

大鲵肽在牙膏中的应用研究

赵冠华, 佟长青, 李伟, 曲敏

(大连海洋大学 食品科学与工程学院 辽宁 大连 116023)

摘要: 采用酶法从人工饲养大鲵肉中提取得到大鲵肽, 利用串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF)测定其分子量主要为 1 422, 1 521, 1 746, 1 828 和 1 879, 均小于 2 000。酶解产物大鲵肽为低聚肽。将提取到的大鲵肽应用到牙膏中, 应用自由基清除活性评价方法研究了大鲵肽牙膏的抗氧化活性。结果表明, 牙膏中添加质量分数为 0.1% 的大鲵肽可达到较好的抗氧化效果, 其牙膏水溶液具有清除 DPPH 自由基、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基的能力。

关键词: 牙膏; 大鲵肽; 抗氧化

中图分类号: TQ658.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1001-1803(2017)01-0036-04

DOI: 10.13218/j.cnki.csdc.2017.01.008

Research on application of peptide from flesh of artificial raised *Andrias davidianus* in toothpaste

ZHAO Guan-hua, TONG Chang-qing, LI Wei, QU Min

(College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: A kind of peptide was isolated from flesh of artificial raised *Andrias davidianus* via enzymolysis. Molecular weight of the peptide was measured as 1 422, 1 521, 1 746, 1 828 and 1 879 with a tandem time-of-flight MS system (MALDI-TOF/TOF). All the molecular weight values are lower than 2 000; and showed that the enzymolysis product is a kind of oligopeptide. The peptide extracted from *Andrias davidianus* was applied in formulation of toothpaste, and its antioxidation activity was examined based on method for determination of free radical scavenging activity. Results showed that when mass fraction of the peptide extract in the toothpaste formulation achieves 0.1%, rather good antioxidation effect can be obtained. Aqueous solution of the toothpaste is capable to scavenge DPPH free radicals, hydroxyl free radicals, superoxide anion radicals and ABTS free radicals.

Key words: toothpaste; peptide from *Andrias davidianus*; antioxidation

中国大鲵(*Andrias davidianus*) ,俗称娃娃鱼,是目前地球上仅存三种隐鳃鲵科中体形最大、品质最优的一种,已列入国家二级保护动物名录,为我国特有的珍稀两栖动物^[1]。由于大鲵中富含多种有益于人类健康的活性成分,目前人工养殖业正在兴起。大鲵肉的酶解产物为大鲵肽,前期研究发现大鲵肽具有清除自由基活性、抑制 ACE 活性、提高小鼠免疫功能、抗疲劳、促进小肠吸收和促进上皮细胞增殖等作用^[2]。

目前,未见将大鲵肽添加到牙膏中的相关研究与报道。外界环境中的空气污染、阳光辐射、呼吸作用、农药等都会让人体产生自由基。过多的自由基会导致

人体和组织的损坏,从而引起疾病,所以研究抗氧化可以有效克服其带来的危害。本文从养殖大鲵的肉中提取大鲵肽,将其添加到牙膏中,应用自由基清除活性评价方法,以探究大鲵肽牙膏的抗氧化能力,使牙膏由普通洁齿型向功效性方向发展。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

大鲵肉,由张家界(中国)金驰大鲵生物科技有限公司提供; *Aspergillus sp.* 酸性蛋白酶,由大连海洋大

收稿日期: 2016-08-18; 修回日期: 2017-01-04

基金项目: 湖南省战略性新兴产业科技攻关项目(2013GK4100)

作者简介: 赵冠华(1990-),男,甘肃兰州人,硕士研究生,电话: 18340831450, E-mail: lookgo@qq.com。

通讯联系人: 曲敏,副教授,博士, E-mail: qumin2008@163.com。

学·张家界(中国)金驰大鲵生物科技有限公司生物技术联合实验室制备; DPPH、ABTS, 美国 Sigma 公司; 水杨酸、双氧水、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、过硫酸钾($K_2S_2O_8$), 天津市科密欧化学试剂有限公司。XS-02 多功能组织捣碎机, 东莞市隆鑫机电设备有限公司; BS-224S 精密电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; UV-754 紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 5800 MALDI-TOF/TOF 串联飞行时间质谱仪, 美国 AB Sciex 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大鲵肽的提取^[3]

