

文章编号:1001-6880(2016)10-1576-05

超高效液相色谱法测定万寿菊悬浮培养细胞中的叶黄素

徐晓辉^{1,2},王莉洁²,孙丹²,何伟^{1,3*}¹中国中医科学院眼科医院,北京 100040; ²辽宁何氏医学院健康营养学院,沈阳 110163; ³沈阳何氏眼科医院,沈阳 110034

摘要:建立了超高效液相色谱快速测定万寿菊悬浮培养细胞中叶黄素的方法。样品冷冻干燥后,经甲醇溶液提取,采用 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离,柱温为 25 °C。以乙腈-甲醇(90:10, v/v) (A)-水(B)为流动相,梯度洗脱,流速为 0.4 mL/min。进样体积为 5 μL, 检测波长为 448 nm。在 1.56 ~ 25 mg/L 范围内,叶黄素的色谱峰面积与质量浓度之间具有良好的线性关系。采用该方法测定了实际样品中叶黄素的含量,并进行了 3 个水平的加标回收试验,其回收率为 102% ~ 105%, 相对标准偏差(n = 5)为 0.11% ~ 1.19%。该方法快速、操作简单,适合于分析植物培养细胞中叶黄素的含量和产率。

关键词:超高效液相色谱;叶黄素;悬浮培养细胞;万寿菊

中图分类号:Q813.1;O657.7

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.014

Determination of Lutein in Cell Suspension Cultures of *Tagetes erecta* L. by Ultra-performance Liquid Chromatography

XU Xiao-hui^{1,2}, WANG Li-jie², SUN Dan², HE Wei^{1,3*}¹Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China;²School of Health and Nutrition, He University, Shenyang 110163, China; ³He Eye Hospital, Shenyang 110034, China

Abstract: A rapid ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method was developed for the determination of lutein in cell suspension cultures of *Tagetes erecta* L. The samples were prepared by freeze-drying followed by extraction with methanol. The UPLC separation was achieved using a Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) at 25 °C. The UPLC analysis was performed in the gradient elution mode, using acetonitrile-methanol (90 : 10, v/v) (A)-water (B) as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. The injection volume was 5 μL and the detection was carried out at 448 nm. A highly significant linear relationship between lutein concentration and peak area was observed over the concentration range from 1.56 to 25 mg/L. The proposed method was applied for the determination of lutein in the actual samples and recoveries were determined at three spiking concentrations. The recoveries ranged from 102% to 105% with relative standard deviations between 0.11% and 1.19%. The approach was found to be rapid, simple, and was suitable for the analysis of lutein in plant cell cultures to determine the lutein content of the biomass and the lutein productivity.

Key words: ultra-performance liquid chromatography; lutein; cell suspension cultures; *Tagetes erecta* L.

叶黄素(lutein),系统命名为 β,ε -胡萝卜素-3,3'-二醇(图 1),是一种含氧类胡萝卜素。叶黄素分子的两个末端分别连接一个六元碳环结构,一个为 β -紫罗兰酮环,另一个为 ε -紫罗兰酮环^[1]。叶黄素在工业上被广泛用作食品着色剂和饲料添加剂。叶黄素是构成人眼睛视网膜黄斑区域的主要色素,对维持眼部健康有至关重要的作用^[2]。叶黄素被认为通过以下两种重要的方式来行使功能的:第一,

作为高能量蓝光的过滤器;第二,具有抗氧化功能,能够淬灭和清除光所诱导产生的活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)^[3]。研究表明,叶黄素具有延缓年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)和白内障的发生以及降低患这两种疾病风险的作用^[4],而根据世界卫生组织的报告(Global data on visual impairment 2010),2010 年引起失明的因素中白内障占 51%,年龄相关性黄斑变性占 5%。此外,膳食中摄入高水平的叶黄素或者高水平的血清叶黄素能够降低冠心病、中风以及新陈代谢综合征的患病风险^[5]。

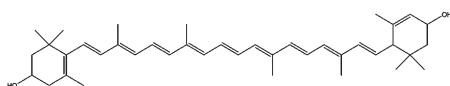


图 1 叶黄素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of lutein

叶黄素,作为一种有效功能性营养物,对人类健康非常有益^[1],但是叶黄素不能由人体自身合成,只能从食物中摄取^[6]。2010年,叶黄素的全球市场约为2.33亿美元,预计到2018年达到3.09亿美元,复合增长率(compound annual growth rate)为3.6%^[7]。目前,商业化生产的叶黄素主要是提取自万寿菊(*Tagetes erecta* L.)的花瓣^[8]。然而,通过大规模栽培万寿菊来生产叶黄素,存在占用土地、叶黄素产率低和生产成本高^[8]等问题,而且具有季节性。此外,万寿菊中叶黄素有两种存在形式:游离叶黄素和叶黄素酯,其中叶黄素酯占80%~100%^[9],叶黄素酯必须经过皂化反应除去脂肪酸,才能得到游离叶黄素^[10],提取和纯化过程比较复杂。基于上述限制性因素,迫切需要建立叶黄素新的来源用于其商业化生产,以满足日益增长的市场需求。

