

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.24202

超高效液相色谱法同时测定甘薯中 13 种类胡萝卜素的含量

贾瑞雪^{1,2,**} 陈伊航^{1,3,**} 张 荣¹ 唐朝臣¹ 王章英^{1,*}

¹ 广东省农业科学院作物研究所 / 广东省农作物遗传改良重点实验室, 广东广州 510640; ² 河北科技师范学院农学与生物科技学院, 河北秦皇岛 066600; ³ 西北农林科技大学草业与草原学院, 陕西杨凌 712100

摘 要: 类胡萝卜素作为评价甘薯食用和加工品质的重要指标, 对于推进甘薯育种至关重要, 但由于缺乏甘薯类胡萝卜素组分及含量的快速检测方法, 限制了甘薯食用品质分析和育种进展。本研究通过优化色谱条件和样品前处理过程, 建立了同时测定甘薯中 13 种类胡萝卜素含量的超高效液相色谱分析方法。结果表明, 待测样品前处理过程中乙醇: 丙酮: 正己烷(1:1:1, v/v/v)作为提取液, 甲基叔丁基醚为复溶液类胡萝卜素得率最高。超高效液相色谱分析条件: 甲醇: 乙腈(1:3, v/v)含 0.01% 2,6-二叔丁基对甲酚(Butylated hydroxytoluene, BHT)和 0.1% 甲酸作为流动相 A 相, 甲基叔丁基醚含 0.01% BHT 作为流动相 B 相梯度洗脱, 色谱柱 YMC Carotenoid C30 (2 mm×100 mm, 3 μm), 流速为 0.8 mL min⁻¹, 柱温 23℃, 进样量 1 μL, 检测波长 450 nm, 分析时间 8 min。该方法中 13 种类胡萝卜素线性关系良好, 相关系数大于 0.997; 精密性、重复性、稳定性及回收率结果均符合要求。本研究建立的超高效液相色谱方法能快速、准确的同时检测甘薯中 13 种类胡萝卜素的含量, 可为大批量甘薯种质资源和育种材料的品质分析奠定基础。
关键词: UPLC; 甘薯品种; β-胡萝卜素; 含量测定

Simultaneous determination of 13 carotenoids in sweetpotato by Ultra-Performance Liquid Chromatography

JIA Rui-Xue^{1,2,**}, CHEN Yi-Hang^{1,3,**}, ZHANG Rong¹, TANG Chao-Chen¹, and WANG Zhang-Ying^{1,*}

¹ Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science / Key Laboratory of Crop Genetic Improvement of Guangdong Province, Guangzhou 510640, Guangdong, China; ² College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, Hebei, China; ³ College of Grassland Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Carotenoids as important indexes to evaluate the edible and process quality of sweetpotato, are crucial to promoting sweetpotato breeding. However, the lack of rapid detection methods for the compositions and contents of carotenoids in sweetpotato has limited the progress of edible quality analysis and breeding of sweetpotato. In this study, an Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) method was established for simultaneous determination of 13 carotenoids in sweetpotato by optimizing the chromatographic conditions and sample pretreatment process. The results showed that ethanol: acetone: hexane (1:1:1, v/v/v) was used as the extraction solution, and methyl tert-butyl ether was used as the dissolution solution to obtain the highest yield of carotenoids. Analysis conditions of UPLC: methanol: acetonitrile (1:3, v/v) containing 0.01% 2,6-butylation hydroxytoluene (BHT) and 0.1% formic acid as mobile phase A, methyl tert-butyl ether containing 0.01% BHT as mobile phase B gradient elution, YMC Carotenoid C30 (2 mm×100 mm, 3 μm), the flow rate was 0.8 mL min⁻¹, injection volume was 1 μL, the detection wavelength was 450 nm, and the analysis time was 8 min. The linear relationships of 13 carotenoids in this method were good, the correlation coefficients were all greater than 0.997. The test

本研究由财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系建设专项(ARS-10), 广东省甘薯马铃薯产业技术体系创新团队(2022KJ111), 广东省农业科学院食品营养与健康研究中心建设运行经费项目(XTXM202205)资助。

This study was supported by the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-10), the Guangdong Modern Agro-industry Technology Research System (2022KJ111), and the Construction and Operation of the Food Nutrition and Health Research Center of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (XTXM202205).

* 通信作者(Corresponding author): 王章英, E-mail: wangzhangying@gdaas.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 贾瑞雪, E-mail: jiaruixue91@126.com; 陈伊航, E-mail: cheniyihang2022@126.com

Received (收稿日期): 2022-08-31; Accepted (接受日期): 2023-02-10; Published online (网络出版日期): 2023-02-22.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20230221.1718.004.html>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

results of precision, repeatability, stability and recovery were all in line with the requirements. The UPLC method in this study can quickly, accurately and simultaneously detect the contents of 13 carotenoids in sweetpotato, which can lay a foundation for quality analysis of germplasm resources and breeding materials in large quantities of sweetpotato.

Keywords: UPLC; sweetpotato cultivar; β -carotene; content determination

甘薯(*Ipomoea batatas* L.)又叫做红薯、地瓜、番薯、红苕等,是世界上继水稻、小麦、马铃薯、玉米和木薯之后的第六大重要粮食作物^[1]。我国是世界上最大的甘薯生产国,根据联合国粮食与农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)统计数据显示,2020 年我国甘薯种植面积占世界甘薯种植总面积的 30.4%,产量占世界总产量的 54.97%。甘薯中含有丰富类胡萝卜素、花青素、多酚、类黄酮等活性物质,其中类胡萝卜素是人体维生素 A 合成的主要来源物质,具有抗氧化、抗癌、改善心血管疾病,提高视力等功效^[2-5]。随着人们保健意识的逐渐增强,对天然类胡萝卜素的需求逐渐增加,甘薯作为保健食品和功能性食品逐渐被认可和青睐。其中,薯肉色泽作为甘薯商品品质、营养品质和加工品质的重要组成部分,直接决定鲜食甘薯的市场价值。已有研究表明,黄色和橙色甘薯主要由类胡萝卜素的组成及含量分布决定^[6]。因此,测定甘薯中类胡萝卜素的组成及含量不仅可以筛选出优质的甘薯品种,而且为甘薯的开发利用提供数据参考。

目前,甘薯中类胡萝卜素含量的检测方法主要有:分光光度计法^[7-9]、高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)^[6,10-11]、高效液相色谱串联质谱(High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)^[12]等方法。分光光度计法虽然操作简单,但是只能测定甘薯中总类胡萝卜素含量,并不能对类胡萝卜素组分进行鉴定,具有局限性。HPLC 法是最常用的方法之一,具有稳定性好、易操作等优点,同时存在耗时较长(一般大于 30 min)、溶剂用量较大、分离度较低的缺点。LC-MS/MS 技术结合液相色谱和质谱共同优点,具有较高的分离性能和鉴别特点,但是由于仪器价格昂贵,很难普及使用。随着色谱技术的不断发展,超高效液相色谱法(Ultra-Performance Liquid Chromatography, UPLC)的出现弥补了 HPLC 检测周期长、分析速度慢、分离度低的缺陷,同时也降低了分析成本,具有更高的分离度、灵敏度和更快的检测速度等特点^[13],已逐渐成为食品^[14-17]、中药^[18]等领域分析检测的有效工具。然而,有关甘薯类胡萝卜素的 UPLC 分析方法国内尚未见报道。

本研究拟通过优化超高效液相色谱分析条件和待测样品前处理过程,建立一种超高效液相色谱同时检测甘薯中 13 种类胡萝卜素的方法,并对 6 种甘薯主栽品种中类胡萝卜素的组成及含量变化进行比较分析,为甘薯类胡萝卜素定量检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 6 个主栽甘薯品种广薯 79 (Guangshu 79)、广薯 87 (Guangshu 87)、普薯 32 号(Pushu 32)、济薯 26 (Jishu 26)、龙薯 9 号(Longshu 9)、烟薯 25 号(Yanshu 25)^[19]均于 2020 年 7 月上旬在广东省农业科学院白云试验基地国家种质广州甘薯圃(23°23'N, 113°26'E)种植。土壤为沙土, pH 6.2, 有机质含量 16.6 g kg⁻¹, 氮含量 1.2 g kg⁻¹, 有机磷含量 114.8 mg kg⁻¹, 速效钾含量 221.0 mg kg⁻¹。采用完全随机区组设计, 3 次重复。每份材料种植 2 行(双行区), 行距 110 cm, 株距 20 cm, 垄高 30 cm。甘薯生长期 138 d, 于 2020 年 11 月 23 日取样, 每个品种 3 株, 分别取中等大小的鲜薯, 清洗干净后擦丝, 四分法对称取样, 称重后液氮速冻, 然后冷冻干燥, 并用粉碎机粉碎。为防止色素被氧化, 样品储存于-20℃暗光环境。

甲醇、乙腈、甲基叔丁基醚、2,6-二叔丁基对甲酚、甲酸, 均为色谱纯, 购自德国默克公司; 无水乙醇、丙酮, 均为优级纯, 购自广州化学试剂厂; 正己烷, 购自国药集团化学试剂有限公司; 13 个类胡萝卜素标准品: 紫黄质(纯度≥95%)、新黄质(纯度≥97%)、环氧玉米黄质(纯度≥95%)购自瑞士 CaroteNature 公司; 叶黄素(纯度≥96%)、玉米黄质(纯度≥97%)、 α -隐黄质(纯度≥98%)、 ϵ -胡萝卜素(纯度≥98%)、 β -隐黄质(纯度≥97%)、 α -胡萝卜素(纯度≥97%)、 β -胡萝卜素(纯度≥95%)、 δ -胡萝卜素(纯度≥95%)、 γ -胡萝卜素(纯度≥96%)、番茄红素(纯度≥95%), 由华南理工大学食品学院郭新波老师课题组提供。

