

331 AGRO

331

**THE BRITISH LIBRARY**



This document has been supplied by, or on behalf of, The British Library Document Supply Centre, Boston Spa, Wetherby, West Yorkshire LS23 7BQ United Kingdom

**WARNING:** Further copying of this document (including storage in any medium by electronic means), other than that allowed under the copyright law, is not permitted without the permission of the copyright owner or an authorised licensing body.

N° 65/02

Agro.

خالد بن عبد الله  
المركزية  
المركزية  
المركزية  
المركزية



Oltre alla Rivista trimestrale INDUSTRIA CONSERVE, pubblicata ininterrottamente dal 1925, giunta ormai al 74° anno e edita dal Gruppo Editoriale FAENZA EDITRICE, la SSICA - Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari pubblica

una

**COLLANA DI MONOGRAFIE TECNOLOGICHE E ANALITICHE**

destinate alla formazione di personale tecnico qualificato.

Sono disponibili le seguenti monografie

- Rodolfo Andreotti - **La fabbricazione delle conserve di piselli** £. 18.000 (9,4 euro)
- Giuseppe Safina - **I derivati agrumari** £. 25.000 (13 euro)
- Giulio Barbieri e Silvio Rosso - **Il controllo dei contenitori di banda stagnata per conserve alimentari** £. 30.000 (15,6 euro)
- Antonio Casolari e Enzo Vicini - **Il conteggio delle muffe nelle conserve di pomodoro** £. 30.000 (15,6 euro)
- Giovanni Mataloni e Rodolfo Andreotti - **La preparazione industriale dei canditi** £. 30.000 (15,6 euro)
- Carlo Leoni - **I derivati industriali del pomodoro** £. 50.000 (26 euro)
- Sebastiano Porretta - **Il controllo della qualità dei derivati del pomodoro** £. 50.000 (26 euro)

Le monografie possono essere acquistate usando una fotocopia della presente pagina come buono d'ordine, indicando il numero di copie nel rispettivo quadratino e inviandola a mezzo posta o fax (0521/771829) a:

**SSICA - Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari  
v.le Tanara 31/a 43100 PARMA**

Vi preghiamo di inviarci la/e monografia/e indicata/a.

forma di pagamento prescelta:

- assegno di £. ...., comprensivo di 5000 £ di spese postali
- pagamento a ricevimento fattura (riservato alle Ditte, che in tal caso dovranno allegare le coordinate fiscali necessarie alla fatturazione).

Per gli ordini provenienti dall'estero, al ricevimento dell'ordine verrà emessa una fattura pro-forma, comprensiva di spese postali e bancarie e si provvederà all'invio del materiale al ricevimento del pagamento della stessa.



**EFFETTO DELLE CONDIZIONI DI MAGAZZINAGGIO  
SUL CONTENUTO DI LICOPENE IN PASSATI  
DI POMODORO OTTENUTI CON DIFFERENTI  
TECNICHE DI PREPARAZIONE**

**EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON LYCOPENE  
CONTENT IN TOMATO PUREES OBTAINED  
WITH DIFFERENT PROCESSING TECHNIQUES**

Rocco Tamburini\*  
Luca Sandei  
Antonio Aldini  
Francesco De Sio\*\*  
Carlo Leoni

SSICA  
Stazione Sperimentale  
per l'Industria delle  
Conserve Alimentari,  
V.le Tanara 31/A -  
43100 Parma (Italia)

\* Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia degli Alimenti della Facoltà di Agraria dell'Università di Parma

\*\* SSICA - Sede di Angri, SA

Riassunto

Sono stati preparati campioni di passata di pomodoro, variando le modalità d'estrazione del succo sia dal punto di vista della temperatura d'inattivazione enzimatica, sia da quello delle dimensioni delle luci di passaggio dei setacci di spremitura e seguendo poi le variazioni del contenuto di licopene in rapporto a differenti condizioni di magazzinaggio.

Il trattamento termico in sé abbassa di poco il contenuto di licopene iniziale, mentre l'abbassamento di concentrazione di licopene che si riscontra nel tempo è legato al tipo di trattamento termico utilizzato per l'estrazione del succo. Con il processo Hot-Break, la concentrazione del licopene rimane quasi inalterata anche dopo 12 mesi di stoccaggio preservando il pigmento meglio di quanto avvenga per derivati ottenuti con la modalità Cold-Break o con estrazione a freddo del succo. Una spiegazione plausibile può essere che l'inattivazione enzimatica consente di mantenere pressoché inalterata la struttura cellulare del pomodoro, per cui la degradazione del licopene risulta sfavorita rispetto a quanto avviene in altri prodotti, nei quali l'azione enzimatica causa la distruzione delle membrane cellulari e quindi espone il licopene ai fenomeni di ossidazione e isomerizzazione chimica.

Nessun effetto tecnologicamente interessante sembra invece essere correlato alle dimensioni dei setacci e alle temperature di magazzinaggio.

Abstract

*Samples of tomato puree were prepared by varying juice extraction with regard to both enzyme inactivation temperature and pulper hole size. Changes in lycopene content of the tomato purees subjected to different storage conditions were then monitored.*

*The heat treatment itself lowers only slightly the initial lycopene content, whereas the decrease in lycopene level over time is linked to the type of heat treatment used in juice extraction. Hot-Break treatment allows lycopene concentration to remain almost unchanged even after 12 months' storage, unlike what happens in tomato products obtained either using the Cold-Break method or the room-temperature juice extraction method. An acceptable assumption is that enzyme inactivation maintains tomato cell structure almost intact, with the result that lycopene degradation is limited in comparison with the one occurring in other tomato products, in which enzyme action destroys cell membranes and therefore makes lycopene liable to oxidation and to chemical-isomerisation phenomena.*

*Instead, no technologically interesting effects seem to be related either to pulper hole size or to storage temperature.*

Key-words: *lycopene, tomato products, processing techniques*



## INTRODUZIONE

Sono universalmente riconosciuti i benefici effetti per la salute umana di un'alimentazione ricca di frutta e ortaggi. Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato l'importanza nella dieta di frutta e ortaggi al fine di prevenire l'insorgenza di malattie cardiovascolari (CVD) e di alcune forme tumorali (1-6) riferibili genericamente a danni di tipo ossidativo. Infatti la mancata inattivazione dei radicali liberi può esplicarsi in mutazioni del DNA, modificazioni delle proteine e dei lipidi con conseguenti alterazioni enzimatiche della struttura e delle funzioni della cellula e interazioni con i carboidrati con possibili disfunzioni a carico dei recettori. A seguito di queste alterazioni ossidative possono insorgere delle patologie gravi quali tumori, neoplasie interepiteliali della cervice uterina, pancreatiti, cataratte, precoce invecchiamento, malattie infiammatorie, malattie cardiovascolari. Per questo un'adeguata assunzione di frutta e ortaggi che contengono consistenti quantità di prodotti antiossidanti contribuisce a ridurre la probabilità che questi effetti degenerativi possano attivarsi.

In particolare, studi epidemiologici (1-6) hanno ipotizzato che un consumo abbondante di pomodoro e dei suoi derivati sia inversamente correlato con il rischio di insorgenza di tumori dell'apparato digerente e della prostata e che i rischi di tali malattie aumentino in corrispondenza di uno scarso consumo di pomodoro. D'altra parte, il pomodoro è uno dei costituenti base della *dieta mediterranea*, associata da tempo ad una ridotta insorgenza delle CVD. Fra i possibili costituenti del pomodoro che possono esercitare tale azione protettiva è stato individuato il licopene (7-11), antiossidante naturale responsabile della caratteristica colorazione rossa, in considerazione del fatto che il licopene è presente quasi esclusivamente in questo vegetale (oltre che nel cocomero, guava e pompelmo rosa) (12). Il pomodoro fornisce una notevole dose di prodotti antiossidanti (licopene in particolare) e di conseguenza contribuisce a costituire un patrimonio di sostanze con attività preventiva contro i danni ossidativi citati in precedenza.

Studi sperimentali riportano che il licopene esplica attività antiossidante, per la capacità, derivante dalla sua struttura chimica, di agire come *Oxygen Singlet Quenching* o *Free Radical Scavenger*, inattivando l'ossigeno nello stato singoletto, oltre che nelle altre specie reattive e altri tipi di radicali liberi. Conseguentemente riduce la proliferazione cellulare e interferisce con la crescita delle cellule tumorali. Inoltre i pomodori sono importanti fonti di vitamina C, potassio, vitamina E (nei semi) e acido folico oltre che di carotenoidi ( $\beta$ - e  $\gamma$ -carotene, fitoene), selenio, flavonoidi e acidi

## INTRODUCTION

*The beneficial effects on human health of a food intake rich in fruits and vegetables are unanimously recognised. Numerous epidemiological studies have stressed the importance of dietary fruits and vegetables for the prevention of cardiovascular diseases (CVD) and certain forms of cancer (1-6) generically related to oxidative damages. Indeed, the lack of free-radical inactivation may cause DNA mutations, changes in proteins and lipids resulting in enzyme-induced significant alterations in cell structure and functions and interactions with carbohydrates, with receptor dysfunctions as a consequence. Because of these oxidative damages, serious diseases may develop such as tumors, interepithelial cervix carcinoma, pancreatitis, cataract, premature old age, inflammatory diseases and CVD. Therefore, an appropriate intake of fruits and vegetables containing high amounts of antioxidants helps to reduce the probability of the occurrence of these degenerative effects.*

*In particular, epidemiological studies (1-6) have hypothesised that a high consumption of tomatoes and tomato products is inversely associated with the risk of developing digestive tract and prostate cancers and that the risk of the development of these diseases occurs with low tomato consumption. On the other hand, tomatoes form a crucial part of the Mediterranean diet, which has long since been linked to a low CVD incidence. Lycopene, a natural antioxidant responsible for the red colour typical of tomatoes, has been identified as one of its constituents able to exert the above protective effect (7-11) in view of the fact that it is found almost solely in this vegetable (it also occurs in watermelon, guava and ruby grapefruit) (12). Being very rich in antioxidants (and especially lycopene), tomatoes contribute to the formation of a group of substances able to prevent human health from being impaired by the oxidative damages already mentioned.*

*Experimental studies report that lycopene exhibits an antioxidant activity as a result of its capability, deriving from its chemical structure, to act as a Singlet Oxygen Quencher or a Free Radical Scavenger by inactivating oxygen in the singlet state as well as in other reactive species and other types of free radicals. As a consequence, it represses cell proliferation and interferes with the development of tumoral cells. In addition, tomatoes are also a rich source of vitamin C, potassium, vitamin E (in the seeds) and folic acid as well as of carotenoids ( $\beta$ - and  $\gamma$ -carotene, phytoene), selenium, flavonoids and phenolic acids which may enhance the disease-preventing action mentioned previously (13, 14).*



fenolici, che possono rafforzare l'azione preventiva citata (13, 14).

