

检测分析

大鲵油体外抗氧化活性研究

王 寒^{1,2}, 罗庆华^{1,2}, 魏梦雅^{2,3}, 王建文⁴

(1. 吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000; 2. 吉首大学 大鲵资源保护与综合利用湖南省工程实验室, 湖南 张家界 427000; 3. 吉首大学 土木工程与建筑学院, 湖南 张家界 427000; 4. 张家界金鲵生物工程股份有限公司, 湖南 张家界 427000)

摘要:采用体外抗氧化实验研究大鲵油抗氧化活性,测定大鲵油对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧自由基清除能力和还原能力、 Fe^{2+} 螯合能力。以 V_C 为阳性对照,评价大鲵油的体外抗氧化活性。结果表明:大鲵油抗氧化能力强于鲈鱼油,添加复合抗氧化剂后抗氧化能力更强,对 Fe^{2+} 的螯合能力表现最好,相同质量浓度条件下强于 V_C ;对 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力和还原能力与 V_C 相当。大鲵油对 DPPH 自由基、羟基自由基和 Fe^{2+} 螯合能力的半抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 3.523、0.493、0.559 mg/mL,添加了复合抗氧化剂的大鲵油的相应 IC_{50} 分别为 0.572、0.099、0.062 mg/mL。

关键词:大鲵;油;抗氧化活性;自由基

中图分类号:TS225.2;TS221 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)09-0149-05

In vitro antioxidant activity of Chinese giant salamander oil

WANG Han^{1,2}, LUO Qinghua^{1,2}, WEI Mengya^{2,3}, WANG Jianwen⁴

(1. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, Hunan, China; 2. Hunan Engineering Laboratory for Chinese Giant Salamander's Resource Protection and Comprehensive Utilization, Jishou University, Zhangjiajie 427000, Hunan, China; 3. College of Civil Engineer and Architecture, Jishou University, Zhangjiajie 427000, Hunan, China; 4. Zhangjiajie Jinni Biotechnology Co., Ltd., Zhangjiajie 427000, Hunan, China)

Abstract: In order to investigate in vitro antioxidant activity of Chinese giant salamander oil, the antioxidant activity of Chinese giant salamander oil was evaluated by DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide anion radical scavenging ability assays, reducing capacity assay and capacity of chelating Fe^{2+} with vitamin C as positive control. The results indicated that the antioxidant ability of Chinese giant salamander oil was stronger than mackerel oil, and the antioxidant ability was stronger after adding compound antioxidant. Chinese giant salamander oil had the strongest capacity of chelating Fe^{2+} , stronger than vitamin C under the same mass concentration condition, while it was comparable to vitamin C on scavenging ability of DPPH radical, hydroxyl radical and reducing capacity. The IC_{50} values of Chinese giant salamander oil on DPPH radical, hydroxyl radical and capacity of chelating Fe^{2+} were 3.523, 0.493 mg/mL and 0.559 mg/mL respectively, and they were 0.572, 0.099 mg/mL and 0.062 mg/mL for Chinese giant salamander

oil added with compound antioxidant, respectively.

Key words: Chinese giant salamander; oil; antioxidant activity; free radical

收稿日期:2017-12-05;修回日期:2018-05-21

基金项目:张家界市科技计划课题(大鲵油微胶囊技术及其生物活性的研究);大鲵资源保护与综合利用工程实验室开放项目(DNGC1601, DNGC1711);湖南省大学生创新项目(CX2017B711)

作者简介:王 寒(1990),男,在读硕士,研究方向为森林食品开发与利用(E-mail)863196980@qq.com。

通信作者:罗庆华,教授(E-mail)lqh700930@126.com。

中国大鲵(*Andrias davidianus*)属于两栖纲、有尾目、隐鳃鲵科,是一种传统的名贵药用动物,营养价值优于鲍鱼、海参和甲鱼,具滋阴补肾、补血行气的功效,被誉为“水中人参”^[1]。研究发现,粗大鲵油中

