

温度对高顺式占比番茄红素稳定性影响研究

李 红¹, 孙清瑞¹, 张连富^{*1,2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 相比全反式, 顺式番茄红素异构体具有更高的生物活性和生物利用率, 但易氧化降解及向反式构型的回复。作者以 YMC Carotenoid C30-HPLC 为检测系统研究温度对其稳定性影响。结果表明以乙酸乙酯为介质, 热回流-重结晶联用技术制备了顺式异构体占比达 78%~85% 的番茄红素产品。贮存稳定性试验表明, 温度越低, 各异构体降解速率常数的绝对值(k)越小, 表明其降解越慢、贮藏越稳定。同时模型参数表明, 等温条件下, $k_{All-E} < k_{9-Z} < k_{13-Z}$ 。9-Z、13-Z、All-E 和 All-Z 异构体在贮藏过程中表现出来的活化能分别为 46.42, 29.19, 56.94, 32.45 kJ/mol。所以 3 种主要番茄红素异构体中, 稳定性由高到低依次为: All-E > 9Z > 13Z。高顺式占比产品表现出总的活化能为 33.76 kJ/mol。

关键词: 番茄红素; 稳定性; 异构化; 降解动力学; 活化能

中图分类号: O 643.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)07—0715—06

Study on the Influence of Temperature on the Stability of High Proportion of Z-Lycopene Isomers

LI Hong¹, SUN Qingrui¹, ZHANG Lianfu^{*1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Compared to All-E lycopene, Z-isomers had higher biological activity and bioavailability, but tending to oxidative degradation and conversion to E-isomer. In the paper, YMC Carotenoid C30-HPLC system were used to detect the influence of temperature on isomers' stability. The results showed that the proportion of cis-isomer lycopene could reach 78–85% in ethyl acetate by combining refluxing-crystal techniques. Storage stability test showed that the lower the temperature was, the smaller of degradation rate constant (k) of lycopene isomers was, indicating that the slower rate of degradation, more stable the storage. While the model parameters indicated that under isothermal conditions, $k_{All-E} < k_{9-Z} < k_{13-Z}$. The activation energies of 9-Z, 13-Z, All-E and All-Z isomers were 46.42 kJ/mol, 29.19 kJ/mol, 56.94 kJ/mol and 32.45 kJ/mol during storage respectively. So stability order of three major lycopene isomers was: All-E > 9Z > 13Z. And the activation energy of high proportion of Z-lycopene isomer product was 33.76 kJ/mol.

Keywords: lycopene, stability, isomerization, degradation kinetics, activation energy

收稿日期: 2013-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171724); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD33B05)。

* 通信作者: 张连富(1967—), 男, 河北唐山人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事功能性食品研究。E-mail: lianfu@jiangnan.edu.cn

番茄红素(lycopene)是一种自然界中广泛存在的类胡萝卜素(carotenoid),主要存在于番茄、西瓜、番石榴和红色葡萄柚等的果实中以及一些微生物中^[1]。番茄红素已被证实具有极强的清除自由基的能力,对防治前列腺癌、肺癌、乳腺癌、子宫癌等有显著效果,还有预防心脑血管疾病、提高免疫力、延缓衰老等功效^[2-5]。

番茄红素分子中含有 11 个共轭及 2 个非共轭碳-碳双键,分子式为 $C_{40}H_{56}$,由于其分子高度的不饱和结构,使其在天然生物合成系统中存在多种几何异构体,番茄红素在理论上有 2^{11} ,即 2 048 种顺反异构体^[6-7]。由于它的结构特征,番茄红素是一种有效的抗氧化剂^[8-9]。但由于链上甲基的位阻效应,大大限制了重排的数目。实际上,番茄红素只存在 72 种顺式结构的异构体。其中最为常见的是 5-Z、9-Z 和 13-Z 等顺式异构体(Z-isomer)^[10]。

番茄红素在人体内分布很广,主要分布在血液、肾上腺、肝脏、睾丸、前列腺、乳腺、卵巢、子宫、消化道等器官中,含量较多的为血液、肾上腺、睾丸、肝脏。在人体血浆中,番茄红素占血中总类胡萝卜素的 21%~43%,在前列腺组织中占 64%。人体内和食物中番茄红素顺式异构体的含量差异较大^[7]。Boileau, Thomas W.-M. 研究发现美国人饮食中吃进去 90% 的全反式番茄红素,但人体组织中的番茄红素主要以顺式结构存在。人类所摄食的番茄红素均以反式为主,而人体内存在的番茄红素大部分都是顺式结构。

