

超高压物理能对胡萝卜汁中类胡萝卜素异构体的影响

马永昆, 徐丽娜, 张佳, 上官丽娟, 李祥波
(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 本实验研究了超高压处理对胡萝卜汁中类胡萝卜素异构体的作用, 为利用超高压技术调控利于人体吸收的类胡萝卜素几何异构体奠定基础。胡萝卜汁分别进行 100、300、500、700MPa 处理 5min, 然后用 C₃₀ 柱加之二极管阵列检测器的 HPLC 分离检测样品中类胡萝卜素几何异构体。根据类胡萝卜素组分的色谱行为、光谱特征及 Q 值对其异构体进行定性, 确定主要的类胡萝卜素有全反式 β-胡萝卜素、15-顺-、13-顺-、9, 15-顺-、9-顺-β-胡萝卜素和全反式 α-胡萝卜素等。结果表明, 超高压处理可能使垒较低的 9、13、15 位等全反式类胡萝卜素发生部分顺式异构化或降解生成小分子片段。

关键词: 超高压物理能; HPLC; C₃₀ 柱; 胡萝卜素异构体

Effect of Ultra-high Pressure Physical Energy on Carotenoid Isomers in Carrot Juice

MA Yong-kun, XU Li-na, ZHANG Jia, SHANGGUAN Li-juan, LI Xiang-bo
(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Carrot juice was pressurized under different ultra-high pressure processing conditions and the aim was to study the effects of ultra-high pressure physical energy on the carotenoid geometric isomers in the carrot juice. The carotenoid geometric isomers in the juices treated by 100, 300, 500 and 700 MPa for 5min were separated respectively by HPLC equipped with a photodiode array detector and a C₃₀ column. According to the chromatographic behavior, spectral characteristics and geometrical transition of the carotenoid geometric isomers catalyzed by iodine, the isomers of all-trans-β-carotene, 15-cis-, 13-cis-, 9-15-di-cis-, 9-cis-β-carotene, and all-trans-α-carotene were identified respectively. The results showed that to some extents, the ultra high pressure physical energy can lead to the isomerization of all-trans-carotenoids such as 9-, 13-, 15- carotenoids with low bond energies or the degradation to some small molecular fragments.

Key words: ultra-high pressure physics energy; HPLC; C₃₀ column; carotenoid isomers

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0105-04

β-胡萝卜素属类胡萝卜素的一种, 分子式为 C₄₀H₅₆, 在自然界中 β-胡萝卜素主要以全反式形式存在, 但也常见其 15-顺-、13-顺-、11-顺-、9-顺- 四种顺式异构体的存在^[1]。β-胡萝卜素分子由中央多聚烯链和两端的六元芳香环末端基团组成的双环结构, 整个分子呈几何中心对称, 其晶体为略有 S 型弯曲的平面叠加结构, 其分子中央共轭多烯链的存在使整个分子具有高度的不饱和性, 故当有外界能量作用时, β-胡萝卜素易发生异构化反应, 形成多种几何异构体^[2-3]。反式的胡萝卜素在光照、长时间高温、氧化等作用下易产生顺式异构体, 如 β-胡萝卜素光照下易生成 9-顺式异

构体, 加热处理主要生成 13-顺-β-胡萝卜素及其他 15-顺-β-胡萝卜素等异构体^[4-5]。然而, 不同构型的类胡萝卜素其生物学功能是不同的, 如顺式异构体含量的增加会降低 β-胡萝卜素的 VA 原活性^[6]; 在体外抗氧化实验中, 全反式异构体的抗氧化性优于顺式异构体^[7-8]; 但反式胡萝卜素等异构体不利于人体吸收及转化为有效的 β-胡萝卜素。因此, 很多国内外研究者都关注于 β-胡萝卜素的异构现象及其生物学意义, 并设法对其异构化进行调控。

超高压物理处理技术是食品加工和保鲜的一种新技术, 其对食品成分中的共价键影响不大, 如色素、风

收稿日期: 2008-08-06

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA100405)

作者简介: 马永昆(1963-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品非热加工及食品风味。E-mail: mayongkun@ujs.edu.cn

