

HPLC 同时测定甘薯茎叶中叶黄素和 β -胡萝卜素

邢鹏¹, 包兢兢¹, 秦玉芝¹, 陆英^{1,2*}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以水果薯、水果花叶薯、紫羽1号、紫羽2号、农大紫1号、农大紫2号、浙紫1号、紫薯2号、高淀粉、叶用薯1号、叶用薯2号等11种不同品种甘薯茎叶为试验材料, 建立了高效液相色谱法同时测定甘薯茎叶中叶黄素和 β -胡萝卜素含量的方法。结果表明: 采用甲醇为提取溶剂, 料液比1:30, 50℃超声提取3次, 每次40 min, 能较完全提取甘薯茎叶中的叶黄素和 β -胡萝卜素; HPLC以甲醇-水(95:5)、甲醇-乙腈-四氢呋喃(70:20:5)为流动相梯度洗脱, 叶黄素和 β -胡萝卜素分离良好, 回收率分别为105.8%和101.5%; 叶黄素及 β -胡萝卜素含量最高的是甘薯茎叶中的成熟叶, 其次为新叶, 茎的含量最低; 成熟叶中叶黄素与 β -胡萝卜素的含量分别在0.504~1.031 mg/g和0.188~0.467 mg/g, 新叶中叶黄素与 β -胡萝卜素的含量分别在0.409~0.617 mg/g和0.141~0.242 mg/g, 叶柄中叶黄素与 β -胡萝卜素的含量分别在0.094~0.195 mg/g和0.040~0.082 mg/g, 茎中叶黄素与 β -胡萝卜素的含量分别在0.053~0.103 mg/g和0.036~0.045 mg/g。

关键词: 甘薯茎叶; 高效液相色谱; 叶黄素; β -胡萝卜素

中图分类号: S531.01 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2015)05-0533-05

HPLC analysis method on Lutein and β -carotene in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) leaves

Xing Peng¹, Bao Jingjing¹, Qing Yuzhi¹, Lu Ying^{1,2*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. National Research Center of Engineering Technology For Utilization of Functional Ingredients From Botanicals, Changsha 410128, China)

Abstract: Stems and leaves of 11 sweet potato varieties (Shuiguo, Shuiguo-huaye, Ziyu 1, Ziyu 2, Nongda-zi 1, Nongda-zi 2, Zhezi 1, Zishu 2, Gaodian-fen, Yeyong 1 and Yeyong 2) were used as material, to study the method of HPLC for the determination of lutein and β -carotene simultaneously. The results showed that lutein and β -carotene could be extracted from sweet potato leaves by ultrasound extracted with 1:30 of materials to methanol at 50℃ three times, each time with 40 min. With HPLC mobile phase of methanol-water(95:5, v/v) and methanol-acetonitrile-tetrahydrofuran (70:20:5), lutein and β -carotene could be separated well and their recoverys were 105.8% and 101.5% respectively. Content of lutein and β -carotene in 11 varieties were the highest in mature leaves(0.504~1.031 mg/g and 0.188~0.467 mg/g), then the tender leaves (0.409~0.617 mg/g and 0.141~0.242 mg/g) and petioles(0.094~0.195 mg/g and 0.040~0.082 mg/g) the lowest levels in stems(0.053~0.103 mg/g and 0.036~0.045 mg/g).

Keyword: sweet potato stems and leaves; high performance liquid chromatography(HPLC); Lutein; β -carotene

类胡萝卜素是一类具有多种生理功能的天然色素, 可以预防人心血管疾病、癌症及许多其他慢性疾

病^[1-2], 其中叶黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素、

番茄红素等10余种已被广泛用作抗氧化剂和食品、医药添加剂, 在医药、食品、饲料和化妆品工业中发挥着重要作用。

收稿日期: 2014-10-28

修回日期: 2015-09-06

基金项目: 湖南省科学技术厅博士后项目(2014RS4010); 湖南农业大学园艺学重点学科开放基金项目(2013YYX021)

作者简介: 邢鹏(1992—), 男, 海南海口人, 硕士研究生, 主要从事植物功能成分分离纯化研究, 978305674@qq.com; *通信作者, 陆英, 博士, 副教授, 主要从事天然产物开发利用研究, luying960522@163.com

