

# 柱层析法分离万寿菊叶黄素

张志强<sup>1</sup>, 向正华<sup>1</sup>, 代冬海<sup>2</sup>, 邢英<sup>1</sup>

(1. 青海大学化工学院, 青海西宁 810016; 2. 青海普兰特药业有限公司, 青海西宁 810007)

**摘要:** 本试验研究了万寿菊叶黄素的分离方法及分离条件。采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定叶黄素的含量, 色谱柱为岛津 VP-ODSC<sub>18</sub> 柱 (150mm × 4.6mm, 5μm), 检测波长 454nm; 以甲醇-0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0mL/min, 柱温 30℃; 进样量 10μL; 校准曲线法定量, 在 0.6~2.0μg 范围内具有良好的线性关系, 回归方程为  $Y = 1.16 \times 10^7 C + 4.99 \times 10^4$ , 相关系数  $r = 0.9984$ 。采用柱层析法分离万寿菊叶黄素的皂化液, 实验结果表明: 固定相采用硅胶 G (100~200目); 胡萝卜素洗脱剂为 V (石油醚) : V (乙酸乙酯) = 5 : 1; 叶黄素洗脱剂为 V (石油醚) : V (乙酸乙酯) = 1 : 1; 层析柱规格为 Φ26 × 510mm; 使用皂化液直接湿法上样; 吸附时间为 30min; 上样量为 0.4mL 皂化液/g 硅胶; 柱温为常温; 皂化液可直接上样; 在以上条件下, 经分离回收溶剂后得到含量为 83.3% 的叶黄素产品。该方法有良好的分离能力, 便于操作, 产品纯度稳定。硅胶在重复使用 5 次以内, 对分离效果的影响不明显。

**关键词:** 叶黄素; 万寿菊; 分离; 柱层析

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513(2010)03-0051-05

## Separation of lutein from marigold by column chromatography

ZHANG Zhi-qiang<sup>1</sup>, XIANG Zheng-hua<sup>1</sup>, DAI Dong-hai<sup>2</sup>, XING Ying<sup>1</sup>

(1. School of Chemical Engineering Qinghai University Xining 810016

2. Qinghai Plateau Pharmaceutical Company Limited Xining 810007)

**Abstract** This paper studied the method and conditions of separating lutein from Marigold. High performance liquid chromatography (HPLC) was applied to determine lutein content. The operating parameters were: Shimadzu VP-ODSC18 column (150mm × 4.6mm, 5μm), detection wavelength 454nm; methanol-0.1% phosphoric acid as mobile phase gradient elution, flow rate 1.0mL/min, column temperature 30℃; injection volume 10μL. Chromatogram peak area (Y) against the injection mass concentrations (C) of lutein was in good linearity in the range of 0.6~2.0μg, regression equation was  $Y = 1.16 \times 10^7 C + 4.99 \times 10^4$ , the correlation coefficient  $r = 0.9984$ . The results showed that the stationary phase was silica gel G (100~200 mesh); carotene eluting agent was V (petroleum ether) : V (ethyl acetate) = 5 : 1; lutein eluting agent was V (petroleum ether) : V (ethyl acetate) = 1 : 1; chromatography column was Φ26 × 510mm; saponification liquid was used directly on the wet sample, adsorption time was 30min, sample volume was 0.4mL saponification liquid/g silica gel, column temperature was room temperature, saponification solution added directly on the sample. In the above conditions, the separation and recovery of the lutein was 83.3%. This method separated optimally, was easy to operate and the products were stable. Silica gel was reused 5 times and showed no obvious differences on the separation effect.

