

番茄红素快速测定方法的研究

刘仲齐, 薛俊, 金凤媚, 郑艳红

(天津市农业生物技术研究中心, 天津 300384)

摘要: 以番茄红素含量不同的 58 个基因型为材料, 对 CR400 型色差计的快速测定值与番茄红素含量之间的相关性进行了研究。结果表明, 以果实为样品测定的 $L1, a1, b1$ 值在基因型间呈随机分布, 番茄红素含量与以果浆为样品测定的 $L2$ 和 $b2$ 值呈负相关, 与 $a2$ 值呈极显著正相关。以去除自由水后的果酱为样品测定的 $L3, a3, b3$ 值更加稳定, 它们与番茄红素含量的相关性更加密切。自由水含量对色差计的读数影响较大, 在自由水含量适中 (71.11% ~ 76.20%) 的基因型中, 番茄红素含量与 $(a3/b3 + a3/L3)$ 的相关系数高达 0.808 **, 此时用线性回归方程能够比较准确地根据色差计的读数估测果实中番茄红素的含量。

关键词: 番茄; 番茄红素; 测定方法

中图分类号: S641.201 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)02-0013-05

Study on Method for Fast Measuring Lycopene Content in Tomato

LIU Zhong-qi, XUE Jun, JIN Feng-mei, JIA Yan-hong

(Tianjin Research Center of Agricultural Bio-technology, Tianjin 300384, China)

Abstract: Fifty-eight tomato genotypes with different lycopene content were used to study the relationship between their lycopene content and color readings of CR400. Experimental results showed that $L1, a1$ and $b1$ from fruits were randomly distributed among genotypes. But lycopene content was negatively correlated with $L2$ and $b2$ of fruit puree respectively and positively correlated with $a2$. After free water in fruit puree was discarded by centrifugation, readings of $L3, a3$ and $b3$ from these pastes were more stable and displayed a more precise linear relationship to lycopene content. Free water imposed a significant effect on color readings. Among genotypes with free water content between 71.11% and 76.20%, the correlation coefficient between lycopene content and $(a3/b3 + a3/L3)$ was as high as 0.808 **. Therefore, linear regression equation could be used to predict lycopene content of fruits based on their color readings from paste without free water.

Key words: Tomato; Lycopene; Measure method

番茄红素是决定番茄外观品质和营养品质的重要因素, 是加工番茄品种改良过程中最受重视的经济性状。在番茄果实成熟过程中, 大量的叶绿素逐渐转变为番茄红素和其他类胡萝卜素 (如胡萝卜素、叶黄素等)。番茄红素在类胡萝卜素中所占的比例既与番茄果实的成熟度有关^[1,2], 又与番茄品种的遗传背景有关^[3~5]。CR400 型色差计是根据各种类胡萝卜素的光吸收特性而设计的, 利用该色差计测得的 L, a, b 值成为许多实验室估测番茄样品中番茄

红素含量的依据, 并被直接用来进行 QTL 定位^[6]。但这些读数是否能够灵敏地检测不同基因型间番茄红素含量的真实差异, 迄今没有见到相关的报道。为了确定色差计在番茄优质育种中的应用价值, 本研究选择了一批番茄红素含量差异较大的基因型, 对番茄红素快速测定方法的有效性进行了检验。

1 材料和方法

2005 年 2 月, 58 个供试番茄品系于温室中育

收稿日期: 2005-10-09

基金项目: 天津市应用基础重点项目 (033803611)

作者简介: 刘仲齐 (1964-), 男, 甘肃清水人, 研究员, 博士, 主要从事番茄分子育种研究工作。

苗, 4月28日大部分植株长到4~5叶时定植, 株距30 cm, 行距60 cm。除少数自封顶类型外, 其他植株全部人工打顶, 每株只保留3簇果。进入成熟期后, 从每个品系的4个单株上分别收获4~6个达到生理成熟(90%变红)的果实, 测定硬度, 放置1 d后, 绝大部分品系的果实完全变红, 进入红熟期。分别按株用搅拌器打碎, 装入事先称过的50 mL离心管中称总质量, 9 000 r/min离心15 min, 轻轻倒出上清液后称量。两次质量之差即为番茄中自由水的含量, 以下简称含水量。离心管中的干物质即为番茄中的含酱量, 然后用化学方法测其番茄红素的含量。

