

文章编号:1007-7383(2011)04-0442-06

不同色泽番茄品种类胡萝卜素含量的 HPLC 分析

王蕾,岳英,鲁晓燕,马兵钢

(石河子大学农学院园艺系,石河子 832003)

摘要:以成熟果为红色、紫红色、枣红色、棕色、黄色、青绿色的 6 个番茄品种为试材,采用高效液相色谱外标法对果实成熟过程中绿熟期、发白期、显色期、转色期、红熟期的番茄红素、叶黄素、 β -胡萝卜素含量进行测定。结果表明:在番茄果实成熟过程中,不同番茄果实番茄红素、叶黄素、 β -胡萝卜素含量不同。红果番茄番茄红素含量最高,绿果、黄果番茄基本不含番茄红素。而绿果、黄果番茄的叶黄素、 β -胡萝卜素明显高于其它颜色的番茄。番茄红素在绿熟期、发白期基本上没有形成,转色期是番茄红素形成的一个过渡期,在成熟期含量达到了最高。叶黄素、 β -胡萝卜素含量在绿熟期都有少量生成,发白期略微下降,转色期开始上升,成熟期含量达到最高。

关键词:番茄果实;胡萝卜素;番茄红素;叶黄素; β -胡萝卜素;高效液相色谱

中图分类号:S641.2

文献标识码:A

Carotenoid Contents in Different Coloured Tomato Varieties By HPLC

WANG Lei, YUE Ying, LU Xiaoyan, MA Binggang

(Agricultural College, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: With red, purple, purplish red, brown, yellow, green tomatoes as test material, the dynamic changes of lycopene, β -carotene and xanthin contents during the fruit ripening course were determined by HPLC external standard method. The results show that the lycopene, β -carotene and xanthin content were different in different types during the development of tomato fruit. Lycopene contents in red color fruit was highest among the other five tested varieties, while the content of yellow color fruit was significantly lower than others. β -carotene and xanthin contents in yellow and green color fruit was higher than the other color fruit. In the ripening development of tomato fruit, the lycopene content was increased gradually. The development period from half-ripe to full-ripe is the key stage for lycopene synthesis. The β -carotene and xanthin contents were decreased firstly and then increased, and the three carotenoids content achieved the highest when the completely ripe fruit.

Key words: tomato; carotenoid; lycopene; xanthin; β -carotene; HPLC

类胡萝卜素大量存在于许多黄色、橙色和红色果实及花器官中。其含量和组成决定果实外观品种和花卉的观赏价值^[1],而且在猝灭自由基^[2]、防癌抗癌^[3]、增强人体免疫力^[4]、保护心血管疾病和抗老化^[5]等保护人类健康方面起着重要的作用。植物类胡萝卜素包括叶黄素(胡萝卜的氧化衍生物)和胡萝卜素(碳氢化合物)两大类。研究表明,类胡萝卜素的积累使植物的果实(如番茄^[6])、根(如胡萝卜^[7])、花(万寿菊^[8])和叶呈现多彩的颜色,使之具有较大的经济价值。番茄是世界范围普遍栽培的重要蔬菜作

物,其营养丰富,味道鲜美,深受人们的喜爱。番茄果实中的类胡萝卜素主要包括番茄红素、叶黄素和胡萝卜素。由于其所含类胡萝卜素种类少,在成熟阶段色泽变化明显,且拥有大量不同果实颜色的突变体,因而成为研究植物类胡萝卜素代谢途径的模式植物^[9]。国外对番茄类胡萝卜素尤其是番茄红素的研究较早。Fraser 等^[10]研究表明,在番茄果实成熟过程中,叶绿体转化为有色体,类胡萝卜素上升 10~14 倍,这主要是番茄红素含量增加了 500 多倍的结果。Ronen 等^[11]和 Pecker 等^[12]检测工番茄果

收稿日期:2011-01-03

基金项目:国家自然科学基金项目(30460081),新疆兵团博士资金项目(ZD2007JC06)

作者简介:王蕾(1986-),女,硕士生,研究方向为园艺植物分子育种;e-mail:wangleiguoshu008@sina.com.

通讯作者:马兵钢(1972-),男,教授,博士,从事园艺植物分子育种研究;e-mail:binggang@hotmail.com.

