

# 西瓜中类胡萝卜素的分离与分析

胡利强<sup>1</sup>, 郭晓伟<sup>1</sup>, 赵文恩<sup>2\*</sup>, 王军伟<sup>3</sup>, 张广瑞<sup>3</sup>

(1. 新乡学院 化学与化工学院, 河南 新乡 453003; 2. 郑州大学 化学工程与能源学院,  
河南 郑州 450001; 3. 河南心连心化肥有限公司, 河南 新乡 453000)

**摘要:** 采用超声波辅助提取法从不同瓤色西瓜果肉中提取类胡萝卜素, 经柱色谱分离和重结晶纯化, 获得纯度为 90% 左右的番茄红素、 $\beta$ -胡萝卜素和  $\zeta$ -胡萝卜素, 用作分析的标样。采用高效液相色谱法, 通过特征吸收光谱和保留时间鉴别, 初步分析西瓜中类胡萝卜素的组成。结果表明, 红瓤西瓜中的类胡萝卜素以番茄红素(18.55%)和  $\beta$ -胡萝卜素为主(11.71%); 黄瓤西瓜中含较多新黄质(52.02%); 白瓤西瓜中不含番茄红素。

**关键词:** 西瓜; 类胡萝卜素; 高效液相色谱法

**中图分类号:** S651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)09-0150-07

## Separation and Analysis of Carotenoids in Watermelon Flesh

HU Li-qiang<sup>1</sup>, GUO Xiao-wei<sup>1</sup>, ZHAO Wen-en<sup>2\*</sup>, WANG Jun-wei<sup>3</sup>, ZHANG Guang-rui<sup>3</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering of Xinxiang University, Xinxiang 453003, China;  
2. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;  
3. Henan Xinlianxin Fertiliser Limited Company, Xinxiang 453000, China)

**Abstract:** Carotenoids were extracted from the fruit flesh of five watermelon varieties using ultrasonic method, and separated by open-column chromatography using recrystallization. Lycopene,  $\beta$ -carotene, and  $\zeta$ -carotene in 90% purity were obtained and used in analysis of watermelon carotenoids as the standard samples. Watermelon carotenoids were analyzed by high performance liquid chromatography with the photodiode array detector. The results showed that lycopene (18.55%) and  $\beta$ -carotene (11.71%) were the major pigments in the red-fleshed watermelon. In the yellow-fleshed watermelon, the neoxanthin content (52.02%) was relatively high. Lycopene was not detected in the white-fleshed watermelon.

**Key words:** Watermelon; Carotenoids; HPLC

西瓜是大众化的水果之一, 也是夏令水果中食用量最大的, 因此, 国内外西瓜的种植面积和产量都十分巨大。瓜瓤颜色作为西瓜的重要性状, 一直以来就受到人们的关注。西瓜的红、粉、橙、黄、白瓤色缘于所含类胡萝卜素种类与量的不同。多年研究表明, 类胡萝卜素不仅能赋予动植物鲜艳的色彩, 还是生物抗氧化剂, 具有重要的生物学功能, 可以清除自由基, 抑制细胞增殖, 防止细胞恶性转化, 预防癌症等,  $\beta$ -胡萝卜素等是维生素 A 前体, 可在体内转化为

维生素 A<sup>[1-3]</sup>。与其他水果蔬菜一样, 类胡萝卜素是西瓜所含的主要功能成分与微量营养素。研究分析西瓜中类胡萝卜素组成, 可对综合评价西瓜品质, 以及开发西瓜中的类胡萝卜素提供借鉴与依据。

分析西瓜类胡萝卜素组成的研究报道极为有限<sup>[4]</sup>。由于近年番茄红素的营养保健作用受到更多关注, 有较多研究是通过分光光度法测定红瓤西瓜中的番茄红素<sup>[5-10]</sup>。在高效液相色谱技术建立之前, 分析西瓜的类胡萝卜素组成是通过开放柱色谱法实现的, 这