用日本美能达公司生产的CR400型色差计, 直接测定红熟期番茄果实的L, a, b值, 每个果实测定4次取其平均值, 分别记作L1, a1和b1。搅拌器打成果浆后, 用小勺舀取大约30 g的样品, 放置在粉末测试盒中, 测定L, a, b值, 分别记作L2, a2和b2。用同果浆的方法测定离心后果酱的L, a, b值, 分别记作L3, a3和b3。

化学方法测定番茄红素的程序如下: 称取离心后的番茄酱1 g, 置研钵中研磨, 然后加入5 mL甲醇再研磨后, 倒入带滤纸的漏斗中, 不断地用甲醇洗脱直至滤液无色为止, 甲醇洗脱液的总量大约为80

mL。用电风扇吹干滤渣(约2 h), 用小刀刮下放入研钵中, 加入苯5 mL, 一起研磨1~2 min后过滤, 取滤渣加入5 mL苯于研钵中, 继续研磨过滤。如此洗脱2~6次, 直至滤渣无色为止。接着用苯继续洗脱滤纸上的残渣, 直至洗脱液接近50 mL, 用苯定溶至50 mL, 摇匀。取上述苯溶液5 mL, 加苯定溶至20 mL, 摇匀, 于487 nm下测OD(光密度)值。

番茄果实番茄红素含量 $ly = (200(OD_{487} + 0.054)/(0.301 \cdot m)) \cdot (1 - W)$

其中, m为番茄酱的质量(g); W为自由水含量(%)。

2 结果与分析

2.1 色差计读数与番茄红素含量的关系

色差计的3个读数分别具有不同的功能。L值反映颜色的明亮程度, a值主要反映红色或绿色物质的含量, b值主要反映黄色或蓝色物质的含量。对58个基因型3类样品的测试结果表明, 均质化的番茄浆和离心脱水后的番茄酱的L和b值都表现出与番茄红素含量负相关的趋势, 尤其是在番茄红素含量较低的基因型中, 这种负相关趋势非常明显(图1)。但完整果实的L和b值呈随机分布状态, 而且

