

牡蛎水提液的抗氧化特性*

吴海涛 张 彧 缪 琪 朱蓓薇

(大连轻工业学院生物与食品工程学院,大连,116034)

摘 要 研究了低温条件下制备牡蛎水提液体外抗氧化特性,及牡蛎水提液清除二苯代苦味酰自由基(DPPH·)、Feton体系产生的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、邻苯三酚自氧化体系产生的超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的能力,以 Fe^{2+} 诱发脂蛋白PUFA过氧化体系研究牡蛎水提液的抗氧化活性。结果表明,牡蛎水提液具有较强的清除自由基能力,并有一定的抗脂质过氧化作用。

关键词 牡蛎,自由基,抗氧化

许多研究发现,自由基具有高度的化学活性,一方面它是机体有效防御系统的一部分,另一方面它又是造成许多疾病的原因^[1,2]。由于许多天然抗氧化剂具有清除体内自由基的活性,因此能起到防病、治病及抗衰老保健作用。对于天然抗氧化剂的研究,已经成为最为活跃的研究课题之一^[3,4]。

牡蛎(oyster)是沿海习见且大量生长的一种珍贵贝类,它营养丰富,蛋白质、多糖、牛磺酸、锌等营养素含量较高,具有很好的抗氧化抗衰老功效^[5]。目前,牡蛎制品的开发已成为开发海洋资源的重要组成部分,关于海洋生物抗氧化方面的研究虽然已有一定深度,但是尚有不足,对于牡蛎制品抗氧化活性的研究更为少见,因此本文针对牡蛎水提液的抗氧化特性进行初步研究。

1 试验材料与设备仪器

1.1 材 料

大连湾牡蛎,番红、硫脲、 H_2O_2 、EDTA二钠盐、Tris、2-巯代巴比妥酸等均为分析纯。

牡蛎水提液的制备:新鲜牡蛎去壳、沥干,按1:1(g:mL)比例加入经预冷的去离子水(4℃以下),高速匀浆15 min后放入4℃冰箱内静置1 h,然后以8 000 r/min,4℃离心30 min,取上清液分装,冷藏备用。

1.2 主要仪器

UV2100型紫外可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司), Thermo IECB-22M型高速冷冻离心机(International Equipment Company),

HH.B11.500型电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

2 试验方法

2.1 牡蛎水提液还原能力的测定^[6]

取不同浓度的样品0.4 mL,加入0.2 mol/L pH 6.6的磷酸缓冲溶液2 mL,质量分数为1%的铁氰化钾($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)溶液2 mL,混匀,在50℃下保温20 min,再加入质量分数为10%的三氯乙酸(TCA)溶液2 mL,振荡混匀后在4 000 r/min下离心10 min。取上清液2 mL,加2 mL蒸馏水和0.4 mL质量分数为0.1%的 FeCl_3 溶液,静置10 min后体系溶液由黄色变为蓝色,在700 nm下进行比色。

2.2 牡蛎水提液在DPPH体系中抗氧化性的测定^[7,8]

取不同浓度的样品2 mL,加入 1×10^{-4} mol/L DPPH 2 mL,混匀后在室温下避光反应20 min,并在4 000 r/min下离心10 min,在517 nm下测定吸光度 A_i ,空白组以等体积95%乙醇溶液代替DPPH溶液,对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液,并以等体积蒸馏水和95%乙醇混合液空白调零。清除率按下式计算,并以 V_E 阳性对照。

$$\text{清除率}/\% = (A_i - A_j)/A_0 \times 100$$

式中: A_0 ——对照组吸光度; A_i ——样品组吸光度; A_j ——空白组吸光度。

2.3 牡蛎水提液在Feton体系中抗氧化性的测定^[9]