中国是世界上甘薯栽培第一大国,年产量约 1.2 亿 t,占世界总产量的 85.9%^[3]。甘薯茎叶作为甘薯产业的副产物,除部分食用或作牲畜饲料外,绝大部分被丢弃,造成了资源的极大浪费。近年来,人们逐渐发现甘薯茎叶中含有多种生物活性成分,如黄酮类、绿原酸类等,同时还含有较高的叶黄素和 β -胡萝卜素,具有广阔的开发利用前景^[4-6]。不同植物品种含有的类胡萝卜素种类、含量均有很大差异。采用 HPLC 测定蔬菜果实中多种类胡萝卜素组分时有的提取溶剂不同^[7-8],有的还进行了皂化处理^[9-10],类胡萝卜素总量或单个类胡萝卜素都有降解损失,且甘薯或茎叶中叶黄素和 β -胡萝卜素的 HPLC 测定多为单一组分,提取方法、流动相组成等也不相同。本研究在对提取条件考察优化的基础上,建立了 HPLC 同时测定甘薯茎叶中叶黄素和 β -胡萝卜素的方法,操作简便,方法可靠,并对 11 个品种甘薯茎叶进行了叶黄素和 β -胡萝卜素含量测定,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试甘薯品种为水果薯、水果花叶薯、紫羽 1 号、紫羽 2 号、农大紫 1 号、农大紫 2 号、浙紫 1 号、紫薯 2 号、高淀粉、叶用薯 1 号、叶用薯 2 号等,均采自湖南农业大学园艺园林学院蔬菜基地。60 °C 下烘干、粉碎,备用。

叶黄素和 β -胡萝卜素对照品纯度为 90%,购于合肥博美生物科技有限公司。乙醇、正己烷、丙酮、三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇均为分析纯;甲醇、四氢呋喃、乙腈均为色谱纯,购自恒兴化学制造有限公司。

1.2 主要仪器与设备

LC-10AT 岛津高效液相色谱仪,配有 PDA 检测器,色谱柱 WondasilTM C₁₈(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, 日本岛津公司);SB3200DT 超声波清洗仪(宁波新芝科技股份有限公司);HH 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂)。

1.3 方 法

1.3.1 色 谱 条 件

流动相 A 为甲醇-水(体积比为 95 : 5); 流

动相 B 为甲醇-乙腈-四氢呋喃(体积比为 70 : 20 : 5), 梯度洗脱: 0~10 min, 100% A; 10~30 min, 100%~70% A, 0%~30% B。检测波长为 445 nm。流速为 1.0 mL/min。柱温 20 °C。

1.3.2 标准曲线的绘制

称取叶黄素 14.10 mg、 β -胡萝卜素 15.30 mg 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解,配制成 1.269 mg/mL 和 1.377 mg/mL 的储备液,测定时逐级稀释至 0.253 8 mg/mL、0.126 9 mg/mL、0.0253 8 mg/mL、0.0126 9 mg/mL、0.634 5 μ g/mL、0.126 9 μ g/mL、0.063 45 μ g/mL,进样量 10 μ L,以进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.3 样品溶液制备方法

1) 提取溶剂的确定。称取紫羽 1 号茎叶混合原料 6 份,每份 1.0 g,分别加入 40 mL 甲醇、乙醇、正己烷、丙酮、三氯甲烷、乙酸乙酯,室温下避光浸润 12 h,然后超声提取 20 min,过滤,定容至 50 mL,过膜进样,测量不同提取溶剂中叶黄素和 β -胡萝卜素含量。重复 2 次,确定最佳提取溶剂。

2) 提取次数的确定。称紫羽 1 号茎叶样品 5 份,按 1) 中确定的提取溶剂分别提取 1、2、3、4、5 次,根据提取效果确定提取次数。

3) 提取条件的优化。采用 1) 中确定的提取溶剂,以料液比、超声温度、超声时间为主要影响因素,进行 L₉(3³) 正交试验(表 1),滤渣同法再提取 1 次,合并滤液,定容至 100 mL,进样,对提取效果进行正交试验分析,确定最优提取条件。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Orthogonal factors and levels table			
水平	A(料液比)	B(时间)/min	C(温度)/°C
1	1 : 30	20	50
2	1 : 40	30	60
3	1 : 50	40	70

