

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.025922

引用格式:张涛,邓思,陈艳红,等. 虾青素和 β -胡萝卜素的抗氧化活性及其协同作用研究[J]. 食品与发酵工业,2021,47(9):8-15. ZHANG Tao, DENG Si, CHEN Yanhong, et al. Antioxidant activity and synergistic effect of astaxanthin and β -carotene[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9):8-15.

虾青素和 β -胡萝卜素的抗氧化活性及其协同作用研究

张涛¹, 邓思¹, 陈艳红^{1,2,3,4*}, 杜希萍^{1,2,3,4}

1(集美大学 食品与生物工程学院, 福建 厦门, 361021) 2(福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门, 361021)

3(厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门, 361021)

4(厦门南方海洋研究中心海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门, 361021)

摘要 基于 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 自由基清除率、 $\cdot\text{OH}$ 清除率、铁离子还原能力、抗油脂过氧化能力和氧自由基吸收能力(oxygen-radical absorbance capacity, ORAC) 法研究虾青素和 β -胡萝卜素的抗氧化能力; 进一步以 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基、 $\cdot\text{OH}$ 清除率为指标评价两者联合作用的抗氧化能力。结果表明, 虾青素和 β -胡萝卜素在 6 种抗氧化实验中均具有抗氧化作用, 且虾青素的抗氧化作用强于 β -胡萝卜素。其中, 虾青素对 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的半最大效应浓度(EC_{50}) 值分别为 (29.95 ± 3.01) 、 (61.21 ± 4.17) 、 $(26.12 \pm 5.14) \mu\text{g/mL}$ 。虾青素与 β -胡萝卜素组合对 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基和 $\cdot\text{OH}$ 清除率具有协同作用, 高浓度的虾青素与 β -胡萝卜素的组合不利于两者产生抗氧化协同作用。虾青素、 β -胡萝卜素从法夫酵母提取物中鉴定得出但结构相似很难分离, 探究两者之间的相互作用, 为应用法夫酵母开发高效的抗氧化剂提供了理论依据。

关键词 虾青素; β -胡萝卜素; 抗氧化; 抗氧化剂; 协同作用

自由基是指任何包含未成对电子并能单独存在的原子或基团, 如羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢(H_2O_2) 等活性氧簇(reactive oxygen species, ROS) 和源于一氧化氮(NO) 的活性氮簇(reactive nitrogen species, RNS)^[1]。研究表明, 不仅人体正常代谢会产生自由基^[2], 压力、紫外线辐射、环境污染等也会诱导自由基的产生。体内过量的自由基会与生物分子结合, 对机体造成损伤^[3-4]。抗氧化剂由于具有清除自由基和减少活性氧的作用被广泛用于减少氧化损伤。作为抗氧化剂重要来源的生物体具有复杂的代谢途径, 可产生多种代谢产物。当从生物体中制备抗氧化剂时, 由于目标产物与某些组分(特别是结构类似物) 具有相似的化学结构和物理性质, 即使采用最先进的分离纯化技术, 提取的抗氧化剂通常也是目标组分及其结构类似物的混合物。结构类似物的存在可能影响目标成分的抗氧化活性。因此, 研究生物体中天然抗氧化剂的共存组分对天然抗氧化剂的影响具有重要的意义。

法夫酵母因是天然虾青素(3,3'-二羟基-4,4'-二

酮基- β , β' -胡萝卜素) 的重要来源而受到广泛关注^[5-9]。研究报道虾青素具有抗氧化^[10]、抗炎^[11]、抗癌^[12] 以及预防心血管疾病等多种生理活性^[13]。法夫酵母具有类胡萝卜素合成的复杂途径^[14-16]。在之前的研究中, 从法夫酵母提取物中鉴定出虾青素、 β -胡萝卜素、玉米黄质、 β -隐黄素和番茄红素等多种类胡萝卜素^[17]。这些类胡萝卜素由于结构相似很难分离。目前, 它们生理活性之间的相互作用还不清楚。本文采用 DPPH 自由基清除率、ABTS 阳离子自由基清除率、 $\cdot\text{OH}$ 清除率、铁离子还原能力、抗油脂过氧化能力和 ORAC 法评价虾青素和 β -胡萝卜素的抗氧化能力, 并以 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基、 $\cdot\text{OH}$ 清除率为指标研究虾青素和 β -胡萝卜素以不同浓度组合的抗氧化效果, 为利用法夫酵母开发高效的抗氧化剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

虾青素(100%, USP 级)、 β -胡萝卜素($\geq 95\%$,

第一作者: 硕士研究生(陈艳红实验师为通讯作者, E-mail: yanhongchen@jmu.edu.cn)

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501448); 福建省科技厅重点项目(2018N019)

收稿日期: 2020-10-19, 改回日期: 2020-11-09

(HPLC 级), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 [2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 甲醇、水杨酸、过硫酸钾、 K_2HPO_4 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeCl_3$, 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 荧光素钠、2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)、水溶性维生素 E(Trolox), 均为分析纯, 北京索莱宝科学技术有限公司。

1.2 仪器与设备

Mettler Toledo 电子天平, 顺迪嘉奥有限公司; BMG 全波长自动多功能酶标仪微孔板检测仪, 广州伯齐生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 DPPH 自由基清除率的测定

