

DSC 测定虾青素的氧化稳定性及体外抗氧化研究

季晓敏, 王亚男, 蔡江佳, 张云云, 姜春芳, 苏秀榕*

宁波大学海洋学院, 宁波 315211

摘要:用 DSC(差示扫描热量法)分析了虾青素的最适储藏温度和氧化稳定性,并且用红外光谱仪检测了虾青素热处理前后结构的变化,然后通过体内细胞检测了人体对虾青素的最大耐受量以及体外抗氧化比较了不同方法得到的精油清除 DPPH 的能力,结论:虾青素的最适宜贮藏温度为-25 ℃左右,贮存条件应为低温、避光,防止与空气接触。同时通过 DSC 检测精油中虾青素的氧化诱导期实验发现:当精油置于 25 ℃空气中,氧化诱导期为 8.5 d,当温度为 4 ℃,氧化诱导期为 29.89 d,当温度为-4 ℃,氧化诱导期为 48.3 d。红外光谱分析虾青素热氧化前后结构的变化发现:氧化之后共轭双键、芳香环上 C=C,及芳香环上的 C=O、O-H、六元环仲醇 C-O 键发生变化。虾青素在人体的最大耐受量 5×10^{-6} mol/L,超临界(Scf),微波萃取(Mae),索式抽提(Sox)方法得到的精油清除 DPPH 能力 $Mae > Scf > Sox$ 。

关键词:虾青素;差式扫描量热仪;氧化诱导期;抗氧化

中图分类号:TS222.1

文献标识码:A

Study on Using DSC to Test Oxidation Stability and Antioxidant of Astaxanthin.

JI Xiao-min, WANG Ya-nan, CAI Jiang-jia, ZHANG Yun-yun, JIANG Chun-fang, SU Xiu-rong*

School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: using DSC analyzed the most suitable storage temperature and oxidation stability of astaxanthin, infrared detected changes in the structure of astaxanthin before and after the heat treatment, and then detected human body's maximum tolerated dose and antioxidant of astaxanthin through the cell. Using different methods to get astaxanthin oil and compared their ability to clean DPPH. Conclusion: astaxanthin optimum storage temperature is about -25 ℃, storage conditions should be cold, dark and protected from air. From DSC detection of oxidation's oxidation induction period in oils, this paper found that when oils placed in the air at 25 ℃, oxidative induction period is 8.5 d, when the temperature is 4 ℃, oxidative induction period is 29.89 d, when the temperature is -4 ℃, oxidative induction period is 48.3 d. Infrared Spectral analysis found that astaxanthin conjugated double bonds and aromatic ring's C=C, aromatic rings's C=O and O-H, six-membered cyclic secondary alcohols's C-O changes after thermal oxidation, The maximum tolerated dose of astaxanthin in human body is 5×10^{-6} mol/L, comparison of astaxanthin oil gotten by supercritical fluid(Scf) and the microwave-assisted extraction(Mae), cable-extraction(Sox), their ability to clean DPPH is $MAE > SCF > SOX$.

Key words: astaxanthin; differential scanning calorimeter; oxidation induction time; antioxidant

虾青素是一种天然胞外超强抗氧化剂,它可以淬灭单形态氧,清除自由基以及有效的结束过氧化链式反应,防止氧原子作用于细胞膜、亚细胞膜上的不饱和脂肪酸,从而保护细胞及 DNA 免受氧化反应的伤害^[1-2],研究虾青素的热稳定性、抗氧化性和贮藏条件对其加工和应用具有重要的意义。

研究含虾青素类物质的贮藏条件可从玻璃化保

藏入手,该理论认为,任何食品处于玻璃态时,一切可导致其品质劣化的变化均停止或减缓,可借此有效地提高保藏食品的品质及稳定性^[3]。发生玻璃化转变时的温度称为玻璃化转变温度 Tg,它是控制食品质量和稳定性的

