

高效液相色谱法同时测定番茄中的番茄红素和 β -胡萝卜素

吴青霖 王娟娟 李冰彬 张阳 曹青虎
新疆科技学院

DOI:10.32629/as.v9i8.4192

[摘要] 建立一种时间程序波长切换-HPLC同时测定番茄中番茄红素和 β -胡萝卜素的方法。样品经含0.1% BHT的正己烷冰浴超声提取、浓缩后,以乙腈-四氢呋喃(70:30)为流动相,Sinochrom ODS-AP柱分离,采用时间程序切换检测波长(0~6.1 min为475 nm,6.1~10 min为455 nm)测定。两种组分分别在0.30~100 $\mu\text{g/mL}$ 和0.50~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好(R^2 分别为0.9998、0.9997),平均回收率均在95%~105%之间,RSD均小于3.0%。市售番茄中二者含量分别为21.27 $\mu\text{g/g}$ 和5.13 $\mu\text{g/g}$ 。方法简便、准确、重现性好,可用于番茄中两种类胡萝卜素的同步定量分析。

[关键词] 高效液相色谱法; 番茄红素; β -胡萝卜素; 番茄

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A

Simultaneous Determination of Lycopene and β -Carotene in Tomatoes by High-Performance Liquid Chromatography

Qinglin Wu Juanjuan Wang Bingbin Li Yang Zhang Qinghu Cao
Xinjiang University of Science and Technology

[Abstract] A high-performance liquid chromatography (HPLC) method with time-programmed wavelength switching was established for the simultaneous determination of lycopene and β -carotene in tomatoes. The samples were extracted by ice-bath ultrasonication using n-hexane containing 0.1% BHT and then concentrated. Separation was performed on a Sinochrom ODS-AP column with acetonitrile-tetrahydrofuran (70:30) as the mobile phase. Time-programmed wavelength switching was adopted for detection: 475 nm within 0–6.1 min and 455 nm within 6.1–10 min. Good linear relationships were obtained for the two analytes in the ranges of 0.30–100 $\mu\text{g/mL}$ and 0.50–100 $\mu\text{g/mL}$, with correlation coefficients (R^2) of 0.9998 and 0.9997, respectively. The average recoveries ranged from 95% to 105%, and the relative standard deviations (RSDs) were both below 3.0%. The contents of lycopene and β -carotene in commercially available tomatoes were 21.27 $\mu\text{g/g}$ and 5.13 $\mu\text{g/g}$, respectively. This method is simple, accurate and reproducible, and can be applied to the simultaneous quantitative analysis of the two carotenoids in tomatoes.

[Key words] high-performance liquid chromatography; lycopene; β -carotene; tomato

引言

番茄富含维生素、矿物质和类胡萝卜素等营养成分^[1],其中番茄红素和 β -胡萝卜素含量较高。番茄红素抗氧化活性强,其摄入与前列腺癌、心血管疾病等慢性病风险降低有关^[2-3]; β -胡萝卜素是重要的维生素A原,对维持视觉和免疫功能具有重要作用^[4-5]。二者对光、热、氧敏感,测定时需避光、低温并添加抗氧化剂(BHT)保护^[6]。目前多采用高效液相色谱法(HPLC)测定^[7-8],但二者最大吸收波长不同,固定波长难以同时兼顾两者的检测灵敏度。为此,本研究采用时间程序波长切换-HPLC,建立同时测定番茄中番茄红素和 β -胡萝卜素的方法并考察其方法学性能。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(福立仪器LC5090); Sinochrom ODS-AP色谱柱(C18, $\Phi 4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, 5 μm); 电子天平(舜宇恒平FA2004, 万分之一); 超声波清洗器(昆山舒美KQ3200DM); 台式高速离心机(湘仪TG16-WS); 旋转蒸发器(亚荣SY-5000); 紫外-可见分光光度计(元析仪器Q-6)。

番茄红素、 β -胡萝卜素(分析对照品); 乙腈、四氢呋喃(色谱纯); 正己烷、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)(分析纯)。

1.2 样品制备

取新鲜番茄,清洗、去蒂、沥干,研磨成匀浆,精密称取5.00 g于离心管中,加入含0.1% BHT的正己烷15 mL,冰浴超声提取15 min,离心,收集上清液;残渣加10 mL正己烷重复提取1次,合并提取液。于35℃旋转蒸发浓缩至近干,用流动相定容至5 mL,即得供试品溶液。操作过程注意避光,以防类胡萝卜素光降解。

1.3 标准溶液配制

精密称取番茄红素和 β -胡萝卜素对照品各10 mg,分别置10 mL棕色容量瓶中,先以色谱级四氢呋喃溶解,再用流动相稀释至刻度,摇匀,制得1 mg/mL对照品储备液。分别精密移取上述储备液1 mL至10 mL棕色容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制得番茄红素和 β -胡萝卜素质量浓度均为100 μ g/mL的混合标准溶液。