用甲醇将 8.00 mg DPPH 配成浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 自由基溶液, 用甲醇制备质量浓度为 2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g/mL}$ 的虾青素或 β -胡萝卜素的待测液。在 96 孔酶标板中依次加入 50 μL DPPH 自由基溶液和 50 μL 待测液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 于 517 nm 波长下测定吸光度值。维生素 E(V_E) 作为阳性对照, 3 次平行实验, 清除率由公式(1)计算^[18]:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_x - A_1)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 , 待测液用甲醇替代, 加入 DPPH 自由基的吸光度; A_x , 添加待测液和 DPPH 自由基的吸光度; A_1 , 加入待测液, DPPH 自由基用甲醇替代的吸光度。

1.3.2 ABTS 阳离子自由基清除率的测定

用蒸馏水分别配制 7 mmol/L 的 ABTS 阳离子自由基溶液和 2.45 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 溶液, 均匀混合, 常温避光 15 h, 之后将混合液用甲醇制成 734 nm 波长下吸光度为 (0.70 ± 0.02) 的工作液。将 10 μL 1.3.1 所述待测液和 200 μL ABTS 阳离子自由基工作液依次加入 96 孔酶标板中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 6 min, 测定 734 nm 波长处吸光度。以 V_E 作为阳性对照, 3 次平行实验, 清除率由公式(2)计算^[19]:

$$\text{ABTS 阳离子自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 , 待测液用甲醇替代, 加入 ABTS 阳离子自由基的吸光度; A_x , 添加待测液和 ABTS 阳离子自由基的吸光度。

1.3.3 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定

将 50 μL 2.25 mmol/L $FeSO_4$ 水溶液、50 μL 9 mmol/L 水杨酸甲醇溶液、50 μL 1.3.1 所述待测液依次加入 96 孔酶标板中, 再加入 50 μL 8.80 mmol/L H_2O_2 甲醇溶液启动反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 测定 510 nm 波长处吸光度 A 。以 V_E 作为阳性对照, 3 次平行实验, 清除率由公式(3)计算^[20]:

$$\cdot\text{OH 清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_x - A_1)}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_x , 添加待测液时的吸光度; A_0 , 待测液用甲醇替代时的吸光度; A_1 , 水杨酸甲醇溶液和 H_2O_2 甲醇溶液均用甲醇替代时的吸光度。

1.3.4 铁离子还原能力测定

参考 BENZIE 等^[21]的方法并略加修改。以 pH 3.6 醋酸钠缓冲溶液: 20 mmol/L $FeCl_3$ 水溶液: 10 mmol/L 2,4,6-三吡啶基三嗪盐酸溶液 (10:1:1, 体积比) 混合制成铁离子还原/抗氧化能力 (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) 工作液。在 96 孔酶标板中依次加入 5 μL 不同浓度的 $FeSO_4$ 溶液 (50、100、200、400、800、1 600 $\mu\text{mol/L}$)、150 μL FRAP 工作液和 15 μL 蒸馏水, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光, 每隔 10 min 测定 595 nm 波长处吸光度。横坐标为 $FeSO_4$ 溶液浓度, 纵坐标为吸光度, 得到标准曲线 $y = 0.2692x + 0.0141$, $R^2 = 0.9994$ 。测定铁离子还原能力: 将 5 μL 64 $\mu\text{g/mL}$ 待测液、150 μL FRAP 工作液和 15 μL 蒸馏水依次加入 96 孔酶标板中, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光, 每隔 10 min 测定 595 nm 波长处吸光度。阳性对照为 V_E , 3 次平行实验, 以达到相同吸光度所需 $FeSO_4$ 浓度表示待测液的铁离子还原能力。

1.3.5 抗油脂过氧化能力测定

实验分成 4 组, 空白组 (35 mL 橄榄油)、虾青素组 (0.007 5 g 虾青素 + 35 mL 橄榄油)、 β -胡萝卜素组 (0.007 5 g β -胡萝卜素 + 35 mL 橄榄油) 和 V_E 组 (0.007 5 g V_E + 35 mL 橄榄油)。所有实验 3 个平行, 密封, 60 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 每天根据 GB 5009.227—2016《食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定》中滴定法测定过氧化值。过氧化值以每千克中活性氧的毫克当量 (meq/kg) 表示。

1.3.6 氧自由基吸收能力 (oxygen-radical absorbance capacity, ORAC) 法评价抗氧化能力

按照徐维盛等^[22]报道 ORAC 法评价抗氧化能力。荧光素钠、自由基产生剂 2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐 (2,2'-azobis-2-methyl-propanimidam-

ide, dihydrochloride, AAPH)、抗氧化标准物质 Trolox 均用 75 mmol/L 磷酸盐缓冲液溶解并稀释到适当浓度。设置空白孔、对照孔、不同浓度的标准溶液孔 (Trolox) 和样品孔。在 96 孔黑色酶标板中依次加入 25 μL 待测样、150 μL 86.1 nmol/L 荧光素钠溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min, 迅速加入 25 μL 153 mmol/L AAPH 溶液启动反应。以激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm 连续测定荧光强度, 每隔 2 min 测定 1 次荧光值, 每次测定前中速振荡孔板 10 s。荧光衰减呈基线后停止测定, 将每次测定的值与初始荧光强度的比值记为 f_n 。根据公式(4) 计算各孔荧光强度曲线下的面积 (area under the curve, AUC), 减掉空白孔的 AUC, 即得到各孔的 Net AUC, 根据不同浓度 Trolox 的 Net AUC 做标准曲线, 计算各样品的 ORAC 值, 待测样品的 ORAC 值以 $\mu\text{mol TE/g}$ 表示, 具体按公式(5) 计算:

$$\text{AUC} = 2 \times (f_0 + f_1 + f_2 + \dots + f_{n-1} + f_n) - f_0 - f_n \quad (4)$$

$$\text{ORAC 值} = \frac{\text{AUC}_{\text{样品}} - \text{AUC}_{\text{空白}}}{\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{空白}}} \times \frac{\text{Trolox 浓度}}{\text{样品浓度}} \quad (5)$$