1.3.4 方法学考察

1) 精密度试验。取叶黄素与 β -胡萝卜素混合标准品连续进样 5 次,以峰面积计算叶黄素和 β -胡萝卜素的 RSD。

2) 稳定性试验。称取粉碎的紫羽 1 号茎叶混合原料 1.0 g 加入 30 mL 甲醇,50 °C 超声提取 40 min,过滤,滤渣同法再提取 2 次,合并滤液,定容至 100 mL,取 20 μ L 分别在 0、1、2、4、6、8、24 h 进

行 HPLC 分析,以峰面积计算叶黄素和 β -胡萝卜素的 *RSD*。

3) 重现性试验:称取紫羽 1 号茎叶混合原料 5 份,每份 1.0 g,按稳定性试验方法制备成甲醇提取液,以峰面积计算叶黄素和 β -胡萝卜素的 *RSD*。

4) 回收率试验:称取紫羽 1 号茎叶混合原料 3 份,每份 1.0 g,加入一定量标准品(叶黄素和 β -胡萝卜素分别为 0.125 和 0.137 mg、0.252 和 0.275 mg、0.377 和 0.413 mg),按稳定性试验方法制成供试液,进样,计算加标回收率。

1.3.5 样品的测定

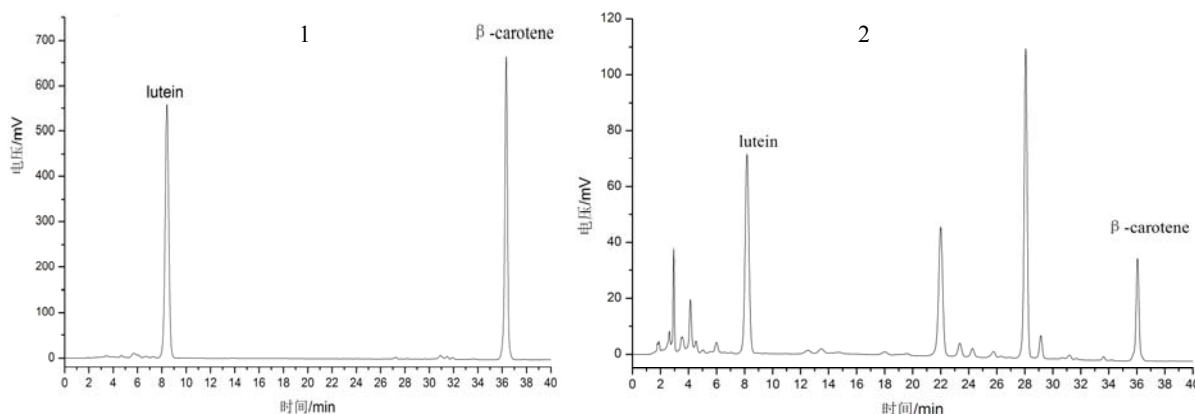
称取粉碎的样品 1.0 g,加入 30 mL 甲醇,50 °C

超声提取 40 min,过滤,滤渣同法再提取 2 次,合并滤液,定容至 100 mL,取 20 μ L 进行 HPLC 分析,根据标准曲线计算样品中叶黄素、 β -胡萝卜素含量。

2 结果与分析

2.1 甘薯叶提取物的 HPLC 分析

叶黄素和 β -胡萝卜素标准品及甘薯叶提取物的 HPL 色谱图见图 1。以峰面积为纵坐标(*Y*),进样量为横坐标(*X*),叶黄素的回归方程为 $Y=9.7 \times 10^6 X - 1.9 \times 10^5$ ($R^2=0.9991$),线性范围 0.000 635~2.538 μ g; β -胡萝卜素的回归方程为 $Y=7.4 \times 10^6 X - 50 189$ ($R^2=0.9993$),线性范围 0.006 885~2.538 μ g。



1 标准品; 2 甘薯叶提取物。

图 1 叶黄素和 β -胡萝卜素标准品及甘薯叶提取物的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of lutein, beta-carotene standers and extracts of sweet potato leaves

2.2 试验条件的优化结果

2.2.1 最适提取溶剂

从表 2 可知,甲醇、乙醇对叶黄素的提取效果较好,对 β -胡萝卜素的提取效果与其他常用提取溶剂的提取效果相近,但采用乙醇为提取溶剂,测定出的叶黄素峰形矮胖,柱效差,因此,选用甲醇作提取溶剂。

