

# 酚酸与谷胱甘肽的抗氧化活性及联合抗氧化作用

冉玲, 黄琰, 曾红棱, 任尧, 何强

(四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065)

**摘要:** 为探究谷胱甘肽与6种酚酸(丁香酸、香草酸、没食子酸、咖啡酸、芥子酸、阿魏酸)的抗氧化活性及联合抗氧化作用, 以ABTS<sup>+</sup>清除能力、DPPH·清除能力、还原力和氧自由基吸收能力为抗氧化指标, 测定了谷胱甘肽与酚酸单独和联合作用的抗氧化能力, 并通过协同系数(SE)分析两者是否能协同抗氧化。结果表明, 在四个抗氧化实验中, 酚酸的抗氧化能力均强于谷胱甘肽。谷胱甘肽与丁香酸和香草酸均存在拮抗作用, 与没食子酸仅在还原力实验中有明显的协同作用( $p < 0.05$ )。谷胱甘肽与阿魏酸无协同作用, 与芥子酸仅在DPPH·清除实验中存在协同。而谷胱甘肽与咖啡酸在ABTS<sup>+</sup>、DPPH·和还原力实验中均表现出显著的协同抗氧化作用, 其SE分别为1.21、2.20和1.29, 为最具潜力的协同抗氧化组合。

**关键词:** 谷胱甘肽; 酚酸; 抗氧化活性; 协同作用

文章编号: 1673-9078(2020)03-48-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.3.007

## Antioxidant Activity and Combined Antioxidant Effect of Phenolic Acids and Glutathione

RAN Ling, HUANG Yan, ZENG Hong-leng, REN Yao, HE Qiang

(College of Biomass Science and Engineering Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** In order to investigate the antioxidant activities of glutathione and six phenolic acids (syringic acid, vanillic acid, gallic acid, caffeic acid, sinapic acid, ferulic acid) alone and in combination, ABTS<sup>+</sup> scavenging ability, DPPH· scavenging ability, reducing power and oxygen free radical absorption capacity were used to evaluate their antioxidant activities, and the synergistic effect (SE) was used to analyze whether they have synergistic antioxidant. The results showed that glutathione had antagonistic effects with syringic acid and vanillic acid in the four antioxidant experiments, and had obvious synergistic effects with gallic acid only in reducing power experiment ( $p < 0.05$ ). There was no synergistic effect between glutathione and ferulic acid, but only synergistic effect with sinapic acid in DPPH· scavenging experiment. However, glutathione and caffeic acid showed significant synergistic antioxidant activity in ABTS, DPPH free radical scavenging experiment and reducing power experiment and its SE were 1.21, 2.20 and 1.29, respectively, which was the most potential synergistic antioxidant combination.

**Key words:** glutathione; phenolic acids; antioxidant activity; synergistic effect

引文格式:

冉玲, 黄琰, 曾红棱, 等. 酚酸与谷胱甘肽的抗氧化活性及联合抗氧化作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 48-55

RAN Ling, HUANG Yan, ZENG Hong-leng, et al. Antioxidant activity and combined antioxidant effect of phenolic acids and glutathione [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 48-55

抗氧化剂是最重要的食品添加剂之一, 在食品工业中广泛用于延长产品的货架期。近年来, 天然抗氧

收稿日期: 2019-10-11

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31701565; 31601442); 国家博士后科研基金资助项目(2017M623035)

作者简介: 冉玲(1994-), 女, 硕士, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白质工程

通讯作者: 何强(1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及质量安全

化剂(如多酚提取物和肽类)及其协同抗氧化作用已成为研究人员关注的热点<sup>[1,2]</sup>。生物活性肽具有抗氧化能力, 可延缓脂质氧化, 保护人体组织和器官免受自由基损伤, 这主要与其氨基酸组成有关<sup>[3]</sup>。其中组氨酸残基具有金属离子螯合能力, 色氨酸残基和酪氨酸残基可通过供氢, 半胱氨酸残基可通过给电子发挥抗氧化作用<sup>[4]</sup>。含有巯基的半胱氨酸残基的谷胱甘肽(GSH)是生物体中主要的细胞内抗氧化剂<sup>[5]</sup>。此外, 酚酸是一类重要的酚类物质, 在植物中普遍存在, 具有

显著的抗氧化活性<sup>[6]</sup>。其活性在很大程度上取决于供氢能力,而供氢能力与酚羟基的数量和位置直接相关<sup>[7]</sup>。例如,含有邻二酚羟基的咖啡酸具有优良的抗氧化能力<sup>[8]</sup>。

天然抗氧化剂的多样性,抗氧化作用机制的多样性,使其协同抗氧化逐渐成为国内外研究热点<sup>[9]</sup>。目前对于谷胱甘肽与酚酸的复配及相互作用鲜有报道,研究谷胱甘肽与酚酸复配物的协同抗氧化作用具有很好的应用价值。涉及电子和质子转移的化学反应可以通过协调或逐步的机制发生。羟基化的位置和程度、极性、溶解性和还原电位是影响酚类化合物抗氧化活性的主要因素<sup>[10,11]</sup>。在大多数用于评价抗氧化性能的方法中,抗氧化剂捕捉自由基的能力是通过它们与自由基反应的动力学来评估的。由于显色化合物的易用性、快速性和敏感性,常用的方法是使用 ABTS<sup>+</sup>和 DPPH·自由基清除活性等方法。