1.4 协同抗氧化活性的测定

1.4.1 DPPH 自由基清除率的测定

以 2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 4 个剂量对虾青素和 β -胡萝卜素进行两两组合, 方法同 1.3.1。

1.4.2 ABTS 阳离子自由基清除率的测定

以 2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 4 个剂量对虾青素和 β -胡萝卜素进行两两组合, 方法同 1.3.2。

1.4.3 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定

以 2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 4 个剂量对虾青素和 β -胡萝卜素进行两两组合, 方法同 1.3.3。

1.5 数据分析

用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析, 结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 DPPH 自由基清除率及协同作用

由图 1 可知, 质量浓度 2 ~ 64 $\mu\text{g/mL}$ 时, 虾青素、 β -胡萝卜素和 V_E 均具有 DPPH 自由基清除能力, 并且呈剂量依赖性。16 ~ 64 $\mu\text{g/mL}$ 时, 虾青素对 DPPH 自由基清除能力显著强于 β -胡萝卜素和 V_E ($P < 0.05$); 当虾青素为 64 $\mu\text{g/mL}$ 时, 虾青素对 DPPH 自由基的清除率为 $(71.61 \pm 3.01)\%$ 。虾青素对 DPPH 自由基的半最大效应浓度 (EC_{50}) 值为 $(29.95 \pm 3.01) \mu\text{g/mL}$, 而在试验浓度范围内未计算出 β -胡萝卜素和 V_E 的 EC_{50} 值。

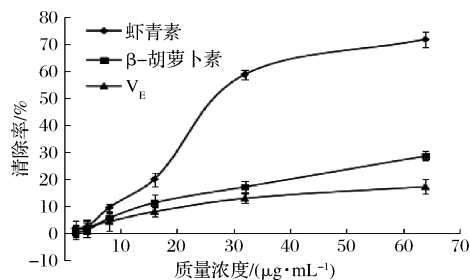


图 1 不同质量浓度虾青素、 β -胡萝卜素和 V_E 对 DPPH 自由基清除能力

Fig. 1 DPPH scavenging ability of different concentration of astaxanthin, β -carotene and V_E

由表 1 可知, 不同质量浓度的 β -胡萝卜素与虾青素 (16 $\mu\text{g/mL}$ 除外) 组合对 DPPH 自由基清除率有协同作用, 8 $\mu\text{g/mL}$ 虾青素与 8 $\mu\text{g/mL}$ β -胡萝卜素组合协同作用最强, 协同作用值为 16.78%。但 16 $\mu\text{g/mL}$ 的虾青素与任意浓度的 β -胡萝卜素组合均表现为拮抗。

表 1 不同质量浓度虾青素和 β -胡萝卜素组合的 DPPH 自由基清除能力的值及相互作用关系

Table 1 DPPH radical scavenging capacity value and interaction effect of astaxanthin and β -carotene at different concentration

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		清除率/%			相互作用
虾青素	β -胡萝卜素	协同值	预期值	协同-预期	
2	2	6.13	0.06	6.07	协同作用
	4	7.84	2.69	5.15	协同作用
	8	14.22	7.16	7.06	协同作用
	16	19.49	12.87	6.62	协同作用
4	2	6.74	0.61	6.13	协同作用
	4	17.10	3.24	13.86	协同作用
	8	17.13	7.71	9.42	协同作用
	16	20.44	13.42	7.02	协同作用
8	2	8.46	7.73	0.73	协同作用
	4	14.36	10.36	4.00	协同作用
	8	31.61	14.83	16.78	协同作用
	16	27.62	20.54	7.08	协同作用
16	2	7.48	18.22	-10.74	拮抗作用
	4	18.23	20.85	-2.62	拮抗作用
	8	20.44	25.32	-4.88	拮抗作用
	16	28.25	31.03	-2.78	拮抗作用

注: 协同值: 2 种单体混合后清除自由基能力的真实检测值; 预期值: 2 种单体混合前清除自由基能力的真实检测值之和; 协同-预期: 真实检测值与预期值的差值, 协同-预期 > 0 , 表示协同作用, 协同-预期 < 0 , 表示拮抗作用 (下同)

进一步分析发现当 β -胡萝卜素质量浓度较高 (8 或 16 $\mu\text{g/mL}$) 时, 增大虾青素的质量浓度 (2 ~ 8

$\mu\text{g/mL}$)有促进协同作用的趋势;当 β -胡萝卜素质量浓度较低(2或4 $\mu\text{g/mL}$)时,协同作用随虾青素浓度的增加(2~8 $\mu\text{g/mL}$)呈先上升后下降的趋势。结果表明,DPPH 自由基抗氧化组合中,高质量浓度虾青素(16 $\mu\text{g/mL}$)与 β -胡萝卜素组合不利于两者产生协同抗氧化作用。

