

不同品系万寿菊花中叶黄素和叶黄素酯含量的测定



LI Da-jing

李大婧^{1,2}, 刘春泉^{2*}, 方桂珍³

1. 东北林业大学 林学院 食品科学与工程教研室, 黑龙江 哈尔滨 150040;
2. 江苏省农科院 原子能农业利用研究所, 江苏 南京 210014;
3. 东北林业大学 材料科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 采用反相高效液相色谱法测定不同颜色万寿菊花(包括花瓣和花萼)中叶黄素和叶黄素酯的含量。通过与叶黄素标准品比较,并利用相同色谱条件下的色谱图确定万寿菊花中含有叶黄素和 6 种叶黄素二酯,即月桂酸-肉豆蔻酸酯、二肉豆蔻酸酯、肉豆蔻酸-棕榈酸酯、二棕榈酸酯、棕榈酸-硬脂酸酯及二硬脂酸酯。不同颜色万寿菊花中叶黄素和叶黄素酯的含量差别较大,黄绿色花色素含量为 0.024%,橙色花色素含量高达 1.148%(均以干花粉计),颜色越深,叶黄素酯含量越高。万寿菊花的色素含量与脂肪含量呈明显正相关($R^2=0.974$)。

关键词: 万寿菊花;叶黄素;叶黄素酯;高效液相色谱

中图分类号:TQ91

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2007)02-0105-04

Determination of Contents of Lutein and Lutein Esters in Marigold Flowers(*Tagetes erecta* Linn.)

LI Da-jing^{1,2}, LIU Chun-quan², FANG Gui-zhen³

1. Food Sciences and Engineering Department, College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;
2. Institute of Application in Atomic Energy, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
3. College of Material Science and Engineering, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Contents of lutein and lutein fatty acid esters in flower-heads (petals and calyces) of different colors of marigold were evaluated by high performance liquid chromatography. A typical chromatographic profile of pigments was characterized by the simultaneous presence of lutein and lutein esters with standard samples of lutein. Six lutein esters from orange marigold flower, consisted of lutein laurate-myristate, dimyristate, myristate-palmitate, dipalmitate, palmitate-stearate, and distearate diesters, were confirmed. The total contents of pigments in dry marigold flower flour varied from 0.024% in greenish yellow flowers to 1.148% in deep orange flowers. Differences in petal color were well related to the pigment content. Furthermore, a positive correlation between pigment concentration and fat content in marigold flower was found ($R^2=0.974$).

Key words: marigold flowers(*Tagetes erecta* Linn.); lutein; lutein esters; HPLC

万寿菊(*Tagetes erecta* Linn.),为菊科万寿菊属植物。1年生草本,因品种不同而颜色不同,黄色至橙红色,原产墨西哥,现我国各地均作观赏花卉种植。近几年来,由于对天然产物的研究日益重视,人们开始关注万寿菊的开发利用。万寿菊花中的主要着色成分是全反式叶黄素(3R,3'R,6'R- β , ϵ -胡萝卜素-3,3'-二醇),它是一种不对称的二羟基类胡萝卜素。叶黄素两侧的每一个紫罗酮环都有一个羟基,在植物细胞内与脂肪酸发生酯化作用生成单酯和二酯的衍生物^[1]。橙色万寿菊花花瓣中含有的叶黄素酯占总类胡萝卜素的 90% 以上^[2],绝大部分叶黄素以酯的形式存在^[3]。商品万寿菊花粉,主要用作家禽饲料添加剂,以提高蛋黄和禽类皮肤的颜色,或供进一步加工用^[4]。精制的叶黄素酯或由叶黄素酯皂化后制得的叶黄素纯品可用于辅助治疗老年性黄斑退化病或白内障等眼部疾病^[5]。在植物油中

收稿日期:2005-07-22

基金项目:江苏省科技攻关资助项目(BG2006319);江苏省农业科学院科研基金资助项目(6110537)

