

熊豆, 谢笔钧, 孙智达. 甲基萘醌 MK-4 对类胡萝卜素在模拟胃液中氧化的保护作用[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 102-111.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.014

# 甲基萘醌 MK-4 对类胡萝卜素在模拟胃液中氧化的保护作用

熊豆, 谢笔钧, 孙智达

华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 为研究甲基萘醌 MK-4 对类胡萝卜素( $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素)氧化的保护作用, 通过模拟胃液低 pH 条件下铁诱导的类胡萝卜素的氧化, 评价了甲基萘醌 MK-4 对膳食类胡萝卜素保留率的影响, 并以  $\beta$ -胡萝卜素为例, 利用液相色谱-质谱(LC-MS)分别鉴定了 2 种不同体系(不加 MK-4, 加入 MK-4)中  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物的种类和数量。结果表明: 甲基萘醌 MK-4 对 Fe(II) 诱导的类胡萝卜素氧化的保护效果最佳, 保留率可提高至原来的 2 倍。在胃液中, 当 Fe(II) 存在时, 不加 MK-4 时,  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物涉及的种类和数量最多, 包括顺式异构体、环氧化物、醛类化合物以及降解产物 4 类, 共计 10 种化合物; 而加入 MK-4 后,  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物减少至 7 种化合物, 未检测到醛类化合物及降解产物。通过对比反应前后胶束中的 MK-4 的高效液相色谱图发现, MK-4 对  $\beta$ -胡萝卜素的保护作用并不是消耗其自身。

**关键词** 甲基萘醌 MK-4; 模拟胃液;  $\beta$ -胡萝卜素; 番茄红素; 铁诱导; 氧化; LC-MS; 氧化产物

**中图分类号** TS 201.2<sup>+</sup>4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)02-0102-10

甲基萘醌又称维生素 K<sub>2</sub>(VK<sub>2</sub>), 是甲萘醌母核 C3 位侧链带有数个异戊二烯结构单元的系列化合物, 简称 MK-*n*(H*m*), *n* 代表异戊二烯单元的聚合度数量, *n* 为 1~14, *m* 是侧链中使异戊二烯链饱和的氢原子数目。该类异戊二烯甲基萘醌物质是人体无法自身合成的, 主要来源于膳食, 在细菌的代谢过程中可大量积累<sup>[1-2]</sup>。甲基萘醌是细菌细胞质膜的成分, 在电子传递、氧化磷酸化、主动转运和内生孢子形成中起重要作用<sup>[3]</sup>。VK<sub>2</sub> 属于凝血类维生素, 在食品中微量存在, 又有“铂金维生素”之称。研究发现, VK<sub>2</sub> 不仅具有易被人体吸收、生物活性强、安全性高等优点, 而且能增加骨密度, 具有预防骨质疏松<sup>[3]</sup>、血管钙化<sup>[4]</sup>、肝癌及肝硬化<sup>[5]</sup>、老年痴呆<sup>[6]</sup>等作用。

自然界发现的天然类胡萝卜素已有 700 多种, 广泛分布于植物、动物和微生物中, 是一类重要的天然色素化合物<sup>[6]</sup>。类胡萝卜素具有独特的多支链段和共轭双键, 也正因为其特殊的结构, 使其具有淬灭单线态氧、清除自由基、抗氧化、抗癌、预防白内障、保护视网膜细胞等重要的生理活性。因此, 类胡萝卜素在食品、药物和化妆品领域有着广阔的应用前景<sup>[7]</sup>。然而, 许多因素可以影响类胡萝卜素的稳定

性。在有氧环境中, 类胡萝卜素易发生氧化, 产生不同类型的氧化产物<sup>[8]</sup>。铁作为血红素铁(红肉色素)或以游离形式存在于食物中, 可以催化类胡萝卜素的氧化<sup>[9]</sup>。在胃液(温度 37 °C, pH 2~6)中存在较高浓度的氧分子和易氧化的脂质及铁等活性物质, 当人体摄入类胡萝卜素后, 其在胃液中易被氧化, 转化为其他的非活性成分或生成有害物质, 严重降低了类胡萝卜素的生物利用率和生物活性<sup>[10-13]</sup>。为阻止类胡萝卜素的氧化和降解, 提高其生物可及性, 通过前期研究, 我们发现甲基萘醌 MK-4 在铁存在下对类胡萝卜素的氧化有显著的保护作用。

本研究选用水果、蔬菜等食品中广泛存在的 2 种类胡萝卜素:  $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素(结构见图 1)<sup>[14-17]</sup>作为研究对象, 用表面活性剂聚氧乙烯月桂醚(Brij35)制备了类胡萝卜素(或类胡萝卜素和甲基萘醌 MK-4 混合物)的胶束溶液, 使其均匀地分散于缓冲液中。研究了在模拟胃液中铁诱导下单独的类胡萝卜素(或加入甲基萘醌 MK-4 的类胡萝卜素胶束溶液中类胡萝卜素)的浓度变化, 并利用液相色谱-质谱(LC-MS)对类胡萝卜素的氧化降解产物进行了分析鉴定, 探讨 MK-4 减缓  $\beta$ -胡萝卜素氧化

收稿日期: 2019-08-19

基金项目: 湖北省农产品加工及综合利用项目(3671600302)

熊豆, 硕士研究生. 研究方向: 天然产物化学. E-mail: 1678941105@qq.com

通信作者: 孙智达, 博士, 教授. 研究方向: 天然产物化学. E-mail: sunzhida@mail.hzau.edu.cn

的可能机制,为 MK-4 对类胡萝卜素氧化的保护作用及进一步开发利用提供参考。

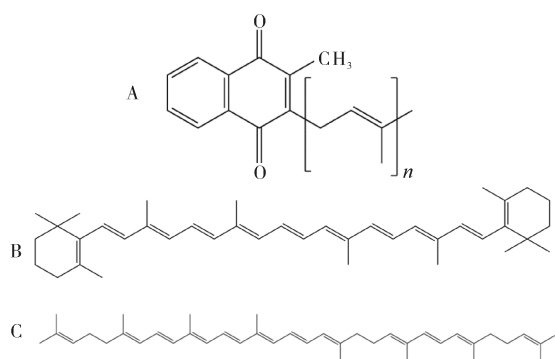


图1 甲基萘醌(A)、 $\beta$ -胡萝卜素(B)和番茄红素(C)的分子结构

Fig.1 Molecular structures of menaquinone(A),  $\beta$ -carotene(B) and lycopene (C)

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

MK-4、 $\beta$ -胡萝卜素、番茄红素(纯度均 $>90\%$ ),上海源叶生物科技有限公司;聚氧乙烯月桂醚(Brij 35)、螯合树脂,上海麦克林生化科技有限公司;七水合硫酸亚铁、九水硝酸铁、无水乙酸钠、硝酸、二氯甲烷、浓硫酸、冰醋酸(均为分析纯),国药集团化学试剂有限公司;高铁肌红蛋白(纯度 $>90\%$ ),美国 Sigma 公司;甲醇(色谱纯),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;甲基叔丁基醚(色谱纯),上海阿拉丁生化科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