实发育过程中相关基因在转录水平的变化,得出番茄果实中类胡萝卜素的积累主要是相关基因在转录水平上差异表达的结果。曲瑞芳等^[13]对番茄和樱桃番茄果实发育成熟过程中的番茄红素含量变化进行了研究,指出番茄红素含量随果实发育逐渐增加。

虽然国内外关于番茄果实类胡萝卜素组份及含量分析有不少报道,但有关各个色泽的番茄果实在成熟发育过程中类胡萝卜素组份和含量变化的报道甚少,而且测定方法主要是紫外分光光度法。本研究以高效液相色谱的方法测定番茄果实成熟过程中的番茄红素、 β -胡萝卜素和叶黄素含量,分析其果实成熟发育过程中类胡萝卜素组分和含量的变化,旨在了解番茄果实成熟过程中类胡萝卜素的变化特点,研究番茄果实成熟过程中类胡萝卜素代谢规律。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的6个不同色泽的番茄品种分别购自北京金土地农业技术研究所、北京绿东方农业技术研究所。根据果实成熟后颜色分成6种类型。I类:圣女杂交一代(成熟果为红色);II类:紫水晶 F_1 (成熟果为枣红色);III类:鬼脸欢欢(紫红色);IV类:棕圣果(成熟果为棕色);V类:彩脸金金(成熟果为黄色);VI类:绿脸迎迎(成熟果为青绿色)。供试材料于2010年4月播种,5月17日定植于石河子大学农学院试验站大田中。管理和大田栽培相同。

番茄红素、叶黄素、 β -胡萝卜素标准品购自Sigma公司(Sigma-Aldrich, L9879、C9750、X6250),纯度>95%;石油醚、甲醇、甲苯(天津化学分析纯试剂);甲醇、乙腈、二氯甲烷、异丙醇购自Honeywell Burdick&Jackson公司;水为蒸馏水经纯水装置(Heal-Force)进行去离子处理,比阻抗达18兆欧以上。

1.2 方法

1.2.1 材料的选择

取样分5个时期:1)绿熟期。绿色,坚实,不宜食用;2)发白期。外观开始由绿色变白;3)显色期。果实顶端转色达全果的10%;4)转色期。果实转色达全果的30%~60%;5)红熟期。果实呈现品种的特有色泽,适于生食。各成熟时期均选取10个果实并对不同部位进行采样,3次重复,7月下旬进入绿熟期开始测定各色番茄在果实成熟过程中的番茄红素、 β -胡萝卜素和叶黄素的含量。

1.2.2 番茄类胡萝卜素的提取

取采集100~150g的果实切成小块放入捣碎机

中捣碎,收集果实匀浆。番茄红素提取采用李敏^[14]的方法并略作改动。称取匀浆的果实0.5g,加入少量的石英砂,5mL的甲醇,放入洗净的研钵,研磨充分后过滤,剩余的残渣再加入甲醇,重复加入甲醇,直至滤液无色,弃去滤液,用甲苯分数次提取番茄红素,直至滤液无色为止。滤液移入棕色容量瓶中,用甲苯定容。叶黄素、 β -胡萝卜素的提取采用刘国道等^[15]的超生波辅取法提取叶黄素、 β -胡萝卜素。取匀浆的果实0.5g,15mL石油醚,35℃下超声波萃取30min,过滤。将提取液经滤膜过滤后,外标法进行HPLC分析,全部操作在避光下进行。

1.2.3 标准曲线制备

分别准确称取2mg番茄红素标准品、叶黄素、 β -胡萝卜素标准品,用少量三氯甲烷溶解,转移至100mL棕色容量瓶中,番茄红素标准品用甲苯定容至100mL,叶黄素、 β -胡萝卜素标准品用石油醚定容至100mL,配制成200 μ g/mL的标准液。番茄红素用甲苯,叶黄素、 β -胡萝卜素用石油醚分别等比稀释为以下6个浓度:200、100、75、50、25、10 μ g/mL,滤膜过滤后,进行HPLC分析。每浓度重复进样3次,记录各标样的峰面积、保留时间,计算标准曲线方程和相关系数。

1.2.4 类胡萝卜素的 HPLC 分析

分别取2mL定容后的标样液或样品液于液相色谱样品瓶中,按顺序放入自动进样器内。高效液相色谱仪(美国Agilent公司)包括四元梯度泵、VWD检测器、标准型自动进样器。色谱柱柱型:反相C18(150mm \times 4.6mm)5 μ m(澳大利亚SGE公司)。进样法:自动进样器,10 μ L;