本实验选苯甲酸类(丁香酸、香草酸、没食子酸)和苯乙烯酸类(咖啡酸、芥子酸、阿魏酸)两大类酚酸(如图1),以 ABTS<sup>+</sup>清除能力、DPPH·清除能力、还原力和氧自由基吸收能力(ORAC)为抗氧化活性指标,测定了这6种酚酸与谷胱甘肽单独和联合作用时的抗氧化能力。从抗氧化机理的角度上,初步探讨了协同作用机制,为充分发挥谷胱甘肽和酚酸优异的抗氧化性能,提供理论依据。

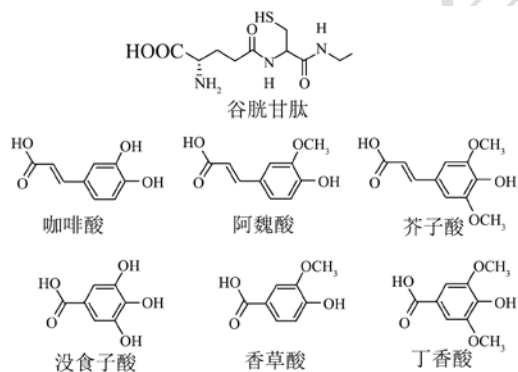


图1 谷胱甘肽和6种酚酸的化学结构式

Fig.1 Chemical structures of glutathione and 6 phenolic acids

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

还原型谷胱甘肽、丁香酸、香草酸、没食子酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸,上海麦克林生化有限公司; 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 [2,2'-Azobis(3-ethylbenzenothiazoline-6-sulphonic acid)], ABTS<sup>+</sup>、1,1-二苯-2-苦基肼(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-偶氮(2-甲基丙基

脘)[2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochlorid, AAPH]、E6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸 [(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Trolox], 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、乙醇(分析级), 成都科隆化学品有限公司。

紫外分光光度计, 上海美谱达(Mapada)仪器有限公司; 多功能酶标仪, 美国伯腾(BioTek)仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 体外抗氧化活性测定

#### 1.2.1.1 ABTS<sup>+</sup>清除能力的测定<sup>[12]</sup>

制备 ABTS<sup>+</sup>和过硫酸钾终浓度分别为 7 mM 和 2.45 mM 的混合溶液, 避光, 室温下放置 12~16 h 形成 ABTS<sup>+</sup>储备溶液。用 0.1 M 磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将其稀释成在 734 nm 吸光度为 0.70±0.02 的工作液。将 0.1 mL 合适浓度的样品加入 3.9 mL 稀释后的 ABTS<sup>+</sup>溶液中, 避光孵育 10 分钟后, 在 734 nm 处测定吸光度。样品的 ABTS<sup>+</sup>清除活性按如下(1)式计算:

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $A_0$  为空白吸光度(蒸馏水),  $A_1$  为样品吸光度。实现 50%清除率所需要有效浓度定义为  $IC_{50}$  值<sup>[13]</sup>。 $IC_{50}$  值越小, 表明样品的自由基清除能力越强。

#### 1.2.1.2 DPPH·清除能力的测定<sup>[14]</sup>

用无水乙醇配制 0.2 mM 的 DPPH·溶液。取 2.0 mL 样品, 加入 2.0 mL 的 DPPH 溶液中, 摇匀, 置于暗处 30 min 后, 在 517 nm 处记录吸光度。DPPH·清除率的计算公式与 ABTS<sup>+</sup>清除率的计算公式相同。 $IC_{50}$  值按前面所述计算。

#### 1.2.1.3 还原力的测定<sup>[15]</sup>

将 2.5 mL 样品溶液与 2.5 mL 0.2 M 的磷酸缓冲溶液(pH=6.6)和 2.5 mL 铁氰化钾溶液(1%, W/V)混匀, 在 50 °C 孵育 25 min, 然后加入 2.5 mL 三氯乙酸溶液(10%, W/V), 静置 10 min。取 2.5 mL 混合溶液与 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 氯化铁溶液(0.1%, W/V)混匀, 测定其在 700 nm 处的吸光度。将吸光度达到 0.5 所需要有效浓度定义为  $OD_{0.5}$  值。 $OD_{0.5}$  值越小, 表明样品的还原能力越强。

#### 1.2.1.4 氧自由基吸收能力(ORAC)的测定

参考 Zhang 等<sup>[16]</sup>的方法, 稍作调整。分别配制 75 mM 的磷酸钠缓冲溶液(pH=7.4), 100 μM 的 Trolox 溶液、40 mM 的荧光素钠溶液和 38 mM 的 AAPH 溶液, 以磷酸钠缓冲液代替样品为空白对照, 以 Trolox

溶液为标准品。将 25  $\mu\text{L}$  样品溶液或 Trolox (10-100  $\mu\text{M}$ ) 溶液和 75  $\mu\text{L}$  荧光素钠溶液添加到黑色的 96 孔酶标板中, 然后稍微振动 10 s。在 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min 后, 加入 100  $\mu\text{L}$  现配的 AAPH 溶液, 再次振动 10 s。用酶标仪在 485 nm 激发波长和 530 nm 发射波长下测定荧光强度的动态变化, 每 2 min 记录一次, 连续记录 2 h。

对测得的荧光曲线进行归一化处理, 归一化曲线的荧光衰减 (fluorescence attenuation curve, AUC) 面积计算如下:

$$\text{AUC} = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} f_i / f_0 \quad (2)$$

式中:  $f_0$  为 0 min 时的初始荧光强度,  $f_i$  为  $i$  min 时的荧光强度。样品的净 AUC (netAUC) 计算如下:

$$\text{netAUC} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}} \quad (3)$$

以标样浓度为横坐标, 制作标样 Trolox 标准曲线, 以具有相同氧自由基吸收能力的 Trolox 浓度表示不同样品的 ORAC 值, 表示为  $\mu\text{M}$  Trolox 当量(TE)每克样品。