1.4 实验色谱条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: Sinochrom ODS-AP (C18, Φ 4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-四氢呋喃(70:30); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 20℃; 进样量: 10 μ L。

1.4.2 最佳检测波长的选择

用紫外-可见分光光度计分别对番茄红素标准溶液和 β -胡萝卜素标准溶液进行光谱扫描,结果见图1。由图1可知,番茄红素和 β -胡萝卜素的最大吸收波长分别为475 nm和455 nm。

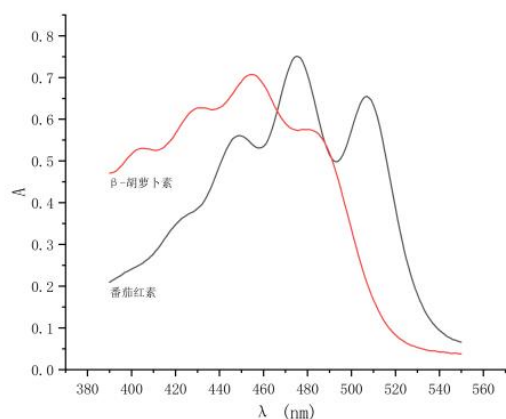


图1 番茄红素和 β -胡萝卜素的紫外吸收光谱图

1.4.3 检测波长切换时间的选择

为在一次进样中同时观察两组分色谱峰的出峰位置,先采用介于两最大吸收波长之间的465 nm作为检测波长,在“1.4.1”色谱条件下分别进样空白溶剂、番茄红素标准溶液和 β -胡萝卜素标准溶液,测得番茄红素和 β -胡萝卜素的保留时间分别约为4.8 min和7.6 min,故将检测波长切换时间设定为6.1 min。

1.4.4 实验色谱条件的确定

在“1.4.1”色谱条件下,设置0~6.1 min的检测波长为475 nm,6.1~10 min的检测波长为455 nm,分别进样空白溶剂、番茄红素和 β -胡萝卜素混合标准溶液,色谱图见图2和图3。结果表明,在上述条件下两种组分色谱峰形对称、分离良好,无杂质峰干扰。

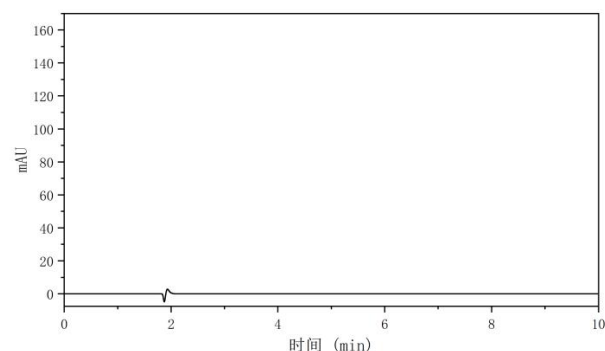


图2 空白对照色谱图

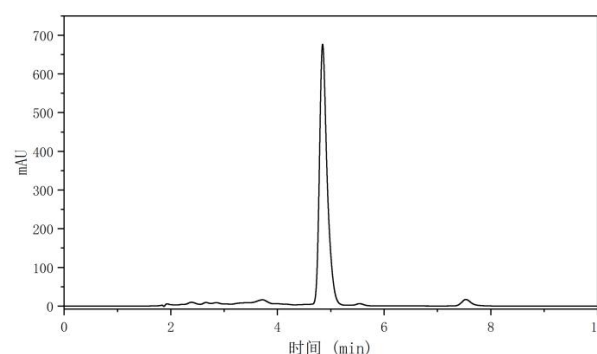


图3 番茄红素和 β -胡萝卜素混合标准溶液的色谱图

2 方法与结果

2.1 线性关系考察

精密配制系列浓度的番茄红素和 β -胡萝卜素混合标准溶液(0.05、0.10、0.30、0.50、1.0、5.0、10、20、40、60、80、100 μ g/mL),按“1.4.1”项下色谱条件进样分析,以峰面积为纵坐标(y)、质量浓度为横坐标(x)进行线性回归。结果显示,番茄红素在0.30~100 μ g/mL范围内线性关系良好,回归方程为 $y=61726.4x+10900.8$,相关系数 $R^2=0.9998$; β -胡萝卜素在0.50~100 μ g/mL范围内线性关系良好,回归方程为 $y=2688.3x+2534.7$,相关系数 $R^2=0.9997$ 。

2.2 精密度试验

2.2.1 仪器精密度试验

连续进样番茄红素和 β -胡萝卜素混合标准溶液(20 μ g/mL)6次,番茄红素和 β -胡萝卜素峰面积的RSD分别为1.10%和1.41%,保留时间的RSD分别为0.16%和0.17%,表明仪器精密度良好。