**Key words** lutein; separation; column chromatography; marigold

收稿日期: 2009-10-17

作者简介: 张志强 (1969-), 男 (汉), 副教授, 本科, 从事天然产物提取与分离研究。

叶黄素 ( lutein) 又称植物黄体素, 分子式为  $C_{40}H_{56}O_2$ , 属四萜类化合物<sup>[1]</sup>。叶黄素是人类食物与血清中主要的类胡萝卜素之一, 并且是  $\alpha$  - 类胡萝卜素的代表<sup>[2,3]</sup>。研究发现, 年龄相关性黄斑退化 (AMD) 是发达国家老年人失明以及普通视觉损害的最重要原因<sup>[4-7]</sup>。叶黄素和玉米黄质作为抗氧化剂和近紫外蓝光的吸收剂, 可降低此类眼疾发生的风险。随着对叶黄素药理研究的深入, 还发现叶黄素在防治心血管动脉硬化、增强免疫力等方面起着重要作用<sup>[8,9]</sup>。万寿菊 (*Tagetes erecta*), 菊科万寿菊属, 原产于墨西哥。因其花叶黄素含量高, 其他种类类胡萝卜素少, 而成为生产叶黄素的理想原料<sup>[10]</sup>。但是万寿菊中游离叶黄素很少, 主要是叶黄素酯 (> 90%), 其脂肪酸部分包括月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸等十多种。研究表明, 叶黄素酯类衍生物不易被人体直接吸收代谢, 人类功能性食品添加剂和药品对游离叶黄素的纯度要求较高。因此对叶黄素酯类物质进行皂化, 并且进一步分离叶黄素十分必要<sup>[11]</sup>。

文献 [12] [13] 报道了重结晶法分离和纯化万寿菊叶黄素。虽然得到的叶黄素纯度较高 (> 90%), 但是操作步骤复杂、收率低, 只适用于实验室少量制备。柱层析分离叶黄素的报道很少。本文采用柱层析法对万寿菊叶黄素的提取皂化物进行分离, 以期能为工业生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

万寿菊干花颗粒, 内蒙古自治区赤峰市鑫卉公司; 叶黄素标准品 (> 90%), Signa-Aldrich 公司。

### 1.2 试剂与仪器

硅胶 G (100~200目) (200~300目), 青岛海洋化工分厂; 硅藻土、氧化铝、氧化镁, 上海建信有限公司试剂厂; 甲醇、氯仿、甲苯、磷酸、无水乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷、无水硫酸钠以及石油醚 (30~60℃) 均为分析纯; 甲醇色谱纯。

高效液相色谱仪 BOSTAV 201/330, 岛津国际贸易 (上海) 有限公司; 电子分析天平 AB104-

N, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 循环水真空泵 SHI-III 上海亚荣生化仪器厂; 层析柱 ( $\Phi 26\text{mm} \times 510\text{mm}$ )。

### 1.3 叶黄素的分离

万寿菊干花颗粒经干燥后, 粉碎过 60 目筛。所得花粉用 V (无水乙醇) : V (丙酮) = 1 : 1 混合提取剂提取, 提取液用 30% KOH -  $\text{CH}_3\text{OH}$  溶液皂化, 皂化液经调节 pH 后用旋转蒸发器回收溶剂, 所得浸膏加入少量甲醇溶解, 并将其转入棕色容量瓶中定容。称取一定量的吸附剂, 经活化后采用干法装柱。在少量的吸附剂中拌入已定容的皂化液进行吸附, 挥干溶剂后置于柱顶。负压条件下, 首先用胡萝卜素洗脱剂洗脱出胡萝卜素和比其极性小的部分, 再用叶黄素洗脱剂洗脱出叶黄素, 经回收溶剂后得到产品。

### 1.4 叶黄素的 HPLC 分析

采用岛津 VP-ODSC18 柱 (150mm  $\times$  4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ), 检测波长 454nm; 以  $\text{CH}_3\text{OH}-0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4$  溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0mL/min; 柱温 30℃; 进样量 10 $\mu\text{L}$ 。校准曲线法定量, 在 0.6~2.0 $\mu\text{g}$  范围内具有良好的线性关系, 回归方程为  $Y = 1.16 \times 10^7 C + 4.99 \times 10^4$ , 相关系数  $r = 0.9984$ 。标准品 HPLC 图谱见图 1。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 吸附剂的选择

