

新型类胡萝卜素的分离提纯及结构鉴定

张 梁¹, 袁婀娜¹, 陶冠军², 蔡宇杰¹, 石贵阳^{1,2*}

(1. 江南大学生物工程学院生物资源研究室; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036)

摘 要: 利用高压液相色谱技术(HPLC)及红外光谱(IR)、质谱(MS)、紫外光谱(UV)等现代测试手段,对微球菌产生的一种未知新型类胡萝卜素进行了分离纯化与结构鉴定。研究结果表明,该未知新型类胡萝卜素的分子量为536,分子式为 $C_{40}H_{56}$,结构是全反式对称结构。共有12个共轭双键(番茄红素为11个),根据已报道的研究,可以基本确定是一种新型的类胡萝卜素。

关键词: 类胡萝卜素; 分离; 纯化; 结构鉴定

中图分类号: R284.2; TQ920.6

文献标识码: A

Isolation and Determination of A New Carotenoid

ZHANG Liang¹, YUAN E-nuo¹, TAO Guan-jun², CAI Yu-jie¹, SHI Gui-yang^{1,2*}

(1. Laboratory of Biomass Resources, School of Biotechnology, Southern Yangtze University;

2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

Abstract: The undetermined carotenoid in *Micrococcus roseus* was isolated and identified by modern testing methods including HPLC, IR, APC/MS, and UV. It shows that its molecular weight is 536 and molecular formula is $C_{40}H_{56}$. This carotenoid has never been isolated before and it has 12 conjugated carbon-carbon double bonds. And it is confirmed to be a new carotenoid based on the studies reported.

Key words: carotenoids; extraction; isolation; identification

类胡萝卜素是由几个异戊二烯单位构成、含有多个双键的化合物,属于萜烯基团类,呈黄、橙红等色。它可分为两大类:一种是末端基团被羟基、酮基、甲氧基、环氧基或羧基取代形成的各种衍生物,统称为胡萝卜酸,以虾青素为代表;一种是没有被取代的通常叫胡萝卜素,如 β -胡萝卜素。目前人们研究较多的几种具有经济实用价值的重要类胡萝卜素有:虾青素(astaxanthin)、 β -胡萝卜素(β -carotene)、番茄红素(lycopene)、角黄素(canthaxanthin)、玉米黄素(zeaxanthin)等^[2]。

类胡萝卜素在动物体内具有很好的沉积作用,动物自身不能合成,必须从它们的食物中得到。同时具有抑制 O_2 单线态氧,预防和治疗 V_A 缺乏症、阻止和解决与年龄有关的视网膜降解的问题,阻止和保护细胞内的元素不受有害的UV和可见光的影响等作用。因此类胡萝卜素成为重要的食品、饲料添加剂。

由于类胡萝卜素具有多种功能,又在食品、医药

及化妆品方面得到广泛的应用,所以在深入研究它的功能作用机理的同时,积极寻找天然新型的类胡萝卜素资源具有重要的理论和实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

由本实验室从无锡惠山竹子上分离筛选得到,按照常规的细菌分离鉴定方法鉴定为微球菌属(*Micrococcus*)的一个种玫瑰色微球菌(*Micrococcus roseus*)。

1.1.2 培养基

固体斜面培养基: 2% 葡萄糖, 1% 蛋白胨, 1% 酵母抽提物, 2% 琼脂。

液体种子培养基: 4% 葡萄糖, 1% 蛋白胨, 1% 酵母抽提物。

发酵摇瓶培养基: 3% 蔗糖, 0.7% 蛋白胨, 0.1% Na_2HPO_4 。

1.1.3 主要仪器

AKTA 纯化仪(Amersham Pharmacia Biotech), 液质联用仪(Waters), 傅立叶变换红外光谱仪(Thermo

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-11-29

*通讯作者 Tel: 86-510-85815339; E-mail: gyshi@sytu.edu.cn

Electron Corporation)。

1.2 方法

1.2.1 菌体的培养与分离

采用 1.1.2 中培养基并按照常规微生物培养方法^[1]对菌体的培养进行初步优化,确定培养条件为:28 ℃下培养 120 h,5000 rpm 离心收集菌体并用蒸馏水洗涤 3 次,得湿菌体。