不饱和脂肪酸(UFA)含量为 66.05% ~ 69.81%,其中多不饱和脂肪酸(PUFA)含量为 27.60% ~ 34.68%^[2-3],具有较高的开发利用价值。目前,国内外对大鲵的研究主要集中在资源保护^[4]、养殖繁殖^[5-6]等方面,对其综合利用的研究较少,有部分关于大鲵黏液的低聚糖肽^[7-8],以及胶原蛋白提取^[9-10]的相关报道。大鲵尾部由于脂肪含量过高,口感腻人,常将其弃之。为了充分利用尾脂资源,本研究团队从尾脂中提取大鲵油^[11],并对其进行精制^[12]、抗氧化^[13]和富集研究^[14]。精制大鲵油中UFA含量高达76.58%,其中PUFA含量为31.11%^[14]。本实验以精制大鲵尾脂油为原料,研究其体外抗氧化活性,为大鲵油的产品开发提供理论基础,积极促进大鲵深加工和综合利用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

精制大鲵油:实验室自制,大鲵尾部脂肪由张家界金鲵生物工程股份有限公司提供,采用木瓜蛋白酶从大鲵尾部脂肪组织中提取^[11],经低温结晶法进行不饱和脂肪酸富集^[14]。取富集后的大鲵油添加复合抗氧化剂(0.015%迷迭香提取物、0.015%竹叶抗氧化物和0.007%植酸)^[13],复合抗氧化剂用去离子水配制成0.037%的对照液。

氯化铁、氯化亚铁、无水乙醇、磷酸二氢钠、氢氧化钠、硫酸亚铁等均为分析纯;菲啰嗦,上海伊卡生物技术有限公司;1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH),南京奥多福尼生物科技有限公司;抗坏血酸(99%),南京奥多福尼生物科技有限公司;三氯乙酸、铁氰化钾,国药集团化学有限公司;植酸,浙江仁和生物科技有限公司;竹叶抗氧化物,河南豫中生物科技有限公司;迷迭香提取物,河南四方生物科技有限公司;实验室用水为去离子水。

1.1.2 仪器与设备

HH-4系列数显水浴锅,金坛市白塔新宝仪器厂;GZX-9146MBE数显鼓风恒温干燥箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;LD5-2A型离心机,北京医用离心机厂;HM-20S型pH计,日本东亚电波工业株式会社;KQ-250E型超声波清洗器,中国昆山超声仪器有限公司;AEG-220型电子天平,日本岛津;U-3900型紫外可见分光光度计,日本日立公司;TDL-40B型低速台式大容量离心机,上海安亭科学仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 DPPH 自由基清除能力测定

用无水乙醇将大鲵油、添加了复合抗氧化剂的

大鲵油和复合抗氧化剂稀释至质量浓度为1、2、3、4、5、6 mg/mL的溶液,分别取2 mL上述溶液于试管中,加入2 mL 0.04 mg/mL的DPPH溶液,混合均匀,室温避光放置30 min,5 000 r/min离心10 min。取上清液于517 nm处测吸光度。以V_c为阳性对照,临用前配制成与大鲵油溶液相同质量浓度^[15]。以蒸馏水做空白对照。按下式计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3} \right) \times 100\%$$

式中:A₁为2 mL样品溶液+2 mL DPPH溶液的吸光度;A₂为2 mL样品溶液+2 mL无水乙醇的吸光度;A₃为2 mL无水乙醇+2 mL DPPH溶液的吸光度。

1.2.2 羟基自由基清除能力测定

依次加入0.75 mmol/L的邻二氮菲2 mL,蒸馏水1 mL,pH 7.4的磷酸盐缓冲液2 mL,充分混匀后加入0.75 mmol/L的硫酸亚铁2 mL,混匀,分别加入大鲵油、添加了复合抗氧化剂的大鲵油和复合抗氧化剂溶液1 mL(用无水乙醇分别稀释成质量浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL),37℃水浴加热60 min,在波长536 nm处测定吸光度为A₁,用蒸馏水代替大鲵油测得的吸光度为A₂,用H₂O₂代替大鲵油测得的吸光度为A₃。以V_c为阳性对照,临用前以去离子水配制成与大鲵油溶液相同质量浓度的对照液。蒸馏水做空白对照。按下式计算羟基自由基清除率。