植物细胞培养技术已经被证明是一种替代方法,用于大规模生产植物化学成分,不但具备经济可行性而且生产方式环境友好^[11]。植物培养细胞提供了连续生产体系,不受季节、地理位置和其它环境因素的限制,生产周期短,而且目标化合物的生产是在限定条件下完成的,产品具有统一的质量和稳定的产率^[12]。而建立快速、重现性好的分析方法,对于目标化合物生产的质量控制至关重要。目前,叶黄素的分析方法主要是针对万寿菊花、微藻^[13]、水果和蔬菜^[14-16]以及植物叶片^[17,18]中叶黄素的检测分析,而植物培养细胞中叶黄素的分析方法还未见报道。本研究利用万寿菊悬浮培养细胞来生产叶黄素,通过对万寿菊悬浮培养细胞中叶黄素的提取方法和叶黄素在色谱柱上的分离条件进行优化,建立了超高效液相色谱(UPLC)测定万寿菊悬浮培养细胞中叶黄素含量的分析方法,该方法简便、快速、重现性好,适用于万寿菊悬浮培养细胞生产叶黄素的工艺研究及质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪(ACQUITY™ UPLC, Waters, 美国);纯水/超纯水一体化系统(MING-CHE 24UV,

Merck Millipore, 法国);超声波清洗器(KQ3200E, 昆山市超声仪器有限公司);冷冻离心机(5430R, Eppendorf AG, 德国);旋转蒸发器(RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂);移液器(Research® plus, Eppendorf AG, 德国)。

叶黄素(Sigma-Aldrich, 美国);乙腈(HPLC级, Sigma-Aldrich, 美国);甲醇(HPLC级, Fisher Scientific, 美国);石油醚(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);乙酸乙酯(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);丙酮(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);氯仿(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);甲醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A为乙腈-甲醇(90:10, v/v),B为水;梯度洗脱程序:0~2.5 min, 90% A; 2.5~3.0 min, 90%~100% A; 3.0~6.0 min, 100% A; 6.0~6.5 min, 100%~90% A; 6.5~9.5 min, 90% A。柱温:25 °C;流速:0.4 mL/min;进样体积:5 μL;检测波长:448 nm。

1.3 万寿菊悬浮培养细胞

万寿菊悬浮培养细胞所用的培养基为MS(Murashige and Skoog, 1962)基础培养基^[19],添加1 mg/L NAA(1-Naphthaleneacetic acid), 1 mg/L KT(kinetin), 30 g/L蔗糖。用1 mol/L NaOH将培养基的pH值调到5.8,然后116 °C灭菌30 min。细胞每两周继代培养一次,接种密度为75 g/L。所用摇瓶为100 mL,内装20 mL培养基。摇瓶以双层铝箔纸封口,置于100 rpm的摇床上光照培养,温度为25 °C。光照强度为8000 Lux,光照时间为24 h/day。

1.4 样品制备

准确称取冷冻干燥后的细胞粉末0.2 g,置于50 mL离心管中,加5 mL甲醇(v/w=25:1),超声提取10 min,然后静置提取20 min。离心(5000 rpm, 5 min)后,取上清液置于15 mL离心管中。重复提取两次,合并两次的甲醇提取液。

将甲醇提取液减压蒸干,分两次向旋转瓶中加入3 mL色谱纯甲醇,用于溶解蒸干的甲醇提取物,第一次加入2 mL,第二次加入1 mL。用5 mL注射器吸取甲醇,经0.22 μm微孔滤膜过滤,涡旋振荡后,测定细胞中叶黄素的含量。

2 结果与讨论

2.1 叶黄素提取方法的选择

确定叶黄素的提取方法,主要考虑叶黄素分子的存在形式,提取溶剂极性以及提取溶剂对培养细胞的渗透性。为了同时提取游离叶黄素和叶黄素酯,本研究选取了2种中等极性溶剂甲醇、丙酮和3种非极性溶剂石油醚、氯仿、乙酸乙酯为提取溶剂。同时,为了提高提取溶剂对细胞的渗透性,采用超声波(40 KHz)辅助提取。

