

4种海藻膳食纤维清除自由基的比较研究

李来好^{1,2}, 李刘冬², 石红², 陈培基², 郝淑贤², 杨贤庆², 吴燕燕²,
刁石强², 薛长湖¹

(1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:采用羟基自由基体系、超氧阴离子自由基体系、烷基自由基引发的亚油酸氧化体系和 DPPH 体系对江蓠(*Gracilaria*)、麒麟菜(*Eucheuma*)、马尾藻(*Sargassum*)、海带(*Laminaria*) 4 种膳食纤维清除自由基的活性进行研究。结果表明, 在羟基自由基体系中, 江蓠、麒麟菜、马尾藻、海带 4 种膳食纤维的 IC_{50} 分别为 5.2 mg/mL、5.5 mg/mL、4.4 mg/mL 和 4.1 mg/mL; 在超氧阴离子自由基体系中, 江蓠、麒麟菜膳食纤维的 IC_{50} 分别为 4.8 mg/mL 和 5.3 mg/mL, 而马尾藻、海带膳食纤维的最高清除率分别为 36% 和 42%; 在烷基自由基引发的亚油酸氧化体系中, 江蓠、麒麟菜膳食纤维的最高清除率分别为 36% 和 26%, 马尾藻、海带膳食纤维的 IC_{50} 分别为 4.1 mg/mL 和 3.5 mg/mL; 在 DPPH 体系中, 江蓠、麒麟菜、马尾藻膳食纤维的最高清除率分别为 31%、11% 和 26%, 海带膳食纤维的 IC_{50} 为 6.2 mg/mL。在各体系中, 与相应的专一性阳性参照物对比, 证明这 4 种海藻膳食纤维对自由基有一定的清除作用。

关键词:江蓠; 麒麟菜; 马尾藻; 海带; 膳食纤维; 自由基; 清除率

中图分类号:R151.41 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0471-06

随着分子生物学和医学研究的深入以及检测技术的发展, 人们对自由基的发生及其对人体所产生的危害有了越来越多的认识。现代医学研究表明, 自由基可与生物体内的许多物质如蛋白质、脂肪酸等作用, 夺取氢离子, 造成生物体内相关细胞的结构与功能的破坏, 引发生物体多种疾病的产生^[1-4]。在动脉粥样硬化、血栓的形成、心肌损伤、肝炎、糖尿病和癌症等疾病中自由基起到了重要的促进作用^[2-5]。因此, 清除自由基的研究得到了普遍的关注。考虑到化学合成自由基清除剂往往有毒副作用, 人们希望从食物中寻找安全、有效的天然自由基清除剂^[6]。

江蓠(*Gracilaria*)和麒麟菜(*Eucheuma*)属于红藻类海洋植物, 而马尾藻(*Sargassum*)和海带属于褐藻类海洋植物, 这 4 种藻类在中国沿海近岸有丰富的资源, 属于大型经济藻类^[7-10]。自由基清除剂可以有效中和自由基, 减轻自由基对人体的损害, 其中多糖类物质发挥了重要作用^[11]。为了探讨海藻膳食纤维对自由基的清除活性, 在羟基自由基体系、超氧阴离子自由基体系、烷基自由基引发的亚油酸氧

化体系和 DPPH(1,1-二苯基-2-苦味肼基自由基)体系下, 对 4 种海藻膳食纤维清除自由基的能力进行比较研究, 为海藻膳食纤维的有效利用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海藻膳食纤维的制备 江蓠膳食纤维、麒麟菜膳食纤维、马尾藻膳食纤维和海带膳食纤维分别按李来好等^[7-10]的方法制备。

1.1.2 试剂 芦丁、超氧化物歧化酶(SOD)和没食子酸丙酯为生化试剂, 茶多酚为食品级, 其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品的处理 分别称取江蓠、麒麟菜、马尾藻、海带 4 种膳食纤维各 5 g 于 4 个 1 000 mL 的三角锥形瓶中, 加水 400 mL 搅拌均匀, 浸泡 1 h, 加热至沸腾后保持 20 min, 于 13 000 r/min 下乳化 1 min, 将乳浊液移至 500 mL 容量瓶中定容。实验时, 根据

