

油棕果实不同发育时期类胡萝卜素的含量变化

李小丽 梁远学 郜凌超 李东栋 郑育声

海南大学材料与化工学院,海口 570228

摘要 以油棕果为材料,分别提取油棕果5个发育时期的类胡萝卜素,采用高效液相色谱法进行分离,鉴定其中叶黄素、番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素的成分和含量,并分析其变化规律。结果表明,高效液相色谱法可对油棕果中的叶黄素、番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素完全分离并进行定性和定量分析。随着油棕果实成熟度的增加, α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的含量逐渐增加,其中在果实发育后期, β -胡萝卜素是 α -胡萝卜素的3~4倍;相反地,叶黄素从青果期到成熟期的含量是逐渐减少的;番茄红素的含量变化不大。油棕在成熟过程中总类胡萝卜素含量不断增加,主要转化为以 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素为主。

关键词 油棕;类胡萝卜素;高效液相色谱;叶黄素;番茄红素; α -胡萝卜素; β -胡萝卜素

中图分类号 S 565.901 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0023-05

油棕(*Elaeis guineensis*)俗称油椰子,属棕榈科椰子亚科油棕属,是热带多年生单子叶木本油料作物。油棕平均年产棕榈油4.17 t/hm²,一些高油品种年产量可达16 t/hm²,是其他油料作物(油菜、大豆、花生)年平均单产的6~20倍,是世界上生产效率最高的产油植物,被人们誉为“世界油王”^[1]。成熟的油棕果呈棕红色,其中含有大量的类胡萝卜素^[1-2]。叶黄素(lutein)、番茄红素(lycopene)、 α -胡萝卜素(α -carotene)和 β -胡萝卜素(β -carotene)是油棕果中含量最为丰富的类胡萝卜素,其中80%为 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素^[3]。类胡萝卜素具有清除自由基、增强免疫力、降低癌症发生几率等作用^[4],成为目前人们研究的热点。高效液相色谱法是目前最有效的对植物果实中类胡萝卜素进行定量和定性分析的分析方法^[5-6]。Mortensen等^[7-8]用C30色谱柱对粗提棕榈油进行分析,结果表明40%的 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素主要以顺式异构体的形式存在。目前,对油棕果的研究主要集中在棕榈油含量和成分,有关不同成熟期油棕果类胡萝卜素种类与含量及其变化规律的报道较少^[6,9]。因此,笔者采用高效液相色谱法对不同成熟期油棕果中类胡萝卜素含量进

行检测分析,考察油棕果发育过程中类胡萝卜素含量的变化规律,以期探索类胡萝卜素的积累与转化规律,为进一步理解油棕果实类胡萝卜素,特别是 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的积累机制、油棕的种植及保健食品及药物开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2012—2013年在海南大学材料与化工学院重点实验室进行。油棕果实采自中国热带农业科学院椰子研究所,采摘方法参照文献^[10]进行。5个不同发育时期分别命名为G1、G2、G3、G4、G5,其中G1、G2、G3、G4、G5分别为授粉后约10、45、90、135、180 d^[11]。新鲜油棕果采摘后-70℃保存备用。

仪器主要有美国Waters 2695高效液相色谱仪、2487紫外检测器、CR-22G II日立离心机、分度吸量管、梨形分液漏斗等。 β -胡萝卜素标准品(分析标准品)、 α -胡萝卜素标准品(分析标准品)、番茄红素标准品(纯度98%)、叶黄素标准品(纯度90%)均购于上海源叶生物科技有限公司。丙酮(分析纯)、

收稿日期:2013-12-16

基金项目:国家自然科学基金项目(31160717,31260193);海南大学科研启动基金项目(kyqd1237)

李小丽,实验师。研究方向:油棕色素提取分析。E-mail: lxlqx88@163.com

通信作者:郑育声,博士,副教授。研究方向:油棕物质代谢。E-mail: hainanzhy@hotmail.com

三氯甲烷(分析纯)均购于天津市化学试剂一厂。乙腈、甲醇、二氯甲烷均购于 Sigma 公司进口分装色谱级试剂;无水硫酸钠、氯化钠均购于广州化学试剂厂分析纯试剂。试验用水为去离子三重蒸水。