### 1.2.2 联合抗氧化实验

在初步研究了单物质浓度与抗氧化能力关系的基础上, 进行了协同实验。将一定浓度的谷胱甘肽和酚酸等体积混合, 测定混合物的 ABTS<sup>+</sup>、DPPH·清除率、还原力和 ORAC。将每种混合物的实验测得的抗氧化能力与其理论抗氧化能力进行比较, 理论抗氧化能力为单个抗氧化活性值之和<sup>[17]</sup>。定义两者的协同系数 (SE) 为实验值与理论值的比值, 即  $\text{SE} = \text{实验值} / \text{理论值}$ <sup>[8]</sup>。当  $\text{SE} > 1$  时, 两者具有协同效应; 当  $\text{SE} = 1$  时, 两者为加和效应; 当  $\text{SE} < 1$  时, 两者为拮抗效应。单一抗氧化剂的浓度选择在线性范围内较低浓度 (清除率小于 30%), 使加和值小于 70%<sup>[8]</sup>。为满足上述复配原则, ABTS<sup>+</sup> 实验中, 谷胱甘肽和酚酸的浓度均为 0.02 mg/L; DPPH·实验中, 谷胱甘肽的浓度为 0.005 mg/mL, 酚酸的浓度为 0.001 mg/mL; 还原力的实验中, 谷胱甘肽和咖啡酸的浓度分别为 0.1 mg/mL 和 0.01 mg/mL; ORAC 实验中, 谷胱甘肽和酚酸的浓度分别为 0.01 mg/mL 和 0.02 mg/mL。

### 1.3 数据处理

每个样品设 3 个平行, 测定结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。用 Origin 9.0 作图, 采用 SPSS 19.0 对实验数据进行显著性分析, 检测实验值与理论值之间是否具有显著性差异, 如果显著性差异值  $p < 0.05$ , 则二者就有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 谷胱甘肽与酚酸联合作用的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力

通过预实验初步分析了谷胱甘肽和 6 种酚酸的 ABTS<sup>+</sup>·清除活性、DPPH·清除活性、还原力和 ORAC, 从结构和抗氧化机理上分析其不同体系中抗氧化能力差异的原因, 也为后续实验中分析联合抗氧化作用效果的原因奠定基础。

#### 2.1.1 单独作用的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力

表 1 谷胱甘肽与酚酸的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力

Table 1 ABTS<sup>+</sup> scavenging capacity of glutathione and phenolic acids

抗氧化剂	回归公式	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> / ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
谷胱甘肽	$y = 523.04x + 3.5853$	0.9991	$88.74 \pm 2.45^b$
丁香酸	$y = 735.54x + 0.4099$	0.9988	$67.42 \pm 5.21^d$
香草酸	$y = 1049.4x + 1.9793$	0.9938	$45.76 \pm 3.68^e$
没食子酸	$y = 2812.6x + 0.9712$	0.9964	$17.43 \pm 2.05^f$
咖啡酸	$y = 621.67x + 0.4098$	0.9997	$79.77 \pm 2.03^c$
阿魏酸	$y = 1615.8x + 3.1399$	0.9934	$29.00 \pm 2.60^f$
芥子酸	$y = 732x + 0.7963$	0.9940	$62.22 \pm 4.24^d$

注: 同一列中不相同的字母表示有显著差异 ( $p < 0.05$ ), 下同。

谷胱甘肽和 6 种酚酸的 ABTS<sup>+</sup>·清除活性如表 1 所示, 与谷胱甘肽 ( $\text{IC}_{50} = 88.74 \pm 2.45 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 相比, 所有酚酸均显示出更强的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力 ( $p < 0.05$ )。其中, 没食子酸对 ABTS<sup>+</sup>·的清除能力最强, 其  $\text{IC}_{50}$  为  $17.43 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。苯甲酸类对 ABTS<sup>+</sup>·的清除能力强弱为: 没食子酸 > 香草酸 > 丁香酸。这表明酚羟基数目越多, 对自由基的清除作用越强。苯乙烯酸类对 ABTS<sup>+</sup>·清除能力顺序为: 阿魏酸 > 芥子酸 > 咖啡酸。酚羟基邻位为甲氧基的阿魏酸和芥子酸对自由基的清除能力强于咖啡酸。有研究表明, 羟基邻位的甲氧基具有降低分子的羟基解离焓, 增加偶极矩, 增加亲电性指数  $\omega$  值, 降低化学硬度  $\eta$  值, 对分子的抗氧化活性的增强具有很大贡献作用<sup>[18]</sup>。这也表明, 在 ABTS<sup>+</sup>·清除体系中, 苯乙烯酸类的供电子甲氧基对自由基清除的贡献大于其酚羟基。

#### 2.1.2 联合作用的 ABTS<sup>+</sup>·清除活性

谷胱甘肽与 6 种酚酸联合作用的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力如图 2 所示, 其中, 谷胱甘肽与苯甲酸类联合的 ABTS<sup>+</sup>·清除活性的测定值均显著小于其各自的理论值 ( $p < 0.05$ )。对于苯乙烯酸类, 谷胱甘肽与咖啡酸联

