

· 技术方法 ·

植物类胡萝卜素提取与分析技术研究进展

何卿^{1,2}, 孙国峰², 林秦文², 李晓东^{2*}, 张金政^{2*}

¹国家知识产权局专利局专利审查协作北京中心, 北京 100160; ²中国科学院植物研究所, 北京 100093

摘要 类胡萝卜素是所有光合生物及一些非光合原核生物和真菌合成的亲脂性天然色素, 对植物、动物和人都具有广泛的生物学作用。随着现代分析技术的快速发展, 越来越多的类胡萝卜素得以发现和利用。该文通过对植物类胡萝卜素的提取、分离纯化、含量测定和结构鉴定等方面的最新研究进展进行系统阐述, 以期对植物类胡萝卜素的有效开发利用提供技术支撑。

关键词 类胡萝卜素, 提取, 分离纯化, 含量测定, 结构鉴定

何卿, 孙国峰, 林秦文, 李晓东, 张金政 (2018). 植物类胡萝卜素提取与分析技术研究进展. 植物学报 53, 700–709.

类胡萝卜素(carotenoids)是所有光合生物及一些非光合原核生物和真菌合成的亲脂性天然色素。典型的类胡萝卜素是由8个异戊二烯单元首尾相连而成的C₄₀萜类化合物及其衍生物。一些类胡萝卜素侧链较短(C₃₀)或较长(C₄₅或C₅₀), 通常分为含氧类胡萝卜素(xanthophylls)和胡萝卜素(carotenes)两类。自然界中, 已发现1 100余种类胡萝卜素且数量还在增加, 常见的有番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、虾青素、叶黄素、玉米黄质、隐黄质和紫黄质等(Rodriguez-Concepcion et al., 2018)。类胡萝卜素具有广泛的生物学作用。在植物中, 类胡萝卜素是植物光合系统正确组成不可或缺的部分, 同时也是花瓣、果实和彩色叶片等呈色的主要色素。在人类健康方面, 有些类胡萝卜素作为V_A的合成前体能够改善视力, 有些类胡萝卜素还具有清除自由基、提高免疫力、降低患癌风险和防治心血管病等多种功效(Hughes, 2001; Fraser and Bramley, 2004; 林魁和徐永, 2015)。此外, 类胡萝卜素还可作为食品和化妆品的天然着色剂以及动物饲料的添加剂。据报道, 2018年商用类胡萝卜素的市场价值将达到14亿美元(<http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoidsglobal-market-fod025d.html>)。由于动物(除一些种类蚜虫)不能合成类胡萝卜素, 需要从食物中获取, 且随着对类胡萝卜素制品需求的增加, 充分利用植物源类胡萝卜素已成为大势所趋, 因而要求

有更可靠的定性和定量分析技术。

1 提取技术

1.1 溶剂提取

溶剂提取(solvent extraction, SE)是依据化合物在溶剂中的溶解性差异, 将所需成分提取出来的一种方法。对不同结构的类胡萝卜素所使用的溶剂种类相差较大。例如, 极性大的含氧类胡萝卜素主要使用丙酮等极性强的溶剂, 极性小的类胡萝卜素主要使用石油醚等极性弱的溶剂(康保珊等, 2007)。选择合适溶剂是有效提取类胡萝卜素的关键。目前常用组合溶剂提高提取效率, 如乙腈/丁醇、乙酸乙酯/石油醚、乙醇/丙酮、丙酮/二氯甲烷、丙酮/正己烷、丙酮/石油醚、正己烷/乙醚、正己烷/乙醇/丙酮/甲苯、甲醇/四氢呋喃、正己烷/乙酸乙酯和正己烷/丙酮/乙醇(Lin and Chen, 2003; 张卫红等, 2014; 莫玉楠等, 2014; Amorim-Carrilho et al., 2014; Zheng et al., 2016)。Poojary和Passamonti (2015)采用四因素(提取温度、提取时间、丙酮正己烷比例和溶剂体积)全因子实验设计研究了这些变量对番茄(*Lycopersicon esculentum*)加工废料中all-trans-番茄红素提取的影响, 结果表明, 最佳提取条件为提取温度20℃、提取40分钟、溶剂组成为丙酮/正己烷(1:3, v/v)、溶剂体积为40 mL, 番茄红素最大回收率为94.7%、all-trans-番茄红素纯

收稿日期: 2018-04-09; 接受日期: 2018-07-16

基金项目: 科技基础性工作专项子课题(No.2015FY210100-10)

* 通讯作者。E-mail: lixcds1234@ibcas.ac.cn; caohua@ibcas.ac.cn

度为98.3%。此外, 由于类胡萝卜素在氧、酸、强光及高温下易降解或异构化, 皂化(saponification)处理是近年类胡萝卜素提取较为常用步骤; 且皂化有助于去除材料中的叶绿素和脂类, 也被用来水解酯化形式的类胡萝卜素, 为后续类胡萝卜素的色谱分离和准确鉴定奠定了基础(Amorim-Carrilho et al., 2014)。赵薪鑫等(2017)探究了不同提取试剂以及皂化反应对萱草属(*Hemerocallis*)植物花瓣中类胡萝卜素提取效果的影响, 发现丙酮-正己烷(3:5, v/v), 常温皂化16小时, 提取效果最佳。此外, 丁基羟基甲苯(butylhydroxytoluene, BHT)是目前在溶剂中添加的保护类胡萝卜素的最常用抗氧化剂, 其它抗氧化剂(如邻苯三酚、丁基羟基茴香醇(BHA)、抗坏血酸以及丁基对苯二酚(TBHQ))也有使用(Amorim-Carrilho et al., 2014)。

