

几何异构化对番茄红素淬灭单线态氧功能的影响

李京¹, 惠伯棣^{2,*}

(1. 首都师范大学生命科学院, 北京 100037; 2. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100083)

摘要: 目的: 观察几何异构化对番茄红素淬灭单线态氧功能的影响。方法: 采用碘诱导的方法从番茄红素全反式异构体中制备一定数量的13Z和9Z顺式异构体, 应用C₃₀-HPLC-PDA分离和纯化各异构体组分。而后, 通过对反应体系的光子计数, 比较不同异构体对次氯酸-双氧水反应所产生的单线态氧的淬灭能力。结果: 各异构体淬灭单线态氧的能力依次为: 全反式异构体 > 13Z顺式异构体 > 9Z顺式异构体。结论: 发生在番茄红素分子中双键两侧的顺式异构可降低其淬灭单线态氧的能力, 而这一异构发生的位置越靠近分子的中央, 其淬灭单线态氧能力下降越快。

关键词: 番茄红素; 几何异构; 淬灭单线态氧

Effects of Geometrical Isomerisation on Singlet-oxygen Quenching by Lycopene *in vitro*

LI Jing¹, HUI Bo-di^{2,*}

(1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China;
2. College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective: To study the effects of geometrical isomerisation on singlet-oxygen quenching by lycopene *in vitro*. Method: In this study, induced by iodine and with further separation and purification by C₃₀-HPLC, the certain amounts of 13Z- and 9Z-isomers were prepared from the all *E*-isomer of natural lycopene. Ability to extinguish singlet-oxygen generated from reaction between NaClO and H₂O₂ by each isomer was then compared by count photons generated from the reaction. Result: Ability to quench singlet-oxygen by each isomer is ranked in following order: all-*E*-isomer > 13Z-isomer > 9Z-isomer. Conclusion: It is therefore considered that *Z*-isomerisation appeared by both sides of double bond in the molecule of lycopene can reduce the ability to extinguish singlet-oxygen of the molecule. Additionally, the closer to the center of the molecule this isomerisation, the more decrease of ability to extinguish singlet-oxygen by the molecule.

Key words lycopene; isomerisation; singlet-oxygen quenching

中图分类号: O629.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0104-04

单线态氧(¹O₂)被认为是处于激发态的活性氧, 亲电子性强, 故性质活泼。它在细胞中是一种很重要的脂质过氧化启动剂, 在许多生命活动中起着重要作用, 与生物膜损伤、衰老和癌症等与年龄相关的疾病有密切关系^[1-3]。

番茄红素(lycopene)是一种只由碳氢组成的类胡萝卜素。中文半系统命名为ψ, ψ-胡萝卜素, 分子式为C₄₀H₅₆。这一天然产物对多种疾病(如: 前列腺疾病和乳腺癌等)具有防治功能。因此, 它具有显著的经济效益。我国近20年来富含番茄红素的功能性食品的生产

消费显著上升^[4]。

番茄红素分子中的11个共轭及两个非共轭C=C双键赋予其具有很强的淬灭单线态氧能力。番茄红素的多数防治疾病功能被认为是建立在其淬灭单线态氧的机理之上。因此, 对番茄红素淬灭单线态氧的研究对探讨其防治疾病的功能有重要意义。

共轭多聚烯结构赋予番茄红素分子形成多种几何异构体的可能性。从理论上讲, 番茄红素分子的11个共轭双键会产生1024个几何异构体, 鉴于空间位阻的存在, 实际上只能形成72个。在自然界中, 大部分番茄

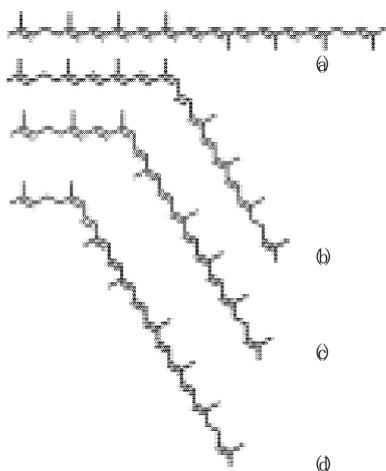
收稿日期: 2007-06-15

*通讯作者

基金项目: 北京市自然科学基金对外合作项目(SZ200511417020)

作者简介: 李京(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为化学与分子生物学。

红素以全反式(all *E*-isomer)的形式存在,常见的单顺式异构体(*Z*-isomer)有13-和5-顺式异构体三种(见图1)。番茄红素中几何异构体的比例与其来源和制备技术有密切的关系,是评价番茄红素制备物质量的重要标志,也被认为是人工合成品与天然产物的重要区别之一。尤其重要的是:番茄红素的几何异构化将对其性质和生物学功能产生重要的影响。笔者等已在实验室中观察到天然番茄红素在大鼠的肝脏中发生了大量的顺式异构化。因此,比较不同几何异构体生物学功能的差异无论在理论上还是在实践中均有重要的价值。