Durante la maturazione, il pomodoro passa da un colore verde, tipico delle clorofille, ad un colore rosa-arancio, fino ad un colore rosso intenso conferito al frutto dallo sviluppo dei carotenoidi. I carotenoidi sono dei polieni, in particolare tetra-terpeni e derivano dalla condensazione testa-coda (con legami 1,4) di più unità isopreniche; si dividono in xantofille, che sono carotenoidi ossigenati, e caroteni, costituiti esclusivamente da carbonio e idrogeno. Presentano un sistema di doppi legami quasi completamente coniugati, che conferisce loro il tipico assorbimento della luce visibile.

Fra i carotenoidi presenti nel pomodoro maturo, il licopene, di colore rosso, è l'ultimo a comparire e la sua formazione aumenta in particolare dopo la fase di invaiatura (passaggio da verde a rosa) del frutto. Si conosce ancora poco sull'influenza delle tecniche colturali e dei fattori pedoclimatici sul contenuto di antiossidanti nel pomodoro. È evidente comunque che fattori come acqua, concimazione, temperatura e luce possono influire sulla concentrazione dei carotenoidi così come la varietà, il grado di maturazione, il tempo di raccolta, le condizioni di crescita e di magazzino (15).

La formazione del licopene, ad esempio, risulta inibita a temperature superiori a 30°-32°C, mentre è favorita fra i 16°-21°C. Gli altri caroteni invece sono presenti in concentrazioni minori rispetto al licopene che rappresenta, nel pomodoro maturo, l'85% dei carotenoidi totali (16). All'interno del frutto la concentrazione di licopene risulta maggiore nella parte più esterna delle cellule del mesocarpo; qui viene accumulato in vescicole (cloroplasti invecchiati) che derivano dalla trasformazione - degenerazione dei cloroplasti e che costituiscono con le molecole dei carotenoidi gli LHC (*light heaping complexes*, complessi che captano la luce), costituiti da sequenze di proteine idrofobiche, legate alla membrana, contenenti diverse molecole di pigmento coagulato in forma di cristalli aghiformi allungati (17). Fra i fattori che influenzano la biosintesi di questi composti, oltre alla temperatura precedentemente menzionata, vi sono il grado di maturazione e la presenza di luce, che influenza la conversione di fitoene a licopene e  $\beta$ -carotene.

## IL LICOPENE

La formula del licopene è  $C_{40}H_{56}$ ; esso è caratterizzato da una struttura aciclica simmetrica, con 13 doppi legami, 11 dei quali coniugati al centro della molecola. A causa della sua struttura molecolare, esiste la possibilità di una serie grandissi-

*During ripening, tomatoes change in colour from green, typical of chlorophylls, through pink-orange to bright red, due to the development of carotenoids. These are polyenes, in particular tetraterpenes, which originate from a head-to-tail condensation (with 1,4-bonds) of several isoprene units; they are divided into xanthophylls, which are oxygen-containing carotenoids, and carotenes, which consist solely of hydrogen and carbon atoms. They present a long chain of double bonds, most of which are conjugated. To this chain is due their typical absorption of light in the visible region.*

*Of the carotenoids occurring in ripe tomatoes, lycopene, red in colour, is the last to form and its formation increases especially after the breaker stage (colour change from green to pink) of the berry. So far, little is known on the effects of agricultural practices and soil/climate factors on the oxidant content of tomatoes. It is plain, anyhow, that factors such as water, fertilisation, temperature and light have a bearing on carotenoid level in tomatoes, as have variety, degree of maturity, harvest date, fruit growth and post-harvest storage (15).*

*Lycopene formation, for example, is inhibited at temperatures above 30°-32°C, whereas it is favoured at temperatures from 16° to 21°C. The other carotenes occur at levels lower than that of lycopene which, in ripe tomatoes, is 85% of total carotenoids (16). Within the berry, lycopene level is higher in the outermost part of the mesocarp's cells; here it builds up in vesicles (aged chloroplasts) which originate from chloroplast transformation-degeneration and which form, with the carotenoid molecules, the so-called LHC (light-heaping complexes). These complexes consist of sequences of hydrophobic membrane-linked proteins containing several pigment molecules coagulated in the form of elongated needle-shaped crystals (17). Among the factors that influence the biosynthesis of these compounds are, in addition to temperature (as already mentioned), degree of maturation and light; light, in particular, favours conversion of phytoene to lycopene and  $\beta$ -carotene.*

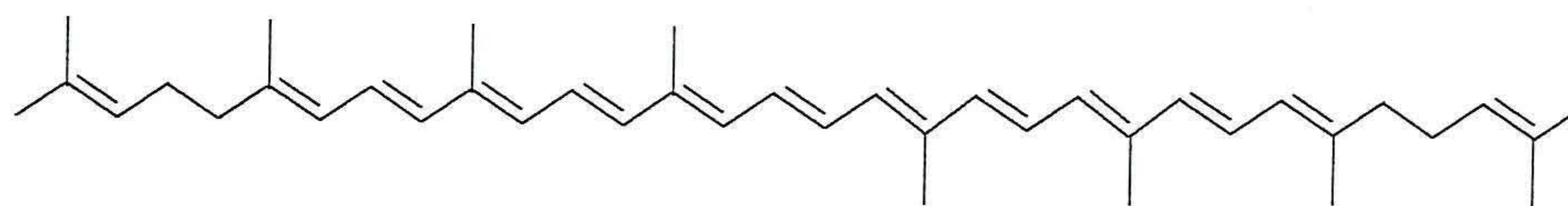
## LYCOPENE

*Its molecular formula is  $C_{40}H_{56}$ ; it is characterised by a symmetrical and acyclic structure containing 13 carbon-carbon double bonds of which eleven, in the central part of the molecule, are conjugated. Because of its molecular structure, a most wide array of stereoisomers of the pigment in the cis-(or Z-) and trans-(or E-) configuration ( $2^{11}=2048$ ) is theoretically possible; practically,*



ma di stereoisomeri nelle forme *cis* - (o *Z*-) e *trans* - (o *E*-) ( $2^{11} = 2048$ ); in pratica a causa degli impedimenti sterici, solo alcuni gruppi etilenici possono essere effettivamente interessati dalla stereoisomeria. In natura sono presenti quasi esclusivamente sotto forma di isomeri *olo-trans* (o *olo-E*).

however, owing to steric hindrance, only some ethylenic groups can participate in stereoisomerisation. In nature, lycopene from plant sources occurs predominantly in the all-trans (or all-E) forms.



Licopene ( $\psi, \psi$  carotene)

Il licopene, come tutti i carotenoidi, è una sostanza apolare, fotosensibile ma particolarmente stabile in sospensione acquosa all'azione delle alte temperature e dell'ossidazione e, al contrario, particolarmente sensibile in soluzione. Le principali caratteristiche chimico-fisiche sono riassunte nella Tabella 1.

Lycopene, like all carotenoids, is an apolar, photosensitive substance. In aqueous suspension, it is practically stable to high temperatures and oxidation whereas, in solution in organic solvents, it is quite sensitive to both. The main physico-chemical properties of lycopene are summarized in Table 1.

Un problema aperto e fondamentale per confermare la citata azione protettiva del licopene è valutarne l'effettiva biodisponibilità per l'uomo (nelle forme nelle quali si può presentare nel pomodoro fresco e nei suoi derivati industriali). Sebbene esista un considerevole numero di studi comparativi al riguardo, non esistono metodi sicuri per valutare quantitativamente la disponibilità dei carotenoidi, anche nel caso del  $\beta$ -carotene, che è il componente studiato maggiormente in quanto presente in molti vegetali. Ci sono alcuni studi provati sull'uomo per valutare la biodisponibilità del licopene, uno dei quali rivela che l'assorbimento è maggiore per il succo di pomodoro trattato termicamente rispetto al succo non trattato (18) e un altro che l'assorbimento attraverso il

A still open problem of primary importance for the confirmation of lycopene protective action is the evaluation of the actual bioavailability of the pigment (in the forms in which it is present in raw tomatoes and in tomato products) for humans. Although a considerable number of comparative studies have been published on this topic, there are no reliable methods for the quantitative assessment of carotenoid bioavailability, even in the case of  $\beta$ -carotene, which is the most widely studied component because of its occurrence in many fruits and vegetables. There are only two studies on lycopene bioavailability for man, one indicating that absorption of the pigment is greater from heat-treated tomato juice than from untreated juice (18) and the other stating that absorption from

TAB. 1 - Principali caratteristiche chimico-fisiche del licopene.

TABLE 1 - Main physico-chemical characteristics of lycopene.

