

天然抗氧化剂对鳄鱼油体外抗氧化活性的影响

傅丽君^{1,2}, 王海燕³, 郑雅鸿^{1,2}, 杨磊^{1,2}, 李华亮⁴, 丁玉梅⁴

(1. 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室, 福建 莆田 351100; 2. 生态环境及其信息图谱福建省高校重点实验室, 福建 莆田 351100; 3. 莆田学院 新工科产业学院, 福建 莆田 351100; 4. 福建鬻龙实业有限责任公司, 福建 厦门 361026)

摘要:为了筛选天然抗氧化剂和提高鳄鱼油体外抗氧化活性, 采用 Schaal 烘箱法, 比较 3 种常见的天然抗氧化剂茶多酚(TP)、维生素 E 和植酸对精制鳄鱼油的抗氧化效果, 并优选出了天然抗氧化剂。在此基础上以优选抗氧化剂和 V_C 为阳性对照, 采用体外抗氧化法考察添加优选抗氧化剂的鳄鱼油对 DPPH 自由基、羟自由基($\cdot OH$)、超氧自由基($O_2^- \cdot$)清除能力, 还原能力及 Fe^{2+} 螯合能力。结果表明: 3 种天然抗氧化剂对鳄鱼油的抗氧化效果为 TP > 维生素 E > 植酸; 鳄鱼油对 DPPH 自由基、 $\cdot OH$ 、 $O_2^- \cdot$ 清除能力, 还原能力和 Fe^{2+} 螯合能力均随其质量浓度的增加而升高; 添加 0.02% TP 后鳄鱼油的体外抗氧化活性明显增强, 添加 TP 的鳄鱼油对 DPPH 自由基、 $\cdot OH$ 和 $O_2^- \cdot$ 的 IC_{50} 分别为 0.874、0.064 mg/mL 和 0.96 mg/mL, 均低于鳄鱼油的(5.448、0.684、4.53 mg/mL), 而还原能力和 Fe^{2+} 螯合能力均高于鳄鱼油的。综上, TP 可有效提高鳄鱼油的体外抗氧化活性。

关键词: 鳄鱼油; 天然抗氧化剂; 抗氧化活性; 自由基

中图分类号: TS225.2; TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)07-0116-05

Effects of natural antioxidant on in vitro antioxidant activity of crocodile oil

FU Lijun^{1,2}, WANG Haiyan³, ZHENG Yahong^{1,2},
YANG Lei^{1,2}, LI Hualiang⁴, DING Yumei⁴

(1. Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology - Toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants, Putian 351100, Fujian, China; 2. Ecological Environment and Its Information Atlas Fujian Key Laboratory of Colleges and Universities, Putian 351100, Fujian, China; 3. New Engineering Industry College, Putian University, Putian 351100, Fujian, China; 4. Fujian Alligator Dragon Industrial Co., Ltd., Xiamen 361026, Fujian, China)

Abstract: In order to screen natural antioxidant and improve the in vitro antioxidant activity of crocodile, the Schaal oven method was used to compare the antioxidant effects of three common natural antioxidants tea polyphenols (TP), V_E and phytic acid on refined crocodile oil, and the antioxidant with stronger antioxidant capacity was selected. Then the DPPH radical, hydroxyl radical ($\cdot OH$), superoxiden anion radical ($O_2^- \cdot$) scavenging ability, reducing capacity and Fe^{2+} chelating capacity of crocodile oil added with selected antioxidant was evaluated by in vitro antioxidant method using added antioxidants and V_C as positive control. The results showed that the antioxidant effect of TP was the strongest, followed by V_E , and the antioxidant effect of phytic acid was the lowest. The scavenging ability of crocodile oil to DPPH free radical, $\cdot OH$, $O_2^- \cdot$, and the reducing ability and Fe^{2+} chelating ability increased with the increase of crocodile oil mass concentration. The in vitro antioxidant capacity of crocodile oil was significantly

enhanced by the addition of 0.02% TP. The IC_{50} of crocodile oil with TP against DPPH radicals, $\cdot OH$, $O_2^- \cdot$ were 0.874, 0.064 mg/mL and 0.96 mg/mL, respectively, which were lower than those of crocodile oil (5.448, 0.684, 4.53 mg/mL), and the reducing ability and Fe^{2+} chelating ability

收稿日期: 2021-06-23; 修回日期: 2022-04-10

基金项目: 福建省科技厅引导性项目(2020Y0089); 福建省教育厅项目(JAT200526); 莆田市科技计划项目(20212001-7)

作者简介: 傅丽君(1975), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为天然产物的开发与利用(E-mail) lijun_fu@sina.com。

were higher than those of crocodile oil. In summary, TP can effectively enhance the in vitro antioxidant activity of crocodile oil.