作者简介:李大婧(1976-),女,黑龙江肇东人,讲师,博士,主要从事天然产物方面的研究;E-mail:lidadjing@163.com

* 通讯作者:刘春泉,研究员,主要从事功能食品方面的研究。

叶黄素酯的溶解性强于合成类胡萝卜素,所以它可替代合成类胡萝卜素作为食品着色剂使用^[6]。由于叶黄素在食品、医药、水产品加工和饲料工业的广泛应用,目前我国已开始大面积种植万寿菊,并把它作为工业上提取分离天然色素——叶黄素的理想原料。作者已采用超声波强化有机溶剂提取万寿菊花叶黄素酯^[7],并将其皂化精制成叶黄素晶体,分析并比较了它们的光热稳定性^[8]。叶黄素的检测方法一般采用分光光度法,采用高效液相色谱法分析不同颜色万寿菊花中叶黄素酯的含量并进一步论证叶黄素和叶黄素酯含量与脂肪含量的关系还未见报道。本实验主要通过高效液相色谱法测定万寿菊花中叶黄素和叶黄素酯的含量,并用叶黄素标准样品和文献报道同一色谱条件下的色谱图对不同叶黄素酯进行定性分析,同时研究不同颜色万寿菊花脂肪含量和色素含量的关系,为万寿菊花原料的选择和叶黄素酯的分析提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

原料:采摘不同颜色新鲜万寿菊花朵,去掉其花梗和萼片,干燥、粉碎制成万寿菊花粉;取橙色万寿菊花的花萼干燥、粉碎制成花萼粉。**试剂:**正己烷、石油醚、无水硫酸钠为分析纯;甲醇、乙腈、乙酸乙酯为色谱纯;叶黄素标准品购于 Adrich-Sigma 公司。

1.2 主要仪器

高效液相色谱仪(惠普 HP1100,带四元梯度洗脱泵、紫外可见光检测器、自动进样器)、旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、恒温水浴锅(金坛市恒丰仪器厂)、电子天平(上海天平仪器厂)、数显恒温干燥箱、粉碎机、索氏提取器。

1.3 试验方法

1.3.1 万寿菊花中脂肪含量测定 采用索氏提取法。

1.3.2 万寿菊花中叶黄素的提取 用石油醚为溶剂萃取不同颜色万寿菊花粉和花萼粉中的类胡萝卜素,每次原料用量为 3 g,提取 10 ~ 15 h 直至近无色。提取液过无水硫酸钠柱干燥后减压浓缩至干,用正己烷定容至 100 mL。整个操作过程在避光条件下进行。萃取物放于冰箱中 -20 °C 冷冻保藏至液相色谱分析用。色素溶液过 0.45 μm 微孔膜过滤后进行液相色谱测定,用外标法进行定性和定量分析。

1.3.3 高效液相色谱(HPLC)分析条件^[9-11] 色谱柱:C₁₈(300 mm × 3.9 mm, i. d, 10 μm);流动相:30 min 内线性梯度洗脱,A(乙腈-甲醇,体积比 9:1);B(乙酸乙酯 0 ~ 100 %);流速:1 mL/min;检测器:紫外-可见光检测器(450 nm);进样量:20 μL。

2 结果与讨论

2.1 万寿菊花中脂肪含量的测定

由于淡黄色花花萼几乎不含有色素,实验中只测定橙色花花萼的脂肪含量,为 11.96 %,同时肉眼观察到只有花萼中心呈橙色,颜色较淡。其脂肪含量分别为黄绿色花 13.32 %、淡黄色花 13.64 %、金黄色花 18.38 %、橙色花 18.81 %。可以看出随着万寿菊花颜色由黄绿色到橙色颜色加深,脂肪含量也随着增加;淡黄色与相近色——黄绿色相比,橙色与相近色——金黄色相比,脂肪含量都略有增加。

2.2 万寿菊花叶黄素高效液相色谱分析

2.2.1 万寿菊叶黄素和叶黄素酯定性分析 由于叶黄素与脂肪酸的酯化作用并不影响光谱特征,叶黄素和叶黄素酯具有同样的光谱特征吸收和光谱形状,从万寿菊花萃取物主要组分的吸收光谱发现各组分最大吸收波长分别为 424.2、446 和 478.5 nm。

实验中叶黄素标准品和橙色万寿菊花萃取物叶黄素酯的液相色谱图见图 1 和图 2。通过与叶黄素标准品的保留时间比较,可以确定图 2 中色谱峰 1 为游离的叶黄素。在用反相液相色谱