表 2 不同溶剂提取的叶黄素和 β -胡萝卜素的含量

Table 2 Contents of different solvents on the efficiency of lutein and beta-carotene mg/g		
提取溶剂	叶黄素含量	β -胡萝卜素含量
乙酸乙酯	0.043	0.076
乙醇	0.101	0.070
三氯甲烷	0.038	0.041
甲醇	0.108	0.067
正己烷	0.026	0.071
丙酮	0.067	0.074

2.2.2 最适提取次数

由表 3 可见,叶黄素和 β -胡萝卜素的提取得率随着提取次数的增加而增加,提取 3 次后 2 个目标物的提取量已趋于稳定,因此,确定试验提取次数为 3 次。

表 3 各提取次数下的叶黄素和 β -胡萝卜素含量

Table 3 Contents of sequence on effect extract efficiency mg/g		
提取次数	叶黄素含量	β -胡萝卜素含量
1	0.108	0.067
2	0.506	0.338
3	0.556	0.379
4	0.562	0.379
5	0.569	0.380

2.2.3 正交试验结果

正交试验的提取效果见表 4。从表 4 可知,最

佳的提取方案为 $A_1B_3C_1$, 即固液比 1:30, 超声温度 50 °C, 超声时间 40 min。

表 4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal experimen

因素		A	B/min	C/	叶黄素含量 (mg·g ⁻¹)	β-胡萝卜素含量/(mg·g ⁻¹)
1		1 30	20	50	0.525	0.325
2		1 30	30	60	0.518	0.326
3		1 30	40	70	0.517	0.330
4		1 40	20	60	0.477	0.297
5		1 40	30	70	0.487	0.311
6		1 40	40	50	0.530	0.326
7		1 50	20	70	0.505	0.321
8		1 50	30	50	0.524	0.321
9		1 50	40	60	0.519	0.318
叶黄素	K ₁	0.520	0.502	0.526		
	K ₂	0.498	0.510	0.505		
	K ₃	0.516	0.522	0.503		
	R	0.022	0.020	0.023		
β-胡萝卜素	K ₁	0.327	0.314	0.324		
	K ₂	0.311	0.319	0.314		
	K ₃	0.320	0.325	0.321		
	R	0.016	0.011	0.011		

2.3 方法学考察结果

精密度试验结果,叶黄素和 β-胡萝卜素的峰面积 RSD 为 0.9%和 1.8%,表明该方法具有较高精密度; 6 h 内叶黄素与 β-胡萝卜素测定值基本稳定,峰面积 RSD 分别为 1.2%和 1.4%,表明该方法稳定性好;重现性试验中,叶黄素与 β-胡萝卜素峰面积 RSD 分别为 1.3%和 1.8%,表明该方法重复性好;叶黄素与 β-胡萝卜素的回收率分别为 105.8%和 101.5%,表明该方法具有较高的准确度。

2.4 甘薯茎叶中叶黄素及 β-胡萝卜素含量的测定

由表 6 可见,11 份不同品种甘薯茎叶中的叶黄

素及 β-胡萝卜素含量最高的是成熟叶,其次为新中叶,茎的含量最低,同一部位不同品种间的含量存在差异,成熟叶中的叶黄素含量 0.504~1.031 mg/g,β-胡萝卜素含量 0.188~0.467 mg/g;新叶中叶黄素含量 0.409~0.617 mg/g,β-胡萝卜素含量 0.141~0.242 mg/g;叶柄中叶黄素含量 0.094~0.195 mg/g,β-胡萝卜素含量 0.040~0.082 mg/g;茎叶黄素含量 0.053~0.103 mg/g,β-胡萝卜素含量 0.036~0.045 mg/g,其中花叶水果薯和紫羽 1 号中的含量较高,其成熟叶中的叶黄素含量大于 1 mg/g,β-胡萝卜素含量大于 0.4 mg/g。