Parametro Parameter	Valori Values	Note Notes
punto di fusione melting point	172-173°C	
$\lambda$ di massimo assorb. $\lambda$ max absorbance UV-Vis	I° 444-458 nm II° 470-487 nm III° 502-522 nm	Gli intervalli sono in funzione del solvente Ranges are a function of the solvent
$\epsilon_{mol}$	180600 cm <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	in benzene in benzene (487 nm)
	184900 cm <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	in etere di petrolio in petr. ether (470 nm)
bande IR IR bands	I° 1629 cm <sup>-1</sup>	debole weak
	II° 1559 cm <sup>-1</sup>	debole weak
	III° 960 cm <sup>-1</sup>	abbastanza forte quite strong
solubilità solubility	0	acqua water
	bassa low	solventi organici polari polar organic solvents
	altissima very high	solventi organici apolari apolar organic solvents



concentrato è maggiore rispetto a quello attraverso il pomodoro fresco (19).

Quello che sembra certo, comunque, è che lo stato fisico e il tipo di trattamento tecnologico di preparazione possono giocare un ruolo decisivo sulla disponibilità di questi componenti e ne consegue che il grado di distruzione della matrice e i trattamenti termici subiti possono fornire utili previsioni sulla biodisponibilità. È anche noto che la biodisponibilità è fortemente condizionata dalla concomitante presenza di lipidi nella dieta in quanto questi hanno un ruolo fondamentale di estrazione dei carotenoidi dalla fase acquosa con formazione di micelle miste attraverso le quali i carotenoidi vengono assorbiti dagli enterociti (20-22) e trasferiti ai tessuti (via le lipoproteine del plasma) (20, 23-25). I carotenoidi sono assorbiti in modo automatico come composti lipofili (20, 21) e la loro biodisponibilità può essere alterata da quei fattori che possono modificarne il trasporto di massa dall'alimento alle micelle (22), in altre parole l'assorbimento da parte dell'intestino. Ad esempio, l'assorbimento è facilitato dalla cottura e dall'omogeneizzazione dei cibi (17, 19) e più in generale da ogni trattamento che causi rottura della struttura cellulare e dalla cottura in presenza di lipidi (15).

Ad oggi, tuttavia, i dati non consentono di fornire risultati certi su quali possano essere i derivati industriali, la tecnica produttiva o l'associazione alimentare più efficaci per garantire la migliore biodisponibilità.

In questo primo lavoro, parziale elaborazione di una tesi del Corso di laurea in Scienza e Tecnologia degli Alimenti della Facoltà di Agraria della Università degli Studi di Parma, vengono riportati i risultati dell'effetto delle condizioni di magazzinaggio sul contenuto in licopene di passati di pomodoro ottenuti con differenti tecniche di preparazione.

## MATERIALI E METODI

Le prove sono state condotte utilizzando gli impianti pilota della SSICA di Parma.

Sono stati preparati campioni di passata di pomodoro, secondo la prassi tradizionale di estrazione del succo, parziale concentrazione sotto vuoto a residuo rifrattometrico 8°Brix, riempimento a caldo in scatole di banda stagnata verniciata, variando le modalità d'estrazione del succo (temperatura ambiente, *Cold-Break* e *Hot-Break*) e tipo di setacci della passatrice. Si sono quindi studiate per un periodo di dodici mesi le variazioni del contenuto di licopene in rapporto a differenti condizioni di magazzinaggio.

I parametri variati sono stati:

- 1) temperatura di estrazione del succo:
  - ambiente
  - 60°C (*Cold-Break*)
  - 90°C (*Hot-Break*).

*tomato paste is greater than that from fresh tomatoes (19).*

*Anyhow, what appears to be certain is that the physical state and the processing technique can decidedly affect the bioavailability of these compounds; it follows that the degree of disruption of the food matrix and the heat-treatments applied can yield useful provisions with regard to bioavailability. It is also known that bioavailability is strongly affected by the fat content of the diet, fats being essential for carotenoid extraction from the aqueous bulk of the food with the formation of mixed micelles through which the carotenoids are absorbed by enterocytes (20-22) and transferred to the tissues (via plasma lipoproteins) (20, 23-25). Carotenoids are passively absorbed as lipophilic compounds (20, 21) and their bioavailability can therefore be affected by those factors that influence their mass transfer from the food to the micelles (22), in other words, absorption by the gut. For example, absorption is facilitated by cooking and food homogenisation (17, 19) and, more generally, by any treatment that breaks down cell structure and by cooking in the presence of fats (15).*

*However, it is impossible, on the basis of the experimental data obtained so far, to indicate the kind of tomato product, processing technique or dietary composition which will warrant maximum bioavailability.*

*This first work, which is a partial elaboration of a thesis for the degree in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Parma, reports the results of the effects of storage conditions on the lycopene content of tomato purees obtained with different processing techniques.*

## MATERIALS AND METHODS

*The trials were conducted using the pilot plants of the Experimental Station for the Food Preserving Industry (SSICA).*

*Samples of tomato puree were prepared first by extracting the juice, according to the conventional technique, varying extraction temperature and pulper hole size, then by vacuum-concentrating the juice to 8° Brix and finally by hot-filling it in lacquered tinfoil cans. The samples obtained were subjected to different storage conditions and the changes in lycopene content were monitored over a 12-month period.*

*The parameters varied were:*

- 1) *juice extraction temperature:*
  - room temperature
  - 60°C (*Cold-Break*)
  - 90°C (*Hot-Break*).
- 2) *hole size of the pulper:*
  - 0.8 mm
  - 1.3 mm.



2) luce di passaggio dei setacci della passatrice:

- 0,8 mm
- 1,3 mm.

Si sono ottenuti in tal modo sei tipi di passate con caratteristiche fisiche (consistenza, colore e granulometria) differenti.

I sei prodotti sono stati poi suddivisi in quattro lotti e messi in celle termostatiche operanti a 18° e 26°C (limiti estremi di condizioni di magazzinaggio che possono essere considerate a basse temperature) e a 30° e 37°C (alte temperature).

Sui campioni prelevati dalle celle dopo i diversi tempi di magazzinaggio è stata effettuata l'estrazione e la determinazione del contenuto di licopene.

## 1. ESTRAZIONE LICOPENE

Il metodo di estrazione utilizzato è simile, a meno di alcune modifiche, a quello per i vegetali e i loro derivati illustrato da D. J. Hart e K. J. Scott (26).

### 1.1 - Reattivi:

- Tetraidrofurano (Carlo Erba)
- Metanolo (Carlo Erba)
- Etere di petrolio 40° - 60°C (Prolabo)
- Acqua bidistillata
- Complesso carbonato-idrossido di magnesio pentaidrato (Sigma)
- Butilenidrossitoluene (Sigma)
- Sodio cloruro (Carlo Erba).

### 1.2 - Attrezzature:

- Bilancia tecnica TM 8120 (Gibertini)
- IKA-Ultra-Turrax T 25 (Junke & Kunkel GmbH & Co KG)
- Filtri in fibra di vetro GF/A (Whatman)
- Filtri da 0,45 mm HVLP (Millipore)
- Vetreria di classe A.

### 1.3 - Metodo.

Si pesano 5 g di passata in una beuta da 250 mL; dopo aggiunta di 1 g di carbonato-idrossido di magnesio per neutralizzare gli acidi organici presenti e 50 mL di una miscela di tetraidrofurano-metanolo (THF:CH<sub>3</sub>OH) 1:1 (v/v); i carotenoidi sono estratti dalla matrice vegetale dopo omogeneizzazione con Ultra-Turrax per 1 minuto circa a 24.000 rpm/min e lavaggio del puntale con 50 mL della miscela THF:CH<sub>3</sub>OH.

La sospensione così ottenuta viene filtrata attraverso un filtro di fibra di vetro in imbuto Buchner sotto vuoto; si lava poi con due successive aliquote di miscela THF:CH<sub>3</sub>OH e si trasferisce il filtrato, a filtro completamente asciutto, in un imbuto separatore, aggiungendo poi 50 mL di etere di petrolio contenente lo 0,1% di butilato di idrossitoluene (BHT) e 50 mL di una soluzione acquosa al 10% di NaCl.

Si agita la miscela ottenuta con cura evitando di creare schiume e si lascia riposare, oscurata da un foglio di alluminio, per 10 minuti, per permettere la separazione di due fasi: una inferiore contenente THF/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O e una superiore di etere di petrolio, che risulta fortemente colorata. La fase THF/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O viene trasferita in un secondo imbuto separatore, mentre la fase eterea è posta in un pallone coperto da alluminio da 250 mL. La mi-

*In this way, six kinds of tomato puree with different physical characteristics (consistency, colour and granulometry) were obtained.*

*The six products were then divided into four lots and placed at 18° and 26°C (extreme limits of storage conditions which can be considered at low temperatures) and at 30° and 37°C (high temperatures).*

*Lycopene was extracted from the samples stored for different times and temperatures and then quantified.*

## 1. LYCOPENE EXTRACTION

*The extraction technique used is similar, except for some modifications, to the one reported by D. J. Hart and K. J. Scott for vegetables and their processed products (26).*

### 1.1 - Reagents:

- Tetrahydrofuran (Carlo Erba)
- Methanol (Carlo Erba)
- Petroleum ether, b.p. between 40-60°C (Prolabo)
- Double-distilled water
- Complex magnesium carbonate hydroxide pentahydrate (Sigma)
- Butylated hydroxytoluene (BHT)
- Sodium chloride (Carlo Erba).

### 1.2 - Apparatus:

- TM 8120 technical balance (Gibertini)
- T 25 IKA-Ultra-Turrax (Junke & Kunkel GmbH & Co KG)
- GF/A glass-fiber filter (Whatman)
- HVLP 0,45 mm filters (Millipore)
- Class A glassware.