1.2 绿色溶剂提取

绿色溶剂提取(green solvent extraction, GSE)是以环境友好的可再生生物物质绿色溶剂(如植物油)代替有机溶剂进行类胡萝卜素的提取(Yara-Varón et al., 2016)。王宪青等(2004)考察了大豆油、花生油、葵花籽油和小麦胚芽油提取番茄中的番茄红素, 发现用葵花籽油作提取溶剂, 料液比为1:1 ($\text{g}\cdot\text{v}^{-1}$), 萃取4小时, 提取效果较好。Goula等(2017)开发了一种超声辅助葵花籽油提取石榴(*Punica granatum*)皮中类胡萝卜素的方法, 最佳工艺为: 提取温度为51.5°C, 料液比为1:10 ($\text{g}\cdot\text{v}^{-1}$), 超声振幅水平为58.8。超声辅助提高了类胡萝卜素的扩散率, 这是由于黏度较高是植物油提取类胡萝卜素的主要限制因素。植物油提取类胡萝卜素比传统的溶剂提取有明显的优势, 因为富含类胡萝卜素的植物油可直接用于食品配方。然而, 工业规模的植物油提取类胡萝卜素研究尚不多见。深入研究各种天然类胡萝卜素的植物油提取优化方法以及制造成本(经济可行性), 以确定工业上最可行的技术方法(Saini and Keum, 2018)势在必行。

1.3 酶辅助提取

酶辅助提取(enzyme-assisted extraction, EAE)是通过添加水解酶打破细胞壁结构的完整性, 暴露细胞内物质, 从而达到提高类胡萝卜素提取效率之目的。Choudhari和Ananthanarayan (2007)发现, 经纤维素酶(cellulase)和果胶酶(pectinase)处理大大提高了

番茄果实番茄红素的提取率。Strati等(2015)也获得了类似结果。

1.4 微波辅助提取

微波辅助提取(microwave-assisted extraction, MAE)是利用样品和溶剂中的偶极分子在高频微波作用下, 由于偶极旋转与离子漂移诱导极性分子内部快速产生大量热, 加速了被提取物向提取溶剂的迁移, 缩短了提取时间, 具有回收率高、溶剂用量少、能耗低和易于控温等特点(李巧玲, 2003; Ho et al., 2015)。MAE方法已成功用于柑橘(*Citrus reticulata*)、中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)和番茄等类胡萝卜素的提取(廖春燕和磨文龙, 2009; 高洁等, 2013; Ho et al., 2015)。MAE对大多数样品来说是一种简单、经济的方法, 但不能排除热降解和顺反异构化。间歇辐射(intermittent radiation)可以提高类胡萝卜素的回收率, 提高抗氧化活性, 最大限度地减少热降解。因此, 可在微波功率、溶剂体积和间歇比的不同水平上进一步优化MAE法的提取工艺。

1.5 超声波辅助提取

超声波辅助提取(ultrasound-assisted extraction, UAE)是利用超声过程产生的空化现象(cavitation), 即通过溶剂内微气核空化泡的形成、发展和崩溃, 在细胞表面引导液体/蒸汽的喷射, 导致细胞破裂, 提高物质的提取效率。该法具有节能、省时和高效等优点(金思和马空军, 2017)。王星等(2014)采用超声波辅助皂化法提取枸杞(*Lycium chinense*)皮渣中的类胡萝卜素, 在超声波功率为205 $\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ 条件下类胡萝卜素提取量为129.121 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。UAE已成功用于摩盒萱草(*Hemerocallis fulva* cv. 'Pandora's Box')、番茄、枸杞和菠萝蜜(*Artocarpus heterophyllus*)等类胡萝卜素的提取(黄昕蕾等, 2013; 刘长付和陈媛梅, 2013; 吴有锋等, 2016; 胡丽松等, 2017)。

1.6 超临界流体萃取

超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)是利用压力或温度的改变对超临界流体溶解能力的影响, 从而有选择性地提取极性、沸点和相对分子质量不同的成分萃取出来的方法。该法以超临界 CO_2 为溶剂, 使用的助溶剂(如乙醇)少, 并且减少了光、热以及

表1 不同类胡萝卜素提取方法的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of various carotenoid extraction methods

提取方法	优点	缺点
溶剂提取	高提取率, 设备简单	需要大量有机溶剂且成本较高
绿色溶剂提取	环境友好, 可直接用于食品配方	成本较高且不适合分析鉴定
酶辅助提取	快速, 高效且溶剂用量少	酶的成本高
微波辅助提取	简便, 快速且经济	会导致类胡萝卜素的热降解和顺反异构化
超声波辅助提取	快速, 非热且高效	超声波探头表面老化会改变萃取效率
超临界流体萃取	溶剂非易燃、无毒且可循环利用(CO ₂ 和乙醇); 连续萃取代替间歇处理; 可用于萃取热分子化合物; 可提供高纯度的类胡萝卜素	不适合含有大量水分的样品, 极性类胡萝卜素产率低且仪器成本高

氧等对类胡萝卜素提取的影响(Zaghdoudi et al., 2016)。Shi等(2010)考察了超临界CO₂提取南瓜(*Cucurbita moschata*)类胡萝卜素的工艺条件, 发现萃取温度为70°C、萃取压力为35 MPa、萃取40分钟, 且在10%乙醇助溶剂(modifier)条件下类胡萝卜素的产率可达109.6 μg·g⁻¹。SFE对提取高纯类胡萝卜素等热不稳定化合物来说是一种绿色环保的方法, 但对极性大的含氧类胡萝卜素的提取效率很低(Hosseini et al., 2017)。

现代提取方法(微波辅助提取、超声波辅助提取和超临界流体萃取)与传统提取方法(溶剂提取、绿色溶剂提取和酶辅助提取)相比, 减少了溶剂用量、缩短了提取时间、提高了类胡萝卜素的提取效率和稳定性(表1), 未来将得到更广泛的应用。然而, 任何提取方法都无法满足所有实验材料的需要, 新技术对于特定植物材料的特殊需求以及工厂化提取技术还有待继续完善。实践中, 超声辅助与超临界流体协同萃取技术、超声辅助与微波协同萃取技术、超声辅助与冷冻协同萃取技术以及超声辅助与双水相协同萃取技术等均可用于类胡萝卜素的提取(金思和马空军, 2017)。