研究表明顺式番茄红素异构体比天然存在的全反式有更好的生物利用率和生物活性^[1,11-12]。在人的体液和组织中,如血浆,前列腺,睾丸和皮肤,存在 25%~70% 的顺式番茄红素。此外,人血清和组织中的番茄红素 50% 以上以顺式形式存在(All-E, 5-Z, 9-Z, 13-Z, 15-Z 是最常见的异构体)^[10,13-14]。动物实验证实顺式结构的番茄红素的生理活性较全反式高。Bohm 等也证实顺式异构体的抗氧化性好于全反式异构体^[15]。Myriam Richelle 研究发现血浆中的番茄红素以顺式为主,顺式异构体的人体吸收率高,肠转化率低。这些研究均表明全反式番茄红素与顺式异构体的生物学功能和效价不同。顺式番茄红素因其链短、易溶解、不易聚集等特性而更易被人体吸收利用,生理活性高于全反式^[1,11,16]。随着番茄红素生理活性研究的进一步深入,番茄红素的

顺反异构现象,顺式结构与反式结构的生理活性的差异等均成为番茄红素研究中的热点问题。

但顺式番茄红素异构体稳定性并不好,顺式异构体在放置过程中易发生氧化降解及回复转化。且因番茄红素的异构化反应是可逆的,反式番茄红素可以在一定条件下转化为顺式异构体,顺式异构体亦可回复为反式,且不同顺式异构体之间也存在互相转化的过程。因此,如何提高高顺式占比番茄红素的稳定性,抑制其回复转化是一个迫切需要解决的问题。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

番茄红素(质量分数 90%):华北制药股份有限公司提供;番茄红素参比样品(P/N:L9879):Sigma 公司提供;甲醇,甲基叔丁基醚(色谱纯),乙酸乙酯(分析纯):均为国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验仪器与设备

HHS-4 型电热恒温水浴锅,上海浦东荣丰科学仪器有限公司产品;AB104-N 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;冰箱,无锡小天鹅股份有限公司产品;SP-250A 型生化培养箱,南京实验仪器厂产品;电脑恒温层析柜,上海沪西分析仪器厂有限公司产品;SHB-111A 循环水式多用真空泵,上海豫康科教仪器设备有限公司产品;KJ-300 超声波发生器,无锡市科洁超声电子设备有限公司产品;高效液相色谱仪(岛津 20A 型 HPLC,岛津 996 二极管阵列检测器;色谱柱:YMC Carotenoid C30 柱(4.6 mm×250 mm,3 μ m):岛津公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 参比样品储备液的配制 番茄红素参比样品纯度为 90%~99%,使用前用 HPLC 检测其番茄红素的几何异构体组成。根据不同组分的峰面积比例,计算全反式异构体的比例大于 99%。故未经进一步纯化而直接使用。精确(0.000 1 g)称取番茄红素参比样品 10 mg,乙酸乙酯溶解于 100 mL 棕色容量瓶中定容,配制成 100 μ g/mL 的储备液,保存于-18 $^{\circ}$ C 冰箱中。18 h 内使用乙酸乙酯配成质量浓度适当的工作液,用于 HPLC 分析。

1.3.2 色谱条件 检测波长:472 nm;DAD 光谱收集波长为 200~800 nm;进样量:10 μ L;流量:1 mL/

min;流动相:A(甲醇),B(甲基叔丁基醚);梯度洗脱:B在35 min内由0%升高到55%,后在10 min内由55%升高到60%,保持60%11 min,在4 min内降至10%;2 min内降至0%。

1.3.3 标准曲线的建立 精确量取一定体积的参比样品储备液,用稀释的方法配制成7个不同质量浓度的标准样品液,配置成质量浓度梯度分别为20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,高效液相色谱分析。通过质量浓度-峰面积线性回归,得到番茄红素的回归曲线和方程 $Y=25\ 913x+4\ 570\ 249(R^2=0.999\ 5)$ 。