1.2 主要仪器和设备

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪, 配有 DAD 二极管阵列检测器和数据分析系统(美国安捷伦公司); YMC C30 色谱柱(2 mm×100 mm, 3 μ m, 日本 YMC); 旋涡混合器(VORTEX-5)、离心机(Thermo

Fisher, 美国赛默飞世尔科技公司)、电子天平(TX223L, 日本岛津)、冷冻干燥机(Beta 1-8 LSCbasic, 德国 Martin Christ)、超声清洗仪(深圳市洁盟清洗设备有限公司)、粉碎机(FS100S, 广州雷迈机械设备有限公司)、氮吹仪(NDK200-2)。

1.3 色谱条件

色谱柱 YMC Carotenoid C30 (2 mm×100 mm, 3 μm); 流动相: A 相为甲醇: 乙腈(1: 3, v/v)加入 0.01% 2,6-二叔丁基对甲酚(butylated hydroxytoluene, BHT) (g mL⁻¹)和 0.1%甲酸, B 相为甲基叔丁基醚加入 0.01% BHT (g mL⁻¹); 采用梯度洗脱程序: 0 min, 85% A, 15% B; 1 min, 80% A, 20% B; 2 min, 70% A, 30% B; 3 min, 55% A, 45% B; 4 min, 40% A, 60% B; 5 min, 25% A, 75% B; 5.10 min, 85% A, 15% B; 8 min, 85% A, 15% B。柱温: 23℃; 流速 0.8 mL min⁻¹; 进样量 1 μL; 波长 450 nm。

1.4 方法学考察

1.4.1 标准曲线 将 13 种类胡萝卜素标准品, 分别用含有 0.01% BHT 的甲基叔丁基醚溶解, 再稀释成 0.1、0.5、1、5、10、100、200 μg mL⁻¹ 不同浓度的标准溶液, 过 0.22 μm 的滤膜后, 按照 1.3 已确定的色谱条件下进样分析, 以类胡萝卜素标准品的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制不同类胡萝卜素的标准曲线。

1.4.2 定量限、检出限 将最小浓度的类胡萝卜素标准溶液逐级稀释, 按照 1.3 已确定的色谱条件进行分析, 计算当信噪比 S/N=3 时所对应的标准溶液浓度以确定检出限(LOD), 信噪比 S/N=10 时所对应的标准溶液的浓度以确定定量限(LOQ)。

1.4.3 精密度试验 取一定浓度的混标溶液, 按照 1.3 已确定的色谱条件进行分析, 连续进样 6 次, 记录峰面积和保留时间, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 判断仪器精密度是否良好。

1.4.4 重复性试验 取一定浓度的混标溶液 6 份, 按照 1.3 已确定的色谱条件进行分析, 记录峰面积和保留时间, 计算 RSD, 判断重复性是否良好。

1.4.5 稳定性试验 取一定浓度的混标溶液, 于室温放置 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h, 按照 1.3 已确定的色谱条件进行分析, 记录各组分的峰面积和保留时间, 从中选择 6 组数据, 计算 RSD, 判断仪器稳定性。

1.4.6 加标回收率试验 取已知浓度的混合标准品溶液作为本底, 分别加入 3 个不同浓度水平的类胡萝卜素标准品, 按照 1.3 色谱条件进行分析, 记录

类胡萝卜素组分的峰面积, 计算各组分回收率。

1.5 样品前处理条件优化

参照 Xu 等^[20]方法, 稍作修改。准确称取 0.500 g 的甘薯粉末至 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 含 0.01% BHT (g mL⁻¹)的有机溶剂, 室温下漩涡振荡 2 min, 于 4℃条件下, 2500×g 离心 5 min, 然后将上清液转移至新的 15 mL 离心管中; 重复以上提取步骤 2 次, 将离心后上清液合并; 用氮吹仪氮吹至干, 得到类胡萝卜素。再用 1 mL 含有 0.01% BHT (g mL⁻¹)的有机溶剂复溶, 超声震荡 10 min 使其完全溶解, 用 0.22 μm 滤膜过滤后, 保存在棕色进样瓶中, 用于 LC 分析。整个样品前处理过程应避免光操作。

以广薯 79 作为试验材料, 按照上述步骤, 比较不同提取溶剂(乙醇: 丙酮: 正己烷(1: 1: 1, v/v/v)、乙醇: 丙酮: 正己烷(1: 1: 2, v/v/v)、甲醇: 丙酮: 正己烷(1: 1: 1, v/v/v)和甲醇: 丙酮: 正己烷(1: 1: 2, v/v/v))和复溶液(甲醇: 甲基叔丁基醚(3: 1, v/v)、甲醇: 甲基叔丁基醚(1: 1, v/v)、甲醇: 甲基叔丁基醚(1: 3, v/v)、甲基叔丁基醚)对甘薯类胡萝卜素含量的影响。

1.6 主栽甘薯品种类胡萝卜素含量测定

分别精密称取 6 种主栽甘薯冷干样 0.5 g, 每个品种 3 份, 按照 1.5 确定的方法制备色谱分析的供试溶液, 按照 1.3 色谱条件进行检测分析, 记录类胡萝卜素各组分峰面积, 采用外标法计算类胡萝卜素的含量, 并按照以下公式计算类胡萝卜素各组分的含量。

样品中类胡萝卜素含量计算公式如下:

样品中类胡萝卜素含量(μg g⁻¹ DW) $y = cxv/1000/m$

式中, c 表示样本中类胡萝卜素各组分峰面积代入标准曲线得到的类胡萝卜素浓度(μg mL⁻¹), v 表示复溶时所用溶液的体积(μL), m 为称取甘薯块根样品的质量(g)。

1.7 数据分析处理

用 Microsoft Excel 软件对数据进行基本的分析处理, SPSS 26.0 软件对甘薯类胡萝卜素含量进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 UPLC 色谱条件的优化

2.1.1 洗脱程序的确定 为更好地将 13 种类胡萝卜素分离开, 试验探索了 4 种不同的洗脱程序对甘薯类胡萝卜素分离效果的影响。由图 1 可知, 第 1

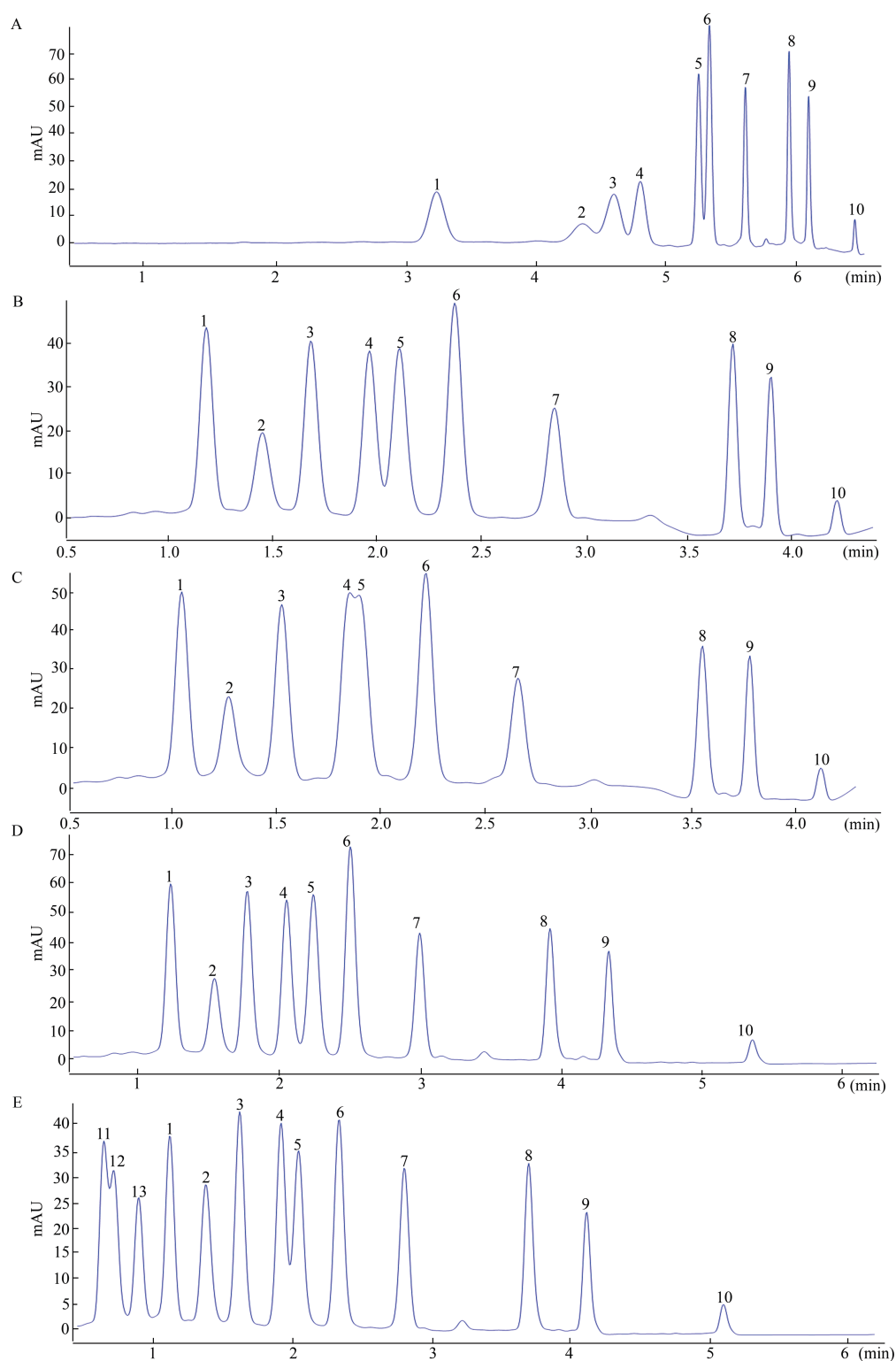


图 1 不同洗脱程序色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the different elution programs