$$\text{羟基自由基清除率} = (A_1 - A_3) / (A_2 - A_3) \times 100\%$$

1.2.3 超氧自由基清除能力测定

采用邻苯三酚自氧化法。分别将大鲵油、添加了复合抗氧化剂的大鲵油和复合抗氧化剂用无水乙醇稀释至质量浓度为1、2、3、4、5、6、7 mg/mL的溶液,分别加入1 mL上述溶液于试管中,然后加入50 mmol/L的Tris-HCl(pH 8.2)缓冲液4.5 mL和25 mmol/L邻苯三酚溶液0.4 mL,25℃反应5 min后加入8 mmol/L的HCl 1 mL终止反应,于299 nm处测定吸光度,以蒸馏水代替样品做空白对照。以V_c为阳性对照,临用前以去离子水配制成与大鲵油溶液相同质量浓度的对照液。按下式计算超氧自由基清除率。

$$\text{超氧自由基清除率} = \frac{A_1 - A_0}{A_1} \times 100\%$$

式中:A₀为空白对照液吸光度;A₁为样品溶液吸光度。

1.2.4 还原能力测定

分别将大鲛油、添加了复合抗氧化剂的大鲛油和复合抗氧化剂用无水乙醇稀释至质量浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL的溶液,分别加入1 mL上述溶液于试管中,依次加入0.2 mol/L pH 6.6的磷酸缓冲液1 mL和1%铁氰化钾1 mL,混匀后50℃水浴反应20 min,然后加入10%三氯乙酸1 mL终止反应,5 000 r/min离心10 min。取上清液1 mL,加入1 mL蒸馏水和0.1%的FeCl₃ 0.2 mL,混匀后静置10 min,在700 nm处检测吸光度。以V_c为阳性对照,临用前以去离子水配制成与大鲛油溶液相同质量浓度的对照液。

1.2.5 Fe²⁺螯合能力测定

分别将大鲛油、添加了复合抗氧化剂的大鲛油和复合抗氧化剂用无水乙醇稀释至质量浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL的溶液,分别加入1 mL上述溶液于试管中,依次加入蒸馏水3.7 mL、2 mmol/L的FeCl₂溶液0.1 mL和5 mmol/L的非罗嗪溶液0.2 mL,避光10 min后5 000 r/min离心10 min。取上清液于562 nm处测定吸光度。以V_c为阳性对照,临用前以去离子水配制成与大鲛油溶液相同质量浓度的对照液。按下式计算螯合率。

$$\text{螯合率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\%$$

式中:A₁为样品溶液反应后的吸光度;A₂为0.1 mL蒸馏水代替FeCl₂溶液后的吸光度;A₃为1 mL蒸馏水代替样品溶液的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 大鲛油对DPPH自由基清除能力(见图1)

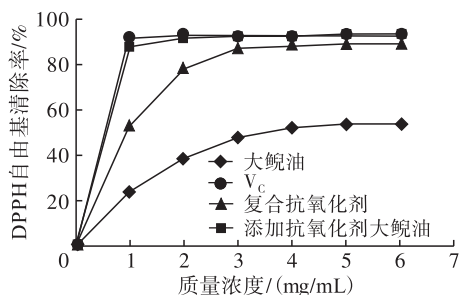


图1 大鲛油对DPPH自由基清除能力

由图1可知,V_c和添加抗氧化剂大鲛油对DPPH自由基清除率相近,两者对DPPH自由基清除率在0~1 mg/mL范围内急剧升高,在1~6 mg/mL范围内清除率基本保持稳定在90%以上。大鲛油较其他样品溶液对DPPH自由基清除能力较弱,在1~4 mg/mL范围内其清除率与质量浓度呈

正相关,表现出良好的对数线性关系,当质量浓度继续升高,清除率变化不大,逐渐趋于平缓。复合抗氧化剂在1~2 mg/mL范围内对DPPH自由基清除率随质量浓度的增加逐渐增强,当质量浓度继续升高,清除率逐渐接近90%,与V_c和添加抗氧化剂大鲛油对DPPH自由基清除率相差不大。

大鲛油在添加复合抗氧化剂后对DPPH自由基清除率急剧提高,可能是复合抗氧化剂中的酚类物质在乙醇溶液中进行电子转移反应(electron transfer, ET),而在极性较低的大鲛油溶液中进行H原子转移反应(H-atom transfer, HAT)和ET反应^[16],两者共同作用,提高了大鲛油对DPPH自由基清除率。大鲛油清除DPPH自由基的半抑制质量浓度(IC₅₀)为3.523 mg/mL,鲑鱼油IC₅₀为5.141 mg/mL^[17],相同质量浓度条件下大鲛油清除DPPH自由基能力强于鲑鱼油,添加了复合抗氧化剂后,大鲛油清除DPPH自由基的IC₅₀为0.572 mg/mL,与V_c相当,对DPPH自由基具有良好的清除能力。