合的 ABTS<sup>+</sup>·清除活性的测定值显著大于其理论值 ( $p<0.01$ ), 其 SE 为 1.21。而其与阿魏酸和芥子酸联合作用的测定值均小于理论值 ( $p<0.05$ )。以上结果显示, 谷胱甘肽与咖啡酸的 ABTS<sup>+</sup>·清除活性之间存在协同作用, 而与其他 5 种酚酸之间的 SE 均小于 1, 为拮抗作用。酚类抗氧化剂一般含有一个或多个酚羟基, 羟基能够贡献出氢质子与自由基反应, 从而起到清除自由基的作用, 同时, 酚羟基与苯环通过 p- $\pi$  共轭效应能够形成稳定的自由基中间体, 而谷胱甘肽也具有一个巯基作为供氢体, 因此, 酚类抗氧化剂与谷胱甘肽贡献出的氢质子可能存在竞争性结合自由基, 从而导致 ABTS<sup>+</sup>·清除活性的拮抗作用<sup>[19]</sup>。而谷胱甘肽与咖啡酸具有协同清除 ABTS<sup>+</sup>·作用, 这可能是因为两者之间存在协同再生作用。

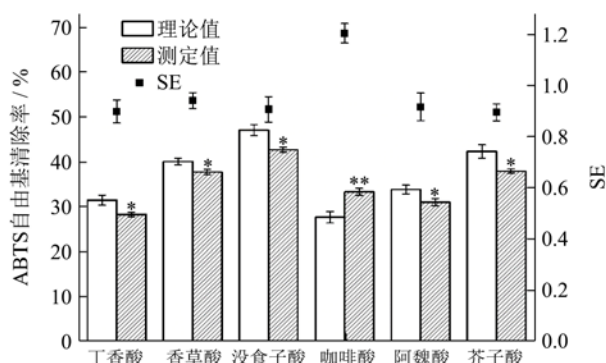


图2 谷胱甘肽和酚酸复合抗氧化剂的 ABTS<sup>+</sup>·清除能力及 SE

Fig.2 ABTS<sup>+</sup> scavenging capacity and SE of combination

注: \*显著相关( $p<0.05$ ); \*\*极显著相关( $p<0.01$ ), 下同。

## 2.2 谷胱甘肽与酚酸联合的 DPPH·清除能力

### 2.2.1 单独作用的 DPPH·清除能力

表2 谷胱甘肽与酚酸的 DPPH·清除能力

Table 2 DPPH· scavenging capacity of glutathione and phenolic acids

抗氧化剂	回归公式	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{g/mL}$ )
谷胱甘肽	$y=2954.1x+2.6325$	0.9991	$16.03\pm 1.87^a$
丁香酸	$y=11834x+1.7192$	0.9909	$4.08\pm 0.34^d$
香草酸	$y=19502x+0.1908$	0.9997	$2.55\pm 0.01^f$
没食子酸	$y=39109x+0.6002$	0.9972	$1.26\pm 0.01^e$
咖啡酸	$y=12669x-0.077$	0.9999	$3.95\pm 0.58^e$
阿魏酸	$y=7236.3x+0.6478$	0.9973	$6.82\pm 0.01^c$
芥子酸	$y=5122.3x+0.9947$	0.9956	$9.57\pm 0.86^b$

测定了谷胱甘肽和 6 种酚酸的 DPPH·清除能力, 结果如表 2 所示。谷胱甘肽的 IC<sub>50</sub> 值为  $16.03\pm 1.87 \mu\text{g/mL}$ , 所有酚酸对 DPPH·的清除能力均明显强于谷胱甘肽 ( $p<0.05$ )。没食子酸的 IC<sub>50</sub> 值为  $1.26\pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ , 具有最高的 DPPH·清除能力。苯甲酸类对

DPPH·的清除能力强弱顺序与 ABTS<sup>+</sup>·一致, 为: 没食子酸>香草酸>丁香酸。对于苯乙酸类来说, 其 DPPH·的清除能力强弱顺序为: 咖啡酸>阿魏酸>芥子酸; 含邻二酚羟基的咖啡酸具有最强的 DPPH·清除活性 (IC<sub>50</sub>= $3.95 \mu\text{g/mL}$ )。而对于一元酚酸 (阿魏酸和芥子酸), 随着具有供电子能力的甲氧基数目的增加, 对 DPPH·清除活性反而下降。这表明, 在该抗氧化体系中, 供氢质子的酚羟基对 DPPH·的清除起主导作用。刘欣等<sup>[20]</sup>对没食子酸、槲皮素、茶多酚、山奈素和芹菜素的 ABTS<sup>+</sup>·与 DPPH·清除能力的研究表明, 没食子酸具有最强的自由基清除活性, 但酚羟基数目多少与清除能力无关。这可能是由于苯环上甲氧基和其他推电子基团的影响。