味、维生素等,可充分保持食品原有的色、香、味及营养成分等^[9-10]。邱伟芬等^[11]研究发现超高压处理对番茄浆中13-顺番茄红素有影响。类胡萝卜素有多个共轭双键,按照化学反应及 *ab initio* 电势能计算原理,较强超高压物理能可能引起 β -胡萝卜素晶体分子间范德华力碰撞, π 轨道电子断裂并导致类胡萝卜素的异构化,生成顺式异构体^[12]。

此外,在类胡萝卜素定量、定性研究中,惠伯棣,仇丹,Chen B H^[13-15]等使用C₃₀柱进行几何异构体的分离并结合HPLC-PDA检测鉴定,获得了较理想的结果。研究表明, β -胡萝卜素异构体的电子吸收光谱特征不同,顺式异构体的主吸收峰与全反式的主吸收峰相比,其电子吸收光谱发生“紫移”。同时,顺式异构体在342~348nm处会出现一特征吸收峰。这些光谱特征可作为判断 β -胡萝卜素异构体的依据^[16-17]。

本实验结合C₃₀-HPLC-PDA检测技术,首次研究了超高压物理能对胡萝卜汁中 β -胡萝卜素异构体的影响,在检测食品类胡萝卜素含量时,获得其异构体比例信息,对判断胡萝卜汁及其产品中类胡萝卜素的生物学功能以及食品质量安全性有重要的参考价值。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜胡萝卜,产地山东,购于镇江蔬菜批发市场。

β -胡萝卜素标准品(纯度>99.5%) Sigma公司;正己烷、甲醇、乙腈、甲基叔丁基醚均属色谱纯 汉邦科技公司;提取用的石油醚为分析纯。

1.2 仪器与设备

超高压设备,压力范围为0~800MPa,高压介质为癸二酸二辛酯的3L智能化超高压装置;C₃₀柱 YMCTM(型号为Carotenoid S-5 4.6×250mm);HPLC设备(600E溶剂输送系统和PDA-996二极管阵列检测器) Waters公司。

1.3 方法

1.3.1 胡萝卜汁前处理

选取桔红色新鲜胡萝卜,洗净去皮,切成3~5mm薄片,将胡萝卜片在95℃左右的0.5%柠檬酸和0.5%VC烫漂液中预煮2min,并用冷水迅速冷却,以料液比1:1加入去离子水打浆,然后胶体磨磨至200目左右,将胡萝卜浆分装于聚乙烯袋中密封,在室温下,按100、300、500、700 MPa压力分别处理保持5min,样品编号为C₁₀₀、C₃₀₀、C₅₀₀、C₇₀₀,处理样品放置在4~6℃冰箱待测。

1.3.2 类胡萝卜素的提取

高压处理胡萝卜汁的样品和空白样分别称取4.00g,

加入40ml石油醚,于400W功率超声波萃取2min,经无水硫酸钠过滤,收集滤液至50ml圆底烧瓶中,于30℃低温下真空旋转浓缩约至2ml,N₂吹干,然后用正己烷定容至10ml,低温避光保存,以备高效液相进样,进样前用0.45 μ m滤膜过滤。

1.3.3 β -胡萝卜素标准品的配制

准确量取10ml浓度为50 μ g/ml的全反式 β -胡萝卜素溶液,溶于50ml石油醚中,制取方法同1.3.2。

1.3.4 色谱条件和定量方法

色谱柱: Y M C Carotenoid S-5(250×4.6 mm);流动相A:乙腈-甲醇(25:75, V/V);流动相B: MTBE;流动相A与B中分别加入0.05%(V/V)三乙胺;线性梯度洗脱: B在20min内由0%增加至80%;流速: 1.0ml/min;检测波长: 450nm; PDA光谱收集范围260~700nm;进样量: 20 μ l。定量方法采用峰面积归一化相对定量。

2 结果与分析

2.1 胡萝卜汁中类胡萝卜素异构体的分离鉴定

β -胡萝卜素异构体的定性最准确的方法是做核磁共振分析,即比较顺式结构与反式结构的化学位移的差异来判断异构体的类型,但此方法要求制备 β -胡萝卜素及其异构体的纯品,否则无法进行核磁共振分析,然而实验室制备纯品的难度比较大,不宜采用。另外,大多数论述采用对各组峰的特征紫外吸收来进行大致判断,即通过 β -胡萝卜素从反式变为顺式,特定吸收光谱发生改变,在近紫外区约330~340nm处出现一个顺式小峰,主要吸收峰也略微向紫外区转移,即以此特性作为鉴定的标记;而其中这个顺式小峰的吸光度与主峰的吸光度的比值被定义为Q值,这种方法被广泛应用作顺反异构体的判别依据。本实验根据各组分最大吸收波长、特征光谱及Q值对异构体的种类进行大致判断。以空白样品的HPLC为例,对胡萝卜汁中可能出现的异构体进行鉴定分析。