WH-3 微型涡漩混合仪,上海沪西分析仪器有限公司;EL-104 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DK-98-IIA 型电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;UV-1800 紫外-可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;5810R 台式低温离心机,德国 Eppendorf 公司;RE-3000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;KQ-50DB 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;A1100 Series 液相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司;YMC C30 色谱柱,安赫科学仪器(上海)有限公司。

### 1.3 试验方法

1)模拟胃液和类胡萝卜素胶束溶液的制备。参考文献[14]的方法略有修改,本试验在接近餐后胃消化的条件( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH4)下进行。用去离子水制备

$0.2\text{ mol/L}$  乙酸盐缓冲液,并用螯合树脂进行纯化以除去任何潜在的金属污染物。利用表面活性剂聚氧乙烯月桂醚(Brij35)在水性介质中制备类胡萝卜素胶束溶液。表面活性剂 Brij35、类胡萝卜素( $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素)和甲基萘醌 MK-4 分别溶解在二氯甲烷中。表面活性剂的储备浓度为  $40\text{ mmol/L}$  ( $1.21\text{ mg}$  Brij 35 溶解于  $25\text{ mL}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中)。

根据朗伯-比尔定律,利用摩尔吸光系数计算出类胡萝卜素溶液的实际浓度。 $\beta$ -胡萝卜素的摩尔吸光系数在  $460\text{ nm}$  时为  $128.5 \times 10^3\text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ,对于番茄红素,在  $482\text{ nm}$  处摩尔吸光系数为  $178 \times 10^3\text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。将类胡萝卜素储备液(约  $900\text{ }\mu\text{L}$ )与  $3\text{ mL}$  表面活性剂储备液均匀混合,之后减压浓缩。残渣用  $20\text{ mL}$  乙酸盐缓冲液溶解,得到含  $19\text{ }\mu\text{mol/L}$  类胡萝卜素和  $4\text{ mmol/L}$  Brij 35 的胶束溶液。

2)不同形式铁溶液的制备。根据文献[15]的方法,将  $404.0\text{ mg}$   $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  溶解于  $2\text{ mL}$   $\text{HNO}_3$  ( $0.1\text{ mol/L}$ ) 中制备  $\text{Fe}(\text{III})$  储备溶液( $500\text{ mmol/L}$ )。同样,将  $279.4\text{ mg}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  溶解于  $2\text{ mL}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0.1\text{ mol/L}$ ) 中制备  $\text{Fe}(\text{II})$  储备溶液( $500\text{ mmol/L}$ )。将高铁肌红蛋白溶解于去离子水中并用  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  滤膜过滤,然后在  $505\text{ nm}$  处测定吸光值,根据朗伯-比尔定律计算出高铁肌球蛋白( $\text{MbFe}(\text{III})$ )溶液的实际浓度(摩尔吸光系数  $\epsilon = 9\text{ }700\text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ),最后将 3 种储备的铁溶液进行相应稀释,制备出不同浓度的稀释铁溶液。其中,  $\text{Fe}(\text{II})$  和  $\text{Fe}(\text{III})$  的浓度在  $0\sim 200\text{ }\mu\text{mol/L}$  内变化,  $\text{MbFe}(\text{III})$  的浓度在  $0\sim 3\text{ }\mu\text{mol/L}$  内变化。

3)铁诱导的类胡萝卜素的氧化。根据 Charlotte 等<sup>[15]</sup>报道,将类胡萝卜素胶束溶液分装于一系列管(每管  $1.96\text{ mL}$ )中。每管在  $t=0$  时注入  $40\text{ }\mu\text{L}$  不同形式铁溶液。将各管保持在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中,避光。用紫外-可见光谱仪测量胶束溶液中类胡萝卜素的吸光值,在  $90\text{ min}$  内每  $15\text{ min}$  记录吸光值。试验平行 3 次,取平均值。类胡萝卜素的保留率按公式(1)计算:

$$\text{保留率} = A_t/A_{t_0} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: $A_t$  为  $t$  时刻类胡萝卜素在最大吸收波长处的吸光值; $A_{t_0}$  为起始时刻类胡萝卜素在最大吸收波长处的吸光值。

### 1.4 $\beta$ -胡萝卜素在模拟胃液中氧化反应产物的液相色谱-质谱(LC-MS)分析方法

1)样品的前处理。根据 Sy 等<sup>[16]</sup>报道的方法略

有修改,反应 90 min 后,取 20 mL 反应后的胶束溶液与 40 mL 二氯甲烷混合以终止反应并提取反应产物。将混合物涡旋,10 000 r/min 离心 5 min,分离有机相和水相,收集下层有机相,减压蒸发浓缩并重新溶解于甲醇-甲基叔丁基醚(体积比 1:1)混合液中,0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤,装入进样瓶中备用。

2)液相色谱-质谱(LC-MS)分析条件。参照陈亚淑等<sup>[14,17]</sup>所报道的方法。①色谱条件:YMC C30 色谱柱(5.0  $\mu\text{m}$ ×4.6 mm×150.0 mm),进样量 100  $\mu\text{L}$ ,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,流速 1 mL/min,检测波长为 450 nm 和 242 nm。梯度洗脱流动相 A 为甲醇,B 为甲基叔丁基醚(MTBE),分离程序为:0~30 min,A 为 95%~70%;30~50 min,A 为 70%~50%;50~60 min,A 为 50%~95%;B 流动相根据 A 相应地变化

且 A+B=100%。②质谱条件:APCI 离子源,正离子检测模式,离子源温度 300  $^{\circ}\text{C}$ ,雾化器温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ,雾化室电压 413.7 kPa,毛细管电压 3 500 V,毛细管出口电压 109 V,干燥气流 5 L/min,质荷比扫描范围 50~1 200。