收稿日期: 2011-03-15

作者简介: 胡利强(1980-), 女, 河南郑州人, 助教, 硕士, 主要从事天然产物有效成分分离与分析检测研究。

E-mail: huliqiang2008@126.com

\* 通讯作者: 赵文恩(1950-), 男, 山西临猗人, 教授, 博士, 主要从事天然产物有效成分分离与分析检测研究。

E-mail: zhaowenen@126.com

对于缺乏昂贵设备的实验室而言,仍不失为一种有效的分析方法<sup>[11-13]</sup>。高效液相色谱技术(HPLC)因具有快速、高效、更高的分辨率和准确性的优势已用于西瓜类胡萝卜素分析。Tadmor 等<sup>[14]</sup>用 HPLC 分析了红、黄、橙色西瓜的类胡萝卜素,并与已知番茄果实颜色突变体的类胡萝卜素模式进行比较。红色瓜瓢(包括红橙)主要含番茄红素,黄橙色瓜主要含前番茄红素与八氢番茄红素及 $\zeta$ -胡萝卜素,品种代号为 NY162003 的西瓜中主含 $\beta$ -胡萝卜素。Perkins-Veazie 等<sup>[15]</sup>使用 C30 柱通过 HPLC 法分析了红瓢瓜的类胡萝卜素分布,番茄红素占总类胡萝卜素的 84%~97%,其中顺-番茄红素(主要为 5-顺番茄红素)占总番茄红素的 2%~18%。 $\beta$ -胡萝卜素与六氢番茄红素分别占总类胡萝卜素的 2%~11%与 0.5%~7%,存在的八氢番茄红素、 $\gamma$ -胡萝卜素与 $\zeta$ -胡萝卜素因含量太低未能定量。该研究中未能分辨出用 C<sub>18</sub> 柱在其他西瓜研究中可发现的叶黄素(1~2 mg/kg)峰,也未分辨出链孢菌红素。目前用 HPLC 法研究西瓜的报道中能分辨出来的类胡萝卜素种类少,对白瓢瓜更极少见有报道。本试验分离纯化番茄红素、 $\beta$ -胡萝卜素和 $\zeta$ -胡萝卜素这 3 种西瓜中的主要类胡萝卜素并用作标样,结合二极管阵列检测,通过 HPLC 法分析 3 种瓢色西瓜类胡萝卜素组成,分辨检测到了更多的类胡萝卜素,在黄瓢瓜中更是发现主要类胡萝卜素是以前未见有报道的新黄质。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

红瓢西瓜早花(中期库号 ZXG00147)、黄瓢西瓜 307 超风(中期库号 ZXG00318)和白瓢西瓜三白(中期库号 ZXG00879)由中国农业科学院郑州果树研究所国家西瓜甜瓜中期库提供。

石油醚、丙酮、无水乙醇、苯、甲醇、乙醇、正己烷、氧化镁和硅胶均为国产分析纯。

HITACHI 55P-72 离心机(日立公司),UV-2102 PC 型紫外分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司),高效液相色谱仪(Waters 1525 液体传送系统,PAD-2998 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司),KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 西瓜类胡萝卜素的提取

称取瓜瓢 400 g,置于九阳料理机中打碎,加入适量氯化钠静置 20 min,10 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,沉淀物移入具塞棕色试剂瓶中,加入石油醚/丙酮(2:1)混合液 400 mL,盖上塞子静置暗处室温(20℃)超声提取多次(一般 3 次)直至提取液无色,合并所得提取液,于 35℃下减压旋蒸至干,残

留物用少量石油醚转移至 10 mL 容量瓶中, $N_2$  气流吹干,密封后保存于-20℃冰箱中,备以制取类胡萝卜素标样。整个操作过程避光。

用相同的方法分别从 50 g 红、黄、白色瓜瓢提取类胡萝卜素,并分别定溶于流动相定容至 1 mL,用于类胡萝卜素的 HPLC 分析。

### 1.3 类胡萝卜素的分离纯化

称取硅胶和氧化镁各 10 g,110℃活化 2 h,混匀后干法装柱。将 1.2 中提取的色素溶于少量石油醚中,然后加到经石油醚预洗的硅胶氧化镁柱上,用不同浓度的丙酮/石油醚混合液进行洗脱,每 10 mL 收集 1 次洗出液,测定其紫外可见吸收并对照标准光谱图,初步判断洗脱液的成份,将相同组份洗脱液合并,35℃下减压旋蒸浓缩, $N_2$  气吹干,密封保存于-20℃冰箱中。整个操作过程避光。各种类胡萝卜素在开放柱上的色带及其洗脱液组成如表 1 所示。

表 1 柱色谱分离色素区带的颜色与其洗脱剂组成

编码	类胡萝卜素	色带颜色	洗脱剂
1	六氢番茄红素	无色	石油醚
2	$\beta$ -胡萝卜素	橙色	2%丙酮/石油醚
3	$\zeta$ -胡萝卜素	暗黄色	5%和 10%丙酮/石油醚
4	番茄红素	红色	20%和 30%丙酮/石油醚
5	叶黄素类	黄色	50%乙醇/石油醚
6	新黄质	桔黄色	20%和 30%丙酮/石油醚

把上述所得类胡萝卜素的粗分物,溶于二氯甲烷中至饱和,加入无水乙醇,将类胡萝卜素晶体析出<sup>[16]</sup>,过滤干燥即得纯度较高的番茄红素、 $\beta$ -胡萝卜素和 $\zeta$ -胡萝卜素产品, $N_2$  密封保存于-20℃冰箱中。