2.2 ABTS 阳离子自由基清除率及协同作用

由图2可知,虾青素、 β -胡萝卜素和 V_E 在试验浓度范围(2~64 $\mu\text{g/mL}$)内,除 β -胡萝卜素在16 $\mu\text{g/mL}$ 时对ABTS阳离子自由基清除率略有下降,其余对ABTS阳离子自由基清除率均呈现出剂量依赖性。虾青素的 EC_{50} 值为(61.21 ± 4.17) $\mu\text{g/mL}$,而 β -胡萝卜素和 V_E 在试验浓度范围内未计算出 EC_{50} 值。此外,在8~64 $\mu\text{g/mL}$ 的试验浓度范围内,虾青素清除ABTS阳离子自由基能力强于 β -胡萝卜素和 V_E ,当质量浓度为64 $\mu\text{g/mL}$ 时,虾青素对ABTS阳离子自由基的清除率最高,为(51.17 ± 1.17)%。

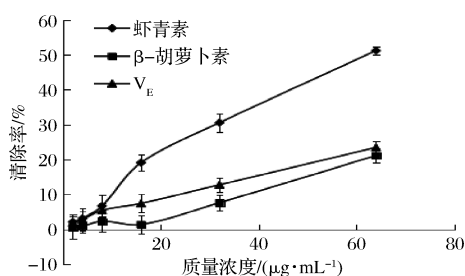


图2 虾青素、 β -胡萝卜素、 V_E 的ABTS阳离子自由基清除能力

Fig. 2 ABTS cationic radical scavenging ability of astaxanthin, β -carotene and V_E

由表2可知,除16 $\mu\text{g/mL}$ 虾青素与2 $\mu\text{g/mL}$ β -胡萝卜素的组合外,虾青素与任意浓度的 β -胡萝卜素组合均对ABTS阳离子自由基清除率有协同作用;协同作用最强为8 $\mu\text{g/mL}$ 虾青素与8 $\mu\text{g/mL}$ β -胡萝卜素组合,协同作用值为63.64%;而16 $\mu\text{g/mL}$ 虾青素与2 $\mu\text{g/mL}$ β -胡萝卜素的拮抗作用值为11.39%。总体来看,当 β -胡萝卜素质量浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ 时,增大虾青素的浓度有促进拮抗作用的趋势;当虾青素质量浓度为16 $\mu\text{g/mL}$ 时,协同作用随 β -胡萝卜素浓度的增加而增强。结果表明,ABTS阳离子自由基抗氧化组合中,高质量浓度的虾青素(16 $\mu\text{g/mL}$)与低质量浓度的 β -胡萝卜素(2 $\mu\text{g/mL}$)组合不利于两者产生抗氧化协同作用。

表2 不同浓度虾青素和 β -胡萝卜素组合的ABTS阳离子自由基清除率的值及相互作用关系

Table 2 ABTS cationic radical scavenging capacity value and interaction effect of astaxanthin and β -carotene at different concentrations

质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		清除率/%			相互作用
虾青素	β -胡萝卜素	协同值	预期值	协同-预期	
2	2	29.81	1.26	28.55	协同作用
	4	8.27	2.11	6.16	协同作用
	8	14.01	1.57	12.44	协同作用
	16	11.73	4.51	7.22	协同作用
4	2	7.72	1.34	6.38	协同作用
	4	62.30	2.19	60.11	协同作用
	8	12.44	1.65	10.79	协同作用
	16	15.67	4.59	11.08	协同作用
8	2	5.23	4.9	0.33	协同作用
	4	15.67	5.57	9.92	协同作用
	8	68.85	5.21	63.64	协同作用
	16	16.59	8.15	8.44	协同作用
16	2	5.93	17.32	-11.39	拮抗作用
	4	18.43	18.17	0.26	协同作用
	8	17.97	17.63	0.34	协同作用
	16	72.95	20.57	52.38	协同作用

2.3 $\cdot\text{OH}$ 清除率及协同作用

由图3可知,在2~64 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内,虾青素、 β -胡萝卜素和 V_E 具有 $\cdot\text{OH}$ 清除活性。虾青素的 $\cdot\text{OH}$ 清除率显著高于 β -胡萝卜素和 V_E ,当虾青素质量浓度为64 $\mu\text{g/mL}$ 时,其对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率最高,为(69.82 ± 1.72)%。虾青素的 EC_{50} 值为(26.12 ± 5.14) $\mu\text{g/mL}$, V_E 和 β -胡萝卜素在试验浓度范围内均未计算出 EC_{50} 值。虾青素和 V_E 的 $\cdot\text{OH}$ 清除率随浓度的增加均呈现上升的趋势,且表现出明显的量效关系, β -胡萝卜素的 $\cdot\text{OH}$ 清除率在试验浓度范围内变化不大,且呈现出波动趋势,无明显的量效关系。

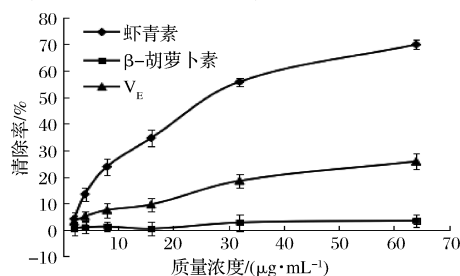


图3 虾青素、 β -胡萝卜素、 V_E 的 $\cdot\text{OH}$ 清除率

Fig. 3 $\cdot\text{OH}$ free radical scavenging ability of astaxanthin, β -carotene and V_E

由表3可知,样品在2~16 $\mu\text{g/mL}$,虾青素与 β -胡萝卜素组合的 $\cdot\text{OH}$ 抗氧化活性相互作用情况复杂。低质量浓度 β -胡萝卜素(2或4 $\mu\text{g/mL}$)与不同