1.2.2 类胡萝卜素的提取

根据 Sedmak^[2]方法,发酵液在 5000 rpm 离心 10 min,去离子水洗涤菌体 2 次。在菌体中加入 55 二甲基亚砜,振荡摇匀后,10000 rpm 离心 5 min,(重复多次至菌体无色)合并上清液,每 10 mL 二甲基亚砜抽提液中加入 1 mL 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)和 15 mL 正己烷、乙酸乙酯混合液(正己烷 乙酸乙酯 - 1)振荡萃取,收集上层萃取液为类胡萝卜素提取液,无水 Na₂SO₄ 干燥,将提取液合并后减压蒸馏至干,即得总类胡萝卜素提取物。

1.2.3 类胡萝卜素的分离纯化

层析用硅胶预装成 2 cm ×50 cm 的层析柱,将上述提取物用少量正己烷溶解后倾倒入柱上,用石油醚/苯 (9:1) 作洗脱剂,进行洗脱,收集橙红色的条带后,再用半制备硅胶 HPLC 柱 (10 ×300 mm) 对其进行纯化,用正己烷和异丙醇在 AKTA 纯化系统上梯度洗脱,收集目标色素条带,充入氮气,密封、避光、冷冻保藏。

1.2.4 类胡萝卜素的化学反应定性测试

显色反应按文献 3,环氧基团测试按文献 3~5,分配系数的测试按文献 3~5 的方法进行。

1.2.5 类胡萝卜素的紫外可见光及红外光谱测定

紫外可见光谱测定:将纯化得到的未知色素溶解于 10 mL 的正己烷中,以正己烷作空白对照,置于 1 cm 加盖石英吸收池内,用紫外-可见分光光度计测定各色素的吸收光谱,扫描范围 190~700 nm,最大吸光度在 0.1~1.5 之间。

红外光谱测定:用 FT-IR 光谱仪测定,分辨率 4 cm⁻¹,直接将适量的纯化的色素干样品以 KBr 压片,光谱记录范围 500~4000 cm⁻¹。

1.2.6 类胡萝卜素的质谱(APC/MS)^[6]

大气压电离源:流速:1 mL/min;光环电压:-2 kV;锥体电压:-25 V;探头温度:400 ℃;源温度:120 ℃。

1.2.7 类胡萝卜素的 HPLC 检测条件

柱子:C₁₈ analytical column (LiChroCAET,LiChro-

spher 250-4);柱温:30 ℃;流速:0.7 mL/L;DAD 检测器;紫外检测波长:475 nm;流动相:甲醇。

2 结果与讨论

2.1 未知色素的化学反应定性分析

纯化色素样品的化学反应的定性结果如表 1 所示,根据色素显色反应结果可以初步断定该色素属于类胡萝卜素类物质,根据分配系数试验和环氧基团试验结果,能够得到该色素结构内不存在环氧基团、羟基团,仅仅是一个有许多共轭双键的长碳链。

表 1 未知色素的化学反应定性分析结果

Table 1 Chemical reaction for the properties and groups of undetermined pigment

测试反应 Testing	测试结果 Result
浓 H ₂ SO ₄ 显色 Color test by H ₂ SO ₄	青蓝色 Cyan
分配系数(羰基)的测试 -C=O-tribute coefficient test	-
环氧基团的测试 Epoxy group test	-

注:“+”阳性 Positive;“-”阴性 Negative

2.2 未知色素的紫外可见光谱及 HPLC 图谱

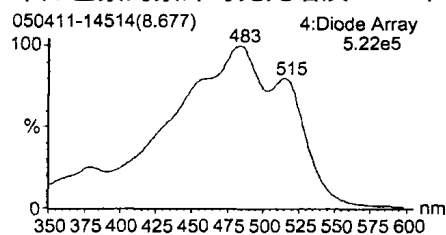


图 1 未知新型类胡萝卜素的吸收图谱

Fig. 1 The absorption spectrum of the undetermined carotenoid

纯化色素样品的紫外可见光谱如图 1 所示,该色素的吸收光谱(如图 1)具有类胡萝卜素类物质特有的三指吸收峰,据此进一步说明它属于类胡萝卜素类色素,其结构是一个共轭多烯体系。

根据其在近紫外区出现一个非常弱的吸收带,可以判断该色素是全反式结构。查阅相关文献资料^[3,7]发现,目前文献中报道的类胡萝卜素吸收光谱并没有与该色素相符的结果,根据 Fieser-Kühns 规则^[8]、胡萝卜素类化合物三个主要吸收波长和共轭双键数目的关系、Hirayama 规则^[9]分析,可以推知该色素的结构内存在十二个共轭双键,八个烷基取代基,但是对其结构的进一步判断和确定,单从吸收光

谱的分析是远远不够的。

2.3 未知色素的红外光谱

纯化未知色素样品进行红外扫描,其红外光谱如图2所示:

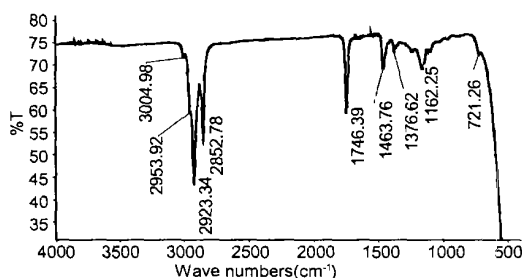


图2 未知新型类胡萝卜素的红外吸收光谱

Fig. 2 The infrared absorption spectrum of the undetermined carotenoid

根据图2所示红外图谱,得到以下信息^[10]:

3004.98 cm^{-1} 处有吸收说明是不饱和C上的C-H的伸缩振动特征吸收,由于体系内无苯环说明分子内含有C=C存在,但在1660~1600 cm^{-1} 处并没有特征吸收,说明体系内为全反式对称结构。

在2953.92、2923.34、2852.78 cm^{-1} 处的强吸收是 CH_3 、 CH_2 的C-H伸缩振动。

在1463.76 cm^{-1} 处的吸收峰是 CH_2 亚甲基的弯曲振动的特征吸收;1376.62 cm^{-1} 是 CH_3 的特征吸收。

在721.26 cm^{-1} 有吸收说明饱和和烷烃链的长度 ≥ 4 。综合以上结果可以说明该未知色素仅是一个具有多个共轭双键的长碳链结构,它属于烃类胡萝卜素,结构内并不存在羟基、羰基、环氧基团。

2.4 未知色素的质谱及HPLC图谱

由以上结构的推断可知,该未知新型类胡萝卜素的极性非常小,采用ESI的方式进行质谱分析,没有任何信号出现。因此,采用大气压电离的方式进行^[6]。

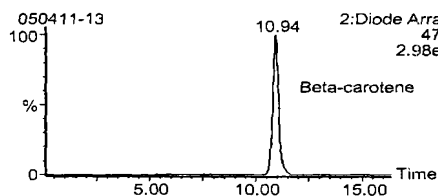


图6 β -胡萝卜素标样的HPLC图谱

Fig. 6 HPLC chromatogram of standard β -carotene

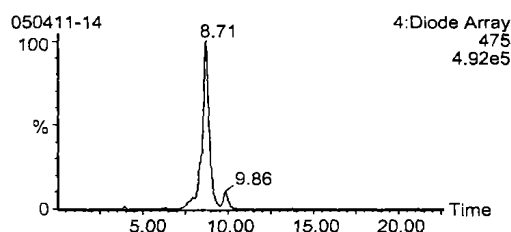


图3 未知新型类胡萝卜素的HPLC图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of the undetermined carotenoid

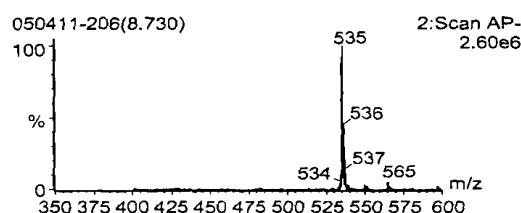


图4 未知新型类胡萝卜素的质谱图

Fig. 4 APCI mass spectrum of the undetermined carotenoid

由色素样品的HPLC图谱及对应的负离子质谱图(如图3、图4),可以确定该色素的理论分子量为 $M_{\text{at } m/e - 536}$,综合以上实验结果和类胡萝卜素类物质的性质,可以确定其分子式为 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$,这个分子量与文献报道的番茄红素和 β -胡萝卜素的分子量相同。

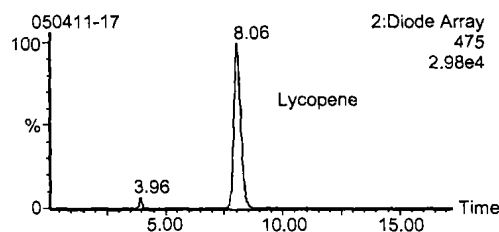


图5 番茄红素标样的HPLC图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram of standard lycopene