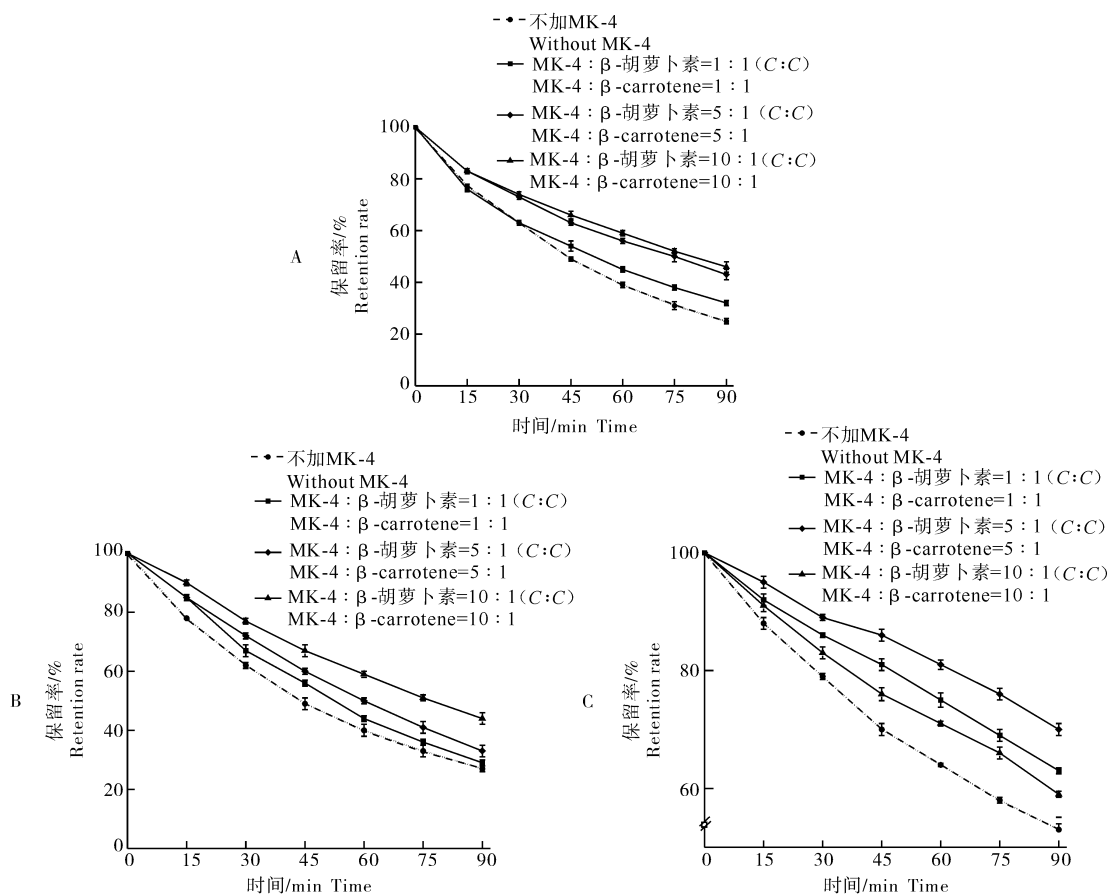
## 1.5 数据处理

运用 Origin 8.6 软件作图。所有试验均重复 3 次,数据均以  $\bar{X} \pm s$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲基萘醌 MK-4 对类胡萝卜素在模拟胃液中由铁诱导的氧化的影响

1)MK-4 对  $\beta$ -胡萝卜素在模拟胃液中由 Fe(II)、Fe(III)和 MbFe(III)等 3 种形式铁诱导的氧化的影响见图 2。



A: 50  $\mu\text{mol/L}$  Fe(II); B: 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe(III); C: 0.5  $\mu\text{mol/L}$  MbFe(III). 下同。The same as below.

图 2 MK-4 存在下  $\beta$ -胡萝卜素在 3 种铁诱导下氧化的保留率-时间曲线

Fig.2 Retention rate-time curve of  $\beta$ -carotene by three kinds of ferric-induced oxidation in the presence of MK-4

从图 2 可以看出,对于  $\beta$ -胡萝卜素,在铁存在下,90 min 后,单独的  $\beta$ -胡萝卜素的保留率均低于  $\beta$ -胡萝卜素与 MK-4 组合的保留率,即不存在 MK-4 时, $\beta$ -胡萝卜素的消耗更多。这说明 MK-4 可以减缓  $\beta$ -胡萝卜素的氧化并使其消耗量减少,对  $\beta$ -胡萝卜素具有一定的保护效果。

当 Fe(II) 存在时,如图 2A 所示,90 min 后,单独的  $\beta$ -胡萝卜素的保留率仅为  $(25 \pm 1)\%$ ;当加入的 MK-4 与  $\beta$ -胡萝卜素的浓度比为 1:1 时, $\beta$ -胡萝卜素的保留率为  $(32 \pm 1)\%$ ,提高了 7 个百分点;而当二者的浓度比提高到 5:1 时,减缓氧化的效果更为明显,90 min 后, $\beta$ -胡萝卜素的保留率为  $(43 \pm 1)\%$ ,约为未加 MK-4 组的 1.7 倍;而当二者的浓度比为 10:1 时, $\beta$ -胡萝卜素的保留率为  $(46 \pm 2)\%$ 。由此可知,随着 MK-4 浓度的增加, $\beta$ -胡萝卜素的保留率也随之增加。同时,通过观察不同浓度下的二者的动力学曲线可知,当加入的 MK-4 与  $\beta$ -胡萝卜素的浓度比为 1:1 时,在前 30 min,其动力学曲线与单独的  $\beta$ -胡萝卜素的动力学曲线基本重合,30 min 后,其动力学曲线则明显位于后者上方;而当二者浓度比增加至 5:1 或 10:1 时,二者的动力学曲线均位于单独的  $\beta$ -胡萝卜素的上方。由此说明,在 Fe(II) 存在时,低浓度的 MK-4(浓度比 1:1)需要一定的时间才能起到保护作用,而高浓度的 MK-4(浓度比 5:1 或 10:1)则不需要。同时可以观察到,当加入的 MK-4 与  $\beta$ -胡萝卜素的浓度比由 1:1 增加到 5:1 时, $\beta$ -胡萝卜素的保留率增加了约 11 个百分点,而当二者的浓度比由 5:1 增加为 10:1 时, $\beta$ -胡萝卜素的保留率仅增加约 3 个百分点,这说明 MK-4 与  $\beta$ -胡萝卜素的浓度比为 5:1 时,其对  $\beta$ -胡萝卜素氧化的保护效果已基本达到饱和,再增加 MK-4 的浓度, $\beta$ -胡萝卜素的保留率增加并不明显。

由图 2B 可知,Fe(III) 存在时的动力学曲线规律与 Fe(II) 类似,随着 MK-4 浓度的增加, $\beta$ -胡萝卜素的保留率随之增加。不同之处在于,当加入的 MK-4 与  $\beta$ -胡萝卜素的浓度比为 10:1 时, MK-4 减缓  $\beta$ -胡萝卜素氧化的效果最好, $\beta$ -胡萝卜素的保留率明显高于另外 3 组,它们的保留率分别为:  $(44 \pm 2)\%$  (MK-4 :  $\beta$ -胡萝卜素 = 10:1)、 $(33 \pm 2)\%$  (MK-4 :  $\beta$ -胡萝卜素 = 5:1)、 $(29 \pm 1)\%$  (MK-4 :  $\beta$ -胡萝卜素 = 1:1) 和  $(27 \pm 1)\%$  (不加 MK-4)。

而对于 MbFe(III),如图 2C 所示,90 min 后,单独的  $\beta$ -胡萝卜素的保留率为  $(53 \pm 1)\%$ 。当加入的 MK-4 与  $\beta$ -胡萝卜素的浓度比为 1:1、5:1 和 10:1 时, $\beta$ -胡萝卜素的保留率分别为  $(63 \pm 2)\%$ 、 $(70 \pm 1)\%$  和  $(59 \pm 2)\%$ ,较未加组的保留率均显著提高。同时可以发现,与 Fe(II)、Fe(III) 存在下的情况不同的是,当加入的 MK-4 与  $\beta$ -胡萝卜素的浓度比增加到 10:1 时, $\beta$ -胡萝卜素的保留率却低于另外 2 个浓度, MK-4 减缓  $\beta$ -胡萝卜素氧化的效果

