

# 柱层析法纯化番茄红素的研究

娄天军 赵功玲 张 焱 付俊辉

河南科技学院 河南新乡 453003

**摘要:**用氧化铝作柱层析固定相,三步洗脱分离提纯番茄红素油树脂,得番茄红素晶体,经高压液相色谱检测知番茄红素的纯度为90%,同时还得到 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素等产品。

**关键词:**番茄红素,柱层析,纯化

## THE PURIFICATION OF LYCOPENE BY COLUMN-CHROMATOGRAPHY

LOU Tianjun ZHAO Gongling ZHANG Yan FU Junhui

Henan Institute of Science and Technology, Xinxing, 453003

**Abstract:** Using aluminum oxide as immobile phase of column- chromatography, lycopene oleoresin was separated through three- step elution programe. Needle-like crystals can be gained from the concentrated eluting liquid, in which the mass percentage of lycopene is 90% by measurement of HPLC. Other ingredients separated from oleoresin were  $\beta$ -carotene and zeaxanthin.

**Key words:** lycopene; column- chromatography; purification

番茄红素是一种类胡萝卜素,其价值不在于它的营养成分,而在于它的功能性作用。近20年的流行病学研究表明<sup>[1]</sup>,经常摄入含番茄红素丰富的食品能够预防多种癌症,进一步的研究表明<sup>[2]</sup>,番茄红素具有极强的抗氧化能力,可防治前列腺癌、肺癌等,调节细胞间通讯和活化免疫细胞。随着番茄红素优越生理功能的发现,其商业应用前景越来越广阔,如何大量获得番茄红素,尤其是高纯度番茄红素成为一个研究热点。目前,采用植物提取获得番茄红素的方法应用得较多,但这种方法只能获得番茄红素粗提物(番茄红素含量<10%)。要得到高纯度番茄红素,需进一步采用薄层层析法、柱层析法、高效液相色谱法等对粗提物进行纯化处理,这些纯化方法或效率较低或所需设备昂贵,难以满足大规模工业生产的要求。本文采用柱层析法,寻找到更为合适的洗脱液,提高了番茄红素的纯度。

## 1 材料、试剂与仪器设备

### 1.1 材料

番茄:新鲜,成熟,色泽深红一致,大小均一,圆形,质地坚实,表面光滑。

### 1.2 试剂

氯仿、环己烷、石油醚、苯、乙酸乙酯、无水硫酸钠、无水乙醇:均为分析纯,薄层层析用氧化铝、柱层析用氧化铝:青岛海洋化工厂,甲醇、乙腈、二氯

甲烷、苏丹红(Ⅱ):色谱纯。

### 1.3 仪器设备

高速组织捣碎机,高速离心机,电热恒温干燥箱,真空旋转蒸发器,电热恒温水浴振荡器,UV-1100紫外—可见分光光度计,显微镜,1100高效液相色谱仪。

## 2 试验方法

柱层析法纯化番茄红素的工艺流程:

溶剂提取番茄红素→过滤→滤液的浓缩→番茄红素粗制品→番茄红素粗制品的皂化→皂化液浓缩→番茄红素的柱层析分离→分离组分的浓缩→番茄红素产品及副产品

### 2.1 番茄红素粗制品的制备

番茄洗净擦干,用高速组织捣碎机捣碎,然后高速离心脱水。取浆体按1:2的比例加氯仿,在电热恒温水浴振荡器上于35℃下避光浸提两次,过滤,合并浸提液,一少部分稍浓缩(备用),其余用真空旋转蒸发器(低于70℃)全部驱除氯仿,得番茄红素粗制品(备用)。

### 2.2 番茄红素粗制品的皂化<sup>[7]</sup>

将番茄红素粗制品中按2:1的比例加入BHT,用正己烷溶解,搅拌均匀后加入等量于正己烷的经氢氧化钾饱和的乙醇液,在充氮条件下,于70℃恒温振荡20min。然后加入100mL的蒸馏水,使整个反

应体系分为两层:有机层和水层。上层为有机层,含有大部分番茄红素等不皂化物,下层为皂化物,有一些含有羟基类胡萝卜素和一些乳化了了的类胡萝卜素,将底层通过正己烷,加2倍水回收番茄红素。合并得到的正己烷溶液,用等量的水洗涤3~5次,以除去其中的碱,接着用乙醇液洗涤数次。用真空旋转蒸发器在70℃下驱除正己烷,得番茄红素粗制品皂化物(备用)。

### 2.3 番茄红素的柱层析分离

用苯溶液湿法装氧化铝柱15cm高(内径12.5mm),在装好的柱表面放上0.5cm厚的石英砂。将番茄红素粗制品溶于1~2ml苯中,加入柱顶,然后再加几毫升苯,打开活塞,当液面下降到石英砂表面时,加环己烷:石油醚(1:1)约30ml洗脱,待黄色物质从柱中完全除去,再用极性较大的乙酸乙酯洗脱下红色物质,最后用无水乙醇洗脱下剩余物质。收集各洗脱液组分,一少部分稍浓缩(备用),其余用真空旋转蒸发器全部驱除有机溶剂(备用)。