图1、2分别为空白样品和 β -胡萝卜素标准品的

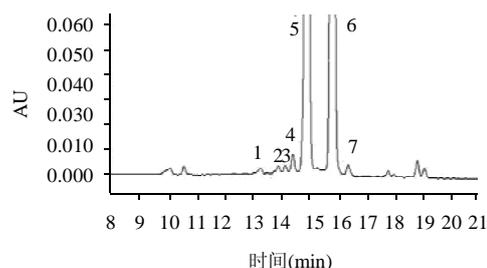
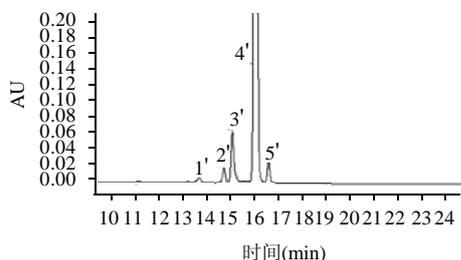


图1 空白样品的HPLC色谱图

Fig.1 C₃₀-HPLC-PDA chromatogram of untreated carrot juice

HPLC 分离效果图, 由图 1、2 可知, 用 C₃₀ 柱分离样品的效果较理想。



1'.片段, 2'.15-顺, 3'.13-顺, 4'.全反式β-胡萝卜素, 5'.9-顺-β-胡萝卜素。

图2 全反式β-胡萝卜素标准品的HPLC色谱图

Fig.2 C₃₀-HPLC-PDA chromatogram of standard sample of all-trans-β-carotene

对照图 1、2, 根据保留时间首先可以判断出图 1 中 6 号峰(R_t=16min)为全反式β-胡萝卜素, 二极管阵列检测器测得特征波长为 453.9、480.6, 这与标准品测得值 452.7、478.2 略有不同, 可能由仪器或试剂因素造成, 但这种差异仍在β-胡萝卜素特征紫外吸收范围之内。其他各组分的光谱特征见图 3。

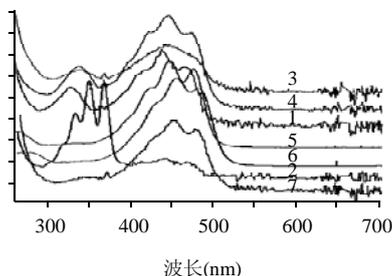


图3 C₃₀-HPLC-PDA 分离空白样品中 7 个峰的光谱特征图

Fig.3 C₃₀-HPLC-PDA spectral overlays with seven peaks of untreated carrot juice

根据表 1 各组分的色谱行为、光谱特征图及 Q 值并参照相关文献对其进行鉴定^[14-15], 1-7 号峰依次鉴定为: 15-顺-β-胡萝卜素、(番茄红素)片段^[18]、9,15-双顺-β-