### 2.2.2 联合作用的 DPPH·清除能力

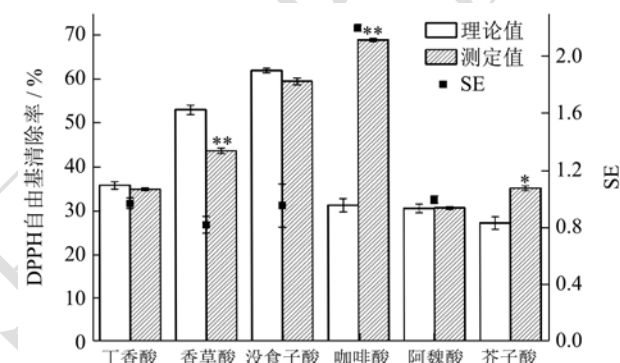


图3 谷胱甘肽和酚酸复合抗氧化剂的 DPPH·清除能力及 SE

Fig.3 DPPH· scavenging capacity and SE of combination

谷胱甘肽与 6 种酚酸联合作用的 DPPH·清除率如图 3 所示。谷胱甘肽与苯甲酸类联合的 DPPH·清除活性的 SE 均小于 1。其中谷胱甘肽与香草酸联合的测定值与理论值之间的差异非常显著 ( $p<0.01$ ), 其 SE 为 0.82, 而与丁香酸和没食子酸联合的测定值与理论值之间并无明显差异 ( $p>0.05$ )。对于苯乙酸类, 谷胱甘肽与芥子酸联合的 DPPH·清除活性的测定值显著大于其各自的理论值 ( $p<0.05$ ), 而谷胱甘肽与阿魏酸联合的测定值与理论值相当 ( $p>0.05$ )。谷胱甘肽与咖啡酸联合的 DPPH·清除活性的 SE 高达 2.20。以上结果显示, 谷胱甘肽与苯甲酸类酚酸对 DPPH·清除活性存在拮抗作用, 且与香草酸之间的拮抗作用显著。这可能是因为在反应过程中谷胱甘肽与苯甲酸型酚酸之间形成分子间氢键缔合, 混合物抗氧化活性受到抑制, 抗氧化能力下降<sup>[21]</sup>。谷胱甘肽与咖啡酸和芥子酸之间存在协同抗氧化作用, 且与咖啡酸协同效果最为显著, 而与阿魏酸之间为加和作用。Renato 等<sup>[22]</sup>对谷胱甘肽与槲皮素、木犀草素、杨梅素和儿茶素等黄酮类化合物混合后的 DPPH·清除活性研究发现, 在 B 环中存在邻苯二酚基团对于与 GSH 协同增效至关重要。

## 2.3 谷胱甘肽与酚酸联合作用的还原力

### 2.3.1 单独作用的还原力

测定了谷胱甘肽和 6 种酚酸的还原力, 结果如表 3 所指示。谷胱甘肽的 OD<sub>0.5</sub> 为 147.94 μg/mL, 远远低于酚酸的还原力( $p < 0.05$ )。对于苯甲酸类, 还原力大小顺序为: 香草酸 > 没食子酸 > 丁香酸。该实验是测定抗氧化剂的供电子能力, 这表明, 在该体系中苯甲酸类苯环上的甲氧基供电子能力强于酚羟基。香草酸的甲氧基和酚羟基互为邻位, 极性较大, 导致供电子基团更容易失去电子, 因而具有更强的还原力。而丁香酸虽然含有两个甲氧基基团, 但由于其极性小, 导致其供电子能力弱于香草酸。苯乙酸类还原力大小为: 咖啡酸 > 芥子酸 > 阿魏酸。这表明苯乙酸类酚羟基的供电子能力强于甲氧基, 随着苯环上甲氧基的数目增多, 酚酸供电子能力增强。咖啡酸具有最强的还原能力(OD<sub>0.5</sub>=3.95 μg/mL), 除了与邻二酚羟基有关, 还与 -CHCHCOO-侧链的存在有关, 侧链上的共轭双键可通过共振增大苯氧基自由基电荷分布, 产生强大的推电子能力, 从而增强酚酸的还原能力<sup>[23]</sup>。

表 3 谷胱甘肽与酚酸的还原力

Table 3 Reducing power of glutathione and phenolic acids

抗氧化剂	回归公式	R <sup>2</sup>	OD <sub>0.5</sub> /(μg/mL)
谷胱甘肽	$y=3.3541x+0.0038$	0.9991	147.94±2.23 <sup>a</sup>
丁香酸	$y=10.506x+0.0521$	0.9940	42.63±1.45 <sup>c</sup>
香草酸	$y=5.3746x+0.0058$	0.9915	9.20±0.23 <sup>f</sup>
没食子酸	$y=32.698x-0.0007$	0.9991	15.31±0.64 <sup>e</sup>
咖啡酸	$y=12669x-0.077$	0.9999	3.95±0.02 <sup>g</sup>
阿魏酸	$y=8.7502x+0.0285$	0.9925	53.88±0.14 <sup>b</sup>
芥子酸	$y=11.961x+0.0729$	0.9918	35.71±0.43 <sup>d</sup>

### 2.3.2 联合作用的还原力

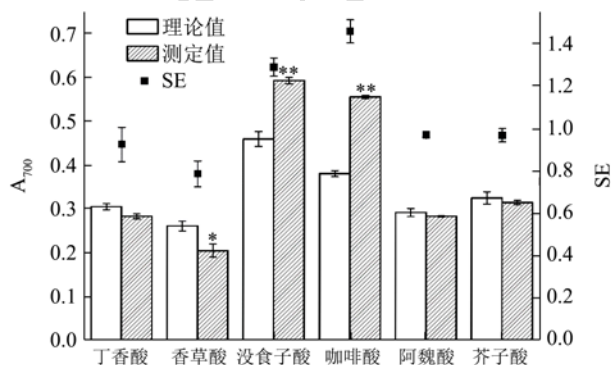


图 4 谷胱甘肽和酚酸复合抗氧化剂的还原力及 SE

Fig.4 Reducing power and SE of combination

谷胱甘肽与 6 种酚酸联合作用的还原力如图 4 所示, 苯甲酸类酚酸中, 谷胱甘肽与没食子酸联合作用还原力的测定值显著大于其理论值 ( $p < 0.01$ ), 其 SE

为 1.29, 而与丁香酸和香草酸联合作用还原力的测定值均小于理论值。对于苯乙酸类, 谷胱甘肽仅与咖啡酸联合作用还原力的测定值大于理论值 ( $p < 0.01$ ), 其 SE 为 1.46, 而与阿魏酸和芥子酸联合作用还原力的测定值与其各自的理论值相当 ( $p > 0.05$ )。以上结果表明, 谷胱甘肽与没食子酸和咖啡酸均存在协同抗氧化作用, 与丁香酸和香草酸之间有拮抗作用, 而与阿魏酸和芥子酸仅为加和作用。由此可知, 在该体系中, 邻酚羟基可能是谷胱甘肽与酚酸协同抗氧化的关键所在。