2.2 大鲛油对羟基自由基清除能力(见图2)

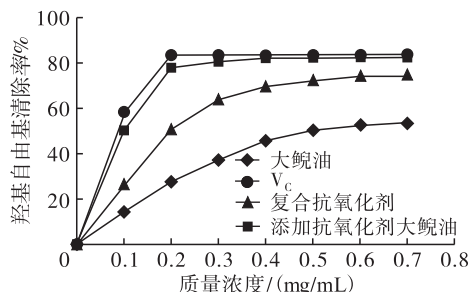


图2 大鲛油对羟基自由基清除能力

由图2可知,添加抗氧化剂大鲛油对羟基自由基的清除能力较V_c稍差,两者都在低质量浓度范围内(0~0.2 mg/mL)表现出明显的增长趋势,在0.2~0.7 mg/mL范围内,清除率稳定在80%左右。大鲛油对羟基自由基的清除能力随质量浓度的增加而增加,表现出良好的量效关系,添加复合抗氧化剂后,对羟基自由基清除能力提升的幅度大于大鲛油和复合抗氧化剂对羟基自由基清除能力之和,二者具有协同作用。大鲛油清除羟基自由基的IC₅₀为0.493 mg/mL,鲑鱼油清除羟基自由基的IC₅₀为7.361 mg/mL^[17],IC₅₀约是鲑鱼油的1/14,大鲛油清除羟基自由基能力大大强于鲑鱼油,添加抗氧化剂大鲛油清除羟基自由基的IC₅₀为0.099 mg/mL,表现出较强的羟基自由基的清除能力。

2.3 大鲛油对超氧自由基清除能力(见图3)

由图3可知,大鲛油对超氧自由基的清除能力较V_c差,随着大鲛油质量浓度的增加,对超氧自由

基清除率逐渐增大,表现出了一定的线性关系和良好的剂量依赖关系,在质量浓度为 7 mg/mL 时,大鲛油对超氧自由基清除率最高为 44.78%,鲛鱼油清除率为 44.179%^[17],两者能力相当。添加抗氧化剂大鲛油表现出了较强的超氧自由基清除能力,且在低质量浓度范围内(0~1 mg/mL)的清除能力大于大鲛油和复合抗氧化剂清除能力的总和,二者具有协同作用。添加抗氧化剂大鲛油在质量浓度为 1 mg/mL 时,对超氧自由基清除率基本达到最大值为 80.3%。因为复合抗氧化剂中迷迭香提取物与天然有机脂有很强的亲性和性^[18],在乙醇溶液中限制了其抗氧化能力,溶于大鲛油后展现了其抗氧化能力,对超氧自由基清除能力提升显著。添加抗氧化剂大鲛油清除超氧自由基的 IC_{50} 为 0.623 mg/mL,表现出较强的超氧自由基的清除能力。

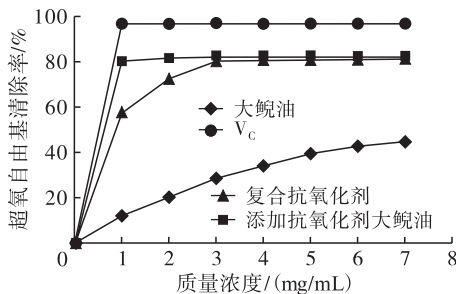


图3 大鲛油对超氧自由基清除能力

2.4 大鲛油的还原能力(见图4)

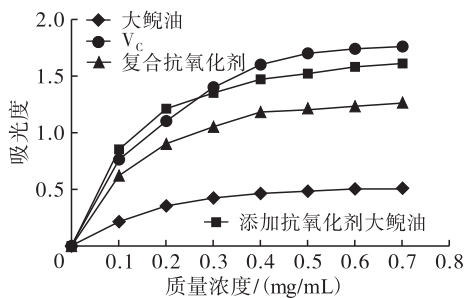


图4 大鲛油的还原能力

由图4可知,大鲛油的还原能力较 V_c 和添加抗氧化剂大鲛油较弱,随大鲛油质量浓度的增加吸光度也逐渐增加,其还原能力也逐渐增加,呈现一定的线性增长关系。添加抗氧化剂后,大鲛油的还原能力明显提高,特别是在低质量浓度范围内(0~0.269 mg/mL)的还原能力要高于 V_c ,可能因为在低质量浓度范围内复合抗氧化剂溶于大鲛油中提升了大鲛油还原能力。随着质量浓度逐渐增加, V_c 还原能力逐渐强于添加抗氧化剂的大鲛油,是因为添加抗氧化剂的大鲛油在低质量浓度时反应更为迅速,当质量浓度升高后其还原能力比 V_c 弱。与鲛鱼油相比,相同质量浓度条件下大鲛油吸光度高于