取新鲜的大鲵肉, 洗净后用组织捣碎机打成糜状物, 加入一定量的水, 搅拌均匀后用冰醋酸调节 pH = 2.0, 加入占大鲵肉质量分数为 0.4% 的 *Aspergillus sp.* 酸性蛋白酶, 45 °C 下酶解 5.5 h, 得到的酶解液冷冻干燥, 即得大鲵肽。

1.2.2 大鲵肽分子量的测定

使用 MALDI-TOF/TOF 测定大鲵肽的分子量。反射模式离子源加速电压为 20 kV, 氮气激光器波长为 337 nm, 质谱信号单次扫描累加 1 000 次。首先将 1 μ L 大鲵肽样品和肽标准分别点至样品靶上, 自然干燥后, 再取 0.6 μ L 芥子酸(SA)基质溶液点至靶位上并自然干燥。通过 MALDI-TOF/TOF 正离子模式下选择反射方法对样品测试范围进行校准, 然后测量样品分子量。标准物质校准范围为: 1 046.542 \pm 0.5, 1 533.858 \pm 0.5, 2 465.199 \pm 0.5 和 3 494.651 \pm 0.5。

1.2.3 大鲵肽牙膏配方及质量测定

实验牙膏配方^[3]如表 1 所示, 本配方经 45 °C 烘箱考察 3 个月稳定。牙膏质量参照国家标准 GB 8372-2008^[4]进行测定。

表 1 牙膏配方表
Tab. 1 Toothpaste formula

序号	原料名称	w/%
1	保湿剂	40~50
2	大鲵肽	0.1
3	二氧化硅	15~20
4	羟甲基纤维素钠	0.5~1.1
5	糖精钠	0.2~0.3
6	月桂醇硫酸酯钠	1.5~2.0
7	苯甲酸钠	0.1~0.3
8	香精	0.5~1.5
9	去离子水	余量

1.2.4 DPPH 自由基清除实验

参照文献[5]的方法, 取不同质量浓度的牙膏样品溶液 2 mL, 分别加入 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液 2 mL 于试管中, 混合摇匀, 于室温黑暗的环境中静置 30 min, 在波长 517 nm 处测定吸光度(A), 以无水乙醇溶液作空白, DPPH 自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\% \quad (1)$$

式中 A_c 为未加入样品时 DPPH 的吸光度; A_j 为未加入 DPPH 时样品的吸光度; A_i 为样品和 DPPH 混合反应后的吸光度。

1.2.5 羟基自由基(\cdot OH)清除实验

按照文献[6]的方法, 取不同质量浓度的牙膏样品溶液 2 mL, 分别加入 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 1 mL, 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇 1 mL, 最后加入 8.8 mmol/L 的双氧水 1 mL, 37 °C 下反应 30 min, 以蒸馏水为空白, 在 510 nm 处测定吸光度, 考虑到样品本身的吸光度, 取未加双氧水的溶液作为本底吸收。 \cdot OH 清除率的计算公式如下:

$$\cdot\text{OH 清除率} = [1 - (A_x - A_{x_0}) / A_o] \times 100\% \quad (2)$$

式中 A_o 为空白对照的吸光度; A_x 为加入样品溶液的吸光度; A_{x_0} 为未加双氧水的样品溶液的吸光度。

1.2.6 超氧阴离子自由基清除实验

参照文献[7]报道的邻苯三酚自氧化法稍加改动进行计算。向试管中添加 4.5 mL pH = 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液和 4.2 mL 的蒸馏水, 25 °C 水浴中反应 10 min, 接着向试管中加入 0.3 mL 45 mmol/L 的邻苯三酚溶液, 混合均匀, 在波长 325 nm 处每隔 1 s 测量溶液的吸光度。1 min 后, 以波长为纵坐标、时间为横坐标作图, 计算斜率, 记为 K_0 ; 向试管中添加 4.5 mL pH = 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液、3.2 mL 蒸馏水和 1 mL 不同质量浓度的牙膏样品溶液, 同样的方法计算斜率, 记为 K_b 。超氧阴离子自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = (1 - K_b / K_0) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.7 ABTS 自由基清除实验

按照文献[8]的方法, 加入 7.4 mmol/L 的 ABTS 储备液, 与 2.6 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 于黑暗室温下反应 12 h, 再用 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释, 使其在波长 734 nm 处的吸光度为 0.70 ± 0.02 , 在反应体系中, 于试管中分别加入 0.2 mL 不同质量浓度的牙膏样品和参比溶液(pH = 7.4 的 PBS), 再加入 0.8 mL 的 ABTS 反应溶液, 振荡摇匀, 室温下静置 6 min, 在波长 734 nm 处测定吸光度。ABTS 自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (1 - A_s / A_o) \times 100\% \quad (4)$$