准确称取细胞样品1 g,并将该样品平均分成5份,每份0.2 g,分别加入上述5种溶剂,按照1.4节所述的方法处理样品,测定不同溶剂中叶黄素含量。本试验重复3次,结果见图2。

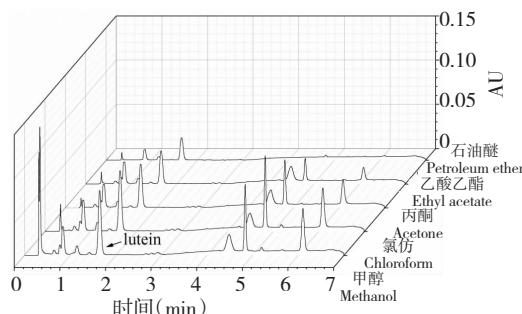


图2 万寿菊悬浮培养细胞不同溶剂提取物的色谱图

Fig. 2 UPLC chromatogram of different extracts from cell suspension cultures of *T. erecta*

2.1.1 皂化反应

从图2可知,万寿菊悬浮培养细胞中叶黄素分子基本上以游离叶黄素的形式存在,这也是细胞培养过程中代谢调控的结果。对于游离叶黄素的提取,不需要皂化反应步骤,因为皂化反应是针对叶黄素酯的,通过皂化反应除去脂肪酸,得到游离叶黄素。本研究中省去皂化反应步骤,不但缩短了样品制备时间,有效防止叶黄素降解,而且使得整个样品制备过程环境友好。

2.1.2 提取溶剂的选择

从图2可见,所选取的5种提取溶剂中,氯仿和甲醇的提取率最高,这2种溶剂提取的叶黄素量均为石油醚提取量的2倍。氯仿和甲醇的提取量无显著性差异,但氯仿密度大,细胞漂浮于液面上,细胞粉末和提取液分离困难,同时,氯仿毒性大,成本高,因此,确定甲醇为提取溶剂。

2.2 叶黄素提取方法的重现性

准确称取0.6 g细胞样品,然后将该样品平均分成3份,每份0.2 g。按照1.4节中所述的方法分

别处理样品,测定每份样品中叶黄素的含量。结果3份样品中叶黄素含量分别为0.0754 mg/g、0.0736 mg/g和0.0758 mg/g,相对标准偏差为1.6%,表明该提取方法可靠、重现性好。

2.3 色谱条件的选择

为了优化色谱分离条件,考察了流动相组成、洗脱程序和柱温对叶黄素保留和分离的影响。基于超高效液相色谱系统,利用Waters BEH C₁₈色谱柱测定叶黄素的报道中,常用的流动相主要有甲醇-水(85:15,v/v)^[17,20],乙腈-甲醇(90:10,v/v)^[16]以及甲醇、乙腈、异丙醇的混合液(54:44:2,v/v/v)-水(含0.1%三氟乙酸)^[21];利用Waters BEH Phenyl色谱柱分析叶黄素的报道中,流动性组成为乙腈-水(90:10,v/v)^[22]。

基于文献报道,通过考察甲醇-水,乙腈-水,乙腈-甲醇以及乙腈、甲醇的混合液(90:10,v/v)-水作为流动相时的分离效果,结果发现乙腈-甲醇(90:10,v/v)为流动相A,水为流动相B,以A-B(90:10,v/v)等度洗脱2.5 min,峰2(叶黄素)与峰1达到基线分离,峰形佳,保留时间适中,结果见图3。此时,柱温为25℃,不需要提高柱温来缩短分析时间。虽然等度洗脱2.5 min即可完成叶黄素的分析,但是为了保护色谱柱,提高方法的耐用性,用100%流动相A冲洗3 min以使样品中的其他物质都能从色谱柱上洗脱下来(峰3和峰4)。然后,以A-B(90:10,v/v)平衡3 min,以实现样品的连续分析。

2.4 方法的线性范围和检出限

取叶黄素标准品(规格1 mg),向标准品瓶内加入5 mL色谱纯甲醇,配制成浓度为200 mg/L的母液。然后,通过逐级稀释得到浓度分别为1.56、3.13、6.25、7.50、12.50、25 mg/L的叶黄素标准溶液,依次进样,每个浓度水平重复测定5次,以峰面积(y)为纵坐标,标准溶液的质量浓度(x, mg/L)为横坐标绘制标准工作曲线,其线性回归方程为y=67.097x-65.703,相关系数r²=0.9984,表明在1.56~25 mg/L范围内线性关系良好。