关键。食品体系的玻璃态和玻璃化转变影响到食品的贮藏和质量控制,是食品贮藏的一项关键指标,因此,可以通过在玻璃化转变温度以下贮存食品,或提高食品体系的玻璃化转变温度来缓解冷冻食品品质的恶化^[4]。近年来逐步受到人们的关注和重视,研究和考察这些变化,DSC 可以提供测定的

方法。物质若氧化,则会放热,氧化诱导期越长,则储存时间越长,因此可以通过 DSC 监测不同温度下的氧化诱导期,从而得到不同温度下的保存时间。然后近年来红外光谱技术由于快速、无损、成本低、重现性好等特点被广泛用于食品、农产品质量与安全检测^[5-8]。因此本文通过红外来检测样品,旨在区别物质氧化前后结构的变化提供理论依据。

实验用建立体内细胞过氧化损伤模型,通过测定不同浓度虾青素对损伤细胞存活率(MTT 检测)研究此类化合物抗氧化能力。

细胞试验比较灵敏,但繁琐、周期较长、费用高,不适于大量样品的测定,因此寻找一种从整体反映药物抗氧化活性的方法,建立一种生物活性评价方法是其质量控制的重要手段和发展新趋势,清除自由基的检测评价方法有许多种^[9,10],而 DPPH 法从整体出发考察药材抗氧化能力,具有快速、简便、灵敏的优点^[11,12],因此可用于抗氧化剂清除自由基能力的评价。最终本实验体内试验仅仅检测虾青素在细胞中的抗氧化能力,然后通过体外清除 DPPH 自由基的实验方法对超临界,微波萃取,索式抽提方法得到的精油进行实验,比较三种方法的清除能力大小,旨在为利用雨生红球藻开发天然的、高效的抗氧化功效药物提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

雨生红球藻藻粉(由宁波大学水产系藻种室提供),虾青素标准品(Sigma 公司),人皮肤成纤维细胞 CCD-966SK(上海酶联生物科技有限公司),DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Thermo scientific, Hyclone),0.25% Trypsin-1 mM EDTA·4Na(美国 Invitrogen, Gibco),SOD 和 MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素(碧云天生物技术研究),二甲基亚砜、MTT(美国 Amresco),DPPH(C₁₈H₁₂N₅O₆,批号 S90790-379,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

雨生红球藻藻粉经过液氮反复研磨破壁,然后做 DSC 测定;超临界精油是在压力 42 MPa,萃取温度 47 °C,萃取时间 120 min,液固比 1.5 得到,微波萃取精油条件为:液固比 108,时间 19.5 min,索式抽提按国标萃取得到。

1.2.2 热力学性质分析

玻璃化转变温度:取(约 5 mg)虾青素标准品平铺于铝坩埚中,取另一空铝坩埚为对照,差式扫描量热仪(DSC2003 型,德国,NETZSCH)进行分析,以 5 °C/min 的升温速率 40 °C 升到 200 °C,吹扫气体为氮气,液氮为冷却介质测定热能变化,得到玻璃化转变温度和最高氧化的温度。

氧化诱导期:取新鲜藻粉样品液氮研磨破壁处理,按上述操作,吹扫气体为氮气,当加热至所需要的温度时,温度设置为恒温,持续通入 5 min 氮气,待样品稳定后,将吹扫气体改为空气,模拟空气中的实验,直至发生氧化为止,此时可以得到此温度下的氧化诱导期,例如,先将温度在氮气的情况下升到 170 °C,保持在此温度,继续通入 5 min 氮气,然后通入空气做恒温实验,接下依次做升温至 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100 °C 的氧化诱导期实验。

1.2.3 红外特性分标准品氧化前后结构变化

虾青素的标品氧化前后碾细后加入 100 mg 干燥 KBr 粉末,继续研磨,于 10 T/cm² 压力下(抽真空至 10 mmHg 柱,1~5 min)压成透明薄片,利用傅立叶变换红外光谱仪(ENSOR 27 型,德国,BRUKER)全反射光谱(ATR)进行测定。波段测定范围为 400 cm⁻¹~4000 cm⁻¹,仪器分辨率为 0.1 cm⁻¹。