1.2 试验方法

1)油棕类胡萝卜素的制备。取冷冻保藏的不同时期油棕果解冻后,用蒸馏水洗净,用小刀切下油棕果肉,称取 10 g 放到研钵里,加入 20 mL 丙酮研磨成匀浆,倒入离心管,再加入 10 mL 氯仿继续研磨成匀浆,倒入离心管中,最后用 10 mL 10%NaCl 溶液洗涤研钵,合并滤液和果浆,并用玻璃棒搅拌混匀,在 15 °C 8 000 r/min 离心 20 min,收集滤液和氯仿相转入有盖试管中,残渣和油棕果浆加 5 mL 氯仿提取,重复 2 次直至果肉浆无色,再次 15 °C 8 000 r/min 离心 20 min,合并 2 次滤液和氯仿相,15 °C 8 000 r/min 离心 20 min。将滤液转入梨形分液漏斗,静置 30 min,分层后用 50 mL 三角瓶收集下层(氯仿相),再加入 10 mL 氯仿到梨形分液漏斗进行萃取,并充分振摇,静置 10 min,完全分层后,收集下层(氯仿相),弃去上层(水相),最后在 50 mL 三角瓶加入适量的无水硫酸钠遮光干燥 30 min。

2)不同成熟期油棕果中类胡萝卜素的测定。
①标准品的配制。分别称取一定量 β -胡萝卜素标准品、番茄红素标准品、叶黄素标准品用色谱级流动相定容至 50 mL,分别配成 308、10、272 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分别取 β -胡萝卜素标准品溶液、番茄红素标准品溶液、叶黄素标准品溶液 1、2、1 mL 混匀(其质量浓度分别为 β -胡萝卜素标准品 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、番茄红素标准品 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、叶黄素标准品 68 $\mu\text{g}/\text{mL}$),根据高效液相色谱图,测出相应物质的峰面积。
②样品的配制。将提取液溶于色谱级流动相条件($V_{\text{乙腈}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{样液}} = 50 : 15 : 35$),定容至 100 mL,即不同时期油棕果中类胡萝卜素高效色谱法的样液。
③色谱条件。高效液相色谱检测器为二极管阵列检测器(PAD),色谱柱:X-Bridge C18(250 mm \times 4.6 mm,粒径 5 μm);流动相为 $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{二氯甲烷}} = 85 : 13 : 2$;流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C,取 10 μL 油棕类胡萝卜素提取液进样;450 nm 波长处检测。记录保留时间及各组分的光谱图与标品对照定性。

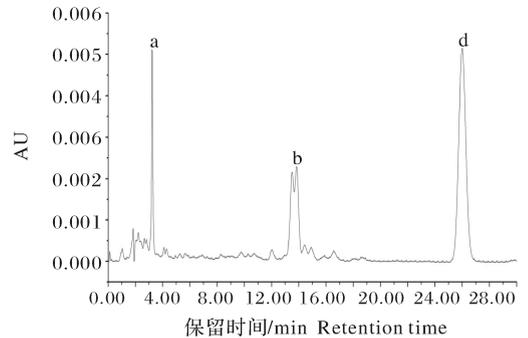
1.3 统计分析

对 HPLC 得到的色谱图,用岛津公司的 Class-VP 软件转化为峰面积,按外标法定量。用 Excel 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同成熟期油棕果类胡萝卜素高效液相色谱

1)标准品高效液相色谱图。叶黄素标准品、番茄红素标准品和 β -胡萝卜素标准品溶液混合后高效液相色谱见图 1。3 种物质主峰保留时间分别为 3.233、13.871 和 25.902 min,按质量浓度分别为 68.5 和 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 上样,对应的峰面积分别是 25 439、20 839 和 117 369。