叶黄素、 β -胡萝卜素检测条件:1)流动相。乙腈:二氯甲烷:异丙醇8:1:1;2)柱温。30℃;3)流速。1mL/min;4)检测器。VWD,450nm。

番茄红素检测条件:1)流动相。甲醇:乙腈:二氯甲烷二7:7:2;2)柱温:30℃;3)流速:1mL/min;4)检测器:VWD,472nm。参照马超等^[16]的方法并略有改进,采用外标法测定各类胡萝卜素含量。

2 结果与分析

2.1 番茄类胡萝卜素的测定结果

被分离物质在高效液相色谱上依据保留时间定性。番茄红素标样在本实验中保留时间为12.211~12.913min,叶黄素为2.817~2.853min, β -胡萝卜素为17.319~18.017min。图1为6个不同色泽的番茄在红熟期时的番茄红素HPLC色谱图,其中

V、VI的色谱图,峰面积相比另4种非常小,可以看出黄果和绿果的番茄番茄红素含量低。图2为6个

不同色泽番茄在红熟期时的β-胡萝卜素、叶黄素的HPLC色谱图。

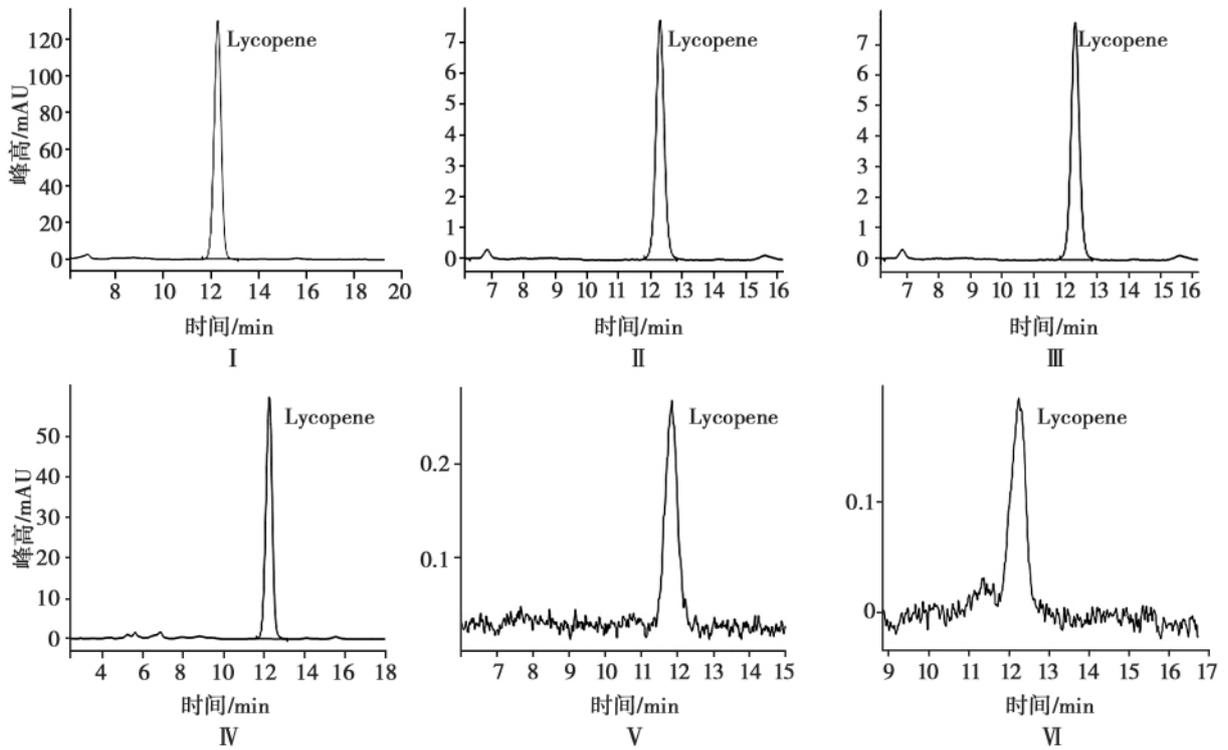


图1 不同色泽番茄红熟期时番茄红素样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of lycopene sample in tomato fruit at full-ripe stage