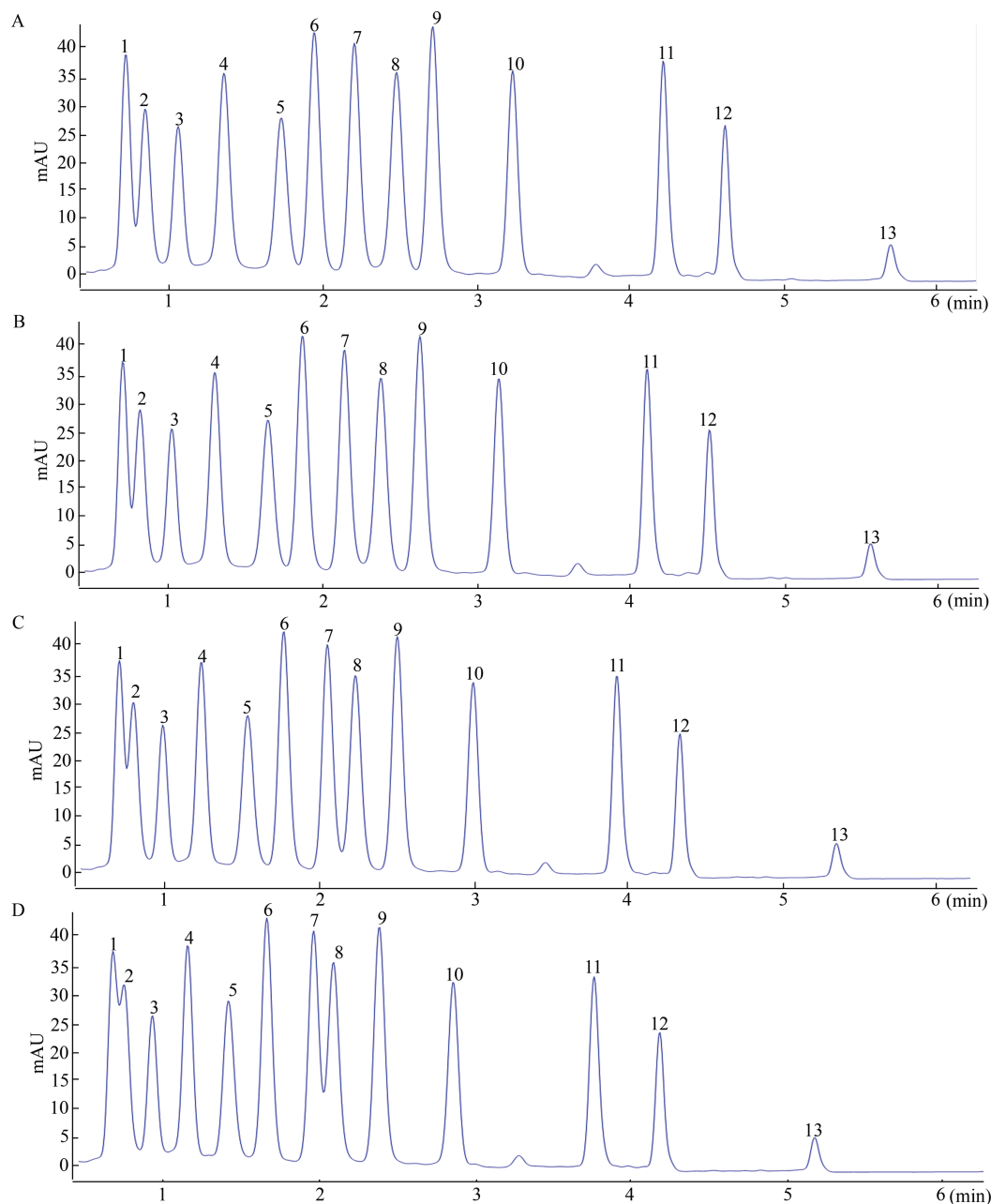
A 图为第 1 种洗脱条件下色谱图; B 图为第 2 种洗脱条件下色谱图; C 图第 3 种洗脱条件下色谱图; D-E 均为第 4 种洗脱条件下色谱图, D 为 10 种胡萝卜素, E 图为 13 种胡萝卜素。1 为叶黄素, 2 为玉米黄质, 3 为 α -隐黄质, 4 为 ϵ -胡萝卜素, 5 为 β -隐黄质, 6 为 α -胡萝卜素, 7 为 β -胡萝卜素, 8 为 δ -胡萝卜素, 9 为 γ -胡萝卜素, 10 为番茄红素, 11 为紫黄质, 12 为新黄质, 13 为环氧玉米黄质。

A: the chromatograms under the first elution condition; B: the chromatograms under the second elution condition; C: the chromatograms under the third elution condition; D-E: the chromatograms under the fourth elution condition, D-E: 10 and 13 carotenoids, respectively. 1: lutein; 2: zeaxanthin; 3: α -cryptoxanthin; 4: ϵ -carotene; 5: β -cryptoxanthin; 6: α -carotene; 7: β -carotene; 8: δ -carotene; 9: γ -carotene; 10: lycopene; 11: violaxanthin; 12: neoxanthin; 13: antheraxanthin.

种洗脱条件下类胡萝卜素在 3 min 以后才被洗脱, 不同组分的峰宽相差较大; 第 2 种和第 3 种洗脱程序, 由于洗脱时间相对较短, 不同组分之间未能更好的分离开; 第 4 种洗脱程序, 10 种类胡萝卜素分离效果比前 3 种洗脱条件下分离效果更好一些, 添加另外 3 种类胡萝卜素以后, 在 6 min 以内可完全洗脱, 但紫黄质与新黄质, ε -胡萝卜素与 β -隐黄质的分离效果有待提高。因此, 选择第 4 种洗脱程序作为最适洗脱程序: 0 min, 85% A, 15% B; 1 min, 80% A, 20% B; 2 min, 70% A, 30% B; 3 min, 55% A, 45% B;

4 min, 40% A, 60% B; 5 min, 25% A, 75% B; 5.10 min, 85% A, 15% B; 8 min, 85% A, 15% B。

2.1.2 色谱柱温度对类胡萝卜素分析的影响 采用第 4 种洗脱程序进行色谱分析, 比较不同色谱柱的温度对类胡萝卜素分离效果的影响。由图 2 可知, 随着温度逐渐降低, 类胡萝卜素分离效果越来越好。在色谱分析过程中, 分离度, 又称分辨率可反映 2 个色谱峰之间的分离情况, 作为衡量色谱柱总分离效能的指标。由表 1 可知, 随着温度的逐渐降低, 色谱峰 1、2、3、4、5、8、10、13 的分离度均呈现



(图 2)

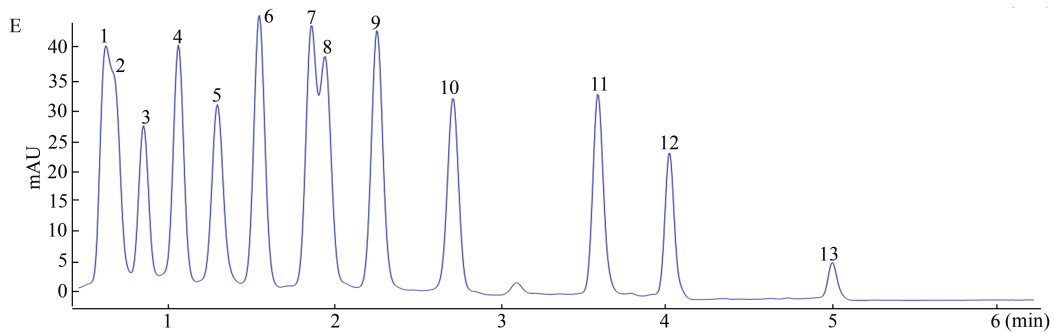


图 2 不同柱温类胡萝卜素色谱图
Fig. 2 Chromatograms of carotenoid at different column temperatures
A~E 分别为 20、23、25、28、30℃条件下类胡萝卜素色谱图。1 为紫黄质, 2 为新黄质, 3 为环氧玉米黄质, 4 为叶黄素, 5 为玉米黄质, 6 为 α -隐黄质, 7 为 ϵ -胡萝卜素, 8 为 β -隐黄质, 9 为 α -胡萝卜素, 10 为 β -胡萝卜素, 11 为 δ -胡萝卜素, 12 为 γ -胡萝卜素, 13 为番茄红素。
A~E are chromatograms of carotenoids at 20, 23, 25, 28, and 30℃, respectively. 1: violaxanthin; 2: neoxanthin; 3: antheraxanthin; 4: lutein; 5: zeaxanthin; 6: α -cryptoxanthin; 7: ϵ -carotene; 8: β -cryptoxanthin; 9: α -carotene; 10: β -carotene; 11: δ -carotene; 12: γ -carotene; 13: lycopene.