### 1.4 类胡萝卜素的 HPLC 和吸收光谱检测

HPLC 检测条件为色谱柱:Vydac201TP54C18 (4.6 mm×250 mm),流动相:A:甲醇-二氯甲烷-乙腈=7:2:7(V/V),B:甲醇,梯度洗脱:0 min: A:B=100:0, 2 min: A:B=90:10,4 min: A:B=80:20,8 min: A:B=50:50,10 min: A:B=20:80,15~30 min: A:B=0:100。进样量:10 mL,柱温:25℃,流量:1 mL/min。

由于西瓜中含有多种类胡萝卜素,大多数类胡萝卜素的吸收峰在 300~600 nm 处,所以选择 450 nm 作为检测波长;但 $\zeta$ -胡萝卜素的特征波长在 379、400、425 nm,故 $\zeta$ -胡萝卜素的检测波长定为 400 nm。

分离纯化的西瓜类胡萝卜素样品在紫外分光光度计上扫描出吸收光谱,HPLC 色谱图上峰样品的吸收光谱通过二极管阵列检测器在线收集。典型的类胡萝卜素紫外-可见光吸收图谱有 3 个吸收峰,右侧两峰之间最小值认作基线或零值,最长波长光吸收谱带的峰高叫做Ⅲ,中间的吸收谱带高(通常为 $\lambda_{max}$ )

叫做 II, 然后用百分率将光谱精细结构表示作峰高比 III/II, 用  $100 \times \text{III}/\text{II}$  来描述光谱图特征<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离纯化的西瓜类胡萝卜素检测结果

通过吸收光谱和高效液相色谱对分离纯化的样品进行检测。从图 1 可见, 在 400 nm 下经 HPLC 检测,  $\zeta$ -胡萝卜素的保留时间为 3.872 min, 与之对

应的吸收光谱三峰波长位置分别为 377.3、400.2、425.6 nm,  $100 \times \text{III}/\text{II}$  值 =  $(0.00098 - 0.00067) / (0.00103 - 0.00067) \times 100 = 86$ , 与文献[17]中  $\zeta$ -胡萝卜素的 379、400、425 nm 和 100 仅小有差异, 这可能是与手册中所用溶剂不同以及样品纯度还不够所致, 确定为  $\zeta$ -胡萝卜素。根据色谱图峰面积, 求得其纯度为 89.6%。

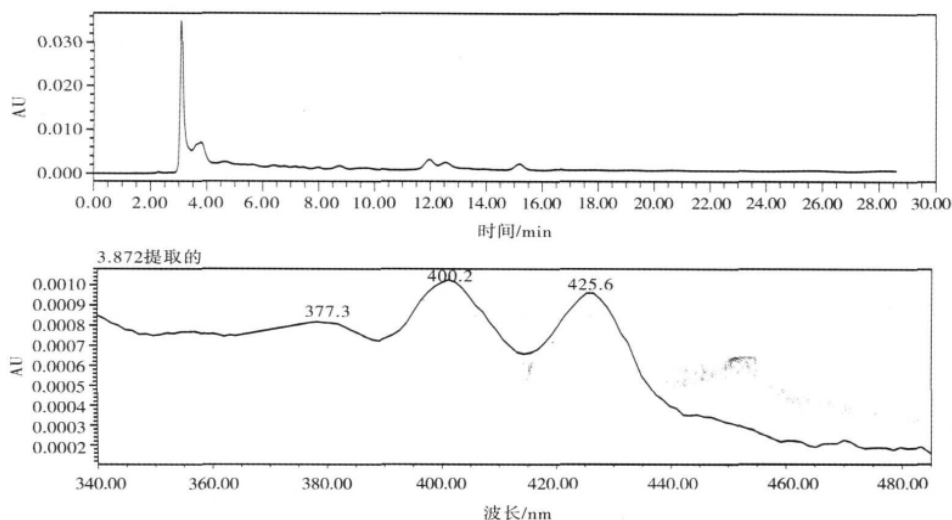


图 1 分离纯化的  $\zeta$ -胡萝卜素 HPLC 色谱(上)与紫外可见吸收光谱(下)

制备的  $\beta$ -胡萝卜素液相色谱检测保留时间为 13.265 min, 其紫外可见吸收光谱三峰波长位置为 428、454.6、480.1 nm,  $100 \times \text{III}/\text{II}$  值 =  $(0.74283 - 0.71386) / (0.84060 - 0.71386) \times 100 = 22.8$  (图 2),

与标准谱图中  $\beta$ -胡萝卜素的 425、450、477 nm 和 25 也有小差异, 同样可能是与标准谱图中所用溶剂不同以及样品纯度还不够所致, 仍确定为  $\beta$ -胡萝卜素, 测得样品纯度 92.3%。