浓度虾青素的组合对·OH清除能力有协同作用,16 μg/mL 虾青素与 2 μg/mL β-胡萝卜素的协同作用最大,为 9.03%。但是,高质量浓度 β-胡萝卜素(8 或 16 μg/mL)与不同质量浓度虾青素(2 μg/mL 虾青素除外)的组合有拮抗作用,最强为 16 μg/mL β-胡萝卜素与 8 μg/mL 虾青素组合,拮抗作用值为 9.33%。·OH 抗氧化组合中,较高质量浓度的虾青素(4~16 μg/mL)与较高质量浓度的 β-胡萝卜素(8 或 16 μg/mL)结合不利于两者产生协同抗氧化作用。

表 3 不同浓度虾青素和 β-胡萝卜素组合的·OH 清除能力的值及相互作用关系

Table 3 ·OH radical scavenging capacity value and interaction effect of astaxanthin and β-carotene at different concentrations

质量浓度/(μg·mL ⁻¹)		清除率/%			相互作用
虾青素	β-胡萝卜素	协同值	预期值	协同-预期	
2	2	9.13	1.16	7.97	协同作用
	4	8.52	1.86	6.66	协同作用
	8	9.29	5.36	3.93	协同作用
	16	7.89	4.58	3.31	协同作用
4	2	13.59	10.48	3.11	协同作用
	4	15.81	11.18	4.63	协同作用
	8	7.01	14.68	-7.67	拮抗作用
	16	6.09	13.90	-7.81	拮抗作用
8	2	22.82	20.85	1.97	协同作用
	4	23.89	21.55	2.34	协同作用
	8	22.49	25.05	-2.56	拮抗作用 c
	16	14.94	24.27	-9.33	拮抗作用
16	2	40.66	31.63	9.03	协同作用
	4	38.19	32.33	5.86	协同作用
	8	35.42	35.83	-0.41	拮抗作用
	16	32.43	35.05	-2.62	拮抗作用

2.4 铁离子还原能力

由图 4 可知,β-胡萝卜素、虾青素和 V_E 均具有铁离子还原能力。当质量浓度为 64 μg/mL 时,β-胡萝卜素、虾青素和 V_E 的 FRAP 值分别为(0.1200 ± 0.011)、(0.2816 ± 0.005)和(0.1020 ± 0.0012) mmol/L。可见,虾青素的铁离子还原能力强于 β-胡萝卜素和阳性对照 V_E,V_E 的铁离子还原能力最弱。

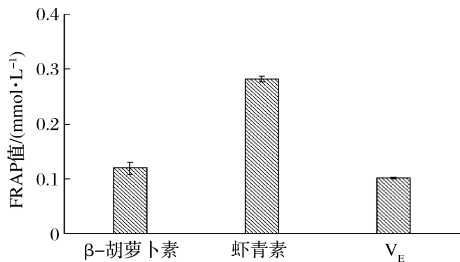


图 4 β-胡萝卜素、虾青素和 V_E 的铁离子还原能力

Fig. 4 Iron ion reduction ability of β-carotene, astaxanthin and V_E

2.5 抗油脂过氧化作用

由图 5 可知,所有组橄榄油的过氧化值均随着放置时间的增加而逐渐增大,添加虾青素、β-胡萝卜素和 V_E 后橄榄油的过氧化值减小,说明它们具有一定的抗油脂过氧化作用。5 d 后,虾青素、β-胡萝卜素和 V_E 处理组的过氧化值分别为(3.50 ± 0.10)、(7.60 ± 0.11)和(5.34 ± 0.02) meq/kg。可见,虾青素抗油脂的过氧化能力最强,β-胡萝卜素抗油脂的过氧化能力最弱。据文献报道,V_E 具有长链饱和烃基结构,而虾青素比 V_E 具有更多的可置换结构和不饱和双键^[23],这种可置换结构可能导致虾青素具有比 V_E 更强的抗油脂过氧化作用^[24]。

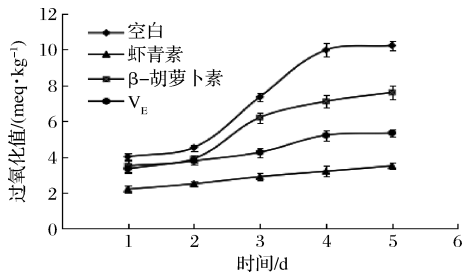


图 5 虾青素、β-胡萝卜素、V_E 的抗油脂过氧化作用

Fig. 5 Antiperoxide effects of astaxanthin, β-carotene and V_E

2.6 ORAC 法评价抗氧化能力

由图 6 可知,无抗氧化剂 Trolox 时,荧光衰减很明显;添加 Trolox 会抑制荧光衰减速度,并且抑制作用随 Trolox 浓度增大而逐渐增强。根据横坐标是 Trolox 浓度,纵坐标是净面积,得到 Trolox 标准溶液的标准曲线 $y = 1.0155x + 0.0956$, $R^2 = 0.996$ 。

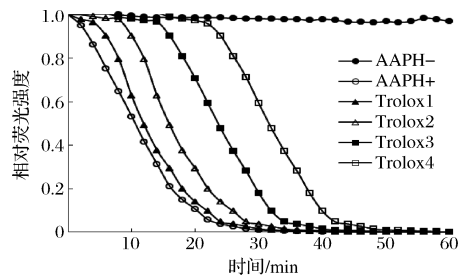


图 6 不同浓度 Trolox 标准溶液荧光随时间衰减曲线

Fig. 6 Time course of the reaction of fluoresce with AAPH in the presence of Trolox standard solution