Key words: crocodile oil; natural antioxidant; antioxidant activity; free radical

鳄鱼全身都是宝,是现存最原始的动物之一。鳄鱼体内粗脂肪含量为3.5%~7.0%,鳄鱼油含有多达24种脂肪酸,其中不饱和脂肪酸含量在60%以上^[1]。鳄鱼油脂肪酸组成与深海鱼油相似,富含二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),具有较高的经济价值^[2]。《本草纲目》记载,鳄鱼油主治“摩风及恶疮”,已被证实具有防冻伤、抗菌消炎等功效^[3]。自2005年国家林业局批准了尼罗鳄、湾鳄和暹罗鳄3种鳄鱼列入54种可商业利用的野生动物以来^[3],鳄鱼油已广泛应用于化妆品、烫伤膏及消炎等产品的开发。如何更好地开发和利用鳄鱼资源是目前需要解决的问题。

油脂中不饱和脂肪酸稳定性差,极易氧化生成醛、酮类等有害物质,从而损伤机体并危害人类健康^[4-5],因此延缓鳄鱼油的氧化对其深加工和高值化利用尤为重要。目前,延缓油脂氧化的常用方法为添加抗氧化剂^[6]。抗氧化剂作为一种外源性抗氧化剂,可阻断或抑制油脂氧化过程的某一环节^[7],从而抑制油脂氧化。随着人工合成抗氧化剂的副作用被证实,油脂中添加高效、低毒、价廉的天然抗氧化剂成为研究热点。目前鲜见关于鳄鱼油抗氧化活性研究的相关报道。

本研究以前期精制鳄鱼油为原料,采用Schaal烘箱法,比较茶多酚(TP)、维生素E(V_E)和植酸3种常用天然抗氧化剂对鳄鱼油的抗氧化效果,并优选出天然抗氧化剂,采用体外抗氧化试验,测定添加优选抗氧化剂的鳄鱼油对DPPH自由基、羟自由基、超氧自由基清除能力,还原能力和 Fe^{2+} 螯合能力等抗氧化活性指标,旨在为天然抗氧化剂筛选及提升鳄鱼油抗氧化能力提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

精制鳄鱼油,酸值(KOH)为 (0.234 ± 0.005) mg/g,过氧化值为 (4.663 ± 0.020) mmol/kg,由福建翥龙实业有限责任公司提供。1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH),南京奥多福尼生物科技有限公司;水杨酸,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;邻苯三酚,国药集团化学有限公司;菲啰啉,上海伊卡生物

技术有限公司;植酸,浙江仁和生物科技有限公司;维生素E、维生素C(V_C),上海源叶生物科技有限公司;茶多酚(TP),无锡世纪生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

DHP-9052型电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;AEG-220型电子天平,日本岛津公司;KQ-250E型超声波清洗器,中国昆山超声仪器有限公司;HH-4型系列数显水浴锅,金坛市白塔新宝仪器厂;U-3900型紫外可见分光光度计,日本日立公司;LD5-2A型离心机,北京医用离心机厂。

1.2 试验方法

1.2.1 不同抗氧化剂对鳄鱼油抗氧化效果的影响

采用Schaal烘箱法^[8]测定鳄鱼油的氧化稳定性。取50.0 g鳄鱼油于烧杯中,分别添加0.02%的TP、 V_E 和植酸(先用约10 mL无水乙醇溶解),搅拌混合均匀,敞口放置于 $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温干燥箱中,每隔12 h搅拌1次,间隔1 d取样按GB 5009.227—2016测定过氧化值。每组重复测定3次,并设空白对照(未添加抗氧化剂),比较不同抗氧化剂对鳄鱼油抗氧化效果的影响。

1.2.2 DPPH自由基清除能力测定

分别将鳄鱼油及添加0.02%抗氧化剂的鳄鱼油用无水乙醇稀释成质量浓度分别为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL的样品,参照文献^[9]的方法测定鳄鱼油的DPPH自由基清除率,以添加的抗氧化剂和 V_C 作为阳性对照。

