

# 西瓜中类胡萝卜素的柱色谱法分离分析

贾关荣<sup>1,2\*</sup>,申红山<sup>1</sup>,王斌<sup>1</sup>,马双武<sup>2</sup>

(1. 郑州大学化学工程学院,河南郑州 450001;2. 中国农业科学院郑州果树研究所,河南郑州 450009)

**摘要** [目的]采用柱色谱法分析检测西瓜中的类胡萝卜素。[方法]以5种瓤色品种的西瓜为试材,通过开放柱色谱法对西瓜主要类胡萝卜素进行分离分析。[结果]红、黄、桃红、粉与白瓤瓜5种西瓜都含有六氢番茄红素、β-和ζ-胡萝卜素。除白瓤瓜外,其他颜色的瓜瓤都含有番茄红素,以红瓤瓜的含量最多,早花、红一号与96B41的番茄红素含量分别为35.35, 28.44和21.19 mg/kg。黄瓤西瓜307超风的β-胡萝卜素含量约0.48 mg/kg,白瓤西瓜三白的ζ-胡萝卜素含量约0.4 mg/kg。红色与桃红色瓜瓤中分离检测到γ-胡萝卜素,红色与黄色瓤瓜中分离检测到叶黄素类。[结论]开放柱色谱法具有成本低、操作简便、结果可靠的特点,可用于分析常量样品中类胡萝卜素各组分含量。

**关键词** 西瓜;类胡萝卜素;开放柱色谱法

中图分类号 O657.7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)20-08416-03

## Analysis of Carotenoids in Watermelon by Column Chromatography Separation

JIA Guan-rong et al (School of Chemical Engineering, Zhengzhou University Zhengzhou, Henan 450009)

**Abstract** [Objective] The research aimed to analyze and detect the carotenoids from watermelon by column chromatography. [Method] The main carotenoids were separated and analyzed by open column chromatography from five watermelon cultivars with different flesh color [Result] Five watermelon cultivars with red-, yellow-, coral-, pink-and white-flesh colors all contained phytofluene, β-, and ζ- carotene. Apart from white-flesh watermelons, the other color flesh cultivars contained lycopene, with its content in red-flesh watermelon being the most. The lycopene content in early flowering, Red 1 and 96B41 was 35.35, 28.44 and 21.19 mg/kg resp. β- carotene content in yellow-flesh watermelon 307Chao Feng was about 0.48 mg/kg, and ζ-carotene content in white-flesh watermelon Three white was about 0.4 mg/kg. γ-carotene could be separated and detected in the red- and coral- flesh cultivars. Lutein could be separated and detected in the red- and yellow-flesh cultivars. [Conclusion] Open column chromatography had the characteristic of low cost, easy operation and reliable results so it can be used to analyze the lycopene content in each component in constant samples.

**Key words** Watermelon;Carotenoids;Open column chromatography

西瓜瓜瓤有红、黄、橙、桃红、粉和白色等多种不同的颜色,主要源于所含有类胡萝卜素种类与含量的不同,如红瓤瓜主要含有番茄红素和少量的β-胡萝卜素等。据报道,美国商品西瓜中番茄红素含量为45.1~53.2 μg/(gFW),平均为48.2 μg/(gFW)<sup>[1]</sup>,比新鲜番茄的平均30.2 μg/(gFW)高60%<sup>[2]</sup>。从新鲜西瓜与加热或加工处理后的番茄制品中获得番茄红素的效果相同,而过程更加简便<sup>[3]</sup>。类胡萝卜素和番茄红素均具有重要的保健功能<sup>[4-5]</sup>。大幅度地提高西瓜中重要类胡萝卜素含量,提高其营养保健功能与经济价值正成为育种家们努力实现的目标,这需要对西瓜的各种类胡萝卜素进行分析测定。目前虽然采用柱色谱法研究西瓜类胡萝卜素较早较多,但还鲜见有分离分析白瓤西瓜色素的报道。用液相色谱法(HPLC)法进行分析需要昂贵的仪器设备和训练有素的技术操作者,一般的实验室条件不够,而且由于缺少标准品,尤其是西瓜中特殊类胡萝卜素的标准品,无法对西瓜瓤色素作较全面的分析检测。因此,该试验通过柱色谱法对红、黄、桃红、粉和白瓤西瓜中的类胡萝卜素进行了初步分析检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试西瓜。**不同瓤色品种西瓜由中国农业科学院郑州果树研究所西瓜甜瓜中期库提供,其品种和瓤色见表1。