收稿日期: 2004-09-09; 修订日期: 2005-01-17。

基金项目: 广东省自然科学基金项目资助(011256); 广东省科技计划项目资助(2002C20323)。

作者简介: 李来好(1963-), 男, 研究员, 从事水产品加工和质量安全领域研究。E-mail: laihuali@163.com

通讯作者: 薛长湖。E-mail: xuech@mail.ouc.edu.cn

需要稀释成不同浓度的待测液。 IC_{50} 为清除50%自由基时膳食纤维的质量浓度。

1.2.2 羟基自由基体系 在10 mL试管中依次加入饱和水杨酸溶液0.5 mL,磷酸缓冲液(pH 7.4)3 mL,3.8 mmol/L Fe^{2+} -EDTA(体积比1:1)溶液0.5 mL,待测液1 mL,充分混匀后加入1 mL 4 mmol/L H_2O_2 启动反应,于25℃水浴中保温反应90 min后取出,加入1 mL 6 mol/L HCl终止反应。再加入0.5 g NaCl,4 mL冷的重蒸乙醚,充分混匀,静置后移取上层乙醚3 mL于10 mL的离心管内,于40℃恒温水浴中蒸干乙醚,然后依次加入10%三氯乙酸0.15 mL,10%钨酸钠0.25 mL,0.5% $NaNO_2$ 0.25 mL,混匀后放置5 min后,再加入1 mol/L KOH 0.25 mL,滴加去离子水至4 mL,混匀。于510 nm处测定吸光度(A_s),以1 mL蒸馏水代替待测液作空白实验。清除羟基自由基活性 $P = (A_0 - A_s)/A_0$,其中 A_0 为空白的吸光度^[11]。

1.2.3 超氧阴离子自由基体系 取0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.2)4.5 mL,置于25℃水浴中预热20 min,分别加入1 mL待测液和0.4 mL 25 mmol/L邻苯三酚溶液,混匀后于25℃水浴中反应4 min,加入8 mL/L HCl终止反应,299 nm处测定吸光度(A_s)。以1 mL蒸馏水代替待测液作空白实验。清除超氧阴离子自由基活性 $P = (A_0 - A_s)/A_0$,其中 A_0 为空白的吸光度^[12]。

1.2.4 烷基自由基引发的亚油酸氧化体系 将5 mL乙醇、5 mL 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 8.0)、1 mL待测液与0.1 mL亚油酸混合,用30 W紫外灯的紫外光照射60 min,然后加入4 mL三氯乙酸(质量分数20%),1 mL硫代巴比妥酸(3%),95℃反应90 min,冰浴冷却,离心,于532 nm处测定吸光度(A_s)。以1 mL蒸馏水代替待测液作空白实验。清除烷基自由基活性 $P = (A_0 - A_s)/A_0$,其中 A_0 为空白的吸光度^[12]。

1.2.5 DPPH体系 将5 mL待测液加入5 mL 0.16 mmol/L DPPH溶液,于25℃水浴中反应15 min后,测定其在517 nm的吸光度(A_s)。以5 mL蒸馏水代替待测液作空白实验。清除DPPH自由基活性 $P = (A_0 - A_s)/A_0$,其中 A_0 为空白的吸光度^[12-14]。

1.2.6 数据分析 所有实验数据采用Office2003的Excel进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 江蓠、麒麟菜、马尾藻、海带4种膳食纤维对羟基自由基的清除作用

根据Fenton反应原理生成的羟基自由基进攻水杨酸分子的苯环,产生2,3-二羟基苯甲酸。通过采用分光光度法测定其含量,以描述羟基自由基的量和待测物质清除羟基自由基的能力。芦丁和4种海藻膳食纤维清除羟基自由基的能力分别见图1和图2。