取0.15 mol/L, pH 7.4的磷酸缓冲液1.0 mL, 520 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的番红溶液0.2 mL, 6 mmol/L的ED-TANa₂- Fe^{2+} 1.0 mL,再分别加入不同浓度的样品溶液7.0 mL,最后加入体积分数为0.3%的 H_2O_2 0.8 mL以启动反应,混匀后于40℃水浴保温30 min,在

第一作者:硕士研究生(朱蓓薇教授为通讯作者)。

* 辽宁省重大科技攻关项目(No.2002205001)

收稿日期:2004-08-06, 改回日期:2005-03-03

波长 520 nm 处测吸光度 A。空白组以等体积的去离子水代替样品溶液;对照组以等体积的去离子水代替样品溶液和 H₂O₂ 溶液。清除率按下式计算,并以羟基自由基特异性清除剂——硫脲作阳性对照。

清除率 / % = (A_{样品} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白}) × 100

式中: A_{样品}—— 样品组吸光度; A_{空白}—— 空白组吸光度; A_{对照}—— 对照组吸光度。

2.4 牡蛎水提液在邻苯三酚体系中抗氧化性的测定^[10]

取 50 mmol/L, pH 8.2 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL (其中含有 2 mmol/L EDTANa₂), 加 0.1 mL 不同浓度的样液, 于 25℃ 保温 10 min, 然后加入 25℃ 预温的 5 mmol/L 的邻苯三酚 0.2 mL, 混匀后迅速于干燥的比色皿中, 在 320 nm 下每隔半分钟测定一次 OD 值, 以等体积 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚溶液为空白调零, 对照组以等体积去离子水代替样品。作吸光度随时间变化曲线的回归方程, 其斜率为邻苯三酚的自氧化速率 V, 按下式计算样品对 O²⁻· 的抑制率。

抑制率 / % = (V_{对照} - V_{样品}) / V_{对照} × 100

式中: V_{对照}—— 对照组邻苯三酚自氧化速率 (ΔOD/min); V_{样品}—— 样品组邻苯三酚自氧化速率 (ΔOD/min)。

2.5 牡蛎水提液在脂蛋白 PUFA 过氧化体系中抗氧化性的测定^[11]

以卵黄脂蛋白为底物的 LPO 模型反应体系包括: 体积比为 1:25 稀释的卵黄悬液(卵黄用等体积的 pH 7.45, 0.1 mol/L PBS 配成, 使用前, 磁力搅拌 10 min) 0.2 mL、一定浓度的样品溶液 0.1 mL, 25

mmol/L FeSO₄·7H₂O 溶液 0.2 mL, 用 PBS 补足至 2.0 mL。对照管除不加样液外其他试剂同前, 并提前加入质量分数为 20% TCA 溶液 0.5 mL。将上述 2 种试管同时置 37℃ 恒温培养箱中培养 12 h。取出后, 加入 20% TCA 0.5 mL, 静置 10 min 后, 与对照管于 3 500 r/min 离心 10 min, 取 2.0 mL 上清液, 分别加入质量分数为 0.8% 硫代巴比妥酸(TBA)溶液 1.0 mL, 加塞于 100℃ 水浴 15 min, 取出冷却。空白管以 2.0 mL PBS 溶液代替, 在 532 nm 下测定吸光度, 样品 AOA (%) 用对卵黄脂蛋白 LPO 的抑制率表示。

AOA / % = (A_{对照} - A_{样品}) / A_{对照} × 100

式中: A_{样品}—— 样品组吸光度; A_{对照}—— 对照组吸光度。

3 结果与讨论

3.1 牡蛎水提液的还原能力

依据 2.1 的测定方法, 在波长 700 nm 处测定的吸光度越大, 样品的还原能力越强。由表 1 所示, 牡蛎水提液的还原能力在它的浓度范围内呈明显的量效关系, 其还原能力随浓度的增加而增大。