最差。这说明 MK-4 对  $\beta$ -胡萝卜素的保护效果不仅取决于其浓度,也与铁的形式有关。

2) MK-4 对番茄红素在模拟胃液中由 Fe(II)、Fe(III) 和 MbFe(III) 等 3 种形式铁诱导的氧化的影响见图 3。

由图 3A 可知,对于番茄红素,当 Fe(II) 存在时,单独的番茄红素和加入了 MK-4 的番茄红素,在前 15 min 内,二者动力学曲线基本重合。这说明在该体系中, MK-4 需要一定的时间才能发挥作用。同时,当 MK-4 与番茄红素的浓度比为 10:1 时, MK-4 对番茄红素氧化的减缓效果最好,90 min 后番茄红素的保留率由不加 MK-4 时的  $(21 \pm 1)\%$  提高至  $(46 \pm 2)\%$ ,约为前者的 2.2 倍。

由图 3B 可知,Fe(III) 存在时,90 min 后,不加 MK-4 的单独的番茄红素的保留率为  $(25 \pm 1)\%$ ,当加入的 MK-4 与番茄红素的浓度比为 1:1 时,番茄红素的消耗明显减少,90 min 后番茄红素的保留率为  $(54 \pm 1)\%$ ,同时可以观察到,加入 MK-4 的浓度增加 5 倍时,90 min 内番茄红素的动力学曲线无明显变化。由此说明,二者浓度比为 1:1 时, MK-4 对番茄红素氧化的减缓效果已达到最佳,即使再增加其浓度,番茄红素的消耗也不会显著减少。

在 MbFe(III) 存在的情况下,如图 3C 所示,加入 3 种浓度的 MK-4 均可以提高番茄红素的保留率,且番茄红素的保留率随着 MK-4 浓度的增加而提高。90 min 后,单独的番茄红素的保留率仅为  $(54 \pm 1)\%$ ,而当加入 MK-4 的浓度与番茄红素的浓度比为 1:1 时,番茄红素的保留率为  $(64 \pm 1)\%$ ,最终浓度约为原来的 1.2 倍;而当二者的浓度比增加为 5:1 时,番茄红素的保留率提高为  $(73 \pm 2)\%$ ,最终浓度约为原来的 1.4 倍。同时可以观察到,二者的浓度比为 5:1 和 10:1 的动力学曲线在前 45 min 基本重合,45 min 后才略有差别,后者的保留率略高于前者。由此说明,当二者的浓度比为 5:1 时, MK-4 对番茄红素的保护效果基本已达到最佳,即使再增加其浓度,番茄红素的保留率也不会显著增加。

## 2.2 $\beta$ -胡萝卜素在模拟胃液中由铁诱导的氧化反应产物的液相色谱-质谱(LC-MS)分析

在模拟胃液中反应 0 min 时  $\beta$ -胡萝卜素的高效液相色谱(HPLC)图见图 4。从图 4 可以看出, $\beta$ -胡萝卜素具有较高的响应值,说明在起始时刻  $\beta$ -胡萝卜素有很高的浓度,同时,未被铁催化时, $\beta$ -胡萝卜素未发生氧化,几乎没有检测到氧化产物。

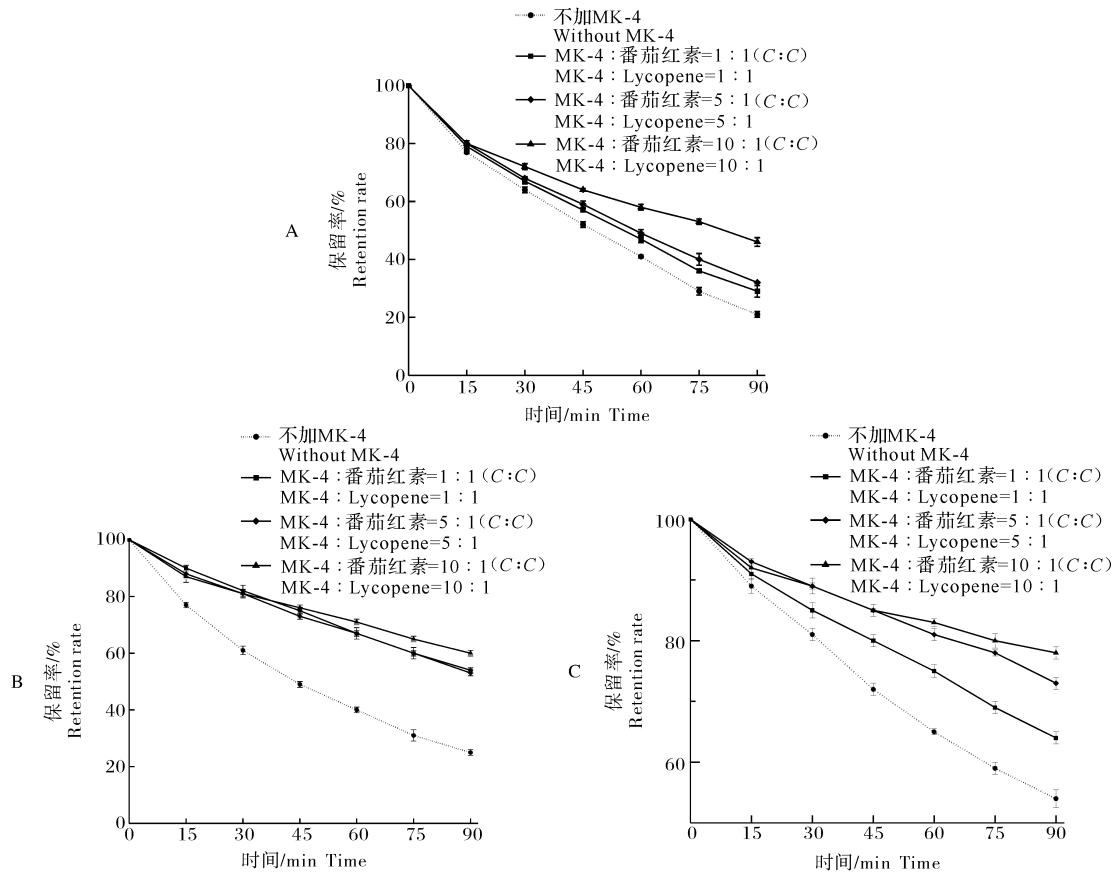


图 3 MK-4 存在下番茄红素在 3 种铁诱导下氧化的保留率-时间曲线

Fig.3 Retention rate-time curve of lycopene by three kinds of ferric-induced oxidation in the presence of MK-4

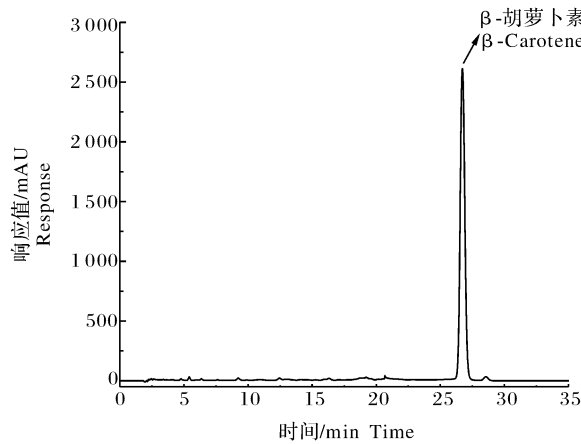


图 4 模拟胃液中反应 0 min  $\beta$ -胡萝卜素的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC of  $\beta$ -carotene at the zero moment in simulated gastric juice