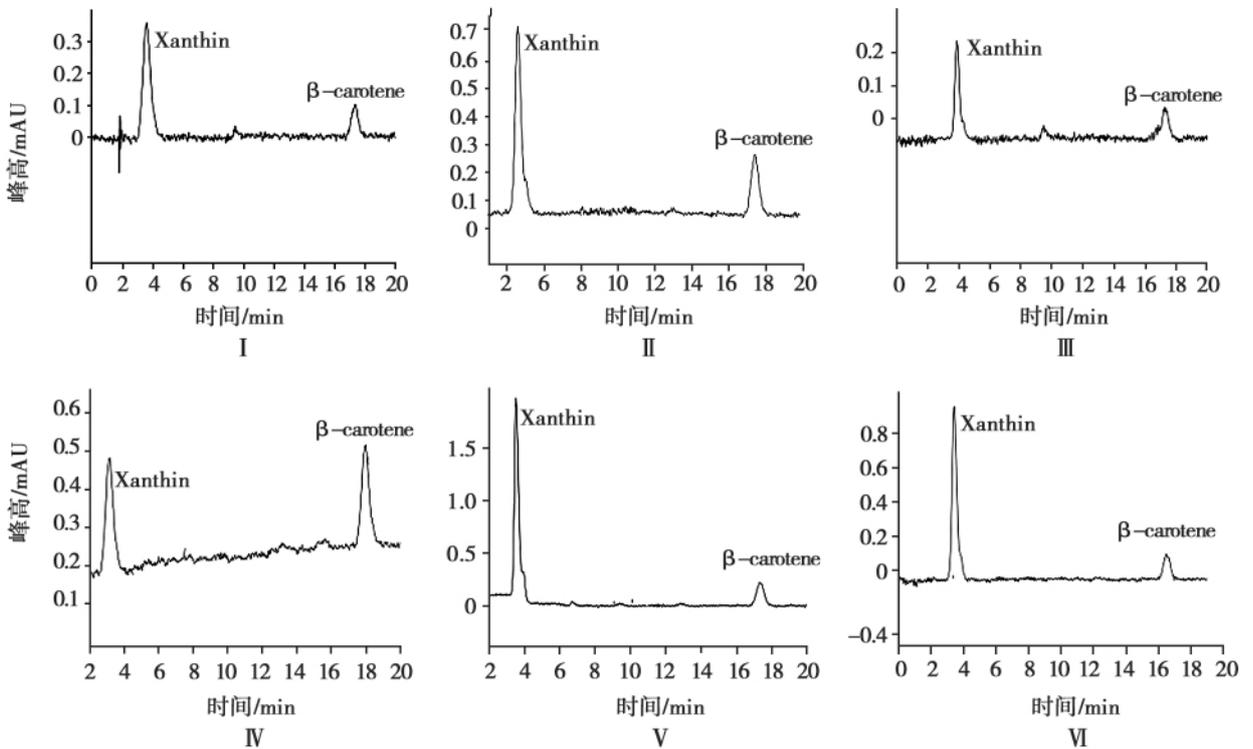


图2 不同色泽番茄红熟期时叶黄素、β-胡萝卜素样品色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Lutein and β-Carotene sample in tomato at the full-ripe stage

2.2 果实成熟过程中主要色素含量的变化动态分析

2.2.1 果实成熟过程中番茄红素含量的动态变化

由表1可知,6个不同颜色番茄在成熟过程中的番茄红素变化规律相似。随着果实的成熟,从发白期到转色期,番茄红素均略有增加,但随着番茄的成熟,从转色期到红熟期,番茄红素含量均迅速上升,达到成熟过程中的最大值。各品种由绿熟期向转色期的发育过程中番茄红素含量变化不显著,这说明绿熟期向转色期的发育过程中番茄红素合成很少,增长缓慢。这一时期果实色素仍以叶绿素和其他类胡萝卜素为主。

红熟期与绿熟期、发白期、显色期、转色期差异显著($P < 0.05$),与绿熟期、发白期、显色期差异极显著($P < 0.01$),与转色期未达到极显著水平。这说明转色期是番茄红素的一个过渡期,番茄红素在红熟期成为主要色素。

