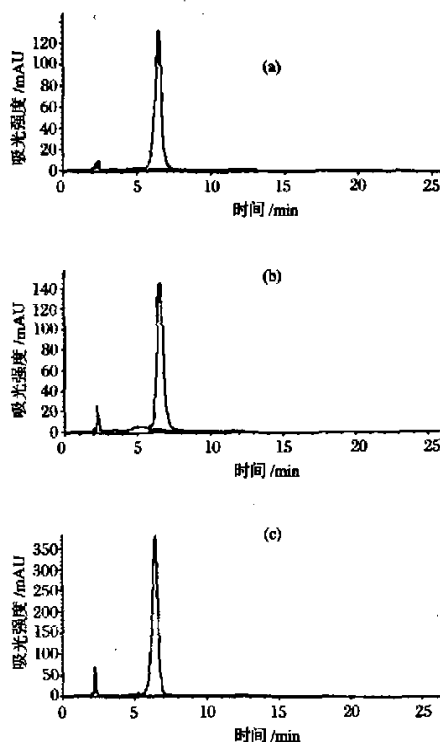


图 3 不同类型样品色谱图

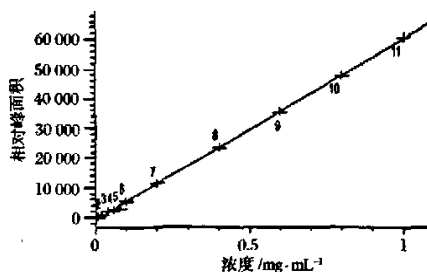


图 4 β -胡萝卜素标准曲线

谱条件重复进样,结果见表 2。

表 2 标准品精密度实验结果($n=10$)

标准品	\bar{X} 值(面积)	SE	RSD/%
β -胡萝卜素	5 082.22	12.97	0.81

取同一样品 10 份按 1.3 的处理方法及 1.4 的色谱条件重复进样进行分析,结果见表 3。

表 3 样品精密度实验结果($n=10$)

样品	\bar{X} 值(面积)	SE	RSD/%
β -胡萝卜素	3 117.10	16.16	1.64

2.7 回收率

分别取果蔬样品、固体样品和液体油样共 6 份,

分别加入 0.2mg β -胡萝卜素标样,按 1.3 的处理方法及 1.4 的色谱条件重复进样结果如表 4。

表 4 β -胡萝卜素回收率实验结果($n=6$)

取样中含量 /mg	加标量 /mg	测定含 量/mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1.318	0.2	1.502	92.0		
1.304	0.2	1.493	94.5		
2.091	0.2	2.283	96.0	95.0	2.16
1.953	0.2	2.146	96.5		
3.389	0.2	3.584	97.5		
3.944	0.2	4.131	93.5		

3 讨论

(1)研究针对样品不同的组成结构和性质,以及 β -胡萝卜素在其中的存在形式,采用不同的提取溶剂进行提取,最大限度的提高了样品提取效率。使建立的超声波强化溶剂提取 RP-HPLC 检测 β -胡萝卜素的方法体系具有普遍的适用性。

(2)研究对 β -胡萝卜素提取,采用抽提法、浸提回流法、振荡提取法和超声波提取 4 种处理方式进行比较,并考察了不同溶剂、用量及提取时间的影响。结果表明超声波提取与传统提取方式比较,具有操作简便、提取率高、提取时间短、溶剂用量少等优点。

(3)研究建立了超声波强化溶剂提取 RP-HPLC 检测 β -胡萝卜素的方法体系。此方法体系具有分析时间较短、谱图相对简单、灵敏度高、准确度和线性范围宽等特点。

参考文献

- 1 Stahl H. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants [J]. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62: 13~15
- 2 Mares-Perleman J A, Millen A E. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease(overview)[J]. *The Journal of Nutrition*, 2002, 3: 5~18
- 3 Nishino H, Tokuda H. Cancer prevention by carotenoids [J]. *Pure Apply Chem*, 1999, 12: 2 273~2 278
- 4 Peto R. Can β -carotenoid reduce human cancer rates[J]. *Nature*, 1981, 290(19): 201
- 5 Hurst W J. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*[M]. New York (Washington, D C): CRC Press LLC, 2002, 108
- 6 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 中国轻工业出版社, 2005: 90~91
- 7 Manz U. Pigmenting carotenoids analytical methods[J]. *Rochep Ublcation Index*, 1983, 64: 29~30
- 8 中华人民共和国国家标准 GB/T5009.83-2003. 食品中胡萝卜素的测定[S]
- 9 中华人民共和国国家标准 GB12389-1990. 胡萝卜素的纸层析法[S]
- 10 魏国勤. 从胡萝卜中提取 β -胡萝卜素方法的研究[J]. *南京医科大学学报*, 1995, 3: 727
- 11 陈晓熠. 优选 β -胡萝卜素提取方案与其工艺改进[J]. *保鲜与加工*, 2006, 6: 29
- 12 赵永彬, 尹明安. 不同溶剂对胡萝卜中类胡萝卜素提取的影响[J]. *安徽农业科学*, 2005, 4: 671~673
- 13 朱秀灵, 车振明, 徐伟, 等. β -胡萝卜素的生理功能及其提取技术的研究进展[J]. *现代食品工业科技*, 2004, 2: 160
- 14 张文斌, 许时婴. β -胡萝卜素微胶囊和胡萝卜汁中 β -胡萝卜素异构体的测定[J]. *粮油食品科技*, 2003, 6: 37~39
- 15 万春花, 龙洲雄, 朱筱玲, 等. 液相色谱法测定 β -胡萝卜素[J]. *食品与机械*, 2003, 2: 37
- 16 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, 1: 57~62

Research on Determination of β -carotene by Ultrasonic Extraction and RP-HPLC

Xiong Ke¹ Xia Yanbin¹, Liu Rong²

1(Food Science and Technology Academe, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

2(Gardens and Horticulture academe, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

ABSTRACT This text combines the foundation of the domestic and international research result. Besides adopting the Ultrasonic Extraction to enhance the sample handle, the experiment also optimize the condition which β -carotene can be separated from other substance by HPLC. The ultrasonic extraction condition: 30℃, sample : solvent = 1 : 15($m : v$ or $v : v$), (30 + 15 min) two times. The HPLC condition: Inertsil ODS-3, C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), UV detector set at 450nm, mobile phase : V (CH₃OH) : V (CHCl₃) = 65 : 35 and flow at 1.2 mL/min. The experiment showed that this method is effectiveness, short time, less solvent, sensitive, accurate and reliable.

Key words β -carotene, ultrasonic extraction, RP-HPLC