**1.1.2 仪器与试剂。**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)仪器公司),RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),循环水式真

空泵(巩义市英裕予华仪器厂)。石油醚、丙酮、苯、甲醇、乙醇、正己烷等试剂均为国产分析纯。

表1 试验用西瓜品种及其瓤色

Table 1 The watermelon cultivars used in the experiment and their flesh color

中期库原号 Original number in intermediate- term pool	中期库新号 New number in intermediate- term pool	品种名称代号 Code name of cultivar	瓤色 Flesh color
ZXG00214	ZXG00147	早花 Zaohua	红 Red
ZXG00318	ZXG00318	307 超风 307chaofeng	黄 Yellow
ZXC00469	ZXC00140	红一号 Hongyihao	桃红 Dark pink
ZXG00209	ZXG00879	三白 Sanbai	白 White
ZXG00152	ZXG00152	96B41	粉色 Pink

### 1.2 方法

**1.2.1 瓜瓤中类胡萝卜素的提取。**从成熟收获的西瓜中取瓜瓤80 g,加适量氯化钠静置20 min,10 000 r/min 离心20 min,将上层清液过滤后弃去,果肉用乙醇移入研钵中,研磨成糊状;加少量乙醇,放布氏漏斗上抽滤,乙醇洗几次以除去瓜瓤中残余的少量水分;再加入石油醚提取色素,至瓜瓤成无色;合并滤液,移入分液漏斗,加水摇匀,静置分层;下层水相经石油醚3次萃取后弃去,上层醚相合并,在旋转蒸发仪上于35 ℃下减压蒸发至干,色素用少量石油醚转移至10 ml容量瓶中,N<sub>2</sub>气吹干,密封后保存于-20 ℃冰箱中备用。

**1.2.2 色素柱色谱分离与分析。**在2.5 cm×30.0 cm玻璃中填入10 g吸附剂(氧化镁:硅胶=1:1,W/W),将石油醚溶解的色素上样于吸附剂顶部,用丙酮-石油醚进行洗脱,其中丙酮含量在0~30%呈阶梯式增加,在分光光度计上测量其吸收光谱。用10 ml试管收集流出液,通过吸收光谱扫描

作者简介 贾关荣(1977-),女,河南新乡人,硕士研究生,研究方向:色素分离。<sup>\*</sup>通讯作者,E-mail: zhaowen@zzu.edu.cn。

收稿日期 2008-04-25

一一进行检测,光谱图的精细结构采用  $V_{III}/V_{II} \times 100\%$  表示,其中,将两峰之间的吸收最小值作为基线或零值,右峰最大吸收波长( $\lambda_{max}$ )处的吸收峰值定义为  $V_{III}$ ,中间吸收峰的最大吸收波长处的吸收值定义为  $V_{II}$ 。然后用百分率将光谱精细结构表示作峰高比  $V_{III}/V_{II}$ ,确定组分类别。将同组分洗脱液合并,再经分光光度法测定其含量。样液中类胡萝卜素的量( $x$ , mg)按以下公式计算<sup>[5]</sup>:

$$x = (A \times y \times 1000) / (A_{1cm}^{1\%} \times 100)$$

式中, $A$  为样液在适当波长处的消光值; $y$  为样液的体积(ml);特征吸收系数  $A_{1cm}^{1\%}$  定义为 1% 溶液的理论消光值,即 1 cm 光径长比色杯中浓度为 100 ml 溶剂含 1 g 样品的溶液消光值。西瓜中主要类胡萝卜素的特征吸收系数(表 2)。

表 2 类胡萝卜素的特征吸收系数(石油醚中)<sup>[6]</sup>

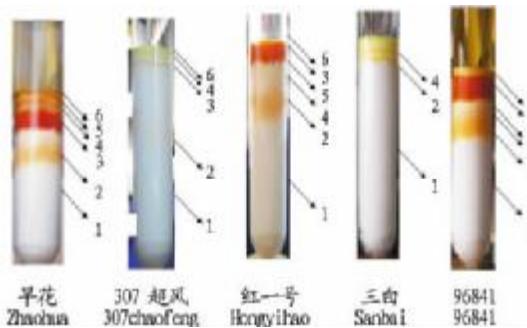
Table 2 The absorption coefficients of carotenoids (in petroleum ether)