### 2.4 粗制品及柱层析分离组分的薄层层析

用薄层层析用氧化镁制作薄层板,作为固定相,以V(石油醚):V(丙酮)=65:35的混合液作展开剂。

在层析缸中展开分离原提取液及柱层析分离的三组分的浓缩物。

### 2.5 紫外—可见吸收光谱的扫描

将三步洗脱组分分别用氯仿、无水乙醇溶解进行紫外—可见吸收光谱扫描,获得柱层析分离的各组分的吸收光谱图。

### 2.6 高压液相色谱分析<sup>[3]</sup>

在V(乙腈):V(甲醇):V(二氯甲烷)=7:7:2的体系为流动相,检测波长为472nm,苏丹红(II)取代标准品番茄红素<sup>[4]</sup>的条件下分离、检测番茄红素。

## 3 结果与分析

### 3.1 粗制品及柱层析分离组分的薄层层析结果

氧化镁薄层板对粗制品的层析结果是在薄层板上呈现出清晰的5个点。粗制品的氧化镁板薄层层析结果见表1。分离出的5点中,第1、第2和第3点的物质的量少,第5点量稍大,红点4( $R_f=0.81$ )量最大。从颜色、 $R_f$ 值及量上看<sup>[6]</sup>,红点可能是番茄红素,黄点5( $R_f=0.90$ )可能是 $\beta$ -胡萝卜素,第1、第2点可能是玉米黄素和叶黄素,第3点可能是番茄红素的异构体。

表1 粗提液的薄层层析结果

	薄层层析出的5组分				
	1	2	3	4	5
颜色	黄	黄	浅红	红	黄
$R_f$ 值	0.42	0.50	0.75	0.81	0.91

柱层析分离组分的薄层层析结果如表2,可以看出,第二步洗脱液的层析结果是有两个点,都呈红色,其中 $R_f$ 值=0.74的点很小, $R_f$ 值=0.80的点很大,结合表1,可以大致推断第二步洗脱液中含的是番茄红素,两点的物质可能互为异构体;第一步洗脱液的层析结果只有一个点,结合表1,可以大致推断第一步洗脱液中含的可能是 $\beta$ -胡萝卜素。第三步洗脱液的层析结果是有两个点,都呈黄色,据参考文献5,可以大致推断第三步洗脱液中含的是叶黄素类。

表2 洗脱液薄层层析结果

洗脱步骤	洗脱液颜色	层析结果
1	黄	一个点 $R_f$ 值=0.91
2	红	两个点 $R_f$ 值=0.74 $R_f$ 值=0.80
3	黄	两个点 $R_f$ 值=0.43 $R_f$ 值=0.50

### 3.2 各组分的紫外—可见吸收光谱的扫描图(见图1,2,3)

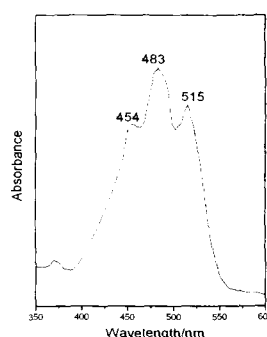


图1 洗脱液2的吸收光谱图

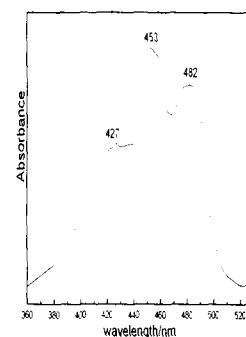


图2 洗脱液1的吸收光谱图

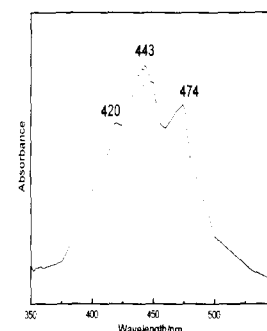


图3 洗脱液3的吸收光谱图

由图1,2,3知,洗脱液2的吸收光谱有3个吸收峰,分别为454nm,483nm,515nm,这与番茄红素标准品的吸收图谱相一致<sup>[6]</sup>,可以判定洗脱液2中的物质可能为番茄红素。由图2,3知,洗脱液1,3的吸收光谱各有3个吸收峰,分别为427nm、453nm、482nm,

(下转51页)

$\alpha$ -半乳糖苷酶勿需超量表达或分泌表达,以防影响酵母本身的产酒精能力;在整合的同时敲除某个副产物生产的关键酶基因,使代谢流更多的流向酒精生产。通过这些手段希望得到一种新型的酒精发酵酵母,在原来的酒精生产能力的基础上,利用掉常规酒精酵母不能利用的蜜二糖,探索酒精工业发展的新方向。

本文通过实现粟酒裂殖酵母  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因的克隆与表达,以及转化子能以蜜二糖为唯一碳源生长的现象,初步证明了研究的可行性。

