

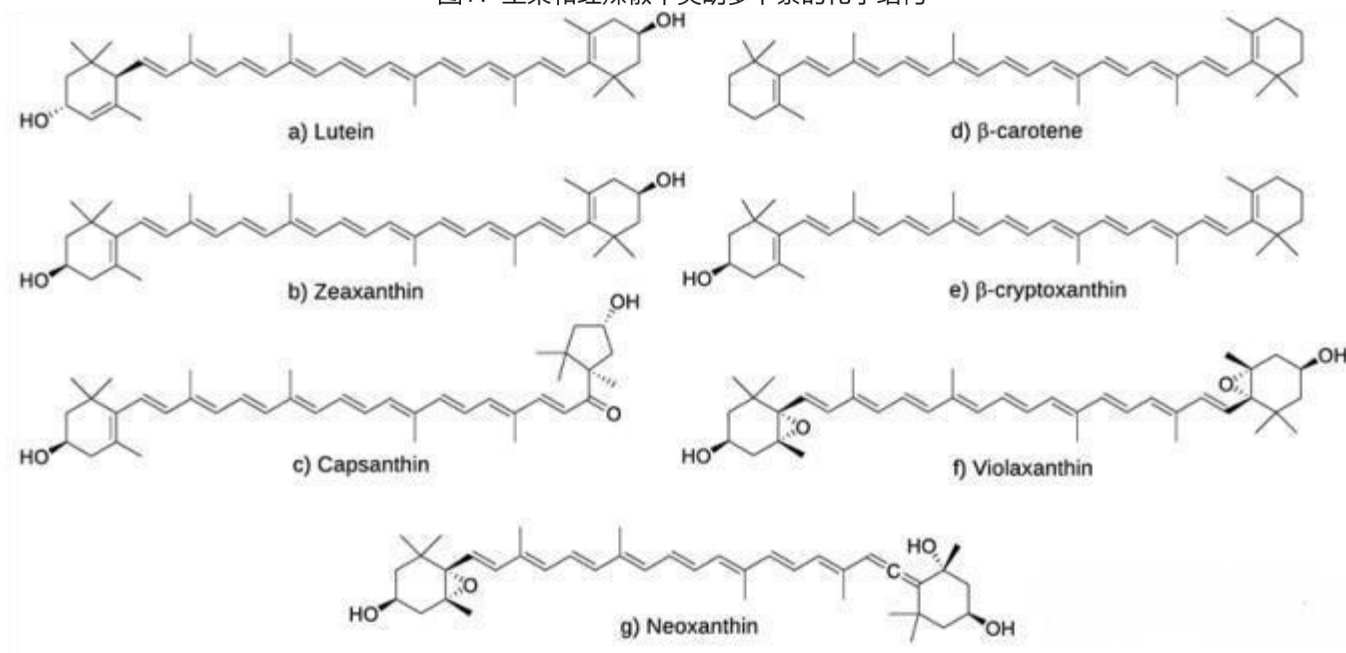
【应用合集】 No. 26 | 使用SiliaChrom 色谱柱分离类胡萝卜素

背景介绍

类胡萝卜素（也称为四萜类化合物）和其他抗氧化剂一样，对某些癌症可起到预防作用。并且摄入一些类胡萝卜素在日常饮食中是十分必要的，因为它们是合成人体功能所必需的维生素的前体。类胡萝卜素是一种色素，由植物产生，可以帮助植物吸收光并将其转化为化学能。类胡萝卜素有两种，叶黄素和胡萝卜素，它们的不同之处仅在于含氧量。它们具有十分相似的结构，由8个异戊二烯分子组成。在本文中，开发了一种使用SiliaChrom Plus C18、dt C18和SiliaChrom PFP柱提取和分离生菜和红辣椒中发现的7种类胡萝卜素的方法。

样品制备&类胡萝卜素的提取

图1：生菜和红辣椒中类胡萝卜素的化学结构



在用SiliaChrom Plus色谱柱进行分析之前，在生菜和红辣椒中发现的类胡萝卜素（图1）需要先根据以下步骤进行提取。

提取步骤：

1. 将100g生菜或红辣椒放置到含有250mL冷丙酮的研磨机中，研磨以获得均匀的提取物溶液。
2. 用布氏漏斗上过滤提取物，并用冷丙酮（3 x 50 mL）冲洗。
3. 用锥形漏斗转移30 mL过滤后的提取物，再加入100 mL石油醚，然后缓慢加入30 mL水。
4. 充分摇晃，静置几分钟。
5. 不要下层的相（水/丙酮），并将上层的相（石油醚）放入玻璃瓶中。
6. 再重复步骤3到5至少2次。