鲛鱼油^[17],说明大鲛油还原力强于鲛鱼油。添加抗氧化剂大鲛油也具有较弱的还原能力。

2.5 大鲛油的 Fe^{2+} 螯合能力(见图5)

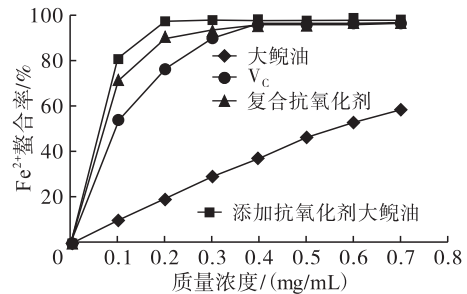


图5 大鲛油对 Fe^{2+} 螯合能力

由图5可知, V_c 、复合抗氧化剂和添加抗氧化剂大鲛油对 Fe^{2+} 的螯合率在低质量浓度范围增长明显,且在 0.4 mg/mL 后就稳定在 96% 以上,说明 V_c 、复合抗氧化剂和添加抗氧化剂大鲛油对 Fe^{2+} 的螯合能力强,相同质量浓度下对 Fe^{2+} 的螯合率大小顺序为添加抗氧化剂大鲛油 > 复合抗氧化剂 > V_c > 大鲛油。大鲛油在 0~0.7 mg/mL 范围内表现出良好的线性关系,随着大鲛油质量浓度的增加,螯合率也逐渐增加,在添加抗氧化剂后,大鲛油对 Fe^{2+} 螯合能力提升明显,但没有表现出很强的协同作用。大鲛油对 Fe^{2+} 螯合能力的 IC_{50} 为 0.559 mg/mL,鲛鱼油对 Fe^{2+} 螯合能力的 IC_{50} 为 9.862 mg/mL^[17],说明大鲛油对 Fe^{2+} 螯合能力远远强于鲛鱼油,添加抗氧化剂后大鲛油对 Fe^{2+} 螯合能力的 IC_{50} 为 0.062 mg/mL,表现出很强的 Fe^{2+} 螯合能力,对铁代谢功能障碍有很好的治疗效果。

3 结论

通过体外抗氧化实验,探明了大鲛油的抗氧化能力。发现大鲛油抗氧化能力比鲛鱼油强,添加复合抗氧化剂的大鲛油抗氧化能力很强,特别是有很强的 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力、还原能力和对 Fe^{2+} 的螯合能力。大鲛油对 DPPH 自由基、羟基自由基和 Fe^{2+} 螯合能力的 IC_{50} 分别为 3.523、0.493、0.559 mg/mL,添加了复合抗氧化剂之后大鲛油相应的 IC_{50} 分别为 0.572、0.099、0.062 mg/mL,其中添加复合抗氧化剂的大鲛油对 Fe^{2+} 的螯合能力表现最好,相同质量浓度条件下强于 V_c ;对 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力和还原能力与 V_c 相当,说明添加复合抗氧化剂大鲛油具有较强的抗氧化活性。过量游离的 Fe^{2+} 可以通过 Fenton 反应形成羟基自由基损伤细胞,最终导致细胞死亡,大鲛油较强的 Fe^{2+} 螯合能力在治疗铁代谢等相关疾病具有潜在的开发应用前景,由于其较强的抗氧化活性

也可以作为抗衰老、修护皮肤等大鲵保健护肤产品进行开发利用,具有良好的开发前景。

参考文献:

