

鱿鱼肝脏鱼油成分及其体外抗氧化性的研究

刘安军, 朱晓芳, 郑捷, 石清

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 以鱿鱼肝脏为原料提取鱼油, 确定了直接水提法提取鱿鱼肝脏鱼油的加水量。用气相色谱-质谱法分析了鱿鱼肝脏鱼油中脂肪酸的组成, 并对鱼油的体外抗氧化能力分别进行了 DPPH 自由基清除能力、超氧阴离子自由基清除作用、过氧化氢清除能力以及脂质过氧化抑制作用的测定。另外对鱿鱼肝脏鱼油进行了薄层分析及全波长扫描, 确定了其中含有虾青素。为鱿鱼肝脏在食品、药品和饲料方面的应用提供了理论依据。

关键词: 鱿鱼肝脏; 鱼油; 抗氧化; 脂肪酸

文章编号: 1673-9078(2010)1-18-5

Study on the Compositions of Squid Liver Oil and its Antioxidation Effect *in Vitro*

LIU An-jun, ZHU Xiao-fang, ZHENG Jie, SHI Qing

(Faculty of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this study, squid liver oil was extracted by water and amount of water in the extraction was determined. The fatty acids of the oil were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. And its antioxidation effect *in vitro* was also determined, including DPPH free radical scavenging, superoxide anion radical scavenging, hydrogen peroxide scavenging capabilities and inhibition effect on lipid peroxidation. Besides, thin-layer analysis and full wavelength scanning analysis showed that the extracted crud squid liver oil contained astaxanthin. It provided a theoretical basis for the application of squid liver in food, medicines and feed.

Key words: squid liver; oil; antioxidant; fatty acids

鱿鱼肝脏是加工鱿鱼时产生的下脚料, 占鱿鱼湿重的 15%左右, 一般将其做废弃处理, 这不但浪费资源, 而且污染环境^[1]。关于鱿鱼肝脏的研究近年来已经有一些报道。如章建设等^[2]研究了鱿鱼内脏糖蛋白提取工艺及其免疫活性, 沈彩英^[3]研究了尿素包合法提取乌贼油中多不饱和脂肪酸的影响因素。目前为止, 对于鱿鱼肝脏鱼油的抗氧化性尚未见报道, 为此, 我们对鱿鱼肝脏鱼油的体外抗氧化性做了研究, 并初步确定了抗氧化性的物质, 为鱿鱼肝脏鱼油的开发利用提供了理论依据。

1 方法

1.1 鱿鱼肝脏鱼油的提取

取一定量的鱿鱼肝脏, 分别按 1:0.5、1:1、1:1.5、1:2 (质量比) 加冰水, 搅拌均匀, 然后以 2000 r/min 离心 20 min, 鱼油不溶于水, 因此上层漂浮的即为鱼油。

1.2 鱿鱼肝脏鱼油脂肪酸组成分析^[4]

收稿日期: 2009-09-04

1.2.1 样品前处理

(1) 取 300 mg 样品, 加入到 15 mL 氯仿-甲醇溶液 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}=2:1$) 中, 再加入 3 mL 生理盐水, 匀浆, 静置 30 min, 3000 r/min 下离心 10 min, 提取氯仿层, 旋转蒸发, 除去氯仿, 加入 1 mol/L KOH-乙醇溶液 15 mL, 65 °C 下水浴加热回流 60 min, 皂化后再次旋蒸, 取出乙醇, 生成的肥皂溶于 20 mL 水中, 加入乙醚 20 mL, 用分液漏斗提取下层不皂化物 2 次, 在水层中加入稀盐酸, 调整 pH 至 2.0, 使脂肪酸从肥皂中游离, 用 20 mL 石油醚提取脂肪酸 2 次, 然后用无水 Na_2SO_4 干燥, 保存, 使用前用旋转蒸发器去除石油醚。

(2) 盐酸甲酯化

取皂化物, 旋转蒸发去除石油醚, 放入 100 mL 茄形烧瓶中, 加入 30 mL 的 4% 盐酸-甲醇溶液, 60 °C 下水浴 60 min, 反应冷却后, 加入 15 mL 正己烷和 5 mL 水, 混匀, 3000 r/min 下离心 10 min, 水洗至中性, 将正己烷 (上层) 取出, 无水硫酸钠干燥, 氮气冷却, 待测。