将标准品氧化前后分别进行红外检测,分析其结构变化,为其氧化提供理论支撑。

1.2.4 细胞抗氧化试验

虾青素对正常和损伤细胞存活率的影响:将人皮肤成纤维细胞细胞数 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,加入最终作用浓度 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液,加入最终浓度为 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 5×10^{-8} mol/L 的虾青素溶液,培养 24 h 后,加入 2 mg/mL MTT 溶液,37 °C 继续孵育 4 h 后加 DMSO 150 μL,于 450 nm 处测吸收度(A)值。同时设置对照组,则细胞抑制率(%) = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%

通过不同剂量组的虾青素对细胞的影响,得到虾青素对细胞的最大耐受量。

1.2.5 体外抗氧化清除 DPPH ·^[13]

通过将超临界,微波萃取,索式抽提得到的精油做清除 DPPH · 实验,检测其抗氧化能力的大小。测定方法同文献^[14,15]。称取 DPPH 粉末 0.0079 g,用无水乙醇溶解 DPPH 粉末,并定容至 100 mL,即得到 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液,放置于棕色瓶

中,并保存在暗处备用^[16]。在 2 mL 2×10^{-4} mol/L DPPH · 溶液中加入 2 mL 样品,摇匀,于室温下放置 30 min,用无水乙醇作参比液,在 517 nm 处测定其吸光值 A_i ;同时测定 2 mL 2×10^{-4} mol/L DPPH · 溶液中加入 2 mL 无水乙醇混合液的吸光值 A_c ,再测定 2 mL 样品液与 2 mL 无水乙醇混合液的吸光值 A_j 。根据下式计算样品对 DPPH · 的抑制率。

$$\text{DPPH} \cdot \text{的抑制率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