- [1] 王苗苗,罗庆华,王海磊,等. 张家界大鲵肌肉营养成分分析[J]. 营养学报,2015,37(4):411-413.
- [2] 罗秦,孙强,叶欣,等. 粗大鲵油的精制及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂,2014,39(7):5-8.
- [3] 胡代花. 超声辅助提取大鲵肝脏油脂及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂,2017,42(6):12-15.
- [4] 宋英杰,罗庆华,张立云,等. 张家界市大鲵生态繁育工程研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2016,42(6):635-640.
- [5] 杨平凹,张星朗,周小愿. 大鲵人工繁育技术研究[J]. 渔业致富指南,2017(20):58-63.
- [6] 陈军,邹鹏,王煜恒,等. 不同饵料对大鲵稚体生长性能、体组成和消化酶活性的影响[J]. 动物营养学报,2017,29(10):3726-3736.
- [7] 姜万维,余睿智,曲敏,等. 大鲵低聚糖肽安全性的毒理学初步研究[J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(3):917-922.
- [9] 曲敏,闫欣,李伟,等. 大鲵低聚糖肽对小鼠免疫功能调节作用的研究[J]. 北京农学院学报,2012,27(1):42-44.
- [9] 欧阳力剑,符广勇. 大鲵皮肤中胶原蛋白的初步提取分析与应用研究[J]. 食品与加工,2017,42(1):72-73.
- [10] 金文刚,陈德经,耿敬章,等. 大鲵皮明胶提取及其性质分析[J]. 食品与发酵工业,2017,43(2):174-179.
- [11] 王苗苗,罗庆华,王海磊,等. 酶解法提取大鲵尾部油的工艺研究[J]. 中国油脂,2015,40(4):6-10.
- [12] 王苗苗. 大鲵肌肉营养成分分析与尾脂油制备技术研究[D]. 湖南 张家界:吉首大学,2015.
- [13] 王苗苗,罗庆华,宋英杰,等. 天然抗氧化剂对大鲵油的抗氧化研究[J]. 中国油脂,2015,40(12):53-56.
- [14] 罗庆华,王寒,王苗苗,等. 大鲵油不饱和脂肪酸的富集研究[J]. 中国油脂,2016,41(10):34-38.
- [15] 李加兴,余娇,黄诚,等. 猕猴桃籽油的体外抗氧化活性[J]. 食品科学,2012,33(23):51-54.
- [16] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学,2014,35(9):317-322.
- [17] 王晓龙. 鲑鱼鱼油提取精制及抗氧化活性研究[D]. 浙江 舟山:浙江海洋学院,2014.
- [18] HABU J B, IBEH B O. In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of active metabolite constituents of *Newbouldia laevis* ethanolic leaf extract [J]. Biol Res, 2015, 48(16):1-10.

· 广告 ·

《中国油脂》杂志社专业书籍目录

1002 谢文磊主编《粮油化工产品化学与工艺学》	45.00	1037 刘珍主编《化验员读本:仪器分析》(下册)第4版	40.00
1012 何东平主编《浓香花生油制取技术》	30.00	1040 倪培德等编《油料加工与操作技术问答》	78.00
1016 倪培德主编《油脂加工技术》(第二版)	41.00	1041 梁少华主编《植物油料资源综合利用》(第二版)	66.00
1021 陈洁主编《油脂化学》	23.00	1043 周瑞宝主编《特种植物油料加工工艺学》	106.00
1022 十五粮食科技发展报告	100.00	1044 韩丽华主编《油脂工厂设计》	35.00
1024 8种食用油国标(大豆油、菜籽油、花生油、棉籽油等)	65.00	1045 《中央储备粮代储资格认定办法实施细则》解读	48.00
1025 浸出油厂防火安全规范(全套)	30.00	1046 何东平等主编《油脂工厂设计手册》(第二版)	1030.00
1026 中国油脂工业发展史	45.00	1047 吴德荣主编《化工工艺设计手册》(上)	210.00
1027 李桂华主编《油料油脂检验与分析》	40.00	1048 吴德荣主编《化工工艺设计手册》(下)	170.00
1028 何东平主编《油脂精炼与加工工艺学》	40.00	1049 王静等主编《粮油食品质量安全检测技术》	45.00
1035 油菜籽标准	12.00	1050 何东平等主编《油脂工厂综合利用》	52.00
1036 刘珍主编《化验员读本:化学分析》(上册)第4版	30.00	1051 刘大川等编《植物蛋白工艺学》	60.00

邮购地址:陕西省西安市劳动路118号

收款人:《中国油脂》杂志社 潘亚萍

订购热线:029-88653162

传 真:029-88625310

邮 编:710082