1.2.3 羟自由基清除能力测定

将鳄鱼油及添加0.02%抗氧化剂的鳄鱼油用无水乙醇稀释成质量浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL的样品,按文献^[10]的方法测定鳄鱼油的羟自由基清除率,以添加的抗氧化剂和 V_C 作为阳性对照。

1.2.4 超氧自由基清除能力测定

将鳄鱼油及添加0.02%抗氧化剂的鳄鱼油用无水乙醇稀释成质量浓度分别为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL的样品,参照文献^[10]采用邻苯三酚自氧法测定鳄鱼油的超氧自由基清除率,以添加的抗氧化剂和 V_C 作为阳性对照。

1.2.5 还原能力测定

将鳄鱼油及添加 0.02% 抗氧化剂的鳄鱼油用无水乙醇稀释成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 的样品,参照文献[10]采用铁氰化钾法测定鳄鱼油的还原能力,以添加的抗氧化剂和 V_C 作为阳性对照。

1.2.6 二价铁离子(Fe^{2+})螯合能力测定

将鳄鱼油及添加 0.02% 抗氧化剂的鳄鱼油用无水乙醇稀释成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 的样品,参照文献[10]的方法测定鳄鱼油的 Fe^{2+} 螯合能力,以添加的抗氧化剂和 V_C 作为阳性对照。

1.2.7 数据统计与分析

采用 Origin Pro 2019 软件进行数据处理与统计,SPSS 25.0 软件计算自由基清除率为 50% 时所需要的物质的质量浓度,即半数抑制率(IC_{50})。

2 结果与分析

2.1 不同抗氧化剂对鳄鱼油的抗氧化效果

过氧化值是评价油脂氧化程度的指标,一般过氧化值越大说明油脂的氧化程度越高。不同抗氧化剂对鳄鱼油的抗氧化效果见图 1。

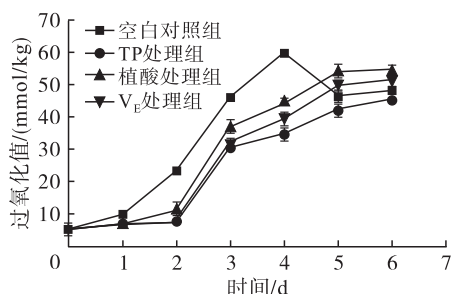


图 1 不同抗氧化剂对鳄鱼油的抗氧化效果

由图 1 可看出,在烘箱储藏 4 d 内,空白对照组与各处理组的过氧化值均随时间的延长而升高,且空白对照组的过氧化值高于各处理组。在 4~6 d 时,空白对照组的过氧化值出现下降趋势,而各处理组的过氧化值仍表现为缓慢增长趋势,空白对照组的过氧化值显著低于植酸和 V_E 处理组的,而高于 TP 处理组的。在添加量均为 0.02% 时,3 种天然抗氧化剂对鳄鱼油的抗氧化效果表现为 $TP > V_E >$ 植酸。不同抗氧化剂的抗氧化效果存在差异可能是它们的结构、纯度及抗氧化机理等不同造成的,其中:植酸具有抗氧化、抗菌等活性,同时其磷酸基团能螯合金属离子^[11];TP 因能使未成对电子离域而具有较强活性,既能通过清除自由基、螯合金属离子、抑制氧化酶活性等直接途径抑制油脂氧化,又能通过

保护机体的内源性抗氧化酶而起到间接的抗氧化效果^[12]; V_E 能够有效阻断脂质的过氧化连锁反应。综上,选取 TP 为抗氧化剂,研究鳄鱼油的体外抗氧化活性。

2.2 鳄鱼油对 DPPH 自由基的清除能力(见图 2)