7. 在锥形漏斗中加入全部的来自上层的石油醚相，并加入100毫升水。
8. 摇一摇，静置几分钟。
9. 废弃下层的水相。
10. 用MgSO₄干燥上层相并过滤。
11. 在旋转蒸发器（30℃）去除溶剂，并用10 mL丙酮重新配制溶液
12. 在-80℃储存。

注：用于HPLC分析时，样品被浓缩了10倍。

本实验使用到的色谱柱的特征

SiliaChrom Plus C18

该柱通常用于处理日常分离，是方法开发很好的尝试，它能最大限度地保留非极性化合物。装填在该柱中的C18硅胶已经过SiliCycle特殊封端工艺。

SiliaChrom dt C18

该柱中包含的dt C18填料可允许在100%纯水或100%纯有机溶剂条件下分离疏水分子。

SiliaChrom Plus PFP

PFP也是一种吸附剂，主要用于分离含氟原子的分子，这是因为PFP含有苯环，这让它与其他氟化吸附剂相比，对含芳烃的分子具有更高的选择性。但它也可用于分离非氟化合物，如紫杉醇及其衍生物。

色谱条件

SiliaChrom Plus C18、dt C18和PFP HPLC柱用于分离提取物中的类胡萝卜素时所用色谱条件的详细情况见表1和表2。

表1：使用SiliaChrom Plus C18和dt C18柱时的色谱条件

使用SiliaChrom Plus C18 和 dt C18 时色谱条件	
参数	数值
柱类型	C18: SiliaChrom Plus HPLC , C18, 4.6 x 250 mm, 3 和 5 µm, 100 Å
产品编号	dt C18: SiliaChrom HPLC Column, dt C18, 4.6 x 250 mm, 3 µm, 100 Å
流动相	C18: 3 µm: HPL-S03203E-A-N250 5 µm: HPL-S03205E-A-N250 dt C18: 3 µm: H141803E-N250
流速	梯度 流动相 A: 乙腈 流动相 B: 甲醇 流动相 C: 乙酸乙酯 1- 0 min : 95 % A, 5 % B 2- 20 min : 60 % A, 20 % B, 和 20 % C 3- 55 min : 60 % A, 20 % B, 和 20 % C 4- 55.1 min : 95 % A, 5 % B 5- 65 min : 95 % A, 5 % B
温度	1 mL/min
检测	25°C
上样量	UV 450 nm
	2 µL