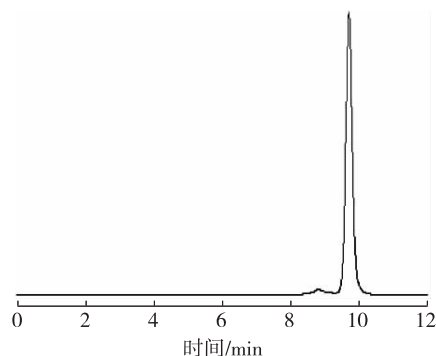


图 1 叶黄素标准样品的液相色谱图
Fig. 1 HPLC profile of lutein standard sample

分析万寿菊花叶黄素酯的研究中,Rivas 检测未皂化的万寿菊萃取物,发现游离叶黄素量很少,主要组分是叶黄素酯,约占总类胡萝卜素量的 95.5%,其中二肉豆蔻酸酯 11.59%、肉豆蔻酸-棕榈酸酯 24.23%、二棕榈酸酯 37.57%、棕榈酸-硬脂酸酯 15.55%、二硬脂酸酯 3.63%^[10]。Scalia 和 Francis 用制备型反相液相色谱分离 5 种脂肪酸酯,并采用气相色谱-质谱法(GC-MS)分析酯化的反式类胡萝卜素酯,表明万寿菊花中叶黄素二酯都由饱和脂肪酸组成(C_{12}/C_{14} 、 C_{14}/C_{14} 、 C_{14}/C_{16} 、 C_{16}/C_{16} 、 C_{16}/C_{18})^[12]。由于万寿菊花萃取物中各组分极性相近,很难分离叶黄素和叶黄素酯,使用 C_{18} 柱只能分离检测出游离叶黄素、3 种叶黄素单酯(C_{14} 、 C_{16} 、 C_{18})和上述 5 种二酯。从图 2 中可以看出,万寿菊花萃取物各主要组分分离较清晰,与相同色谱条件下 Rivas、Roberta 和 Rong 报道的谱图相一致^[10-11, 13]。其中,色谱峰 5~10 峰面积较高,按照出峰先后的保留时间很容易定性,它们依次为月桂酸-肉豆蔻酸酯、二肉豆蔻酸酯、肉豆蔻酸-棕榈酸酯、二棕榈酸酯、棕榈酸-硬脂酸酯、二硬脂酸酯。由于叶黄素单酯色谱峰 2~4 峰面积较小,在现有实验条件下无法准确确定其成分,通过与相同色谱条件下的谱图比较,它们依次可能为单肉豆蔻酸酯、单棕榈酸酯和单硬脂酸酯,对此成分的确定需要用质谱法进一步分析。

2.2.2 叶黄素和叶黄素酯定量分析 通过峰面积和叶黄素浓度的关系对叶黄素和叶黄素酯定量分析。由于叶黄素和叶黄素酯具有同样的光谱特征吸收和光谱形状,因此,实验中叶黄素酯作为叶黄素的等同物,进行定量计算。不同品系万寿菊花粉中叶黄素和各种叶黄素酯的含量见表 1。

表 1 不同品系万寿菊花粉中叶黄素和叶黄素酯含量

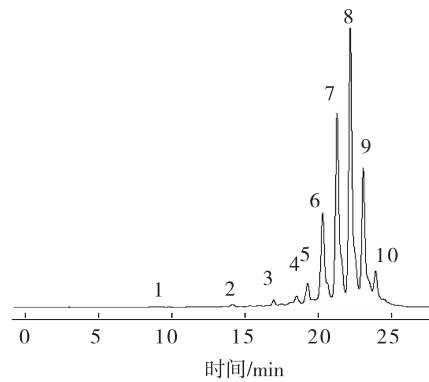
Table 1 Contents of lutein and lutein esters in marigold flower flours