无自由基的荧光素钠溶液荧光自然衰减对照;AAPH+;不含抗氧化剂的自由基对照;Trolox1~Trolox4:加入 6.25、12.5、25.0、50.0 μmol/L Trolox 标准溶液时荧光强度衰减的影响

图 7 为虾青素、β-胡萝卜素荧光随时间衰减曲线,根据衰减曲线计算出净面积。依据标准曲线得到虾青素的 ORAC 值为(4 325 ± 11.79) μmol TE/g,β-

胡萝卜素的 ORAC 值为 $(2\,029 \pm 10.01) \mu\text{mol TE/g}$, 虾青素的 ORAC 值显著高于 β -胡萝卜素的 ORAC 值,说明虾青素具有更强的抗氧化活性。

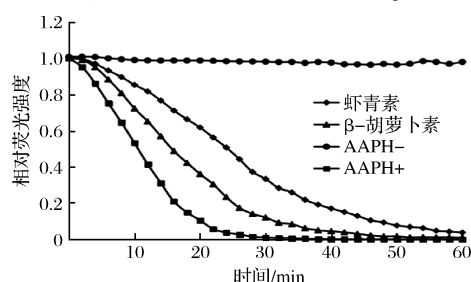


图7 虾青素、 β -胡萝卜素荧光随时间衰减曲线

Fig.7 Time course of the reaction of fluoresce with AAPH in the presence of astaxanthin and β -carotene

3 讨论

抗氧化体外评价方法因具有快速便捷的特点而被广泛应用。本文选择了6种抗氧化方法全面评价虾青素和 β -胡萝卜素的抗氧化活性。结果表明,在6种抗氧化实验中,虾青素和 β -胡萝卜素均具有抗氧化活性。其中虾青素对DPPH自由基、ABTS阳离子自由基和 $\cdot\text{OH}$ 清除率最强,其 EC_{50} 值分别为 (29.95 ± 3.01) 、 (61.21 ± 4.17) 和 $(26.12 \pm 5.14) \mu\text{g/mL}$;当AAPH-;质量浓度为 $64 \mu\text{g/mL}$ 时,虾青素和 β -胡萝卜素的FRAP值分别为 (0.2816 ± 0.005) 和 $(0.1200 \pm 0.011) \text{mmol/L}$;5 d后,虾青素和 β -胡萝卜素的过氧化值分别为 (3.50 ± 0.10) 和 $(7.60 \pm 0.11) \text{meq/kg}$;在相同浓度下虾青素和 β -胡萝卜素的ORAC值分别为 $(4\,325 \pm 11.79)$ 和 $(2\,029 \pm 10.01) \mu\text{mol TE/g}$ 。综上,虾青素的抗氧化能力优于 β -胡萝卜素,此结果与LIU等^[25]研究结果一致。虾青素具有独特的化学性质,虾青素骨架中的共轭双键及末端的不饱和酮基和羟基相互作用,加剧分子之间的摩擦力度,可以促进电子的自由移动,自由基负责提供电子与未配对电子相互吸引,能有效地淬灭附近的自由基及有害的活性氧^[26]。据报道,虾青素除了不饱和多烯链在膜中捕获自由基外,其极性末端环部分能够通过分子间和分子内氢键捕获膜内和膜表面的自由基,从而在几种抗氧化体系中表现出比 β -胡萝卜素更强的抗氧化能力^[27-29]。

抗氧化剂组合的抗氧化能力大于相同剂量的单一抗氧化剂时,则抗氧化剂间存在协同作用,且抗氧化剂浓度和反应体系等会影响协同作用效果。低效的抗氧化剂黄芩苷与 β -胡萝卜素组合后在由自由基

引发的脂质氧化反应中表现出显著的协同作用^[30]。黄芩苷的共轭基团有助于黄芩苷- β -胡萝卜素抗脂质过氧化协同作用的产生,其机制与葛根素- β -胡萝卜素的协同作用相似^[31]。本文研究发现,虾青素和 β -胡萝卜素组合对DPPH自由基、ABTS阳离子自由基和 $\cdot\text{OH}$ 清除率具有协同作用。此研究结果与LI-ANG等^[32]报道虾青素与类胡萝卜素在脂相具有协同作用一致。这是由于类胡萝卜素的空间分布,虾青素固定在脂质/水界面,来自引发剂2,2'-偶氮双(2,4-二甲基戊腈)的初始自由基氧化虾青素生成自由基阳离子,与大豆卵磷脂氧化竞争,由于共振稳定作用,虾青素自由基阳离子中的单电子被重新定位到类胡萝卜素多烯链的中心,多烯链可以在细胞膜的亲脂性中心从还原性更强的类胡萝卜素 β -胡萝卜素中提取一个电子,从而以 β -胡萝卜素为代价再生虾青素。虾青素起着自由基桥的作用,将分子内部还原性更强的类胡萝卜素(β -胡萝卜素)的电子传递到具有高偶极矩自由基集中的界面。研究发现,高浓度虾青素与 β -胡萝卜素组合不利于协同抗氧化作用的产生。许飒等^[33]研究结果显示,当 V_C 浓度较高,类胡萝卜素浓度较低时,两者组合具有较好的协同抗氧化作用;但是当类胡萝卜素增加至一定浓度时,两者组合没有表现出抗氧化协同作用。丁健等^[34]研究表明,当 V_C 为 10 mg/mL ,类胡萝卜素与 V_C 质量浓度比值 ≤ 1.5 时,或 V_E 为 0.384 mg/mL ,类胡萝卜素与 V_E 质量浓度比值 ≤ 1.5 时,类胡萝卜素与 V_C 或 V_E 具有明显的助氧化作用;而当 V_C 或 V_E 浓度较低时, V_C 或 V_E 将加速类胡萝卜素的降解。本研究结果显示, $16 \mu\text{g/mL}$ 虾青素与任意浓度 β -胡萝卜素组合对DPPH自由基清除率比未混合前2种单体清除能力之和低,表现为拮抗作用;高浓度的虾青素与低浓度的 β -胡萝卜素结合对ABTS阳离子自由基清除率以及较高浓度的虾青素与较高浓度的 β -胡萝卜素结合对 $\cdot\text{OH}$ 清除率均表现出拮抗作用。抗氧化剂之间的拮抗现象可能是由于抗氧化剂自由基加合物的形成或抗氧化剂再生之间的竞争,以及一种抗氧化剂的微环境被另一种抗氧化剂改变所造成的^[35]。

