

海藻中类胡萝卜素抗超氧自由基活性研究*

严小军 范 晓 娄清香 刘晓妹

(中国科学院海洋研究所)

在植物组织内,类胡萝卜素除具有集光功能外,还具有其他的重要生物学功能,类胡萝卜素作为光保护剂可抵抗光、氧和光敏色素的有害作用,也可作为化学反应物抵抗细胞所产生的化学物质引起的氧化损伤,保护光合系统免受光动力敏化作用的破坏。类胡萝卜素光保护作用的主要机制如下:(1)类胡萝卜素对三重线态敏化剂的淬灭;(2)类胡萝卜素对 $^1\text{O}_2$ 的淬灭;(3)类胡萝卜素对自由基反应的抑制,它的这种生物学活性在医学领域也具有重要的应用价值。胡萝卜素在生物系统中的保护作用包括失活由电激活的单线态氧($^1\text{O}_2$),失活反应性的化学物质如过氧化物自由基和烷氧基,这些自由基产生于细胞内,并可能会引起有害的氧化作用。类胡萝卜素的保护功能与直接的抗氧化活性或与对细胞内抗氧化水平的调节有关(Krinsky, 1990)。对于类胡萝卜素清除脂类过氧化物自由基的能力和作用机理已经进行了详细的研究(Burton *et al.*, 1984; Burton, 1989; Terao, 1989; Palozza *et al.*, 1992b; Tsuchihashi *et al.*, 1995),但对于类胡萝卜素清除超氧阴离子自由基的能力尚未见有详细研究报道。本文以邻苯三酚自氧化体系作为超氧自由基的发生体系,对海藻中分离纯化制备的类胡萝卜素清除该种自由基的能力进行了初步的探讨。

一、材料与方法

1. 海藻中类胡萝卜素的提取与制备

除 β -胡萝卜素采用标准样品外,其余类胡萝卜素(包括 α -胡萝卜素、褐藻黄素、三色堇黄素、玉米黄素、叶黄素、 β -隐藻黄素、角黄素)全部从海藻中制取、分离。采用硅胶柱层析,洗脱液为正己烷和乙酸乙酯按照体积比分别为1:1, 1:2, 1:3(v:v)配置的梯度溶液。 α -胡萝卜素和三色堇黄素从石花菜中制备,褐藻黄素从鼠尾藻中制备,玉米黄素从条斑紫菜中制备,叶黄素从金膜藻中制备, β -隐藻黄素从缘管浒苔中制备,角黄素从海黍子中制备。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3791 号。
国家“九五”攻关资助项目, 96-916-04-01 号。
收稿日期: 2000 年 1 月 5 日。

2. 超氧阴离子自由基发生体系及抗氧化性的检测方法

取 0.05 mol/L (pH = 8.2) 的 Tris-HCl 缓冲液 5mL, 置于 25℃ 水浴中预热 20 min, 然后分别加入一定浓度的待测样品和 25 mol/L 的邻苯三酚溶液 0.4 mL, 混匀后置 25℃ 水浴中反应 4 min, 加入 8 mol/L HCl 终止反应, 采用 DU-650 型分光光度计 (美国 Beckman 公司) 于 299 nm 处测定溶液的吸光度 (A)。空白对照组以相同体积的丙酮代替待测样品, 计算清除率 $P = (A_0 - A_1) / A_0$, 其中 A_0 为空白对照组的吸光度, A_1 为所测样品的吸光度 (王春波等, 1998)。

3. 海藻中不同类胡萝卜素抗氧化性的比较

分别配制浓度为 1×10^{-2} mg/mL 的海藻主要类胡萝卜素, 按上述实验方法测定其抗氧化性。以蒸馏水作为空白, β -胡萝卜素标准溶液作为参比。

4. 维生素 E 和各类胡萝卜素协同作用的比较

分别测定浓度为 1×10^{-2} mg/mL 的维生素 E 和各类胡萝卜素溶液 (1×10^{-2} mg/mL) 的协同抗氧化性。

二、结果与讨论

1. 不同类胡萝卜素抗氧化性的比较

在邻苯三酚自氧化的过程中有超氧阴离子自由基 O_2^- 产生, 它既是邻苯三酚自氧化的中间产物, 又能加速邻苯三酚的自氧化进程。因此, 一种物质对邻苯三酚自氧化的抑制率可作为它对超氧阴离子自由基 O_2^- 清除率的表征。