选用硅胶 G1 (100~200目)、硅胶 G2 (200~300目)、m (氧化镁) : m (硅藻土) = 1 : 1、m (硅胶 1) : m (硅藻土) = 1 : 1、中性氧化铝等作为固定相。叶黄素、胡萝卜素等均为色素, 可通过观察柱层析时各色素条带分离状况判断分离效果。实验结果表明: 中性氧化铝对样品的吸附性较差, 当用胡萝卜洗脱剂洗脱时, 所有的色素均被洗脱下来, 达不到分离的目的; 硅胶 G2 颗粒小, 洗脱阻力大、流速慢、分离时间过长易导致叶黄素氧化; m (氧化镁) : m (硅藻土) = 1 : 1 和 m (硅胶 1) : m (硅藻土) = 1 : 1 分离过程中整个柱身均充满了色素, 没有形成明显的叶黄素和胡萝卜素色素条带, 不利于分离操作; 使用硅胶 G1 作为吸附剂时, 可观察到柱内颜色明显分为两部分, 上段为较深的橙黄色, 下段为

较浅的淡黄色，分 2 级收集洗脱液。经 HPLC 分析，样品的分离效果较好，洗脱速度较快，洗脱剂的用量较少，因此选用硅胶 G1 作为吸附剂较好。

### 2.2 洗脱剂的选择

通过石油醚、正己烷、甲苯、二氯甲烷、氯

仿、乙酸乙酯、无水乙醇等溶剂对叶黄素的洗脱效果的比较发现，当溶剂的极性大于二氯甲烷时，叶黄素能够被完全洗脱下来。为了保证分离效果，采用混合洗脱剂。不同的混合洗脱剂的洗脱效果见表 1:

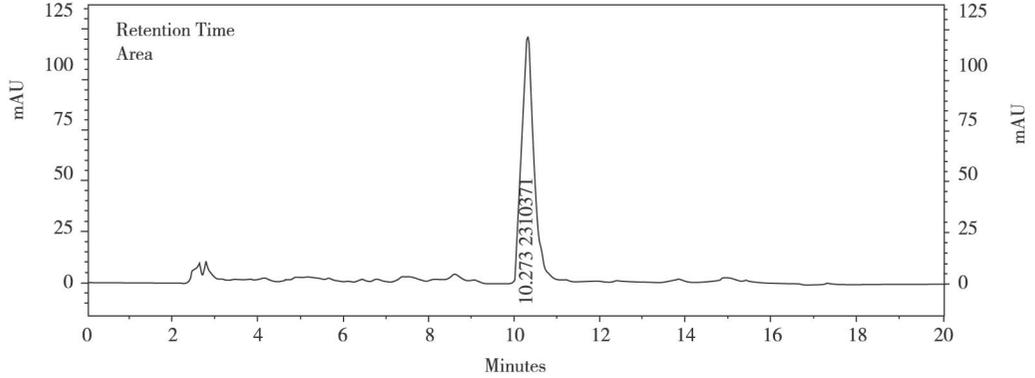


图 1 标准品的 HPLC 图谱  
Fig 1 Chrom atograms of standards of by HPLC

表 1 不同洗脱剂对分离的影响  
Table 1 Results of column chrom atography using different eluants

序号	洗脱剂体系	胡萝卜素洗脱剂 /v/v	叶黄素洗脱剂 /v/v	现象
1	正己烷 - 丙酮 - 无水乙醇	9: 1: 0	8: 1: 1	柱子不能出现明显的色带，分离效果较差。
2	二氯甲烷 - 氯仿	1: 0	1: 1	在柱子上出现了三条色带，但叶黄素未被分开。
3	正己烷 - 无水乙醇	100: 1	—	当用胡萝卜素洗脱剂洗脱时，叶黄素也被洗下来。
4	石油醚 - 乙酸乙酯	5: 1	1: 1	能出现比较好的色素带，其洗脱、分离叶黄素的效果较好。

由表 1 可知，石油醚 - 乙酸乙酯体系作为洗脱剂有很好的分离效果，能够达到分离的要求。同时该洗脱剂具有毒性小、价格低廉以及易于回收等优点。因此选用 V (石油醚) : V (乙酸乙酯) = 5 : 1 为胡萝卜素洗脱剂，选用 V (石油醚) : V (乙酸乙酯) = 1 : 1 为叶黄素洗脱剂。