胡萝卜素、13-顺-β-胡萝卜素、α-胡萝卜素、全反式β-胡萝卜素和 9-顺-β-胡萝卜素。

2.2 超高压处理对类胡萝卜素几何异构体的影响

胡萝卜汁样品在经过 100、300、500、700MPa 压力处理后经 HPLC 得到的色谱图, 如图 4~7 所示。

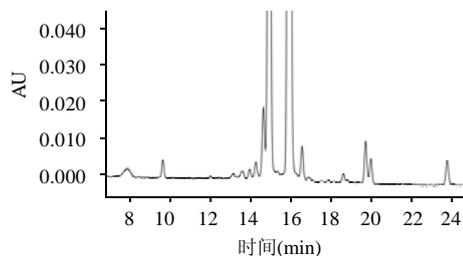


图4 100MPa 高压下 C₃₀ 柱高效液相色谱图

Fig.4 C₃₀-HPLC-PDA chromatogram of carrot juice treated by 100 MPa

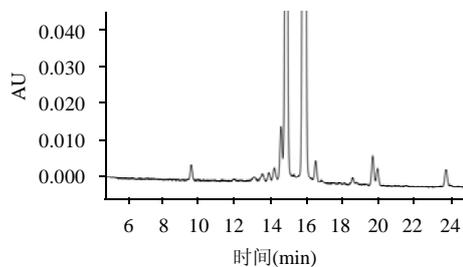


图5 300 MPa 高压下 C₃₀ 柱高效液相色谱图

Fig.5 C₃₀-HPLC-PDA chromatogram of carrot juice treated by 300 MPa

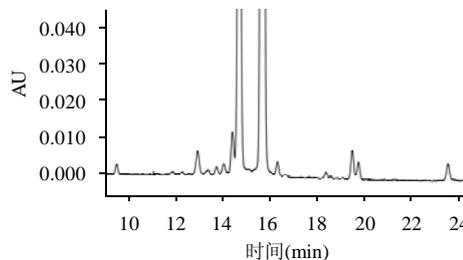


图6 500MPa 高压下 C₃₀ 柱高效液相色谱图

Fig.6 C₃₀-HPLC-PDA chromatogram of carrot juice treated by 500 MPa

由图 4~7 可知, 各压力处理后的样品中仅在峰面

表 1 胡萝卜汁空白样中类胡萝卜素异构体的种类

Table 1 Varieties of carotenoid isomers in untreated carrot juice

序列	异构体	保留时间(min)	λ (nm, 实验值)			λ (nm, 参考值)			Q 值			
									计算值	参考值		
1	15-顺	13.703	332.7	(412)	439.4	466.0	334	—	441	—	0.40	0.39 ^a
2	片段	14.055	348.3	—	439.4	464.8	—	—	—	—	—	—
3	9,15-双顺	14.348	338.7	—	439.4	—	333	—	440	466	0.28	0.21 ^a
4	13-顺	14.734	342.3	(425)	445.5	(474)	337	—	446	471	0.41	0.36 ^a
5	α-胡萝卜素	15.018	335.1	435	446.7	474.5	—	420	445	474	—	0.08 ^b
6	全反式	16.007	—	—	453.9	480.6	—	—	454	478	—	— ^a
7	9-顺	16.651	339.9	—	451.5	474.5	340	—	445	472	0.0079	0.11 ^a

注: a.HPLC 流动相为: 甲醇-MTBE-水(50:45:5, V/V/V); b.HPLC 流动相为石油醚。

表2 胡萝卜汁中顺反式异构体的含量(%)
Table 2 Contents of carotenoid isomers in carrot juice (%)

样品	全反式 β -胡萝卜素	全反式 α -胡萝卜素	全反式类胡萝卜素总量	13-顺式	15-顺式	9-顺式	其他顺式
空白	58.843	34.724	93.567	0.802	0.426	0.405	4.800
C ₁₀₀	69.972	21.297	91.269	1.592	0.238	0.842	6.059
C ₃₀₀	68.579	21.202	90.174	1.764	0.293	0.757	7.012
C ₅₀₀	69.473	21.549	91.022	1.348	0.273	0.509	6.848
C ₇₀₀	67.804	22.677	90.481	0.617	0.993	0.457	7.452

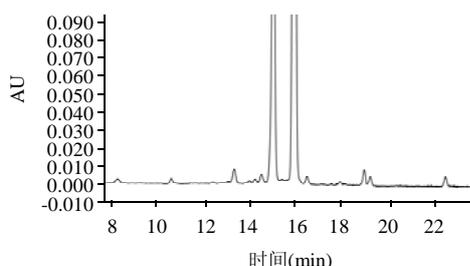


图7 700 MPa 高压下 C₃₀ 柱高效液相色谱图

Fig.7 C₃₀-HPLC-PDA chromatogram of carrot juice treated by 700 MPa

积上略有变化, 并无新的物质生成。对各样品中顺反异构体的含量进行计算, 空白及各压力处理后样品中类胡萝卜素顺反异构体含量见表 2。

由表 2 可知, 超高压处理后的胡萝卜汁样品中, 100、300、500 MPa 对胡萝卜汁中类胡萝卜素总量影响不大, 其中 500 MPa 处理后的样品各组分比例较为协调, 而 700MPa 导致类胡萝卜素总量减少, 并且生成的顺式异构体比例也较大。可见, 压力高于 500MPa 对胡萝卜汁中类胡萝卜素降解或异构化影响较大。