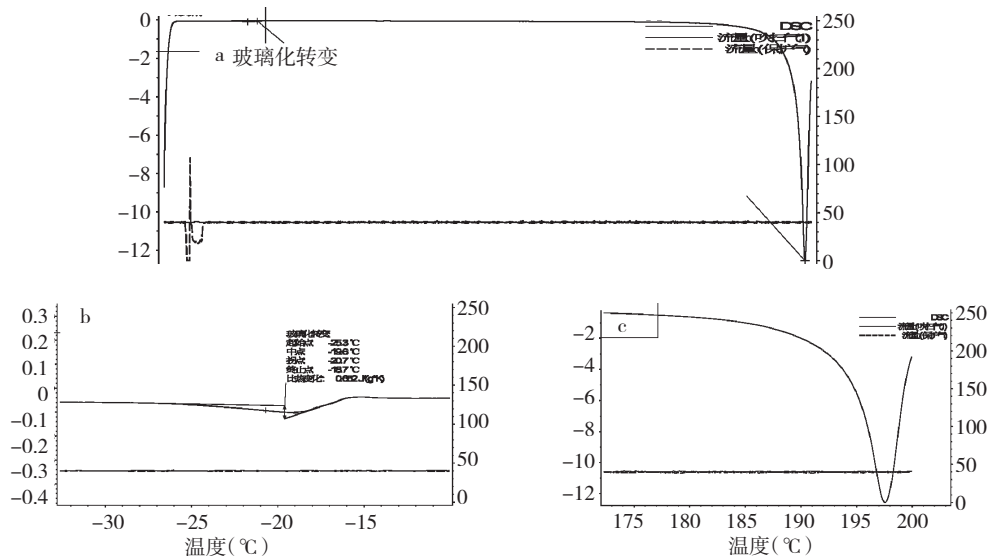


图 1 虾青素标准品的热分析曲线

Fig. 1 Thermal analysis curve of Astaxanthin

2.2 氧化诱导期

从表 1 可知,新鲜藻粉样品液氮研磨破壁处理后,DSC 中通入空气时,不同的温度的氧化诱导期时

间不一样,在 170 °C 仅有 2.2 min,随着温度的降低,氧化诱导期变长,100 °C 时,为 156 min。

表 1 不同温度下氧化诱导期时间

Table 1 The oxidative inductive time at different temperature

温度 T(°C)	170	160	150	140	130	120	110	100
时间 t(min)	2.2	3.7	6.3	11	22	35	73	156

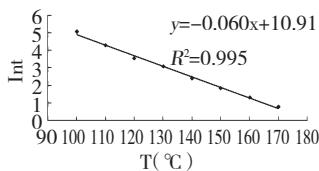


图 2 不同的温度下氧化诱导期

Fig. 2 The oxidative inductive time at different temperature

图 2 探索的是在不同的温度下雨生红球藻中虾青素的氧化诱导期,及在一个温度下虾青素开始氧化的时间,横坐标为不同的温度,纵坐标为不同温度

2 结果和分析

2.1 玻璃化转变温度

由下图 1 中 a 可知,DSC 得到虾青素标品的玻璃化转变温度为-25 °C,开始氧化的温度为 190 °C, b, c 是放大之后可以看到玻璃化转变温度,起始点-25.3 °C,中点-19.6 °C,终点-18.7 °C, c 图是一个明显的放热峰,放热峰的峰值为-197 °C。

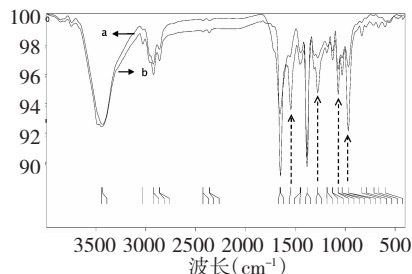


图 3 热处理前后虾青素的结构变化

Fig. 3 Changes in the structure of astaxanthin after heat treatment

注:a 表示虾青素标品-热处理之前 b 表示虾青素标品-热处理之后

下氧化诱导期的对数,他们之间呈线性关系,带入方程 $y = -0.060x + 10.91$,得到当温度为 25 °C,氧化诱导期为 8.5 天,当温度为 4 °C,氧化诱导期为 29.89 天,当温度为 -4 °C,氧化诱导期为 48.3 d。

2.3 红外光谱图分析

对虾青素标准品热分析前后进行分析,可以获知傅立叶变换红外光谱图中虾青素的吸收峰位置、振动方式以及谱带归属^[17]。由图可以看出虾青素分子 3435 cm^{-1} 处是虾青素末端六元环上的羟基 O-H 键的伸缩振动吸收峰(-OH),与之相对应的 1275 cm^{-1} 处的吸收峰是由 O-H 键的面内弯曲振动(δ -OH)引起;1070 cm^{-1} 处的吸收峰为分子上仲醇 C-O 键的伸缩振动引起;在 1654 cm^{-1} 有一个很强的吸收带,是由于 C = O 伸缩振动造成的^[18]。吸收带在 1545 cm^{-1} 表示在芳香族六元环 C = C 伸缩振动。969 cm^{-1} 吸收带表示在 C,C 共轭体系的 C-H。

通过比较发现这些吸收带有些变化,经过热处理之后,1275 cm^{-1} 处的吸收峰 O-H 键的面内弯曲振动基本消失,但是 3435 cm^{-1} 处和之前相比仍有较强的吸收峰,说明此处 O-H 键的伸缩振动仍然存在,但是面内弯曲振动消失,可能是方向发生了变化。1070 cm^{-1} 处热处理之后吸收峰强度减弱,说明六元环仲醇 C-O 键伸缩振动减弱,但是仍然存在。1654 cm^{-1} C = O 处的吸收带强度减弱,并且波峰向高波数

方向转移;1545 cm^{-1} 芳香族六元环 C = C 处的吸收带经过热处理之后消失了,表示氧化后此处放生了变化;969 cm^{-1} C,C 共轭体系的 C-H 吸收带热处理之后明显减弱,波峰向低波数方向转移,此处发生了变化。

