

沙蚕提取物的抗氧化活性研究<sup>△</sup>

黄琳, 段磊, 李荣贵, 王斌

(青岛大学生物系, 山东 青岛 266071)

**摘要:**目的 探讨沙蚕提取物的抗氧化活性。方法 采用 DPPH 法观察沙蚕提取物的抗氧化活性, 通过 Sephadex LH-20 凝胶过滤, 对沙蚕提取物中的抗氧化物质进行了初步分离纯化。结果与结论 沙蚕提取物具有较强的清除自由基(DPPH)的能力, 通过定性分析方法确定该物质为一类小分子量的多肽类物质。

**关键词:**双齿围沙蚕; 自由基; 抗氧化性; 二苯代苦味酰基自由基

**中图分类号:**Q959.19;R965 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-3461(2007)02-0019-04

Study on antioxidant activity of extracts from *Perinereis aibuhitensis*

HUANG Lin, DUAN Lei, LI Rong-gui, WANG Bin

(Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** **Objective** To study antioxidant activity of extracts from *Perinereis aibuhite*. **Methods** The extracts from *Perinereis aibuhite* were purified by using Sephadex LH-20 and its antioxidant activities were determined by the method of DPPH. **Results and Conclusion** The extracts from *Perinereis aibuhite* showed strong free radical scavenging activity, and it was identified as a group of low molecular weight peptides by qualitative analyzing method.

**Key words:** *Perinereis aibuhitensis*; free radical; antioxidant activity; DPPH

沙蚕是广泛分布在我国沿海地区的一种环节动物, 资源十分丰富。目前国内对沙蚕的研究主要集中在营养成分上<sup>[1,2]</sup>, 以及少数溶栓活性的报道<sup>[3,4]</sup>。但其抗氧化活性研究在国内外尚未见报道。为此, 我们对沙蚕进行了初步分离纯化, 采用 DPPH 法对其抗氧化活性进行了初步观察, 旨在为进一步开发利用沙蚕提供实验依据。

## 1 材料与仪器

## 1.1 材料

双齿围沙蚕 (*Perinereis aibuhitensis* Grube), 购自青岛南山花鸟鱼虫市场, 由本系郭道森教授确认, 保存于本实验室。

DPPH (Sigma, USA), 铁氰化钾, 三氯乙酸, 三氯化铁,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 乙醇等均为分析纯。

## 1.2 主要仪器

紫外可见分光光度计 (UV-1601 日本岛津), 高速冷冻离心机 (CR21 日本日立), 电热恒温水浴锅 (北京长风), AKTA Purifier 蛋白纯化工作站, Sephadex LH-20 凝胶过滤层析柱 (1.2 × 60 cm), 冷冻干燥机 (Freezone 6L, 美国 Labconco)。

## 2 方法

## 2.1 提取物的制备

将活的沙蚕用清水清洗数次, 沥干后称

<sup>△</sup> 基金项目: 国家重点基础研究前期专项基金 (2004CCA02400)

作者简介: 黄琳, 女, 讲师 E-mail: kiki-abo@sohu.com

重,置-35℃备用,或直接用高速组织捣碎机匀浆,加 2~5 倍体积的预冷的磷酸盐缓冲液( $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS, pH7.0),4℃静置 2h 以上。 $8000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15min,收集上清,再用提取液二次浸提沉淀,离心,合并上清。上清冷冻干燥后称重,每 1mL 上清约制得 12.5mg 干粉。

## 2.2 柱层析分离纯化

取离心后的上清 3.0mL,沸水浴中加热 10min。将热变性后的上清离心  $12000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,10min,取上清。将 2mL 上清(约为柱床体积的 1%~3%)加到 Sephadex LH-20 柱上,以  $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 洗脱,流速为  $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。用部分收集器收集,每管约 4 mL,280nm 紫外检测,分别收集各个组分,透析,冻干,并进行活性测定。

## 2.3 沙蚕上清对 $\text{Fe}^{3+}$ 的还原能力的测定

采用硫酸亚铁法测定沙蚕上清的还原能力<sup>[5]</sup>。取不同浓度的样品 0.4mL,加入  $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH6.6 的磷酸缓冲溶液 2mL,1% 铁氰化钾( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ )溶液 2mL,混匀,在 50℃恒温水浴锅中保温 20min,再加入质量分数为 10%的三氯乙酸(TCA)溶液 2mL,振荡混匀后  $4000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10min。取上清 2mL,加 2mL 蒸馏水和 0.1%  $\text{FeCl}_3$  溶液 0.4mL,静置 10min 后,体系的颜色由黄色变为蓝色,在 700nm 下进行比色,以维生素 C 作为阳性对照,每个测定对象平行测定 3 次,取平均值。