从表 1 可以看出, 在这些类胡萝卜素中三色堇黄素清除超氧阴离子自由基 O_2^- 的能力最强, 高达 12% 左右; α -胡萝卜素相对最弱, 仅有 7% 左右。三色堇黄素、 β -胡萝卜素、 β -隐藻黄素、叶黄素、褐藻黄素和玉米黄素的自由基清除能力均强于维生素 E, 都可成为较好的生物抗氧化剂, 其中, 玉米黄素是高等植物中偶尔含有的少量组分, 又具有较强的抗氧化活性。至于三色堇黄素清除自由基能力强的机制虽尚需进一步深入研究, 但褐藻和红藻显然可以作为三色堇黄素的主要资源库。

表 1 不同类胡萝卜素的超氧自由基清除率 $\bar{x} \pm s/\%$

组别	例数 n	自由基清除率
空白对照组	3	0
维生素 E	3	6.9 ± 2.6
α -胡萝卜素	3	6.9 ± 1.3
β -胡萝卜素	3	8.2 ± 1.6
褐藻黄素	3	7.5 ± 0.4
三色堇黄素	3	12.3 ± 1.3
玉米黄素	3	7.3 ± 1.0
叶黄素	3	7.8 ± 3.2
β -隐藻黄素	3	7.9 ± 2.4
角黄素	3	6.9 ± 4.5

2. 维生素 E 和各种类胡萝卜素协同作用的比较

表 2 是在超氧阴离子自由基发生体系中同时添加类胡萝卜素与维生素 E 后, 溶液对超氧自由基的自由基清除效率。为了直观地比较各种类胡萝卜素对自由基单独清除能力和其与维生素 E 协同作用的抗氧化活性变化, 将表 1 与表 2 所获得的有关海藻中类胡萝卜素的超氧自由基清除活性的结果列入图 1, 从图 1 可以看出, 维生素 E 和 β -胡萝卜素、玉米黄素以及褐藻黄素的协同作用最好, 其清除超氧阴离子自由基 O_2^- 的能力很强, 比各自的清除能力增加约 80%, 比其他类胡萝卜素与维生素 E 的协同作用高 50% 以上。三色堇黄素单独清除自由基的能力很强, 可是协同效果却不佳; 玉米黄素和褐藻黄素单独清除自由基的能力不如三色堇黄素, 可是和维生素 E 的协同作用却使其自由基清除能力高于三色堇黄素; 除此之外, 其他色素与维生素 E 的协同作用使各自清除能力增加了将近 30%。绿藻和褐藻可作为和维生素 E 协同作用较强的玉米黄素和褐藻黄素的主要资源库。

表 2 维生素 E 和各类胡萝卜素协同作用的超氧自由基清除率 $\bar{x} \pm s/\%$

组 别	例数 n	自由基清除率
空白对照组	3	0
维生素 E + α -胡萝卜素	3	8.9 ± 2.4
维生素 E + β -胡萝卜素	3	14.5 ± 0.6
维生素 E + 褐藻黄素	3	12.9 ± 1.0
维生素 E + 三色堇黄素	3	13.4 ± 1.1
维生素 E + 玉米黄素	3	13.2 ± 2.5
维生素 E + 叶黄素	3	10.2 ± 1.6
维生素 E + β -隐藻黄素	3	10.3 ± 3.6
维生素 E + 角黄素	3	8.7 ± 1.3

3. 类胡萝卜素抗氧化活性的意义与作用方式

近年的研究表明, 活性氧自由基是产生多种疾病的“罪魁祸首”。一般的反应过程描述如下, 活性氧自由基攻击不饱和脂肪酸侧链产生不饱和烷基自由基, 这种自由基可以引发链式自由基反应, 很快形成过氧化物, 这种过氧化物累积在油脂中就表现为酸败, 在人体细胞膜中就表现为褐变、色素沉着。在细胞内的过氧化物自由基可以进一步与蛋白质发生反应, 特点是蛋白质中的酚羟基与氨基使蛋白质变性、酶活性降低。脂类与蛋白质过氧化物还能够与核酸反应, 导致 DNA 突变、断裂。因此, 在世界许多国家, 研究药理、食品、药物、营养等多方面科技人员正在合作, 从分离提取、结构鉴定、筛选模型建立到抗氧化剂代谢、潜在的药理作用等共同协作研究抗氧化, 可以预见, 海藻的抗氧化研究也有可能使人们对海藻的保健作用有新的认识。

一般来说, 按照清除自由基的种类与作用位点, 可将抗氧化剂分为预防型抗氧化剂和链锁切断型抗氧化剂两大类 (图 2)。类胡萝卜素在以下方面对氧化过程均起作用: (1) 作为预防型抗氧化剂, 类胡萝卜素可以清除单线态氧及三线态光敏感剂等 (Burton, 1989)。(2) 作为链锁切断型抗氧化剂, 类胡萝卜素可以清除超氧自由基。不同的类胡