#### 参考文献:

- [1] 章克昌. 发展“燃料酒精”的建议. 中国工程科学, 2000, 2(6): 89-93
- [2] 严自正, 朱静, 朱梅芳, 等. 分枝犁头霉( $\alpha$ -半乳糖苷酶的纯化和性质. 微生物学报, 1989, 29(4): 265-271
- [3] 李孝辉, 陈声明, 贾小明, 等. 青霉菌固体发酵产( $\alpha$ -半乳糖苷酶的研究. 浙江农业学报, 2001, 13(5): 305-308
- [4] 高新, 杨军, 李素波, 等. 基因工程( $\alpha$ -半乳糖苷酶的制备及其性质研究. 生物工程学报, 2003, 19(2): 223-226

- [5] CQS 摘译. 重组( $\alpha$ -半乳糖苷酶 A 替代疗法布里病的安全性和有效性. 中华医学信息导报, 2001, 16(18): 22
- [6] Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature, 2002, 415 (6874): 871-880
- [7] A. Adams, D. E. Gottschling, C. A. Kaiser, et al. Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
- [8] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南 (第三版). 科学出版社, 2003
- [9] F. 奥斯特伯, R. E. 金斯顿, J. G. 塞德曼, 等著. 颜子颖, 王梅林译. 精编分子生物学实验指南. 科学出版社, 2001
- [10] 潘宝海, 李德发, 陆文清, 等. 对硝基酚-(D-吡喃半乳糖法测定饲用( $\alpha$ -半乳糖苷酶(黑曲霉)活力的方法. 中国农业大学学报, 2002, 7(5): 107-111
- [11] 吴劲松, 冯万祥. ( $\alpha$ -半乳糖苷酶. 生命的化学, 2000, 20(2): 84-86
- [12] 张晋辉. 畜禽日粮中的( $\alpha$ -半乳糖苷以及相应酶制剂的应用. 中国农业科技导报, 2001, 3(1): 49-54
- [13] 李孝辉, 陈声明. 微生物源( $\alpha$ -半乳糖苷酶的研究进展. 微生物学通报, 2002, 29(2): 71-75
- [14] Akiba T. Properties of ( $\alpha$ -Galactosidases of Alkalophilic Bacteria. Agric. Biol. Chem., 1976, 40(9): 1851-1855

收稿日期: 2004-12-13

(上接 29 页) 420nm、443nm、475nm, 它们分别与  $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素的吸收图谱相一致<sup>[7,5]</sup>, 可以判定洗脱液 1、3 中的物质可能为  $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素。结合薄层层析结果可以判定洗脱液 1、3 中的物质为  $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素。

#### 3.3 洗脱液 2 中物质的进一步确定

将粗提液、洗脱液 2 在显微镜下(400 倍)进行观察, 结果见图 4、5, 可以看出, 粗提液中物质呈红球状, 而洗脱液 2 中的物质呈红色针状, 结合参考文献 8、9 及各组分的吸收图谱, 可以判定, 洗脱液 2 含的是番茄红素。



图 4 粗提液中物质的放大图

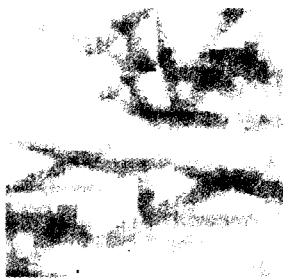


图 5 洗脱液 2 中物质的放大图

#### 3.4 高压液相色谱分析结果

在本试验的色谱条件下, 以苏丹红作为外标, 采用单点校正法对粗提液及洗脱液 2 中的番茄红素进行定量分析。由样品与标准物的峰面积计算得粗提

液及洗脱液 2 中的番茄红素含量分别为 3% 和 90%。

#### 4 结论

4.1 用氧化铝作柱层析固定相, 分三步洗脱(环己烷: 石油醚(1:1), 乙酸乙酯、无水乙醇)分离番茄红素, 经液相色谱检测番茄红素纯度为 90%。

4.2 分离纯化番茄红素的同时得到副产品  $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素。

#### 参考文献:

- [1] Nguyen M L, Schwarts S L. Lycopene: Chemical and Biological Properties [J]. Food Technology, 1999, 53(2): 38-45
- [2] Donald E. Pszczola. 50 Ingredient Hot Spots Highlighted [J]. Food Technology, 2002, 56(6): 32-70
- [3] 孙庆杰, 等. 番茄油树脂中番茄红素的 HPLC 测定. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(5): 506-509
- [4] Emenhiser C., Sander L. et al. J. Capability of Polymeric C30 Stationary Phase to Resolve Cis — tran Carotenoid Isomers in Reverse liquid Chromatography. Chroma. 1995, 707: 205-216
- [5] 卢艳杰, 等. 玉米蛋白粉中黄体素和玉米黄素的分离与定性. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(5): 11-14
- [6] 王强, 等. 反相高小液相色谱法同时测定番茄中 5 种类胡萝卜素. 色谱, 1997, 15(6): 534-536
- [7] 李伟, 等. 液固相色谱法分离番茄红素异构体. 色谱, 2003, 21(1): 13-16
- [8] 邸进申, 等. 番茄红素的层析分离. 精细化工, 2003, 20(4): 215-217
- [9] 于文利, 等. 番茄中番茄红素的纯化及表征. 上海交通大学学报, 2003, 37(5): 654-657

收稿日期: 2004-11-01