### 2.3 上样方法

柱层析的上样方法主要有湿法上样和干法上样两种，实验比较了干法上样与湿法上样对分离效果的影响，结果见表 2。

由表 2 可知，经柱层析分离后，由湿法上样得到的叶黄素产品的纯度和收率明显高于干法上样。并且在干法上样时，胡萝卜素洗脱液中有少

量叶黄素被洗脱下来，使得叶黄素的纯度和收率均有所下降。同时干法上样，叶黄素在拌样的过程中暴露在空气中易被氧化，增大了叶黄素的损失。

表 2 上样方法对分离的影响  
Table 2 Effect of different themethod of load on separation

上样方法	湿法		干法	
	1	2	1	2
叶黄素纯度 %	83. 63	82. 66	66. 33	67. 33
叶黄素收率 %	88. 43	86. 22	70. 32	73. 66

## 2.4 吸附时间对分离的影响

采用湿法上样, 样品与吸附剂的接触时间较短, 如果吸附剂没有将样品完全吸附上, 在洗脱胡萝卜素部分时将会导致叶黄素也被洗脱下来, 这样将影响叶黄素的收率。在上样后, 选择吸附时间分别为 1Q 3Q 6Q 120m in 时, 比较吸附和分离效果。实验结果表明: 当吸附时间为 30m in 时, 在洗脱胡萝卜素部分时不会使叶黄素洗脱下来, 因此吸附时间选为 30m in。

## 2.5 上样量对分离的影响

上样量少使得吸附剂未能充分利用, 过多的上样量又会造成色谱柱的负担过重, 难以保证分离效果。选择上样量样品分别为 0.2Q 0.4Q 0.6Q 0.8Q 1.0Q mL/g 硅胶, 上样量对叶黄素的纯度及收率的影响见图 2。

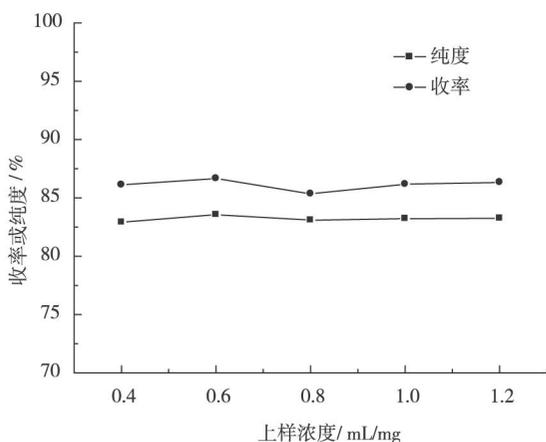


图 2 上样量对分离的影响

Fig 2 Effect of loadability on separation

由图 2 可知, 上样量在 0.40mL 样品 /g 硅胶时, 叶黄素的纯度和收率均最高。实验结果表明, 为了减少叶黄素的损失, 提高收率, 上样量样品选择为 0.40mL/g 硅胶较为适宜。

## 2.6 上样浓度对分离的影响

分别将皂化液按 1.3 节配制成浓度为 0.4Q 0.8Q 0.12mg/mL 的溶液分别上柱, 收集叶黄素洗脱液并回收溶剂, 测定产品中叶黄素含量。上样浓度对分离效果的影响见图 3。