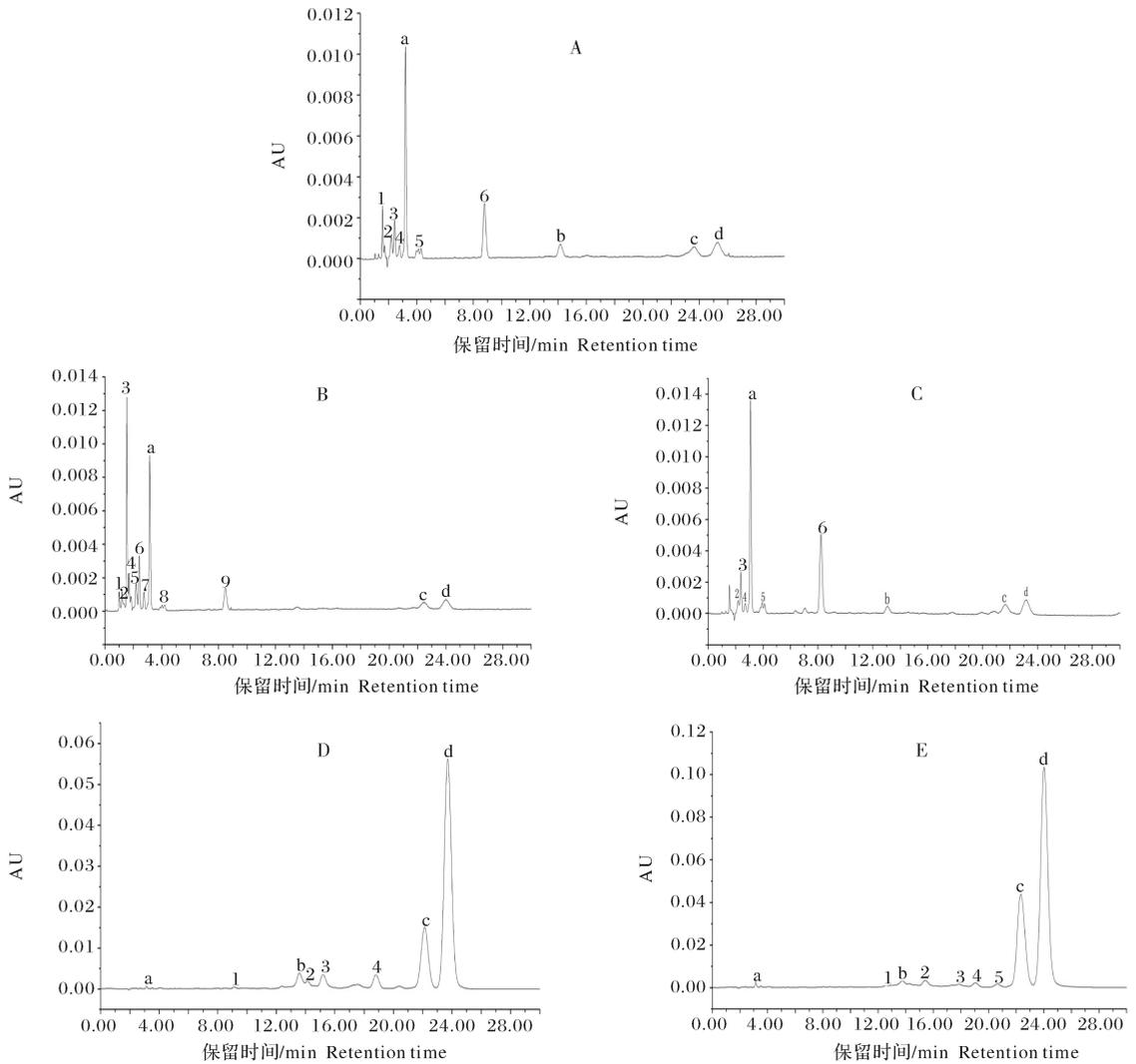


a: 叶黄素 Lutein; b: 番茄红素 Lycopene; d: β -胡萝卜素 β -Carotene.