(a).全反式异构体 (b).13顺式异构体 (c).9顺式异构体 (d).5顺式异构体。

图1 番茄红素几何异构体的分子结构

Fig.1 Molecular structures of lycopene geometrical isomers

在研究中,采用碘诱导的方法,从全反式异构体制备13和9顺式异构体,再应用C₃₀-HPLC分离和纯化各产物。同时,使用次氯酸盐氧化双氧水,产生单线态氧(¹O₂) (见反应式(1)),应用微弱发光分析仪对该反应所产生的光子计数。将纯化的各组分加到单线态氧的生成反应中,观察反应所释放光子的数量下降。最终,从构效关系的角度探索几何异构化对番茄红素在体外淬灭单线态氧功能的影响。



1 材料与方法

1.1 材料与试剂

碘、次氯酸钠、双氧水、甲醇和四氢呋喃(分析纯) 北京化工厂;用于HPLC分离的乙腈、甲醇和甲基叔丁基醚(MTBE)(均为色谱纯试剂) 迪马公司;番茄红素样品(Lycopene FS, 10%) DSM公司。

1.2 仪器

C₃₀柱(YMC Carotenoid S-5)、HPLC(Waters 1525溶

剂输送系统和PDA-996二极管阵列检测器) Waters公司;分光光度计 Multi Spec-150岛津公司;BPCL-G-K微弱发光分析仪 中科院生物物理研究所。

1.3 方法

1.3.1 番茄红素溶液的制备

称取一定量的番茄红素产品,定溶于50ml二氯甲烷中。用分光光度计测量浸泡液475nm处吸光度,并根据下面郎比定律计算其番茄红素含量^[5]。

$$x = (A \times y) / A^{1\%1\text{cm}} \times 100 \quad (2)$$

式中, x 为样品番茄红素的含量(g); y 为样品溶液的体积(ml); A 为样品在475nm处的吸光值; A^{1%1cm}为吸光系数,定义为在1cm光程长的比色杯中1%(W/V)浓度溶质的理论吸收值。在此采用值为 ε = 3400。

1.3.2 顺式异构体的诱导

配制与番茄红素-二氯甲烷溶液相同浓度(W/V)的碘-二氯甲烷溶液。按碘与番茄红素1/20(V/V)的比例向番茄红素溶液中加入碘液。日光或距离日光灯60cm照射15min后避光保存。在操作这一反应时,反应时间和碘用量的掌握至关重要,时间过长或碘量过多都会引起番茄红素分子重排后降解。

1.3.3 C₃₀-HPLC分离、纯化异构体

诱导的番茄红素异构体混合物用C₃₀-HPLC分离。HPLC条件已由惠伯棣等人报道^[7],色谱柱为Waters YMC Carotenoid S-5(4.6 × 250mm);流动相A为乙腈-甲醇(75:25);流动相B为MTBE;流动相A与B中分别加入0.05%三乙胺作为改性剂防止番茄红素降解;线性梯度洗脱: B在8min内由0%增加至55%;8~35min B维持55%;35~40min B由55%减至0%;流速为1.0ml/min;检测波长为475nm;波长范围260~700nm;进样量为20μl。根据各组分的色谱行为和光谱特征对其进行鉴定^[6]。收集不同组分,用1.3所述方法测定其浓度后,用氮气吹干,-20℃保存。

1.3.4 不同异构体淬灭单线态氧能力比较

将各组分分别溶于四氢呋喃溶液,根据1.3.1所述的方法和公式(2)对每个组份定量,最终配制成0.0001、0.0005、0.001、0.005、0.01、0.02mg/ml不同浓度的溶液。

用微弱发光分析仪分别计数不同异构体浓度下次氯酸钠-双氧水体系产生的光子,并比较它们有效淬灭单线态氧的最小作用剂量。选用640nm滤光片^[5];采集间隔1s,收集时间100s;用14C源校正仪器至30000光子计数值。

测量样品时,在测量杯中依次加入2ml次氯酸钠溶液、1ml甲醇、0.2ml样品溶液,混匀后将测量杯放入测量池中,开始测量,在开始光子计数程序后10s时注

入 0.6ml 30% 双氧水启动反应, 完成光子计数。空白为四氢呋喃。

由于该反应受多种环境因素的影响, 为确保实验结果的准确性, 每个样品重复测量三次, 取平均值计算结果, 并按以下公式计算淬灭效率:

$$\text{淬灭率} = \frac{\text{空白最大光子计数值} - \text{样品最大光子计数值}}{\text{空白最大光子计数值}} \times 100\% \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 番茄红素几何异构体的 C₃₀-HPLC 分离、纯化与收集