## 2.4 谷胱甘肽与酚酸联合的 ORAC 测定

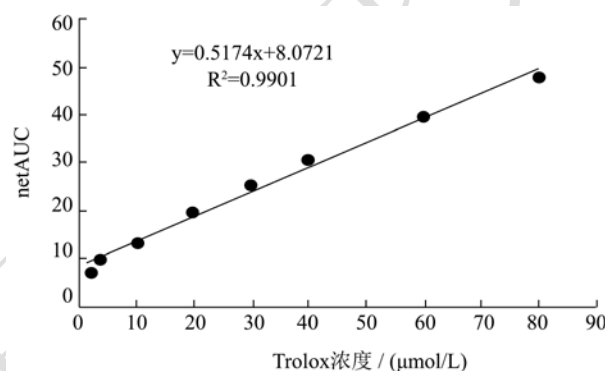


图 5 净 AUC 与 Trolox 浓度的线性关系

Fig.5 The linear relationship between net AUC and Trolox concentration

Trolox 的氧自由基吸收能力的标准曲线如图 5 所示, 以 Trolox 浓度为横坐标 X, 净 AUC 为纵坐标 Y, 制作标准曲线为:  $Y=0.5174X+8.0721$ ,  $R^2=0.9901$ , 表明 Trolox 浓度与曲线下的面积之间有良好的线性关系。

### 2.4.1 单独作用的 ORAC 值

表 4 谷胱甘肽与酚酸的 ORAC 值

Table 4 ORAC value of glutathione and phenolic acids

抗氧化剂	ORAC/(μmol TE/g)
谷胱甘肽	809.80±142.71 <sup>f</sup>
丁香酸	6931.94±687.04 <sup>d</sup>
香草酸	12724.60±2207.28 <sup>b</sup>
没食子酸	5836.25±367.58 <sup>e</sup>
咖啡酸	16208.85±189.30 <sup>a</sup>
阿魏酸	15648.02±251.23 <sup>a</sup>
芥子酸	9206.50±657.59 <sup>c</sup>

谷胱甘肽与 6 种酚酸的 ORAC 值如表 4 所示。其中, 谷胱甘肽具有最小的 ORAC 值 (809.80 μmol TE/g)。对于苯甲酸酚类, ORAC 大小顺序为: 香草酸 > 丁香酸 > 没食子酸。而对于苯乙酸酚酸类, 咖啡酸的 ORAC 值为 16208.85 μmol TE/g, 具有最强得氧

自由基吸收能力。其中苯环上有一对互为邻位的甲氧基和酚羟基的香草酸与咖啡酸表现出更优秀的氧自由基吸收能力。

### 2.4.2 联合作用的 ORAC 值

测定了谷胱甘肽和 6 种酚酸联合作用的氧自由基吸收能力, 结果如图 6 所示。谷胱甘肽与苯甲酸类酚酸联合作用 ORAC 的测定值均小于其各自的理论值。对于苯乙烯酸类, 谷胱甘肽与咖啡酸联合后 ORAC 的测定值大于理论值, 但结果并不显著 ( $p>0.05$ )。谷胱甘肽与芥子酸联合后 ORAC 的实验值和预测值相当 ( $p>0.05$ ), 而与阿魏酸联合使用后, 其测定值显著小于理论值 ( $p<0.01$ )。由此可知, 在 ORAC 实验体系中, 谷胱甘肽与苯甲酸类酚酸及阿魏酸均存在显著的拮抗作用, 而与咖啡酸和芥子酸之间并无明显的协同或者拮抗作用。这表明酚酸甲氧基可能不利于该体系二元组合呈现协同效应。Xiao 等<sup>[24]</sup>研究发现酚酸苯环上每增加一个甲氧基, 发生相互作用的亲和力会增加 1.05 倍。这有助于含甲氧基的酚酸与谷胱甘肽形成氢键缔合, 表现拮抗效应。而不含甲氧基的没食子酸由于其三个酚羟基可能与谷胱甘肽吸收氧自由基存在竞争性抑制作用而出现拮抗现象。

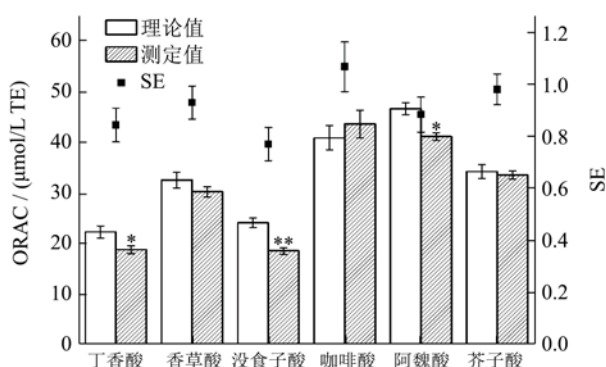


图 6 谷胱甘肽和酚酸复合抗氧化剂的 ORAC 值及 SE

Fig.6 ORAC value and SE of combination

综上所述, 谷胱甘肽与咖啡酸在 ABTS<sup>+</sup>、DPPH·和还原力三个实验体系中均存在协同抗氧化作用, 是最具潜力的协同组合。通过研究谷胱甘肽及酚酸二元复合体系抗氧化效应的结果可知, 在四种不同的抗氧化模型中的抗氧化效应是不同的, 这是由于抗氧化模型原理不同, 导致二元组合在不同的体外抗氧化模型中存在差异。在 ABTS<sup>+</sup>和 DPPH·实验体系中, 抗氧化剂既可以通过氢原子转移(HAT)机制猝灭自由基, 也可以通过电子转移(ET)机制直接还原自由基, 因而为混合机制(ET/HAT)<sup>[25]</sup>。此外, ORAC 实验为 HAT 机制, 还原力实验为 ET 机制<sup>[26]</sup>。在本实验中, 谷胱甘肽和咖啡酸在 ABTS<sup>+</sup>法(ET/HAT)、DPPH·法(ET/HAT)和还原力法(ET)中都具有协同抗氧化作用,