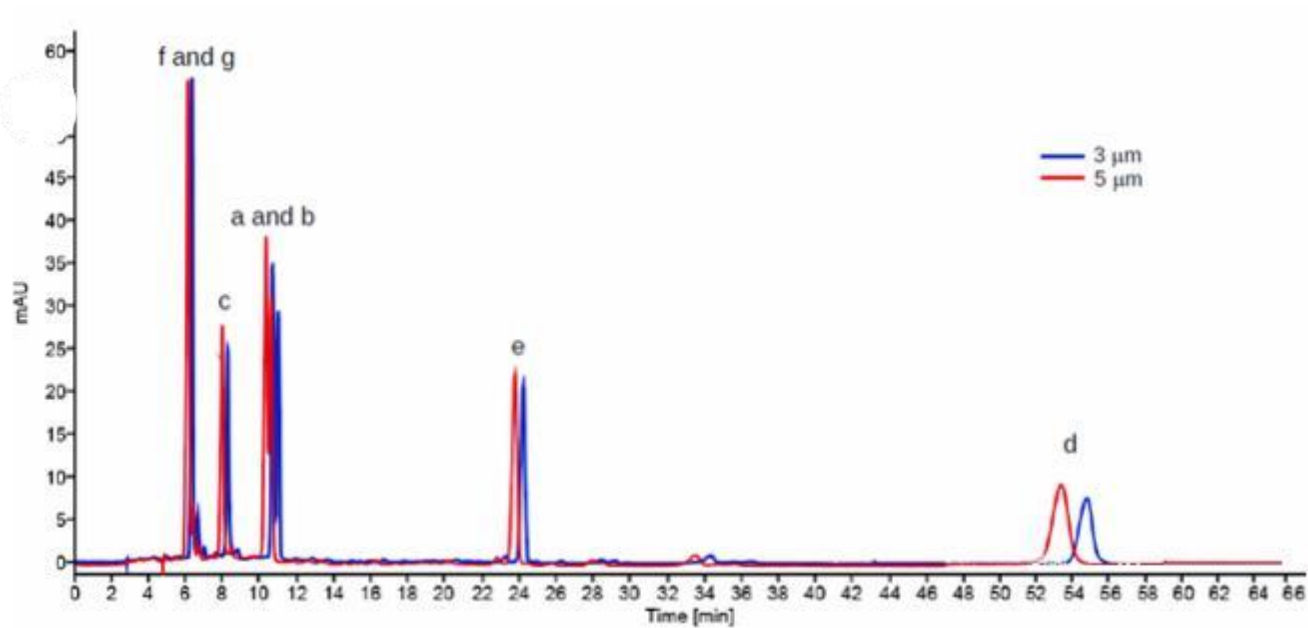
表2：使用SiliaChrom Plus PFP柱时的色谱条件

参数	数值
色谱柱	SiliaChrom Plus HPLC , PFP, 4.6 x 250 mm, 5 μm, 120 Å
产品编号	HPL-S67505G-A-N250
流动相	梯度 流动相 A: 水 流动相 B: 甲醇 1- 0 min : 20 % A 和 80 % B 2- 20 min : 100 % B 3- 30 min : 100 % B 4- 30.1 min : 20 % A 和 80 % B 5- 35 min : 20 % A 和 80 % B
流速	1 mL/min
温度	25°C
检测	UV 450 nm
上样量	2 μL

谱图

SiliaChrom Plus C18

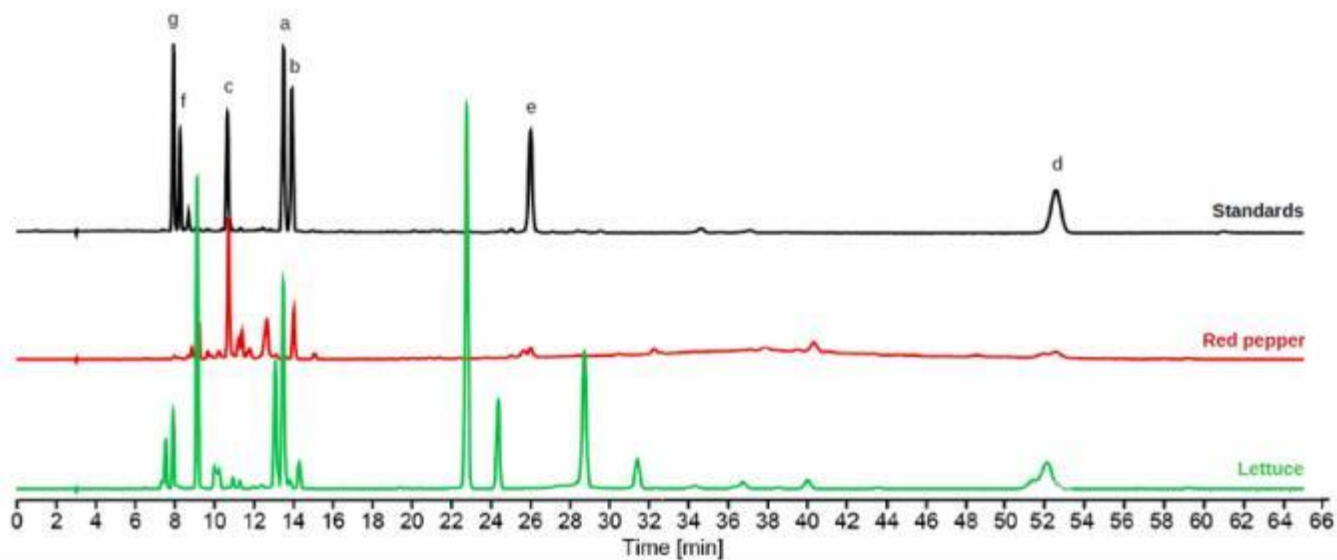
图2：类胡萝卜素标准品在SiliaChrom Plus C18下的谱图（3和5μm）



用SiliaChrom Plus C18柱测试了各种梯度和流动相。但这些条件都不能分离出这7种类胡萝卜素标准品。如图2所示，紫黄质（f）和新黄质（g）以及叶黄素（a）和玉米黄质（b）都不能用这些柱分离。因此，生菜和红辣椒提取物没有考虑再用这一种C18柱进行分析。此外，之后的实验都将选择使用3μm的C18相，而不是5μm，因为进一步的测试发现，5μm无法有效分离各种类胡萝卜素。