2 分离纯化技术

2.1 柱色谱

柱色谱(column chromatography, CC)是主要利用混合物中各组分理化性质差异导致其在固定相和流动相中分配系数不同而达到彼此分离的目的(李晓银, 2006)。Chen等(1991)以活化氧化镁和硅藻土(1:1, v/v)为吸附剂、以不同比例的正己烷-丙酮-甲醇为洗脱剂对空心菜(*Ipomoea aquatica*)中的类胡萝卜素进行分离, 重复性较好。de Azevedo-Meleiro和Rodrig-

uez-Amaya (2005)采用氧化镁/硅藻土(1:1, v/v)填充柱制备β-胡萝卜素、叶黄素、紫黄质、新黄素和茼蒿黄素标准品, 纯度可达92%–98%。Kao等(2012)以氧化镁-硅藻土为吸附剂, 用乙酸乙酯洗脱, 从台湾蒲公英(*Taraxacum formosanum*)中制备出更多的类胡萝卜素环氧衍生物及其顺式异构体。

2.2 薄层色谱

薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)是将固定相均匀铺在平板上形成薄层, 将样品溶液点在薄层板的一端, 用适宜的展开剂使混合物得以分离、提纯的方法。该法分离成本低(曹洪玉, 2009)。范文秀等(2004)以薄层层析-分光光度法测定了南瓜中β-胡萝卜素的含量。

2.3 膜分离

膜分离(membrane separation, MS)是利用膜选择透性, 实现溶剂与不同粒径组分混合物的选择性分离、纯化的方法。该法适于热敏性物质的分离与浓缩, 能耗低且选择性好(孙福东等, 2008)。Chiu等(2009)利用平板聚合物膜(NP10)从天然棕榈(*Trachycarpus fortunei*)油中精炼类胡萝卜素, 在压力为2.5 MPa、40°C条件下β-胡萝卜素回收率达75%。Oliveira等(2016)利用孔径为0.2 μm的α-Al₂O₃膜(T1-70)从西瓜(*Citrullus lanatus*)汁中分离番茄红素, 效果极佳。

2.4 高速逆流色谱

高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)是一种基于液-液分配色谱的现代制备色谱技术。该法利用互不相溶的两相溶剂体系在高速运动的螺旋管内建立起一种特殊的单向流体动

力学平衡, 而物质依赖于其在两相中分配系数的不同实现分离。该法避免了因不可逆吸附而引起的样品损失、变性和失活, 且回收率高、制备量大(李爱峰等, 2008)。Baldermann等(2008)采用HSCCC, 以正己烷-二氯甲烷-乙腈溶剂系统(30:11:18, v/v/v), 从番茄酱中分离出全反式番茄红素。

3 含量测定方法

3.1 分光光度法

分光光度法(spectrophotometry, SP)是利用类胡萝卜素分子所具有的较长共轭双键体系(发色团)使其在紫外-可见光区有强吸收峰, 可根据最高峰位置、吸收光谱形状和光谱精细结构等信息对类胡萝卜素进行定性定量分析。Burgos等(2009)采用分光光度法揭示了富利亚薯(*Solanum phureja*)品种间类胡萝卜素差异以及总类胡萝卜素与玉米黄质、玉米黄素和 β -胡萝卜素之间的关系。邹德喜等(2013)采用分光光度法分析了沙棘(*Hippophae rhamnoides*)果实 β -胡萝卜素的含量, 为沙棘天然色素开发以及遗传育种提供了依据。

3.2 高效液相色谱法

高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)法是以单一或不同极性的混合溶剂为流动相, 采用高压泵将流动相输入色谱柱, 在柱内根据被分离物质组分在固定相和流动相间分配的平衡将不同组分分离后, 进入检测器检测, 从而实现对样品的分析(惠伯棣等, 2002)。HPLC包括正相色谱和反相色谱。正相色谱(normal phase chromatography, NPC)是采用极性键合固定相(如带有二醇基、氨基和氰基)、非极性流动相(如正己烷)的分离方法, 有利于分离中等极性和极性较强的化合物。反相色谱(reversed-phase chromatography, RPC)则是采用非极性键合固定相, 如硅胶- $C_{18}H_{37}$ (简称ODS或 C_{18})和硅胶-苯基等, 以强极性溶剂为流动相, 如甲醇/水和乙腈/水, 该系统能较好地分离多种类胡萝卜素及其异构体。近年, NPC逐渐被RPC取代。徐响等(2007)以反相 C_{18} 柱分离和测定了沙棘全果油中的类胡萝卜素, 在波长450 nm处共分离检测出14种游离的类胡萝卜素, 并对叶黄素、玉米黄质、 β -隐黄质和 β -胡萝卜素进行了定量分析。由于 C_{18} 柱对类胡萝卜素顺反异构