4 结论

本研究发现多种抗氧化评价体系中,虾青素的抗氧化能力均强于 β -胡萝卜素,并且虾青素和 β -胡萝卜素组合对DPPH自由基、ABTS阳离子自由基和 $\cdot\text{OH}$ 清除率具有协同作用。因此可应用虾青素和

β -胡萝卜素的抗氧化协同作用开发高效的抗氧化剂。同时可采用水溶性、成膜性、生物降解性良好的明胶和稳定性、溶解性、增稠性良好的麦芽糊精为微胶囊壁材,采用喷雾干燥法制备虾青素和 β -胡萝卜素微胶囊,以避免光和氧等因素作用下类胡萝卜素的降解和异构化。综上,本文的研究结果为利用法夫酵母开发高效的抗氧化剂提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 逯阳. 几种植物多酚捕获体内自由基反应机理的理论研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨理工大学,2017.
LU Y. A theoretical study on the reaction mechanisms of several plant polyphenols scavenging radicals *in vivo* [D]. Harbin: Harbin University of Science and Technology, 2017.
- [2] PALANISWAMY R, PADMA P R. Free radical scavenging activity of *Majorana hortensis* leaves [J]. *Ancient Science of Life*, 2011, 30(4): 96–99.
- [3] 翁雪梅, 李思惠. 化学危害因素引起的疾病与自由基关系研究进展[J]. *职业卫生与应急救援*, 2009, 27(2): 77–79.
WENG X M, LI S H. Free radical and diseases caused by chemical hazards [J]. *Occupational Health and Emergency Rescue*, 2009, 27(2): 77–79.
- [4] 韩静静, 田丹丹, 高玉星, 等. 生育酚及其衍生物保护自由基诱导的生物大分子损伤和抑制 HepG2 细胞增殖的作用[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 144–152.
HAN J J, TIAN D D, GAO Y X, et al. Tocopheryl and derivatives protect against free radical-induced damage to biological macromolecules and inhibit the proliferation of HepG2 cells [J]. *Food Science*, 2018, 39(13): 144–152.
- [5] 高岩, 邢丽红, 孙伟红, 等. 不同来源虾青素提取、纯化及定量检测方法的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(5): 1 414–1 423.
GAO Y, XING L H, SUN W H, et al. Research progress on extraction, purification and quantitative detection methods of astaxanthin from different sources [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(5): 1 414–1 423.
- [6] 张广伦, 肖正春, 张锋伦, 等. 雨生红球藻中虾青素的研究与应用[J]. *中国野生植物资源*, 2019, 38(2): 72–77.
ZHANG G L, XIAO Z C, ZHANG F L, et al. Study and application of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2019, 38(2): 72–77.
- [7] VISSER H, VANOOYEN A J J, VERDOES J C. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 4(3): 221–231.
- [8] HUSSEIN G, SANKAWA U, GOTO H, et al. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition [J]. *Journal of Natural Products*, 2006, 69(3): 443–449.
- [9] DU X P, DONG C C, WANG K, et al. Separation and purification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by preparative high-speed counter-current chromatography [J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1 029–1 030: 191–197.
- [10] HORMOZI M, GHOREISHI S, BAHARVAND P. Astaxanthin induces apoptosis and increases activity of antioxidant enzymes in LS-180 cells [J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 891–895.
- [11] KUMAR S, SINGH S V. Influence of astaxanthin supplementation on attainment of puberty and lipid peroxidation in Sahiwal and Karan Fries (Holstein \times Tharparkar) heifers during summer season [J]. *Biological Rhythm Research*, 2020, 51(1): 15–28.
- [12] LI J J, GUO C Y, WU J Y. Astaxanthin in liver health and disease: A potential therapeutic agent [J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2020, 14: 2 275–2 285.
- [13] ALIDADI M, JAMIALAHMADI T, CICERO A F G, et al. The potential role of plant-derived natural products in improving arterial stiffness: A review of dietary intervention studies [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 99: 426–440.
- [14] MISAWA N, SHIMADA H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts [J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 59(3): 169–181.
- [15] OJIMA K, BREITENBACH J, VISSER H, et al. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase [J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2006, 275(2): 148–158.
- [16] VERDOES J C, SANDMANN G, VISSER H, et al. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7): 3 728–3 738.
- [17] 王春, 杜希萍, 姜泽东, 等. 法夫酵母虾青素高效液相色谱分析前处理方法改进研究[J]. *分析科学学报*, 2018, 34(3): 352–356.
WANG C, DU X P, JIANG Z D, et al. Improving the sample preparation for high performance liquid chromatography determination of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* [J]. *Journal of Analytical Science*, 2018, 34(3): 352–356.
- [18] SOWMYA R, SACHINDRA N M. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by *in vitro* assays and in membrane model system [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(1): 308–314.
- [19] 张乃珣, 尹红力, 刘冉, 等. 茶黄素与真菌多糖联合清除 ABTS 自由基活性的比较[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(2): 21–28; 34.
ZHANG N X, YIN H L, LIU R, et al. ABTS radical scavenging activity of theaflavins combined with fungal polysaccharides [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(2): 21–28; 34.
- [20] VANIA U O, JOSELINA H O, ELIZABETH C M, et al. Component analysis and free radicals scavenging activity of *Cicer arietinum* L. husk pectin [J]. *Molecules*, 2010, 15(10): 6 948–6 955.
- [21] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70–76.
- [22] 徐维盛, 李东, 刘静, 等. ORAC 法对 12 种水果总抗氧化能力评价研究[J]. *食品工业*, 2014, 35(1): 247–250.
XU W S, LI D, LIU J, et al. Study on antioxidant activities of 12 kinds of fruit [J]. *The Food Industry*, 2014, 35(1): 247–250.
- [23] 尹文娟. 载虾青素海藻酸钙微球的制备及性能研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2016.
YI L J. Preparation and properties of astaxanthin-loaded calcium alginate microparticles [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016.