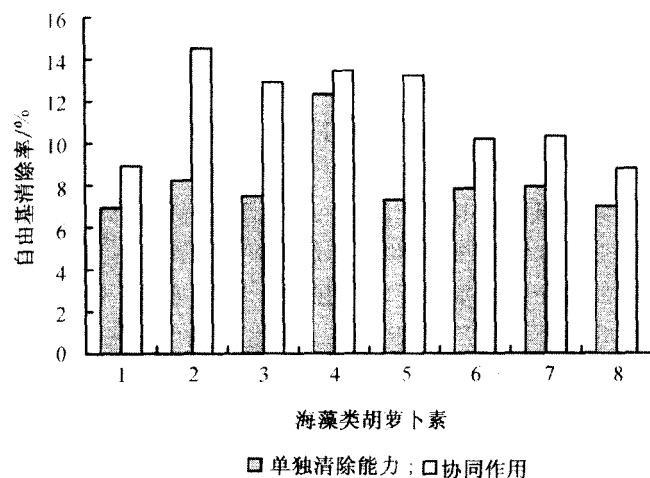


图1 各种类胡萝卜素对自由基单独清除能力和与维生素E协同作用的对比

1. α -胡萝卜素; 2. β -胡萝卜素; 3. 褐藻黄素; 4. 三色堇黄素; 5. 玉米黄素;
6. 叶黄素; 7. β -隐藻黄素; 8. 角黄素

胡萝卜素随化学结构的不同可以有所侧重,如褐藻黄素的连锁切断活性可能较强(Yan *et al.*, 1999),本实验结果也表明不同类胡萝卜素的超氧自由基清除效率有较大差别。(3)类胡萝卜素可以与其他抗氧化剂具有明显的协同作用,因此,对于进一步的体内抗氧化活性实验而言,应该注重类胡萝卜素构效关系的研究,及寻找针对具体生物检测模型的最佳类胡萝卜素种类,而不能一概而论。

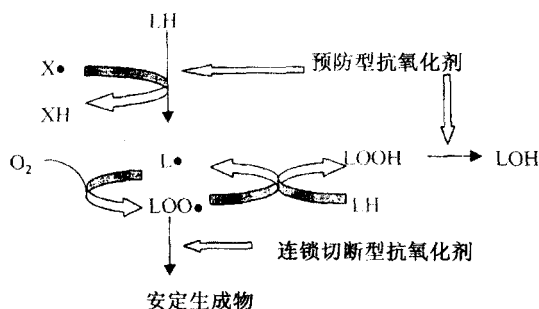


图2 抗氧化剂的类型与作用位点
(预防型和连锁切断型)

参 考 文 献

- 王春波等, 1998, 海洋肽的体外抗氧化作用, 中国海洋药物, 3 (67): 15—17。
 Burton, G. W. and K. U. Ingold, 1984, β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *Science*, 224: 569—573.
 Burton, G. W. 1989, Antioxidant action of carotenoids, *J. Nutr.*, 119: 109—111.
 Krinsky, N. I., 1990, Carotenoids in medicine, In "Carotenoids: Chemistry and Biology" (Krinsky, N. I. et al, ed.),

- Plenum, New York, 279—291.
- Palozza, P. and N. I. Krinsky, 1992, Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model, *Arch. Biochem. Biophys.*, 297 (2): 291—295.
- Terao, J., 1989, Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution, *Lipids*, 24: 659—661.
- Tsuchihashi, H., M. Kigoshi and M. Iwatsuki, *et al.*, 1995, Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323 (1): 137—147.
- Yan, X., Y. Chuda, M. Suzuki, T. Nagata, 1999, Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 605—607.
- Yoshikawa T *et al.*, 1990, Active oxygen species in biology and medicine, *Kikan Kagaku Sosetsu*, 7: 163—176.
- Yoshikawa T and S. Takahashi, 1995, The antioxidant function of foods in disease prevention, *Food Ingredients Journal of Japan*, 163: 11—18.

SUPEROXIDE RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES OF CAROTENOIDS ISOLATED FROM MARINE ALGAE*

Yan Xiaojun, Fan Xiao, Lou Qingxiang, Liu Xiaomei

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

The ability of carotenoids to scavenge superoxide radicals *in vitro* was determined by pyrogalllic acid autooxidation method. The results indicated that violaxanthin has the strongest superoxide radical scavenging activity, followed by β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein and fucoxanthin. Combination experiments of carotenoids with vitamin E were also studied to show that β -carotene, zeaxanthin, or fucoxanthin could synergistically promote the superoxide radical scavenging activity of vitamin E.

By comparing the content and antioxidant activity of carotenoids, we hope to screen valuable species of seaweeds to further research on its physiological and pharmacological activities.

* Contribution No. 3791 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.