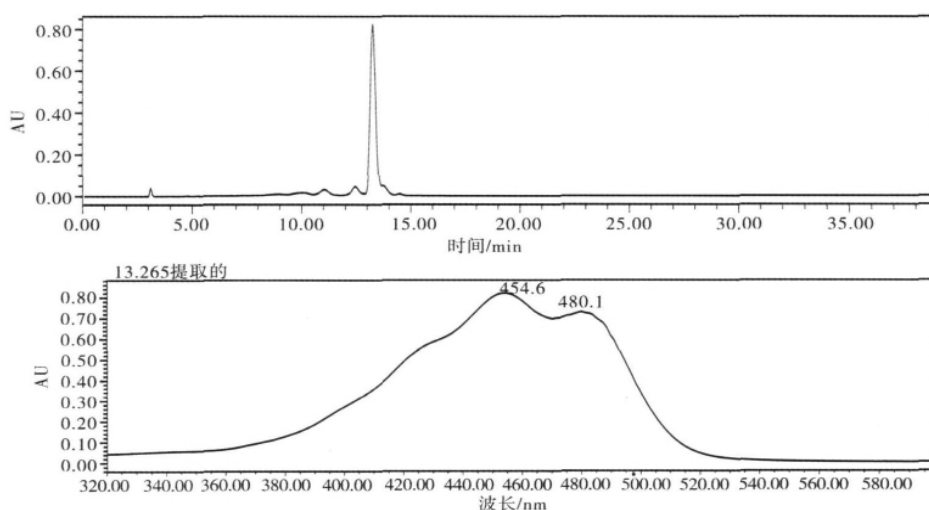


图 2 分离纯化的  $\beta$ -胡萝卜素 HPLC 色谱(上)与紫外可见吸收光谱(下)

制备的番茄红素液相检测其保留时间为 14.144 min, 吸收光谱三峰波长位置为 447.3、474.0、504.4 nm,  $100 \times \text{III}/\text{II}$  值 =  $(0.22132 - 0.15813) /$

$(0.24872 - 0.15813) \times 100 = 69$  (图 3), 与手册中番茄红素的 446、472、503 nm 和 65 差异很小, 确定为番茄红素, 测得样品纯度 91.2%。

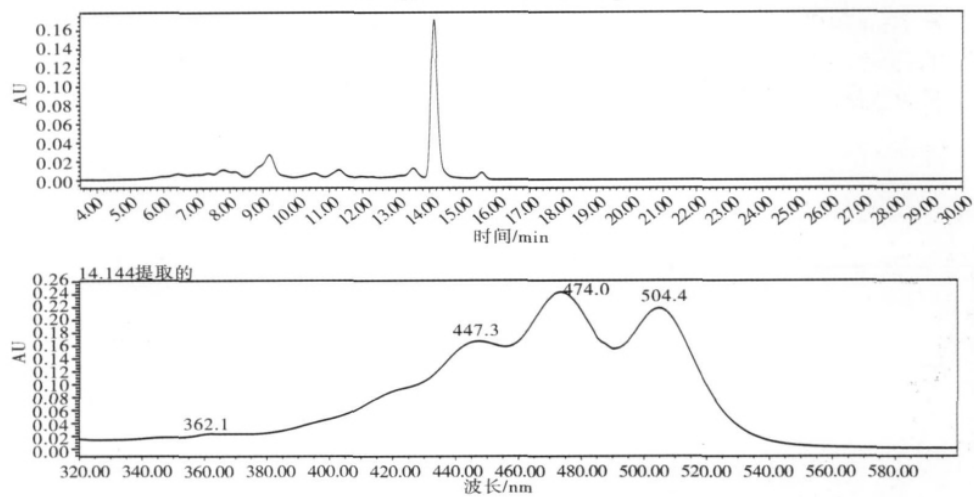


图 3 分离纯化的番茄红素 HPLC 色谱(上)与紫外可见吸收光谱(下)

2.2 西瓜中主要类胡萝卜素的色谱分析

西瓜中含有多种类胡萝卜素,由于目前商业上还无法获得每种类胡萝卜素的标样,本研究依据液相检测保留时间和在线吸收光谱扫描,通过与所得标样保留时间和标准谱图中已知类胡萝卜素吸收光谱及其特征吸收峰的波长数据比对,来鉴别液相图上每个吸收峰的类胡萝卜素的种类。

图 4 为早花西瓜样品液相色谱,其中吸收峰 7 和 8 的保留时间为 13.593、14.078 min,与制备的  $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素标样的 13.265、14.144 min 保留时间基本一致,而且其光谱的特征吸收峰值也与标准类胡萝卜素是基本吻合的,可以确定峰 7 和 8 为  $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素。参照表 2 中所列的类胡萝卜素的吸收峰文献值,推断图 4 中峰 1、2、3、5 和 9 分别为 5,8-环氧化  $\beta$ -胡萝卜素、 $\beta$ -玉米胡萝卜素、藏红花酸、 $\gamma$ -胡萝卜素和 1,2-环氧化番茄红素。峰 4 和 6 所对应的紫外可见光谱图呈现类胡萝卜素三指峰特征,似为未知的类胡萝卜素。