由图 3 可知, 上样浓度对分离效果的影响不明显。因此直接使用皂化液进行分离, 可简化操作。

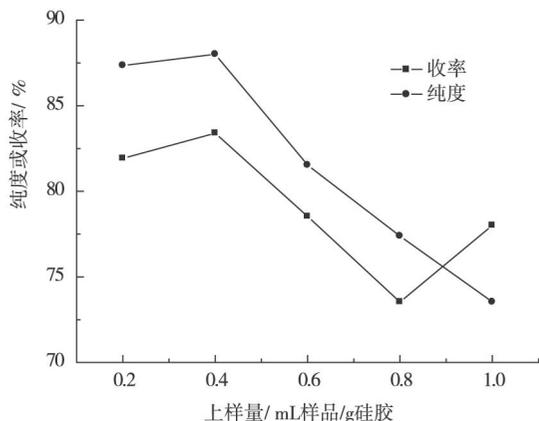


图 3 上样浓度对分离的影响

Fig 3 Effect of different sample concentration on separation

## 2.7 吸附剂使用次数对分离的影响

吸附剂重复使用可降低生产成本。实验发现, 在层析结束后由于柱中还残留少量的杂质, 用 2~3 倍柱体积的无水乙醇洗脱, 再用 2~3 倍柱体积的洗脱剂平衡, 然后重新上样。在操作条件下连续进行了 5 次层析分离, 结果如表 5 所示。硅胶使用 5 次以内, 对叶黄素的分离效果无明显影响。可见层析分离的重现性较好。这是由于乙醇极性较大, 能够有效地洗脱硅胶柱吸附的极性杂质组分, 从而使层析柱基本恢复到初始状态。但是当硅胶使用一段时间后, 需将硅胶重新活化, 使其恢复吸附性能。