表 1 不同色谱条件下 13 种类胡萝卜素分离度
Table 1 Resolution of 13 carotenoids under different chromatographic conditions

色谱条件		分离度 Resolution													
Chromatographic conditions		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
色谱柱温度 Chromatographic column temperature (°C)	20	3.09	1.01	1.67	2.28	2.61	1.49	1.87	1.93	1.67	3.94	3.61	3.69	10.11	2.49
	23	2.88	0.88	1.62	2.18	2.45	1.57	2.00	1.68	1.80	3.87	3.71	3.70	9.89	2.97
	25	2.46	0.67	1.51	2.06	2.26	1.71	2.13	1.33	1.98	3.79	3.79	3.73	9.75	3.37
	28	2.38	0.57	1.58	1.91	2.04	1.86	2.29	0.92	2.14	3.62	3.87	3.76	9.48	3.98
	30	1.58	—	1.35	1.77	1.89	1.97	2.36	0.59	2.35	3.48	3.89	3.78	9.21	4.30
流速 Flow rate (mL min ⁻¹)	0.6	4.02	1.19	1.89	2.59	2.99	1.53	1.93	2.29	1.71	4.22	3.60	3.60	10.43	1.25
	0.8	2.88	0.88	1.62	2.18	2.45	1.57	2.00	1.68	1.80	3.87	3.71	3.70	9.89	2.97
	1	2.64	0.66	1.48	2.00	2.18	2.03	2.44	0.89	2.36	3.70	3.69	3.55	9.75	3.29
进样量 Injection volume (μL)	1	4.23	1.12	2.01	2.56	2.74	1.80	2.23	1.68	1.99	3.98	3.78	3.74	9.88	2.72
	2	2.88	0.88	1.62	2.18	2.45	1.57	2.00	1.68	1.80	3.87	3.71	3.70	9.89	2.97
	3	2.80	0.78	1.30	1.88	2.29	1.20	1.58	2.03	1.43	3.79	3.49	3.58	9.94	2.20

1~13 代表 13 种类胡萝卜素组分对应色谱峰。1 为紫黄质, 2 为新黄质, 3 为环氧玉米黄质, 4 为叶黄素, 5 为玉米黄质, 6 为 α -隐黄质, 7 为 ϵ -胡萝卜素, 8 为 β -隐黄质, 9 为 α -胡萝卜素, 10 为 β -胡萝卜素, 11 为 δ -胡萝卜素, 12 为 γ -胡萝卜素, 13 为番茄红素, 14 为溶剂峰。“—”表示无数据。

1~13 represent the chromatographic peaks of 13 carotene compositions. 1: violaxanthin; 2: neoxanthin; 3: antheraxanthin; 4: lutein; 5: zeaxanthin; 6: α -cryptoxanthin; 7: ϵ -carotene; 8: β -cryptoxanthin; 9: α -carotene; 10: β -carotene; 11: δ -carotene; 12: γ -carotene; 13: lycopene; 14: the solvent peak. “—”: no data.

逐渐升高的趋势, 表明温度降低, 有助于提高不同类胡萝卜素之间的分离效能。当温度为 20℃时, 除了色谱峰 2、6 以外, 其余 12 个峰分离度均大于 1.5, 达到完全分离状态; 柱温 23℃时, 6 号色谱峰比 20℃条件下分离效果较好一些, 且除了色谱峰 2 以外, 其余峰分离度均大于 1.5, 达到了完全分离的状态。所以在类胡萝卜素分离效果较好, 峰形良好的基础上, 23℃作为最适色谱柱温度。

2.1.3 流速对类胡萝卜素分析的影响 在 2.1.1 已确定的梯度洗脱程序下, 设置柱温为 23℃, 选择合适的流速。由图 3 和表 1 可知, 虽然流速对类胡

萝卜素出峰顺序并无影响, 但是影响出峰的时间。当流速为 0.6 mL min⁻¹ 时, 类胡萝卜素出峰较晚, 导致溶剂峰与番茄红素色谱峰之间分离度为 1.25, 表示番茄红素未能在 8 min 内完全分离出来; 流速为 1.0 mL min⁻¹, 速度太快, 虽然 13 种类胡萝卜素都可分离出, 但 ϵ -胡萝卜素与 β -隐黄质色谱峰之间的分离度只有 0.89, 2 个物质未能完全分离; 流速 0.8 mL min⁻¹ 的条件下, 13 种类胡萝卜素可在 6 min 内全部分离, 除了紫黄质与新黄质之间分离度为 0.88, 其他类胡萝卜素之间分离度均大于 1.5, 表示可完全分离。因此, 流速 0.8 mL min⁻¹ 比较合适。

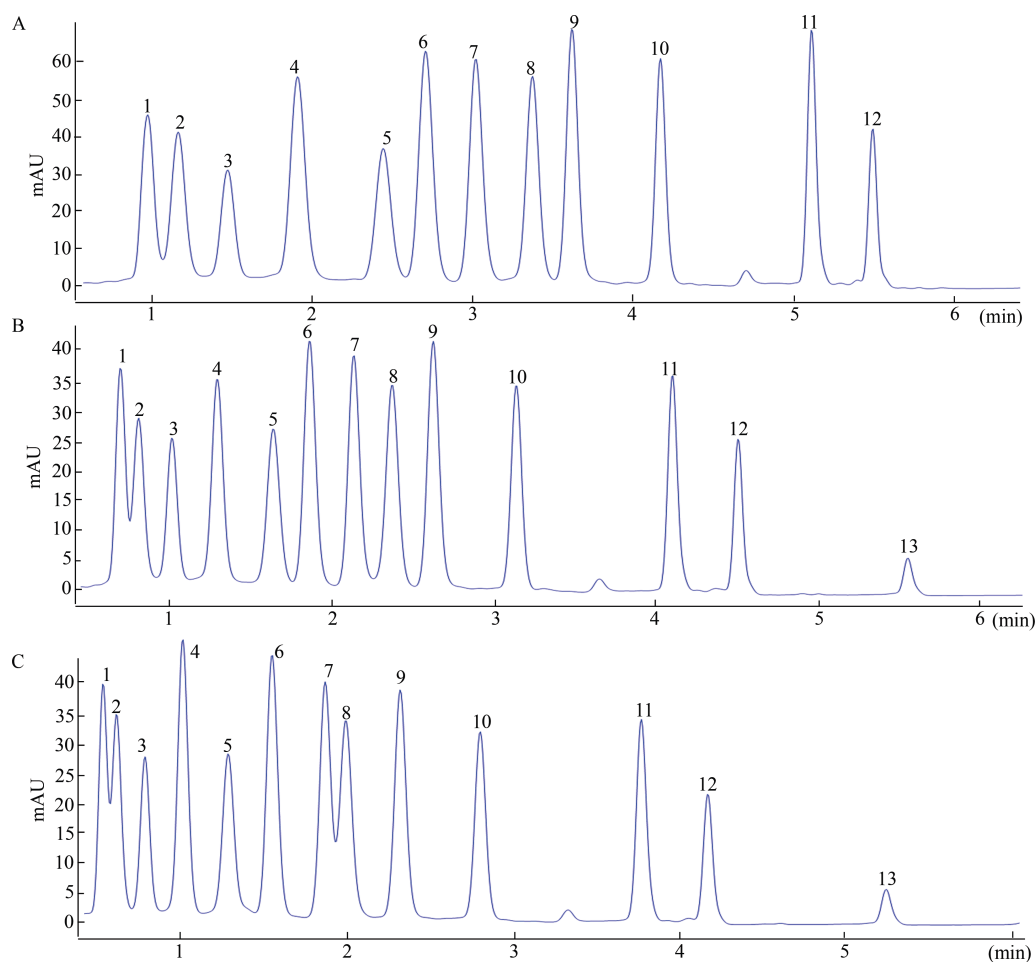


图 3 不同流速类胡萝卜素的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of the different flow rates

A~C 分别代表流速为 0.6、0.8 和 1.0 mL min⁻¹ 条件下类胡萝卜素色谱图。1 为紫黄质, 2 为新黄质, 3 为环氧玉米黄质, 4 为叶黄素, 5 为玉米黄质, 6 为 α -隐黄质, 7 为 ϵ -胡萝卜素, 8 为 β -隐黄质, 9 为 α -胡萝卜素, 10 为 β -胡萝卜素, 11 为 δ -胡萝卜素, 12 为 γ -胡萝卜素, 13 为番茄红素。

A~C represents chromatograms of carotenoids at flow rates of 0.6, 0.8, and 1.0 mL min⁻¹, respectively. 1: violaxanthin; 2: neoxanthin; 3: antheraxanthin; 4: lutein; 5: zeaxanthin; 6: α -cryptoxanthin; 7: ϵ -carotene; 8: β -cryptoxanthin; 9: α -carotene; 10: β -carotene; 11: δ -carotene; 12: γ -carotene; 13: lycopene.

2.1.4 进样量对类胡萝卜素分析的影响 在 2.1.1、2.1.2 和 2.1.3 已确定的色谱条件下, 优化进样体积。不同的进样量对应类胡萝卜素色谱图见图 4, 色谱峰之间分离度见表 1, 随着进样体积逐渐增大, 除番茄红素以外, 其他类胡萝卜素色谱峰的分离度均呈现降低趋势, 表示类胡萝卜素分离效果降低; 当进样量为 1 μ L 时, 紫黄质与新黄质两色谱峰的分离度为 1.12, 大于 1, 表示两峰基本分离, 其他色谱峰分离度均大于 1.5, 表明完全分离。因此, 进样量 1 μ L 条件下, 13 种类胡萝卜素可基本分离, 峰形良好。

通过以上色谱条件的优化, 最终确定色谱条件为: 色谱柱 YMC Carotenoid C30 (2 mm $\times$ 100 mm, 3 μ m); 流动相: A 相为甲醇: 乙腈(1:3, v/v)加入 0.01% BHT 和 0.1% 甲酸, B 相为甲基叔丁基醚加入

0.01% BHT (g mL⁻¹); 采用梯度洗脱程序: 0 min, 85% A, 15% B; 1 min, 80% A, 20% B; 2 min, 70% A, 30% B; 3 min, 55% A, 45% B; 4 min, 40% A, 60% B; 5 min, 25% A, 75% B; 5.10 min, 85% A, 15% B; 8 min, 85% A, 15% B。柱温: 23 $^{\circ}$ C; 流速 0.8 mL min⁻¹; 进样量 1 μ L; 波长 450 nm。