而在 ORAC 法(HAT)中为加合作用, 因此推测在谷胱甘肽与咖啡酸的混合抗氧化体系中, 协同抗氧化作用可能是通过电子转移实现的。表现协同效果的其他原因可能是谷胱甘肽和酚酸结构中分子间形成共轭体系, 增大电荷分布, 从而增强了抗氧化活性<sup>[27]</sup>。此外, 还可能是两种抗氧化功效因子之间存在基于氧化还原电位差的偶联氧化, 降低了直接反应的两种抗氧化功效因子之间的电位差, 使反应更容易进行<sup>[28]</sup>。而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<sup>[29]</sup>。

本实验虽然证明了谷胱甘肽与酚酸的相互作用在抗氧化活性方面发生了拮抗、协同或加和效应, 为更好地理解这些相互作用的机制, 后续需对更多的酚酸类化合物和谷胱甘肽的组合进行更详细的研究, 在此研究基础之上, 可以结合量子化学理论计算、光谱技术以及电化学技术分子来探究发生抗氧化效应的具体原因。

### 3 结论

本实验分析了在 ABTS<sup>+</sup>、DPPH·、ORAC 和还原力四个抗氧化模型中谷胱甘肽与 6 种酚酸单独抗氧化和组合抗氧化效应。在不同抗氧化模型中, 抗氧化剂表现出不同的抗氧化活性。酚酸的抗氧化能力普遍优于谷胱甘肽。通过对比四个抗氧化模型中谷胱甘肽-酚酸二元组合的抗氧化活性的预测值与实验值及协同系数发现, 谷胱甘肽与丁香酸和香草酸均存在拮抗作用, 与没食子酸仅在还原力实验中有明显的协同作用。谷胱甘肽与阿魏酸不存在协同作用, 与芥子酸仅在 DPPH·清除实验中存在协同。而谷胱甘肽与咖啡酸在 ABTS<sup>+</sup>、DPPH·自由基清除实验和还原力实验中的 SE 分别为  $1.21\pm 0.04$ 、 $2.20\pm 0.02$  和  $1.29\pm 0.04$ , 均表现出显著的协同抗氧化作用。因此谷胱甘肽和咖啡酸是本研究中最具潜力的协同抗氧化组合。本实验可为在设计新的复合抗氧化剂时, 选择谷胱甘肽-酚酸的最佳组合提供理论基础。

### 参考文献

- [1] Larrauri M, Zygadlo J A, Zunino M P, et al. Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes [J]. Industrial Crops & Products, 2016, 94: 964-971
- [2] Zhou J, Ma Y, Jia Y, et al. Phenolic profiles, antioxidant activities and cytoprotective effects of different phenolic