一般情况下, 样品的还原能力与抗氧化能力呈正相关, 所以牡蛎水提液的抗氧化能力随其浓度的增加而增强。

3.2 牡蛎水提液在 DPPH 体系中的抗氧化性

依据 2.2 的测定方法, 在波长 517 nm 处测定的吸光度越小, 样品的清除自由基能力越强, 其在该体系中抗氧化能力越强, 由表 2 可知, 牡蛎水提液和 V_E 对 DPPH· 的清除能力均随浓度的增大而增大。

表 1 牡蛎水提液的还原能力 (x ± s, n = 6)

| 浓度 / mg·mL ⁻¹ | 3.43 | 6.85 | 13.7 | 27.4 | 41.1 | 54.8 | 68.5 |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 吸光度 | 0.083 ± 0.007 | 0.149 ± 0.004 | 0.211 ± 0.006 | 0.306 ± 0.011 | 0.406 ± 0.013 | 0.455 ± 0.018 | 0.537 ± 0.028 |

表 2 牡蛎水提液和 V_E 对 DPPH· 的清除作用 (x ± s, n = 6)

| 浓度 / mg·mL ⁻¹ | 牡蛎水提液 | | 浓度 / mg·mL ⁻¹ | V _E | |
|--------------------------|-------------------|---------|--------------------------|-------------------|---------|
| | OD ₅₁₇ | 清除率 / % | | OD ₅₁₇ | 清除率 / % |
| 1.028 | 0.402 ± 0.003 | 16.14 | 1.0 | 0.414 ± 0.007 | 14.44 |
| 2.055 | 0.308 ± 0.005 | 35.36 | 2.0 | 0.346 ± 0.006 | 28.60 |
| 3.083 | 0.226 ± 0.006 | 52.72 | 3.0 | 0.286 ± 0.009 | 41.00 |
| 4.110 | 0.198 ± 0.003 | 58.69 | 4.0 | 0.227 ± 0.009 | 53.12 |
| 5.138 | 0.078 ± 0.003 | 83.66 | 5.0 | 0.171 ± 0.008 | 64.64 |
| 对 照 | 0.479 ± 0.005 | | 对 照 | 0.484 ± 0.008 | |

在牡蛎水提液抑制 DPPH· 自由基的作用中,将清除 50% 自由基所需样品的浓度定义为 IC₅₀,以评价抗氧化水平。依据回归方程牡蛎水提液 IC₅₀ 为 (2.90 ± 0.10) mg/mL, V_E 的 IC₅₀ 为 (3.73 ± 0.15) mg/mL,可见在该体系中,牡蛎水提液的抗氧化能力强于 V_E。

表 3 牡蛎水提液和硫脲对·OH 的清除作用(x ± s, n = 6)

| 浓度/mg·mL ⁻¹ | 牡蛎水提液 | | 浓度/mg·mL ⁻¹ | 硫脲 | |
|------------------------|-------------------|-------|------------------------|-------------------|-------|
| | OD ₅₁₇ | 清除率/% | | OD ₅₁₇ | 清除率/% |
| 0.098 | 0.029 ± 0.007 | 4.75 | 0.014 | 0.090 ± 0.007 | 14.64 |
| 0.196 | 0.074 ± 0.011 | 12.05 | 0.029 | 0.172 ± 0.012 | 28.10 |
| 0.294 | 0.166 ± 0.020 | 27.12 | 0.043 | 0.237 ± 0.022 | 38.68 |
| 0.391 | 0.289 ± 0.023 | 47.31 | 0.057 | 0.271 ± 0.017 | 44.11 |
| 0.489 | 0.372 ± 0.018 | 61.01 | 0.071 | 0.325 ± 0.014 | 51.78 |
| 0.587 | 0.455 ± 0.027 | 74.48 | 0.085 | 0.415 ± 0.016 | 66.67 |
| 对 照 | 0.610 ± 0.022 | | 对 照 | 0.613 ± 0.016 | |