表 5 不同品种甘薯茎叶中的叶黄素和 β-胡萝卜素含量

Table 5 Lutein and beta-carotene content in sweet potato leaves and stems

甘薯品种	叶黄素含量				β-胡萝卜素含量			
	新叶	成熟叶	叶柄	茎	新叶	成熟叶	叶柄	茎
水果薯	0.487	0.678	0.133	0.077	0.176	0.304	0.061	0.039
水果花叶薯	0.601	1.070	0.195	0.103	0.234	0.450	0.082	0.045
紫羽 1 号	0.526	1.031	0.193	0.096	0.242	0.467	0.077	0.041
紫羽 2 号	0.440	0.852	0.180	0.075	0.209	0.362	0.040	0.037
农大紫 1 号	0.450	0.504	0.112	0.057	0.210	0.188	0.049	0.036
农大紫 2 号	0.424	0.552	0.116	0.074	0.183	0.223	0.049	0.040
浙紫 1 号	0.491	0.674	0.123	0.079	0.166	0.218	0.045	0.041
紫薯 2 号	0.497	0.698	0.094	0.053	0.192	0.272	0.043	0.036
高淀粉	0.542	0.823	0.133	0.072	0.199	0.361	0.055	0.038
叶用 1 号	0.409	0.636	0.117	0.087	0.141	0.334	0.044	0.040
叶用 2 号	0.617	0.864	0.156	0.101	0.193	0.339	0.044	0.040

3 讨论

叶黄素与 β -胡萝卜素虽然都属类胡萝卜素,但叶黄素极性较大,可溶于大多数有机溶剂,而 β -胡萝卜素极性较小,不溶于水,易溶于氯仿、正己烷等溶剂,因此,测定时的提取溶剂及处理方法均有不同,需要针对不同的提取溶剂进行比较。本研究采用了乙酸乙酯、乙醇、三氯甲烷、甲醇、正己烷、丙酮等作为提取溶剂,发现以甲醇为提取溶剂,对甘薯茎叶中的这2种组分提取效果均较好,经3次提取后可基本提取完全。提取液直接注入HPLC 色谱仪,经梯度洗脱,叶黄素和 β -胡萝卜素得到很好分离,方法稳定,重复性好,回收率高,确定该方法准确可信。

近年来,人们逐渐发现甘薯茎叶中含有多种生物活性成分,如黄酮类、绿原酸类以及类胡萝卜素等。本研究结果表明,非叶用品种与叶用品种的甘薯茎叶中叶黄素和 β -胡萝卜素含量差异不大,因此,不同品种的甘薯叶作为食用蔬菜均有较高的价值。

甘薯茎叶中叶黄素含量与普通万寿菊叶黄素含量(16~20 mg/g)^[7]的差距很大,但由于甘薯茎叶产量大,价格低,来源广,安全性高。因此,甘薯茎叶在提取方面仍具有一定优势,作为膳食补充剂开发,具有一定的发展前景。

在鸡日粮中添加 5%~8%的银合欢粉(叶黄素含量为 0.950 mg/g),蛋黄颜色会加深,添加 8%~12%的苜蓿粉(胡萝卜素含量为 0.500 mg/g),蛋黄和皮肤的颜色也可以加深^[11],因此,甘薯叶作为饲料添加剂开发也具有较好的发展前景。

参考文献:

- [1] Rao A V, Rao L G. Carotenoids and human health [J]. *Pharmacological Research*, 2007(55): 207-216.
- [2] Paiva S A, Russell R M. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 1999, 18(5): 426-433.
- [3] 张斌,吴祎南,陈莉,等.红薯茎叶化学组成的研究进展[J]. *食品科学*, 2006(3): 252-256.
- [4] Hiroshi Ishida, Hiroko Suzuno, Noriko Sugiyama, et al. Nutritive evaluation on chemical components of leaves, stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* poir)[J]. *Food Chemistry*, 2000(68): 359-367.
- [5] Aurea M Almazan, Fatima Begum, Colette Johnson. Nutritional quality of sweet potato greens from greenhouse plants[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1997, 10(3): 246-253.
- [6] Harald M. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection[J]. *European Food Research and Technology*, 1997(38): 88-94.
- [7] 叶兆伟,李洵,刘柱明,等.万寿菊中叶黄素的三种提取方法比较[J]. *湖北农业科学*, 2014, 4(5): 874-876.
- [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.
- [9] 石晋.甘薯中类胡萝卜素分析[D].大连:大连理工大学,2008.
- [10] 孙健,彭宏祥,董新红,等.甘薯中 β -胡萝卜素 HPLC 测定方法分析[J]. *食品科技*, 2009, 34(1): 236-238.
- [11] 谢仲权,牛树琦.天然植物饲料添加剂生产技术与质量标准[M].北京:中国农业科学技术出版社,2004: 76-77.

责任编辑:尹小红

英文编辑:梁和