### 1.3 - Method.

*5 g of tomato puree is weighed into a 250 mL flask; 1 g of magnesium carbonate hydroxide (to neutralize the organic acids present) and 50 mL of tetrahydrofuran - methanol (1+1, v/v) (THF-CH<sub>3</sub>OH) is then added. The carotenoids are extracted from the vegetable matrix after homogenization on an Ultra-Turrax for 1 min at about 24,000 rpm/min and washing of the shaft with 50 mL of THF-CH<sub>3</sub>OH.*

*The suspension obtained is vacuum-filtered through a Buchner funnel fitted with a glass-fiber filter; the funnel is then washed with two 50-mL THF-CH<sub>3</sub>OH aliquots. As soon as the filter is completely dry, the filtrate is transferred to a separatory funnel. 50 mL petroleum ether containing 0.1% BHT and 50 mL of a 10% aqueous solution of NaCl are then added to the filtrate in the funnel.*

*The mixture obtained is shaken carefully, avoiding at the same time formation of foam, then the funnel is wrapped in an aluminium foil and the mixture is allowed to stand for 10 min to permit the separation into two phases: a lower one containing THF/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O and an upper one consisting of brightly coloured petroleum ether. The lower phase is then transferred to another separatory funnel, whereas the petroleum ether phase is drained into a 250 mL round-bottom flask wrapped in an Al foil. The mixture in the funnel is washed with 250-mL petroleum ether (+0.1% BHT) aliquots. After shaking, two phases are again obtained, which are separated in the same way as just descri-*



scela nell'imbuto è lavata con due aliquote successive di 50 mL di etere (+ 0,1% BHT). Dopo agitazione si ottengono ancora le due fasi che vengono separate allo stesso modo. Quelle eterie riunite nel pallone sono fatte evaporare quasi a secchezza a 35°C sottovuoto in Rotavapor. Il residuo colorato (rosso-arancio) è quindi disciolto in 20 mL di THF all'interno di una provetta che viene poi adeguatamente protetta con parafilm e foglio di alluminio.

I campioni così estratti sono riposti in freezer al buio a -20°C per essere analizzati entro le 48 ore successive.

## 2. ESTRAZIONE $\beta$ -APO-8'-CAROTENALE

Il  $\beta$ -apo-8'-carotenale è un prodotto di sintesi, non presente in natura, che viene utilizzato come standard interno per valutare il grado di estrazione; naturalmente, la valutazione può essere solo parziale in quanto lo standard non viene estratto dalla matrice vegetale, ma è semplicemente aggiunto alla stessa in quantità nota.

### 2.1 - Reattivi:

gli stessi elencati al punto 1.1 e in più:

- solfato di sodio anidro (Carlo Erba)
- polvere contenente circa lo 0,1% di  $\beta$ -apo-8'-carotenale (Fluka).

2.2 - Attrezzature: le stesse elencate al punto 1.2.

### 2.3 - Metodo.

Si pesano esattamente circa 0,2 gr di sostanza grezza di  $\beta$ -apo-8'-carotenale in un pallone Kohlrausch da 100 mL e si sciolgono in acqua distillata portando poi a volume. Si versa quindi la soluzione in un imbuto separatore e si estrae quindi una prima volta con 100 mL di una soluzione metanolo-etere di petrolio + 0,1% di BHT 1:1 (v/v). Si effettua poi una seconda estrazione con la stessa miscela aggiungendo in più 50 mL di una soluzione di acqua distillata al 10% di sodio cloruro.

Si ripete l'estrazione altre volte, finché si nota ancora una persistente colorazione gialla nella fase polare, utilizzando ogni volta 100 mL della soluzione metanolo-etere di petrolio + 0,1% di BHT 1:1 (v/v).

Si riuniscono le fasi organiche in un becker da 300 mL e si disidratano aggiungendo solfato di sodio anidro (circa 2 cucchiaini). Si lascia a riposo per 45 minuti e si filtra con filtro di vetro su un imbuto Buchner sottovuoto, lavando poi il filtro con due aliquote da 50 mL di THF. Il filtrato è trasferito in un pallone da 500 mL, lavando con 50 mL di THF e si porta a secchezza in Rotavapor. Si riprende il residuo di evaporazione con 20 mL di THF.

## 3. PREPARAZIONE DEGLI STANDARDS

### 3.1 - Reattivi:

- Tetraidrofurano (Carlo Erba)
- n-Esano (J. T. Baker)

The petroleum ether phases are pooled in the flat-bottom flask and vacuum-evaporated to near dryness at 35°C on a Rotavapor. The orange-red residue obtained is dissolved in 20 mL THF in a test tube, which straight afterwards is suitably wrapped in parafilm and Al foil.

The samples are then stored at -20°C in the dark and analyzed within 48 hours.

## 2. EXTRACTION OF $\beta$ -APO-8'-CAROTENAL

$\beta$ -apo-8'-carotenal is a synthetic product used as an internal standard to evaluate the degree of extraction; of course, the evaluation can only be a partial one because the standard is not extracted from the vegetable matrix, but is merely added to it in a known amount.

### 2.1 - Reagents:

the same as those listed in 1.1 and in addition:

- anhydrous sodium sulfate (Carlo Erba)
- powder containing about 0.1%  $\beta$ -apo-8'-carotenal (Fluka).

2.2 - Apparatus: the same as that listed in 1.2.

### 2.3 - Method.

About 0.2 g of unpurified  $\beta$ -apo-8'-carotenal is accurately weighed into a 100 mL Kohlrausch flask and dissolved in distilled water; the solution is then diluted to the mark. The solution is transferred to a separatory funnel and extracted with 100 mL of methanol-petroleum ether (1 + 1, v/v) + 0.1% BHT. A second extraction is accomplished with the same mixture plus 50 mL of a 10% NaCl solution in distilled water.

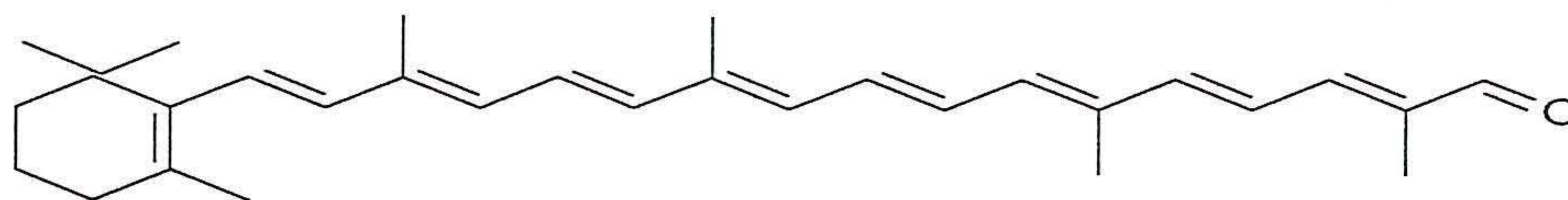
The extraction is repeated as long as the polar phase exhibits a persistent yellow colour, using each time 100 mL of methanol-petroleum ether + 0.1% BHT.

The organic phases are combined in a 300-mL beaker and dehydrated by adding about 2 spoonfuls of anhydrous sodium sulfate. The mixture is allowed to stand for 45 min, then is filtered with suction through a Buchner funnel containing a glass-fiber filter. This is then washed with two 50-mL THF aliquots. The filtrate is transferred to a 500 mL round-bottom flask, while washing with 50 mL THF, and evaporated to dryness on a Rotavapor. The residue is taken up with 20 mL THF.

## 3. PREPARATION OF STANDARD

### 3.1 - Reagents:

- Tetrahydrofuran (Carlo Erba)
- n-Hexane (J. T. Baker)
- Lycopene from tomato powder (5 mg), 90-95% purity (Sigma)
- Powder containing about 0.1% of  $\beta$ -apo-8'-carotenal (Fluka).



$\beta$ -apo-8'-carotenale



- Licopene di pomodoro in polvere (5 mg) con purezza del 90 – 95% (Sigma)
- Polvere contenente circa lo 0,1% di  $\beta$ -apo-8'-carotenale (Fluka).

### 3.2 - Attrezzature:

- Vetreria di classe A
- Spettrofotometro UV-VIS mod. 7800 JASCO.

### 3.3 - Metodo.

Prevede la taratura *a posteriori* dello standard, mediante lettura allo spettrofotometro, conoscendo l'estinzione molare del licopene e del  $\beta$ -apo-8'-carotenale. Si preleva con uno specillo una piccola quantità di licopene trasferendola in un pallone da Rotavapor e sciogliendolo in THF + 0,1% di BHT; si fa evaporare fino a un volume di circa 4 mL e si trasferisce la soluzione così ottenuta in una Vial ambrata che viene conservata al buio in freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Al momento dell'analisi spettrofotometrica, si diluisce 25-50 (in base alla quantità di standard prelevato) volte con esano, si filtra e si effettua una lettura spettrofotometrica di assorbanza alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di massimo assorbimento in esano (471 nm per il licopene e 461 per il  $\beta$ -apo-8'-carotenale). Il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) tabulato per il licopene in esano è  $0,365 \text{ (cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L)}$ , quello del  $\beta$ -apo-8'-carotenale è  $0,2640 \text{ (cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L)}$ . Dal valore di assorbanza si risale alle rispettive concentrazioni applicando la legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

da cui:

$$C = A/\epsilon \cdot l$$

dove:

C = concentrazione in  $\text{mg L}^{-1}$

A = assorbanza a 471 o 461 nm

l = lunghezza della cella.

## 4. DETERMINAZIONE CON HPLC

### 4.1 - Reattivi:

- Acetonitrile (Carlo Erba)
- Metanolo (Carlo Erba)
- Diclorometano (Carlo Erba)
- Butilenidrossitoluene (Sigma)
- Trietilammina (Sigma)
- Acetato d'ammonio (Carlo Erba)
- Tetraidrofurano (Carlo Erba).

### 4.2 - Attrezzature:

- Filtri HVLP da  $0,45 \mu\text{m}$  (Millipore)
- Filtri per siringa MILLEX – HV da  $0,45 \mu\text{m}$  (Millipore)
- Vials scure
- Cromatografo HPLC, costituito di:
  - autocampionatore 712 Wisp Waters (Millipore);
  - pompa per HPLC mod. 510 Waters (Millipore);
  - rivelatore Programmable Multiwavelength Detector 490E Waters (Millipore), collegato a due interfacce modulari del tipo System Interface Module Waters che trasferiscono un segnale a un programma di gestione per HPLC Maxima 820, Chromatography Workstation, Dinamic Solutions, Versione 3.3;
  - sistema di colonne comprendenti un prefiltro di lunghezza di 10 mm e porosità  $5 \mu\text{m}$  del tipo "me-

### 3.2 - Apparatus:

- Class A glassware
- JASCO mod. 7800 UV-VIS spectrophotometer.