2.2 UPLC 方法评价

2.2.1 类胡萝卜素线性关系、检出限和定量限

以类胡萝卜素标准品浓度作为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得到 13 种类胡萝卜素的线性回归方程如表 2, 标准物质的线性范围较宽, 线性相关系数 $r > 0.997$, 表明类胡萝卜素在线性范围内线性关系良好, 适用于甘薯 13 种类胡萝卜素的测定。13 种类胡萝卜素的检出限 0.003~0.018 μ g mL⁻¹、定量限在 0.009~0.060 μ g mL⁻¹, 表明该方法灵敏度较高。

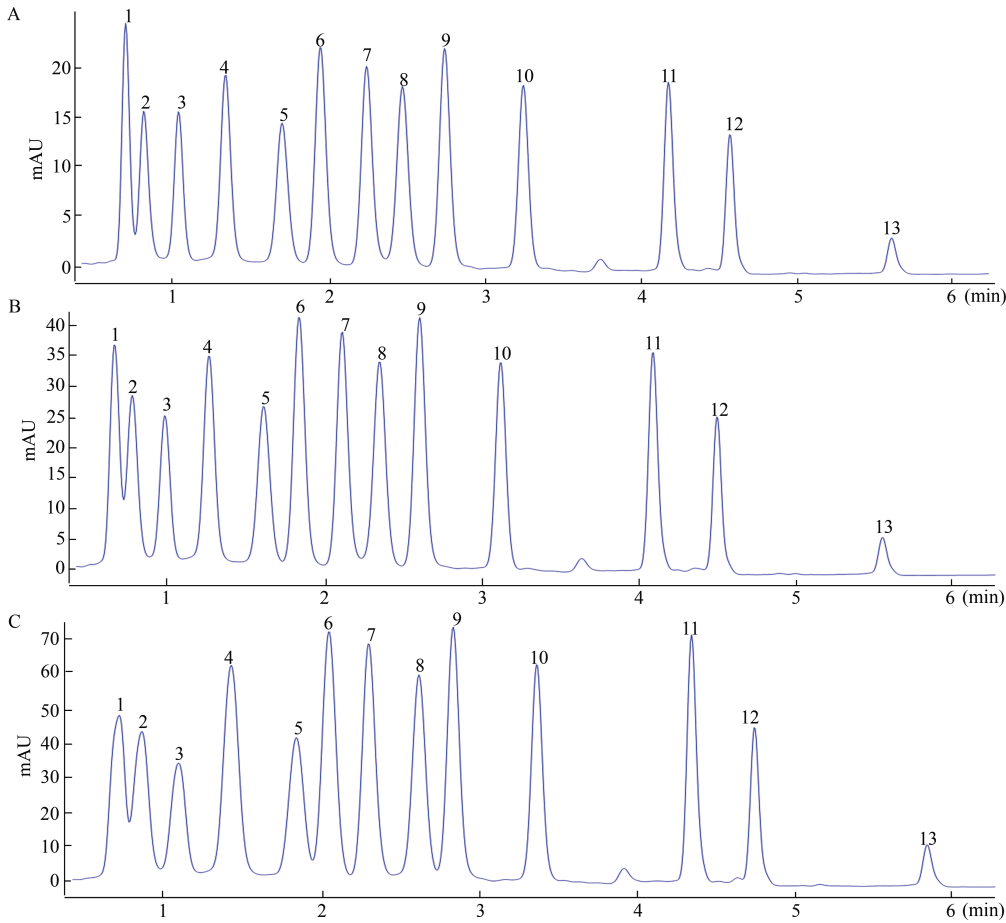


图 4 不同进样量类胡萝卜素色谱图

Fig. 4 Chromatograms of the different injection volumes
A~C 分别代表进样体积为 1、2 和 3 μL 条件下类胡萝卜素色谱图。1 为紫黄质, 2 为新黄质, 3 为环氧玉米黄质, 4 为叶黄素, 5 为玉米黄质, 6 为 α -隐黄质, 7 为 ε -胡萝卜素, 8 为 β -隐黄质, 9 为 α -胡萝卜素, 10 为 β -胡萝卜素, 11 为 δ -胡萝卜素, 12 为 γ -胡萝卜素, 13 为番茄红素。A~C represents the chromatograms of carotenoids at injection volumes of 1, 2, and 3 μL , respectively. 1: violaxanthin; 2: neoxanthin; 3: antheraxanthin; 4: lutein; 5: zeaxanthin; 6: α -cryptoxanthin; 7: ε -carotene; 8: β -cryptoxanthin; 9: α -carotene; 10: β -carotene; 11: δ -carotene; 12: γ -carotene; 13: lycopene.

表 2 13 种类胡萝卜素的线性回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, and detection limits of carotenoids

类胡萝卜素 Carotenoids	保留时间 Retention time (min)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	检出限 LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
紫黄质 Violaxanthin	0.709	0.1–100	$y = 14.2103x - 2.2023$	0.9997	0.003	0.009
新黄质 Neoxanthin	0.831	0.1–50	$y = 11.9700x + 5.1485$	0.9995	0.004	0.015
环氧玉米黄质 Antheraxanthin	1.057	0.1–100	$y = 9.3125x - 0.0484$	0.9996	0.004	0.015
叶黄素 Lutein	1.370	0.1–100	$y = 16.0211x + 18.3307$	0.9985	0.003	0.012
玉米黄质 Zeaxanthin	1.678	0.1–100	$y = 11.7821x + 13.2805$	0.9971	0.005	0.016
α -隐黄质 α -cryptoxanthin	1.961	0.1–100	$y = 20.9719x + 10.9579$	0.9984	0.003	0.010
ε -胡萝卜素 ε -carotene	2.363	0.1–100	$y = 16.7789x + 16.6374$	0.9975	0.003	0.011
β -隐黄质 β -cryptoxanthin	2.506	0.1–100	$y = 17.7172x + 5.8782$	0.9990	0.004	0.012
α -胡萝卜素 α -carotene	2.874	0.1–100	$y = 18.1369x + 9.9311$	0.9986	0.003	0.010
β -胡萝卜素 β -carotene	3.317	0.1–200	$y = 16.3936x - 4.5911$	0.9993	0.004	0.012
δ -胡萝卜素 δ -carotene	4.326	0.1–100	$y = 15.1643x + 8.9234$	0.9982	0.003	0.011
γ -胡萝卜素 γ -carotene	4.712	0.1–100	$y = 9.4632x + 3.0909$	0.9997	0.005	0.016
番茄红素 Lycopene	5.770	0.1–100	$y = 2.9934x + 1.1650$	0.9990	0.018	0.060

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantitation.

2.2.2 精密度、重复性和稳定性试验 类胡萝卜素混合标准品溶液连续测定 6 次, 得到各成分峰面积和保留时间相对标准偏差 RSD 分别在 0.46%~8.66%和 0.45%~2.02%之间, 表明仪器精密度良好。由表 3 可知, 重复性试验结果显示, 类胡萝卜素的峰面积和保留时间相对标准偏差分别在 0.35%~3.14%和 1.07%~2.76%之间, 表示色谱分析方法重复性良好; 稳定性试验 13 种类胡萝卜素峰面积和保留时间相对标准偏差分别在 1.80%~14.05%和 4.38%~8.16%之间, 表明溶液在 24 h 内稳定。

2.2.3 加标回收率试验 以类胡萝卜素混合标准品

作为本底, 分别添加不同浓度水平的标准溶液, 结果如表 4 所示, 13 种类胡萝卜素不同水平加标平均回收率均在 84.61%~122.38%, 表明检测方法准确性良好。

2.3 待测样品前处理条件的优化

试验分别比较了 4 种提取溶剂和 4 种复溶液共 16 组组合(每组 3 个重复), 对广薯 79 类胡萝卜素含量的影响。方差分析结果显示, 不同提取溶剂对广薯 79 类胡萝卜素含量无显著影响($P = 0.374 > 0.05$), 不同复溶液对广薯 79 类胡萝卜素含量影响显著($P < 0.01$), 提取溶剂和复溶液交互效应不显著($P = 0.279 > 0.05$)。由表 5 可知, 随着复溶液中甲基叔丁基醚的

表 3 精密度、重复性和稳定性相对标准偏差
Table 3 Relative standard deviations (RSD) of precision, repeatability, and stability

类胡萝卜素 Carotenoids	精密度 Precision RSD (%)		重复性 Repeatability RSD (%)		稳定性 Stability RSD (%)	
	峰面积 Area	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Area	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Area	保留时间 Retention time (min)
紫黄质 Violaxanthin	0.46	1.31	0.51	1.61	7.03	5.07
新黄质 Neoxanthin	0.89	1.82	1.10	2.23	1.80	6.61
环氧玉米黄质 Antheraxanthin	0.49	1.75	0.79	2.23	6.97	6.95
叶黄素 Lutein	0.55	1.91	0.82	2.43	3.90	7.64
玉米黄质 Zeaxanthin	0.60	2.02	0.99	2.76	6.67	8.16
α -隐黄质 α -cryptoxanthin	0.55	1.55	0.80	2.21	5.36	6.88
ε -胡萝卜素 ε -carotene	0.73	1.14	1.20	1.70	4.75	5.76
β -隐黄质 β -cryptoxanthin	0.74	1.47	1.45	2.25	8.15	6.85
α -胡萝卜素 α -carotene	0.86	1.09	1.05	1.74	6.48	5.75
β -胡萝卜素 β -carotene	8.66	0.92	1.19	1.55	11.08	5.33
δ -胡萝卜素 δ -carotene	0.50	0.61	0.35	1.32	6.69	4.64
γ -胡萝卜素 γ -carotene	0.86	0.48	0.59	1.15	10.51	4.38
番茄红素 Lycopene	5.76	0.45	3.14	1.07	14.05	4.57