碘可诱导类胡萝卜素发生几何异构的现象已被认识多年。这一方法在以探索分子结构为主要内容的类胡萝卜素化学早期研究中曾经发挥过重要的作用。这一方法应用于番茄红素分子时, 番茄红素全反式异构体可转化生成相当数量的 13 和 9 顺式异构体^[6]。图 2 为番茄酱萃取物碘诱导反应前和碘诱导后的 C₃₀-HPLC 的谱图。图 2 表明, 经过碘诱导异构化后, 样品中组分 I 和 II 含量增多, 组分 III 的含量减少。

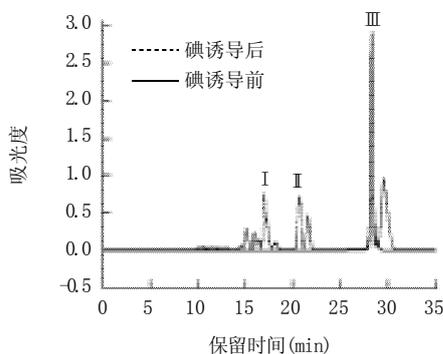


图 2 碘诱导前后番茄红素样品的 C₃₀-HPLC 色谱图

Fig.2 C₃₀-HPLC chromatogram of lycopene sample before and after iodine-induced

与全反式异构相比, 番茄红素顺式异构体的主要电子吸收光谱特征包括: (1) 最大吸光值所在波长 (λ_{\max}) 略有“紫移”(一般为 2~5nm, 视溶剂而异); (2) “顺式吸收峰(cis-peak, 360nm)”有明显加强, 且异构位置越靠近中心, 此峰越高^[7]。图 3 为组分 I、II 和 III 的电子吸收光谱图。从图 3 可以看出, 与组分 III 相比, 组分 I 和 II 的最大吸光值所在波长略有“紫移”, 360nm 处的吸光值有明显加强, 其中组分 I 的最强。

根据已有的文献报道^[6], 全反式番茄红素发生分子异构时分子极性增大, 并且异构化位置越靠近分子中心极性增强越明显。因此, 在反相色谱系统中, 顺式异构化发生在分子末端的异构体会被先洗脱出来, 之后

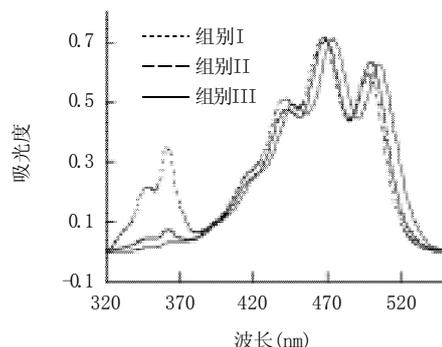


图 3 组分 I、II、III 的电子吸收光谱图

Fig.3 Electronic absorption spectra of fraction I, II and III

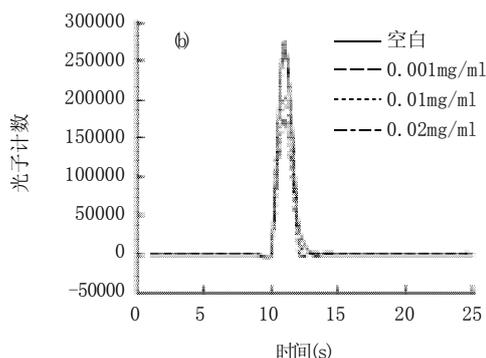
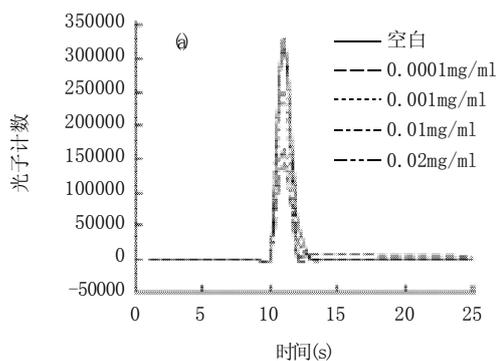
是顺式异构化发生在分子中央的异构体, 最后为极性最小的全反式异构体。因此, 13 顺式、9 顺式和全反式番茄红素异构体在反相 C₃₀ 上的洗脱顺序为: 13 顺式异构体 → 9 顺式异构体 → 全反式异构体。

根据上述其色谱行为与光谱特征, 参比已报道的研究结果, 确定组分 I、II 和 III 分别为番茄红素的 13、9 和全反式异构体。可分别收集各组分用来进行体外淬灭自由基的实验。