### 3.3 - Method.

This requires an *a posteriori* calibration of the standard by spectrophotometric reading, based on the molar extinction of lycopene and  $\beta$ -apo-8'-carotenal. A small amount of lycopene, taken by means of a probe, is transferred to a Rotavapor flask and dissolved in THF + 0.1% BHT. The solution is evaporated to about 4 mL and transferred to an amber vial, which is then stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  in the dark. For the spectrophotometric analysis, the solution is diluted 25-50-fold (depending on the amount of standard taken) with hexane and filtered. A spectrophotometric absorbance reading on the solution is then performed at the wavelength of pigment's maximum absorption in hexane (471 and 461 nm for lycopene and  $\beta$ -apo-8'-carotenal, respectively). The literature values for lycopene and  $\beta$ -apo-8'-carotenal molar extinction ( $\epsilon$ ) are  $0.365$  and  $0.2640 \text{ (cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L)}$ , respectively. From the absorbance value the corresponding pigment concentration can be obtained by applying the Lambert-Beer law:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

hence:

$$C = A/\epsilon \cdot l$$

where:

C = concentration in  $\text{mg/L}^{-1}$

A = absorbance at 471 or 461 nm

l = cell length.

## 4. HPLC DETERMINATION

### 4.1 - Reagents:

- Acetonitrile (Carlo Erba)
- Methanol (Carlo Erba)
- Dichloromethane (Carlo Erba)
- Butylated hydroxytoluene (Sigma)
- Triethylamine (Sigma)
- Ammonium acetate (Carlo Erba)
- Tetrahydrofuran (Carlo Erba).

### 4.2 - Apparatus:

- $0.45 \mu\text{m}$  HVLP filters (Millipore)
- $0.45 \mu\text{m}$  MILLEX-HV syringe filters (Millipore)
- Dark vials
- Liquid chromatograph consisting of:
  - Waters mod. 712 Wisp autosampler;
  - Waters mod. 510 solvent delivery pump (Millipore);
  - Waters mod. 490E programmable multiwavelength detector (Millipore) connected to two modular interfaces of a Waters System Interface Module which transferred a signal to an HPLC management program Maxima 820, Chromatography Workstation, Dynamic Solution, Version 3.3;
  - a column system comprising: a 10 mm,  $5 \mu\text{m}$ , metal-free guard ODS-2 prefilter (Alltech) linked to a  $100 \times 4.6 \text{ mm}$  Partisil 5 ODS column (Whatman), connected to a  $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  Vydac 201 TP54 standard-bore C18 analytical column (The Separations Group, Inc., Hesperia CA, USA) modified by the replacement of metal frits with "bio-compatible" Teflon frits (Alltech).



tal-free guard ODS 2" (*The Separations Group, Inc., Hesperia CA, USA*), connesso a una precolonna da 100 mm di lunghezza per 4,6 mm di diametro mod. Partisil 5 ODS-2 (Whatman), collegato a una colonna analitica C18 standard bore del tipo 201 TP 54 Vydac (Alltech) di dimensioni 250 mm di lunghezza e 4,6 mm di diametro con particelle da 5  $\mu\text{m}$  e modificata con l'impiego di Frits biocompatibili (Alltech) in teflon al posto di quelli in metallo.

#### 4.3 - Metodo.

Prima di effettuare l'iniezione nel sistema HPLC gli estratti conservati in freezer sono diluiti 50 volte e filtrati attraverso filtri Millipore PVDF da 0,45  $\mu\text{m}$  per avere una concentrazione nelle Vials di circa 1,5-3,0 ppm; si tara l'autocampionatore in modo da iniettare 20  $\mu\text{L}$  del campione da analizzare nel sistema HPLC e si regola la pompa a pistoni per ottenere un flusso isocratico di 1,5 mL/minuto e una pressione di circa 2000 psi (~136 atm). La fase mobile è composta da acetonitrile, metanolo e diclorometano ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) in rapporto 75:20:5 (v/v/v), con aggiunta dello 0,1% di BHT come antiossidante e dello 0,05% di trietilamina (TEA). Il metanolo a sua volta è addizionato di acetato di ammonio 0,05 M. La fase mobile prima dell'impiego deve essere filtrata attraverso un filtro a membrana PTFE e degassata.

Il sistema delle colonne deve essere mantenuto, durante le analisi, a temperatura ambiente costante ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) per ottenere una buona separazione del licopene.

La determinazione quantitativa del licopene è ottenuta con la tecnica HPLC utilizzando come rivelatore uno spettrofotometro UV - Vis che acquisisce il segnale alle lunghezze d'onda 444/470/501 nm.

I cromatogrammi ottenuti per campioni reali presentano il picco di licopene al tempo di ritenzione di circa 18-19 minuti.

Alla fase di rivelazione deve essere riservata una particolare attenzione per eliminare ogni contatto con superfici capaci di catalizzare reazioni di degradazione del licopene; in particolare sono da evitare le superfici metalliche e a questo proposito si consiglia di usare solo connessioni del sistema cromatografico in tubi in PEEK (Poly-Eter-Eter-Ketone).

## 5. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata realizzata utilizzando il programma SPSS Release 5.0.1 per Windows (1992, SPSS Inc.). È stata effettuata un'analisi della varianza a 4 vie (ANOVA).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### CARATTERIZZAZIONE DEL LICOPENE E RETTA DI CALIBRAZIONE

Nella Figura 1 è rappresentata la retta di calibrazione utilizzata per la determinazione del licopene.

#### 4.3 - Method.

Before injection into the liquid chromatograph, the extracts stored at  $-20^\circ\text{C}$  are diluted 50-fold and filtered through Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF filters to obtain a concentration of about 1.5-3.0 ppm in the vials. The autosampler is adjusted so that 20  $\mu\text{L}$  of the sample to be analyzed is injected into the chromatograph and the solvent delivery pump is regulated to give an isocratic flow-rate of 1.5 mL/min and a pressure of about 2,000 psi (~136 atm). The mobile phase is composed of acetonitrile, methanol and dichloromethane ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 75:20:5 v/v/v, containing 0.1% BHT as an antioxidant and 0.05% triethylamine (TEA). The methanol contains 0.05 M ammonium acetate. Before use, the mobile phase is filtered through a 0.5  $\mu\text{m}$  PTFE membrane filter and degassed.

During the analysis, the column system must be held at ambient temperatures ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) in order to obtain a good separation of lycopene.

Lycopene is determined by HPLC using as detector an UV-Vis spectrophotometer which picks up the signal at 444/470/501 nm wavelengths.

The chromatograms obtained for real samples exhibit the lycopene peak at a retention time of about 18-19 min.

Special attention must be paid to the detection step: any contact with surfaces able to catalyze lycopene degradation reactions must be eliminated; in particular, metal surfaces must be avoided and it is therefore recommended that PEEK (Poly-Ether-Eter-Ketone) tubing be used for connecting the components of the chromatographic system.

## 5. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis of data was performed using the SPSS Release 5.0.1 program for Windows (1992, SPSS Inc.). A 4-way analysis of variance (ANOVA) was accomplished.

## RESULTS AND DISCUSSION

### LYCOPENE CHARACTERIZATION AND CALIBRATION CURVE

Figure 1 shows the calibration curve used for lycopene quantitation.

#### RECOVERY TRIALS

Lycopene recovery was evaluated using  $\beta$ -apo-8'-carotenal as an internal standard. To this end, a calibration graph consisting of six concentrations levels was constructed; the result is represented in Figure 2.

Subsequently, lycopene was determined in eight samples to which known aliquots of internal standard (0.4 ppm) had been added. Table 2 reports the results obtained, which show that the recovery of the internal standard was  $91 \pm 3\%$ . Lycopene recovery is considered to be at least as high as that of the internal standard because it has a



Livelli di concentrazione Concentration levels	Area cromatografica Chromatographic area (mV*sec*10 <sup>6</sup> )	Concentrazione Concentration (ppm)
1*	1,17	0,5
2*	3,35	1,5
3*	6,19	2,5
4*	8,87	3,5
5*	11,45	4,5
6*	13,45	5,5