SiliaChrom dt C18

图3：使用SiliaChrom dt C18柱（3 μ m）时类胡萝卜素标准品、生菜和红辣椒提取物谱图



SiliaChrom dt C18柱成功地分离了真实提取物中的7种类胡萝卜素。该填料表面游离的硅烷醇含量较高可与化合物进行二次相互作用，从而产生更好的选择性和完全分离。

SiliaChrom Plus PFP

图4: PFP相

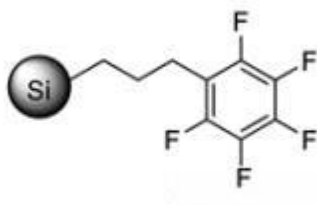
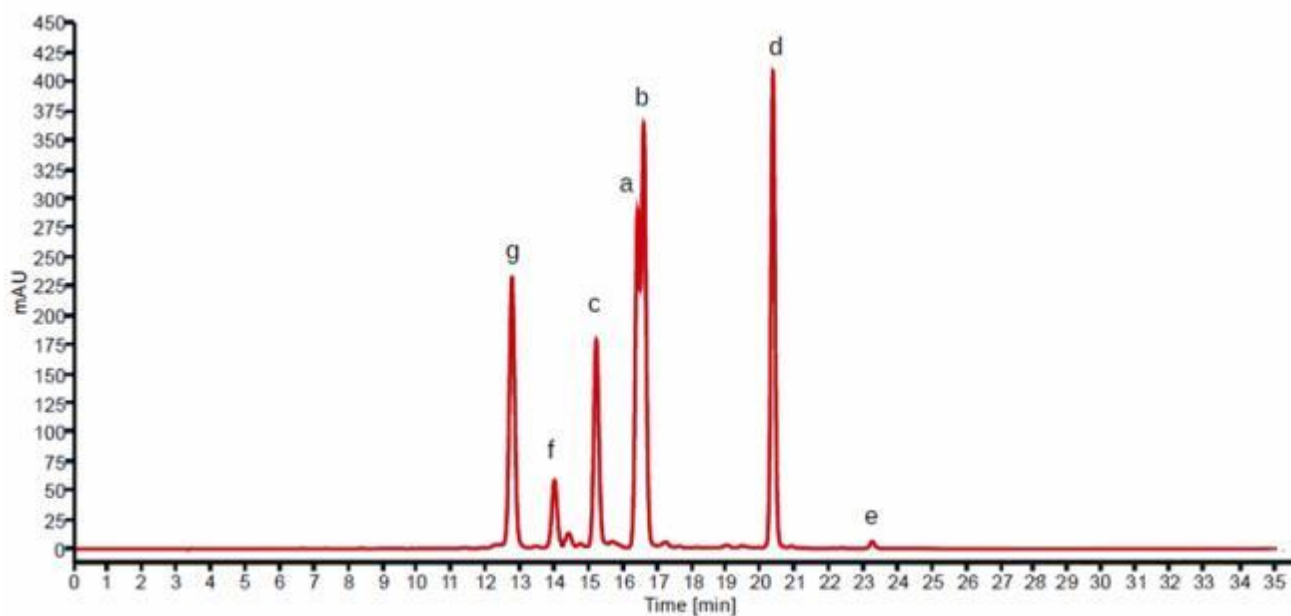


图5：用 SiliaChrom Plus PFP柱分离类胡萝卜素标准品（3 μ m）



用SiliaChrom Plus PFP柱测试了各种梯度和流动相。这些条件都无法分离出7种类胡萝卜素标准品。如图5所示，使用该柱无法分离叶黄素（a）和玉米黄质（b）。因此，生菜和红辣椒提取物将不选用该固定相进行分离。

结论

本文实验说明，游离的硅烷醇在类胡萝卜素的分离中起着关键作用。这就是为什么SiliaChrom dt C18表现最好，而SiliaChrom Plus C18未能分离所有7种成分。也有人认为，PFP相产生的 π - π 相互作用可以使7种类胡萝卜素有效分离，但由于它们在核心分子结构上都具有相同的不饱和体系，事实并非如此，SiliaChrom Plus PFP无法充分分离它们。所以，SiliaChrom dt是分离和鉴定生菜和红辣椒提取物中类胡萝卜素的最有效方法。