芦丁属于·OH的专一性清除剂之一^[11]。本研究结果显示,芦丁对·OH的清除能力较高(图1),其 IC_{50} 为0.045 mg/mL。图2显示了4种海藻膳食纤维对·OH的清除能力,随着海藻膳食纤维质量浓度的提高,膳食纤维对·OH自由基的清除率也逐渐上升,但增幅趋缓,江蓠的 IC_{50} 为5.2 mg/mL,麒麟菜的 IC_{50} 为5.5 mg/mL,马尾藻的 IC_{50} 为4.4 mg/mL,海带的 IC_{50} 为4.1 mg/mL。虽然4种膳食纤维对·OH都显示了清除能力,但与芦丁相比,其 IC_{50} 相当于芦丁的100倍左右,证明4种海藻膳食纤维对·OH的清除能力远小于芦丁。在4种海藻膳食纤维中,属于褐藻的马尾藻和海带膳食纤维清除·OH的能力稍大于属于红藻的江蓠和麒麟菜膳食纤维,但是4种海藻膳食纤维膳食纤维清除·OH的规律基本随着膳食纤维质量浓度的提高而逐渐上升。

2.2 江蓠、麒麟菜、马尾藻、海带4种膳食纤维对超氧阴离子自由基的清除作用

在邻苯三酚的自氧化过程中有超氧阴离子自由基产生,此自由基既是邻苯三酚氧化的中间产物,又能加速邻苯三酚的自氧化进程,因此通过测定待测物质对邻苯三酚自氧化的抑制作用,即可判定其对超氧阴离子自由基的清除作用。超氧化物歧化酶(SOD)和4种海藻膳食纤维清除超氧阴离子自由基的能力见图3和图4。

SOD属于 $O_2^{\cdot-}$ 的专一性清除剂^[14-15]。图3显示,SOD对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力较高,其 IC_{50} 为0.72 ng/mL。图4显示,4种海藻膳食纤维对 $O_2^{\cdot-}$ 有一定的清除能力,江蓠和麒麟菜膳食纤维对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力基本相同,都是随着膳食纤维质量浓度的提高而逐渐上升,在膳食纤维质量浓度为6 mg/mL以上时增幅开始趋缓,两者的 IC_{50} 分别为4.8 mg/mL和5.3 mg/mL,但远远低于SOD对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力。

马尾藻和海带膳食纤维虽然对 $O_2^{\cdot-}$ 显示了一定的清除能力,但是在膳食纤维浓度为 2 mg/mL 之前,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力随着膳食纤维质量浓度的提高而逐渐上升,在膳食纤维质量浓度为 2 mg/mL 之

后,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力随着膳食纤维质量浓度的提高反而下降,这可能是在高浓度条件下马尾藻和海带膳食纤维自氧化产生了 $O_2^{\cdot-}$,从而减弱了海藻膳食纤维清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力^[16]。