本方法的灵敏度以信噪比(S/N)为3时所对应的叶黄素质量浓度为检出限,叶黄素的检出限为0.05 mg/L。这表明本方法具有较高的灵敏度,能满足培养细胞中叶黄素的分析要求。

2.5 方法的回收率和精密度

准确称取1.2 g样品,混匀后平均分成6份,每份0.2 g。随机选取3份样品作为空白对照,剩余3

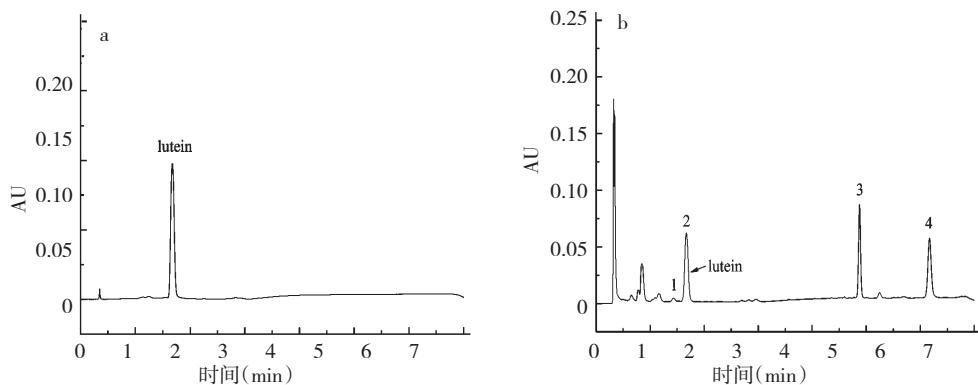


图3 叶黄素标准品(a)和样品(b)的UPLC色谱图

Fig. 3 UPLC chromatograms of lutein standard (a) and sample (b)

份样品按低、中、高3个浓度水平,分别添加0.015 mg、0.040 mg和0.060 mg的叶黄素标准品。按照1.4节所述方法同时处理这6份样品,测定每份样

品中叶黄素含量,每个浓度水平重复测定5次。以对照组3份样品中叶黄素含量的平均值作为样品中叶黄素含量的本底值,计算回收率,结果见表1。

表1 细胞样品中叶黄素回收率及精密度($n=5$)Table 1 Recoveries and precision of lutein in cell samples (RSDs) ($n=5$)

样品质量 Sample weight (g)	叶黄素含量 Lutein content (mg)	添加量 Spiked amount (mg)	检测量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
0.2	0.012	0.015	0.016	106	1.19
0.2	0.015	0.040	0.042	105	0.25
0.2	0.015	0.060	0.061	102	0.11

结果表明,细胞样品中叶黄素的回收率为102%~105%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.11%~1.19%,说明该方法具有较高的准确度,方法的重复性好。

2.6 培养细胞中叶黄素的分析

为了优化细胞培养条件,提高叶黄素产率,本研

究测定了光照培养和黑暗培养两种培养条件下万寿菊悬浮培养细胞中叶黄素的含量,结果见表2。由表2可见,光照条件下,细胞中叶黄素的含量是黑暗条件下的5.4倍,说明光能够促进细胞中叶黄素的合成。

表2 样品中叶黄素的含量($n=5$)Table 2 Content determination results of lutein in samples ($n=5$)

样品 Sample	培养条件 Culture condition	叶黄素 Lutein (mg/g)	相对标准偏差 RSD (%)
1	光照 Light	0.131	0.15
2	黑暗 Dark	0.024	0.08

同时,本研究对两种培养条件下的细胞甲醇提取物进行了对比分析,结果见图4。由图4可见,光照培养和黑暗培养条件下,细胞甲醇提取物的色谱图中都含有4个主峰,其中峰2为叶黄素,说明两种培养条件下,细胞次生代谢特征基本相同。但就含量而言,光照培养条件下,这4个峰的峰面积都显著高于黑暗培养下的对应峰面积,说明光照条件能够

促进细胞产物的生产。

3 结论

本研究建立了万寿菊悬浮培养细胞中叶黄素的超高效液相色谱检测方法。用该方法制备样品,叶黄素提取率高,重现性好。而且,样品制备步骤简单,缩短了制备时间,环境友好。将本方法应用于实