式中 A_s 为加入样品溶液的吸光度; A_o 为对照溶

液的吸光度。

1.2.8 数据处理

所有数据均以“均值 ± 标准差”表示,实验结果采用 Excel 和 SPSS 统计软件分析。

2 结果与讨论

2.1 大鲛肽分子量的测定

使用 MALDI-TOF/TOF 测定大鲛肉的酶解产物,

质荷比 (m/z) 主要为 1 422, 1 521, 1 746, 1 828 和 1 879, 均小于 2 000。大鲛肉酶解获得的大鲛肽确定为低聚肽。

2.2 大鲛肽牙膏的技术指标

表 2 为大鲛肽牙膏质量指标与国家标准对照。从表 2 中可以看出,大鲛肽牙膏 pH、过硬颗粒、膏体、稳定性、菌落数等指标已达到了牙膏行业国家标准 GB 8372-2008 的要求。

表 2 大鲛肽牙膏质量指标与国家标准对照

Tab. 2 Comparison of quality index of the *Andrias davidianus* formulated toothpaste product and national standard of toothpaste

项目	大鲛肽牙膏	国家标准 GB 8372-2008
pH	7.3	5.0 ~ 10.0
过硬颗粒		玻片无划痕
膏体		均匀、无异物
稳定性		膏体不溢出管口 不分离出液体 香味色泽正常
菌落总数/(CFU · g ⁻¹)	≤180	≤500
霉菌与酵母菌总数/(CFU · g ⁻¹)	≤50	≤100
粪大肠菌群/g		不得检出
铜绿假单胞菌/g		不得检出
金黄色葡萄球菌/g		不得检出
w(Pb)/(mg · kg ⁻¹)		≤15
w(As)/(mg · kg ⁻¹)		≤5

2.3 大鲛肽牙膏水溶液抗氧化性能

2.3.1 清除 DPPH 自由基能力

大鲛肽牙膏水溶液对 DPPH 自由基的清除能力如图 1 所示。由图 1 可知,在一定的浓度范围内,大鲛肽牙膏水溶液对 DPPH 自由基的清除率与质量浓度呈线性增长关系;当大鲛肽牙膏质量浓度为 20 g/L 时,其清除率为 40.50%,说明大鲛肽牙膏水溶液具有一定的

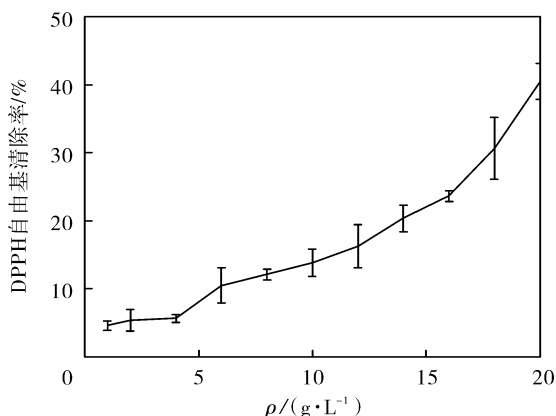


图 1 大鲛肽牙膏水溶液清除 DPPH 自由基能力

Fig. 1 Scavenging effects on DPPH free radicals of the *Andrias davidianus* formulated toothpaste aqueous solution

的清除 DPPH 自由基的能力。

2.3.2 清除 ·OH 能力

大鲛肽牙膏水溶液对 ·OH 的清除能力如图 2 所示(见下页)。由图 2 可知,大鲛肽牙膏水溶液具备清除 ·OH 的能力,并且随着质量浓度的提高其清除活性随之提升;质量浓度为 10, 50 和 100 g/L 时,其清除率分别为 33.49%, 64.82% 和 99.20%,其清除 ·OH 的 IC₅₀ 为 18.55 g/L,说明大鲛肽牙膏水溶液具有一定的清除 ·OH 的能力。

2.3.3 清除超氧阴离子自由基能力

大鲛肽牙膏水溶液对超氧阴离子自由基的清除能力如图 3 所示(见下页)。由图 3 可知,在一定的质量浓度范围内,大鲛肽牙膏水溶液具有清除超氧阴离子自由基的能力,并且清除率与质量浓度呈线性增长关系,质量浓度为 100 g/L 时,清除率达到 41.86%。