编号 No.	类胡萝卜素 Carotenoids	$A_{1cm}^{1\%}$	$\lambda_{max} // nm$
1	六氢番茄红素 Phytofluene	1 350	348
2	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	2 592	449
3	$\zeta$ -胡萝卜素 $\zeta$ -carotene	2 555	400
4	$\gamma$ -胡萝卜素 $\gamma$ -carotene	3 100	462
5	番茄红素 Lycopene	3 450	470
6	叶黄素类 Xanthophylls	2 550	445

## 2 结果与分析

**2.1 西瓜中类胡萝卜素的柱色谱分离结果** 由图 1 可知,早花的红瓤色素在色谱柱上分离出 5 条清晰的色带,307 超风的黄瓤色素分离出 4 条清晰色带,红一号的桃红瓤色素分出 4~5 条色带,三白的白瓤色素只分出 2 条色带,粉色的 96B41 的瓤色素也分出 4~5 条色带,而且色带之间界限明显没有交叉,表明采用开放柱色谱法基本可以将西瓜瓤中的主要类胡萝卜素分离开来,再通过适宜的溶剂洗脱,就可实现对西瓜瓤色素的各类胡萝卜素组分进行分别测定。

**2.2 柱色谱分离的西瓜瓤各种类胡萝卜素的鉴别结果** 试验结果表明,类胡萝卜素吸收光谱的最重要特征是可见区的主要光吸收谱带,常见类胡萝卜素多表现出 3 峰式的光谱图(图 2),不同类胡萝卜素 3 个吸收峰的波长位置不同,光谱图的精细结构也不同,依此对其作出初步鉴别。



注:1 为六氢番茄红素;2 为  $\beta$ -胡萝卜素;3 为番茄红素;4 为  $\xi$ -胡萝卜素;5 为  $\gamma$ -胡萝卜素;6 为叶黄素类。

Note: 1 phytofluene, 2  $\beta$ -carotene, 3 lycopene, 4  $\xi$ -carotene, 5  $\gamma$ -carotene, 6 xanthophylls

图 1 5 个品种西瓜瓤类胡萝卜素在开放色谱柱上的区带

Figure 1 Zone of carotenoids on open chromatograph column from five watermelon cultivars

从西瓜瓤色素分离出的第 1 组分是无色的,它的吸收光谱图显示吸收 3 峰的波长在紫外区(图 2 a),与六氢番茄红素的吸收光谱是一致的,且  $V_{III}/V_{II} \times 100\%$  的值为 84%,与六氢番茄红素的值 90% 很接近(表 3),可以确定该组分为六氢番茄红素;橙色的第 2 组分光谱图的 3 峰吸收波长(图 2 b)与  $\beta$ -胡萝卜素的吻合,  $V_{III}/V_{II} \times 100\%$  值为 24.6%,也与  $\beta$ -胡萝卜素的 25% 一致(表 3),为  $\beta$ -胡萝卜素;第 3 组分在色谱柱的上部,为红色条带,其吸收光谱图(图 2 c)与番茄红素的一致,  $V_{III}/V_{II} \times 100\%$  的值为 65.3%,与番茄红素的 65% 吻合(表 3),为番茄红素;第 4 组分吸收光谱的 3 峰波长(图 2 d)与  $\zeta$ -胡萝卜素的一致,  $V_{III}/V_{II} \times 100\%$  的值为 94%,接近  $\zeta$ -胡萝卜素的 95%(表 3),为  $\zeta$ -胡萝卜素;第 5 组分的 3 峰吸收波长(图 2 e)与  $\gamma$ -胡萝卜素的一致,其  $V_{III}/V_{II} \times 100\%$  的值为 17%,尽管与  $\gamma$ -胡萝卜素的 40%(表 3)相差很多,但是,从其颜色、在色谱柱上的位置以及洗脱下来的次序判断仍认定为  $\gamma$ -胡萝卜素。而叶黄素类的确定是由其位于开放柱最顶层,颜色为淡黄色,且与醇类互溶等色谱行为来认定的。通过鉴别,可初步确定已分离主要西瓜色素组分为六氢番茄红素、 $\beta$ -胡萝卜素、番茄红素、 $\xi$ -胡萝卜素与  $\gamma$ -胡萝卜素和叶黄素类等。