采用不同 pH 值(6.0,7.0,8.0)的沙蚕上清( $12.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),测定其还原能力,每个测定对象平行测定 3 次,取平均值。

## 2.4 沙蚕提取物对自由基 DPPH 清除率的测定

为了测定沙蚕提取物的体外抗氧化活性,采用了 DPPH(二苯代苦味酰基自由基)比色法<sup>[6,7]</sup>。 $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 提取液和经过分子筛分离纯化后的各个峰中的物质分别进行 DPPH 自由基清除率的测定。取不同

浓度的待测样品(125,100,75,50,25,12,  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 2mL 加入  $1.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DPPH 2mL,振荡混匀,避光反应 20min 后在 517nm 下进行吸光度的测定,以维生素 C 作为阳性对照,平行测定 3 次,取平均值。对照组以等体积的无水乙醇代替 DPPH,空白组以等体积的 DPPH 和无水乙醇混合,并以乙醇和蒸馏水进行空白调零。

清除率的计算:清除率(%) =  $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$

式中, $A_1$ —对照组吸光度; $A_2$ —样品组吸光度; $A_0$ —空白组吸光度。

## 3 沙蚕提取物的初步定性

### 3.1 茚三酮反应

取 20 $\mu\text{L}$  的样品液(已经柱层析分离后的物质,并显示抗氧化活性),加入 0.1% 茚三酮溶液 100 $\mu\text{L}$ ,将混合液在沸水浴中加热 1~2min,观察颜色变化,并以酪蛋白作为阳性对照。

### 3.2 萘酚反应

取萘酚试剂 4mL 和待测样品(已经柱层析分离后的物质,并显示抗氧化活性)1mL 置试管中,迅速浸于冰水中冷却,然后在沸水浴上加热 10min(注意加盖,防止水分蒸发造成损失),冷却,观察颜色变化。

### 3.3 双缩脲反应

取 100 $\mu\text{L}$  的双缩脲试剂和待测样品(已经柱层析分离后的物质,并显示抗氧化活性)40 $\mu\text{L}$  置试管中,摇匀,观察颜色变化,以酪蛋白作为阳性对照。

## 4 结果和讨论

### 4.1 沙蚕抗氧化物的初级分离

经沸水浴变性并离心后的上清通过 Sephadex LH-20 柱层析分离,在 280nm 检测出有 5 个对称峰。4 号峰的对称性最好,同时在 280nm 的吸光度也最大,并且 4 号峰洗脱时间较晚,表明其相对分子质量较小。

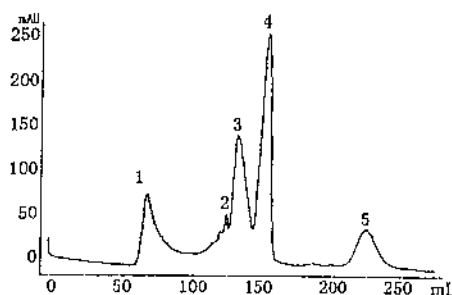


图 1. Sephadex LH-20 分离  
沙蚕上清的洗脱曲线

#### 4.2 沙蚕提取物的体外还原能力

根据 2.3 还原力的测定方法,在 700nm 处的吸光度越大,样品的还原能力越强。由表 1 可知,沙蚕上清的还原能力在一定浓度范围内随着浓度的升高而增大,并且,样品的还原能力与抗氧化能力呈正相关。

表 1 沙蚕提取物的还原能力

| mg · mL <sup>-1</sup> | 0.01  | 0.025 | 0.050 | 0.075 | 0.100 | 0.125 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>700</sub>      | 0.139 | 0.183 | 0.285 | 0.423 | 0.499 | 0.636 |

由表 2 显示,采用 pH 为 7.0 的沙蚕上清进行还原力的测定,其还原能力较强。

表 2 不同 pH 值沙蚕上清的还原力

| 浓度<br>mg · mL <sup>-1</sup> | 不同 pH 值的沙蚕上清的吸光度 (A <sub>700</sub> ) |       |       |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------|-------|
|                             | pH6.0                                | pH7.0 | pH8.0 |
| 0.025                       | 0.222                                | 0.250 | 0.215 |
| 0.050                       | 0.311                                | 0.339 | 0.316 |
| 0.075                       | 0.422                                | 0.443 | 0.419 |
| 0.100                       | 0.519                                | 0.538 | 0.520 |
| 0.125                       | 0.601                                | 0.607 | 0.596 |

表 3 Sephadex LH-20 凝胶过滤分离后的样品对 DPPH 的清除作用

| 待测样品             | 沙蚕提取液         | 分离前的样品 | 1 号峰  | 2 号峰  | 3 号峰  | 4 号峰  | 5 号峰  |
|------------------|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>517</sub> | 0.116         | 0.146  | 0.505 | 0.513 | 0.494 | 0.155 | 0.509 |
| 对照               | 0.510 ± 0.005 |        |       |       |       |       |       |
| 清除率/%            | 77.25         | 71.37  | 0.98  | 0.39  | 3.14  | 69.61 | 0.20  |