体的分离能力有限, 从20世纪90年代开始, 逐渐引入 C_{30} 柱以便能更好地分离非极性类胡萝卜素和 C_{18} 柱难以分离的几何异构体, 当然同时也带来了分析时间过长的问题(Turcsi et al., 2016)。Chen等(2004)采用 C_{30} 柱, 应用一种改进的HPLC方法, 在53分钟内检测出25种类胡萝卜素。康迎春等(2014)采用YMC- C_{30} 色谱柱建立了枸杞果实中5种类胡萝卜素(新黄质、叶黄素、玉米黄素、 β -隐黄质及 β -胡萝卜素)的HPLC分析方法。胡海涛等(2016)也成功地对5种胡颓子属(*Elaeagnus*)植物果实番茄红素的含量进行了分析。然而, 类胡萝卜素的HPLC法定量通常是基于标样的质量与峰面积之间的线性关系, 而目前大多数需要分析的类胡萝卜素都没有标样, 故只能采取半定量方法。为了提供复杂样品鉴别分析物所需的最佳分辨率以及分离能力, 通过引进多维色谱(multidimensional chromatography)大大提高了相应一维色谱技术的分离能力。Dugo等(2006)首次应用LC \times LC, 以硅胶微高效液相色谱正相柱为第一维、反相整体 C_{18} 柱为第二维, 分析了红橙皂化挥发油中的类胡萝卜素。此外, Dugo等(2008)还采用正相微孔氰基柱和反相整体 C_{18} 柱, 配备光电二极管阵列检测器(PDA)和APCI-MS检测器分析了游离及酯化类胡萝卜素, 该方法可同时检测40种不同的类胡萝卜素, 并且不需要任何预处理。

3.3 超高效液相色谱法

超高效液相色谱(ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC)是20世纪90年代借助HPLC理论, 推出的一种液相色谱技术, 其最大特点是色谱柱的固定相填料粒径小于2 μ m, 系统压力可达100 MPa, 理论塔板数高于HPLC, 有更高的信噪比、更好的分离效果, 大大减少了分析时间。目前, 用于分析类胡萝卜素的UPLC柱主要包括HSS C_{18} (用于分离叶黄素类)和BEH C_{18} (用于分离胡萝卜素类)。Delpino-Rius等(2014)开发了一种UPLC分析果汁中类胡萝卜素的方法, 可同时检测环氧类胡萝卜素(epoxycarotenoid)、羟基类胡萝卜素(hydroxycarotenoids)和胡萝卜素(carotene), 17分钟内检测出27种类胡萝卜素。Kim等(2016)采用UPLC配备HSS T3柱在30分钟内成功分析了辣椒(*Capsicum annuum*)中的12种类胡萝卜素。

3.4 超高效合相色谱法

超高效合相色谱(ultra-performance convergence chromatography, UPC²)是一种全新的色谱技术,其遵循超临界流体色谱(Supercritical fluid chromatography, SFC)的基本原理,同时利用比UPLC更小的系统容积。由于UPC²采用填料粒径小于2 μm 的色谱柱,大大减少了分析时间和样品在分析过程中的降解,同时也提高了分辨率和检测灵敏度;所需样品量很少(1–5 μL)且对类胡萝卜素同分异构体有更好的分离效果。此外,UPC²所用流动相主要为超临界CO₂,大大减少了有毒溶剂的使用,更符合绿色环保理念。赵薪鑫等(2017)初步探讨了UPC²结合二极管阵列检测器(PDA)和串联四极杆质谱(TQ-MS)检测萱草属植物中的类胡萝卜素,共检测出20种类胡萝卜素。但是,用UPC²检测植物中的类胡萝卜素才刚刚起步,尚需进一步优化检测条件。

3.5 毛细管液相色谱法

毛细管液相色谱法(capillary liquid chromatography, CLC)与普通液相色谱法原理类似,只是用毛细管柱代替普通液相色谱柱。该法显著降低了有机溶剂的消耗并节省了样品用量,易与其它技术耦合。Xu和Jia(2009)采用CLC结合在线固相微萃取(SPME)分析了脂溶性维生素和 β -胡萝卜素,使用单片硅-ODS柱,并在UV/Vis检测器中用一个光纤流动池和长的光路来提高检测灵敏度,检测限(LOD)范围为1.9–17 302 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,相对标准偏差小于5%。随着分析仪器的小型化趋势,CLC将越来越多地被采用。

3.6 其它方法

刘燕等(2013)发明了一种利用吸收光谱测定植物活体叶片中叶绿素a、b和类胡萝卜素含量的方法。基本原理是用光纤光谱仪测定从400 nm到700 nm的叶片吸收光谱,对吸收光谱进行四阶导数处理,从而分离不同组分的吸收峰,用900 nm处的光谱校正叶片结构差异带来的误差,从而准确测定3种色素的含量。

4 结构鉴定

4.1 高效液相色谱-质谱联用法

高效液相色谱-质谱联用法(high performance liquid

chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)将HPLC的高分离性能与MS强大的结构鉴定功能相结合,广泛用于物质结构鉴定。对已知物质,可将质谱获得的分子结构信息(分子质量和断裂模式)与已发表的碎片离子丰度或质谱文库进行比对;而对于未知物质,需结合在线PDA或UV-Vis检测器以及串联质谱(tandem MS, MS/MS)为其鉴定提供更多有价值的信息。分子断裂模式(fragmentation pattern)取决于电离技术和流动相的组成。目前,已利用各种电离技术获得了大量的类胡萝卜素特征片段。在与HPLC兼容的电离技术中,类胡萝卜素研究中最成功的是电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)和大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI),APCI通常具有较强的电离非极性化合物的能力,而ESI更适合极性化合物的电离(Amorim-Carrilho et al., 2014)。由于在正离子电喷雾过程中,胡萝卜素和含氧类胡萝卜素能形成分子离子或质子化分子,但在使用负离子电喷雾时,胡萝卜素不电离。然而,APCI对于胡萝卜素和含氧类胡萝卜素均能形成大量的正/负电荷分子离子或质子化和去质子化分子。因此,更多的研究人员使用LC-PDA-APCI-MSⁿ法对不同基质中的类胡萝卜素进行分析和鉴定(Inbaraj et al., 2008; de Jesús Ornelas-Paz et al., 2008; Kao et al., 2012; Li et al., 2012; van Breemen et al., 2012; Giuffrida et al., 2013)。de Azevedo-Meleiro等(2005)采用HPLC-PDA-MS方法,根据吸收光谱精细结构(%III/II)、化学检测反应和质谱鉴定了栽培菊苣(*Cichorium endivia*)和新西兰菠菜(*Tetragonia tetragonoides*)中几种主要的类胡萝卜素,包括新黄质(m/z 600)、紫黄质(m/z 600)、莧苣黄素(m/z 568)、叶黄素(m/z 568)和 β -胡萝卜素(m/z 536)。Zhong等(2016)采用HPLC-DAD-APCI⁺-MS法鉴定了4种玫瑰果实(rose hip fruit)中的类胡萝卜素,首次在未皂化提取物中检测到23种类胡萝卜素酯(其中玉红黄质酯(rubixanthin ester)和紫黄质酯(violaxanthin ester)是主导成分);在皂化提取物中检测到21种类胡萝卜素,包括11种含氧类胡萝卜素和10种胡萝卜素。Etzbach等(2018)采用HPLC-DAD-APCI-MSⁿ法测定了酸浆果(*Physalis peruviana*)不同成熟期和不同器官中类胡萝卜素的组成及含量,检测到53种类胡萝卜素,其中42种得到鉴定。Schex等(2018)采用HPLC-DAD-APCI/ESI-MSⁿ法研究了不同成熟期哥斯达黎加格鲁椰子(*Acrocomia aculeate*)的类胡萝卜素和