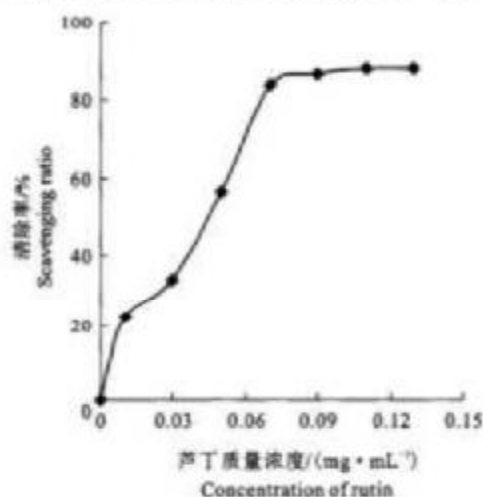


图1 芦丁对 $\cdot\text{OH}$ 的消除作用

Fig.1 Scavenging effects of rutin on $\cdot\text{OH}$ elimination

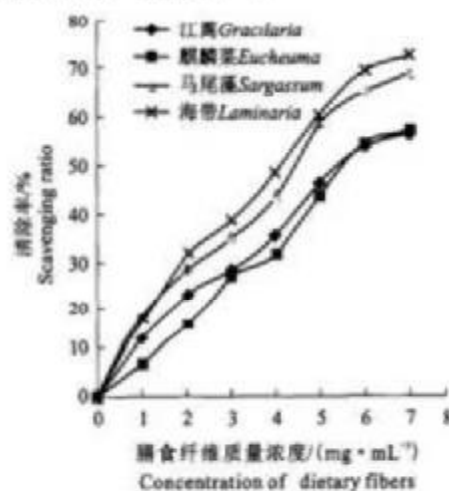


图2 海藻膳食纤维对 $\cdot\text{OH}$ 的消除作用

Fig.2 Scavenging effects of seaweed dietary fibers on $\cdot\text{OH}$ elimination

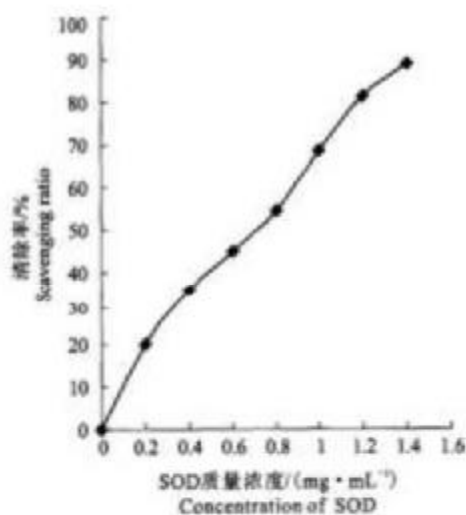


图3 SOD对超氧阴离子的消除作用

Fig.3 Scavenging effects of SOD on elimination of superoxide radical

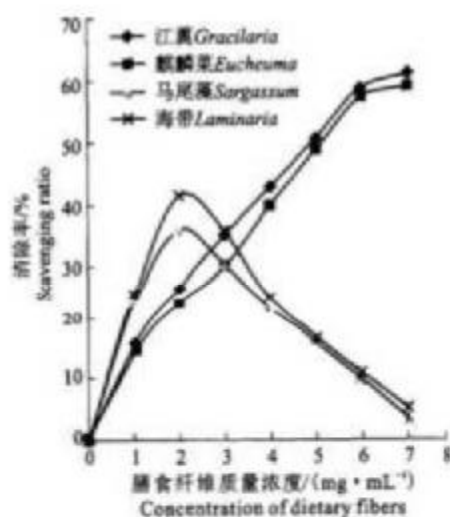


图4 海藻膳食纤维对超氧阴离子的消除作用

Fig.4 Scavenging effects of seaweed dietary fibers on elimination of superoxide radical

2.3 江蓠、麒麟菜、马尾藻、海带4种膳食纤维对烷基自由基的清除作用

浓乙醇在碱性有氧条件下,于强紫外线照射下光解产生 $\text{CH}_3(\text{OH})\text{CH}\cdot$, $\text{CH}_3(\text{OH})\text{CH}\cdot$ 作为自由基

引发剂直接作用于亚油酸产生 $\text{R}\cdot$, 然后 $\text{R}\cdot$ 氧化形成脂过氧自由基($\text{ROO}\cdot$), 再分解为丙二醛(MDA), 它可以与硫代巴比妥酸(TBA)发生反应产生红色物质。通过分光光度法测定吸光度, 即可判定其对烷