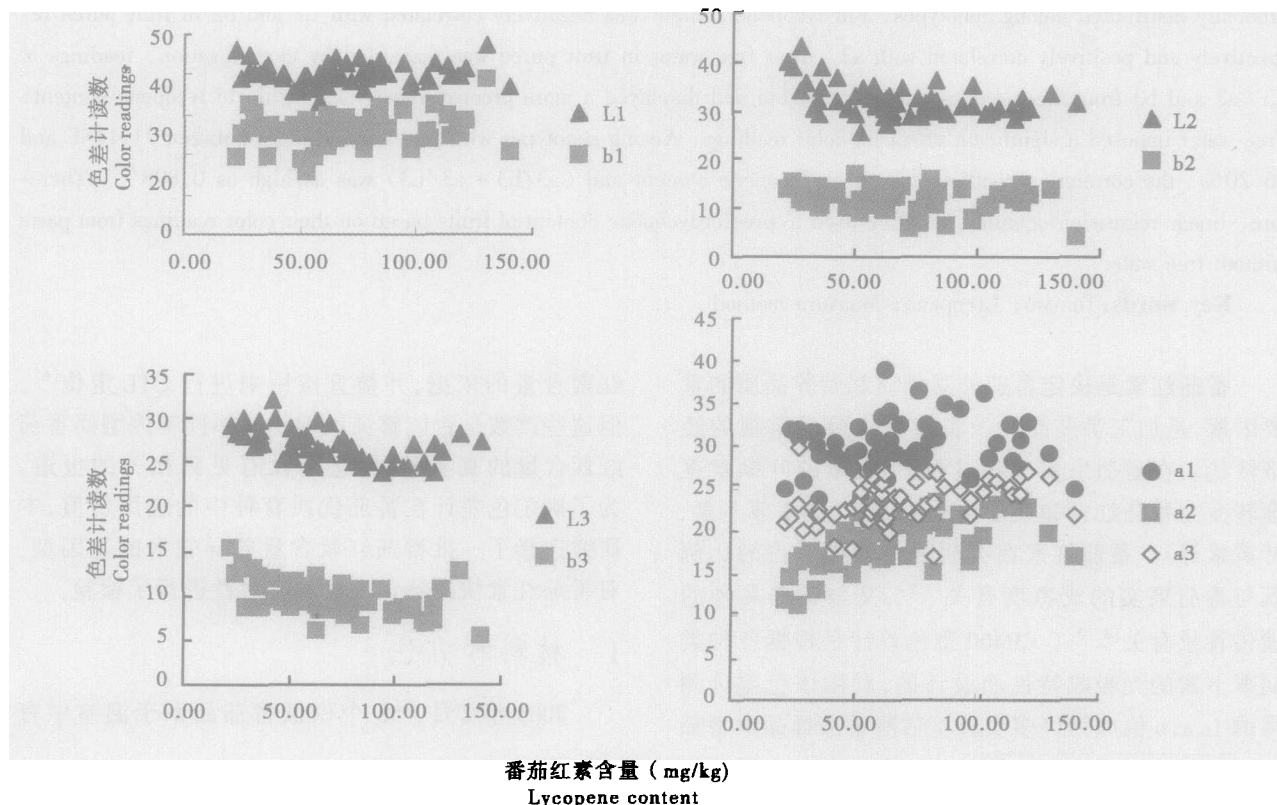


图1 色差计读数与番茄红素含量的关系

Fig.1 Relationship between color readings and lycopene content

数值比对应的 L2 和 L3, b2 和 b3 都大得多。这可能是因为完整的果实反射光比较强, 而且受到周围散射光源的影响, 因此读数较高。而果酱放在测试盒中测定时, 可以排除其他光源的干扰, 所以测定值偏低。比较果浆和果酱的读数值, 发现 b2 略大于 b3 的读数, 但 a2 明显地低于 a3, L2 却明显地高于 L3。这可能是因为果浆中自由水对反射光谱产生了干扰。

果实的番茄红素含量(ly)与果实的 3 个读数值都没有显著的线性相关, 但与 L2 和 L3 极显著负相关, 与 a2 和 a3 极显著正相关, 与 b3 极显著负相关, 与 b2 的负相关没有达到 5% 的显著水平(表 1)。这说明番茄果实打碎后用色差计测定的读数, 能比较客观地反映番茄红素的含量。即使如此, 根据 L, a,

b 的绝对值还是难以准确的判断番茄红素的含量。例如, 本试验中番茄红素含量最高的品系 171-10-1, 它的 b3 是最小的, 但 L3 却高于平均值, a3 只是比平均值略高而已。

L1 与 b1 和 a1 分别呈极显著正相关, b1 和 a1 间也极显著正相关, 这与色差计的设计理念不符。说明在自然条件下直接测定果实的反射光, 不能真实地反映果实内部色素物质的含量。L2 和 a2, L3 和 a3 都呈极显著负相关, L2 和 b2, L3 和 b3 的正相关分别达显著和极显著水平, a2 和 b2, a3 和 b3 都没有显著的相关性。说明以打碎后的番茄浆和离心脱水后的番茄酱为样品, 色差计能够区分不同的反射光谱, 读数值能够反映果浆中色素物质的含量。

表 1 色差计读数值与番茄红素含量的相关性(n = 58)

Tab.1 Correlation coefficients between color readings from different samples and lycopene content									
	ly	L1	a1	b1	L2	a2	b2	L3	a3
L1	0.023								
a1	0.113	0.393 **							
b1	0.170	0.580 **	0.475 **						
L2	- 0.398 **	0.245	- 0.312 *	- 0.045					
a2	0.565 **	- 0.014	0.298 "	0.257 *	- 0.635 **				
b2	- 0.246	0.328 **	0.053	0.263 *	0.295 *	0.110			
L3	- 0.519 **	0.166	- 0.132	- 0.008	0.517 **	- 0.537 **	0.169		
a3	0.333 **	0.299 *	0.183	0.329 *	- 0.054	0.498 **	0.077	- 0.372 **	
b3	- 0.551 **	0.371 **	- 0.082	0.014	0.524 **	- 0.521 **	0.432 **	0.395 **	0.012