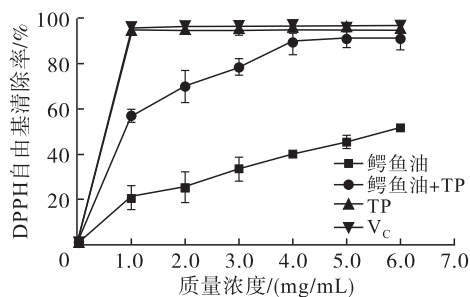


图 2 鳄鱼油对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH 是十分稳定的以氮为中心的自由基,样品的 DPPH 自由基清除能力能反映其抗氧化活性^[13]。由图 2 可知,添加 TP 的鳄鱼油对 DPPH 自由基的清除率在中低质量浓度(0~4.0 mg/mL)范围内急剧增长,在高质量浓度(4.0~6.0 mg/mL)范围内逐渐趋于稳定,此时 DPPH 自由基清除率达 90% 左右,且均高于鳄鱼油的,添加 TP 的鳄鱼油对 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} (0.874 mg/mL) 是鳄鱼油(5.448 mg/mL)的约 1/6。TP、 V_C 对照组在低质量浓度(0~1.0 mg/mL)范围内,对 DPPH 自由基的清除率表现出急剧上升趋势,之后逐渐趋于平缓,最终 DPPH 自由基清除率达 94% 左右,添加 TP 的鳄鱼油在质量浓度为 4.0~6.0 mg/mL 时的 DPPH 自由基清除率与二者相当。上述结果表明,向鳄鱼油中添加 TP 可显著提高鳄鱼油对 DPPH 自由基的清除能力。这可能是由于 TP 在乙醇溶液中会进行电子转移反应,而在极性较低的鳄鱼油中进行 H 原子转移反应和电子转移反应,二者共同作用提高了鳄鱼油对 DPPH 自由基的清除能力^[10]。

2.3 鳄鱼油对羟自由基的清除能力(见图 3)

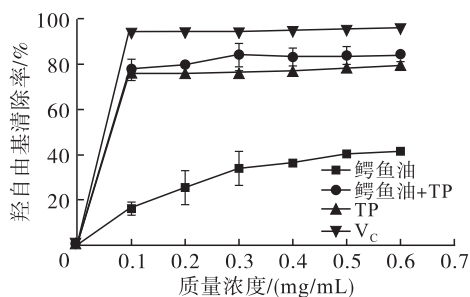


图 3 鳄鱼油对羟自由基的清除能力

羟自由基是机体内反应性和破坏性极强的自由基,与活细胞许多成分反应,直接损伤各种生物大分

子(核酸、蛋白质、脂质等)和生物膜(与细胞膜上的不饱和脂肪酸发生过氧化反应),从而引起机体的损伤和衰老^[14]。对羟自由基的清除能力是反映物质抗氧化活性的重要指标。由图3可知,在质量浓度为0~0.6 mg/mL范围内,鳄鱼油对羟自由基的清除率与其质量浓度呈良好的量效关系,其 IC_{50} 为0.684 mg/mL。添加TP的鳄鱼油和TP、 V_C 对照组在低质量浓度(0~0.1 mg/mL)范围内对羟自由基的清除率均表现出急剧上升趋势。添加TP的鳄鱼油在中质量浓度(0.1~0.3 mg/mL)范围内对羟自由基的清除率略有增长,在中高质量浓度(0.3~0.6 mg/mL)范围内对羟自由基的清除率趋于稳定,此时羟自由基清除率约为84%,其 IC_{50} 为0.064 mg/mL,显著低于鳄鱼油(0.684 mg/mL)的。TP、 V_C 对照组对羟自由基清除率在质量浓度为0.1~0.6 mg/mL范围内变化不大,其中:TP对羟自由基的清除率达77%左右,低于添加TP的鳄鱼油; V_C 对羟自由基清除率超过94%,高于添加TP的鳄鱼油;但TP与 V_C 对羟自由基的清除率均高于鳄鱼油。

2.4 鳄鱼油对超氧自由基的清除能力(见图4)

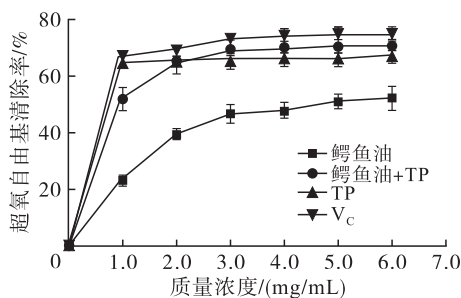


图4 鳄鱼油对超氧自由基的清除能力

超氧自由基主要是通过Fenton反应产生,其具有强氧化和细胞毒性作用,能够有效杀灭病原微生物,但在体内大量聚集,会对人体健康产生危害,引起机体衰老,引发各项疾病^[14]。对超氧自由基的清除能力是评价物质抗氧化能力的重要指标之一。