最终结果,是氧化之后共轭双键、芳香环上 C = C,及芳香环上的 C = O、O-H、六元环仲醇 C-O 键发生变化。

2.4 体内抗氧化

当 H_2O_2 的浓度为 0.3 mmol/L,细胞存活率基本维持在 50% 左右,为使细胞处于损伤状态且又不致使细胞过度死亡,选择 H_2O_2 的浓度为 0.3 mmol/L 作为后续实验浓度。在此浓度下,不同浓度 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 5×10^{-8} mol/L 的虾青素溶液的细胞的抑制率分别为 0.91,0.12,-0.06,随着虾青素浓度的降低,抑制率逐渐减小,当浓度为 5×10^{-8} mol/L 时,对细胞有促进的作用;当高于此浓度时对细胞有明显的抑制作用。最终得到虾青素对细胞有抗氧化作用,但是不能超过细胞的的最大耐受量 5×10^{-6} mol/L。

2.5 清除 DPPH ·

将超临界 (Scf),微波萃取 (Mae),索式抽提 (Sox) 得到的精油配置为表格如下的不同浓度,然后按照按 1.2.5 的方法,计算 DPPH · 的抑制率。

表 2 不同浓度下不同提取方法清除 DPPH · 能力

Table 2 The DPPH scavenging activity of different extracts of different concentration

浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	1000	500	100	80	60	40	20
Mae	95.25	74.57	18.02	14.85	12.7	8.97	1.74
Scf	91.65	71.71	18.51	14.82	14.63	10.35	10.29
Sox	82.62	52.17	13.87	9.67	5.26	3.3	0.28

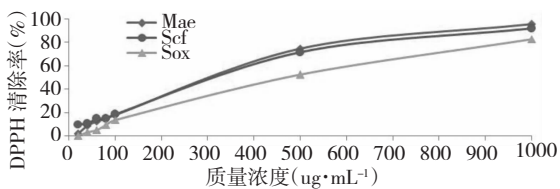


图 4 不同方法的提取物的 DPPH · 的清除作用比较

Fig. 4 The DPPH scavenging activity of different extracts

从图中可以看出雨生红球藻中不同的提取方法对 DPPH · 的清除作用有不同的效果,当加入一定质量浓度的提取物后,DPPH 自由基信号明显减弱,

吸光度值随药物质量浓度的增加而减小,清除率随着质量浓度的增加而提高,说明雨生红球藻提取物对 DPPH 自由基均有显著的清除作用,当浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,清除作用达到最高,Mae 为 95.25%;通过比较图,可以看出,对 DPPH · 的清除作用是 Mae > Scf > Sox, IC_{50} 越低,抗氧化剂的清除自由基的能力越强,因此选择 IC_{50} 值作为抗氧化剂自由基清除能力的测定指标。通过 Spss 软件计算得到 Scf 的 IC_{50} 为 325 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Mae 为 237 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sox 为 403 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可见自由基清除能力 Mae > Scf > Sox。

3 讨论与结论

雨生红球藻因富含含量较高的虾青素,而虾青素的抗氧化性是迄今为止最高的,因此研究虾青素的贮藏温度以及氧化诱导期刻不容缓,本文通过玻璃化转变的温度来寻找虾青素的最适宜贮藏温度为-25℃左右,贮存条件应为低温、避光,防止与空气接触。同时通过 dsc 检测精油中虾青素的氧化诱导期实验,可知当将精油置于空气中,当温度为 25℃,氧化诱导期为 8.5 d,当温度为 4℃,氧化诱导期为 29.89 d,当温度为-4℃,氧化诱导期为 48.3 天。目前,关于 DSC 来检测食品的热变性温度比较普遍,蛋白质变性的过程都会伴随着能量的变化,用 DSC 进行测量,其他的主要利用 DSC 研究食品中蛋白质种类,淀粉的糊化和老化,多糖与脂类物质的相互作用,脂类物质的溶解曲线和结晶动力学,食品的玻璃态保藏和食品综合体系^[19],关于目前研究食品的氧化诱导期方面的应用较少。