表 2 色差计读数转换值与番茄红素含量的线性相关系数(n = 58)

Tab.2 Correlation coefficients between converted color readings and lycopene content								
	ly	a2/b2	a2/b2 + a2/L2	a2/(b2 + L2)	(a2 ² + b2 ²) ^{1/2}	a3/b3	a3/b3 + a3/L3	a3/(b3 + L3)
a2/b2	0.527 **							
a2/b2 + a2/L2	0.582 **	0.982 **						
a2/(b2 + L2)	0.585 **	0.665 **	0.794 **					
(a2 ² + b2 ²) ^{1/2}	0.370 **	- 0.100	0.076	0.598 **				
a3/b3	0.668 **	0.635 **	0.699 **	0.709 **	0.372 **			
a3/b3 + a3/L3	0.686 **	0.606 **	0.683 **	0.738 **	0.436 **	0.984 **		
a3/(b3 + L3)	0.608 **	0.406 **	0.507 **	0.690 **	0.549 **	0.754 **	0.858 **	
(a3 ² + b3 ²) ^{1/2}	0.142	- 0.104	- 0.049	0.135	0.348 **	0.103	0.255 *	0.631 **

2.2 色差计读数转换值与番茄红素含量的关系

根据色差计读数值和番茄红素含量的相关趋势以及前人的报道, 我们对 L, a, b 值进行了 4 种转换, 试图从中找到比较理想的线性相关性。L1, a1, b1 经过各种转换后, 依然和番茄红素含量没有显著的线性相关。但 L2, a2, b2 和 L3, a3, b3 经过转换后, 一些转换值与番茄红素含量的线性相关系数明显提高。最简单的转换是 a/b, 这种转换既体现了番茄红素与 a 的正相关性和与 b 的负相关性, 又体现了 2 种组分的相对数量, 结果表明, a2/b2, a3/b3 都与番

茄红素含量呈极显著正相关(表 2)。考虑到番茄红素含量与 L 的负相关性, 我们尝试了 a/b + a/L 和 a/(b + L) 2 种转换, 结果发现这 2 种转化值都与番茄红素含量呈极显著正相关。前人把 (a² + b²)^{1/2} 定义为色度值(Chroma)^[1], 但这种转换值与番茄红素含量的线性相关性并不密切, 只有 (a2² + b2²)^{1/2} 的值与番茄红素含量表现出极显著正相关。

从表 2 可以看出, 以 L3, a3 和 b3 为基数的转换值, 与番茄红素含量的相关系数最大。因此, 本文分别以 a3/b3 和 a3/b3 + a3/L3 为自变数, 以番茄红素

含量 ly 为依变数进行回归分析,建立线性回归方程如下:

$$ly = 6.94793 + 3.6329(a_3/b_3 - 2.46061)$$

$$(r = 0.668^{**})$$

$$ly = 6.94793 + 3.267728(a_3/b_3 + a_3/L_3 - 3.343809)$$

$$(r = 0.686^{**})$$

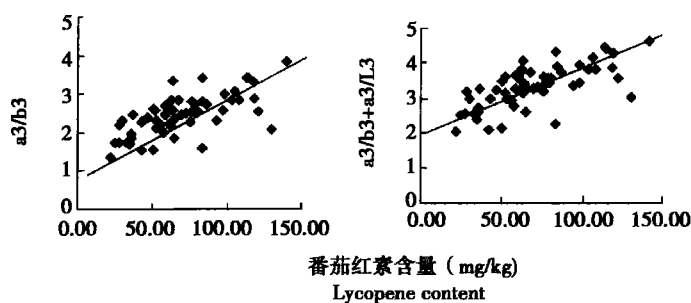


图2 色差计读数转换值与番茄红素含量的线性回归

Fig.2 Linear regression between converted color readings and lycopene content

在回归线的下方有 2 个远离回归线的点,它们是 7209-1 和 6446-10-1 的测定值。这 2 个基因型的与众不同主要表现在 b 值上。果浆离心后,绝大多数品系的 b_3 都比 b_2 小了 2~4 个数量级,但这 2 个品系的 b_2 和 b_3 非常接近,这可能与它们较低的自由水含量有关。多数品种的自由水含量在 73% 左右,但 7209-1 和 6446-10-1 的自由水含量分别为 67.92% 和 68.17%。其他水分以束缚态存在,低速离心难以去除,于是它们的 b_3 和 b_2 没有表现出明显的差别。由于它们的 b_3 下降较少,致使 a_3/b_3 的值明显低于群体平均值,成为远离回归线的 2 个散点(图 2)。在回归线的上方,6068-10-1 的测定值距回归线最远。究其原因也是受了 b 值的影响,果浆离心后的 b_3 值为 6.24,只有 b_2 的 2/3,但 a_3 和 a_2 没有明显的差别,分别为 20.96 和 21.07,所以 a_3/b_3 值明显上升,这可能与 6068-10-1 中自由水的含量(79.45%)太多有关。由此可见, b 值容易受含水量的影响。

为了分析自由水含量对读数值的影响,我们以 58 个基因型的平均含水量及其 1/2 的标准差为依据,把 58 个基因型分成 3 类,分别计算番茄红素含量与色差计读数值的线性相关系数。结果表明,在自由水含量较低的群体中,色差计的读数及其转换值与番茄红素含量没有显著的线性相关;在含水量较高的群体中,除 a_3 和番茄红素的正相关没有达到显著水平外,其他读数以及 3 种转换值都与番茄红素含量有显著或极显著的线性相关;自由水含量在 71.11%~76.20% 的基因型较多,它们的色差计读数及其转换值与番茄红素含量都呈显著的线性相关,特别是 $(a_3/b_3 + a_3/L_3)$ 与番茄红素含量的相关系数达到了 0.808^{**}, b_3 和番茄红素含量的相关系

数也有了明显的提高(表 3)。这说明在自由水含量相近的情况下,色差计的读数值经过转换后,能够与番茄红素含量建立起比较理想的线性回归关系, $ly = 7.707407 + 4.190726(a_3/b_3 + a_3/L_3 - 3.539118)$,番茄红素含量的定义域为 3.51~14.04 mg/kg。

表3 自由水含量不同的基因型群体中番茄红素含量与读数值的线性相关系数

Tab.3 Correlation coefficients between color readings from genotypes with different free water content and lycopene

	含水量(%) Water content		
	56.60 ~ 71.10	71.11 ~ 76.20	76.21 ~ 86.50
样本数 Sample No.	14	27	17
L3	-0.017	-0.442 [*]	-0.672 ^{**}
a_3	0.250	0.420 [*]	0.140
b_3	-0.089	-0.659 ^{**}	-0.628 ^{**}
a_3/b_3	0.320	0.787 ^{**}	0.643 ^{**}
$a_3/b_3 + a_3/L_3$	0.325	0.808 ^{**}	0.658 ^{**}
$a_3/(L_3 + b_3)$	0.282	0.663 ^{**}	0.588 [*]

3 讨论

CD400 型色差计携带方便,操作简便,具有数据贮存和保持样品原有特性的功能,所以,被国内外的许多实验室用来测定番茄果实和番茄酱中的番茄红素含量^[1,2,6,7]。Arias 等人根据不同的成熟度把番茄分成绿熟、黄熟、橘红、淡红、红、大红、软红 7 个时期,以这 7 个时期的番茄果实为材料,研究了 CR-200 型色差计的读数与番茄红素含量的关系,认为番茄红素含量和 a , a/b 值呈极显著的线性回归关系^[1],但最明显的线性区间实际上在黄熟到红熟期之间,红熟到软红的 3 个点差异并不明显。本研究全部以完全成熟(即大红期)的果实为材料,研究 CR-400 型色差计的读数与番茄红素含量的关系,