由图4可知,添加TP的鳄鱼油对超氧自由基的清除率在中低质量浓度(0~3.0 mg/mL)范围内随其质量浓度的增加而快速增长,在中高质量浓度(3.0~6.0 mg/mL)范围内随质量浓度变化趋于稳定,此时超氧自由基清除率约为69%,其 IC_{50} 为0.96 mg/mL。鳄鱼油在质量浓度为0~6.0 mg/mL范围内对超氧自由基的清除率随其质量浓度升高而上升,其 IC_{50} 为4.53 mg/mL,高于添加TP的鳄鱼油

的。TP和 V_C 在质量浓度为0~1.0 mg/mL范围内对超氧自由基的清除率呈快速上升趋势,之后逐渐趋于平缓,此时TP对超氧自由基的清除率约为66%,与添加TP的鳄鱼油相当; V_C 对超氧自由基的清除率约为73%,高于添加TP的鳄鱼油和鳄鱼油。

2.5 鳄鱼油的还原能力(见图5)

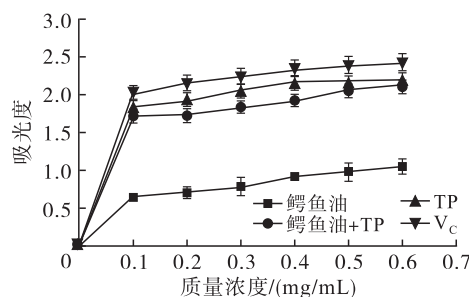


图5 鳄鱼油的还原能力

采用铁氰化钾法利用分光光度计测定样品的还原能力,吸光度越大,代表样品还原能力越高^[15],抗氧化活性越强。由图5可知,在低质量浓度(0~0.1 mg/mL)范围内,添加TP的鳄鱼油和TP、 V_C 对照组的还原能力接近,均高于鳄鱼油的。各处理组还原能力在低质量浓度范围增长明显,在质量浓度大于0.1 mg/mL时,随质量浓度增加还原能力增长速度渐缓,还原能力大小依次为 $V_C > TP >$ 添加TP的鳄鱼油 $>$ 鳄鱼油。

2.6 鳄鱼油的二价铁离子(Fe^{2+})螯合能力(见图6)

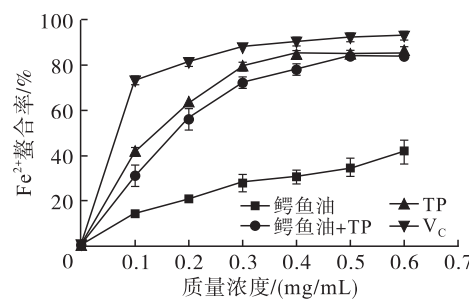


图6 鳄鱼油的 Fe^{2+} 螯合能力

Fe^{2+} 作为过渡金属离子,是促氧化剂,可以促进活性氧的产生,从而氧化一些脂质、蛋白质和细胞组分,对机体产生氧化损伤。 Fe^{2+} 螯合能力的大小可以反映物质抗氧化活性的强弱, Fe^{2+} 螯合率越大,则抗氧化活性越强^[14]。由图6可知,鳄鱼油的 Fe^{2+} 螯合能力随其质量浓度的增加而升高,呈一定的量效关系;添加TP的鳄鱼油其 Fe^{2+} 螯合能力随其质量浓度增加而快速增长,在0.5 mg/mL之后达到稳定,此时 Fe^{2+} 螯合率在83%以上,其 IC_{50} 为0.175 mg/mL,约是鳄鱼油的1/4。TP对照组与添加TP的鳄鱼油 Fe^{2+} 螯合率变化趋势相似,但高于添加TP的鳄鱼

油。 V_c 对 Fe^{2+} 螯合能力最大,在质量浓度为 $0 \sim 0.3 \text{ mg/mL}$ 范围内 Fe^{2+} 螯合率随其质量浓度的增加而快速增长, 0.3 mg/mL 后增长速度趋缓,最高约为92%,高于添加TP的鳄鱼油的。TP对金属离子具有很强的结合作用和沉淀功能^[16],因此经TP处理后显著提高了鳄鱼油的还原能力和 Fe^{2+} 螯合能力。