图 1 叶黄素、番茄红素、 β -胡萝卜素标准品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of lutein, lycopene and β -carotene standard sample

2)不同成熟期类胡萝卜素高效液相色谱图。5 个发育时期油棕果按本文“1.2.1)”样品处理方法,在选定的液相色谱条件下进样,测定其主要的类胡萝卜素物质与含量(图 2)。5 个时期均能获得类胡萝卜素各组分良好的分离效果。根据叶黄素、番茄红素和 β -胡萝卜素 3 种标准品的保留时间,得到这 3 种物质在 5 个时期中的主峰,除了 G2 时期未能检测到番茄红素外,其他时期均有该类物质。经过计算,分别得到各物质的绝对含量和相对含量(表 1)。由于 α -胡萝卜素标样难以制备和购得,根据文献[12]中 α -胡萝卜素在选定的液相色谱条件下的保留时间,推断出油棕果类胡萝卜素 HPLC 谱图中 α -胡萝卜素的主峰。在 5 个时期中 α -胡萝卜素主峰的出峰时间均在 21.129~23.030 之间(图 2)。除此之外,5 个时期均发现其他类胡萝卜素物质。每个时期的峰数不尽相同。有意思的是,G1—G3 时期 HPLC 谱图形相似;而 G4 和 G5 时期 HPLC 谱图形相似。G1—G3 时期 HPLC 谱图中,峰数主要集中在出峰时间较早的位置,且随着成熟时期增加而峰数逐渐减少。



A:G1 时期 G1 phase; B:G2 时期 G2 phase; C:G3 时期 G3 phase; D:G4 时期 G4 phase; E:G5 时期 G5 phase; a:叶黄素 Lutein; b:番茄红素 Lycopene; c: α -胡萝卜素 α -Carotene; d: β -胡萝卜素 β -Carotene.

图 2 G1—G5 时期 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of carotenoids during G1—G5 phases

表 1 G1—G5 时期油棕果叶黄素、番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素峰面积与相对含量¹⁾

Table 1 Peak area and content percentage of lutein,lycopene and α -carotene, β -carotene during G1—G5 phases

时期 Phase	保留时间/min Retention time	峰面积/(AU·min) Peak area	含量/(μ g/g) Content	相对含量/% Relative content
叶黄素 Lutein	3.196	77 165	2 062.67	0.206
番茄红素 Lycopene	14.153	11 708	28.09	0.003
α -胡萝卜 α -Carotene	23.660	17 556	115.18	0.012
β -胡萝卜 β -Carotene	25.317	17 820	116.91	0.012
叶黄素 Lutein	3.147	57 832	1 545.88	0.155
番茄红素 Lycopene	/	/	/	/
α -胡萝卜 α -Carotene	22.453	10 738	70.44	0.007
β -胡萝卜 β -Carotene	23.997	13 251	86.93	0.009
叶黄素 Lutein	3.096	41 998	1 122.62	0.112
番茄红素 Lycopene	13.090	3 592	8.62	0.001
α -胡萝卜 α -Carotene	21.836	8 955	58.75	0.006
β -胡萝卜 β -Carotene	23.380	12 880	84.50	0.008

续表 1 Continued from Table 1

时期 Phase		保留时间/min Retention time	峰面积/(AU·min) Peak area	含量/($\mu\text{g/g}$) Content	相对含量/% Relative content
G4	叶黄素 Lutein	3.130	12 837	237.43	0.024
	番茄红素 Lycopene	13.561	99 464	48.07	0.005
	α -胡萝卜素 α -Carotene	22.129	501 476	2 220.53	0.222
	β -胡萝卜素 β -Carotene	23.709	1 919 182	8 498.11	0.850
G5	叶黄素 Lutein	3.148	15 670	289.83	0.029
	番茄红素 Lycopene	13.926	66 877	32.32	0.003
	α -胡萝卜素 α -Carotene	22.597	2 390 180	10 583.68	1.058
	β -胡萝卜素 β -Carotene	24.399	4 616 678	20 442.58	2.044

1)/:未检出 Not detected.