基自由基的清除作用。茶多酚和4种海藻膳食纤维清除烷基自由基的能力见图5和图6。

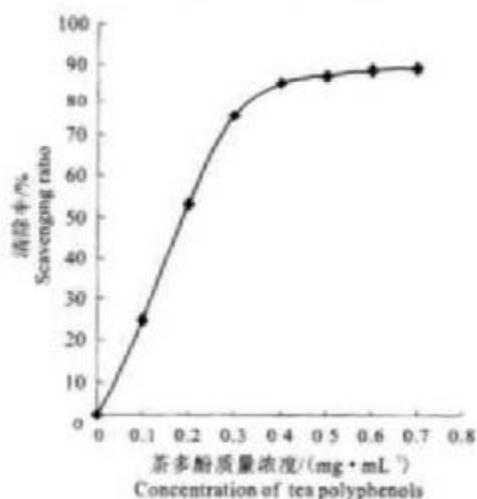


图5 茶多酚对烷基自由基的清除作用

Fig.5 Scavenging effects of tea polyphenols on elimination of alkyl radical

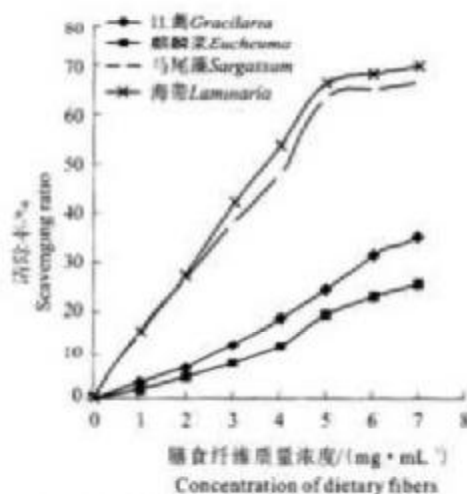


图6 海藻膳食纤维对烷基自由基的清除作用

Fig.6 Scavenging effects of seaweed dietary fibers on elimination of alkyl radical

茶多酚属于R·的专一性清除剂之一^[12]。图5显示,茶多酚对R·的清除能力较高,其IC₅₀为0.18 mg/mL。图6显示了4种海藻膳食纤维对R·有一定的清除能力,江蓠和麒麟菜膳食纤维对R·的清除能力基本接近,马尾藻和海带膳食纤维对R·的清除能力也基本接近,并且随着膳食纤维质量浓度

的提高而逐渐升高,但马尾藻和海带膳食纤维在质量浓度5 mg/mL以上增幅开始趋缓,两者的IC₅₀分别为4.1 mg/mL和3.5 mg/mL,但低于茶多酚对R·的清除能力。虽然江蓠和麒麟菜膳食纤维对R·显示较低的清除能力,但两者随着膳食纤维质量浓度的提高而对R·的清除能力未出现明显的增幅趋缓。在4种海藻膳食纤维中,属于褐藻的马尾藻和海带膳食纤维对R·的清除能力远高于属于红藻的江蓠和麒麟菜膳食纤维。

2.4 江蓠、麒麟菜、马尾藻、海带4种膳食纤维对DPPH自由基的清除作用

DPPH在有机溶剂中是一种稳定的自由基,呈紫色,在517 nm处有强吸收,在有自由基清除剂存在时,DPPH的游离电子被配对,使其颜色变浅,在最大吸收波长处的吸光度变小,且这种颜色的变浅程度与配对电子数成化学计量关系,因此可通过在此波长处吸光度的测定来评价自由基的清除能力。没食子酸丙酯和4种海藻膳食纤维清除DPPH自由基的能力见图7和图8。

没食子酸丙酯是DPPH的专一性清除剂之一^[12]。图7显示,没食子酸丙酯对DPPH的清除能力较高,其IC₅₀为0.055 mg/mL。图8显示了4种海藻膳食纤维对DPPH有一定的清除能力,江蓠、麒麟菜和马尾藻膳食纤维对DPPH的清除能力都随着膳食纤维质量浓度的提高而逐渐上升,但清除率