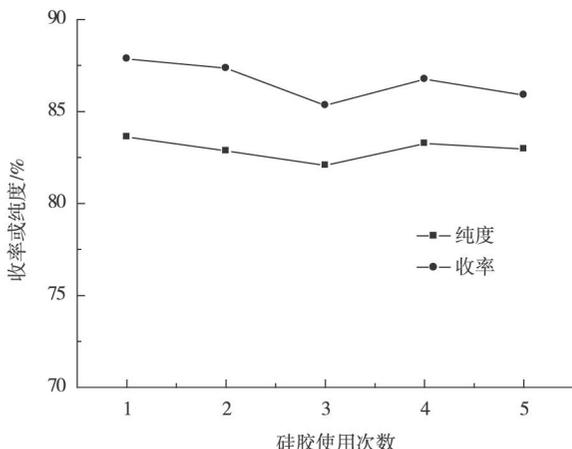


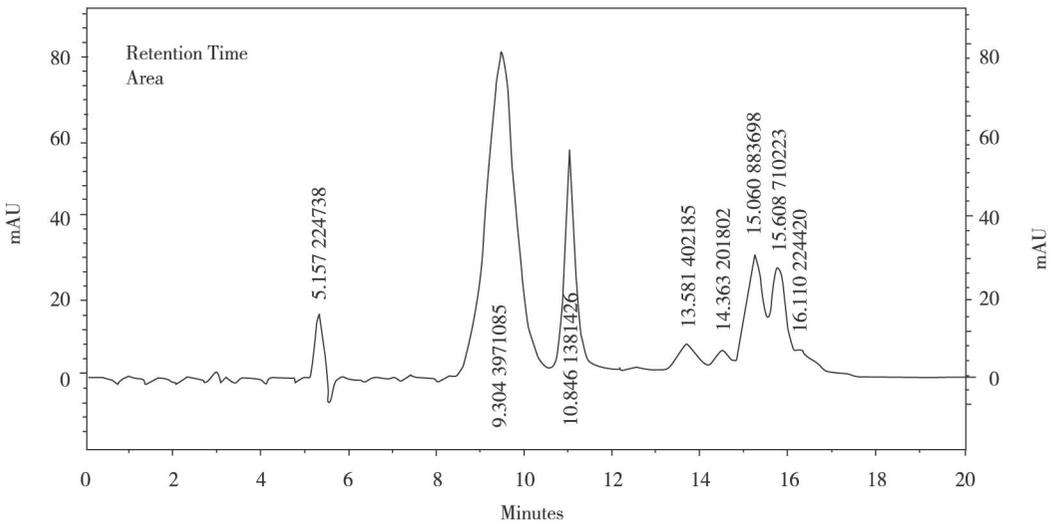
图 4 连续 5 次层析分离的结果

Fig 4 Results of consecutive column chromatography for five times

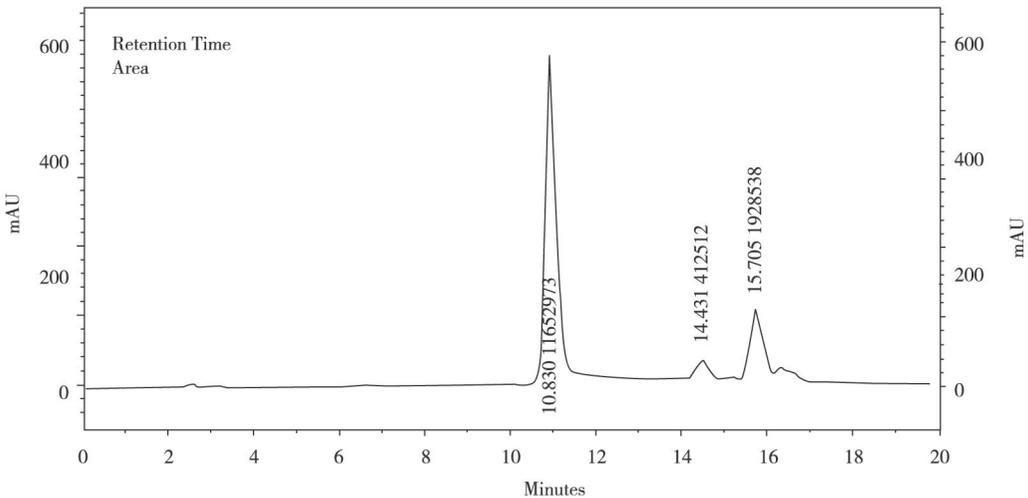
### 2.8 优化条件下的分离

皂化液经样品前处理后, 进样得到图 5 (a)。由图可知, 经 HPLC 分离后得到 7 个色谱峰, 其中 3 峰为叶黄素, 含量为 17.3%。在硅胶使用量

为 40g 上样量为 16mL 皂化液, 湿法上样, 吸附时间为 30min, 负压操作过柱的条件下, 经柱层析后得到的叶黄素产品, 其 HPLC 图谱见图 5 (b)。



(a) 皂化液的 HPLC 图谱



(b) 叶黄素产品的 HPLC 图谱

图 5 皂化液和叶黄素产品的 HPLC 图谱

Fig 5 Chromatograms of saponification solution and product standards of by HPLC

由图 5 (b) 可知, 叶黄素产品的纯度可以达到 83.3% 左右。表明该方法有良好的分离能力。

### 3 结论

固定相采用硅胶 G (100~200 目), 胡萝卜素洗脱剂为 V(石油醚) : V(乙酸乙酯) = 5 : 1, 叶黄

素洗脱剂为 V(石油醚) : V(乙酸乙酯) = 1 : 1, 层析柱规格为  $\Phi 26 \times 510$ mm, 吸附时间为 30min, 使用皂化液直接湿法上样, 上样量为 0.4mL 皂化液 /g 硅胶; 柱温为常温。在以上条件下, 叶黄素的纯度可由皂化液的 17.3% 提高到 83.3%。实验表明, 该方法有良好的分离能力, 便于操作, 产

(下转第 130 页)

## 4 讨论

4.1 本实验通过三水平四因素正交试验, 确定了橘红皮多糖的最佳提取条件, 即为: 微波萃取功率为 40% (320W)、浸提时间 120s、固液比 1:50、橘红皮粉碎粒度 30 目, 在此条件下进行的验证实验提取量高达 23.77mg/g, 远高于单因素实验及正交试验的最高提取量。

4.2 目前微波萃取基本上还停留在实验室小样品的提取及分析, 使用设备简陋, 工业化微波萃取器尚未见报道。近年, 有用于试生产的微波萃取设备问世, 一类为微波提取罐; 另一类为连续微波萃取设备。而且对于潮州这样一个橘红产地来说, 一旦这些设备应用于大生产, 必将对食品、香料业、传统中药制药业等相关行业带来巨大的革命, 也必将极大的影响潮州的橘红种植、加工业甚至潮州的产业结构。

### 参考文献:

- [1] 谢志刚, 刘成伦. 橘红皮的综合利用新进展 [J]. 食品与机械, 2005, 1 (5): 77-80.
- [2] 张成, 贾绍义. 微波萃取技术及其应用 [J]. 化学工业与工程, 2004, 21 (6): 444-448