**2.3 西瓜中类胡萝卜素的含量** 由图 3 可知,红色瓤系西

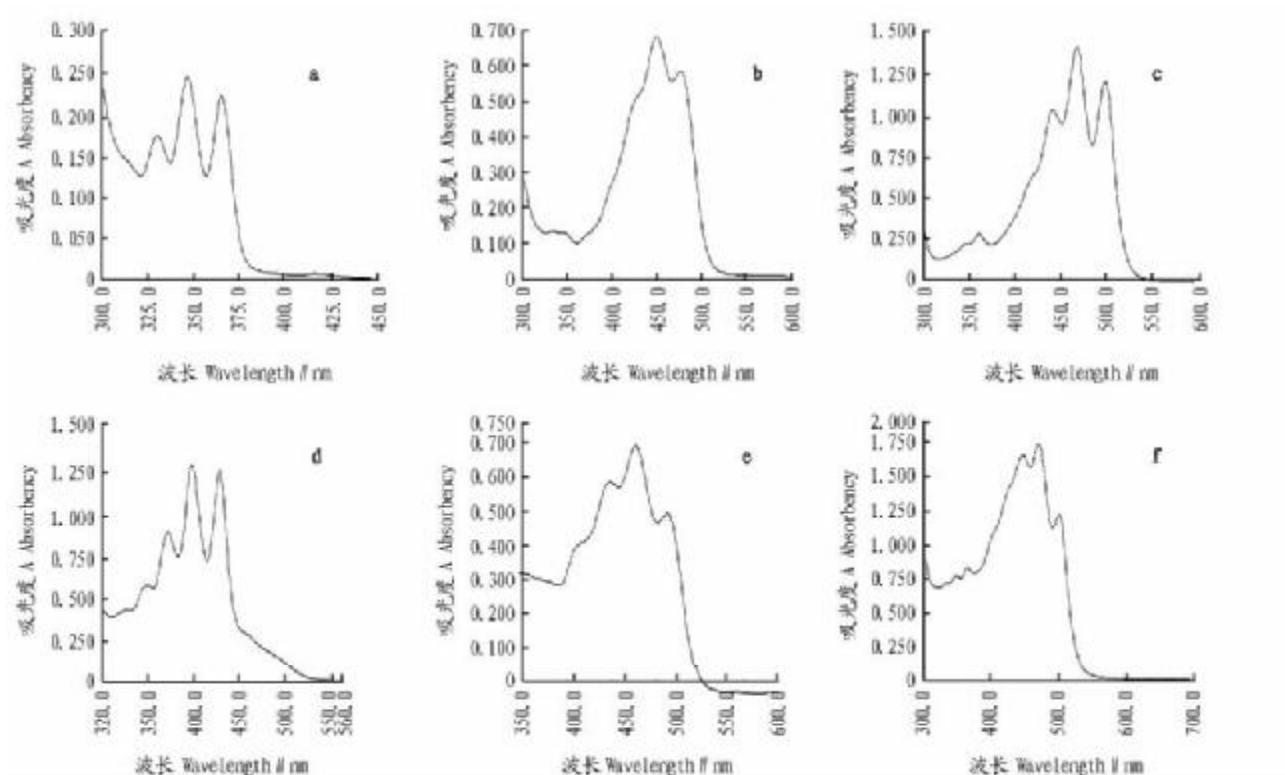
表 3 柱色谱分离的色素区带的颜色与光谱数据

Table 3 Visual color and spectral data of pigment zones separated by column chromatography

编码 No.	色带颜色 Zone color	石油醚中吸收最大值// nm						类胡萝卜素 Carotenoids	$V_{III}/V_{II} // \%$		
		Absorption maxima in petroleum ether		实测值		文献值 <sup>[6]</sup>			实测值	文献值 <sup>[6]</sup>	
		Observed value	Literature value	Observed value	Literature value	Observed value	Literature value				
1	无色 Colorless	367	347	330	366	347	330	六氢番茄红素 Phytofluene	84.0	90	
2	橙色 Orange	476	448	425	479	450	425	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	24.6	25	
3	红色 Red	501	469	443	501	470	443	番茄红素 Lycopene	65.3	65	
4	淡黄色 Dull-yellow	425	400	378	425	400	379	$\xi$ -胡萝卜素 $\xi$ -carotene	94.0	100	
5	粉色 Pink	489	458	433	489	460	434	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -carotene	17.0	40	
6	黄色 Yellow	468	440	362	465 <sup>[7]</sup>	440 <sup>[7]</sup>	380 <sup>[7]</sup>	叶黄素类 Xanthophylls			