2.2 不同番茄红素异构体淬灭单线态氧能力比较

图 4 给出了 13 顺式、9 顺式和全反式异构体做为淬灭剂时次氯酸与双氧水反应的光子计数曲线。从图 4 的结果, 依据公式 (3) 可计算不同浓度异构体的淬灭率, 并作比较(见图 5)。

从图 5 可以看出, 三种番茄红素的几何异构体均有



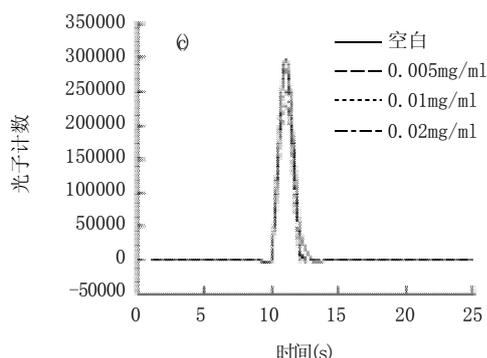


图4 全反式异构体(a)13顺式异构体、(b)9顺式异构体、(c)作为淬灭剂时的反应光子计数图

Fig.4 Photon counts of reaction with allE-isomer (a) 13Z-isomer (b) and 9Z-isomer (c) as free radical quenchers

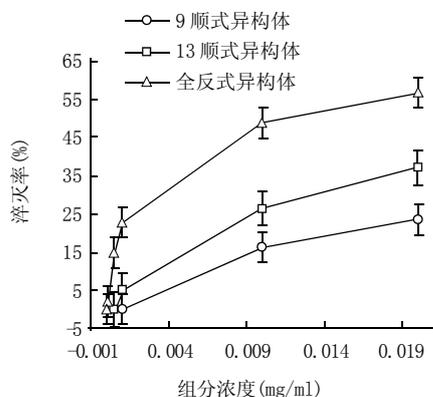


图5 三种异构体的淬灭率比较

Fig.5 Comparison of quenching of three isomers

淬灭单线态氧的能力，即：将一定量的组分加入后，反应体系光子计数值比空白有所降低，且淬灭率随着组分浓度的升高而增强；在相同浓度下，各组分的淬灭率均为：全反式异构体 > 13顺式异构体 > 9顺式异构体。

3 讨论

3.1 顺式异构化对分子淬灭单线态氧的影响

研究表明，番茄红素分子的顺式异构化导致其淬灭单线态氧能力的下降。同时，发生顺式异构的

位置也与其淬灭自由基的能力有关，顺式异构发生的位置越靠近分子的末端，其淬灭自由基的能力下降越多。

3.2 分子能量转移过程的分析

番茄红素淬灭单线态氧的过程可以被理解为一个能量转移过程：番茄红素分子首先接受单线态氧的激发能，然后向周围溶剂分子传递转动和振动能，最终降低单线态氧的能级。由于顺式异构体已经处于较高的能级^[7]，其接受的能量小于全反式异构体，所以，其淬灭单线态氧的能力小于全反式异构体。这种观点可以被考虑为上述实验结果的解释之一。

3.3 电子转移过程的分析

从电荷转移的角度来看，由于番茄红素分子中央具有均匀而稳定的共轭双键结构，当分子参与淬灭自由基的反应时，分子间的电荷转移应当是始于分子的末端基团。在参与反应时，分子末端基团的电荷得失会引起分子内部电荷的位移，形成电荷传递链。顺式异构导致的空间位阻变化(分子的弯曲)对分子内部的电荷传递链具有一定影响，进而影响分子得失电荷(参与反应)的能力。从上述实验结果来看，当顺式异构体参与淬灭自由基的反应时，电荷得失应当发生在异构位置(分子弯曲处)两侧的短链一端。当该端得失电荷时，分子内部的电荷传递链很快受阻，使分子得失电荷(参与反应)的能力较异构发生在靠近分子中央的异构体下降更多。

参考文献：

- [1] 莫简. 医用自由基生物学导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 25-30.
- [2] 陈璇, 周玫. 自由基医学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1991: 22-42; 115-118.
- [3] 胡天喜, 陈纪, 陈克明, 等. 发光分析与医学[M]. 上海: 华东师范大学出版社, 1990: 48-67.
- [4] 李京, 惠伯棣, 裴凌鹏. 番茄红素——被关注的功能因子[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 154-157.
- [5] 廖萍泰, 惠伯棣, 裴凌鹏, 等. 叶黄素体外抗氧化研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 46-50.
- [6] 惠伯棣, 李京, 裴凌鹏. 应用C30-HPLC-PDA分离与鉴定番茄红素几何异构体[J]. 食品工业科技, 2006(6): 49-54.
- [7] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 262-265.

中国科学引文数据库核心库收录期刊