依据回归方程其 IC₅₀ 为 (0.41 ± 0.02) mg/mL, 羟基自由基的特异性清除剂硫脲的 IC₅₀ 为 (0.07 ± 0.004) mg/mL,结果表明,在该体系中,牡蛎水提液与特异性清除剂硫脲清除自由基能力相当。

3.4 牡蛎水提液在邻苯三酚体系中的抗氧化性

依据 2.4 所述的测定方法,在波长 320 nm 处测定的吸光度越小,样品的抗氧化能力越强。由图 1 可知,超氧阴离子自由基的产生和邻苯三酚产生有色物质的变化随着时间的变化而保持相对的稳定。不同浓度的牡蛎水提液对邻苯三酚的自氧化都有明显的抑制作用,随着牡蛎水提液浓度的增大,其抑制率分别为 23.64%、32.89%、48.54%、68.93%、85.93%,这表明在试验剂量范围内牡蛎水提液与邻苯三酚的自氧化速率的抑制率呈明显的量效关系,该反应体系很稳定,反应误差小(见图 1)。

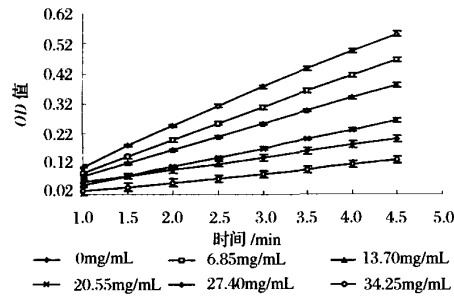


图 1 牡蛎水提液对 O₂^{-·} 的抑制作用

3.5 牡蛎水提液在脂蛋白 PUFA 过氧化体系中抗氧化性

3.3 牡蛎水提液在 Fenton 体系中的抗氧化性

依据 Fenton 法,在波长 520 nm 处测定的吸光度越大,其样品的抗氧化能力越强。由表 3 可知,牡蛎水提液对 Fenton 反应产生的羟基自由基有明显的清除作用,随着浓度的增大,对·OH 自由基的清除作用也明显上升。

牡蛎水提液在脂蛋白 PUFA 过氧化体系中,结果与前述各自由基体系不尽相同,如表 4 所示。牡蛎水提液对卵黄脂蛋白的脂质过氧化虽然有一定的抑制作用,但在未被稀释的情况下(体系中样品干重为 6.85 mg)抑制率仅达 19.08%,而在其他抗氧化体系中清除率均较高,特别是对羟基自由基(·OH)和超氧阴离子自由基(O₂^{-·})的作用较为显著。

表 4 牡蛎水提液对在各个体系中抗氧化特性的比较(干重为 6.85 mg)

| 抗氧化体系 | DPPH· | ·OH | O ₂ ^{-·} | PUFA |
|----------|-------|-----|------------------------------|-------|
| 清除/抑制率/% | 54.36 | >90 | >90 | 19.08 |

这说明,同一物质在不同的抗氧化体系中效果并不相同,在研究牡蛎水提液的抗氧化特性中,应综合各个体系的抗氧化效果,对其体外抗氧化特性进行综合评价。

4 结 论

- (1)牡蛎水提液表现出较强的还原能力,证明牡蛎水提液具有较好的抗氧化性。
- (2)牡蛎水提液清除 DPPH· 的效果强于 V_E;清除·OH 的效果与硫脲相当;在邻苯三酚自氧化体系中,牡蛎水提液对 O₂^{-·} 有明显的抑制作用。
- (3)在卵黄体系中,牡蛎水提液具有一定的抗氧化活性,但不如在自由基体系中效果明显。