- fractions from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fruits treated by ultra-high pressure [J]. Food Chemistry, 2019, 288: 68-77
- [3] Sharma S, Singh R, Rana S. Bioactive peptides: A review [J]. International Journal Bioautomation, 2011, 15(4): 223-250
- [4] 胡晓赟.小肽抗氧化性及协同作用研究[D].无锡:江南大学,2012  
HU Xiao-yun. Antioxidant properties and synergistic effect of small peptides [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012
- [5] Kritzing E C. Winemaking practices affecting glutathione concentrations in white wine [D]. Stellenbosch: Stellenbosch University, 2012
- [6] 陈志杰,吴嘉琪,马燕,等.植物食品原料中酚酸的生物合成与调控及其生物活性研究进展[J].食品科学,2018,39(7): 321-328  
CHEN Zhi-jie, WU Jia-qi, MA Yan, et al. Biosynthesis, metabolic regulation and bioactivity of phenolic acids in plant food materials [J]. Food Science, 2018, 39(7): 321-328
- [7] 杨晓姣.酚类化合物抗氧化及减肥作用的研究[D].北京:北京协和医学院,2014  
YANG Xiao-jiao. Study on antioxidant and weight loss effects of phenolic compounds [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014
- [8] Sun Y, Yu Y Y, Cao S W. Antioxidant capacity of caffeic acid, phloretin and glutathione mixtures and formula optimization [J]. Asian Journal of Chemistry, 2013, 25(7): 3971
- [9] 盛雪飞,彭燕,陈健初,等.天然抗氧化剂之间的协同作用研究进展[J].食品工业科技,2010,7:414-417  
SHENG Xue-fei, PENG Yan, CHEN Jian-chu, et al. Research progress in synergistic effect between natural antioxidants [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 7: 414-417
- [10] Ayse Karadag, Beraat Ozcelik, Samim Saner. Review of methods to determine antioxidant capacities [J]. Food Analytical Methods, 2009, 2(1): 41-60
- [11] Menezes Jose C J M D S, Kamat Shrivallabh P, Cavaleiro Jose A S, et al. Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46(2): 773-777
- [12] 王天星,姜建国.代代花化学成份的分离鉴定和抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2018,34(7):76-80,67  
WANG Tian-xing, JIANG Jian-guo. Isolation and identification of compounds with antioxidant activity from *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(7): 76-80, 67
- [13] 冯学珍,伍善广,韦啟球,等.网地藻多糖清除 DPPH·自由基活性的动力学研究[J].广西植物,2017,37(5):647-652  
FENG Xue-zhen, WU Shan-guang, WEI Qi-qiu, et al. Kinetics of DPPH· free radical scavenging activity of *Dictyota dichotoma* polysaccharides [J]. Guihaia, 2017, 37(5): 647-652
- [14] 胡双飞,张学武,范晓丹.超声耦合亚临界水提取螺旋藻粗蛋白及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2018,34(9): 156-163  
HU Shuang-fei, ZHANG Xue-wu, FAN Xiao-dan. Crude protein extraction from *Spirulina platensis* by ultrasound coupling subcritical water and its anti-oxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(9): 156-163
- [15] 郑金德,孙美侠,姚记威,等.淡色啤酒类黑精的分离及抗氧化活性评价[J].现代食品科技,2017,33(10):133-138  
ZHENG Jin-de, SUN Mei-xia, YAO Ji-wei, et al. Separation and antioxidant activity evaluation of melanoidins from lager beer [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 133-138
- [16] Deju Zhang, Yizhen Wang, Menglei, et al. Antioxidant synergistic effect between the peptides derived from the egg white pentapeptide Trp-Asn-Trp-Ala-Asp [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2017, 23(4): 509-518
- [17] Wang Sunan, Meckling Kelly A, Marcone Massimo F, et al. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(3): 960-968
- [18] 曾花.姜黄素类化合物的抗氧化性理论研究[D].桂林:广西师范学院,2012  
ZENG Hua. Theoretical study on antioxidant activity of curcumin analogues [D]. Guilin: Guangxi Teachers Education University, 2012
- [19] 李新.氨基酸和酚类化合物的联合抗氧化作用研究[D].长春:吉林大学,2017  
LI Xin. Research on the combined antioxidant activity of amino acids and phenolic compounds [D]. Changchun: Jilin University, 2017
- [20] 张欣,赵新淮.几种多酚化合物抗氧化性的不同化学评价及相关性分析[J].食品科学,2008,29(10):85-89  
ZHANG Xin, ZHAO Xin-huai. Antioxidant activities of some polyphenols evaluated by different chemical methods and correlation analysis [J]. Food Science, 2008, 29(10): 85-89
- [21] Samra M A, Chedea V S, Economou A, et al. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic

- compounds: Part I. studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry [J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 622-629
- [22] Pereira R, Sousa C, Costa A, et al. Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: synergisms and antagonisms [J]. Molecules, 2013, 18(8): 8858-8872
- [23] 赵春贵. 中草药有效成分绿原酸和咖啡酸抗氧化活性研究 [C]. 第八届全国发光分析暨动力学分析学术研讨会论文集. 中国化学会: 山西省化学会, 2005: 57
- ZHAO Chun-gui. Study on antioxidant activity of chlorogenic acid and caffeic acid, active components of Chinese herbal medicine [C]. Proceedings of the Eighth National Symposium on Luminescence Analysis and Kinetic Analysis. Chinese Chemical Society: Shanxi Chemical Society, 2005: 57
- [24] Xiao J, Zhao Y, Wang H, et al. Noncovalent interaction of dietary polyphenols with common human plasma proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19): 10747-10754
- [25] Apak R, Özyürek M, Güçlü K, et al. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(5): 1028-1045
- [26] Jiménez Aurora, Selga Ariadna, Torres, et al. Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols [J]. Organic Letters, 2004, 6(24): 4583-4586
- [27] 张鑫, 杨英杰, 吕庆章, 等. 4 种甘草黄酮类化合物抗氧化活性的密度泛函理论研究 [J]. 计算机与应用化学, 2012, 29(6): 656-660
- ZHANG Xin, YANG Ying-jie, LYU Qing-zhang, et al. Density functional theory calculations on antioxidation activity of four flavones from radix glycyrrhizae [J]. Computers and Applied Chemistry, 2012, 29(6): 656-660
- [28] 杨剖舟, 翟晓娜, 王佳良, 等. 绿原酸协同抗氧化机理的电化学和光谱-色谱学研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(8): 2405-2413
- YANG Kai-zhou, ZHAI Xiao-na, WANG Jia-liang, et al. Study on the synergistic antioxidant mechanism of chlorogenic acids (CQAs) with electrochemical and spectroscopy property [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2016, 36(8): 2405-2413
- [29] 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
- 
- (上接第 274 页)
- [26] Kim K S, Kim J S, Hwang I M, et al. Application of stable isotope ratio analysis for origin authentication of pork [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2013, 33(1): 39-44
- [27] Kim J S, Hwang I M, Lee G H, et al. Geographical origin authentication of pork using multi-element and multivariate data analyses [J]. Meat Science, 2017, 123: 13-20
- [28] Park Y M, Lee C M, Hong J H, et al. Origin discrimination of defatted pork *via* trace elements profiling, stable isotope ratios analysis, and multivariate statistical techniques [J]. Meat Science, 2018, 143: 93-103
- [29] 武兆云. 应用 Excel 进行方差分析和多重比较 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(14): 4172-4174, 4182
- WU Zhao-yun. Analysis of variance and multiple comparisons by excel [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2014, 42(14): 4172-4174, 4182
- [30] 林昕, 沙岭杰, 兰珊珊, 等. 在普洱茶产地溯源中化学计量学工具的应用研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 9: 3646-3653
- LIN Xin, SHA Ling-Jie, LAN Shan-shan, et al. Application of chemical metrology software of Pu-erh tea geographical origin traceability [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 9: 3646-3653