际样品的测定,方法精密度好,回收率高。分析结果表明,光照培养和黑暗培养两种条件下,光照培养能够显著促进培养细胞中叶黄素的合成。该方法为确定万寿菊悬浮培养细胞生产叶黄素的最佳培养条件提供了简单、快速、可靠的方法,可用于植物培养细胞生产叶黄素的工艺研究和产品质量控制。

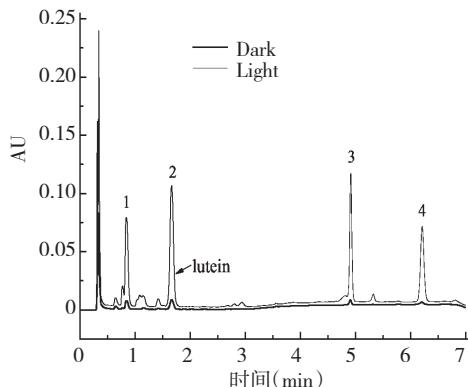


图4 生长在不同培养条件下的万寿菊悬浮培养细胞甲醇提取物的色谱图

Fig. 4 UPLC chromatogram of methanol extracts from cell suspension cultures of *T. erecta* grown under different culture conditions

参考文献

- Lin JH, Lee DJ, Chang JS. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresour Technol*, 2015, 184:421-428.
- Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, et al. Lutein; more than just a filter for blue light. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31:303-315.
- Alves-Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett*, 2004, 150:57-83.
- Nwachukwu ID, Udenigwe CC, Aluko RE. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. *Trends Food Sci Tech*, 2016, 49:74-84.
- Leermakers ETM, Darweesh SKL, Baena CP, et al. The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 2016, 103:481-494.
- Ozawa Y, Sasaki M, Takahashi N, et al. Neuroprotective effects of lutein in the retina. *Curr Pharm Design*, 2012, 18: 51-56.
- Nidhi B, Baskaran V. Acute and subacute toxicity assessment of lutein in lutein-deficient mice. *J Food Sci*, 2013, 78: T1636-T1642.
- Giorio G, Yildirim A, Stigliani AL, et al. Elevation of lutein content in tomato: A biochemical tug-of-war between lycopene cyclases. *Metab Eng*, 2013, 20:167-176.
- Piccaglia R, Marotti M, Grandi S. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Ind Crop Prod*, 1998, 8:45-51.
- Araya B, Gouveia L, Nobre B, et al. Evaluation of the simultaneous production of lutein and lipids using a vertical alveolar panel bioreactor for three *Chlorella* species. *Algal Res*, 2014, 6:218-222.
- Gandhi SG, Mahajan V, Bedi YS. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta*, 2015, 241:303-317.
- Davies KM, Deroles SC. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 2014, 26: 133-140.
- Lin JH, Lee DJ, Chang JS. Lutein in specific marigold flowers and microalgae. *J Taiwan Inst Chem E*, 2015, 49:90-94.
- Perry A, Rasmussen H, Johnson EJ. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *J Food Compos Anal*, 2009, 22:9-15.
- Montesano D, Gennari O, Seccia S, et al. A simple and selective analytical procedure for the extraction and quantification of lutein from tomato by-products by HPLC-DAD. *Food Anal Methods*, 2012, 5:710-715.
- Chen MD (陈敏氡), Zhu HS (朱海生), Wen QF (温庆放), et al. Determination of carotenoids in strawberry by UPLC. *J Fruit Sci* (果树学报), 2013, 30:706-711.
- Heo JY, Kim S, Kang JH, et al. Determination of lutein from green tea and green tea by-products using accelerated solvent extraction and UPLC. *J Food Sci*, 2014, 79:C816-C821.
- Xing P (邢鹏), Bao JJ (包兢兢), Qing YZ (秦玉芝), et al. HPLC analysis method on lutein and β -carotene in sweet potato (*Ipomoea batatas Lam*) leaves. *J Hunan Agric Univ, Nat Sci* (湖南农业大学学报), 2015, 41:533-537.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473-497.
- Kang JH, Kim S, Moon BK. Optimization by response surface methodology of lutein recovery from paprika leaves using accelerated solvent extraction. *Food Chem*, 2016, 205: 140-145.
- Hung PV, Hatcher DW. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) quantification of carotenoids in durum wheat: Influence of genotype and environment in relation to the colour of yellow alkaline noodles (YAN). *Food Chem*, 2011, 125:1510-1516.
- Liu HC, Zhang Y, Zheng B, et al. Microwave-assisted hydrolysis of lutein and zeaxanthin esters in marigold (*Tagetes erecta* L.). *Int J Food Sci Nutr*, 2011, 62:851-856.