整个果实成熟过程中,绿脸迎迎、彩脸金金变化不大,番茄红素含量均低于其它几个品种。其中,圣女杂交一代变化量最大,红熟期番茄红素含量为转色期的6.529倍,棕圣果4.958倍,鬼脸欢欢1.998倍,绿脸迎迎1.233倍,彩脸金金1.1733。成熟期番茄红素含量依次为圣女杂交一代>棕圣果>鬼脸欢欢>紫水晶F₁>彩脸金金>绿脸迎迎。从外观上看,含量较低的绿脸迎迎、彩脸金金成熟之后为青绿色、黄色,而含量最高的2个品种圣女杂交一代,成熟之后均为红色。这说明,果实番茄红素含量与果实颜色有关系,果实越红,番茄红素含量越高,而绿果、黄果番茄基本上不含有番茄红素。

表1 不同发育时期番茄果实中番茄红素含量变化

Tab. 1 Changes of Lycopene content in tomato fruits at different stages

品种	果实发育时期番茄红素含量/(mg/100 g FW)				
	绿熟期	发白期	显色期	转色期	红熟期
圣女杂交一代	0.328	0.421	3.139	3.357	21.920
棕圣果	0.195	0.196	0.227	1.996	12.967
鬼脸欢欢	0.197	0.235	0.854	5.369	10.725
绿脸迎迎	0.138	0.155	0.177	0.205	0.299
紫水晶 F ₁	0.227	0.267	1.579	2.772	3.147
彩脸金金	0.151	0.159	0.126	0.169	0.369
均值	0.206 ^{bb}	0.239 ^{bb}	1.017 ^{bb}	2.311 ^{bAB}	8.238 ^{aA}

注:a表示5%显著水平,A表示1%显著水平。

2.2.2 果实成熟过程中β-胡萝卜素含量的动态变化

由表2可以看出,β-胡萝卜素在绿熟期即有少量生成,进入发白期,含量略有下降,随着果实的成熟,β-胡萝卜素含量又有所回升,在成熟期含量达到最高。绿熟期向显色期的发育过程中β-胡萝卜素含量变化不显著;红熟期的含量与绿熟期、发白期、显色期的差异极显著($P < 0.01$),与转色期差异显著($P < 0.05$)。这说明在绿熟期向转色期的发育过程中β-胡萝卜素合成很少,而转色期也是β-胡萝卜素合成的一个过渡期。

6种色泽的番茄果中,黄果番茄彩脸金金β-胡萝卜素含量均比其它颜色的番茄含量高。成熟期β-胡萝卜素含量依次为彩脸金金>绿脸迎迎>紫水晶F₁>棕圣果>圣女杂交一代>鬼脸欢欢。彩脸金金的β-胡萝卜素分别为绿脸迎迎的1.23倍,紫水晶F₁的1.79倍,棕圣果的2.03倍,圣女杂交一代的2.19倍,鬼脸欢欢的2.65倍。

表2 不同发育时期番茄果实中β-胡萝卜素含量变化

Tab. 2 Changes of β-carotene content in tomato fruits at different stages

品种	果实发育时期β-胡萝卜素含量/(mg/100 g FW)				
	绿熟期	发白期	显色期	转色期	红熟期
圣女杂交一代	0.095	0.060	0.136	0.138	0.168
棕圣果	0.075	0.071	0.089	0.114	0.181
鬼脸欢欢	0.074	0.054	0.083	0.128	0.139
绿脸迎迎	0.155	0.138	0.177	0.205	0.299
紫水晶 F ₁	0.114	0.069	0.070	0.116	0.206
彩脸金金	0.159	0.126	0.152	0.170	0.369
均值	0.206 ^{bb}	0.239 ^{bb}	1.017 ^{bb}	2.311 ^{bAB}	8.238 ^{aA}

注:a表示5%显著水平,A表示1%显著水平。

2.2.3 果实成熟过程中叶黄素含量的动态变化

由表3可知,叶黄素在果实的整个发育过程中进入发白期,含量也是略有下降,显色期含量持续下降,转色期开始上升,在成熟期含量也是达到了最高。叶黄素含量在红熟期达到最大值0.146 mg/100 g FW。5个时期的叶黄素含量有明显的显著性,在叶黄素含量的低点和最高点达到了显著水平,而转色期为叶黄素含量增加的转折点,与其他时期均不显著($P < 0.05$)。各个时期均表现为极不显著($P < 0.01$)。这说明转色期向红熟期的发育阶段是叶黄素合成的关键时期。