表 4 沙蚕提取物和维生素 C 对 DPPH 的清除作用

| 沙蚕提取物                 |                  |       | Vc                    |                  |       |
|-----------------------|------------------|-------|-----------------------|------------------|-------|
| mg · mL <sup>-1</sup> | A <sub>517</sub> | 清除率/% | mg · mL <sup>-1</sup> | A <sub>517</sub> | 清除率/% |
| 5.0                   | 0.464            | 6.65  | 1.25                  | 0.425            | 13.59 |
| 10                    | 0.426            | 14.12 | 2.5                   | 0.348            | 29.33 |
| 25                    | 0.312            | 37.22 | 3.75                  | 0.280            | 43.31 |
| 37.5                  | 0.224            | 56.21 | 5.0                   | 0.195            | 61.29 |
| 50                    | 0.151            | 71.29 | 7.5                   | 0.089            | 83.33 |
| 对 照                   | 0.496 ± 0.005    |       | 对 照                   | 0.492 ± 0.007    |       |

#### 4.3 沙蚕提取物对 DPPH 的清除效果

如表 2 所示,经 Sephadex LH-20 凝胶过滤分离后的各个峰中的样品,只有 4 号峰的物质具有明显的清除自由基 DPPH 的能力,而 1、2、5 号峰则几乎没有清除自由基 DPPH 的能力,而 3 号峰对自由基 DPPH 的清除作用很弱。

沙蚕提取物的抗氧化能力以 IC<sub>50</sub> 来衡量,IC<sub>50</sub> 的定义为:使得 DPPH 自由基的清除率达到 50% 时所需的样品液的浓度,通过回归方程可求出 IC<sub>50</sub>。依据回归方程  $y = 1.4555x + 0.0002$  (沙蚕提取物清除 DPPH),  $y = 11.276x + 1.0673$  (维生素 C 清除 DPPH), 4 号峰收集的样品的 IC<sub>50</sub> 为 (34.36  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 而维生素 C 的 IC<sub>50</sub> 为 (4.34  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 可见在该抗氧化分析体系中,沙蚕提取物的抗氧化能力低于维生素 C。由表 3 可知,4 号峰收集的沙蚕提取物,对 DPPH 有一定的清除作用,清除率随着抗氧化剂浓度的增大而升高。沙蚕提取物的抗氧化活性明显低于维生素 C,其抗氧化活性大小可能与抗氧化剂分子中有效酚羟基的个数及新生成的自由基的稳定性有关。

#### 4.4 沙蚕提取物的初步定性

样品液加入茚三酮后,加热呈现蓝紫色,而对照酪蛋白溶液同样呈现蓝紫色,说明样品液中含有多肽类或蛋白质物质。茚酮试剂和样品液混合后,沸水浴冷却后颜色没有变化,而阳性对照蔗糖迅速呈现绿色。以上结果表明,经凝胶过滤后的 4 号峰中的物质不含有糖类或糖基。待测样品加入双缩脲试剂后,呈现蓝紫色,而阳性对照酪蛋白迅速呈现深紫色,说明待测样品中含有二肽以上的多肽类分子。

本文通过 DPPH 法观察了沙蚕提取物的抗氧化活性,并进行了初步分离纯化。通过实验发现,沙蚕上清具有较强的还原力和清除自由基 DPPH 的能力,并呈现较好的热稳定性。沙蚕上清中的抗氧化物为一种小分子量的多肽类物质。

#### 参考文献:

- [1] 滕瑜,王印庚,王彩理. 沙蚕的营养分析和功能研究[J]. 海洋科学进展,2004,22(4):215.
- [2] 刘向辉,戈峰,潘卫东. 沙蚕组织内几种营养成分的分析[J]. 中国海洋药物,2002,21(6):35.
- [3] 张永靖,童丽娟,郑周数,等. 养殖环境中底栖生物丰度与双齿围沙蚕生化组成的相关性研究[J]. 水产科学,2005,24(2):5.
- [4] 张伟云,陈颖,汪水娟,等. 沙蚕纤溶酶的一种纯化方法[J]. 中草药,2001,32(8):673.
- [5] Yenbun H, Fereidoon S. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system[J]. *Agric Food Chem*, 1997, 45:4262.
- [6] Chio CW, Kim SC, Hwang SS, et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison[J]. *Plant Science*, 2002, 163:1161.
- [7] Lu Yin rong. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. *Food Chemistry*, 2000, 68:81.

(收稿日期:2006-10-08)

《中国海洋药物》为我国科技核心期刊