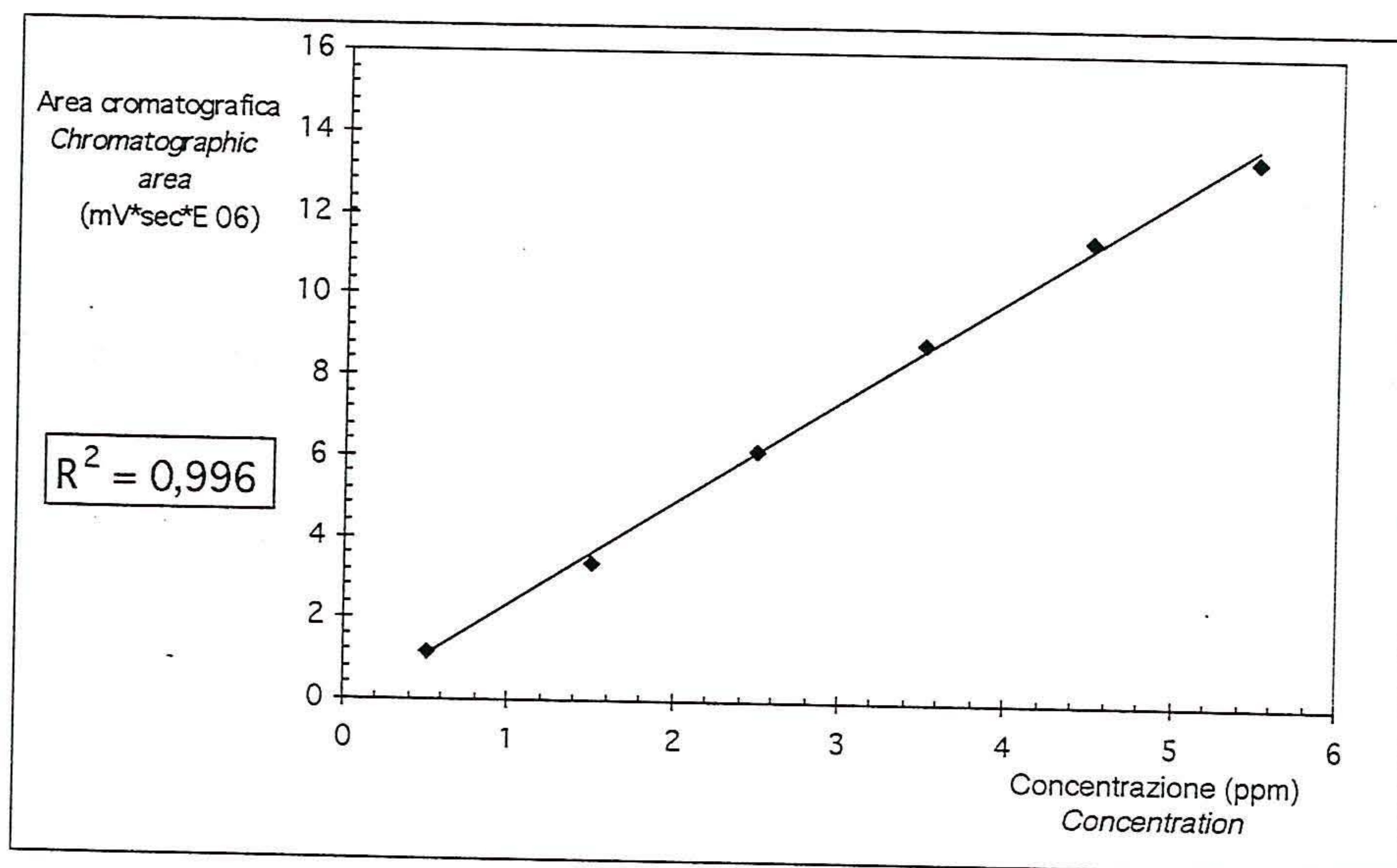


FIG. 1 - Curva di calibrazione del licopene.  
*Lycopene calibration curve.*

#### PROVE DI RICUPERO

È stata determinato il recupero di licopene utilizzando  $\beta$ -apo-8'-carotenale come standard interno. A tal scopo si è costruita una retta di calibrazione costituita da sei livelli di concentrazione; il risultato è rappresentato nella Figura 2.

Successivamente si è determinata la concentrazione in otto campioni ai quali erano state aggiunte aliquote note (0,4 ppm) di standard interno. Nella Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti, dai quali si vede che il recupero dello standard interno è stato del  $91 \pm 3\%$ . Si ritiene che il recupero di licopene sia almeno uguale a quello dello standard interno in quanto presenta una polarità inferiore che ne consente un più efficiente passaggio nella fase lipofila dell'estrazione.

#### MESSA A PUNTO DEL METODO ANALITICO

Si sono apportate alcune modifiche al metodo di Hart e Scott (26), volte ad adattare meglio il metodo al caso della matrice in esame. Per il pomodoro e i suoi derivati, prodotti ad alta concentrazione di licopene, è stato infatti necessario individuare il quantitativo di prodotto di partenza per essere sicuri di ottenere una completa estrazione del licopene (dopo che il campione era stato triturato con Ultraturax e una successiva solubilizza-

lower polarity which enables it to pass more efficiently into the lipophilic phase during extraction.

#### DEVELOPMENT OF THE ANALYTICAL METHOD

Some changes were made to the method of Hart and Scott (26) to render it more suitable for application to the matrix being examined. For tomatoes and lycopene-rich tomato products, it was indeed necessary to know the amount of starting product to be sure of obtaining a complete extraction of lycopene (after the sample had been homogenized in an Ultra-Turrax and then dissolved in THF:CH<sub>3</sub>OH). In addition, it was deemed useful to re-dilute the extract, evaporated previously to dryness, with THF instead of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, not only for safety reasons, but also because the latter is reported in the literature as a solvent which lessens lycopene concentration in solutions stored prior to analysis (27).

The information found in the literature confirms that C<sub>18</sub> columns are suitable for separation of the carotenoids (28) occurring in some food products and that the mobile phase CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> allows lycopene to be eluted in rather short times and its cis- and trans-isomers to be resolved, even though only partially (29).

It was also noted that, when the column was



zione in THF:CH<sub>3</sub>OH). Si è ritenuto utile inoltre ridiluire l'estratto, precedentemente portato a secchezza, con THF anziché che con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> per motivi di sicurezza e perché in letteratura quest'ultimo è stato indicato come agente che deprime la concentrazione del licopene stoccato in attesa di essere analizzato (27).

Le informazioni presenti in letteratura confermano che le colonne C18 sono idonee alla separazione dei carotenoidi (28) presenti in alcuni prodotti alimentari e che la fase mobile CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> è adatta ad eluire il licopene in tempi non troppo lunghi e a separare, anche se solo parzialmente, i *cis-trans*-isomeri (29).

Si è inoltre visto che anche non termostatando la colonna a 22,5°C, come consigliato nella pubblicazione citata, ma lasciandola a temperatura ambiente (20°-23°C) il licopene veniva sempre eluito in 18-19 minuti. Questo tempo di ritenzione in letteratura è fatto coincidere con una temperatura media di circa 20°C considerata ottimale per l'estrazione dei carotenoidi (30).

#### EFFETTO DEI TRATTAMENTI TECNOLOGICI E DELLE CONDIZIONI DI MAGAZZINAGGIO SUL CONTENUTO DI LICOPENE

Nella Tabella 3 sono riportate le caratteristiche

held at room temperatures (20°-23°C) and not at the constant temperature of 22.5°C, as recommended in the work quoted, lycopene always eluted in 18-19 min. In the literature, this retention time is related to an average temperature of about 20°C, regarded as optimal for carotenoid extraction (30).

TAB. 2 - Aree cromatografiche e concentrazioni relative delle aggiunte di standard interno.

TABLE 2 - Chromatographic areas and relative concentrations of added internal standards.

Aree cromatografiche dello standard interno Chromatographic areas of internal standard (mV*sec*10 <sup>6</sup> )	Concentrazione Concentration (ppm)
578133	0,3683
559030	0,3554
488199	0,3074
568342	0,3617
572149	0,3643
561018	0,3567
646150	0,4145
625562	0,4005
Valore medio ± dev. standard Mean value ± standard dev.	0,366 ± 0,011

Livelli di concentrazione Concentration levels	Area cromatografica Chromatographic area (mV*sec*10 <sup>6</sup> )	Concentrazione Concentration (ppm)
1*	246416	0,15
2*	460439	0,30
3*	743634	0,45
4*	909916	0,60
5*	1,16*10 <sup>6</sup>	0,75
6*	1,34*10 <sup>6</sup>	0,90

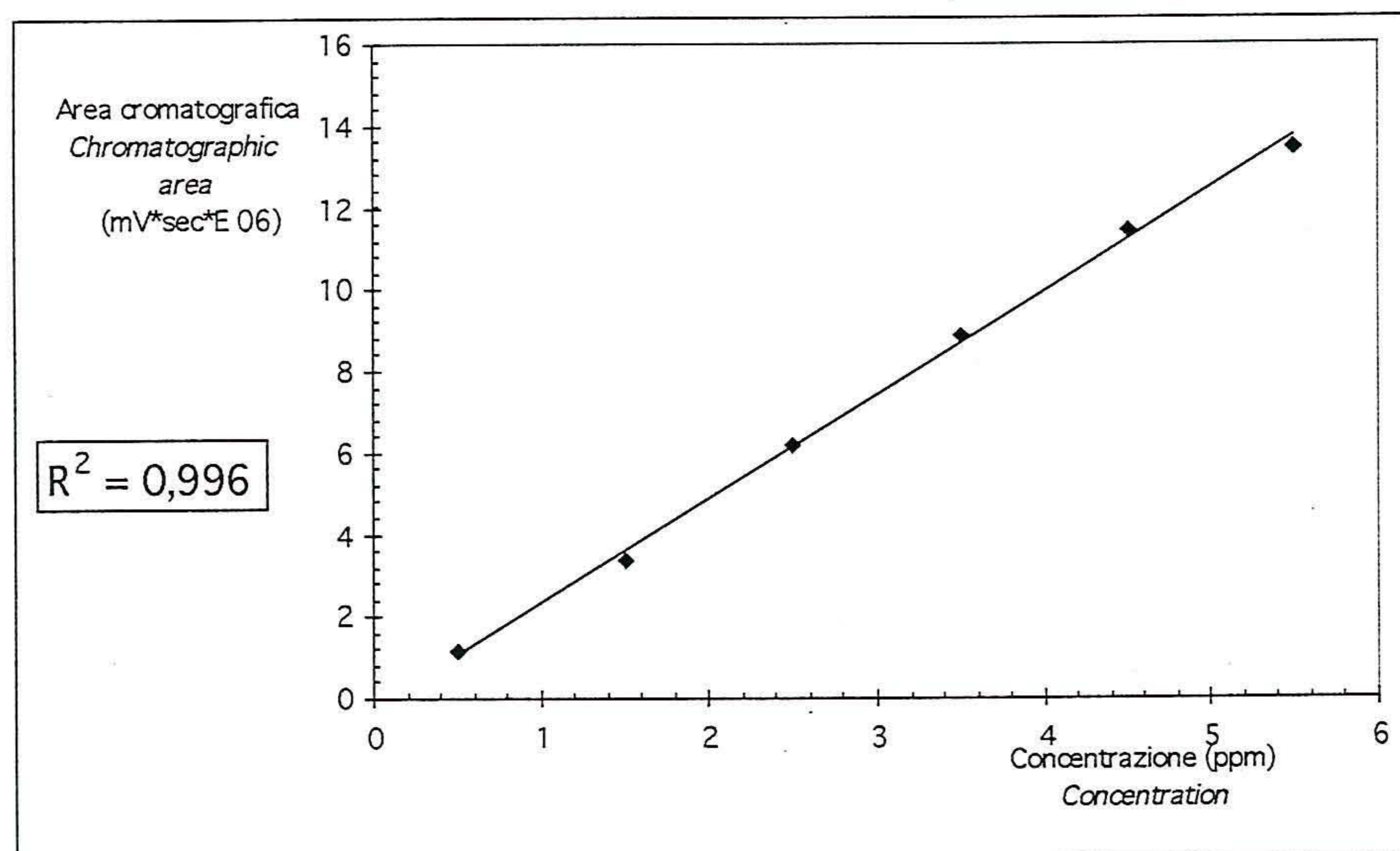


FIG. 2 - Curva di calibrazione del  $\beta$ -Apo-8'-carotenale.  
 $\beta$ -Apo-8'-carotenal calibration curve.