瓜早花、红一号与 96B41 的番茄红素含量分别为 35.35、28.44、21.19 mg/kg,还有少量的六氢番茄红素和  $\beta$ -、 $\zeta$ -、 $\gamma$ -胡

萝卜素。黄瓤西瓜 307 超风的  $\beta$ -胡萝卜素含量约为 0.48 mg/kg,并有微量的六氢番茄红素和  $\beta$ -、 $\zeta$ -胡萝卜素。白瓤西



注:a为六氢番茄红素;b为 $\beta$ -胡萝卜素;c为番茄红素;d为 $\xi$ -胡萝卜素;e为 $\gamma$ -胡萝卜素;f为叶黄素类。

Note: a. Phytofluene; b.  $\beta$ -carotene; c. Lycopene; d.  $\xi$ -carotene; e.  $\gamma$ -carotene; f. Xanthophylls.

图2 西瓜中分离出的6种类胡萝卜素的吸收光谱

Fig. 2 The absorption spectra of six carotenoids separated from watermelon

瓜三白的 $\zeta$ -胡萝卜素含量在0.4 mg/kg左右,有痕量的六氢番茄红素与 $\gamma$ -胡萝卜素。

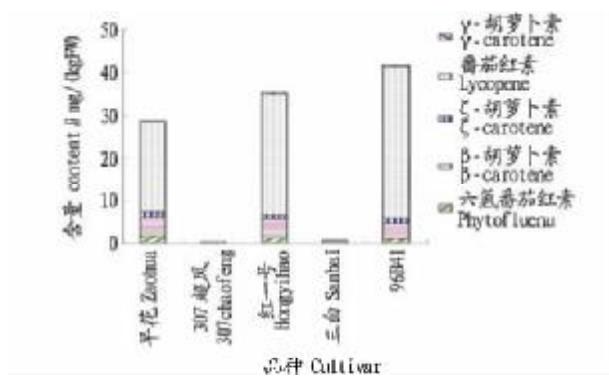


图3 各种瓤色西瓜中类胡萝卜素含量

Fig. 3 Carotenoid content in five watermelon cultivars with different flesh colors

### 3 讨论

(1) 目前类胡萝卜素分析上面临的主要问题是缺少标准样品。因为一般在水果蔬菜等饮食中存在的类胡萝卜素种类多,多数情况下每一种的含量都较低,加上其共轭碳骨架结构使其对光、氧等环境因素敏感而不稳定,较难提取纯化,导致标样难得。Tee等曾比较开放柱色谱法与HPLC法分析类胡萝卜素的优缺点<sup>[8]</sup>,尽管HPLC法比开放柱色谱法有多种优点,分析结果更加可靠,但由于缺少特定的标准品,目前采用该法分析检测西瓜瓤类胡萝卜素含量所报道检测的种

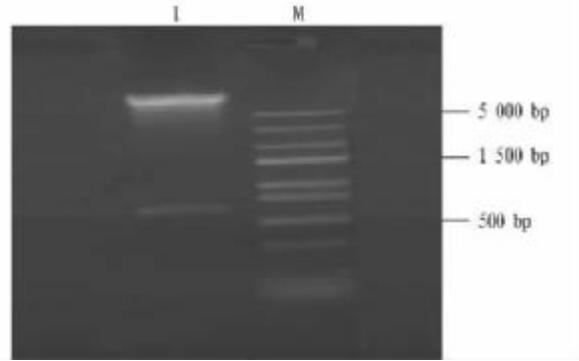
类不多<sup>[8-15]</sup>。加上仪器设备本身昂贵,目前开放柱色谱法由于花费少、简便易于操作、结果也可靠、可检测的类胡萝卜素种类多,因而更为实用,应为多数实验室用来分析常量样品中类胡萝卜素各组分含量。