参考文献

- 1 Marx J L. Qxygen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235: 529~531
- 2 Czapski G, Goldstein S. The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems[J]. Free Radic Biol&Med, 1995, 19(6): 785~794
- 3 Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants[J]. Free Radic Res, 2001, 33(6): 809~817
- 4 Yokozawa T, Dong E, Nakagawa F. In vitro and in vivo studies on the radical scavenging activity of tea[J]. Agric Food Chem, 2000, 46: 2 143~2 150
- 5 Tapiero Haim, Gate L, Dhahalluin S., et al. The antioxidant effects of Crassostrea gigas extract (JCOE) in human volunteers[J]. In Vivo, 1998, 12(3): 305~309
- 6 Yenhun He, Fereidoom Shahidi. Antioxidant axitivity of green tea and its catechins in a fish meat model system[J], Agric Food Chem, 1997, 45: 4 262~4 265
- 7 Chio C W, Kim S C, Hwang S S et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison[J]. Plant Science, 2002, 163: 1 161~1 168
- 8 Lu Yinrong. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chemistry, 2000, 68: 81~85
- 9 田京伟, 杨建雄. 白藜芦醇苷的体外抗氧化活性[J]. 中草药, 2001, 32(10): 918~920
- 10 王关林, 田 兵, 方宏筠等. 芦荟抗氧化物质活性及对红细胞的保护作用[J]. 营养学报, 2002, 24(4): 380~384
- 11 包 斌, 德力戈尔桑, 吴文惠. 羊脾脏提取液抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(4): 62~65

Study on the Antioxidant Activities of Oyster Water Extract *in Vitro*

Wu Haitao Zhang Yu Miao Qi Zhu Beiwei

(College of Biology and Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian, 116034, China)

ABSTRACT The antioxidant activities of oyster water extracts prepared at low-temperature were studied in this paper. Scavenging effects on DPPH radical, hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$) produced from Feton system and superoxide anion radical(O_2^-) produced from the self oxidation method of pyrogallol were measured. In addition, the antioxidant effect on peroxidation of polyunsaturated fatty acid from lipoprotein induced by iron was studied. The results showed that water extract of oyster had a strong radical scavenging activity and certain antilipid peroxidation activity.

Key words oyster, free radical, antioxidant activity

市场动态

福建食用菌在国际市场走俏 市场潜力看好

我国是大多数食用菌栽培的原产地,目前食用菌年产量已超过世界总产量的65%,出口量占全球食用菌贸易量的40%。福建省盛产特色食用菌,据福州海关统计,2005年1~2月,福建省食用菌出口4 417万美元,比2004年同期增长0.92%。

福建省出口的食用菌以小白蘑菇罐头、干香菇、暂时保藏的蘑菇、干木耳为主,主要出口日本、俄罗斯、德国、马来西亚。福建嘉田公司的秀珍菇等5个产品获得绿色食品标志使用权,“吉田”产品获得FDA认证,可直接进入欧美市场。因此,福建食用菌在国际市场十分走俏,市场潜力看好。

虽然福建省食用菌产业取得发展,但在出口方面依然面临不利因素。如相关标准体系较为落后,出口容易遭遇环保壁垒。目前仅在农药残留限量的指标上,国际食品法典有2 572项标准,欧盟有22 289项,美国有8 669项,日本有9 052项,而我国只有484项,较国际标准还有很大距离。2004年4月日本开始实施的《种苗法修正案》,使用DNA分子检测设备,使食用菌对日出口构成威胁。

此外,我国食用菌主要出口至日本、欧盟和美国,然而近年来对我农产品环保壁垒层出不穷,出口市场的集中也导致了较高的市场风险。目前我国部分生产加工企业尚未形成工业化、专业化、规模化的生产格局,不同企业的生产能力、生产工艺、检测技术等差异大。食用菌出口总体生产工艺落后、科技含量低,出口的产品多为原料性的大包装初级产品,产品附加值低。

对此,有关人士建议,要通过制定法律法规,尽快建立切合实际、与国际接轨的食用菌标准体系,不断规范食用菌的生产出口,同时出口企业应加大技术投入,积极研发具有保健功能的环保食品,提高出口产品的科技含量和产品附加值,确保出口食用菌在国际市场上的竞争力,促进食用菌的出口增长。