TAB. 4 - Analisi della varianza a quattro vie del confronto di diversi trattamenti di estrazione del succo e condizioni di magazzinaggio.

TABLE 4 - Four-way analysis of variance for the comparison of different juice extraction treatments and storage conditions.

Fonte di variazione Source of variation	Devianza Deviation	Gradi di libertà Degrees of freedom	Varianza Variance	F test	% Errore 1° tipo 1 <sup>st</sup> -type error
FCH	6883,96	2	3441,98	102,32	<1
Sezione Section	155,78	1	155,78	4,63	<5
Temperatura Temperature	311,45	1	311,45	9,26	<1
Tempo Time	7553,15	5	1510,63	44,91	<1
FCH - Sezione Section	14,85	2	7,43	0,22	80
FCH - Temperatura Temperature	95,17	2	47,59	1,41	25
FCH - Tempo Time	2616,03	10	261,60	7,78	<1
Sezione - Temperatura Section - Temperature	52,69	1	52,69	1,57	21
Sezione - Tempo Section - Time	5220,32	5	1044,06	31,04	<1
Temperatura - Tempo Temperature - Time	1170,34	5	234,07	6,96	<1
FCH - Sezione - Temperatura Section - Temperature	6,58	2	3,29	0,10	91
FCH - Sezione - Tempo Section - Time	1624,56	10	162,46	4,83	<1
FCH - Temperatura - Tempo Temperature - Time	1425,35	10	142,53	4,24	<1
Sezione - Temperatura - Tempo Section - Temperature - Time	1032,91	5	206,58	6,14	<1
FCH - Sezione - Temperatura - Tempo Section - Temperature - Time	854,83	10	85,48	2,54	<1
Residuo Residual	3229,25	96	33,64		
Modello Model	30693,55	71	432,30	12,85	<1
Totale Total	33922,80	167	203,13		

Legenda delle fonti di variazione.

**FCH:** indica diversi trattamenti termici utilizzati per l'estrazione del succo precedenti alla concentrazione del pomodoro (tre livelli: ambiente, Cold-Break e Hot-Break).

**Sezione:** diverso diametro delle fori della passatrice (due livelli: 0,8 mm e 1,3 mm).

**Temperatura:** differenti temperature di magazzinaggio (due livelli: alte: 30° ÷ 37°C; basse: 18° ÷ 26°C).

**Tempo:** diverso periodo di magazzinaggio (6 livelli: 0, 2, 4, 6, 10 e 12 mesi).

Legend of sources of variation.

**FCH:** It indicates the different heat treatments used for juice extraction prior to concentration (three levels: room, Cold-Break and Hot-Break).

**Section:** different diameter of pulper holes (two levels: 0,8 mm and 1,3 mm).

**Temperature:** different storage temperatures (two levels: high: 30° ÷ 37°C; low: 18° ÷ 26°C).

**Time:** different storage durations (six levels: 0, 2, 4, 6, 10 and 12 months).

#### EFFETTO DELLA TEMPERATURA DI MAGAZZINAGGIO

È stato studiato l'effetto di basse (18° e 26°C) ed alte (30° e 37°C) temperature di magazzinaggio sulla concentrazione di licopene.

L'abbassamento del contenuto di licopene è risultato di entità assolutamente trascurabile (Tabella 6) per poter discriminare una modalità di magazzinaggio rispetto ad un'altra.

#### EFFECT OF STORAGE TEMPERATURE

The effect of low (18° and 26°C) and high (30° and 37°C) temperatures on lycopene concentration was studied.

Decrease in lycopene content was found to be decidedly negligible (Table 6), making thereby discrimination between the two modes of storage impossible.



TAB. 5 - Variazione nel tempo del contenuto di licopene nell'insieme di tutti i campioni.

TABLE 5 - Variation over time in lycopene contents for the totality of samples.

Durata del magazzino Storage time (mesi months)	Licopene $\pm$ s.d. Lycopene $\pm$ s.d. (ppm)
0	195,5 $\pm$ 1,1
2	188,0 $\pm$ 1,1
4	180,7 $\pm$ 1,1
6	177,4 $\pm$ 1,1
10	176,6 $\pm$ 1,1
12	176,9 $\pm$ 1,1

#### EFFETTO DELLA SEZIONE DELLA PASSATRICE

L'analisi statistica permette di riscontrare un effetto sul contenuto di licopene legato al diametro dei fori della passatrice: la concentrazione di licopene infatti risulta essere maggiore per campioni trattati con sezioni di 1,3 millimetri rispetto a campioni trattati con sezioni di 0,8 millimetri (Tabella 7). La variazione sperimentale, seppur di trascurabile interesse pratico (ca. 1%), può essere spiegata dalla concomitanza di due fattori: un effetto meccanicamente meno "distruttivo" delle cellule del pomodoro e una maggiore resa di estrazione, in particolare della frazione solida, che si ottiene con le sezioni maggiori.

TAB. 6 - Contenuto medio di licopene calcolato fra tutti i campioni immagazzinati ad alta e bassa temperatura.

TABLE 6 - Mean content calculated for the totality of the samples stored at both high and low temperatures.

Temperatura di magazzino Storage temperature	Licopene $\pm$ s.d. Lycopene $\pm$ s.d. (ppm)
Bassa (18 $\div$ 26) Low	183,9 $\pm$ 0,6
Alta (30 $\div$ 37) High	181,1 $\pm$ 0,6

TAB. 7 - Contenuto medio di licopene calcolato fra tutti i campioni prodotti con sezione delle fori della passatrice di 0,8 e 1,3 mm.

TABLE 7 - Mean lycopene content calculated for the totality of the samples obtained using a pulper having 0.8 or 1.3 mm hole diameters.

Sezione fori passatrice Pulper hole diameter (mm)	Licopene $\pm$ s.d. Lycopene $\pm$ s.d. (ppm)
0,8	181,5 $\pm$ 0,6
1,3	183,5 $\pm$ 0,6

#### EFFECT OF PULPER HOLE DIAMETER

Statistical analysis allowed an effect of the diameter of pulper holes on lycopene content to be ascertained: lycopene concentration was higher in the samples treated with the 1.3-mm holes than in those treated with the 0.8-mm holes (Table 7).

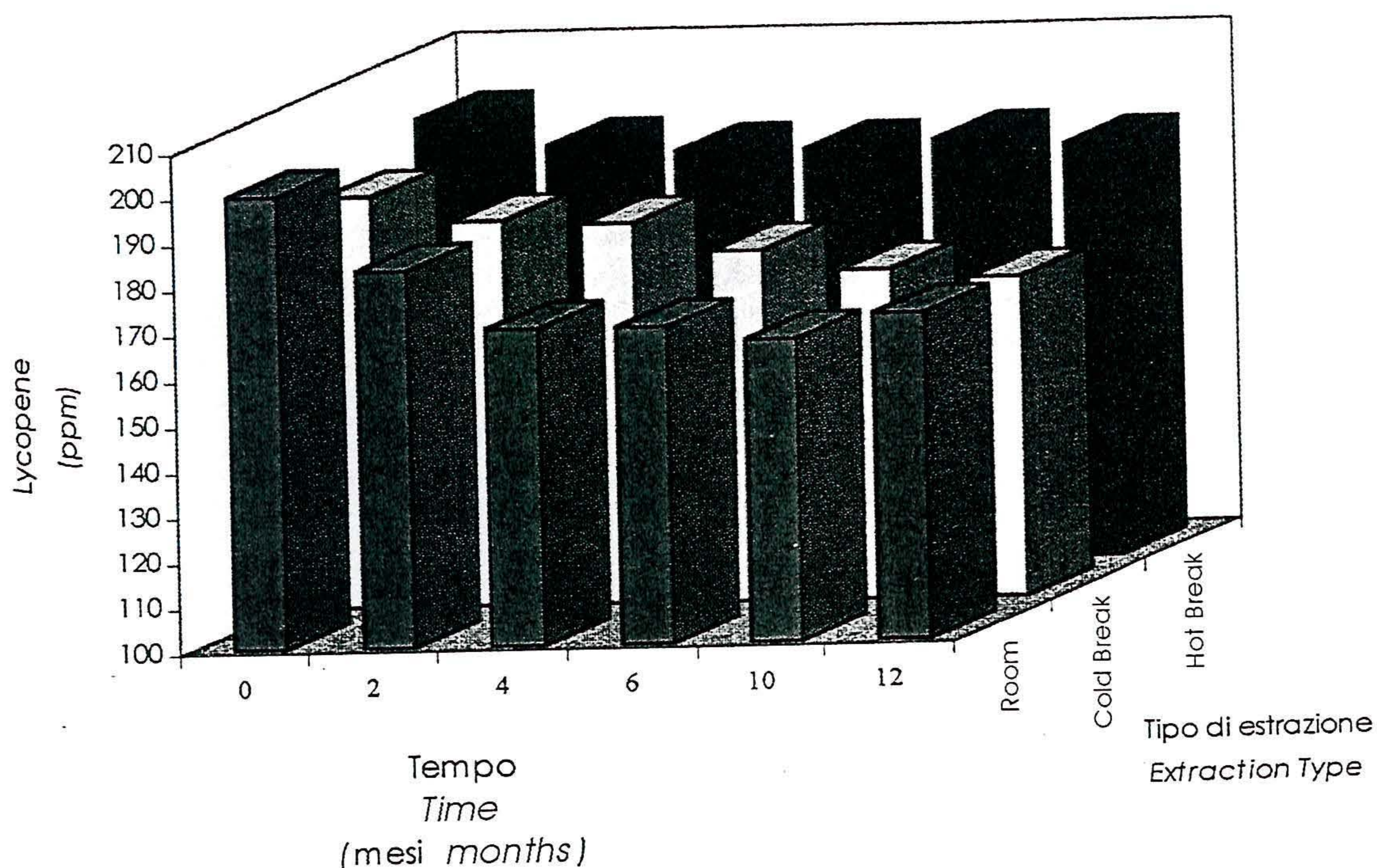


FIG. 4 - Variazioni nel tempo del contenuto di licopene in funzione dei trattamenti termici effettuati in fase di estrazione del succo.