为了鉴别该色素与番茄红素或 β -胡萝卜素的异同,同时对三者的紫外吸收图谱进行分析和比较(实验条件与测定本色素的实验条件完全相同)。

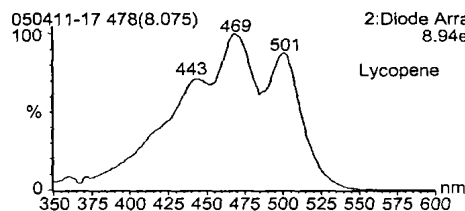


图7 番茄红素标样的吸收图谱

Fig. 7 The absorption spectrum of standard lycopene

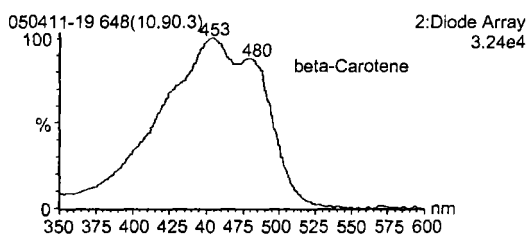


图8 β -胡萝卜素标样的吸收图谱

Fig. 8 The absorption spectrum of standard β -carotene

由图3~图8结果可知,番茄红素标样、 β -胡萝卜素标样的 HPLC 图谱的保留时间、紫外吸收图谱

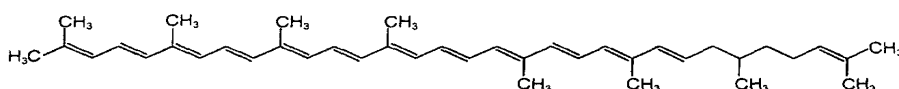


图9 未知新型类胡萝卜素的结构图

Fig. 9 Constitution of the new catenoid

综上所述,通过对色素吸收光谱、红外光谱、HPLC 图谱、质谱图的实验结果分析和总结,可以证明该色素为一种新型类胡萝卜素,而非任何一种资料中已经报道过的类胡萝卜素,根据以上实验结果和对结果的合理推断,得到如下结论:该色素分子量为536,有12个共轭双键,8个烷基取代基,结构是全反式对称结构,结构如图9所示。同时,进一步验证该未知色素结构的推测结果试验依然在进行。

3 结论

HPLC 技术及 IR、APCFMS、UV 等现代测试手段的分析结果表明,由微球菌产生的色素为一种新型类胡萝卜素,而非任何一种资料中已经报道过的类胡萝卜素,分子量为536,有12个共轭双键,8个烷基取代基,结构是全反式对称结构,结构如图9所示。根据目前的研究结果表明,类胡萝卜素提高人体的免疫力,猝灭体内化学活性很高的自由基,防止癌症及其抗氧化能力是与其共轭双键的个数有关,那么我们得到的这一新型类胡萝卜素的共轭双键数目比目前被认为最强单线态氧淬灭剂-番茄红素的还要多(番茄红素有11个共轭双键),有望开发出一种更有价值对人类更有贡献的新色素。因此,具有极大的开发利用前景。

的特征吸收值都与该色素完全不相同,说明该色素并非它们构象上的顺式异构体,因此,可以得出结论,该色素并非番茄红素、 β -胡萝卜素各种异构体的一种,而是一种与它们构型不同的同分异构体,是一种新的物质。

2.5 未知新型类胡萝卜素的结构

综合以上的实验结果,依据类胡萝卜素结构是由多个异戊二烯组成的特性,我们可以推测出该色素的结构为下图所示:

参考文献

- 1 Ye Q (叶勤). Principles of Fermentation Processes (发酵过程原理). Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- 2 Sedmak JJ, Weerasinghe DK, Jolly SO, et al. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotech Tech*, 1990, 4: 107-112.
- 3 Wang YQ (王业勤), Li QS (李勤生). Natural Carotenoids Research, Production, Application (天然类胡萝卜素-研究进展、生产、应用). Beijing: China Medical Publishing House, 1997.
- 4 Britton G. General carotenoids methods. In: Law J H, Rilling H C. eds. Methods in Enzymology. Vol. 111. Steroids and Isoprenoids (Part B). New York: Academic Press, 1985. 113-149.
- 5 Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Carotenoids Vol. 1B: Spectroscopy. Basel: Birkhauser Verlag, 1995, 13-62, 261-320.
- 6 Martin Janner, Hanspeter P. Deinoxanthin: a new carotenoids isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 1997, 53: 919-926.
- 7 Lee PC, Momen AZR. Biosynthesis of structurally novel carotenoids in *Escherichia coli*. *Chemistry Biology*, 2003, 10: 453-462.
- 8 Zhang ZX (张正行). Spectroscopic Analysis in Organic Chemistry (有机光谱分析). Beijing: People's Medical Publishing House, 1995.
- 9 Hirayama K. Carotenoid chemistry. *J Amer Chem Soc*, 1955, 77: 373-379, 382-383.
- 10 Pavia, Lampman, Kriz. Introduction to Spectroscopy. Saunders College Publishing, 1995. 56-63.