1.2.2 气相色谱/质谱条件

(1) 色谱条件

色谱柱: VF-5ht 30 m×0.25 mm×0.25 μm; 离子源: EI; 进样量: 1 μL; 进样温度: 300 °C; 离子阱温度: 220 °C; 色谱柱升温程序: 60 °C→10 °C/min→300 °C, 并在 300 °C 下保持 10 min; 载气: He 99.999%; 流速: 1 mL/min。

(2) 质谱条件

离子源温度: 220 °C; 接口温度: 280 °C; 电离能量: 70 eV。

1.3 鲑鱼肝脏鱼油抗氧化性的测定^[5]

1.3.1 对 DPPH 自由基清除能力测定

按表 1 加入试剂, 溶液总体积为 4.0 mL, 室温放置 30 min, 在 517 nm 下测定吸光值。

表 1 DPPH 清除能力测定的加样方法

Table 1 Design of determination test for DPPH scavenging effect of the oil

代码	加样方法
A ₀	2mL 2×10 ⁻⁴ M DPPH 自由基溶液+2mL 无水乙醇
A _i	2mL 2×10 ⁻⁴ M DPPH 自由基溶液+2mL 试样溶液
A _j	2mL 无水乙醇+2mL 试样溶液

清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \{1 - (A_i - A_j)/A_0\} \times 100\%$$

式中: A_i—加抗氧化剂时 DPPH 溶液的吸光度; A_j—加抗氧化剂未加 DPPH 溶液的吸光度; A₀—只加溶剂时 DPPH 溶液的吸光度。

1.3.2 对超氧阴离子自由基清除作用测定

核黄素光照还原法, 在 10 mL 的试管中依次加入 0.05 mol/L pH 7.8 磷酸盐缓冲液、0.13 mol/L 甲硫氨酸和 2×10⁻⁵ mol/L 核黄素各 0.4 mL, 再加入 7×10⁻⁴ mol/L 氮蓝四唑 (NBT) 0.4 mL, 25 °C 光照 30 min。核黄素光敏后产生的 O²⁻ 与氮蓝四唑生成的蓝色物质在 560 nm 处有最大吸收。操作同上, 做不加挥发油的空白对照和维生素 E 为对照。每样重复 3 次, 按以下公式计算清除率

$$\text{清除率}(\%) = \{1 - (A_i - A_j)/A_0\} \times 100\%$$

式中: A_i—加抗氧化剂时溶液的吸光度; A_j—加抗氧化剂未加 NBT 溶液的吸光度; A₀—只加溶剂时溶液的吸光度。

1.3.3 对过氧化氢清除能力的测定

过氧化氢是一种强氧化剂, 具有良好的扩散性, 容易透过细胞膜, 并引起氧化损伤, 采用置换滴定法检测过氧化氢浓度。

分别取 0.1 mmol/L H₂O₂ 1.0 mL 和不同质量浓度的提取物 1.0 mL 混合, 加入 2 滴 3% 钼酸铵, 2 mol/L

H₂SO₄ 10 mL 和 1.8 mol/L KI 7.0 mL, 用 0.005 mol/L Na₂S₂O₃ 开始滴定, 待体系变黄, 加 1~2 mL 淀粉溶液, 滴定到无色即为终点。滴定样品的体积为 V₁, 滴定过氧化氢所用体积为 V₀, 按以下公式计算过氧化氢的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \{(V_0 - V_1)/V_0\} \times 100\%$$

1.3.4 脂质过氧化抑制作用的测定

(1) 卵磷脂体系试液的配制

卵磷脂溶液 (LLS): 30 mg 卵磷脂溶解于 30 mL 10 mmol/L pH 7.4 PBS (磷酸缓冲液), 冰浴震荡。

TCA-TBA-HCL 混合液: 三氯醋酸 (TCA): 硫代巴比妥酸 (TBA): 盐酸 = 15 g: 0.375 g: 2.1 mL, 溶解于蒸馏水, 定容至 100 mL。