3 结 论

采用Schaal烘箱法探明了添加天然抗氧化剂TP、 V_E 和植酸对鳄鱼油氧化稳定性的影响,发现三者对鳄鱼油抗氧化效果强弱为 $TP > V_E > \text{植酸}$ 。添加TP后鳄鱼油对DPPH自由基、羟自由基及超氧自由基清除能力显著提高, Fe^{2+} 螯合能力和还原能力也增强,表明TP能有效切断引起鳄鱼油自动氧化的自由基链式反应,提高鳄鱼油的抗氧化活性。

参考文献:

- [1] 陈弘培, 赵慧, 董诗婷, 等. 鳄鱼综合加工与高值化利用研究进展[J]. 农产品加工, 2017(20):62-67.
- [2] 李海航, 罗嘉玲, 倪贺. 鳄鱼资源开发和生物活性物质研究进展[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2014, 46(3):10-17.
- [3] 李慧, 张雅文, 罗翔宇, 等. 人工养殖鳄鱼油的提取与精制工艺研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2017, 49(6):71-76.
- [4] 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.
- [5] CAROCHO M, FERREIRA I C F R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 51(1):15-25.
- [6] 高彤彤, 晏志勇. 绿茶提取物茶多酚在化妆品中的抗氧化效果研究[J]. 中国美容医学, 2015(24):26-29.

(上接第102页)

加热器电动调节阀开度,从而实现石蜡加热器温度闭环自控,减少了超调量,在响应速度、稳定性等方面均优于传统PID控制器,具有良好的鲁棒性,稳态精度又优于常规模糊控制器,提高了石蜡加热器温度闭环控制系统的运行效率。

参考文献:

- [1] 诸静. 模糊控制原理与应用[M]. 北京:机械工业出版社,2005.
- [2] 张铭钧. 智能控制技术[M]. 哈尔滨:哈尔滨工程大学出

- [7] 刘艳红, 唐嘉雯, 李雪竹. 抗氧化剂的机理及其在化妆品中应用的研究进展[J]. 广州化工, 2020, 48(2):32-34,44.
- [8] DOUNY C, RAZANAKOLONA R, RIBONNET L, et al. Linseed oil presents different patterns of oxidation in real-time and accelerated aging assays[J]. Food Chem, 2016, 208:111-115.
- [9] MENEZES B B D, FRESCURA L M, DUARTE R, et al. A critical examination of the DPPH method: mistakes and inconsistencies in stoichiometry and IC_{50} determination by UV-Vis spectroscopy[J/OL]. Anal Chim, 2021, 1157(1):338398 [2021-06-23]. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2021.338398>.
- [10] 王寒, 罗庆华, 魏梦雅, 等. 大鲵油体外抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(9):149-153.
- [11] 高延芬, 徐虹, 宋焕禄. 植酸及其生理活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1):368-371.
- [12] CROFT K D. Dietary polyphenols: antioxidants or not? [J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 595:120-124.
- [13] SAHIN S, KURTULBAS E, TOPRAKCI I, et al. Determination of lipid oxidation in sunflower oil treated with several additives [J/OL]. Biomass Convers Bior, 2021:1-9 [2021-06-23]. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01345-9>.
- [14] 李清清, 余旭亚, 耿树香, 等. 复合核桃油的体外抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24):31-36.
- [15] 王肖行, 余旭亚, 耿树香, 等. 美藤果油体外抗氧化性能研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(4):63-67.
- [16] ELAVARASAN K, SHAMASUNDAR B A. Antioxidant properties of papain mediated protein hydrolysates from fresh water carps (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*) and its application on inhibition of lipid oxidation in oil sardine mince during ice storage[J]. J Food Sci Tech, 2021, 59(2):636-645.

版社,2006.

- [3] 李洪兴. 模糊控制器与PID调节器的关系[J]. 中国科学:E辑, 1999, 29(2):136-145.
- [4] 汤兵勇, 路林吉. 模糊控制理论与应用技术[M]. 北京:清华大学出版社,2002.
- [5] 江春红. 基于PLC的液位模糊控制系统设计[D]. 合肥:合肥工业大学,2007.
- [6] 王力, 钱林方, 高强, 等. 基于灰预测模糊PID的随动系统负载模拟器力矩控制研究[J]. 兵工学报, 2012, 33(11):1379-1386.