从最终的含量来看,黄果彩脸金金的叶黄素含量明显高于其它 5 种色泽的番茄,而这 5 种色泽的番茄叶黄素含量间差异不大。

表 3 不同发育时期番茄果实中叶黄素含量变化

Tab. 3 Changes of Xanthin content in tomato fruits at different stages

品种	果实发育时期叶黄素含量/(mg/100 g FW)				
	绿熟期	发白期	显色期	转色期	红熟期
圣女杂交一代	0.123	0.113	0.110	0.131	0.140
棕圣果	0.148	0.135	0.140	0.142	0.142
鬼脸欢欢	0.122	0.102	0.095	0.120	0.142
绿脸迎迎	0.143	0.133	0.134	0.143	0.143
紫水晶 F ₁	0.138	0.131	0.137	0.139	0.141
彩脸金金	0.149	0.140	0.121	0.133	0.166
均值	0.137 ^{abA}	0.126 ^{ba}	0.123 ^{ba}	0.135 ^{abA}	0.146 ^{aA}

注:a 表示 5% 显著水平,A 表示 1% 显著水平。

2.2.4 类胡萝卜素总量成熟过程中的动态变化

果实在刚开始的绿熟期、发白期,类胡萝卜素总量均无变化,各个品种间含量差别也不大。进入显色期,各个品种类胡萝卜素总量一直处于上升趋势,在红熟期达到高峰,品种间的差别也加大。类胡萝卜素总量最大的为圣女杂交一代,其类胡萝卜素总量为彩脸金金、绿脸迎迎类胡萝卜素总量的 20 倍以上(图 3)。其变化趋势和番茄红素的基本一致,由此可见,番茄红素是番茄果实中的主要类胡萝卜素。

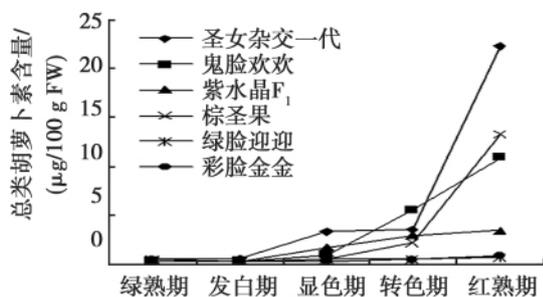


图 3 不同番茄在果实成熟过程中类胡萝卜素总量的变化
Fig. 3 Changes of total carotenoid content in different tomato during ripening

3 讨论

番茄番茄红素含量的检测时所得检测值往往大于真实值。其原因是番茄及其制品中除番茄红素外还含有其它类胡萝卜素,如 β -胡萝卜素。这些类胡萝卜素在检测波长下有一定的光吸收,这导致检测值偏高,影响测定结果。因此,本实验在测定番茄红素时,首先将番茄及萃取物中番茄红素与其它类胡萝卜素分离,排除其干扰,再用 HPLC 对番茄红素

含量进行检测。

许多植物花和果的颜色与其积累的叶绿素、类胡萝卜素、花青苷、类黄酮种类及含量有关。戴雄泽等^[17]研究了不同颜色辣椒果实发育过程中类胡萝卜素种类和含量的变化规律,不同颜色辣椒果实中类胡萝卜素合成途径不同。青果期为绿色、成熟期为红色的品种为选育高辣椒红素的理想材料。熊作明等^[18]研究了不同类型枇杷着色期间类胡萝卜素含量的变化,指出胡萝卜素积累,尤其是 β -胡萝卜素含量的高低是影响枇杷果肉色泽深浅的主要原因。

番茄因其在成熟阶段色泽变化明显,所含类胡萝卜素种类较少,因而已经成为研究植物类胡萝卜素发育的模式植物。本实验测定不同颜色(红色、紫红色、枣红色、棕色、黄色、青绿色)番茄果实发育过程中番茄红素、叶黄素、 β -胡萝卜素含量,发现红果番茄番茄红素含量最高,绿果、黄果番茄基本不含番茄红素。曾有报道^[10,13]也得出与本实验一致的结论:番茄的番茄红素含量与果实颜色有关,果实越红,番茄红素含量越高。而绿果、黄果番茄的叶黄素、 β -胡萝卜素明显高于其它颜色的番茄。从番茄果实发育的各个过程来看,番茄红素在绿熟期、发白期基本未形成,转色期是番茄红素形成的一个过渡期,在成熟期含量达到了最高。叶黄素、 β -胡萝卜素在绿熟期均有少量生成,发白期略微下降,转色期开始上升,成熟期含量达到最高。