%

| 品系号 No. | 叶黄素 lutein 1 | 叶黄素酯 lutein esters | | | | | | | | | | 总类胡萝卜素含量 total carotenoid contents |
|------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------------------------------------|
| | | 2 ¹⁾ | 3 ¹⁾ | 4 ¹⁾ | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| I | — | 0.00044 | 0.00076 | 0.00068 | 0.00090 | 0.00309 | 0.00453 | 0.00460 | 0.00125 | 0.00029 | 0.0165 | |
| II | 0.00332 | 0.00098 | 0.00065 | 0.00058 | 0.00102 | 0.00389 | 0.00543 | 0.00593 | 0.00167 | 0.00061 | 0.0241 | |
| III | 0.00611 | 0.00121 | 0.00750 | 0.00740 | 0.00142 | 0.00504 | 0.00648 | 0.00629 | 0.00115 | 0.00042 | 0.0296 | |
| IV | 0.00125 | 0.00202 | 0.00566 | 0.00817 | 0.0274 | 0.114 | 0.251 | 0.330 | 0.101 | 0.0402 | 0.881 | |
| V | 0.00103 | 0.00188 | 0.00492 | 0.00843 | 0.0282 | 0.129 | 0.316 | 0.447 | 0.144 | 0.068 | 1.148 | |

1) 表示可能为某物质 possible

从表 1 中可以看出,橙色花花萼(I)含有一定量的色素,黄绿色花(II)和淡黄色花(III)总色素含量较低,而金黄色花(IV)和橙色花(V)总色素含量较高。在橙色万寿菊花花萼中未检测到游离的叶黄素;淡黄色品系万寿菊花游离叶黄素含量相对较高,黄绿色和淡黄色万寿菊花中游离叶黄素含量分别占总类胡萝卜素的 13.79% 和 20.63%;橙色品系游离叶黄素含量相对较低,金黄色和橙色万寿菊花中游离叶黄素含量分别占总类胡萝卜素的 0.14% 和 0.09%,含量很低,这与 Quackenbush^[3]的研究结果一致,并进一步证明橙色万寿菊花中绝大部分叶黄素是以酯的形式存在。对叶黄素单酯而言,淡黄色品系万寿菊花中叶黄素单酯含量相对较高,黄绿色和淡黄色万寿菊花中叶黄素单酯含量分别占总类胡萝卜素的 9.18% 和 9.12%;橙黄色品系叶黄素单酯含量相对较低,金黄色和橙黄色万寿菊花中叶黄素单酯含量分别占总类胡萝卜素的 1.80% 和 1.33%。不同颜色万寿菊花中叶黄素二酯含量也不相同,万寿菊花中淡黄色品系叶黄素二酯的含量低于橙黄色品系,淡黄色和橙色花中叶黄素二酯分别占总类胡萝卜素的 70.25% 和 98.58%。从表 1 中还可以发现,橙色品系中 6~9 组分含量较高,是叶黄素酯的主要组成成分,这也与 Rivas 的研究结果一致,它们依次为二肉豆蔻酸酯、肉豆蔻酸-棕榈酸酯、二棕榈酸酯和棕榈酸-硬脂酸酯。由于橙色品系中叶黄素含量相对较高,同时其花萼部分仍含有一定量的叶黄素,所以为方便,在生产时宜选用橙色品系万寿菊花的花头作为生产叶黄素的原料。



1. 叶黄素 lutein; 2. 单肉豆蔻酸酯 monomyristate; 3. 单棕榈酸酯 monopalmitate; 4. 单硬脂酸酯 monostearate; 5. 月桂酸-肉豆蔻酸酯 laurate-myristate; 6. 二肉豆蔻酸酯 dimyristate; 7. 肉豆蔻酸-棕榈酸酯 myristate-palmitate; 8. 二棕榈酸酯 dipalmitate; 9. 棕榈酸-硬脂酸酯 palmitate-stearate; 10. 二硬脂酸酯 distearate

图 2 橙色万寿菊花萃取物的液相色谱图

Fig. 2 HPLC profile of orange marigold flower extracts

2.3 花瓣颜色与脂肪含量和叶黄素含量的关系

从表2中可以看出,万寿菊花颜色愈深,脂肪含量愈高,叶黄素酯含量也高,二者存在很大程度正相关, $R^2 = 0.974$ 。此结果表明,随着万寿菊花颜色的加深,叶黄素与更多的脂肪酸发生酯化作用生成叶黄素酯,进一步从理论上验证了 Quackenbush^[2-3]的说法。

