

利用 PRP-6 树脂制备高纯度全反式番茄红素

王志华¹ 亓国秀¹ 陈 超² 张卫强² 刘开录² 赵京城^{2*}

(1. 北京化工大学理学院, 北京 100029; 2. 北京普瑞孚天然药物现代纯化和分离研究所, 北京 100088)

摘 要: 文中以番茄酱为原料, 利用聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (PRP-6 树脂) 吸附并经梯度洗脱制备出高纯度番茄红素, 经紫外、红外、质谱和核磁分析, 确认制得的样品为全反式番茄红素, 经高效液相色谱检测样品纯度为 99.8 %。

关键词: PRP-6 树脂; 番茄红素; 定性分析; 定量分析; 波谱分析

中图分类号: R931.6

番茄红素是类胡萝卜素的一种, 具有抗氧化、消除自由基、诱导细胞间信息传递、调控肿瘤增殖、明显减轻由体内过氧化引起的对淋巴细胞 DNA 的氧化损害、减轻动脉粥样硬化形成等功能, 从而可预防前列腺癌、胃癌、皮肤癌、乳腺癌、宫颈癌和心脑血管病等^[1-2]。

番茄红素很不稳定, 易受光、热、氧等的影响而发生异构化或氧化反应, 所以制备高纯度番茄红素非常困难。美国的 sigma 公司提供番茄红素标品纯度也仅为 90 % ~ 95 %, 而且价格昂贵。目前番茄红素纯化一般都采用正相色谱柱层析的方法, 邸进申等^[3]以硅胶为固定相进行层析分离, 制备的样品纯度只有 18.9 %; 李伟等^[4]采用先皂化再以硅胶为固定相进行层析分离的方法, 样品纯度虽大于 90 %, 但回收率较低; 张裕卿等^[5]以大孔吸附树脂进行吸附分离, 此方法解吸率较低。

本实验以高交联度的聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (PRP-6) 树脂对浸提得到的番茄红素浓缩液进行层析分离。在制备过程中经过高温聚合及聚合后溶剂抽提过程处理, 完全除去了残留的有害溶剂, 具有极高的机械强度和化学稳定性, 可在 pH 值为 0 ~ 14 范围内使用, 也可以在高压灭菌的条件下使用。PRP-6 可重复使用 2 000 个循环以上, 对番茄红素样品的解析率大于 90 %, 塔板数为 260/m, 这是其

它正相填料所不具备的。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SPD-10Avp 液相色谱仪 (岛津公司), 756 型全波长紫外-可见分光光度计 (上海光谱仪器厂), N2000 数据处理系统, AV300-高分辨核磁共振光谱仪 (Bruker 公司), Bibflex 飞行时间质谱仪 (Bruker 公司), EQUINOX55 红外光谱仪 (Bruker 公司), RE-A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), LG-18 型冷冻干燥机 (上海四环科学仪器厂), 玻璃层析柱 (1.5 cm × 60 cm, 自制), TGL 16G 台式高速离心机 (上海医用分析仪器厂)。

95 % 乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷, 分析纯; 二氯甲烷、乙腈、甲醇, 色谱纯; PRP-6 聚合物颗粒是本实验室自制的交联度为 9 % 多孔微球, 比表面积为 450 ~ 500 m²/g, 孔径范围 20 ~ 30 nm, 粒径 50 ~ 80 μm, 塔板数为 260/m。

1.2 实验方法

1.2.1 番茄红素的制备 取适量的 95 % 乙醇浸泡过的 PRP-6 树脂, 同时超声 20 min, 使其混和均匀并除去气泡。搅拌均匀后湿法装柱, 使其自然沉降。装好后用 2 倍柱体的质量分数为 95 % 的乙醇冲洗柱子去除杂质, 准备上样。

向 3 kg 番茄酱中加入 4.5 kg 质量分数为 95 % 的乙醇, 在室温下搅拌 1 h, 以除去水分和水溶性色素, 离心分离混和物得酱渣。向酱渣中加入 2 000 mL 乙酸乙酯在 55 °C 下搅拌浸提 40 min 得浸提液。将浸提液浓缩至 300 mL 左右加入乙醇浸泡的 PRP-6 树脂 30 mL, 减压蒸干, 用研钵研磨树脂使其混合

收稿日期: 2004-05-09

基金项目: 国家星火计划项目 (2003EA891016)

第一作者: 女, 1963 年生, 副教授

*通讯联系人

E-mail: qiqi-975224 @163.com

均匀,干法装入层析柱中准备层析分离。

分别用 95%乙醇、 $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{乙醇}) = 1 : 9$, $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{乙醇}) = 2 : 8$, $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{乙醇}) = 4 : 6$, $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{乙醇}) = 6 : 4$ 、二氯甲烷洗脱液进行六个梯度洗脱,收集洗脱液,在 -12°C 的条件下冻结结晶。过滤,真空冻干。得深红色针状晶体约 600 mg。