表 4 13 种类胡萝卜素的回收率
Table 4 Recovery rate of 13 carotenoids

类胡萝卜素 Carotenoids	本底值 Background content	回收率 Recovery rate (%)			平均值回收率 Average recovery rate (%)
		添加量 1 μg	添加量 2 μg	添加量 3 μg	
		Addition amount 1 μg	Addition amount 2 μg	Addition amount 3 μg	
紫黄质 Violaxanthin	0	138.35	132.15	96.65	122.38
新黄质 Neoxanthin	0	74.64	91.43	91.32	85.80
环氧玉米黄质 Antheraxanthin	0	116.19	110.63	97.25	108.02
叶黄素 Lutein	1	104.71	103.42	117.10	108.41
玉米黄质 Zeaxanthin	1	111.90	112.67	130.56	118.38
α -隐黄质 α -cryptoxanthin	1	96.12	95.93	110.95	101.00
ε -胡萝卜素 ε -carotene	1	97.73	98.90	113.73	103.45
β -隐黄质 β -cryptoxanthin	1	91.99	91.58	105.84	96.47
α -胡萝卜素 α -carotene	1	92.94	93.89	108.49	98.44
β -胡萝卜素 β -carotene	1	80.54	80.11	93.19	84.61
δ -胡萝卜素 δ -carotene	1	83.79	89.19	105.73	92.90
γ -胡萝卜素 γ -carotene	1	92.51	93.31	110.18	98.67
番茄红素 Lycopene	1	84.82	87.86	106.71	93.13

表 5 不同提取溶剂和复溶液组合广薯 79 类胡萝卜素含量
Table 5 Carotenoid content of Gangshu 79 in the different extraction and resolution

提取溶剂 Extraction solution	复溶液 Dissolution solution				F 检验 F-test	显著性 Significant
	甲醇:甲基叔丁基醚 (3:1, v/v) Methanol:Methyl tert-butyl ether (3:1, v/v)	甲醇:甲基叔丁基醚 (1:1, v/v) Methanol:Methyl tert-butyl ether (1:1, v/v)	甲醇:甲基叔丁基醚 (1:3, v/v) Methanol:Methyl tert-butyl ether (1:3, v/v)	甲基叔丁基醚 tert-butyl ether		
乙醇:丙酮:正己烷(1:1:1, v/v/v) Ethanol: acetone: n-hexane (1:1:1, v/v/v)	18.06 ± 1.88	37.33 ± 5.31	172.23 ± 14.88	214.49 ± 19.92		
乙醇:丙酮:正己烷(1:1:2, v/v/v) Ethanol: acetone: n-hexane (1:1:2, v/v/v)	19.44 ± 3.38	39.28 ± 3.33	199.29 ± 34.94	193.91 ± 18.14		
甲醇:丙酮:正己烷(1:1:1, v/v/v) Methanol: acetone: n-hexane (1:1:1, v/v/v)	17.11 ± 1.58	32.46 ± 0.71	152.99 ± 12.03	205.36 ± 16.49		
甲醇:丙酮:正己烷(1:1:2, v/v/v) Methanol: acetone: n-hexane (1:1:2, v/v/v)	17.06 ± 1.72	38.42 ± 3.35	167.99 ± 28.80	195.71 ± 33.25		
提取溶剂 Extraction solution					1.074	0.374
复溶液 Dissolution solution					366.885	< 0.001
提取溶剂×复溶液 Extraction solution×dissolution solution					1.293	0.279

类胡萝卜素含量单位为 $\mu\text{g g}^{-1}$ 。The unit of carotenoid content is $\mu\text{g g}^{-1}$.

比例越来越高, 广薯 79 的类胡萝卜素含量逐渐升高, 复溶液为甲基叔丁基醚时, 类胡萝卜素含量最高, 所以甲基叔丁基醚为最佳复溶液。复溶液为甲基叔丁基醚的条件下, 提取溶剂为乙醇: 丙酮: 正己烷(1: 1: 1, v/v/v)时广薯 79 类胡萝卜素含量最高, 且检测到类胡萝卜素组分种类最多, 因此, 乙醇: 丙酮: 正己烷(1: 1: 1, v/v/v)为最适提取溶剂。

2.4 主栽甘薯类胡萝卜素含量分析

利用本方法对国内主栽甘薯品种中类胡萝卜素的组成及含量进行测定, 验证本方法的准确性和

可靠性。从表 6 中可知, 6 个品种中共检测到了 8 种类胡萝卜素组分, 其中紫黄质、环氧玉米黄质和 β -胡萝卜素在所有品种中都检测到了。不同甘薯品种中类胡萝卜素组分存在差异, 烟薯 25 中共检测到 8 种类胡萝卜素, 龙薯 9 号检测到 7 种类胡萝卜素, 广薯 87 和广薯 79 分别检测到 6 种, 普薯 32 检测到 5 种, 济薯 26 中检测到的类胡萝卜素种类最少, 为 4 种。除济薯 26 中主要类胡萝卜素为环氧玉米黄质以外, 其他 5 个品种中主要类胡萝卜素为 β -胡萝卜素。

表 6 不同甘薯品种类胡萝卜素含量
Table 6 Carotenoid content of different sweetpotato cultivars

类胡萝卜素 Carotenoids	含量 Content ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
	龙薯 9 号 Longshu 9	广薯 87 Guangshu 87	普薯 32 Pushu 32	广薯 79 Guangshu 79	济薯 26 Jishu 26	烟薯 25 Yanshu 25
紫黄质 Violaxanthin	2.22	0.79	1.16	0.41	0.62	0.72
新黄质 Neoxanthin	1.54	1.60	ND	ND	0.50	0.39
环氧玉米黄质 Antheraxanthin	4.07	5.79	1.11	3.19	6.30	3.55
叶黄素 Lutein	3.18	ND	ND	ND	ND	0.81
玉米黄质 Zeaxanthin	0.41	0.99	ND	0.10	ND	0.67
α -隐黄质 α -cryptoxanthin	0.88	ND	0.78	2.88	ND	2.70
ε -胡萝卜素 ε -carotene	ND	0.41	2.62	2.00	ND	1.28
β -隐黄质 β -cryptoxanthin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α -胡萝卜素 α -carotene	ND	ND	ND	ND	ND	ND
β -胡萝卜素 β -carotene	58.66	27.86	178.08	205.91	3.79	125.34
δ -胡萝卜素 δ -carotene	ND	ND	ND	ND	ND	ND
γ -胡萝卜素 γ -carotene	ND	ND	0.00	ND	ND	ND
番茄红素 Lycopene	ND	ND	0.00	ND	ND	ND
总含量 Total content	70.97	37.49	183.76	214.49	11.29	135.15

ND: 未检出。ND: not detected.

3 讨论

近年来, 食品中类胡萝卜素的检测多采用分光光度计法、高效液相色谱法和超高效液相色谱法, 本研究对不同物种的检测方法进行了比较, 见表 7。分光光度计法对类胡萝卜素进行定量检测, 一般包括比色法和吸光系数法, 但该方法不能明确待测样品中含有的类胡萝卜素种类及含量, 只能将已知类胡萝卜素标准品的吸光值或者吸光系数作为参考, 计算待测样品中总胡萝卜素的含量。另外, 如果待测样品中基本只含有一种胡萝卜素, 且以该胡萝卜素标准品的吸光度值或者吸光系数作为参考, 这样该类胡萝卜素的定量结果是可靠的; 但是当待测样品中不仅仅只有一种类胡萝卜素时, 分光光度计法

定量的结果便会有较大的误差^[21]。由于甘薯中含有多种类胡萝卜素, 若采用分光光度计法很难准确测定总胡萝卜素以及每种类胡萝卜素组分的含量。高效液相色谱法在柑橘^[22]、菠萝蜜^[23]、香蕉^[24]、甘薯^[6,10]等物种上均有报道, 虽然该技术可检测类胡萝卜素组分的含量, 但是存在检测周期长、溶剂消耗大、分辨率不高等缺点, 详细比较见表 7。Ishiguro 等^[6]和 Kim 等^[10]在甘薯不同品种和愈伤组织中检测多种类胡萝卜素的含量, 用时约 60 min (表 7), 不利于进行大批量种质资源类胡萝卜素的快速检测分析。随着色谱技术的发展, 超高效液相色谱分析方法逐渐成为食品中类胡萝卜素检测的有效工具, 该方法是采用比常规 HPLC 色谱柱(填充颗粒为 5 μm 直径)更小粒径的色谱柱, 不仅可以缩短整体分析时间, 而

表 7 不同物种间类胡萝卜素检测方法比较
Table 7 Comparison of carotenoid detection methods among different species

物种 Species	检测方法 Detection method	部位 Part	类胡萝卜素种类 Carotenoid composition	提取方法 Extraction method	提取溶剂 Extraction solution	复溶液 Dissolution solution	色谱柱 Chromatographic column	洗脱程序 Elution programs	温度 (°C)	流速 Flow rate (mL min ⁻¹)	进样量 Injection volume (μL)	分析时间 Time (min)	参考文献 References
甘薯 Sweetpotato	UPLC	薯肉 Flesh	13	非皂化 Non saponification	乙醇:丙酮:正己烷 (1:1:1) Ethanol: acetone: n-hexane (1:1:1)	甲基叔丁基醚 Methyl tert-butyl ether	YMC Carotenoid C30 (2 mm×100 mm, 3 μm)	梯度洗脱 Gradient elution	23	0.8	1	8	本研究 This study
甘薯 Sweetpotato	分光光度计法 Spectrophotometry	薯肉 Flesh	1	非皂化 Non saponification	丙酮 Acetone	—	—	—	—	—	—	—	[8]
甘薯 Sweetpotato	HPLC	薯肉 Flesh	17	非皂化 Non saponification	—	—	Wakopak Navi C30 (30 mm×250 mm, 5 μm)	梯度洗脱 Gradient elution	35	0.85	—	60	[6]
甘薯 Sweetpotato	HPLC	愈伤组织 Callus	6	非皂化 Non saponification	丙酮 Acetone	二氯甲烷:丙酮(1:1) Methylene chloride: acetone (1:1)	YMC Carotenoid C30 (4.6 mm×250 mm, 3 μm)	梯度洗脱 Gradient elution	22	0.70	—	60	[10]
甘薯 Sweetpotato	HPLC	茎叶 Leaves	2	非皂化 Non saponification	甲醇 Methanol	—	Wondasil C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)	梯度洗脱 Gradient elution	20	1	10	30	[34]