- [24] 钟先锋, 张继如, 黄建锋, 等. 法夫酵母虾青素对油脂氧化稳定性的影响[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(2): 31–34.
ZHONG X F, ZHANG J R, HUANG J F, et al. Effects of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* on the oxidative stability of oil[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2015, 23(2): 31–34.
- [25] LIU X B, OSAWA T. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity *in vitro* compared to the all-trans isomer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 357(1): 187–193.
- [26] 钟雨彤. 虾青素的生理功能与应用领域[J]. 科技展望, 2016, 26(23): 290.
ZHONG Y T. Physiological function and application of astaxanthin[J]. Outlook of Science and Technology, 2016, 26(23): 290.
- [27] GOTO S, KOGURE K, ABE K, et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2001, 1512(2): 251–258.
- [28] TERAJO J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution[J]. Lipids, 1989, 24(7): 659–661.
- [29] LIM B P, NAGAO A, TERAJO J, et al. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1992, 1126(2): 178–184.
- [30] LIANG R, HAN R M, FU L M, et al. Baicalin in radical scavenging and its synergistic effect with β -Carotene in antilipoxidation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(15): 7118–7124.
- [31] HAN R M, TIAN Y X, BECKER E M, et al. Puerarin and conjugate bases as radical scavengers and antioxidants: Molecular mechanism and synergism with β -Carotene[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2384–2391.
- [32] LIANG J, TIAN Y X, YANG F, et al. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge[J]. Food Chemistry, 2009, 115(4): 1437–1442.
- [33] 许颢, 李忠, 张声华. 类胡萝卜素与 V_C 的协同抗氧化性研究[J]. 食品科学, 1999, 20(2): 22–26.
XU S, LI Z, ZHANG S H. Study of the synergistic antioxidative activities of carotenoids and V_C [J]. Food Science, 1999, 20(2): 22–26.
- [34] 丁健, 徐娟, 张红艳. 丙酮体系中柑橘皮中类胡萝卜素与 V_C 及 V_E 的协同抗氧化性研究[J]. 生物技术, 2004, 14(6): 30–32.
DING J, XU J, ZHANG H Y. Study of the synergistic antioxidative activities of citrus peel carotenoids and V_C or V_E in acetone solution[J]. Biotechnology, 2004, 14(6): 30–32.
- [35] CHOE E, MIN D B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2009, 8(4): 345–358.

Antioxidant activity and synergistic effect of astaxanthin and β -carotene

ZHANG Tao¹, DENG Si¹, CHEN Yanhong^{1,2,3,4*}, DU Xiping^{1,2,3,4}

1(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen, 361021, China)

2(Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen, 361021, China)

3(Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen, 361021, China)

4(Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen, 361021, China)

ABSTRACT Based on the analysis of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) free radical (ABTS), hydroxyl free radical (\cdot OH) clearance, iron ion reduction ability, anti-oil peroxidation ability and oxygen-radical absorbance capacity (ORAC), the antioxidation abilities of astaxanthin and β -carotene were studied. In addition, DPPH, ABTS, \cdot OH clearance were used as indexes to evaluate the antioxidation abilities of the synergistic effect of astaxanthin and β -carotene. The results showed that astaxanthin and β -carotene had antioxidant activities in the six antioxidant experiments, and the antioxidant activities of astaxanthin were stronger than that of β -carotene. The concentration for 50% of maximal effect (EC_{50}) values of astaxanthin on DPPH, ABTS and \cdot OH radicals were (29.95 ± 3.01) , (61.21 ± 4.17) and (26.12 ± 5.14) μ g/mL, respectively. The combination of astaxanthin and β -carotene demonstrated synergy on DPPH \cdot , ABTS $^{+}$, \cdot OH radical scavenging capacities, however, a high concentration of astaxanthin combined with β -carotene was not conducive to the production of radical scavenging capacity synergy. The study provides a theoretical basis for the development of efficient antioxidants from *P. rhodozyma*.

Key words astaxanthin; β -carotene; antioxidant activity; antioxidants; synergistic effect