1.3.4 番茄红素异构化 称取质量分数90%的番茄红素样品溶解于乙酸乙酯中,配置其质量浓度为1.6 mg/mL的悬浮液,恒温水浴避光热回流处理12 h, $-18\ ^\circ\text{C}$ 下放置12 h重结晶,过滤得到高顺式占比番茄红素,稀释、0.22 μm 过滤,HPLC测定分析^[7]。

1.3.5 温度对高顺式占比番茄红素稳定性的影响 将高顺式占比的番茄红素产品分别于 $-18\ ^\circ\text{C}$ (冰箱)、 $4\ ^\circ\text{C}$ (冰箱)、 $25\ ^\circ\text{C}$ (电脑恒温层析柜) 和 $37\ ^\circ\text{C}$ (SP-250A型生化培养箱) 温度条件下进行避光储存,每隔一定时间取样,HPLC测定分析。

1.3.6 重复性实验 每个条件下的样品分别处理分析3次,取平均值。

1.3.7 降解动力学模型的建立 分数转换模型适用于描述番茄红素异构体含量随温度、时间的变化^[17]。其反应公式可以表示为:

$$\frac{dC}{dt} = -k(C - C_f) \quad (1)$$

也可以描述为:

$$C = C_f + (C_o - C_f)\exp(-kt) \quad (2)$$

即如下:

$$\frac{C}{C_o} = \frac{C_f}{C_o} + \left(\frac{C_o - C_f}{C_o}\right)\exp(-kt) \quad (3)$$

假一级反应是分数转换模型中的一种,用于描述番茄红素含量随时间的变化。高顺式占比的番茄红素在不同的贮藏温度下,其降解速率还受其浓度的制约,对比各类回归分析,发现番茄红素异构体的降解过程与假一级反应(Pseudo First Order Reaction)非常相象。降解速率(k)可由如下公式求得,所以我们建立 $\ln(C/C_o)-t$ 的降解动力学模型:

$$k = \frac{\ln\left(\frac{C}{C_o}\right)}{t} \quad (4)$$

式中, C 为番茄红素异构体的浓度, C_f 为番茄红素异构体达到平衡状态时浓度, C_o 为番茄红素初始浓度, k 为降解速率(d^{-1}), t 为反应时间(d)。

2 结果与讨论

2.1 番茄红素异构体的鉴定

番茄红素异构体的鉴定可通过保留时间和光谱学特性进行分析和鉴定^[18-19]。顺式番茄红素异构体分子其电子吸收光谱上在361~362 nm左右处会出现一个“顺式峰”(cis-peak)^[6],同时与全反式相比,顺式番茄红素的主吸收峰的最大吸收波长(λ_{max})也会向短波长方向“紫移”5~10 nm,摩尔吸光系数减小。因此,可根据相关研究报道及对照样品对其进行初步鉴定。如图1所示,可得出10号峰代表全反式番茄红素,6号、9号和11号峰分别为13-顺、9-顺和5-顺异构体。峰1-5,7和8分别表示其他顺式番茄红素。

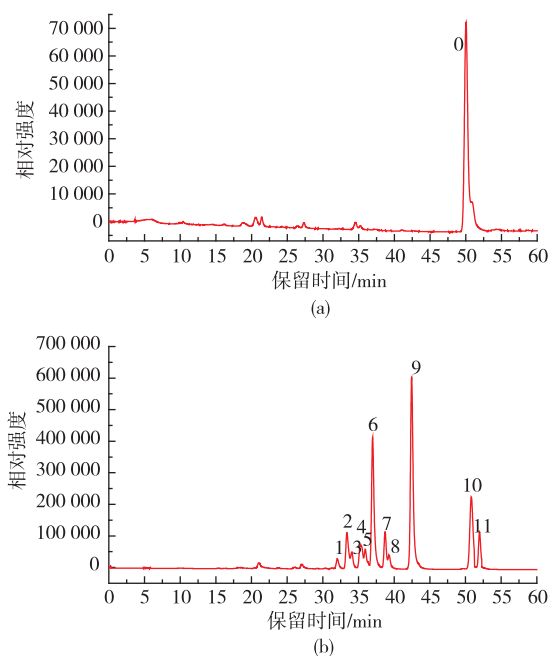


图1 全反式番茄红素(a)及异构化后的HPLC谱图(b)

Fig. 1 HPLC spectra of All-E lycopene (a) and lycopene isomers(b)