通过红外分析虾青素热氧化前后结构的变化,发现氧化之后共轭双键、芳香环上 C=C,及芳香环上的 C=O、O-H、六元环仲醇 C-O 键发生变化。至于变化成了什么结构,还需要用质谱,圆二色等继续深入研究。

最后,抗氧化实验,体内试验比较灵敏,但繁琐、周期较长、费用高,不适于大量样品的测定,因此在本实验在体内简单做了虾青素对细胞有抗氧化作用,虾青素在人体的最大耐受量 5×10^{-6} mol/L。之后,然后通过体外清除 DPPH 自由基的实验方法对超临界,微波萃取,索式抽提方法得到的精油实验,通过图直观比较及 IC₅₀ 比较三种方法的清除能力 Mae > Scf > Sox。同时,本实验用到的样品量极少,将 0.05 g 精油溶于 50 mL 乙醇中,得到最高浓度 1000 ug/mL,清除率达到 90% 以上,而含有的虾青素的含量是仅为 100 ug,可见虾青素的抗氧化效果之强。

参考文献

- Johnson EA, An G. Astaxanthin from Microbial Sources. *Crit Rev in Biotechnol*, 1991, 11: 297-326.
- Miao FP, et al. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2006, 352: 176-181.
- Yao AD(姚艾东), He J(何健). Application and foreground of the new technology of frozen food. *J. Henan Tech. Univ*(河

- 南工业大学学报), 2006, 27(3): 84-87.
- Sun XY(孙向阳), Wang C(王春), Chen J(陈洁). The application of the glass transition in the process and storage of quick frozen food. *Mach Cer, oil and Food Proc.*, (粮油加工与食品机械), 2006, (7): 81-83.
- Li HJ(李军会), Zhao LL(赵龙莲), Yan YL(严衍禄), et al. Near infrared spectrum technique and its application in quality analysis on farm produce. *Mode Sci Inst*(现代科学仪器), 2005, (1): 17-19.
- Zhao JW(赵杰文), Zhang HD(张海东), Liu MH(刘木华). On-destructive determination of sugar contents of apples using near infrared diffuse reflectance. *Trans Chin Soc Agric Eng*(农业工程学报), 2005, 21: 162-165.
- Li H(李辉), Qin YC(秦玉昌), Lv XW(吕小文), et al. Research advances of the application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy technology in the evaluation of feed quality and safety. *Trans Chin Soc Agric Eng*(农业工程学报), 2006, 22: 264-267.
- Wang L, Lee FS, Wang XR, et al. Feasibility study of quantifying and discriminating soybean oil adulteration in camellia oils by attenuated total reflectance MIR and fiber optic diffuse reflectance NIR. *Food Chem*, 2006, 95: 529-536.
- Wang XQ(王笑晴). Evaluation on anti-oxidant activity of *Curcuma longa* extracts based on DPPH free radical scavenging capability. *Drug Eval Rese*(药物评价研究), 2011, 34: 360-363.
- Song HE(宋怀恩), Wen ren(闻韧). Advances in the study of the antioxidants screening methods. *Chin J Med Chem*(中国药物化学杂志), 2003, 13: 119-124.
- Peng CL(彭长连), Chen SW(陈少薇). Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 2000, 27: 658-661.
- Xu SH(许申鸿), Hang H(杭瑚). A Simple Method for the Screening of Free Radical Scavenger. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2000, 31(2): 96-97.
- Hou FJ(侯付景), Jin CH(金春华), Dong MM(董明敏), et al. Study on optimization of enzymolysis technology of *Acaudina leucoprocta* by response surface method and their antioxidant activities. *Acta Nutri Sin*(营养学报), 2010, 32: 276-280.
- Wang GN(王根女), Su P(苏平), Huang KT(黄恺婷), et al. Optimization of microwave extraction of polyphenols in *perilla frutescens* leaves by response surface analysis. *J Chin Inst Food Sci and Tech*(中国食品学报), 2009, 9(5): 87-92.
- Laetitia MD, Christian M. Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiol and Biochem*, 2009, 47: 37-41. (下转第 326 页)