表2 万寿菊花色素含量、脂肪含量和颜色的关系

Table 2 Relationship among pigment content, fat content and observed color in marigold flowers

| 品系号 No. | 花瓣颜色 observed color | 叶黄素和叶黄素酯含量/% lutein + lutein esters contents | 脂肪含量/% fat contents |
|------------|------------------------|---|------------------------|
| II | 黄绿色 greenish yellow | 0.024 | 13.32 |
| III | 淡黄色 light yellow | 0.030 | 13.64 |
| IV | 金黄色 golden yellow | 0.881 | 18.38 |
| V | 橙色 orange | 1.148 | 18.81 |

3 结论

3.1 采用反相高效液相色谱法对万寿菊花中主要呈色成分进行定性分析,通过与叶黄素标准品比较,并利用相同色谱条件下的色谱图确定万寿菊花中含有叶黄素和6种叶黄素二酯。叶黄素二酯包括月桂酸-肉豆蔻酸酯、二肉豆蔻酸酯、肉豆蔻酸-棕榈酸酯、二棕榈酸酯、棕榈酸-硬脂酸酯及二硬脂酸酯。

3.2 用高效液相色谱法测定万寿菊花(包括花瓣和花萼)中叶黄素和叶黄素酯的含量,发现不同颜色万寿菊花叶黄素和叶黄素酯的含量差别较大,黄绿色花色素含量为0.024%,橙色花色素含量高达1.148%(均以干花粉计),颜色越深,叶黄素酯含量越高;橙色花中游离叶黄素很少,叶黄素主要以叶黄素酯的形式存在,其中,二肉豆蔻酸酯、肉豆蔻酸-棕榈酸酯、二棕榈酸酯、棕榈酸-硬脂酸酯是橙色花叶黄素酯的主要成分;花萼中仍含有一定量的叶黄素,生产时宜选用橙色品系万寿菊花的花头作为提取叶黄素的原料。

3.3 实验中发现万寿菊花的色素含量与脂肪含量呈明显正相关($R^2 = 0.974$)。

参考文献:

- [1] KRINSKY N I, LANDRUM J T, BONE R A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye[J]. *Annu Rev Nutr*, 2003, 23: 171-201.
- [2] QUACKENBUCH F W. Use of heat to saponify xanthophyll esters and speed analysis for carotenoids in feed material; collaborative study[J]. *J Assoc Anal Chem*, 1973, 56: 748-753.
- [3] QUACKENBUSH F W, MILLER S L. Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals[J]. *J Assoc Anal Chem*, 1972, 55: 617-621.
- [4] 凌关庭. 可供开发新型食品添加剂(III):万寿菊色素及其生理功能[J]. *粮食与油脂*, 2002(12): 44-46.
- [5] GAU W, PLOSCHKE H J, WUNSCH C. Mass spectrometric identification of xanthophylls fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high-performance liquid chromatography and Craig counter-current distribution[J]. *J Chromatogr*, 1983, 262: 277-284.
- [6] PHILIP T, BERRY J W. Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) flowers[J]. *J Food Sci*, 1975, 40: 1089-1090.
- [7] 李大婧,方桂珍,刘春泉. 超声波强化有机溶剂提取万寿菊中叶黄素的研究[J]. *林产化学与工业*, 2006, 26(3): 127-130.
- [8] 李大婧,方桂珍,刘春泉. 叶黄素和叶黄素酯稳定性研究[J]. *林产化学与工业*, 2007, 27(1): 112-116.
- [9] GREGORY G K, CHEN T S, PHILIP T. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography[J]. *J Food Sci*, 1986, 51: 1093-1094.
- [10] RIVAS D L J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder[J]. *J Chromatogr*, 1989, 464: 442-447.
- [11] PICCAGLIA R, MAROTTI M, GRANDI S. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*[J]. *Ind Crops Prod*, 1998, 8: 45-51.
- [12] SCALIA S, FRANCIS G W. Preparative scale reversed-phase HPLC method for simultaneous separation of carotenoids and carotenoid esters[J]. *Chromatographia*, 1989, 28: 129-132.
- [13] RONG T, RAYMOND Y, CHRISTOPHER Y, et al. Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatography A*, 2004, 1045(1): 65-70.