此外,本试验用柱色谱法分析西瓜中的类胡萝卜素,曾检测到早花西瓜样品中含有  $\zeta$ -胡萝卜素<sup>[12]</sup>,而用 HPLC 分析时却没有检测到  $\zeta$ -胡萝卜素,原因可能是

用 HPLC 分析时每次上样量只有 10 mL,因  $\zeta$ -胡萝卜素含量低,没有达到仪器的检测限。

图 5 是 307 超风黄瓢西瓜样品的液相色谱,保留时间为 3.761 min 的峰 1 对应的吸收光谱图中峰波长位置为 417、439、468 nm 与新黄质的 415、439、467 nm 吻合,  $(0.01285-0.00903)/(0.01440-0.00903) \times 100 = 71$  的  $100 \times III/II$  值与新黄质 80 较为接近,可确定为新黄质。峰 2 的保留时间为 8.915 min,其对应的光谱图中吸收峰波长为 414、438、469 nm,在手册中未检测到与其对应的类胡萝卜素。除此外,液相色谱没有检测到其他类胡萝卜素。

图 6 是三白西瓜样品的液相色谱,保留时间为 8.915 min 的峰 1 对应的光谱图中吸收峰波长为 414、438、467 nm,它的保留时间和吸收峰波长值与 307 超风液相色谱图中的峰 2 的保留时间 8.915 min,吸收值 414、438、469 基本一致,很可能为同一种未知类胡萝卜素。

依色谱图峰面积计算含量可知(表 2),红瓢西瓜中主要类胡萝卜素为番茄红素 18.55%、1,2-环氧化番茄红素 12.7%和  $\beta$ -胡萝卜素 11.71%,其他类胡萝卜素含量较少;黄瓢西瓜里的主要类胡萝卜素为新黄质 52.02%;白瓢西瓜里的类胡萝卜素含量和种类都很少。

表 2 西瓜中类胡萝卜素的鉴别

西瓜品种	峰号	类胡萝卜素	保留时间/min	吸收峰/nm		100×Ⅲ/Ⅱ		峰面积 百分比/%
				实测值	文献[18-19]值	实测值	文献[18-19]值	
早花	1	5,8-环氧化 $\beta$ -胡萝卜素	7.535	402,426,450	407,428,452	21	—	3.75
	2	$\beta$ -玉米胡萝卜素	8.019	406,428,453	406,428,454	32	—	4.99
	3	藏红花酸	9.327	412,436,463	413,435,462	48	—	18.12
	4	未知	10.222	426,450,479	—	13	—	6.16
	5	$\gamma$ -胡萝卜素	11.390	440,460,489	440,460,489	31	35	4.63
	6	未知	12.389	431,456,481	—	—	—	5.78
	7	$\beta$ -胡萝卜素	13.593	426,453,480	425,450,477	17.6	15	11.71
	8	番茄红素	14.078	445,472,503	444,470,502	61	65	18.55
	9	1,2-环氧化番茄红素	15.312	443,469,450	443,469,450	49	—	12.70
307 超风	1	新黄质	3.761	417,439,468	415,439,467	63	80	52.02
	2	未知	8.915	414,438,469	—	70	—	9.53
三白	1	未知	8.915	414,438,467	—	37	—	22.66