Variations of lycopene content over time as a function of the heat treatments carried out during juice extraction.



## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel confronto di diversi trattamenti tecnologici e condizioni di magazzinaggio hanno messo in evidenza, attraverso un'analisi ANOVA a quattro vie, un effetto significativo di tutti i parametri analizzati. Dal punto di vista tecnologico però risultano interessanti solamente le variazioni del contenuto di licopene attribuite ai trattamenti di estrazione del succo, se valutate nel corso del progredire del magazzinaggio. In definitiva, viene messo in risalto come siano diversi gli effetti dei differenti trattamenti di estrazione del succo e risulta graficamente evidente la migliore conservabilità del licopene nei prodotti Hot-Break, mentre non sembra esistere nessun effetto protettivo legato alla granulometria, almeno per le condizioni sottoposte a prova.

Il sistema di estrazione del succo Hot-Break, pur riducendo il contenuto iniziale di licopene a causa dell'effetto termico più drastico, ma consentendo di mantenere pressoché inalterata la struttura cellulare, permette di preservare maggiormente nel tempo il pigmento dalle reazioni che ne provocano una riduzione, a differenza di quanto accade con altri sistemi di estrazione del succo (a temperatura ambiente e Cold-Break) con le quali, venendo a mancare questo effetto protettivo per l'attivazione delle reazioni di pectolisi, già a quattro e sei mesi di magazzinaggio si nota una riduzione nel contenuto di licopene dell'ordine dell'8-15%.

Gli ulteriori effetti analizzati (diametro dei fori della passatrice e temperatura di stoccaggio) non inducono variazioni significative di interesse tecnologico della quantità di licopene.

I risultati riportati sembrano suggerire la seguente ipotesi. Finché il licopene rimane nella matrice idrofila originaria e, ancor più, finché rimane all'interno delle cellule integre, risulta notevolmente stabile, ma appunto, a causa della sua insolubilità e quindi della scarsa reattività, probabilmente risulta poco assimilabile e pertanto la sua supposta attività antiossidante è molto ridotta.

Viceversa, quando il licopene si solubilizza in una matrice lipidica, è molto più reattivo e bio-disponibile e, a causa di questa sua maggior reattività, può esplicare la sua attività antiossidante. È ovvio che questa sua maggior reattività lo rende molto più "indifeso" nei confronti delle condizioni ambientali (aria, matrice biologica, temperatura).

Parma, 1 giugno 1999

*This experimental datum, even though of negligible practical interest (about 1%), can be accounted for by the coexistence of two factors: a mechanically less "destructive" effect on tomato cells and a higher extraction yield, in particular of the solid fraction, which is obtained with the larger holes.*

## CONCLUSIONS

*The results obtained from the comparison of different technological treatments and different storage conditions showed, through a four-way ANOVA, a significant effect of all the parameters analyzed. However, from the technological viewpoint, only the variations in lycopene content attributed to juice extraction treatments are interesting, if evaluated in the course of storage. All in all, the better preservability of lycopene in the Hot-Break-treated product is clearly shown graphically, whereas no granulometry-induced protective effect seems to occur, at least under the conditions tested.*

*Hot-Break juice extraction technique lessens the initial lycopene content because of the severe heat effect but, allowing tomato cell structure to remain almost unchanged, preserves lycopene more efficiently, over time, against the reactions that cause its destruction, unlike what happens with other juice extraction techniques (at room temperatures, Cold-Break), where, owing to the lack of this protective effect due to the triggering of pectolytic reactions, a decrease in lycopene content by 8-15% already occurs after 4-6 months' storage.*

*The other effects analyzed (diameter of the pulper holes and storage temperature) cause no significant, technologically interesting variations in lycopene content.*

*The results of the experience reported lead us to state that until lycopene remains within the original hydrophilic matrix and most of all, within a whole cell, is considerably stable but, just because of the subsequent scarce reactivity, it probably presents lower bioavailability and therefore it could be practically ineffective in acting its potential antioxidant activity.*

*Conversely, when lycopene solubilizes in a lipophilic matrix, it is considerably reactive and more available; therefore, it could suitably perform its antioxidant activity. However, it is obvious that this higher reactivity makes it much more unprotected against the degradation activity of environmental conditions (air, biological matrix components, temperature).*



## BIBLIOGRAFIA

- 1 - Riboli *et al.*, Alimentation et Cancer. Evaluation des données scientifiques, Tec Doc, Lavoisier, Paris (1996).
- 2 - Nutritional Aspects of the Development of Cancer. Report of The Working Group on Diet and Cancer of the Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy, The Stationery Office, UK (1998).
- 3 - Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective, World Cancer Research Fund, with the American Institute for Cancer Research, BANTA Book Group, Menasha, USA (1997).
- 4 - M. Eicholzer, H. B. Stahelin, K. F. Gey, Inverse correlation between essential antioxidants in plasma and subsequent risk to develop cancer, ischemic heart disease, and stroke, respectively: 12-year follow-up to the Prospective Basel Study, ed. I. Emerit, B. Chance, Burkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 398-410 (1992).
- 5 - A. R. Ness, J. W. Powles, *Intern. J. Epidemiol.*, 26, 1(1997).
- 6 - D. C. Schwenke, *J. Nutr. Biochem.*, 9, 424 (1998).
- 7 - L. Kohlmeier, J. D. Kark, E. Gomez-Gracia, B. C. Martin, S. E. Steck, A. F. M. Kardinaal, J. Ringstad, M. Thamm, V. Masaev, R. Riemersma, K. U. Uarto-Upre, J. K. Huttunen, F. J. Kok, *Am. J. Epidemiol.*, 146, 618 (1997).
- 8 - P. F. Jacques, L. T. Chylack, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 352S (1991).
- 9 - S. Franceschi, E. Bidoli, C. La Vecchia, R. Talamini, B. D'Avanzo, E. Negri, *Intern. J. Cancer*, 59, 181 (1994).
- 10 - E. Giovannucci, A. Ascherio, E. B. Rimm, J. Meir, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, W. C. Willett, *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 1767 (1995).
- 11 - S. B. Kritchevsky, G. S. Tell, T. Shimakawa, B. Dennis, R. Li, L. Kohlmeier, E. Steere, G. Heiss, *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 726 (1998).
- 12 - A. R. Mengels, J. M. Holden, G. R. Beecher, M. R. Forman, E. Lanza, *J. Am. Diet. Assoc.*, 93, 284 (1993).
- 13 - E. A. Offord, Proceedings of the Tomato & Health Seminar. Pamplona - FAIR CT 97-3233, Ed. B. Bièche, Avignon, 4 (1998).
- 14 - E. Giovannucci, Proceedings of the Tomato & Health Seminar. Pamplona - FAIR CT 97-3233, Ed. B. Bièche, Avignon, 69 (1998).
- 15 - H. Sies, W. Stahl, Proceedings of the Tomato & Health Seminar. Pamplona - FAIR CT 97-3233, Ed. B. Bièche, Avignon, 139 (1998).
- 16 - C. Leoni, I derivati industriali del pomodoro, SSICA, Parma (1993).
- 17 - W. Stahl, H. Sies, *J. Nutr.*, 122, 2161 (1992).
- 18 - M. Porrini, P. Riso, G. Testolin, *Brit. J. Nutr.*, 80, 353 (1998).
- 19 - C. Gartner, W. Stahl, H. Sies, *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 116 (1997).
- 20 - J. W. Erdman, T. L. Bierer, E. T. Gugger, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 691, 76 (1993).
- 21 - R. S. Parker, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51, S86 (1997).
- 22 - P. Borel, P. Grolier, M. Armand, A. Partier, H. Lafont, D. Lairon, V. Azais-Braesco, *J. Lipid Res.*, 37, 1 (1996).
- 23 - F. Berr, *J. Lipid Res.*, 33, 915 (1992).
- 24 - T. van Vliet, W. H. P. Schreurs, H. van den Berg, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 110 (1995).
- 25 - T. van Vliet, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50, S32 (1996).
- 26 - D. J. Hart, K. J. Scott, *Food Chem.*, 54, 101 (1995).
- 27 - F. Khachik, *J. Agric. Food Chem.*, 34, 603 (1986).
- 28 - G. Sadler, J. Davis, D. Dezman, *J. Food Sci.*, 55, 1460 (1990).
- 29 - B. Tan, *J. Food Sci.*, 53, 954 (1988).
- 30 - K. J. Scott, P. M. Finglas, R. Seale, D. J. Hart, I. de Froidmont-Görtz, *Food Chem.*, 57, 85 (1996).