1.2.2 番茄红素的纯度检测及定性分析 实验采用 HPLC 对所得样品进行纯度检测,采用波谱法进行定性分析及结构鉴定。HPLC 实验条件为:色谱柱及填料 SHIMADZU, V_p -ODS, C_{18} (150 \times 4.6 mm, I.D.); 流动相 $V(\text{甲醇}) : V(\text{乙腈}) : V(\text{二氯甲烷}) = 7 : 7 : 2$; 流量 1 mL/min; 检测波长 472 nm; 进样体积 20 μL ; 柱温 30°C 。

2 结果与讨论

2.1 样品的纯度检测

样品用二氯甲烷溶解,配成适当的浓度,进行 HPLC 检测。以番茄红素标准品作为外标物,采用单点校正法对样品进行定量分析,由样品番茄红素的峰面积与标准品的峰面积进行比较计算,样品纯度为 99.8%。液相色谱如图 1 所示。

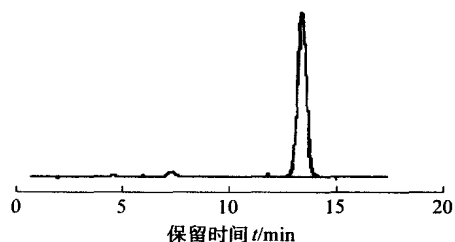


图 1 样品的液相色谱图

Fig. 1 HPLC of sample

2.2 样品的定性分析及结构鉴定

2.2.1 番茄红素的紫外测定 番茄红素样品为深红色针状晶体,将样品的正己烷溶液在 200 ~ 600 nm 范围内进行全波长扫描,最大特征吸收峰在 444, 472 和 502 nm,与标准全反式番茄红素具有相同的特征吸收。如图 2 所示。362 nm 处无顺式结构的特征吸收峰说明样品为全反式番茄红素。

2.2.2 MALDI-TOF 质谱 测定番茄红素样品的质谱,如图 3 所示。由图 3 可知,飞行时间质谱测得样品的平均相对分子质量为 536.6,与理论值 536.85 基本一致,表明此样品的纯度较高。

2.2.3 样品的红外光谱 样品的红外光谱(图 4)

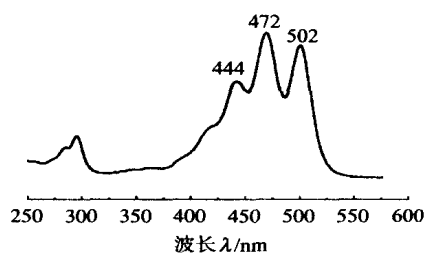


图 2 样品的紫外谱图

Fig. 2 UV/Vis spectroscopy of sample

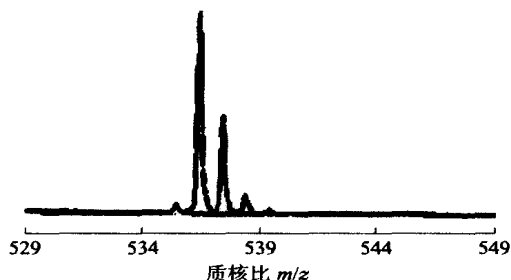


图 3 样品的 MALDI-TOF 质谱图

Fig. 3 MALDI-TOF mass spectrometry of sample

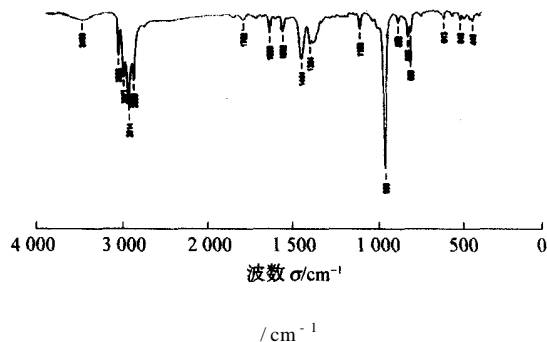


图 4 番茄红素样品在正己烷中的红外吸收光谱

Fig. 4 Infrared spectroscopy of sample

表现为典型的共轭多烯结构,波数 3035 cm^{-1} 为 $=\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰, 1629 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} 为 $\text{C}=\text{C}$ 双键的伸缩振动峰,吸收强度较弱,说明分子的对称性较强; 2971 , 2914 , 2853 , 1444 和 1394 cm^{-1} 处峰表示分子中含有甲基和亚甲基; 959 cm^{-1} 处的强峰为反式 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 面外弯曲振动引起。 $665 \sim 730\text{ cm}^{-1}$ 范围内无吸收峰,而此范围内往往表现出顺式单烯双取代的 $\text{CH}=\text{CH}$ 剪切振动的吸收峰。表明该样品为全反式番茄红素。