(续表 7)

物种 Species	检测方法 Detection method	部位 Part	类胡萝卜 素种类 Carotenoid composition	提取方法 Extraction method	提取溶剂 Extraction solution	复溶液 Dissolution solution	色谱柱 Chromatographic column	洗脱程序 Elution programs	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	流速 Flow rate (mL min^{-1})	进样量 Injection volume (μL)	分析时间 Time (min)	参考文献 References
柑橘 Citrus	HPLC	果皮	7	皂化	丙酮	—	C18	等度洗脱	25	1	20	—	[22]
	HPLC	Peel		Saponification	Acetone		(3.9 mm $\times$ 300 mm, 10 μm)	Isocratic elution					
菠萝蜜 Jackfruit	HPLC	果肉	16	皂化	乙醇:丙酮:正己烷	甲醇和甲基叔丁基醚	YMC Carotenoid	梯度洗脱	—	1	—	60	[23]
	HPLC	Flesh		Saponification	(1:1:2) Ethanol:acetone: n-hexane (1:1:2)	Methanol and methyl tert-butyl ether	C30 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)	Gradient elution					
香蕉 Banana	HPLC	果肉	9	皂化	乙醇:丙酮:正己烷	甲醇:甲基叔丁基醚	YMC Carotenoid	梯度洗脱	20	1	10	50	[24]
	HPLC	Pulp		Saponification	(1:1:2) Ethanol:acetone: n-hexane (1:1:2)	(1:1) Methanol:methyl tert-butyl ether (1:1)	C30 (4.5 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)	Gradient elution					
草莓 Strawberry	UPLC	果实	4	皂化	丙酮:石油醚(1:2)	丙酮	C18 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μm)	等度洗脱	27.4	0.5	50	5	[26]
	UPLC	Fruit		Saponification	Acetone:petroleum ether (1:2)	Acetone		Isocratic elution					
南瓜 Pumpkin	UPLC	果肉	4	皂化	乙醇	—	C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm)	等度洗脱	30	0.5	10	8	[17]
	UPLC	Pulp		Saponification	Ethanol			Isocratic elution					
小麦 Wheat	UPLC	麦粒	4	非皂化	正己烷:丙酮(80:20)	甲醇:乙酸乙酯(68:32)	YMC Carotenoid	梯度洗脱	35	0.4	8	25	[27]
	UPLC	Kernel		Non saponification	N-hexane:acetone (80:20)	Methanol:ethyl acetate (68:32)	C30 (4.6 mm $\times$ 100 mm, 3 μm)	Gradient elution					

且能实现更高的分辨率,具有快速高效、高分辨率、高灵敏度等特点^[25],可快速准确测定类胡萝卜素组分的含量。但国内外有关甘薯类胡萝卜素组分和含量的研究尚未见报道。本研究采用 YMC Carotenoid C30 色谱柱(2 mm×100 mm, 3 μm),由于色谱柱粒径较小,在增加色谱柱的效能,提高分离度的同时,该柱为类胡萝卜素专用色谱柱,可以更好的分离类胡萝卜素的同分异构体,适用于多组分类胡萝卜素的分离。与陈敏氢等^[26]、王彬等^[17]采用 C18 色谱柱检测 4 种类胡萝卜素相比,本试验采用 C30 色谱柱建立的 UPLC 分析方法可同时检测甘薯中 13 种类胡萝卜素的含量,分析的类胡萝卜素组分更多。虽然李文爽等^[27]检测小麦麦粒类胡萝卜素的 UPLC 方法,同样采用了 YMC C30 类胡萝卜素专用色谱柱,但由于其只检测了 4 种类胡萝卜素,用时 25 min,是本方法分析时间 8 min 的 3 倍左右,对于溶剂的消耗较大,对环境不太友好。因此,本研究建立的 UPLC 方法不仅可以同时检测甘薯中多种类胡萝卜素的含量,也大大缩短了分析时间,可适用于大规模种质资源鉴定和育种材料品质分析。

类胡萝卜素提取方法有很多,包括:超声波辅助提取法、皂化后提取法、有机溶剂直接提取法等^[28],由于不同植物或者组织中类胡萝卜素的组成不同,采用的提取方法和提取试剂也不尽相同。类胡萝卜素根据其结构组成不同,可分为胡萝卜素类和叶黄素类,其中叶黄素类是指含有羟基的含氧类胡萝卜素,比胡萝卜素类极性更强^[29],叶黄素类可与脂肪酸结合酯化形成类胡萝卜素酯。由于甘薯中脂质含量较少,类胡萝卜素主要以游离态存在,几乎没有类胡萝卜素酯类存在^[30],所以本试验采用了非皂化处理方式对类胡萝卜素的提取,与 Rodriguez-Amaya 和 Kimura^[30]报道的甘薯类胡萝卜素提取方法相比简化了前处理过程,缩短了提取时间。类胡萝卜素作为脂溶性化合物,常采用有机溶剂进行提取,提取非极性胡萝卜素需选择己烷等非极性溶剂,极性叶黄素类提取需乙醇、丙酮等极性溶剂^[31-32]。王彬等^[17]发现南瓜果肉中主要含有 β-胡萝卜素、α-胡萝卜素和叶黄素 3 种类胡萝卜素,以乙醇作为提取剂类胡萝卜素的含量最高;付莉和王歆姬^[33]研究表明,利用丙酮+石油醚作为提取剂,南瓜皮的类胡萝卜素得率最高;李文爽等^[27]建立 UPLC 方法检测小麦粒中的玉米黄质、叶黄素、α-胡萝卜素和 β-胡萝卜素 4 种类胡萝卜素含量,研究发现正己烷:丙酮

(80:20)作为提取试剂,小麦类胡萝卜素的提取效果最好,且不同提取方法无显著差异。本研究将乙醇(或甲醇)、丙酮和正己烷混合液作为提取溶剂,可满足同时提取不同极性类胡萝卜素的需求。另外,通过比较我们发现,虽然甲醇比乙醇极性更强,但是与丙酮、正己烷混合后的协同作用,以及正己烷在混合液中的体积比变化对于甘薯中类胡萝卜素的提取并无显著影响。由于不同食品、作物中或者不同组织中类胡萝卜素的组成及含量分布不同,且类胡萝卜素的极性不同,所以需要的提取溶剂也不一致。如表 7 中南瓜果肉^[17]、柑橘果皮^[22]、香蕉果肉^[24]、草莓果实^[26]、甘薯茎叶^[34]等类胡萝卜素的提取溶剂与本研究都不相同,因此,针对不同物种不同组织中类胡萝卜素的提取溶剂需要不断地优化。关于类胡萝卜素氮吹干后复溶液的选择,一般考虑用少量色谱分析的流动相来溶解。不同复溶液的选择也会影响类胡萝卜素的测定结果,范迎康等^[24]比较了甲基叔丁基醚中加入不同比例甲醇对香蕉类胡萝卜素组分的影响,结果发现甲醇与甲基叔丁基醚体积比为 1:1 时,类胡萝卜素出峰效果更好。本试验选择了不同比例的流动相组合作为复溶液(甲醇:甲基叔丁基醚分别为 3:1、1:1、1:3 和 0:1),通过比较发现随着甲醇的比例越大,甘薯中类胡萝卜素的含量越低,其中只有甲基叔丁基醚作为复溶液时,类胡萝卜素含量最高。这可能是由于本试验采用非皂化直接有机溶剂提取方法,类胡萝卜素中会有一些杂质的存在^[27],对复溶液的要求不同;另外,也可能是因为添加了甲醇以后,对于 UPLC 色谱分析流动相比比例的改变,对类胡萝卜素分离效果有一定影响。因此,通过前处理条件的优化,我们选择了更适用于甘薯类胡萝卜素检测的提取溶剂和复溶液,有利于提高类胡萝卜素的检测效果。

4 结论

本研究建立了一种超高效液相色谱同时测定甘薯中 13 种类胡萝卜素的方法,前处理过程中乙醇:丙酮:正己烷(1:1:1, v/v/v)为提取溶剂,提取液氮吹浓缩后由甲基叔丁基醚作为复溶液;色谱条件:色谱柱为 YMC Carotenoid C30 (2 mm×100 mm, 3 μm);以甲醇:乙腈(1:3, v/v)加入 0.01% BHT (g mL⁻¹)和 0.1%甲酸作为流动相 A 相,甲基叔丁基醚加入 0.01% BHT 作为流动相 B 相,梯度洗脱;流速为 0.8 mL min⁻¹,检测波长 450 nm,柱温 23℃,进