α -生育酚, 25种类胡萝卜素得到有效鉴定, 包括: 花药黄质(m/z [585]: 567、549、493和221)、 β -胡萝卜素(m/z [537]: 481、457、445、444、413、401、399、387、347、321和281)、叶黄素($[M+H-H_2O]^+$, m/z [551]: 533、495、477、459和429)、黄体黄质(m/z [601]: 583、565、509、445、429和221)、新黄质(m/z [601]: 583、565、547、521、509、491、445、393和221)、八氢番茄红素(m/z [545]: 503、489、475、463和435)、六氢番茄红素(m/z [543]: 501、487、473、461、433、405和323)、紫黄质(m/z [601]: 583、565、521、509、491、445、429和221)和玉米黄质(m/z [569]: 551、549、533、477、463、459、411、393和376), 以及若干上述化合物的(Z)-异构体。而超高效液相色谱-质谱联用法(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrum, UPLC-MS)和超高效合相色谱-质谱联用法(ultra-performance convergence chromatography-mass spectrum, UPC²-MS)/超临界流体色谱-质谱联用法(supercritical fluid chromatography-mass spectrum, SFC-MS)作为HPLC-MS的升级版也逐渐开始应用于植物类胡萝卜素的结构鉴定(Goupy et al., 2013; Giuffrida et al., 2018)。

4.2 红外光谱法

红外光谱(infrared spectroscopy, IR)是分子吸收光谱的一种, 根据每种物质分子都具有由其组成和结构决定的选择性红外吸收来进行结构分析的一种方法。该方法具有特征性强、试样用量少和简便快速等优点。但IR主要提供官能团的结构信息, 对于复杂化合物和新化合物, 需要结合其它手段进行综合解析, 才能确定分子结构。Chen等(2009)利用近红外光谱系统(NIR systems)检测了151个芥蓝(*Brassica oleracea*)样品中的叶黄素和 β -胡萝卜素, 反射光谱(log 1/R)扫描范围为1 100–2 500 nm, 每间隔2 nm记录。de Oliveira等(2014)比较了近红外光谱(near infrared, NIR)和中红外光谱(mid-infrared spectroscopy, MIR)检测西番莲果(*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) β -胡萝卜素的优劣, 2种方法的结果都不令人满意。

4.3 拉曼光谱法

拉曼光谱(Raman spectrometry, RS)是一种散射光

谱。该法基于印度物理学家C V Raman所发现的拉曼散射效应, 即光通过透明介质时被分子散射的光发生频率变化, 频率位移与发生散射的分子结构有关, 而应用于物质结构分析的一种方法。RS无需样品制备, 操作简便、测试时间短且灵敏度较高。由于水的拉曼散射微弱, RS是研究水溶液中生物样品的理想工具。Lawaetz等(2016)采用RS结合偏最小二乘法对胡萝卜(*Daucus carota*)中的类胡萝卜素进行了无损快速测定, 该法适合橙色胡萝卜的早期预测和分级。

4.4 高效液相色谱-核磁共振法

高效液相色谱-核磁共振法(high performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance, HPLC-NMR)通过适当的接口技术, 将HPLC高效分离能力与NMR能够提供待测物丰富结构信息的功能结合起来, 用于混合物中未知化合物的结构鉴定技术。与传统的离线NMR相比, 在线NMR检测可以防止样品在分离后至检测期间的结构变化, 并能够缩短NMR检测时间。HPLC-NMR始于20世纪80年代, 随着NMR不断发展, 该技术在未知化合物结构鉴定中的应用日益广泛。目前对类胡萝卜素的鉴定仍以离线NMR为主(Jayaprakasha and Patil, 2016; Masetti et al., 2017; Agócs et al., 2018; Maulidiani et al., 2018), 在线HPLC-NMR仍然处于探索和完善阶段。Putzbach等(2005)采用毛细管高效液相色谱与微线圈磁共振波谱联用(HPLC-NMR)方法测定了小型菠菜(*Spinacia oleracea*)样品中的类胡萝卜素, 高特异性样品制备技术-基质固相分散(MSPD)结合高选择性C₃₀反相HPLC-NMR法使得鉴定微量天然化合物成为可能; 本文对标准溶液中5种类胡萝卜素和菠菜样品中2种类胡萝卜素的鉴定证明了该新方法的潜力。类胡萝卜素的分离是在自填充熔融石英的毛细管中进行, 用丙酮和水组成的二元溶剂梯度洗脱。该微型化系统允许使用全氟化溶剂进行在线HPLC-NMR, 在停流模式下得到的各种类胡萝卜素的¹H NMR谱, 给出了低纳克范围内样品高信噪比。结构阐明所需的所有参数(如多重结构、耦合常数和积分值)都可以清楚地检测出来。Sivathanu和Palaniswamy (2012)采用HPLC-NMR以及LC-APCI-MS法纯化并鉴定了土生绿球藻(*Chlorococcum humicola*)的类胡萝卜素, 主要包括紫黄质、虾青素、叶黄素、玉米黄质、 α -胡萝卜素和