- [3] 傅荣杰, 冯怡. 微波萃取技术在天然产物提取中的应用. 中国中医药报, 2004, 08
- [4] 赵纪锋, 王海军. 中药多糖的提取分离工艺研究 [J]. 重庆中草药研究, 2007, 6 (1): 29-32
- [5] 张海容, 韩伟珍. 微波法与传统热水法提取香菇多糖的比较研究 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26 (5): 68-71.
- [6] 江和源, 蒋迎. 茶叶多糖的微波辅助提取技术研究 [J]. 食品科技, 2003, (10).
- [7] 张文超, 蔡妙颜, 李琳, 李冰. 金针菇子实体多糖提取新方法 [J]. 中国食品工业, 2000 (8): 48B-48D.
- [8] 欧阳小丽, 张晓昱, 等. 茶薪菇菌丝体多糖提取方法的研究 [J]. 中国食用菌, 2004, 23 (5): 35-37.
- [9] 梁艳, 应苗苗, 吕英华, 陆仙英, 张英. 微波辅助提取仙人掌多糖的工艺研究 [J]. 农业工程学报, 2006, 22(7): 159-162
- [10] 陈奎, 陈易彬. 板蓝根多糖提取工艺的研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, (4): 57-59
- [11] 尹艳, 高文宏, 于淑娟, 岳强. 微波提取水溶性大豆多糖工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2): 21-23.
- [12] 李俊丽, 王运强, 向长萍. 南瓜水溶性多糖提取工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28 (7): 140-143
- [13] 池爱平, 陈锦屏. 微波辅助提取绞股蓝多糖的工艺研究 [J]. 食品科学, 2007, 28 (7): 181-184
- [14] 周跃斌, 王伟, 李适, 邓克尼, 罗里勇. 竹叶多糖提取条件的优化 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2006, 32 (2): 206-209

(上接第 55 页)

品纯度稳定。硅胶在重复使用 5 次以内, 对分离效果的影响不明显。但是叶黄素在光照条件下易氧化, 因此在检测、分离过程中应采取良好的避光措施。

### 参考文献:

- [1] Aman R., Bishl J., Carle R., Conrad, J. Beifuss U., Schieber A. Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables [J]. Food Chem., 2005, 92: 753-763
- [2] Khachik F., Spangler C. J., Smith J. C. Jr, et al. Identification, quantification and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum [J]. Anal Chem, 1997, 69: 1873-1881
- [3] Craft N.E., Soares H. Jr. Relative solubility and absorptivity of lutein and  $\beta$ -carotene in organic solvents [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 431-434
- [4] Seddon J.M., Ajanu A., Sperduto R.D., et al. Dietary carotenoids, vitamin A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration [J]. JAMA, 1994, 272: 1413-1420.

- [5] Snodderly D.M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins [J]. Am. J Clin Nutr, 1995, 62 (suppl): 1448s-1461s
- [6] Schupp C., Okano-Martin E., Gerth C., et al. Lutein, zeaxanthin, macular pigment and visual function in adult cystic fibrosis patients [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79: 1045-1052
- [7] 赵文恩, 孙晓萍, 时国庆, 等. 万寿菊叶黄素提取分离研究 [J]. 食品科学, 2003, 24 (12): 68-70
- [8] Aker-Rodriguez A. The science behind lutein [J]. Toxicology Letters, 2004, 150: 57-83.
- [9] Sowbhagya H.B., Sanpathu A.R., Krishnamurthy N. Natural colorant from marigold: chemistry and technology [J]. Food and Reviews International, 2004, 20 (1): 33-50.
- [10] Karrer P., Jucker E. (translated by Braude E. A.). Carotenoids [M]. London, 1951. 197-207
- [11] Kisten L.M., Oelkrum, Jialiang Li, Philipp W. Simon, et al. Lutein and  $\beta$ -carotene from lutein-containing yellow carrots are bioavailable in humans [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 80: 131-136
- [12] 惠伯棣, 唐粉芳, 裴凌鹏, 等. 万寿菊干花中叶黄素的实验室制备 [J]. 食品科学, 2006, 27 (6): 157-160.
- [13] 杜桂彩, 郭群群, 滕大为, 等. 高纯度叶黄素的制备及稳定性研究 [J]. 精细化工, 2004, 21 (6): 447-449.