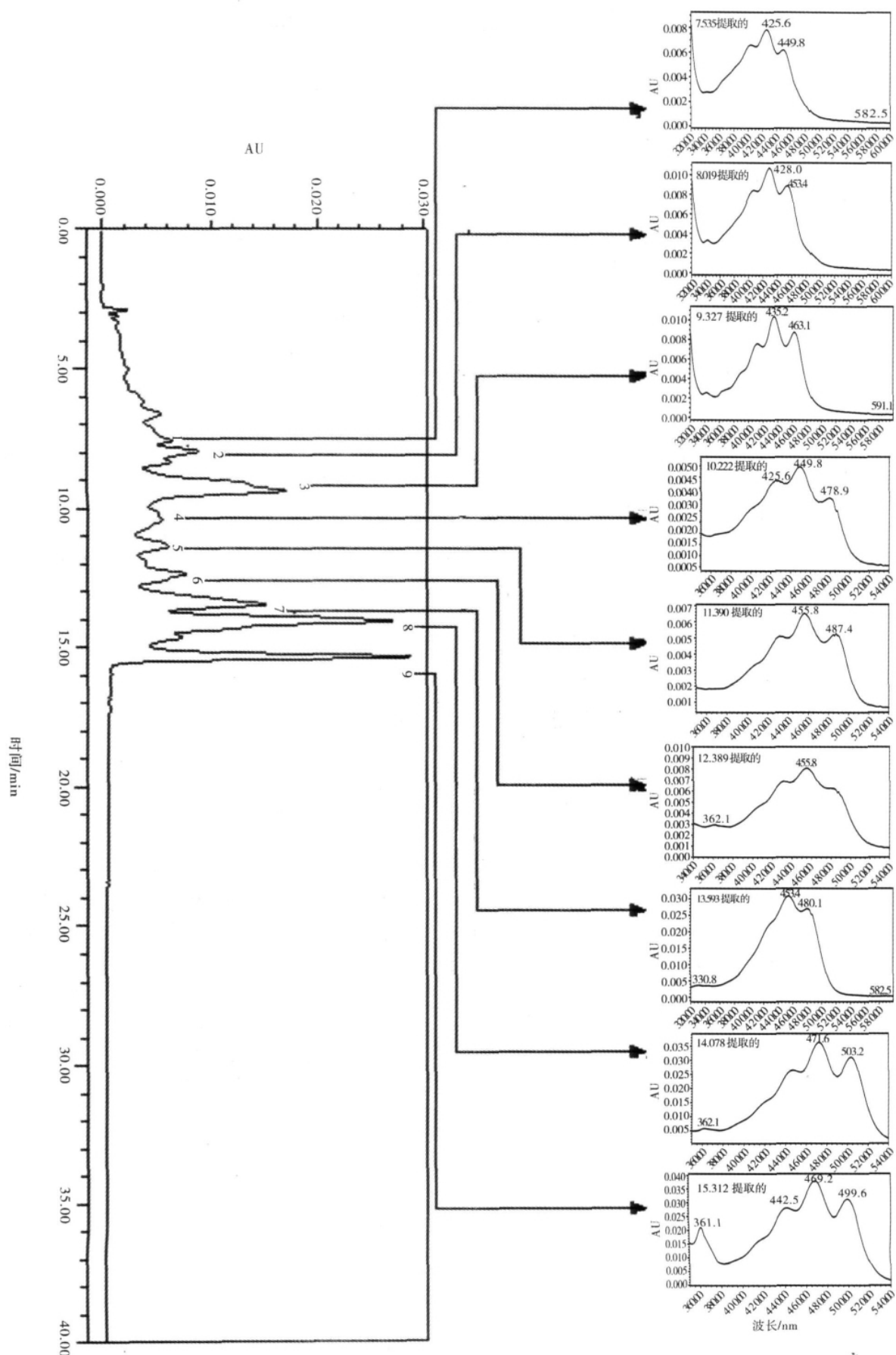


图 4 早花西瓜样品液相色谱

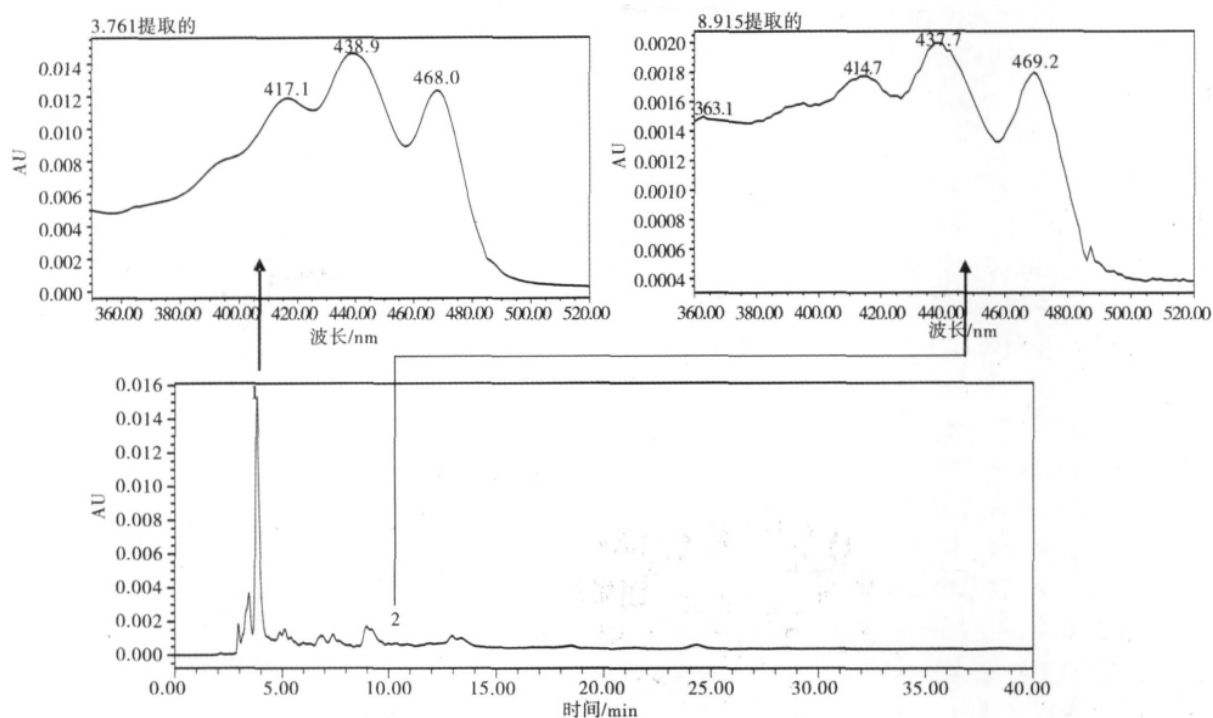


图 5 307 超风西瓜样品液相色谱

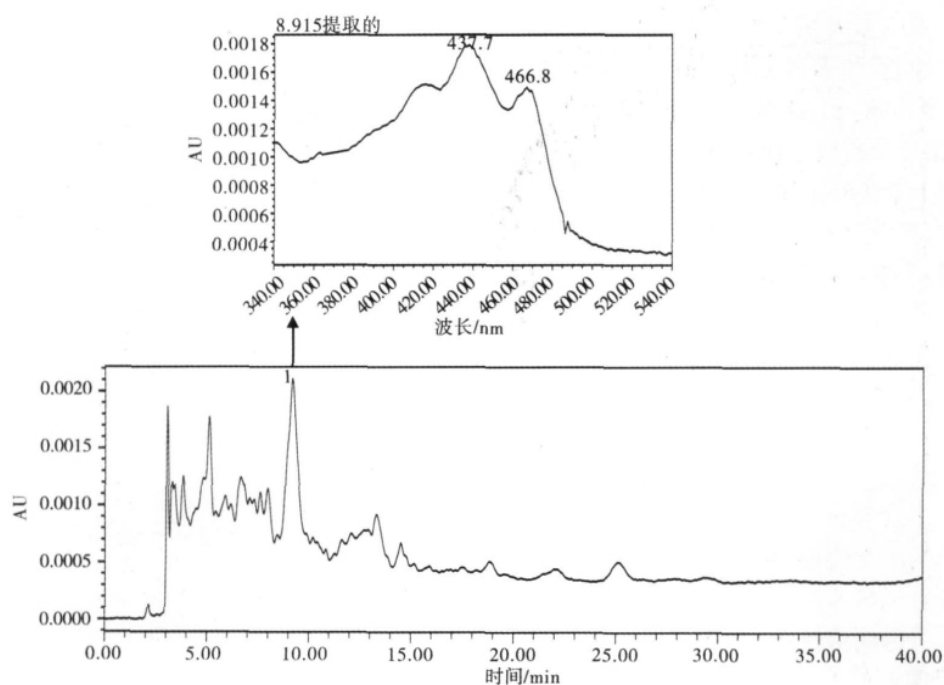


图 6 三白西瓜样品液相色谱

### 3 结论与讨论

本研究通过高效液相色谱技术分析测定西瓜中的类胡萝卜素,结果表明,所采用的色谱系统,包括选择的流动相,可使样品中的各种类胡萝卜素在 20 min 内得到较好分离,表明本方法适用于西瓜中

类胡萝卜素的分析测定。

本研究根据各种类胡萝卜素的保留时间和特征峰的吸收波长来确定西瓜中的类胡萝卜素的种类。试验中,番茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素标准品的保留时间与西瓜样品色谱图的吸收峰 7 和 8 的保留时间基本吻合,差异极小,这可能是因操作过程中柱温不稳定