β -胡萝卜素。

5 小结与展望

类胡萝卜素是所有光合生物及一些非光合原核生物和真菌合成的亲脂性天然色素,对植物、动物和人都具有广泛的生物学作用。近年来,随着对类胡萝卜素制品需求的增加,充分开发利用植物源类胡萝卜素成为必然趋势。而随着可提取类胡萝卜素种类的增加,对其精准定性定量分析成为未来研究的重要课题。目前,在类胡萝卜素提取、分离纯化、含量测定和结构鉴定方面取得了一些重要进展,尤其是组合提取法、固相微萃取技术、超临界流体萃取技术、高效液相色谱-质谱联用技术和高效液相色谱-核磁共振联用技术等对植物类胡萝卜素的提取与分析具有里程碑意义。而随着现代仪器分析技术的进步以及组学工具和大数据技术的广泛应用,必将会有更方便和更高效的类胡萝卜素分析技术涌现。

参考文献

- 曹洪玉 (2009). 薄层层析法对药物成分的剖析. 赤峰学院学报(自然科学版) **25**(12), 31–34.
- 范文秀, 李新峰, 朱芳坤 (2004). 薄层层析-分光光度法测定南瓜中 β -胡萝卜素. 光谱实验室 **21**, 1218–1220.
- 高洁, 黄春辉, 曲雪艳, 辜青青, 徐小彪 (2013). 微波法提取猕猴桃果实中类胡萝卜素的工艺研究. 北方园艺 (1), 11–14.
- 胡海涛, 程珍霞, 李玲艳, 陈建华, 杨玲 (2016). 胡颓子属5种植物果实主要类胡萝卜素成分及含量. 植物学报 **51**, 306–310.
- 胡丽松, 吴刚, 郝朝运, 范睿, 伍宝朵, 谭乐和 (2017). 菠萝蜜类胡萝卜素检测方法研究及呈色物质分析. 热带作物学报 **38**, 950–956.
- 黄昕蕾, 李晓东, 孙国峰, 林秦文, 张金政, 陈段芬 (2013). 萱草花色素的超声波辅助提取及其稳定性研究. 山西农业科学 **41**, 440–445.
- 惠伯棣, 欧阳清波, 曾悦 (2002). 植物食品中类胡萝卜素的高压液相色谱检测. 中国食品添加剂 (5), 72–82.
- 金思, 马空军 (2017). 超声波辅助提取类胡萝卜素研究进展. 食品研究与开发 **38**(9), 192–197.
- 康保珊, 赵文恩, 焦风云, 张软爱 (2007). 不同提取溶剂系统对类胡萝卜素总含量的影响. 食品工业科技 (1), 84–86.
- 康迎春, 尹跃, 赵建华, 刘兰英 (2014). HPLC法测定枸杞鲜果中主要类胡萝卜素组成. 食品工业 **35**(12), 270–273.
- 李爱峰, 刘宁宁, 柳仁民 (2008). 高速逆流色谱原理及其在天然产物化学成分分离中的应用研究进展. 理化检验-化学分册 **44**, 481–487, 489.
- 李巧玲 (2003). 微波萃取技术在天然食用色素提取上的应用. 食品科技 (10), 60–61, 64.
- 李晓银 (2006). 柿子皮中类胡萝卜素化合物的分离鉴定及稳定性研究. 硕士论文. 西安: 西北工业大学. pp. 15.
- 廖春燕, 磨文龙 (2009). 微波法提取橘皮中类胡萝卜素的工艺研究. 安徽农业科学 **37**, 15981–15983.
- 林魁, 徐永 (2015). LED照明对植物体内功能性化学物质积累的影响. 植物学报 **50**, 263–271.
- 刘长付, 陈媛梅 (2013). 超声波法提取西红柿中类胡萝卜素的工艺优化. 食品工业 **34**(8), 76–80.
- 刘燕, 高健洲, 高荣孚, 彭金根, 郑国明 (2013). 一种利用吸收光谱测定植物活体叶片中叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量的方法. 中国专利, CN201310018129.0. 2013-05-22.
- 莫玉楠, 张鲁刚, 王国芳 (2014). 橙色大白菜类胡萝卜素提取与测定方法研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版) **42**, 206–214.
- 孙福东, 王淑玲, 王英姿 (2008). 膜分离技术在中药提取与制剂研究中的应用. 齐鲁药事 **27**, 226–228.
- 王宪青, 徐倩, 余善鸣, 姚旭, 刘妍妍 (2004). 番茄红素的简便提取方法及抗氧化效果的研究. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版) **20**, 103–105.
- 王星, 牛黎莉, 王晓璇, 周美, 张盛贵 (2014). 皂化工艺对枸杞皮渣中类胡萝卜素提取效果的影响. 食品与生物技术学报 **33**, 709–714.
- 吴有锋, 马世震, 谭亮, 冯海生, 李彩霞 (2016). 柴达木枸杞类胡萝卜素提取工艺优化及抗氧化活性研究. 食品工业科技 **37**, 250–256.
- 徐响, 刘光敏, 王琦, 高彦祥 (2007). 反相HPLC法测定沙棘全果油中类胡萝卜素. 食品工业科技 (12), 206–207, 215.
- 张卫红, 李朋成, 徐素梅, 高超, 马空军 (2014). 响应面优化超声波-混合溶剂法提取万寿菊中类胡萝卜素工艺条件. 食品科技 **39**(3), 164–168, 172.
- 张小明, 贾艳青, 许春潮, 牟德华 (2010). 类胡萝卜素纯化及分析技术最新研究进展. 食品工程 (4), 6–9.
- 赵薪鑫, 焦芳, 孙国峰, 张金政 (2017). 萱草花瓣中类胡萝卜素分析样品的制备及UPCC-MS检测方法研究. 植物研究