2.2.4 样品的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 样品的 ^1H -NMR δ 5.11, 5.94, 6.49, 6.24, 6.17, 6.64, 6.33, 6.27, 6.62, 2.12, 2.12, 1.69, 1.62, 1.82, 1.97, 1.97; ^{13}C -NMR δ 131.7, 124.0, 26.7, 125.1, 137.4, 136.5, 40.2, 139.5, 125.7, 124.8, 135.4, 136.5,

136.7, 132.6, 130.1, 25.7, 17.7, 17.0, 12.9, 12.8 与文献[6]的全反式番茄红素氢谱和碳谱测定结果基本一致,说明产物为全反式番茄红素。其中 $16^{\#}$

C 原子为甲基碳原子,由于与甲基相连的 C=C 双键的超共轭效应, $16^{\#}$ C 原子的化学位移向低场移动至 25.7。番茄红素结构如图 5 所示。

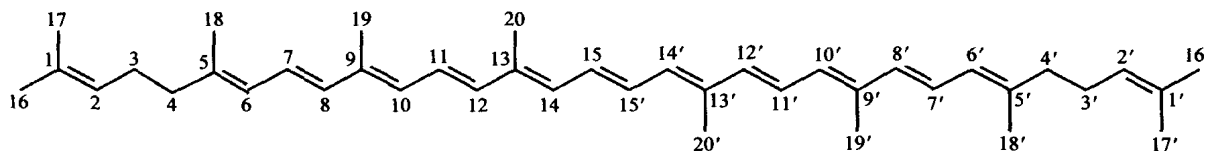


图 5 番茄红素结构式

Fig. 5 Structure of lycopene

2.3.5 回收率和解析率计算 原料番茄酱中番茄红素的质量分数为 0.05%, 5 kg 番茄酱经提取, 层析分离后所得番茄红素样品的回收率以及 PRP-6 树脂对样品的解析率如表 1 所示。

表 1 样品的回收率和解析率

Table 1 Recoveries and desorptions of samples %

	浸提率	回收率	解析率
番茄红素	53	75	90

3 结论

本文以 PRP-6 树脂为吸附剂,以乙醇-二氯甲烷为洗脱体系,层析分离制备出高纯番茄红素晶体,高效液相色谱测定纯度为 99.8%,经 UV, FTIR, MALDI-TOF-MS, $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 分析,确定产物为全反式番茄红素。PRP-6 树脂对番茄红素样品的解析率大于 90%,回收率为 75%。建立了一种

成本低、产品纯度高、简单可行的方法,易于实现大规模的工业生产。

参 考 文 献

- [1] 李 伟,孙新虎,丁宵霖. 番茄红素溶解度的测定[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(8): 54 - 56
- [2] Francesclic S, Bidoli E M, La Vecchia C. Tomatoes and risk of digestive tract cancers[J]. Int J Cancer, 1994, 59: 181 - 184
- [3] 李 伟,肖 刚,丁宵霖. 番茄红素标准样的制备及定性定量分析[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(9): 29 - 33
- [4] 邱进申,王燕燕,郑辉杰,等. 番茄红素的层析分离[J]. 精细化工, 2003, 20(4): 215 - 217
- [5] 张裕卿,张黎明,孟 李,等. 大孔吸附树脂对番茄红素和 β -胡萝卜素吸附分离的研究[J]. 中草药, 2002, 33(7): 602 - 604
- [6] Britton G, Liaaen S, Pfander H. Carotenoids, Vol1B: Spectroscopy[M]. Berlin: Birkhauser Verlag, 1995

Preparation of high purity all-trans lycopene with resin of PRP-6

WANG Zhi-hua¹ QI Guo-xiu¹ CHEN Chao² ZHANG Wei-qiang²
LIU Kai-lu² ZHAO Jing-cheng²

(1. College of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Beijing Purinatural Pharmaceutical Institute, Beijing 100088, China)

Abstract: High purity lycopene was successfully prepared from tomato paste with novel reversed-phase micromolecular resin -highly crosslinked styrene and divinylbenzene copolymers (PRP-6). The product obtained was analysed by UV-Vis, FTIR, MALDI-TOF-MS, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. As a result, the lycopene prepared through this study was proved to be all-trans conformation. HPLC was also used to make a quantitative analysis, and the purity of the lycopene was 99.8%.

Key words: PRP-6 resin; lycopene; qualitative analysis; quantitative analysis; spectroscopy

(责任编辑 曾宪玉)