$\beta$ -胡萝卜素在模拟胃液中由  $\text{Fe}(\text{II})$  诱导的氧化反应产物的 LC-MS 分析见图 5 和表 1。

在  $\text{Fe}(\text{II})$  存在下,无甲基萘醌 MK-4 时,反应 90 min 后, $\beta$ -胡萝卜素氧化产物的 HPLC 图如图 5 所示,与图 4 对比可以发现,底物  $\beta$ -胡萝卜素的响应值

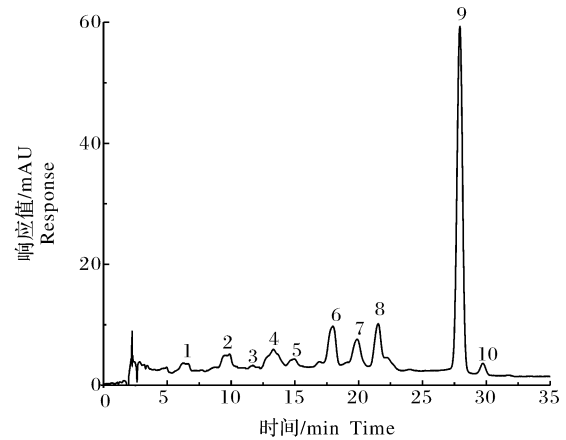


图 5 反应 90 min 后  $\beta$ -胡萝卜素在  $\text{Fe}(\text{II})$  存在下反应产物的高效液相色谱图

Fig.5 HPLC of reaction products of  $\beta$ -carotene in the presence of  $\text{Fe}(\text{II})$  after 90 min reaction

显著降低,说明  $\beta$ -胡萝卜素被大量消耗,共检测到 10 种化合物,包括  $\beta$ -胡萝卜素环氧化、开环氧化、降解产物及异构体(表 1)。

对于峰 1,保留时间为 6.0 min,检测到 2 个分子离子  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,分别为 377 和 285,紫外-可见

(UV-Vis) 最大吸收波长分别为 378 nm 和 445 nm, 参考文献[19-21], 可以初步判断为反式- $\beta$ -阿林-15-胡萝卜醛和反式- $\beta$ -阿林-10'-胡萝卜醛的混合物。

对于峰 2, 保留时间为 9.7 min, 分子离子  $[M+H]^+$  为 569, 以及对应的碎片离子 551 ( $m/z$ ), 310 ( $m/z$ ), UV-Vis 最大吸收波长为 390、405、431 nm, III/II 为 30%, 无顺式吸收峰, 与文献[19]、[21]中的数据比对, 可以初步判断为全反式-5, 8, 5', 8'-二环氧- $\beta$ -胡萝卜素。同理, 对于峰 3、峰 4、峰 6、峰 7 和峰 10, 采取上述方法, 可分别初步鉴定为反式- $\beta$ -

氧分解-8'-胡萝卜素<sup>[20]</sup>、13-顺式- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[21]</sup>、全反式-5, 6-环氧- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[22]</sup>、反式-5, 8-环氧- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[20]</sup>、9-顺式- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[20, 23]</sup>。而对于峰 8, 在保留时间为 21.6 min 时, 既检测到分子离子  $[M+H]^+$  为 537, 以及其对应的碎片离子 399 ( $m/z$ ), 361 ( $m/z$ ), 同时也检测到了分子离子  $[M+H]^+$  为 569 及对应的碎片离子 551, 310 ( $m/z$ ), UV-Vis 最大吸收波长分别为 340、418、445、475 nm, III/II 为 33%,  $A_B/A_{II}$  为 71%, 由此推测峰 7 为全反式-5, 6, 5', 6'-二环氧-4 氢- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[23]</sup>和 15-顺- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[20, 22]</sup>的混合物。

表 1  $\beta$ -胡萝卜素在 Fe(II) 存在下的反应产物分析结果

Table 1 Analysis results of reaction products of  $\beta$ -carotene in the presence of Fe(II)

编号 Number	保留时间/min Retention time	最大吸收波长 $\lambda_{max}/nm$ Maximum absorption wavelength	III/II / %	$A_B/A_{II}$ / %	$[M+H]^+$ ( $m/z$ )	分子式 Formula	碎片离子/ ( $m/z$ ) Fragment ion	鉴定 Identification	相对含量/% Relative content
1	6.0	378, 448	0	0	377 285	$C_{27}H_{36}O$ $C_{20}H_{28}O$	359 $[M+H-18]^+$ 267 $[M+H-18]^+$	反式- $\beta$ -阿林-10'-胡萝卜醛和 反式- $\beta$ -阿林-15'-胡萝卜醛 <i>trans</i> - $\beta$ -Apo-10'-carotenal and <i>trans</i> - $\beta$ -Apo-15'-carotenal	5.4
2	9.7	385, 405, 431	33	0	569	$C_{40}H_{57}O_2$	551 $[M+H-18]^+$ , 310	全反式-5, 8, 5', 8'- 二环氧- $\beta$ -胡萝卜素 All- <i>trans</i> -5, 8, 5', 8'- diepoxy- $\beta$ -carotene	7.3
3	11.7	465	0	0	417	$C_{30}H_{40}O_2$	399 $[M+H-18]^+$	反式- $\beta$ -阿林-8'-胡萝卜醛 <i>trans</i> - $\beta$ -Apo-8'-carotenal	0.3
4	13.3	330, 420, 450, 472	17	46	537	$C_{40}H_{56}$	444 $[M-92]^+$ , 177	13-顺式- $\beta$ -胡萝卜素 13- <i>cis</i> - $\beta$ -Carotene	11.9
5	15.0	440	—	—	553	$C_{40}H_{56}O$	457	未鉴定 Not identified	4.0
6	18.0	420, 450, 474	47	0	553	$C_{40}H_{56}O$	535 $[M+H-18]^+$ , 205	全反式-5, 6-环氧- $\beta$ -胡萝卜素 All- <i>trans</i> -5, 6-epoxy- $\beta$ -carotene	9.0
7	19.9	410, 430, 458	64	0	553	$C_{40}H_{56}O$	535 $[M+H-18]^+$ , 495 $[M+H-58]^+$	反式-5, 8-环氧- $\beta$ -胡萝卜素 <i>trans</i> -5, 8-Epoxy- $\beta$ -carotene	10.0
8	21.6	340, 418, 445, 475	33	71	569 537	$C_{40}H_{57}O_2$ $C_{40}H_{56}$	551 $[M+H-18]^+$ , 310 399 $[M-137]^+$ , 361, 177	全反式-5, 6, 5', 6'-二环氧-4 氢- $\beta$ -胡萝卜素和 15-顺- $\beta$ -胡萝卜素 All- <i>trans</i> -5, 6, 5', 6'-diepoxy- $\beta$ -carotene and 15- <i>cis</i> - $\beta$ -Carotene	13.1
9	28.0	430, 455, 481	25	0	537	$C_{40}H_{56}$	444 $[M-92]^+$ , 269	全反式- $\beta$ -胡萝卜素 All- <i>trans</i> - $\beta$ -Carotene	26.2
10	29.9	330, 430, 448, 480	27	10	537	$C_{40}H_{56}$	444 $[M-92]^+$ , 361	顺式- $\beta$ -胡萝卜素 9- <i>cis</i> - $\beta$ -Carotene	3.2