类胡萝卜素在经过光照、高温等影响下易产生顺式异构体, 其发生异构化的部位主要位于 9、13、和 15, Yeung J C Y^[12] 研究指出根据 *ab initio* 势能面计算得出番茄红素异构体稳定性的顺序为: 5-顺 > 全反式 > 9-顺 > 13-顺 > 15-顺。由此可见, 这 3 个位置的顺反异构反应的能垒较低是导致异构化的根本原因。本实验中超高压处理后样品顺式异构体的总含量较不经高压处理的空白样品略高, 且压力超过 500MPa 分子异构化或降解较为明显, 原因可能是高压物理能作用于 β -胡萝卜素晶体结构引起分子间范德华力碰撞, π 轨道电子断裂, 导致 9、13 或 15 等异构化, 生成顺式异构体或其小分子片段。

3 结论

3.1 利用 C₃₀-HPLC-PDA 对胡萝卜汁中类胡萝卜素的种类进行鉴定, 确定超高压处理的胡萝卜汁中主要类胡萝卜素成分为全反式 β -胡萝卜素、全反式 α -胡萝卜素、15-顺、13-顺、9,15-顺、9-顺等, 其中全反式 β -胡萝卜素含量约占总类胡萝卜素的 60% 以上, 顺式异构体

的含量约为 7%~9%。

3.2 超高压物理能可使全反式类胡萝卜素异构体发生顺式异构化, 甚至降解为小分子片段。压力高于 500MPa 对胡萝卜汁中类胡萝卜素降解或异构化影响较为显著。

参考文献:

- [1] 惠伯棣, 李京, 裴凌鹏. C₃₀-HPLC-PDA 分离与鉴定 β , β -胡萝卜素几何异构体[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 252-255.
- [2] LAUCHLIN R G, BUNKE G M, EADS C D, et al. Preparation and physical characterization of pure β -carotene[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2002, 115: 63-76.
- [3] STERLING C. Crystal-structure analysis of β -carotene[J]. Acta Cryst, 1964, 17: 1224-1228.
- [4] CHER H E, PENG H Y, CEN B H. Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice[J]. Food Chem, 1996, 57: 497-503.
- [5] TSUKIDA K, SAIKI K, TAKII T, et al. Separation and determination of cis/trans- β -carotenes by high-performance liquid chromatography[J]. Chromatogr, 1982, 245: 359-364.
- [6] CHEN B H, CHEN Y Y. Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking[J]. Agric Food Chem, 1993, 41: 1315-1320.
- [7] 廖萍泰, 惠伯棣, 裴凌鹏, 等. 叶黄素的体外抗氧化功能[J]. 食品与发酵工业, 2005(4): 46-49.
- [8] MURTHY K N C, VANITHA A, RAJEESHA J, et al. *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* - a green microalga [J]. Life Sciences, 2005, 76: 1381-1390.
- [9] BUTZ P, FERMANDEZ-GARCIA A, LINDAUER R, et al. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products [J]. Journal of Food Engineering, 2003, 56 (2/3): 233-236.
- [10] LAMBERT Y, DEMAZEAU G, LARGETEAU A, et al. Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment [J]. Food Chemistry, 1999, 67:7-16.
- [11] QIU W F, JIANG H H, WANG H F. Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability [J]. Food Chemistry, 2006, 97: 516-523.
- [12] YEUNG J C Y, CHASSE G A, FRONDOZO E J, et al. Cationic intermediates in trans- to cis-isomerization reactions of allylic systems. An exploratory *ab initio* study[J]. Journal of Molecular Structure (Theochem), 2001, 546: 143-162.
- [13] 惠伯棣, 李京, 孙拿拿. 番茄和胡萝卜中类胡萝卜素的 C₃₀ 与 C₁₈HPLC 分离[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(4): 289-292.
- [14] 仇丹, 陈志荣, 李浩然. β -胡萝卜素异构体的定性分析[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 50-55.
- [15] CHEN B H, CHEN J M, CHIEN J T. Kinetic model for studying the isomerization of α - and β -carotene during heating and illumination[J]. Agric Food Chem, 1994, 42: 2391-1397.
- [16] EMENHISER C, SANDER L C, SCHWARTZ S J. Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed phase liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 1995, 707: 205-216.
- [17] LIN C H, CHEN B H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1012: 103-109.
- [18] HU C C, LIN J T, LU F J, et al. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract[J]. Food Chemistry, 2008, 109: 439-446.