(2) 测定步骤: 于样品管中依次加入 1.0 mL 卵磷脂溶液 (LLS)、1.0 mL 0.1% 三氯化铁溶液 (FeCl₃)、1.0 mL 4 mmol/L 抗坏血酸和 0.2 mL 样品, 混匀, 避光, 于 37 °C 水浴 30 min, 再加入 2.0 mL TCA-TBA-HCL 混合液, 90~100 °C 水浴 15 min, 迅速冷却, 以 2000 r/min 转速离心 10 min, 取上清液在 532 nm 测吸光值 A_s, 同上做空白对照, 以维生素 E 为对照, 每样品重复 3 次。

$$\text{清除率}(\%) = \{1 - (A_i - A_j)/A_0\} \times 100\%$$

式中: A_i—加抗氧化剂时溶液的吸光度; A_j—加抗氧化剂未加 TCA-TBA-HCL 溶液的吸光度; A₀—只加溶剂时溶液的吸光度

1.4 鲑鱼肝脏鱼油的薄层分析

用玻璃毛细点样管将溶于二氯甲烷的样品溶液点到硅胶板下端距边缘约 1.0 cm 处, 静置 10 min, 待样品溶液挥发后, 将薄层板斜放进装有少量展开剂 [V (正己烷): V (丙酮) = 1:1] 的层析缸中展开, 待展开剂上升至接近于层析板的顶部 5 mm 时, 取出硅胶板, 吹风机吹干, 通过与虾青素标准样品比较, 确认鲑鱼肝脏鱼油中是否存在虾青素。

1.5 鲑鱼肝脏鱼油的全波长扫描

将虾青素和鲑鱼肝脏鱼油分别溶于二氯甲烷中, 离心, 取上清液, 于 CARY 50BIO 紫外-可见分光光度计扫描最大吸收波长及吸光度。

2 结果与讨论

2.1 鲑鱼肝脏中不同加水量的出油率比较

由表 2 可以看出, 加水量为 100 mL 的鱼油提取量最多。因此, 用水提取法将鲑鱼肝脏中的鱼油和蛋白分开, 鲑鱼肝脏和水的最佳质量比为 1:1。

表 2 不同加水量对 100 g 鱿鱼肝脏的出油量的影响

Table 2 Effect of water amount on the oil yield from 100 g squid

liver				
加水量/mL	鱼油/g			平均/g
50	34.5	35.6	36.3	35.5
100	40.0	40.8	41.0	40.6
150	34.8	36.6	37.8	36.4
200	34.2	35.6	35.5	35.1

2.2 鱿鱼肝脏鱼油脂肪酸组成分析

鱿鱼肝脏鱼油经过甲酯化处理，再用气象色谱质谱仪进行分析，图 1 为鱿鱼肝脏鱼油的气相色谱图。

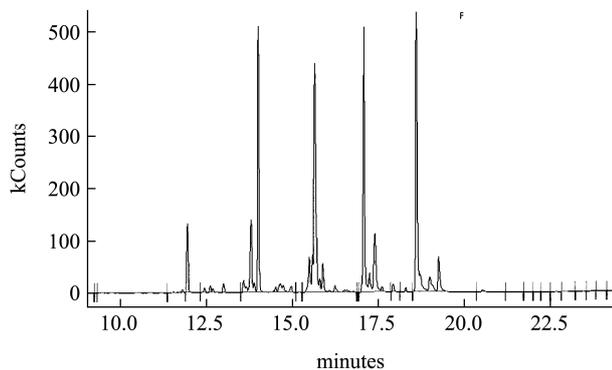


图 1 鱿鱼肝脏鱼油的气相色谱图

Fig.1 GC chromatography of the squid liver oil

由图 1 可看出，鱿鱼肝脏鱼油主要由 C₁₄~C₂₂ 脂肪酸组成。

表 3 鱿鱼肝脏鱼油中各种脂肪酸含量百分比

Table 3 Contents of the fatty acids of squid liver oil

序号	脂肪酸名称	相对含量/%
1	十四碳酸 (14:0)	4.2
2	十五碳酸 (15:0)	0.7
3	十六碳酸 (16:0)	15.1
4	十六碳烯酸 (16:1)	4.8
5	十七碳酸 (17:0)	0.2
6	十八碳酸 (18:0)	1.7
7	油酸 (18:1)	4.9
8	亚油酸 (18:2)	13.0
9	亚麻酸 (18:3)	2.0
10	二十碳二烯酸 (20:2)	4.6
11	二十碳五烯酸 (20:5) (EPA)	18.7
12	二十二碳三烯酸 (22:3)	0.1
13	二十二碳六烯酸 (22:6) (DHA)	19.7
饱和脂肪酸		22.0
单不饱和脂肪酸		9.7
多不饱和脂肪酸		58.2
EPA+DHA		38.4