番茄果实成熟过程中,番茄红素的积累受果实发育过程中一系列类胡萝卜素合成基因的表达水平调控^[19]。李京等^[20]的研究结果表明,在果实成熟过程中,控制八氢番茄红素脱氢酶的基因 *Pds* 和控制八氢番茄红素合成酶的基因 *Psy-1* 非常活跃,其 mRNA 水平显著增加。而番茄红素向下游产物 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素的番茄红素环化酶基因 *Lcy- β* 和 *Lcy- ϵ* 的 mRNA 水平下降,并逐渐消失。这些变化表明,不同番茄果实中番茄红素、叶黄素、 β -胡萝卜素的积累与果实发育过程中类胡萝卜素合成酶相关基因的表达调控有很大关系,但调控机制尚不明确,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐昌杰,张上隆. 柑橘类胡萝卜素合成关键基因研究进展[J]. 园艺学报, 2002, 29(增刊): 619-623.
- [2] 马天贵. 番茄红素生理功能及其应用[J]. 粮食与油脂, 2008(1): 46-48.
- [3] 朱秀灵,车振明,徐伟,等. β -胡萝卜素的生理功能及其提取技术的研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20

- (2):158-162.
- [4] 朱海霞,郑建仙. 叶黄素(Lutein)的结构、分布、物化性质及生理功能[J]. 中国食品添加剂,2005(5):48-455.
- [5] Yon Lintig J, Wyss A. Molecular analysis of vitamin A formation; cloning and characterization of beta-carotene 15,15' dioxygenases[J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 385(1):47-52.
- [6] Bramley P M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development[J]. Journal of Experimental Botany,2002,53:2107-2113.
- [7] 梁燕,茄红素代谢的基因调控及其影响因子研究[D]. 陕西:西北农林科技大学,2002:40-96.
- [8] Moehs C P, Tian L, Osteryoung K W, et al. Analysis of carotenoids biosynthetic gene expression during marigold petal development[J]. Plant Molecular Biology,2001,45:281-293.
- [9] 杨美英,贺红霞,王艳,等. 番茄茄红素 β -环化酶基因高效沉默载体构建[J]. 分子植物育种,2007,5(1):43-46.
- [10] Fraser P D, Truesdale M R, Bird C R, et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression)[J]. Plant Physiology,1994,105(1):405-413.
- [11] Ronen G, Carmel Goren L, Zamir D, et al. An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutation in tomato[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(20):11102-11107.
- [12] Pecker I, Gabbay R, Cunningham F X Jr, et al. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening[J]. Plant Mol Biol,1996,30(4):807-819.
- [13] 曲瑞芳,梁燕,巩振辉,等. 番茄不同品种间番茄红素含量变化规律的研究[J]. 西北农业学报,2006,15(3):121-123.
- [14] 李敏. 番茄红素提取及纯化的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2007:25-41.
- [15] 刘国道,王东劲,侯冠彧,等. 海南热带植物叶黄素和 β -胡萝卜素含量分析[J]. 草地学报,2006,14(2):134-137.
- [16] 马超,马兵钢,郝青南. 番茄红素 β -环化酶基因(*Lyc- β*) RNAi 载体构建及表达鉴定[J]. 农业生物技术学报,2010,18(1):10-17.
- [17] 戴雄泽,王利群,陈文超,等. 辣椒果实发育过程中果色与类胡萝卜素的变化[J]. 中国农业科学,2009,42(11):4004-4011.
- [18] 熊作明,周春华,陶俊. 不同类型枇杷果实着色期间果肉类胡萝卜素含量的变化[J]. 中国农业科学,2007,40(12):2910-2914.
- [19] 陶俊,张上隆. 园艺植物类胡萝卜素的代谢及其调节[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2003,29(5):585-590.
- [20] 李京,惠伯棣,裴凌鹏. 番茄果实在成熟过程中类胡萝卜素含量的变化[J]. 中国食品学报,2006,6(2):123-125.