2.2 高顺式占比番茄红素异构体的制备

热回流-重结晶联用技术制备得到的番茄红素异构体产品中,顺式异构体占比可达78%~85%,其中9-顺(9-Z)、13-顺(13-Z)和全反式(All-E)是3种主要的番茄红素异构体如图1所示(分别由9号、6号和10号峰所表示)。

2.3 番茄红素异构体的降解动力学特性

在-18、4、25、37 ℃的贮藏条件下,番茄红素各异构体的降解动力学模型和降解速率常数分别如图2和表2所示。显然,温度越低,各异构体降解速率常数的绝对值越小,表明其降解的速率越慢、贮藏越稳定。同时模型参数表明,不同番茄红素异构

体之间的降解速率差距也较大。3种主要的番茄红素异构体中,全反式(All-E)和9-顺(9-Z)番茄红素异构体的降解速率明显小于13-顺(13-Z)。这与相关研究相符^[20]。不同番茄红素异构体间的稳定性不同,其中稳定性由高到低依次为:5Z>All-E>9Z>13Z>15Z>7Z>11Z^[21]。

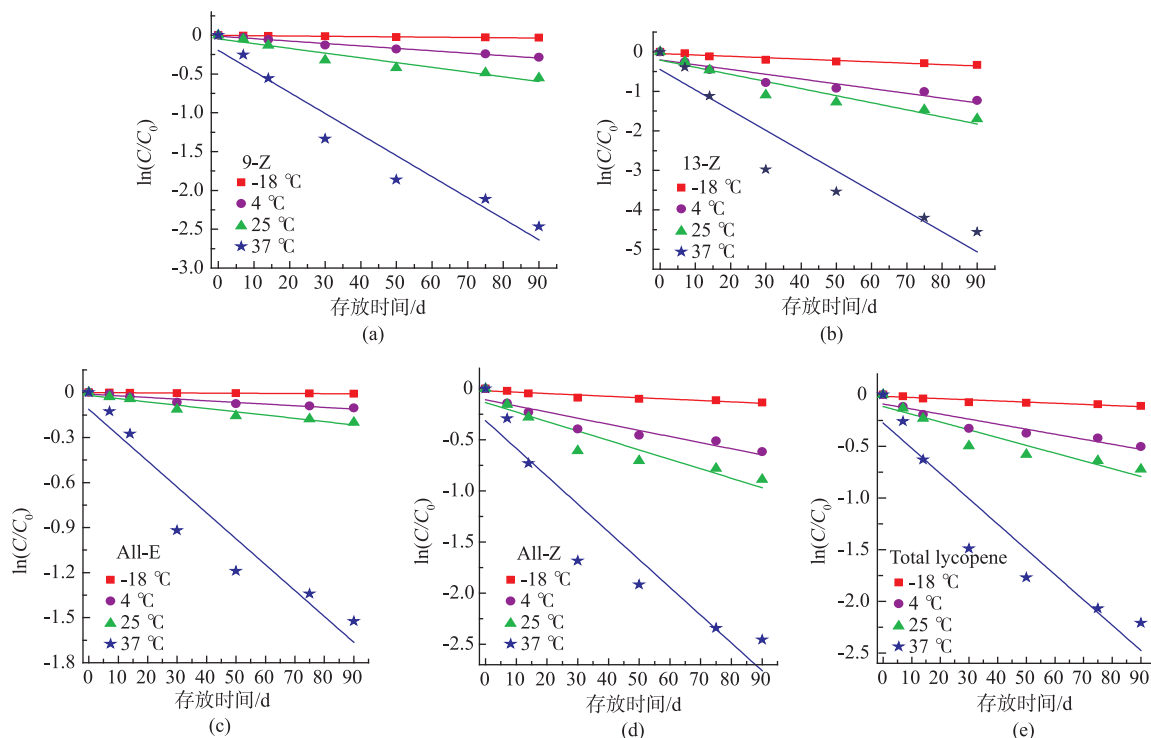


图2 番茄红素异构体在不同温度条件下的降解动力学曲线

Fig. 2 Degradation kinetics curve of lycopene isomers at different temperature

2.4 活化能的计算

以降解速率常数的自然对数($\ln k$)对热力学温度的倒数($1/T$)作图,如图3所示,所得曲线的斜率可计算番茄红素的降解表观活化能。根据 Arrhenius 方程:

$$\ln(k/[k]) = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T/K} \right) + \ln(A/[k])$$