2.2 不同成熟期油棕果类胡萝卜素主要组分含量的变化

根据 3 次 HPLC 谱图中叶黄素、番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素 4 种主要组分的含量,取平均值(表 2)。油棕果中叶黄素的含量呈现逐渐减少的变化趋势。G1 时期含量最高,在前 3 个时期(G1—G3)持续较高表达;G4 时期开始明显下降,至 G5 时期,含量变化不大。番茄红素的变化没有表现出线性化的规律。除了 G2 时期未检测到番茄红素外,其他 4 个时期均有,其中 G4 时期最高;其次为 G1 和 G5,含量减少了约 1/3。作为类胡萝卜素最重要的成分之一, α -胡萝卜素在油棕果中含量变化相当明显。前 3 个时期其含量都在 100 $\mu\text{g/g}$ 左右,后 2 个时期则迅猛升高,到 G5 时期,含量达 10 000 $\mu\text{g/g}$ 。 β -胡萝卜素在油棕果中的含量变化与 α -胡萝卜素非常相似,G1—G3 含量较低,变化不大,G4 和 G5 时期含量陡然增加,在 G5 时期达到最高值。

表 2 叶黄素、番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素在油棕果发育过程中的含量变化

Table 2 Diversification of the lutein, lycopene, α -carotene and β -carotene contents during the five development phases

时期 Phase	叶黄素 Lutein	番茄红素 Lycopene	α -胡萝卜素 α -Carotene	β -胡萝卜素 β -Carotene
G1	2 062.67	28.09	115.18	116.91
G2	1 545.88		70.44	86.93
G3	1 122.62	8.62	58.75	84.50
G4	237.43	48.07	2 220.53	8 498.11
G5	289.83	32.32	10 583.68	20 442.58

3 讨论

类胡萝卜素提取的充分和溶解状态,直接影响后续 HPLC 分析效果,影响组分的分离和获得。类胡萝卜素种类繁多,它们之间极性差异较大,提取分离过程中多易降解,使得类胡萝卜素的提取采用单一有机溶剂提取通常不能达到良好的效果。目前,

油棕果类胡萝卜素提取分离方法未见报道。为了能获得更多的分离组分,我们分别采用 6 种不同有机溶剂配比的提取方法,提取液进行 HPLC 检测,摸索建立针对油棕果中类胡萝卜素的分离技术。第 1 种用 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{丙酮}}=1:1$,可从不同成熟期油棕果中可分离出 6 种组分;第 2 种采用 $V_{\text{丙酮}}:V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{乙醇}}=1:1:1$ 混合液,可分离出 5 种类胡萝卜素;第 3 种则用 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{丙酮}}=2:1$ 混合液和 10% NaCl,可获得出 8 种组分;第 4 种为 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{丙酮}}=2:1$ 混合液可分离出 11 种组分;第 5 种为 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{丙酮}}=1:2$,混合液和 2 mL 6% KOH-甲醇溶液皂化,虽可有效除去叶绿素和油脂类物质,将类胡萝卜素酯水解成为游离态的类胡萝卜素,但皂化会造成类胡萝卜素总含量和单个类胡萝卜素组分不同程度的损失,同时这些物质还会影响色谱的分离,缩短色谱柱的寿命;第 6 种用丙酮、氯仿和 10% NaCl 分别处理,可从油棕果中分离出大约 18 种组分。由此可见,第 6 种提取方法有望获得较丰富的类胡萝卜素分离组分。

由图 2A-E 的峰型可看,油棕类胡萝卜素各物质其含量在 5 个时期的发育过程中有 2 个明显的分界:G1—G3;G4—G5。G1—G3 中,主要存在是极性大的物质,且极性程度接近。G4—G5 中,极性较大的物质含量极少,极性较小的物质均匀分布。分析 5 个时期类胡萝卜素主要组分的总峰高和总峰面积,可推断类胡萝卜素总含量。可见,从 G1 到 G5,类胡萝卜素总含量上升,尤其是 G4 期之后。对叶黄素、番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素含量变化进行分析后发现,与其他极性较大的物质含量变化相一致,叶黄素的含量随着油棕成熟度的增加而减少,而番茄红素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素含量逐渐增加。极性居中的番茄红素的变化不是很明显,极性相对较小的 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素的含量急剧上升。油棕果发育过程包含了前期细胞快速增殖和后期脂肪积累两个过程。由此可见,在前期极性大