(2) 开放柱色谱法分离西瓜瓤色素过程中,六氢番茄红素很容易与 $\beta$ -胡萝卜素一起洗脱,因为六氢番茄红素是没有颜色的,其色带位于柱子的最底端,上面紧接着的是 $\beta$ -胡萝卜素,而 $\beta$ -胡萝卜素洗脱的速度快,2种色素还没来得及分开就已被一起洗脱下来,光谱扫描检测常会看到六氢番茄红素和 $\beta$ -胡萝卜素两色素混在一起的情况。解决这个问题需要增加洗脱液收集次数,减小每试管收集液量,但是,收集洗脱液太少,又常会因含量太低而得不到扫描光谱图,因此,需要多次检测浓缩合并。其次, $\gamma$ -胡萝卜素和叶黄素柱色谱法分离较为不易, $\gamma$ -胡萝卜素的含量低,不容易洗脱,本身性质也很不稳定,不易得到较纯品,因而,图2 e 中表示光谱精细结构的 $V_{III}/V_{II}$ 值与文献值相差较大。叶黄素色带位于柱子的顶层,很容易掺入杂质,属较不易洗脱下来的色素,不易分离,需要借助醇类洗脱。

(3) 红瓤西瓜中色素的主要成分为番茄红素。Tadmor等曾用HPLC分析报道白瓤西瓜未显示出任何可检测量的类胡萝卜素<sup>[15]</sup>。笔者研究结果表明,白瓤西瓜中主要色素为 $\zeta$ -胡萝卜素,还有六氢番茄红素与 $\beta$ -胡萝卜素,而不含有番茄红素,与该报道结果不同。

(下转第8501页)

明诱饵载体对酵母菌没有毒害作用。与酵母菌株EGY48

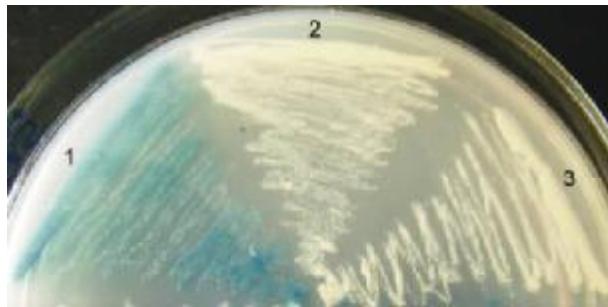


注:M为Marker;1为pLexA-peaT1/EcoR I + Xho I。

Note: M. Marker; 1. pLexA-peaT1/EcoR I + Xho I.

图1 诱饵载体pLexA-peaT1双酶切鉴定

Fig.1 Identification of bait vector pLexA-peaT1 digested by restriction endonuclease EcoR I and Xho I



注:1为EGY48[p8op-lacZ, pLexA-pos];2为EGY48[p8op-lacZ, pLexA-peaT1];3为EGY48[p8op-lacZ, pLexA-Lam]。

Note: 1. EGY48[p8op-lacZ, pLexA-pos]; 2. EGY48[p8op-lacZ, pLexA-peaT1]; 3. EGY48[p8op-lacZ, pLexA-Lam].

图2 诱饵载体pLexA-peaT1转录激活活性检测

Fig.2 Detection of the transcriptional activation activity of bait vector pLexA-peaT1

(上接第8418页)

(4)笔者研究通过开放柱色谱分离技术分析测定西瓜中类胡萝卜素,由于只采用单一色谱柱,色素的分辨率还有限,可以分离的色素种类不多,如果在现有色谱柱基础上再通过其他类型的色谱柱进行分离分析,则效果会更好,可检测到的类胡萝卜素种类更多,结果的准确性和精确度会更高。

## 参考文献

- [1] U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, ARS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 [M ]. U.S. Department of Agriculture: Washington, DC, 2005.
- [2] HOLDEN J M, ELDRIDGE A L, BEECHER G R, et al. USDA-NCC Carotenoid database for US foods 1998 [J ]. J Food Comp Anal, 1999, 12: 169 - 196.
- [3] COLLINS J K, PERKINS - VEAZIE P, ROBERTS W. Lycopene: From plants to humans [J ]. Hort Science, 2006, 41: 1135 - 1144.
- [4] ZHAO W E, KANG B S, JIAO F Y, et al. The anticancer effects of carotenoids and gene expression [J ]. J Biol, 2006, 23(2): 1 - 6.
- [5] 惠伯棣,余建国,赵文恩,等.类胡萝卜素化学及生物化学 [M ].北京:中国轻工业出版社,2005.
- [6] BRITTON G, LIAAEN - JENSEN S, PFANDER H. Carotenoids handbook [M ]. Basel: Birkhäuser, 2004.
- [7] WATANABE K, SAITO T, HIROTA S, TAKAHASHI B. Carotenoid pig-