2.2.2 方法精密度试验

按“1.2”项下方法平行制备6份供试品溶液进样分析,番茄红素和 β -胡萝卜素含量的RSD分别为1.03%和3.60%,表明方法精密度良好。

2.2.3 日间精密度试验

连续3天,每天在相同条件下进样番茄红素和 β -胡萝卜素混合标准溶液(20 μ g/mL)3次,番茄红素和 β -胡萝卜素含量的RSD分别为0.78%和1.47%,表明该方法在跨天操作中具有良好的精密度。

2.3稳定性试验

分别于0、2、4、6、8 h进样供试品溶液,番茄红素和β-胡萝卜素峰面积的RSD分别为0.41%和0.47%,表明供试品溶液中两种待测组分室温放置8 h内基本稳定。

2.4回收率试验

精密称取已知含量的同一批次番茄样品9份,每份5.00 g,分为低、中、高三个加标水平组,每组3份,分别精密加入适量混合对照品储备液,使各组分的理论加标量分别相当于本底浓度的80%、100%和120%,按“1.2”项下方法制备供试品溶液,进样分析。另取同批番茄样品按“1.2”项下方法制备供试品溶液,测定番茄红素和β-胡萝卜素的本底浓度,重复测定3次取均值。测定及计算结果见表1和表2。结果表明,各加标水平下两种待测组分的平均回收率均在95%~105%之间,RSD均小于3.0%,表明本方法准确度良好,能够满足番茄实际样品中番茄红素和β-胡萝卜素的定量分析要求。

表1 番茄红素回收率试验结果

本底值(μg/mL)	加标量(μg/mL)	测定值(μg/mL)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
21.18	16.94	37.12	94.1		
21.18	16.94	37.58	96.8	95.5	1.4
21.18	16.94	37.35	95.5		
21.18	21.18	41.52	96		
21.18	21.18	42.08	98.7	97.4	1.4
21.18	21.18	41.86	97.6		
21.18	25.42	46.58	99.9		
21.18	25.42	47.03	101.7	100.9	0.9
21.18	25.42	46.85	101		

表2 β-胡萝卜素回收率试验结果

本底值(μg/mL)	加标量(μg/mL)	测定值(μg/mL)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
5.16	4.13	9.05	94.2		
5.16	4.13	9.18	97.3	95.8	1.6
5.16	4.13	9.12	95.9		
5.16	5.16	10.13	96.3		
5.16	5.16	10.35	100.6	98.4	2.2
5.16	5.16	10.24	98.4		
5.16	6.19	11.28	98.9	100.2	1.4
5.16	6.19	11.45	101.6		
5.16	6.19	11.36	100.2		

2.5样品检测

取市售番茄样品6份,按“1.2”项下方法分别制备供试品溶液,每份平行进样测定3次。测得番茄红素的平均含量为21.27 μg/g,β-胡萝卜素的平均含量为5.13 μg/g。

3 结论

实验建立了时间程序波长切换-HPLC同时测定番茄中番茄红素和β-胡萝卜素的方法。方法学验证显示:两种组分线性关系良好($R^2 \geq 0.9997$);精密度试验的RSD均小于4.0%;供试品溶液室温放置8 h稳定;平均回收率均在95%~105%之间,RSD小于3.0%。6份市售番茄中二者平均含量分别为21.27 μg/g和5.13 μg/g。该方法简便、准确、重现性好,可为番茄及其制品的质量控制与营养评价提供技术支撑。

[课题]

基于时间程序紫外线检测器的HPLC法测定番茄中的类胡萝卜素(X202613561105)。

[参考文献]

[1]杨月欣.中国食物成分表(标准版·第6版·第一册)[M].北京:北京大学医学出版社,2018.

[2]Stahl W,Sies H.Lycopene:a biologically important carotenoid for humans?[J].Archives of Biochemistry and Biophysics,1996,336(1):1-9.

[3]Rao A V,Agarwal S.Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease[J].Journal of the American College of Nutrition,2000,19(5):563-569.

[4]Krinsky N I,Johnson E J.Carotenoid actions and their relation to health and disease[J].Molecular Aspects of Medicine,2005,26(6):459-516.

[5]中国营养学会.中国居民膳食营养素参考摄入量(2013版)[M].北京:科学出版社,2014.

[6]Rodriguez-Amaya D B.A Guide to Carotenoid Analysis in Foods[M].Washington DC:ILSI Press,2001.

[7]国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.GB 5009.83—2016食品安全国家标准食品中胡萝卜素的测定[S].北京:中国标准出版社,2017.

[8]刘沐霖,惠伯棣,庞克诺.番茄及其制品中番茄红素含量的C18-HPLC-PDA定量分析[J].食品科学,2007,28(7):453-456.

作者简介:

王娟娟(1993--),女,汉族,甘肃省通渭县人,本科,助理实验师,研究方向:分析化学。

曹青虎(1998--),男,汉族,陕西省永寿县,本科,助理实验师,研究方向:分析化学。