的物质参与了细胞快速增长过程,这一过程脂肪积累相当少。待细胞发育到一定大小,果实内部才逐渐开始调控脂肪的堆积。在后期(G4和G5)脂肪堆积过程中,类胡萝卜素在酶的作用下不断转化为以 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素,特别是 β -胡萝卜素(大约是 α -胡萝卜素的3~4倍)为主要形式。 β -胡萝卜素占成熟期类胡萝卜素总量的60%以上,这也是成熟油棕果外在特征(橙红色)的体现。油棕果成熟过程中类胡萝卜素的变化主要是 β -胡萝卜素的积累过程。

参 考 文 献

- [1] MURPHY D J. Future prospects for oil palm in the 21st century: biological and related challenges[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2007, 109: 296-306.
- [2] 杨光宇, 王东. 棕榈油的研究进展及在畜牧业中的应用[J]. *饲料博览*, 2010(8): 33-36.
- [3] CHIU M C, COUTINHO C M, GONCALAVES L. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology[J]. *Desalination*, 2009, 245: 783-786.
- [4] NISHINO H, MURAKOSHI M, TOKUDA H, et al. Cancer prevention by carotenoids[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 483(2): 165-168.
- [5] HORNERO-MENDEZ D, COSTA-GARCIA J, MINGUEZ-MOSQUERA M I. Characterization of carotenoid high-producing *Capsicum annuum* cultivars selected for paprika production[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(20): 5711-5716.
- [6] MOULY P P, GAYDOU E M, CORSETTI J. Characterization of paprika (*Capsicum annuum*) extract in orange juices by liquid chromatography of carotenoid profiles[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(3): 968-976.
- [7] MORTENSEN A. Analysis of a complex mixture from oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit extracts[J]. *Food Res Int*, 2005, 38(8/9): 847-853.
- [8] EDEM D O. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: a review[J]. *Palm Food Hum Nutr*, 2002, 57: 319-341.
- [9] 姚建花, 黄百芬, 任一平, 等. 高效液相色谱法同时测定果蔬中五种类胡萝卜素[J]. *营养学报*, 2012, 34(3): 282-288.
- [10] TRANBARGER T J, DUSSERT S, ARGOUT X, et al. Regulatory mechanisms underlying oil palm fruit mesocarp maturation, ripening, and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 564-584.
- [11] WANG G L, RYU S, WANG X M. Plant phospholipases: an overview[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 861: 123-137.
- [12] 惠伯棣, 张西, 文镜. 反相 C₃₀ 柱在 HPLC 分析类胡萝卜素中的应用[J]. *食品科学*, 2005, 26(1): 264-269.

Changes of carotenoids in the fruit of oil palm (*Elaeis guineensis*) at different stages of development

LI Xiao-li LIANG Yuan-xue GAO Ling-chao LI Dong-dong ZHENG Yu-sheng

Department of Biotechnology, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract The changes of carotenoids in the fruit of oil palm (*Elaeis guineensis*) at five different stages of development were investigated. After extracting carotenoids from the fruit of oil palm, lutein, lycopene, α -carotene and β -carotene were separated and its contents were analyzed with high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that contents of α - and β -carotene had a tendency of increasing with fruit ripening. β -Carotene content increased obviously. The content of β -carotene was three to four times more than that of α -carotene in the late developmental stages. On the contrary, the changing trend of the lutein content was gradually decreased. The content of lycopene was almost constant during the development of fruit. It was indicated that the content of total carotenoids in the fruit of oil palm was gradually increased, and was mainly transformed into α - and β -carotene in the process of maturation.

Key words oil palm (*Elaeis guineensis*); carotenoids; HPLC; lutein; lycopene; α -carotene; β -carotene