所致;样品中其他 5 种类胡萝卜素的峰 1、2、3、5 和 9 所对应的紫外可见吸收光谱与文献报道虽不完全相同,但十分接近,可能是由于测定所用的溶剂体系不同,故有一定差异。

用柱色谱分离西瓜中的类胡萝卜素时,曾用紫外可见分光光度计检测到白瓢品种中含有六氢番茄红素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\zeta$ -胡萝卜素,黄瓢西瓜中除了检测到以上几种类胡萝卜素外,还含有番茄红素;而用液相色谱分析检测西瓜中的类胡萝卜素时,白瓢西瓜和黄瓢西瓜在 8.915 min 时都有一未知胡萝卜素的吸收峰,除此之外白瓢西瓜中几乎检测不到其他类胡萝卜素,黄瓢西瓜中仅检测到了新黄质,究其原因,可能是柱色谱分离时,上样量(从 400 g 西瓜中提取出的类胡萝卜素)较大,而液相色谱的上样量只有 10  $\mu$ L(从 0.5 g 西瓜中提取出的类胡萝卜素),色素含量相对很少,没达到高效液相色谱仪的检测限。而若液相色谱上样量过大,又会导致杂质含量过多,对类胡萝卜素吸收峰的判断产生影响,因此,在以后的研究中可通过改进样品前处理方法减少杂质影响,以取得更好的检测结果。