注: III/II 是指将 2 个峰之间的最小值作为基线, 最长波长吸收峰的高度 III 与中间吸收峰的高度 II 之比;  $A_B/A_{II}$  是指顺式吸收峰即 340 nm 左右的吸收峰强度与中间吸收峰的强度 II 之比; “—”代表无法计算。下表同。Note: the parameter III/II is the ratio of the height of the longest wavelength absorption peak designated III, and that of the middle absorption peak designated as II, taking the minimum between the two peaks as baseline; the parameter  $A_B/A_{II}$  is the ratio of the *cis* absorption peak designated as  $A_B$ , which is the intensity of the absorption peak around 340 nm, and that of the middle absorption peak designated as  $A_{II}$ ; “—” represents incalculable. The same as below table.

从表 1 可以看出,在所检测到的  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物中,主要分为 4 类物质:顺式异构体、环氧化合物、醛类化合物以及降解产物,其中顺式异构体的总含量为 25.1%,环氧化合物的总含量为 26.3%,醛类化合物和降解产物的总含量为 5.7%,而底物全反式- $\beta$ -胡萝卜素的含量为 26.2%。

### 2.3 MK-4 存在下 $\beta$ -胡萝卜素在模拟胃液中由 Fe(II) 诱导的氧化反应产物的 LC-MS 分析

在 Fe(II) 存在下,加入 MK-4(浓度比 5:1),反应 90 min 后, $\beta$ -胡萝卜素的反应产物的 HPLC 图如图 6 所示,与图 5 对比可知, $\beta$ -胡萝卜素的最终浓度提高了约 5 倍。如表 2 所示,共检测到 7 种化合物,采用本文“1.4.2)”所提到的方法,峰 1、峰 2、峰 3、峰 4、峰 6 和峰 7 可以分别初步判断为全反式-5,8,5',8'-二环氧- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[20-21]</sup>、全反式-5,6-环氧- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[21]</sup>、5,6,5',6'-二环氧- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[19,23-24]</sup>、(13-顺式)-5,6,5',6'-二环氧基-5,6,5',6'-四氢- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[22]</sup>、9-顺式- $\beta$ -胡萝卜素<sup>[20,23]</sup>、全反式- $\alpha$ -胡萝卜素<sup>[21]</sup>。

表 2 加入 MK-4 后  $\beta$ -胡萝卜素在 Fe(II) 存在下的反应产物分析结果

Table 2 Analysis results of reaction products of  $\beta$ -carotene in the presence of Fe<sup>II</sup> and MK-4

编号 Number	保留时间/min Retention time	最大吸收波长		III/ II/%	A <sub>B</sub> / A <sub>II</sub> /%	[M+ H] <sup>+</sup> / (m/z)	分子式 Formula	碎片离子/ (m/z) Fragment ion	鉴定 Identification	相对含量/% Relative content
		$\lambda_{\max}$ /nm Maximum absorption wavelength								
1	9.9	385,405,431	33	0	569	C <sub>40</sub> H <sub>57</sub> O <sub>2</sub>	551[M+ H-18] <sup>+</sup> ,310	全反式-5,8,5',8'- 二环氧- $\beta$ -胡萝卜素 All-trans-5,8,5',8'- diepoxy- $\beta$ -carotene	1.7	
2	17.5	425,450,475	48	0	553	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O	535[M+ H-18] <sup>+</sup> ,205	全反式-5,6-环氧- $\beta$ -胡萝卜素 All-trans-5,6-epoxy- $\beta$ -carotene	5.8	
3	19.4	410,430,470	83	0	569	C <sub>40</sub> H <sub>57</sub> O <sub>2</sub>	477	5,6,5',6'-二环氧- $\beta$ -胡萝卜素 5,6,5',6'-diepoxy- $\beta$ - carotene	2.9	
4	20.9	330,415,438,460	43	—	569	C <sub>40</sub> H <sub>57</sub> O <sub>2</sub>	551[M+ H-18] <sup>+</sup> ,310	(13-顺式)-5,6,5',6'- 二环氧基-5,6,5', 6'-四氢- $\beta$ -胡萝卜素 13-cis-5,6,5', 6'-Diepoxy- $\beta$ -carotene	5.4	
5	27.4	430,455,481	25	0	537	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	444[M-92] <sup>+</sup> , 269	全反式- $\beta$ -胡萝卜素 All-trans- $\beta$ -carotene	78.2	
6	29.1	340,430,450,481	25	10	537	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	444[M-92] <sup>+</sup> , 361	9-顺式- $\beta$ -胡萝卜素 9-cis- $\beta$ -Carotene	3.5	
7	31.8	418,448,480	50	0	537	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	444[M-92] <sup>+</sup>	全反式- $\alpha$ -胡萝卜素 All-trans- $\alpha$ -carotene	0.6	

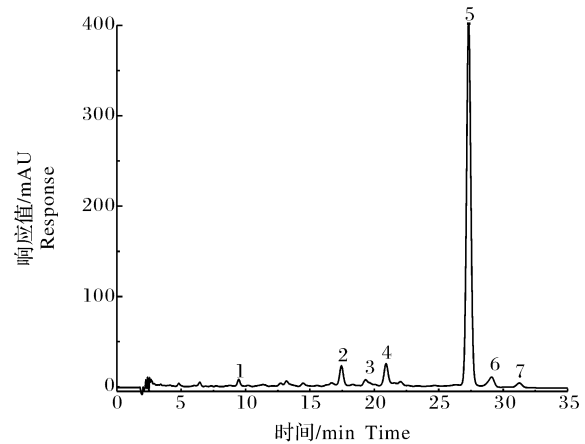


图 6 加入 MK-4 反应 90 min 后  $\beta$ -胡萝卜素在 Fe(II) 存在下反应产物的高效液相色谱图

Fig.6 HPLC of reaction products of  $\beta$ -carotene in the presence of Fe(II) and MK-4 after 90 min reaction