[p8op-lacZ, pLexA-pos]相比,EGY48[p8op-lacZ, pLexA-peaT1]和EGY48[p8op-lacZ, pLexA-Lam]一样呈现白色菌落,这说明诱饵载体没有转录激活活性,可用于下一步文库筛选。

## 3 讨论

酵母双杂交技术是用于研究蛋白分子相互作用中效率最高、应用最广泛的方法之一。酵母双杂交系统自1989年由Stanley F等提出并初步建立以来<sup>[5]</sup>,已成为研究蛋白质相互作用的重要手段,被广泛用于功能蛋白质组学研究、疾病的病理机制分析和药物筛选等多个领域中。与其他技术相比,酵母双杂交技术省去了耗时费力的蛋白表达纯化及抗体制备步骤,并可以用于高通量的筛选,而且灵敏度较高。但与此同时,该系统也存在一些不足,假阳性便是其中很突出的问题,而诱饵质粒的转录激活活性是造成假阳性结果的原因之一<sup>[6]</sup>。

为了阐明极细链格孢菌蛋白激发子Peat1的作用机制,笔者构建了载体pLexA-peaT1,拟采用酵母双杂交系统筛选与Peat1蛋白存在相互作用的蛋白质。在该试验中首先要排除诱饵蛋白的转录激活功能。该试验利用酵母菌的报告基因,通过检测β-半乳糖苷酶活性验证了Peat1蛋白无转录激活功能,因此可利用酵母双杂交系统来寻找与Peat1蛋白相互作用的蛋白。

## 参考文献

- [1] 邱德文.植物用多功能真菌蛋白质:中国,CN 1344727 A[P].2002.
- [2] 邱德文.微生物蛋白农药研究进展[J].中国生物防治,2004,20(2): 91 - 94.
- [3] 龙松华,张宁,邱德文,等. Gateway技术构建交链孢菌JH505 cDNA文库[J].微生物学报,2005,45(6): 963 - 965.
- [4] 赵明治,杨秀芬,张明,等.一种细极链格孢蛋白激发子的分离纯化及其生物活性[J].中国生物防治,2007,23(2): 170 - 173.
- [5] FIELD S, SONGO. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340: 245 - 246.
- [6] BARTEL P, CHIEN C T, STERNGLANZ R, et al. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system[J]. Biotechniques, 1993, 14: 920 - 924.

menta in red, orange, and yellow fleshed fruits of watermelon (*Citrullus vulgaris*) cultivars [J ]. Engei Gakkai Zasshi, 1987, 56: 45 - 50.

[8] TEE E S, LIM C L. Carotenoid composition and content of Malaysia vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods [J ]. Food Chem, 1991, 41: 309 - 339.

[9] HEINONEN M I, OLLILAINEN V, LINKOLA E K, et al. Carotenoids in Finnish foods: Vegetables, fruits and berries [J ]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 655 - 659.

[10] HOLDEN J M, ELDRIDGE A L, BEECHER G R, et al. Carotenoid content of US foods: An update of the database [J ]. J Food Comp Anal, 1999, 12: 169 - 196.

[11] SETIAWAN B, SULAEAMAN A, GIRAUD D W, et al. Carotenoid content of selected Indonesian fruits [J ]. J Food Comp Anal, 2001, 14: 169 - 176.

[12] MANGELS A R, HOLDEN J M, BEECHER G R, et al. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytical data [J ]. J Am Diet Assoc, 1993, 93: 284 - 296.

[13] PERKINS-VEAZIE P, COLLINS J K. Flesh quality and lycopene stability of fresh-cut watermelon [J ]. Postharvest Biol Technol, 2004, 31: 159 - 166.

[14] 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.

[15] TADMOR Y, KING S, LEVI A, et al. Comparative fruit colouration in watermelon and tomato [J ]. Food Res Internat, 2005, 38: 837 - 841.