因为类胡萝卜素的标准样品价格昂贵,并且由于本身的稳定性差,故不宜长期保存。本研究成功制备出  $\zeta$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、番茄红素的纯品,用紫外光谱法和高效液相色谱法对 4 个品种西瓜中的类胡萝卜素进行了定性分析,通过对试验样品的横向比较,可以明显看出,红瓢西瓜类胡萝卜素含量相对较高,主要以番茄红素为主,而黄瓢西瓜中的类胡萝卜素主要是新黄质,白瓢瓜中只检测到一种未知的类胡萝卜素,且黄瓢及白瓢西瓜中类胡萝卜素含量很少。由此可以推测类胡萝卜素的含量多少与西瓜颜色的深浅有较为直接的关系。含量越多,颜色越深;反之,含量越少,颜色越淡。

尽管西瓜中含有很多种类胡萝卜素,但由于类胡萝卜素的标准品不全,不能保证将西瓜中所有类胡萝卜素分离鉴定出来。因此,应在以后的研究工作中进一步完善试验条件,并采用其他分离检测手段来对西瓜中的类胡萝卜素进行较准确地分析测量,以保证色素组分分析的完整性。比如在利用保留时间和紫外、荧光检测光谱特征图谱的基础上,再借助质谱(MS)、核磁共振(NMR)或红外光谱(IR)等技术来进行类胡萝卜素成分的精确鉴定,以提高分析结果的可靠性与精确性。

#### 参考文献:

- [1] 赵文恩,康保珊,焦凤云. 类胡萝卜素的抗癌作用与基因表达的联系[J]. 生物学杂志,2006,23(2):1-6.
- [2] 赵文恩,韩雅珊. 类胡萝卜素的生物学性质[J]. 生物学杂志,1998,15(3):1-3.
- [3] 侯耀兵,康保珊,黄进勇. 植物类胡萝卜素研究进展[J]. 中国瓜菜,2009(4):28-31.
- [4] 赵文恩,康保珊,胡国勤. 西瓜瓢类胡萝卜素研究进展[J]. 果树学报,2008,25(6):908-915.
- [5] 王镇,党选民. 小型西瓜果实中番茄红素含量的比较研究[J]. 长江蔬菜,2009(6):24-26.
- [6] 何楠,赵胜杰,刘文革. 施用钾肥对西瓜番茄红素的影响研究[J]. 长江蔬菜,2008(20):21-22.
- [7] 孙利祥,李建勇,卢钢. 西瓜番茄红素提取方法优化及含量分析[J]. 浙江农业学报,2006,18(1):42-45.
- [8] Dimitrovski D, Bicanic D, Luterotti S, *et al.* The concentration of trans-lycopene in: postharvest watermelon; An evaluation of analytical data obtained by direct methods [J]. Postharvest Biold Technol, 2010, 58: 21-28.
- [9] 高志勇. 番茄红素研究概况[J]. 中国瓜菜,2009(3):42-44.
- [10] 万学闪,刘文革,阎志红,等. 无籽西瓜果实不同部位维生素 C 和番茄红素含量测定[J]. 中国瓜菜,2009(3):4-9.
- [11] Tomes M L, Johnson K W, Hess M. The carotene pigment content of certain red fleshed watermelon [J]. Proc Am Soc Hort Sci, 1963, 82: 460-464.
- [12] Morgan R C. The carotenoids of Queensland fruits. Carotenes of the watermelon[J]. J Food Sci, 1967, 32: 275-278.
- [13] Jeffrey S W, Mantoura R F C, Wright S W. Phytoplankton pigments in Oceanography guidelines to modern methods [M]. UNESCO Publishing: Imprimerie Jouve, Mayenne, 1997.
- [14] Tadmor Y, King S, Levi A, *et al.* Comparative fruit colouration in watermelon and tomato[J]. Food Res Internat, 2005, 38: 837-841.
- [15] Perkins-Veazie P, Collins J K, Davis A R, *et al.* Carotenoid content of 50 watermelon cultivars[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 2593-2597.
- [16] 李伟,肖刚,丁霄霖. 番茄红素标准样品的制备及定性定量分析[J]. 食品与发酵工业, 2000, 28(9): 29-33.
- [17] Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Carotenoids handbook [M]. Basel: Birkhäuser, 2004.
- [18] Di Mascio P. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher[J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 274: 532-538.
- [19] Rodriguez-Amaya D B. A guide to carotenoid analysis in foods [M]. ILSI Press: Washington, DC, 2001.