- 37, 926–932.
- 邹德喜, 严彪, 李贺 (2013). 不同品种沙棘果实的 β -胡萝卜素测定与分析. *辽宁农业科学* (3), 22–24.
- Agócs A, Murillo E, Turcsi E, Béni S, Darcsi A, Szapannos Á, Kurtán T, Deli J (2018). Isolation of allene carotenoids from mamey. *J Food Compos Anal* **65**, 1–5.
- Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends Anal Chem* **56**, 49–73.
- Baldermann S, Ropeter K, Köhler N, Fleischmann P (2008). Isolation of all-trans lycopene by high-speed counter-current chromatography using a temperature-controlled solvent system. *J Chromatogr A* **1192**, 191–193.
- Burgos G, Salas E, Amoros W, Auqui M, Muñoa L, Kimura M, Bonierbale M (2009). Total and individual carotenoid profiles in *Solanum phureja* of cultivated potatoes: I. Concentrations and relationships as determined by spectrophotometry and HPLC. *J Food Compos Anal* **22**, 503–508.
- Chen BH, Yang SH, Han LH (1991). Characterization of major carotenoids in water convolvulus (*Ipomoea aquatica*) by open-column, thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **543**, 147–155.
- Chen JP, Tai CY, Chen BH (2004). Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). *J Chromatogr A* **1054**, 261–268.
- Chen XJ, Wu JG, Zhou SJ, Yang YJ, Ni XL, Yang J, Zhu ZJ, Shi CH (2009). Application of near-infrared reflectance spectroscopy to evaluate the lutein and β -carotene in Chinese kale. *J Food Compos Anal* **22**, 148–153.
- Chiu MC, de Moraes Coutinho C, Gonçalves LAG (2009). Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. *Desalination* **245**, 783–786.
- Choudhari SM, Ananthanarayan L (2007). Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chem* **102**, 77–81.
- de Azevedo-Meleiro CH, Rodriguez-Amaya DB (2005). Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *J Food Compos Anal* **18**, 845–855.
- de Jesús Ornelas-Paz J, Yahia EM, Gardea AA (2008). Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCI⁺-time-of-flight mass spectrometry. *Postharvest Biol Technol* **50**, 145–152.
- de Oliveira GA, de Castilhos F, Renard CMGC, Bureau S (2014). Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Res Int* **60**, 154–162.
- Delpino-Rius A, Eras J, Marsol-Vall A, Vilaró F, Balcells M, Canela-Garayoa R (2014). Ultra performance liquid chromatography analysis to study the changes in the carotenoid profile of commercial monovarietal fruit juices. *J Chromatogr A* **1331**, 90–99.
- Dugo P, Herrero M, Kumm T, Giuffrida D, Dugo G, Mondello L (2008). Comprehensive normal-phase \times reversed-phase liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection for the analysis of free carotenoids and carotenoid esters from mandarin. *J Chromatogr A* **1189**, 196–206.
- Dugo P, Škeriková V, Kumm T, Trozzi A, Jandera P, Mondello L (2006). Elucidation of carotenoid patterns in citrus products by means of comprehensive normal-phase \times reversed-phase liquid chromatography. *Anal Chem* **78**, 7743–7750.
- Etzbach L, Pfeiffer A, Weber F, Schieber A (2018). Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MSⁿ. *Food Chem* **245**, 508–517.
- Fraser PD, Bramley PM (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**, 228–265.
- Giuffrida D, Dugo P, Torre G, Bignardi C, Cavazza A, Corradini C, Dugo G (2013). Characterization of 12 *Cap-sicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem* **140**, 794–802.
- Giuffrida D, Zoccali M, Arigò A, Cacciola F, Roa CO, Dugo P, Mondello L (2018). Comparison of different analytical techniques for the analysis of carotenoids in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Arch Biochem Biophys* **646**, 161–167.
- Goula AM, Adamopoulou MVA, Kaderides K (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrason Sonochem* **34**, 821–830.
- Goupy P, Vian MA, Chemat F, Caris-Veyrat C (2013). Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Ind Crops Prod* **44**, 496–510.