鱿鱼肝脏鱼油中，饱和脂肪酸中的十六碳酸 (16:0) 含量最高，占 15.1%，其它饱和脂肪酸含量很少。不饱和脂肪酸占 70%左右，其中单不饱和脂肪酸占 9.7%，鱿鱼油中多不饱和脂肪酸含量较高，主要物质是 EPA 和 DHA，含量分别为 18.7%和 19.7%，DHA 高于 EPA。这类多不饱和脂肪酸具有多种生理调节功能，因此，从鱿鱼肝脏中提取鱼油并对其开发利用具有广泛的应用前景。

2.3 鱼油的体外抗氧化

2.3.1 对 DPPH 自由基清除能力测定

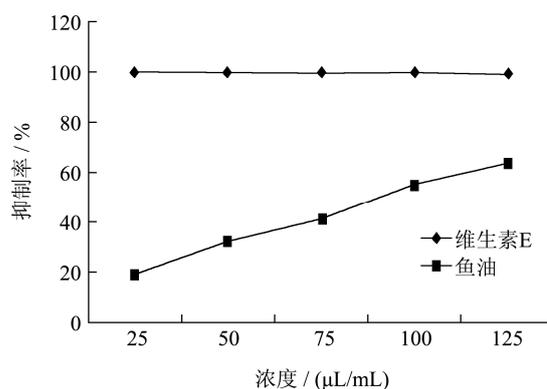


图 2 鱿鱼肝脏鱼油与 VE 清除 DPPH 自由基的能力

Fig.2 DPPH scavenging effects of squid liver oil and VE

由图 2 可知，鱿鱼肝脏鱼油清除 DPPH 自由基的能力均随着鱼油质量浓度的增大而增大，质量浓度越大，清除能力越强。同时，由图 2 可知，在同等条件下，鱼油的抗氧化性比 VE 的抗氧化性弱。

2.3.2 对超氧阴离子自由基清除作用测定

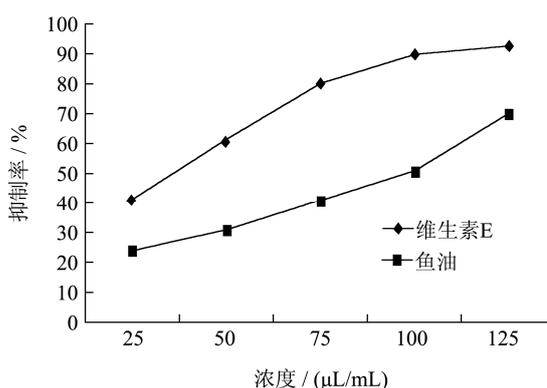


图 3 鱿鱼肝脏鱼油与 VE 对超氧阴离子自由基清除作用

Fig.3 Superoxide anion radical scavenging effects of squid liver oil and VE

由图 3 可知，鱿鱼肝脏鱼油与维生素 E (对照) 清除超氧阴离子自由基的能力均随着样品质量浓度的增大而增强，维生素 E 清除超氧阴离子自由基的能力更强一些，可以判断鱿鱼肝脏鱼油具有一定的清除超

氧阴离子自由基的能力。

2.3.3 对过氧化氢清除能力的测定

鱿鱼肝脏鱼油及维生素 E 清除过氧化氢能力的强弱如图 4 所示, 随着样品质量浓度的增大, 其对过氧化氢的清除能力越强, 从图 3 可以看出, 维生素 E 的清除能力强于鱿鱼肝脏鱼油。