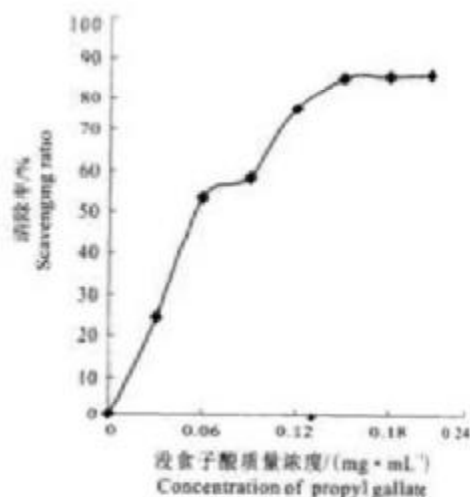


图7 没食子酸丙酯对DPPH的清除作用

Fig.7 Scavenging effects of propyl gallate on elimination of DPPH

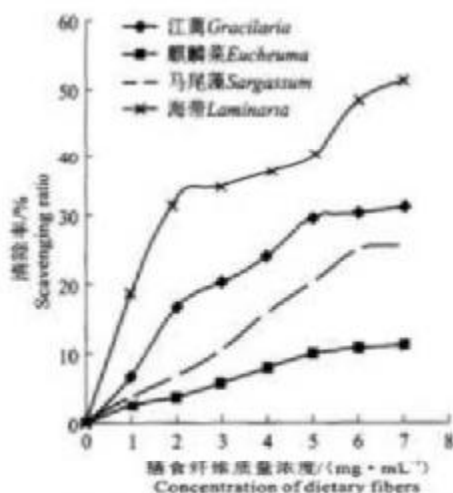


图8 海藻膳食纤维对DPPH清除作用

Fig.6 Scavenging effects of seaweed dietary fibers on elimination of DPPH

都较低,在膳食纤维质量浓度7 mg/mL以下,江蕨膳食纤维对DPPH的最高清除率为31%,其次为马尾藻和麒麟菜膳食纤维,其最高清除率分别为26%和11%,但都远不如没食子酸丙酯对DPPH的清除能力。在4种海藻膳食纤维中,海带膳食纤维对DPPH的清除率最高,其 IC_{50} 为6.2 mg/mL,但也比不上没食子酸丙酯对DPPH的清除能力,在膳食纤维浓度为2 mg/mL以下,其清除率迅速增长,在2 mg/mL以上增长缓慢。

3 结论

在羟基自由基体系中,江蕨、麒麟菜、马尾藻、海带4种膳食纤维都显示了较强的清除能力,其 IC_{50} 分别为5.2 mg/mL、5.5 mg/mL、4.4 mg/mL和4.1 mg/mL;在超氧阴离子自由基体系中,江蕨、麒麟菜膳食纤维显示了较强的清除能力,其 IC_{50} 分别为4.8 mg/mL和5.3 mg/mL,而马尾藻、海带膳食纤维出现先升高再下降的清除趋势;在烷基自由基引发的亚油酸氧化体系中,江蕨、麒麟菜膳食纤维的清除规律基本相同,其清除率较低,最高分别为36%和26%,而马尾藻、海带膳食纤维显示较强的清除率,其 IC_{50} 分别为4.1 mg/mL和3.5 mg/mL;在DPPH体系中,江蕨、麒麟菜、马尾藻和海带4种膳食纤维都显示较低的清除率,前3者的最高清除率分别为31%、11%和26%,而海带膳食纤维的 IC_{50}

为6.2 mg/mL。在各体系中,与相应的专一性阳性参照物(芦丁、超氧化物歧化酶、茶多酚和没食子酸丙酯)对比,4种海藻膳食纤维对羟基自由基、超氧阴离子自由基、烷基自由基和DPPH自由基都有一定的清除能力。

参考文献:

- [1] 张立新,杭 珊,王宗花,等. 某些常见藻类抗氧化活性的研究[J]. 食品科学,1999(11):21-23.
- [2] Hudson J B, Kim J H. Antiviral compounds in extracts from Korean seaweeds: Evidence for multiple activities[J]. Appl Phycol, 1999(10):427-434.
- [3] Tutour B Le, Benalimane F. Antioxidation and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Asciophyllum*[J]. Appl Phycol, 1998(10):121-129.
- [4] Yan Xiao-jun, Fang Guo-ming. Studies on free radical scavenging activity in Chinese seaweeds Part I. Screening results[J]. Chin J Oceanol Limnol, 1999, 17(3):240-246.
- [5] 薛长朋,徐 强,赵 雪,等. 琼脂低聚糖清除自由基的活性[J]. 水产学报,2003,27(3):283-288.
- [6] 周建全,黄博宇,邹晓宁. 天然食用抗氧化剂研究进展[J]. 广州食品工业科技,1998(3):33-35.
- [7] 李来好,陈培基,杨贵庆,等. 正交设计法提取江蕨高活性膳食纤维[J]. 湛江海洋大学学报,2000,20(1):33-38.
- [8] 李来好,杨贵庆,陈培基,等. 麒麟菜高活性膳食纤维的提取与功能性试验[J]. 湛江海洋大学学报,2000,20(2):28-33.
- [9] 李来好,杨贵庆,吴燕燕,等. 正交设计法提取马尾藻高活性膳食纤维[J]. 湛江海洋大学学报,1998,18(2):39-43.
- [10] 李来好,陈培基,李刘冬,等. 海带膳食纤维的提取与功能性试验[J]. 青岛海洋大学学报,2003,33(5):687-694.
- [11] 贾之情,邹建敏,唐孟成. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(2):184-186.
- [12] 范 晓,严小军,房国明,等. 高分子量褐藻多酚抗氧化性质研究[J]. 水生生物学报,1999,23(5):494-499.
- [13] 彭长连,陈少薇,林植芳,等. 用清除有机自由基DPPH法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展,2000,27(6):658-661.
- [14] 李兆杰,薛长朋,陈 磊,等. 低分子量海带岩藻糖硫酸酯的清除活性氧自由基和体内抗氧化作用[J]. 水产学报,2001,25(1):64-68.
- [15] 薛长朋,陈 磊,李兆杰,等. 岩藻糖硫酸酯体外抗氧化特性的研究[J]. 青岛海洋大学学报,2000,30(4):583-588.
- [16] 李 丹,肖 刚,丁霄霖. 苦荞黄酮清除自由基作用的研究[J]. 食品科技,2000(6):62-64.

Scavenging effect of dietary fibers from four seaweeds on free radical

LI Lai-hao^{1,2}, LI Liu-dong², SHI Hong², CHEN Pei-ji², HAO Shu-xian², YANG Xian-qing², WU Yan-yan², DIAO Shi-qiang², XUE Chang-hu¹

(1. Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Free radical scavenging capacities of four dietary fibers from *Gracilaria*, *Eucheuma*, *Sargassum* and *Laminaria* were studied. The assay system included hydroxyl radical system, superoxide radical system, alkyl radical oxidation system and DPPH system. The results showed that IC_{50} s of dietary fibers from *Gracilaria*, *Eucheuma*, *Sargassum* and *Laminaria* were 5.2 mg/mL, 5.5 mg/mL, 4.4 mg/mL and 4.1 mg/mL, respectively in hydroxyl radical assay system. In superoxide radical assay system, the IC_{50} of *Gracilaria* and *Eucheuma* was 4.8 mg/mL and 5.3 mg/mL respectively, while for *Sargassum* and *Laminaria*, free radical scavenging ratio were as high as 36% and 42% respectively. In linoleic acid oxidation system, free radical scavenging capacities of *Gracilaria* and *Eucheuma* were about 36% and 26%, respectively, which were lower than those of *Sargassum* and *Laminaria*, and IC_{50} were 4.1 mg/mL and 3.5 mg/mL, respectively. In DPPH system, free radical scavenging capacities for *Gracilaria* and *Eucheuma* dietary fiber were 31%, 11% and 26%, respectively, while for *Laminaria* dietary fiber, IC_{50} was about 6.2 mg/mL. It was proved that dietary fibers from the four seaweeds had effects on free radical scavenging compared with special positive contrast in these systems.

Key words: *Gracilaria*; *Eucheuma*; *Sargassum*; *Laminaria*; dietary fibers; free radical; scavenging ratio

Corresponding author: XUE Chang-hu. E-mail: xuech@mail.ouc.edu.cn