- Ho KKHY, Ferruzzi MG, Liceaga AM, Martín-Gonzalez MFS (2015). Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: effect of extraction conditions on all-*trans* and *cis*-isomer yields. *LWT-Food Sci Technol* **62**, 160–168.
- Hosseini SRP, Tavakoli O, Sarrafzadeh MH (2017). Experimental optimization of SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Dunaliella salina*. *J Supercrit Fluids* **121**, 89–95.
- Hughes DA (2001). Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition* **17**, 823–827.
- Inbaraj BS, Lu H, Hung CF, Wu WB, Lin CL, Chen BH (2008). Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. *J Pharm Biomed Anal* **47**, 812–818.
- Jayaprakasha GK, Patil BS (2016). A metabolomics approach to identify and quantify the phytochemicals in watermelons by quantitative ¹H-NMR. *Talanta* **153**, 268–277.
- Kao TH, Loh CH, Inbaraj BS, Chen BH (2012). Determination of carotenoids in *Taraxacum formosanum* by HPLC-DAD-APCI-MS and preparation by column chromatography. *J Pharm Biomed Anal* **66**, 144–153.
- Kim JS, An CG, Park JS, Lim YP, Kim S (2016). Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food Chem* **201**, 64–71.
- Lawaetz AJ, Christensen SMU, Clausen SK, Jørnsgaard B, Rasmussen SK, Andersen SB, Rinnan Å (2016). Fast, cross cultivar determination of total carotenoids in intact carrot tissue by Raman spectroscopy and Partial Least Squares calibration. *Food Chem* **204**, 7–13.
- Li HY, Deng ZY, Liu RH, Loewen S, Tsao R (2012). Ultra-performance liquid chromatographic separation of geometric isomers of carotenoids and antioxidant activities of 20 tomato cultivars and breeding lines. *Food Chem* **132**, 508–517.
- Lin CH, Chen BH (2003). Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1012**, 103–109.
- Masetti O, Ciampa A, Nisini L, Sequi P, Dell'Abate MT (2017). A multifactorial approach in characterizing geographical origin of Sicilian cherry tomatoes using ¹H-NMR profiling. *Food Res Int* **100**, 623–630.
- Maulidiani M, Mediani A, Abas F, Park YS, Park YK, Kim YM, Gorinstein S (2018). ¹H NMR and antioxidant profiles of polar and non-polar extracts of persimmon (*Diospyros kaki* L.)—metabolomics study based on cultivars and origins. *Talanta* **184**, 277–286.
- Oliveira CS, Gomes FS, Constant LS, Silva LFM, Godoy RLO, Tonon RV, Cabral LMC (2016). Integrated membrane separation processes aiming to concentrate and purify lycopene from watermelon juice. *Innov Food Sci Emerg Technol* **38**, 149–154.
- Poojary MM, Passamonti P (2015). Optimization of extraction of high purity all-*trans*-lycopene from tomato pulp waste. *Food Chem* **188**, 84–91.
- Putzbach K, Krucker M, Grynbaum MD, Hentschel P, Webb AG, Albert K (2005). Hyphenation of capillary high-performance liquid chromatography to microcoil magnetic resonance spectroscopy—determination of various carotenoids in a small-sized spinach sample. *J Pharm Biomed Anal* **38**, 910–917.
- Rodriguez-Concepcion M, Avalos J, Bonet ML, Boronat A, Gomez-Gomez L, Hornero-Mendez D, Limon MC, Meléndez-Martínez AJ, Olmedilla-Alonso B, Palou A, Ribot J, Rodrigo MJ, Zacarias L, Zhu CF (2018). A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog Lipid Res* **70**, 62–93.
- Saini RK, Keum YS (2018). Carotenoid extraction methods: a review of recent developments. *Food Chem* **240**, 90–103.
- Schex R, Lieb VM, Jiménez VM, Esquivel P, Schweiggert RM, Carle R, Steingass CB (2018). HPLC-DAD-APCI/ESI-MSⁿ analysis of carotenoids and α-tocopherol in Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits of varying maturity stages. *Food Res Int* **105**, 645–653.
- Shi J, Yi C, Ye XQ, Xue S, Jiang YM, Ma Y, Liu DH (2010). Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. *LWT-Food Sci Technol* **43**, 39–44.
- Sivathanu B, Palaniswamy S (2012). Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. *Bio-medicine and Preventive Nutrition* **2**, 276–282.
- Strati IF, Gogou E, Oreopoulou V (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food Bioprod Process* **94**, 668–674.
- Turcsi E, Nagy V, Deli J (2016). Study on the elution order of carotenoids on endcapped C₁₈ and C₃₀ reverse silica stationary phases. A review of the database. *J Food Compos Anal* **47**, 101–112.
- van Breemen RB, Dong LL, Pajkovic ND (2012). Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spec-

trometry of carotenoids. *Int J Mass Spectrom* **312**, 163–172.

Xu H, Jia L (2009). Capillary liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins and β -carotene in combination with in-tube solid-phase microextraction. *J Chromatogr B* **877**, 13–16.

Yara-Varón E, Fabiano-Tixier AS, Balcells M, Canela-Garayoa R, Bily A, Chemat F (2016). Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. *RSC Adv* **6**, 27750–27759.

Zaghdoudi K, Framboisier X, Frochot C, Vanderesse R,

Barth D, Kalthoum-Cherif J, Blanchard F, Guiavarc'h Y (2016). Response surface methodology applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of carotenoids from *Persea indica* (*Diospyros kaki* L.). *Food Chem* **208**, 209–219.

Zheng HW, Zhang QY, Quan JP, Zheng Q, Xi WP (2016). Determination of sugars, organic acids, aroma components, and carotenoids in grapefruit pulps. *Food Chem* **205**, 112–121.

Zhong LJ, Gustavsson KE, Oredsson S, Glab B, Yilmaz JL, Olsson ME (2016). Determination of free and esterified carotenoid composition in rose hip fruit by HPLC-DAD-APCI⁺-MS. *Food Chem* **210**, 541–550.

Advances in Extraction and Analysis Technologies of Plant Carotenoids

Qing He^{1,2}, Guofeng Sun², Qinwen Lin², Xiaodong Li^{2*}, Jinzheng Zhang^{2*}

¹Patent Examination Collaborating Beijing Center of the Patent Office, China National Intellectual Property Administration, Beijing 100160, China; ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract Carotenoids are lipophilic natural pigments, which synthesized by all photosynthetic organisms and some non-photosynthetic prokaryotes and fungi, and have a wide range of biological effects on plants, animals and humans. With the rapid development of modern analytical techniques, more and more carotenoids will be discovered and utilized. This article systematically elaborated the latest research progresses in the extraction, isolation and purification, content determination and structure identification of plant carotenoids in order to provide technical support for effective development and utilization of plant carotenoids.

Key words carotenoid, extraction, isolation and purification, content determination, structure identification

He Q, Sun GF, Lin QW, Li XD, Zhang JZ (2018). Advances in extraction and analysis technologies of plant carotenoids. *Chin Bull Bot* **53**, 700–709.

* Authors for correspondence. E-mail: lixcds1234@ibcas.ac.cn; caohua@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)