发现完整果实的色差计读数与番茄红素含量没有明显的相关趋势, $L1$, $a1$, $b1$ 呈随机分布;但以含自由水的番茄浆和不含自由水的番茄酱为材料时, 色差计的读数值 L 和 b 与番茄红素含量呈现出明显的负相关趋势, a 则呈正相关趋势, 相对而言, L 和 b 的分布比较集中, a 值的分布离散性较大;从绝对值来看, 多数基因型的 $L1 > L2 > L3$, $b1 > b2 > b3$, 唯独 a 的次序是 $a1 > a3 > a2$ 。果实和番茄浆的差别主要表现在光源和均质性 2 个方面, 以果实为材料时, CR-400 型色差计既测定了仪器内部脉冲氙气灯的反射光, 同时也可能测定了果实周围散射光的反射光, 所以读数值偏高, 稳定性也较差, 同一果实因为受光面不同, 番茄红素的分布也不同, 于是读数值表现出较大的随机误差;与果实不同的是, 果酱在样品盒中测定时能够排除环境中散射光的干扰, 经过粉碎搅拌后均质性也比较好, 所以读数值的稳定性较好, 随机误差较小。由此可见, 用 CR-400 型色差计测定果实的番茄红素含量, 不能反映客观事实, 没有参考价值。

色差计的读数值转换成 a/b 后, 与番茄红素含量的线性相关系数得到了提高, 这与 Arias^[1] 等人的结果相同。但前人定义的色光值 $(a^2 + b^2)^{1/2}$ 与番茄红素含量并没有显著的相关性。根据 3 种读数值变化趋势, 我们设计另外 2 种转换也与番茄红素含量表现出明显的线性相关, 其中 $(a3/b3 + a3/L3)$ 与番茄红素含量的相关系数最大。从实测值来看, $a3$ 呈随机分布, 番茄红素含量最高的基因型, 其果酱的 a 值并不高, 但 b 值和 L 值都很低, 所以, 果实成熟后期, b 值和 L 值下降得越快, 意味着番茄红素积累的越多。

果浆和离心后的果酱唯一的区别就是自由水的含量。多数基因型的 $L2 > L3$, $b2 > b3$, 但 $a2 < a3$, 这种变化显然是由自由水含量引起的, 自由水越少, L 和 b 似乎越稳定。所以, $a3/b3$ 和 $(a3/b3 + a3/L3)$ 与番茄红素含量的线性相关程度明显地高于 $a2/b2$ 和

$(a2/b2 + a2/L2)$ 。为了确定自由水的影响力, 我们以 58 个样品的自由水含量为依据, 把它们分成 3 组, 结果在自由水含量适中 (71.11% ~ 76.20%) 的基因型中, 它们的色差计读数及其转换值与番茄红素含量都呈显著的线性相关, 特别是 $(a3/b3 + a3/L3)$ 与番茄红素含量的相关系数达到了 0.808^{**}。此时建立的线性回归方程 $ly = 7.707407 + 4.190726(a3/b3 + a3/L3 - 3.539118)$, 能够比较准确地根据色差计的读数值估测果实中番茄红素的含量, 这对于以提高番茄红素含量为主要目标的优质育种具有重要意义, 育种家可以通过色差计来初选高番茄红素的优良基因型。

参考文献:

- [1] Arias R, Lee T C, Logendra L, *et al.* Correlation of lycopene measured by HPLC with the L^* , a^* , b^* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48:1697 - 1702.
- [2] Edan Y, Pasternak H, Shmulevich D, *et al.* Color and firmness classification of fresh market tomatoes[J]. J Food Sci, 1997, 62:793 - 796.
- [3] Alexander L, Grierson D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening[J]. J Experimental Botany, 2002, 53(377):2039 - 2055.
- [4] 薛俊, 夏时云, 张要武, 等. 番茄品质性状的遗传多样性研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(4):7 - 10.
- [5] Thompson K A, Marshall M R, Sims C A, *et al.* Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes[J]. J Food Sci, 2000, 65(5):791 - 795.
- [6] Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, *et al.* Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102(2/3):259 - 272.
- [7] Davis A R, Fish WW, Perkin-Veazie P. A rapid hexane-free method for analyzing lycopene content in watermelon[J]. J Food Sci, 2003, 68(1):328 - 332.