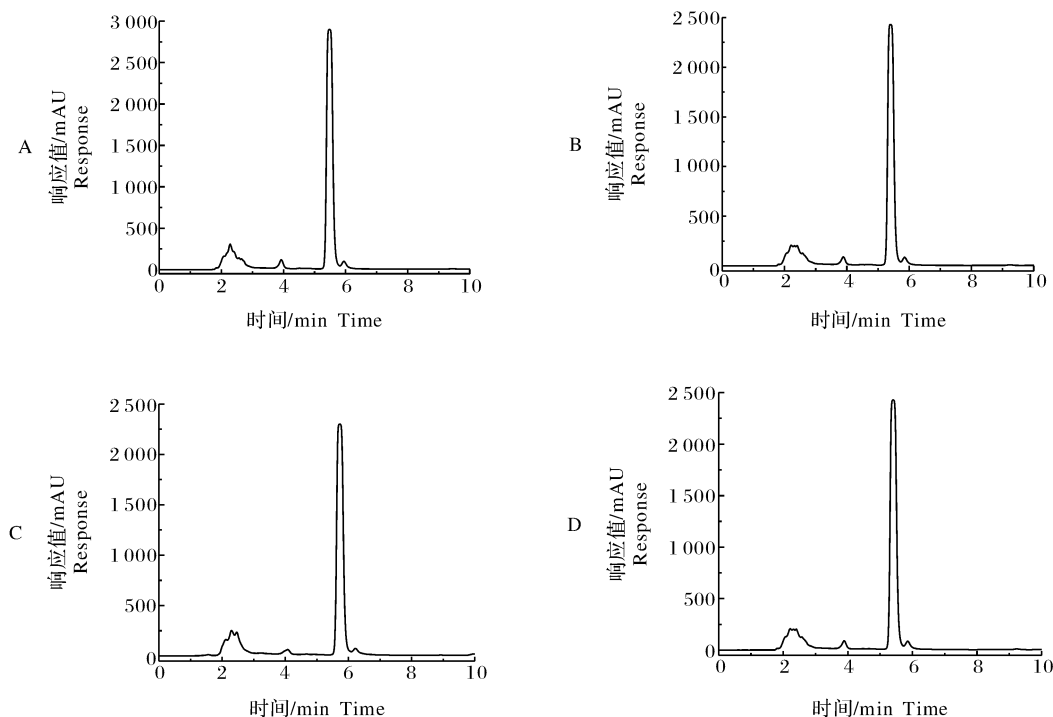
如前所述,利用峰面积来表征各个产物的相对含量,与表 1 对比可知,底物全反式- $\beta$ -胡萝卜素的相对含量增加至 78.2%,而其他产物总含量减少至 21.8%,其中顺式异构体的含量减少至 3.5%,环氧

化合物的含量降低至 15.8%, 并且未检测到醛类化合物和降解产物。以上数据表明 MK-4 存在下,  $\beta$ -胡萝卜素向其他氧化产物转化减少, 具有一定的保护作用。

#### 2.4 模拟胃液条件下铁存在时加入 $\beta$ -胡萝卜素中的甲基萘醌 MK-4 的高效液相色谱 (HPLC) 图分析

模拟胃液条件下 3 种铁存在时加入  $\beta$ -胡萝卜素中的甲基萘醌 MK-4 在反应前后的 HPLC 图如图 7

所示, 其中图 7A 为反应 0 min MK-4 的 HPLC 图, 图 7B、C、D 分别为在  $\text{Fe}(\text{II})$ 、 $\text{Fe}(\text{III})$ 、 $\text{MbFe}(\text{III})$  存在下反应 90 min 后加入  $\beta$ -胡萝卜素中的 MK-4 的 HPLC 图。通过反应前和反应后的 HPLC 图对比可知, 在模拟胃液条件下, MK-4 在 3 种铁存在下均表现出很高的稳定性, 观察到的轻微消耗可能与试验过程中不可避免的光照有关。



A: 反应 0 min at the zero moment; B:  $\text{Fe}(\text{II})$ ; C:  $\text{Fe}(\text{III})$ ; D:  $\text{MbFe}(\text{III})$ .

图 7 铁存在时反应前后加入  $\beta$ -胡萝卜素中的甲基萘醌 MK-4 的高效液相色谱图

Fig.7 HPLC of MK-4 added to  $\beta$ -carotene in the presence of iron before and after reaction

### 3 讨论

本文研究了水果和蔬菜中最常见的类胡萝卜素 ( $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素) 胶束溶液, 在模拟胃液中, 甲基萘醌 MK-4 对  $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素在 3 种铁诱导下氧化的保护作用。试验结果表明, 单独的类胡萝卜素, 无论是  $\beta$ -胡萝卜素还是番茄红素, 在铁存在下  $\text{pH}=4$  的胃液中都不稳定, 尤其是在  $\text{Fe}(\text{II})$  和  $\text{Fe}(\text{III})$  存在时, 90 min 后 2 种类胡萝卜素的保留率均在 30% 以下, 而加入了 MK-4 后, 类胡萝卜素的保留率明显提高, 且 MK-4 在 3 种铁中对类胡萝卜素的保护效果是有差别的, 其中对  $\text{Fe}(\text{II})$  诱导的类胡萝卜素氧化的保护效果最佳, 保留率可提高至原来的 2 倍。

为进一步研究 MK-4 对类胡萝卜素氧化的保护

作用机制, 以  $\beta$ -胡萝卜素为例, 利用 LC-MS 分别鉴定了 2 种不同体系中  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物, 共鉴定出包括 13-顺式- $\beta$ -胡萝卜素、全反式-5,6-环氧-5,6-二氢- $\beta$ -胡萝卜素、(13-顺式)-5,6,5',6'-二环氧基-5,6,5',6'-四氢- $\beta$ -胡萝卜素、9-顺式- $\beta$ -胡萝卜素、5,6,5',6'-二环氧- $\beta$ -胡萝卜素、9-顺式-5,8-环氧- $\beta$ -胡萝卜素、全反式-5,8,5',8'-二环氧- $\beta$ -胡萝卜素、反式- $\beta$ -阿林-8'-胡萝卜素醛等在内的 14 种  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物并用峰面积对其进行定量分析。结果表明, 在胃液中, 当  $\text{Fe}(\text{II})$  存在时, 不加 MK-4 时,  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物涉及的种类和数量最多, 包括顺式异构体、环氧化物、醛类化合物以及降解产物 4 类, 共计 10 种化合物; 而加入 MK-4 后,  $\beta$ -胡萝卜素的反应产物减少为 7 种化合物, 未检测到醛类化合物及降解产物。由此说明, MK-4 可以减少  $\beta$ -胡



卜素向其他氧化产物转化,从而保护  $\beta$ -胡萝卜素。通过对比反应前后胶束中的 MK-4 的 HPLC 图,发现反应后的 MK-4 依然保持着高浓度,这说明 MK-4 对  $\beta$ -胡萝卜素的保护作用并不是消耗其自身,事实上这一点可以从 MK-4 的结构上来解释, MK-4 的头部赋予其很好的稳定性和较小的氧化还原电位。因此,在模拟胃液的低 pH 条件下,铁并不能促使其发生氧化,而较小的氧化还原电位赋予其很好的抗氧化能力,使 MK-4 在保护  $\beta$ -胡萝卜素的同时也不消耗自身。