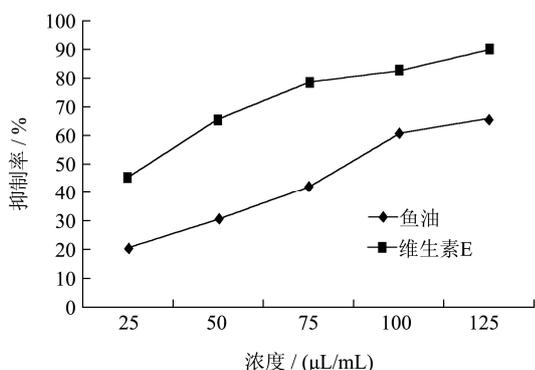


图 4 鱿鱼肝脏鱼油与 VE 对过氧化氢清除能力

Fig.4 Hydrogen peroxide scavenging effects of squid liver oil and VE

2.3.4 脂质过氧化抑制作用的测定

脂质过氧化是动脉粥样硬化的病因之一, 其终产物 MDA 可与膜蛋白、酶发生交联反应, 使膜透性增加, 导致细胞膜结构、功能和代谢发生变化, 对人体危害极大, 其测定结果见图 5。

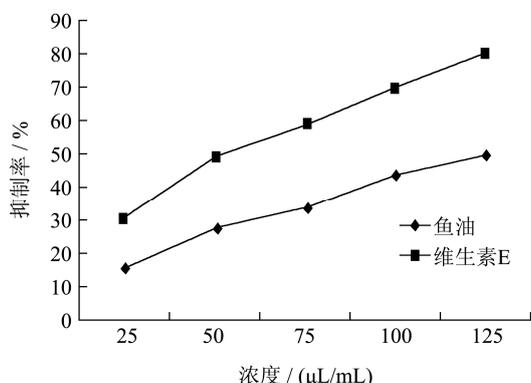


图 5 鱿鱼肝脏鱼油与 VE 的脂质过氧化抑制作用

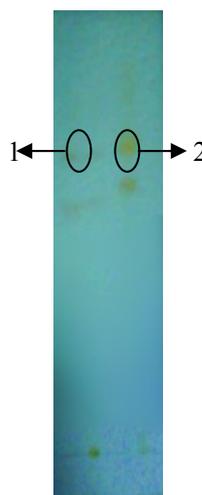
Fig.5 Inhibition effects of squid liver oil and VE on lipid peroxidation

由图 5 可以看出, 鱿鱼肝脏鱼油及维生素 E 抑制脂质过氧化的能力随着浓度的增大而增强, 维生素 E 抑制抗氧化的能力强于鱿鱼肝脏鱼油。因此, 鱿鱼肝脏鱼油具有一定的抑制脂质过氧化的能力。

2.4 薄层层析结果

由图 6 的薄层层析分析可以看出, 在虾青素出现的点处鱿鱼肝脏鱼油也出现了斑点, 由此可以推断鱿

鱼肝脏鱼油中含有虾青素。



(1) 鱿鱼肝脏鱼油, (2) 虾青素

图 6 鱿鱼肝脏鱼油的薄层层析图

Fig.6 Thin-layer chromatography of squid liver oil

2.5 全波长扫描结果

由图 7 全波长扫描图可看出, 鱿鱼肝脏鱼油同虾青素均在 480 nm 处出现了最大吸收峰, 可以推断鱿鱼肝脏鱼油中含有虾青素。

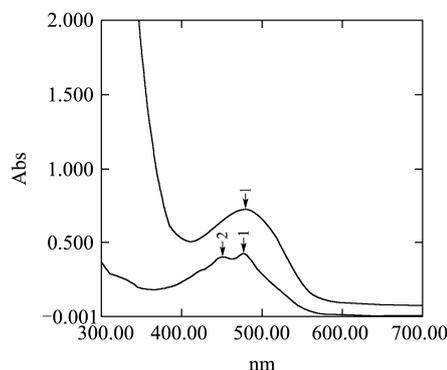


图 7 鱿鱼肝脏鱼油的全波长扫描图

Fig.7 Full wavelength scanning analysis of squid liver oil

3 结论

本实验是对鱿鱼肝脏废弃物的综合利用研究, 其中包括鱼油的制备及鱼油体外抗氧化功能的研究。主要结论如下:

(1) 确定了直接水提法提取鱿鱼肝脏鱼油的加水量, 当加水量为 1:1 鱿鱼肝脏的出油量最高。

(2) 分析了鱿鱼肝脏鱼油中脂肪酸的组成, 鱿鱼油中多不饱和脂肪酸含量较高, 主要物质是 EPA 和 DHA, 含量分别为 18.7%和 19.7%, DHA 高于 EPA。

(3) 对鱼油体外抗氧化能力分别进行 DPPH 自

(转第 62 页)