样量 1 μL , 分析时间 8 min。本方法可有效检测甘薯中类胡萝卜素的含量, 适用于大批量甘薯种质资源的评价和优质品种的选择。

致谢 在此非常感谢华南理工大学食品学院郭新波老师课题组为本研究提供的标准品和技术指导。

References

- [1] CIP. Discovery to Impact: Science-Based Solutions for Global Challenges, CIP Annual Report 2019 edn. Pyrmont, Australia: CIP, 2020. p 9.
- [2] Fraser P D, Bramley P M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, 2004, 43: 228–265.
- [3] Eggensdorfer M, Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 652: 18–26.
- [4] Abdel-Aal E, Akhtar H, Zaheer K, Ali R. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 2013, 5: 1169–1185.
- [5] Lian F, Hu K Q, Russell R M, Wang X D. Beta-cryptoxanthin suppresses the growth of immortalized human bronchial epithelial cells and non-small-cell lung cancer cells and up-regulates retinoic acid receptor beta expression. *Int J Cancer*, 2006, 119: 2084–2089.
- [6] Ishiguro K, Yoshinaga M, Kai Y, Maoka T, Yoshimoto M. Composition, content and antioxidative activity of the carotenoids in yellow-fleshed sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *Breed Sci*, 2010, 60: 324–329.
- [7] 唐忠厚, 魏猛, 陈晓光, 史新敏, 张爱君, 李洪民, 丁艳锋. 不同肉色甘薯块根主要营养品质特征与综合评价. *中国农业科学*, 2014, 47: 1705–1714.
Tang Z H, Wei M, Chen X G, Shi X M, Zhang A J, Li H M, Ding Y F. Characters and comprehensive evaluation of nutrient quality of sweetpotato storage root with different flesh colors. *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 1705–1714 (in Chinese with English abstract).
- [8] 张允刚, 房伯平. 甘薯种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006. p 89.
Zhang Y G, Fang B P. Descriptors and Data Standard for Sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. Beijing: China Agriculture Press, 2006. p 89 (in Chinese).
- [9] Alam M K, Rana Z H, Islam S N. Comparison of the proximate composition, total carotenoids and total polyphenol content of nine orange-fleshed sweet potato varieties grown in Bangladesh. *Foods*, 2016, 5: 64.
- [10] Kim S H, Ahn Y O, Ahn M, Lee H, Kwak S. Down-regulation of β -carotene hydroxylase increases β -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. *Phytochemistry* (Oxford), 2012, 74: 69–78.
- [11] Achir N, Pénicau C, Bechoff A, Boulanger R, Dornier M, Dhuique-Mayer C. Use of multi-response modelling to investigate mechanisms of β -carotene degradation in dried orange-fleshed sweet potato during storage: from carotenoids to aroma compounds. *Food Bioproc Technol*, 2013, 7: 1656–1669.
- [12] Rios-Romero E A, Ochoa-Martínez L A, Bello-Pérez L A, Morales-Castro J, Quintero-Ramos A, Gallegos-Infante J A. Effect of ultrasound and steam treatments on bioaccessibility of β -carotene and physicochemical parameters in orange-fleshed sweet potato juice. *Heliyon*, 2021, 7: e6632.
- [13] Suzuki K, Kamimura A, Hooker S B. Rapid and highly sensitive analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with the first derivative spectrum chromatogram (FDSC) technique. *Mar Chem*, 2015, 176: 96–109.
- [14] 方波, 赵其阳, 席万鹏, 周志钦, 焦必宁. 十种柚类及柚杂种果实中类黄酮含量的超高效液相色谱分析. *中国农业科学*, 2013, 46: 1892–1901.
Fang B, Zhao Q Y, Xi W P, Zhou Z Q, Jiao B N. Determination of flavonoids in 10 pummelo and pummelo hybrid fruits by ultra-performance liquid chromatography. *Sci Agric Sin*, 2013, 46: 1892–1901 (in Chinese with English abstract).
- [15] 郑洁, 赵其阳, 张耀海, 焦必宁. 超高效液相色谱法同时测定柑橘中主要酚酸和类黄酮物质. *中国农业科学*, 2014, 47: 4706–4717.
Zheng J, Zhao Q Y, Zhang Y H, Jiao B N. Simultaneous determination of main flavonoids and phenolic acids in citrus fruit by ultra-performance liquid chromatography. *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 4706–4717 (in Chinese with English abstract).
- [16] 袁文新, 刘志平, 刘平, 赵榕, 吴国华, 范赛, 周洋. 固相萃取-超高效液相色谱法同时测定豆芽中 4 种植物生长调节剂. *卫生研究*, 2017, 46: 783–787.
Yuan W X, Liu Z P, Liu P, Zhao R, Wu G H, Fan S, Zhou Y. Determination of 4 kinds of plant growth regulator in bean sprout by solid phase extraction column coupled with ultra-high performance liquid chromatography. *J Hygiene Res*, 2017, 46: 783–787 (in Chinese with English abstract).
- [17] 王彬, 林亮, 陈敏氢, 刘建汀, 叶新如, 朱海生, 温庆放. 南瓜类胡萝卜素含量的超高效液相色谱分析. *农学学报*, 2017, 7(12): 22–27.
Wang B, Lin L, Chen M D, Liu J T, Ye X R, Zhu H S, Wen Q F. Analysis of carotenoids contents in pumpkin by ultra-performance liquid chromatography. *J Agric*, 2017, 7(12): 22–27 (in Chinese with English abstract).
- [18] 刘婉沂, 张英丰, 陈竟之, 曾珂琪, 周欣. 超高效液相色谱法同时测定补阳还五汤冻干物中 10 种成分的含量. *中药新药与临床药理*, 2022, 33: 830–835.
Liu W Y, Zhang Y F, Chen J Z, Zeng K Q, Zhou X. Simultaneous content determination of 10 components in lyophilized product of Buyang Huanwu decoction on UPLC. *Trad Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2022, 33: 830–835 (in Chinese with English abstract).
- [19] 王欣, 李强, 曹清河, 马代夫. 中国甘薯产业和种业发展现状与未来展望. *中国农业科学*, 2021, 54: 483–492.
Wang X, Li Q, Cao Q H, Ma D F. Current status and future prospective of sweetpotato production and seed industry in China. *Sci Agric Sin*, 2021, 54: 483–492 (in Chinese with English abstract).
- [20] Xu X, Lu X, Tang Z, Zhang X, Lei F, Hou L, Li M. Combined analysis of carotenoid metabolites and the transcriptome to reveal the molecular mechanism underlying fruit colouration in zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Food Chem: Mol Sci*, 2021, 2: 100021.
- [21] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学. 北京: 中国轻工业出版社, 2003. pp 88–94.
Hui B D. Carotenoid Chemistry and Biochemistry. Beijing: China

- Light Industry Press, 2003. pp 88–94 (in Chinese).
- [22] Yoo K, Moon B. Comparative carotenoid compositions during maturation and their antioxidative capacities of three citrus varieties. *Food Chem*, 2016, 196: 544–549.
- [23] 胡丽松, 吴刚, 郝朝运, 范睿, 伍宝朵, 谭乐和. 菠萝蜜类胡萝卜素检测方法研究及呈色物质分析. *热带作物学报*, 2017, 38: 950–956.
- Hu L S, Wu G, Hao C Y, Fan R, Wu B D, Tan L H. Method of carotenoids analysis and pigments identification in Jackfruit. *Chin J Trop Crops*, 2017, 38: 950–956 (in Chinese with English abstract).
- [24] 范迎康, 李莉, 詹妮, 况梦宇, 邓贵明, 吕培涛, 盛鸥. 香蕉果肉类胡萝卜素提取与测定方法的研究. *热带作物学报*, 2022, 43: 1945–1952.
- Fan Y K, Li L, Zhan N, Kuang M Y, Deng G M, Lyu P T, Sheng O. Optimization of extraction and determination of carotenoids from banana pulp. *Chin J Trop Crops*, 2022, 43: 1945–1952 (in Chinese with English abstract).
- [25] 张帅, 丛海林, 于冰. 超高效液相色谱的发展及在分析领域的应用. *分析仪器*, 2017, (6): 16–27.
- Zhang S, Cong H L, Yu B. Development of ultra-high performance liquid chromatography and its application in the field of analysis. *Analy Instrument*, 2017, (6): 16–27 (in Chinese with English abstract).
- [26] 陈敏氢, 朱海生, 温庆放, 马宏棋, 林义章. UPLC 测定草莓果实中类胡萝卜素含量. *果树学报*, 2013, 30: 706–711.
- Chen M D, Zhu H S, Wen Q F, Ma H Q, Lin Y Z. Determination of carotenoids in strawberry by UPLC. *J Fruit Sci*, 2013, 30: 706–711 (in Chinese with English abstract).
- [27] 李文爽, 夏先春, 何中虎. 普通小麦类胡萝卜素组分的超高效液相色谱分离方法. *作物学报*, 2016, 42: 706–713.
- Li W S, Xia X C, He Z H. Establishment of ultra-performance liquid chromatography (UPLC) protocol for analyzing carotenoids in common wheat. *Acta Agron Sin*, 2016, 42: 706–713 (in Chinese with English abstract).
- [28] 徐佳佳, 崔亚娟, 姜菲菲, 李全霞, 李东, 王竹, 王国栋, 门建华. 几种常见的类胡萝卜素提取技术. *食品研究与开发*, 2014, 35(19): 141–144.
- Xu J J, Cui Y J, Jiang F F, Li Q X, Li D, Wang Z, Wang G D, Men J H. Study on the extraction of carotenoids. *Food Res Dev*, 2014, 35(19): 141–144 (in Chinese with English abstract).
- [29] Watkins J L, Pogson B J. Prospects for carotenoid biofortification targeting retention and catabolism. *Trends Plant Sci*, 2020, 25: 501–512.
- [30] Rodriguez-Amaya D B, Kimura M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004. pp 24–30.
- [31] Amorim-Carrilho K T, Cepeda A, Fente C, Regal P. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends Analy Chem*, 2014, 56: 49–73.
- [32] Saini R K, Nile S H, Park S W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Res Int*, 2015, 76: 735–750.
- [33] 付莉, 王歆姬. 南瓜皮类胡萝卜素的提取工艺研究. *中国农学通报*, 2012, 28(36): 295–299.
- Fu L, Wang X J. Extraction of carotenoids from pumpkin peel. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, 28(36): 295–299 (in Chinese with English abstract).
- [34] 邢鹏, 包兢兢, 秦玉芝, 陆英. HPLC同时测定甘薯茎叶中叶黄素和 β -胡萝卜素. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 41: 533–537.
- Xing P, Bao J J, Qin Y Z, Lu Y. HPLC analysis method on Lutein and β -carotene in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) leaves. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 2015, 41: 533–537 (in Chinese with English abstract).