## 参考文献 References

- [1] KAWAMUKAI M. Biosynthesis and applications of prenylquinones[J/OL]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2018; 1-15 [2019-08-19]. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1433020>.
- [2] 朱杰,王中群,王昭军,等. 维生素 K<sub>2</sub>抑制血管钙化作用与机制研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(1): 94-96. ZHU J, WANG Z Q, WANG Z J, et al. Research progress in the role of vitamin K<sub>2</sub> in inhibiting vascular calcification [J]. Chinese journal of geriatric cardiocerebral vascular disease, 2016, 18 (1): 94-96(in Chinese with English abstract).
- [3] 夏玉,殷光玲. 维生素 K<sub>2</sub>防治骨质疏松症的研究进展[J]. 生物技术世界, 2016(3): 184-185. XIA Y, YIN G L. Research progress of vitamin K<sub>2</sub> in the prevention and treatment of osteoporosis [J]. Biotechnology world, 2016 (3): 184-185(in Chinese with English abstract).
- [4] 董坤伦. 维生素 K<sub>2</sub>结合钙剂在甲状腺功能亢进症继发骨质疏松症中的临床应用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018(2): 218-221. DONG K L. Clinical application of vitamin K<sub>2</sub> combined with calcium in secondary osteoporosis of hyperthyroidism[J]. Chinese journal of osteoporosis, 2018 (2): 218-221 (in Chinese with English abstract).
- [5] 张锋,苗江永. 维生素 K<sub>2</sub>调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号对肝癌细胞侵袭、凋亡的影响及机制研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2017(11): 28-31. ZHANG F, MIAO J Y. Effect and mechanism of vitamin K<sub>2</sub> regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signal on invasion and apoptosis of liver cancer cells[J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2017 (11): 28-31(in Chinese with English abstract).
- [6] 穆青,陈亚淑,谢笔钧,等. 北极海洋红球菌 B7740 (*Rhodococcus* sp.)产类胡萝卜素和类异戊二烯醌的抗氧化、抗增殖活性[J]. 食品科学, 2018, 39 (11): 166-171. MU Q, CHEN Y S, XIE B J, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of carotenoids and isoprenoids produced by Arctic marine *Rhodococcus* B7740 (*Rhodococcus* sp.) [J]. Food science, 2018, 39 (11): 166-171(in Chinese with English abstract).
- [7] BRITTON G, LIAAENJENSEN S, HANSPETER P. Carotenoids; volume 5; nutrition and health[M]. [S.l.]: Birkhauser, 2009.
- [8] BOON C S, MCCLEMENTS D J, WEISS J, et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2010, 50(6): 515-532.
- [9] PRIYADARSHANI A M B. A review on factors influencing bioaccessibility and bioefficacy of carotenoids[J]. Critical reviews in food technology, 2017, 57(8): 1710-1717.
- [10] FINKEISHTEIN E I, KRASNOKUTSKAYA I S, VAKULOVA L A. Spectroscopy of carotenoids and its application to the investigation of autoxidation [J]. Journal of molecular structure, 1999, 480/481: 569-571.
- [11] HENRY L K, PUSPITASARI -NIENABER N L, JAREN-GALAN M, et al. Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2000, 48(10): 5008-5013.
- [12] JOMOVA K, VALKO M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease[J]. Toxicology, 2011, 283(2/3): 65-87.
- [13] CILLA A, BOSCH L, BARBERA R, et al. Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds; a review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols[J/OL]. Journal of food composition and analysis, 2018, 68: 3-15 [2019-08-19]. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.009>.
- [14] CHEN Y S, XIE B J, YANG J G, et al. Identification of microbial carotenoids and isoprenoid quinones from *Rhodococcus* sp. B7740 and its stability in the presence of iron in model gastric conditions[J/OL]. Food chemistry, 2018, 240: 204-211 [2019-12-04]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.067>.
- [15] CHARLTTE S, OLIVIER D, PATRICK B, et al. Interactions between carotenoids from marine bacteria, and other micronutrients: impact on stability and antioxidant activity[J]. Marine drugs, 2015, 13(11): 7020-7039.
- [16] SY C, DANGLES O, BOREL P, et al. Stability of bacterial carotenoids in the presence of iron in a model of the gastric compartment: comparison with dietary reference carotenoids [J/OL]. Archives of biochemistry and biophysics, 2015, 572: 89-100 [2019-08-19]. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.030>.
- [17] 陈亚淑,汪荣,谢笔钧,等. 北极海洋红球菌 (*Rhodococcus* sp.) B7740 产类胡萝卜素的提取条件优化及甲基萘醌类胡萝卜素鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 25-30. CHEN Y S, WANG R, XIE B J, et al. Optimization of extraction conditions of carotenoids produced by *Rhodococcus* sp. B7740 and identification of menaquinone carotenoids [J]. Food science, 2016, 37 (2): 25-30(in Chinese with English abstract).
- [18] GURAK P D, MERCADANTE A Z, GONZALEZ MIRET M L, et al. Changes in antioxidant capacity and colour associated with the formation of  $\beta$ -carotene epoxides and oxidative cleavage derivatives [J/OL]. Food chemistry, 2014, 147: 160-169 [2019-08-19]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.106>.

- [19] ZEB A. Oxidation and formation of oxidation products of  $\beta$ -carotene at boiling temperature[J]. *Chemistry and physics of lipids*, 2012, 165(3): 277-281.
- [20] AZEVEDO M C H, RODRIGUEZ A D B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS[J]. *Journal of food composition and analysis*, 2004, 17(3/4): 385-396.
- [21] ZEPKA L Q, MERCADANTE A Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice[J]. *Food chemistry*, 2009, 117(1): 28-34.
- [22] ELTINAY A H, CHICHESTER C O. Oxidation of beta-carotene-Site of initial attack[J]. *Journal of organic chemistry*, 1970, 35(7): 2290-2293.
- [23] RODRIGUEZ E B, RODRIGUEZ D B. Formation of epoxy-carotenoids and apocarotenals from lycopene by chemical reactions and autoxidation in model systems and in processed foods[J]. *Food chemistry*, 2007, 101(2): 563-572.
- [24] XIAO Y D, HUANG W Y, LI D J, et al. Thermal degradation kinetics of all- *trans*, and *cis*-carotenoids in a light-induced model system [J/OL]. *Food chemistry*, 2018, 239: 360-368 [2019-08-19]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.107>.

## Protective effect of MK-4 on oxidation of carotenoids in simulated gastric juice

XIONG Dou, XIE Bijun, SUN Zhida

*College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The protective effect of methyl-naphthoquinone MK-4 on the oxidation of carotenoids ( $\beta$ -carotene and lycopene) was studied. By simulating the ferric-induced oxidation of carotenoids at low pH in gastric juice, the effect of MK-4 on the retention rate of dietary carotenoids was evaluated. Taking  $\beta$ -carotene as an example, the type and quantity of reaction products of  $\beta$ -carotene in two different systems (without MK-4, adding MK-4) were identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results showed that MK-4 had the best protection effect and the retention rate could be increased by 2 times when the oxidation of carotenoids was induced by Fe(II). For the gastric juice without MK-4 in the presence of Fe(II), there were the most types and quantities of reaction products of  $\beta$ -carotene, including *cis*-isomers, epoxy compounds, aldehydes and degradation products, a total of 10 compounds. After the addition of MK-4, the reaction products of  $\beta$ -carotene were reduced to 7 compounds without aldehydes and degradation products. By comparing the HPLC of MK-4 in the micelles before and after the reaction, it was found that the protective effect of MK-4 on  $\beta$ -carotene did not consume itself.

**Keywords** methyl-naphthoquinone MK-4; simulated gastric juice;  $\beta$ -carotene; lycopene; ferric-induced; oxidation; LC-MS; oxidation products

(责任编辑: 赵琳琳)