其中, E_a 为活化能(J/mol); R 为理想气体常数($8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$),计算得到各异构体在贮藏过程中表现出来的活化能分别为:9-顺(9-Z)的活化能为 46.42 kJ/mol,13-顺(13-Z)的活化能为 29.19 kJ/mol,全反式(All-E)的活化能为 56.94 kJ/mol,总顺式异构体(All-Z)的活化能为 32.45 kJ/mol,高顺式产品(Total lycopene)表现出的总的活化能为 33.76 kJ/mol。一个化学反应的活化能越高,可以认为该化学反应越难进行,其数值越大,代表越不易被降解,

其稳定性越好。所以几种主要的番茄红素异构体中(All-E,9-Z,13-Z),全反式(All-E)番茄红素的稳定性最好,9-顺(9-Z)次之,13-顺(13-Z)最不稳定。

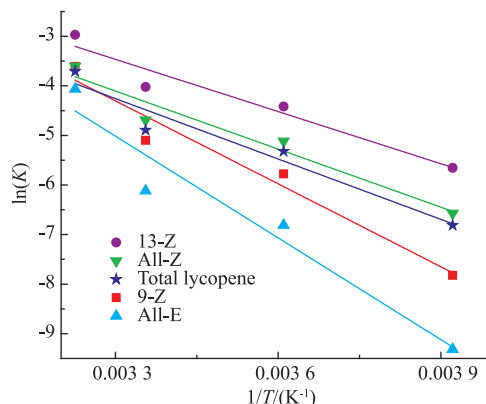


图3 番茄红素异构体在不同温度条件下的 $\ln(K)-1/T$ 关系图

Fig. 3 $\ln(K)-1/T$ diagram of lycopene isomers at different temperatures

表1 番茄红素异构体在各不同温度条件下存放时其降解反应的动力学参数

Table 1 Degradation kinetic parameters of lycopene isomers at various storage conditions

异构体种类	降解速率常数/(1/d)				活化能/(kJ/mol)
	255K(-18 ℃)	277K(4 ℃)	298K(25 ℃)	310K(37 ℃)	
9-Z	0.000 4	0.003 1	0.006 1	0.027 1	46.42
13-Z	0.003 5	0.012 1	0.017 9	0.051 3	29.19
All-E	0.000 09	0.001 1	0.002 2	0.017 2	56.94
顺式含量	0.001 4	0.006	0.009 2	0.027 2	32.45
总含量	0.001 1	0.004 9	0.007 5	0.024 5	33.76

3 结 语

番茄红素是种具有优越生理功能的功能因子,相比天然全反式番茄红素分子,顺式结构的番茄红素分子具有更高的生物活性和生物利用率,但同时易发生氧化降解及顺式向全反式的回复转化,稳定性不好。以 YMC Carotenoid C30 柱为色谱柱,以甲基叔丁基醚、甲醇为流动相,采用梯度洗脱的 HPLC 检测系统,可得以下结论:

以乙酸乙酯为加热介质,利用热回流-重结晶

联用技术可制备顺式占比达 78%~85%的番茄红素异构体。温度越低,各异构体降解速率常数的绝对值越小,降解速率越慢、越稳定。高顺式占比番茄红素异构体在贮藏试验中表现出总的活化能为 33.76 kJ/mol,稳定性仍有待提高。番茄红素异构体间的稳定性不同,其中稳定性由高到低为:All-E>9Z>13Z。番茄红素分子异构化是个可逆反应,顺式异构体向反式回复转化需要能量,低温贮藏可减少环境体系的能量,在一定程度可抑制回复的进行。所以低温是一种有效提高顺式番茄红素稳定性的途径。

参考文献:

- [1] Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2000, 40(1): 1-42.
- [2] Rao A V, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review [J]. *Nutrition Research*, 1999, 19(2): 305-323.
- [3] Giovannucci E. Tomato products, lycopene, and prostate cancer: A review of the epidemiological literature [J]. *Journal of Nutrition*, 2005, 135(8): 2030S-1S.
- [4] Arab L, Steck S. Lycopene and cardiovascular disease[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71(6): 1691S-5S.
- [5] 王晓岚, 王璇, 张连富. 番茄红素纳米分散体抗小鼠肝移植瘤的作用[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(3): 376-380.
WANG Xiaolan, WANG Xuan, ZHANG Lianfu. Antitumor effect of lycopene nanodispersion on mice transplanted with hepatoma [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(3): 376-380. (in Chinese)
- [6] Koe B K, Zechmeister L. In vitro conversion of phytofluene and phytoene into carotenoid pigments[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 41(1).
- [7] 张连富, 张环伟. Cosmosil+Cholester-HPLC 法分离番茄红素异构体的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(5): 699-703.
ZHANG Lianfu, ZHANG Huanwei. Study on the separation of lycopene isomers via cosmosil cholester-HPLC system[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(5): 699-703. (in Chinese)
- [8] Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 274(2).
- [9] Conn P F, Schalch W, Truscott T G. The singlet oxygen and carotenoid interaction [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1991, 11(1): 41-47.
- [10] Schierle J, Bretzel W, Buhler I, et al. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma [J]. *Food Chemistry*, 1997, 59(3): 459-465.
- [11] Boileau T W M, Boileau A C, Erdman J W. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2002, 227(10): 914-919.

- [12] Unlu N Z, Bohn T, Francis D M, et al. Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects[J]. **British Journal of Nutrition**, 2007, 98(1): 140-146.
- [13] Clinton S K, Emenhiser C, Schwartz S J, et al. cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate[J]. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 1996, 5(10): 823-833.
- [14] Ferruzzi M G, Nguyen M L, Sander L C, et al. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection[J]. **Journal of Chromatography B**, 2001, 760(2): 289-299.
- [15] Bohm V, Puspitasari-Nienaber N L, Ferruzzi M G, et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002, 50 (1): 221-226.
- [16] Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2000, 20(4): 293-334.
- [17] Kaur D, Sogi D S, Wani A A. Degradation kinetics of lycopene and visual color in tomato peel isolated from pomace[J]. **International Journal of Food Properties**, 2006, 9(4): 781-789.
- [18] Moraru C, Lee T C. Kinetic studies of lycopene isomerization in a tributyrin model system at gastric pH [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005, 53(23): 8997-9004.
- [19] Re R, Fraser P D, Long M, et al. Isomerization of lycopene in the gastric milieu [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2001, 281(2): 576-581.
- [20] 王晓文, 张华伟, 闫圣坤, 等. 番茄红素在微乳液制备和贮藏过程中构型转化及稳定性研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(1): 22-29.
WANG Xiaowen, ZHANG Huawei, YAN Shengkun, et al. Study on the configuration-changing and stability of lycopene in the process of microemulsion preparation and storage[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(1): 22-29. (in Chinese)
- [21] Chasse G A, Mak M L, Deretey E, et al. An ab initio computational study on selected lycopene isomers[J]. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, 2001, 571: 27-37.

会 议 信 息

会议名称(中文): 2014 海峡两岸生物防治学术研讨会

开始日期: 2014-09-17

结束日期: 2014-09-20

所在城市: 云南省 昆明市

主办单位: 中国植物保护学会

承办单位: 中国植物保护学会生物防治专业委员会、国家植物病虫害生物学重点实验室

全文截稿日期: 2014-08-01

联系人: 蒋细良

联系电话: 010-82106381

E-MAIL: jiangxiliang@caas.cn

会议网站: http://www.ipmchina.net/csp/showmynews.asp?news_id=213

会议背景介绍:

中国植物保护学会与中华植物保护学会自 1998 年以来以轮值召开学术研讨会形式, 已召开了 4 届两岸生物防治学术研讨会。研讨会的召开增进了海峡两岸植保科技工作者在生物防治领域的学术与应用交流, 对两岸的生物防治学术研究与生防技术的发展起到积极推进作用。原计划于 2013 年 7 月 19~22 日在云南省昆明市召开“2013 海峡两岸生物防治学术研讨会”因故推延到 2014 年 9 月 17~20 日在云南省昆明市召开, 会议名称为“2014 海峡两岸生物防治学术研讨会”。本次会议由中国植物保护学会主办, 中国植物保护学会生物防治专业委员会、国家植物病虫害生物学重点实验室承办, 云南省植物保护学会、云南农业大学、云南省植保植检站、云南省农科院农业环境资源研究所协办。