2.3.4 清除 ABTS 自由基能力

大鲛肽牙膏水溶液清除 ABTS 自由基的能力如图 4 所示(见下页)。由图 4 可知,在一定质量浓度范围内,随着大鲛肽牙膏水溶液质量浓度的增加,ABTS 自由基清除率也增加;质量浓度为 50 g/L 时,清除率达到了 38.33%。

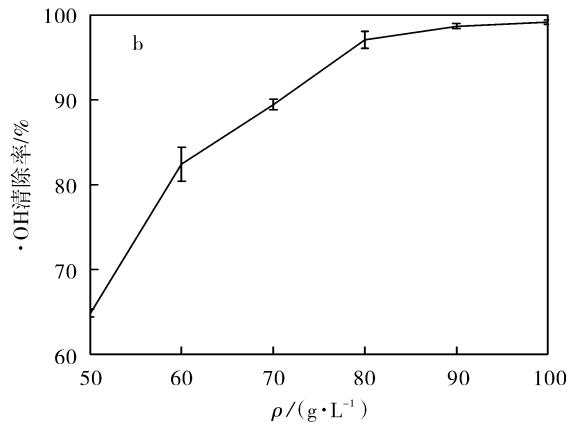
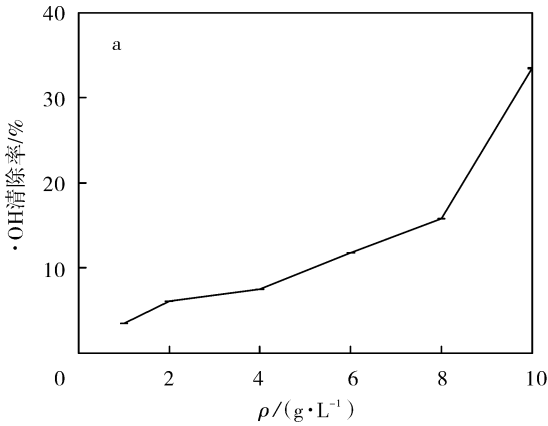


图 2 大鲵肽牙膏水溶液清除 ·OH 能力

Fig. 2 Scavenging effects on hydroxyl free radicals of the *Andrias davidianus* formulated toothpaste aqueous solution

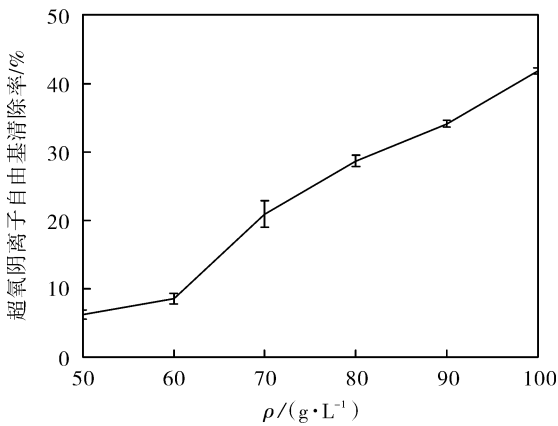


图 3 大鲵肽牙膏水溶液清除超氧阴离子自由基能力

Fig. 3 Scavenging effects on superoxide anion free radicals of the *Andrias davidianus* formulated toothpaste aqueous solution

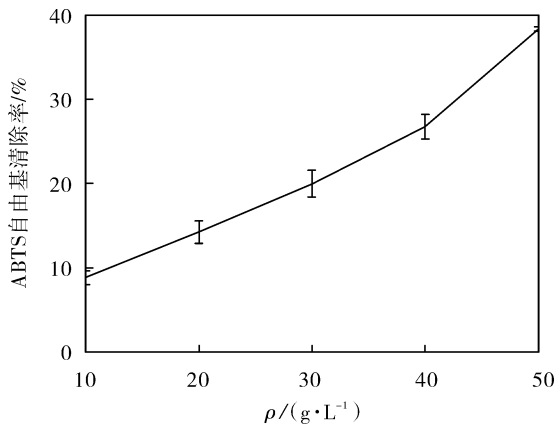


图 4 大鲵肽牙膏水溶液清除 ABTS 自由基能力

Fig. 4 Scavenging effects on ABTS free radicals of the *Andrias davidianus* formulated toothpaste aqueous solution

3 结论

研究大鲵肽发现,其分子量主要为1 422,1 521,

1 746,1 828 和 1 879,均小于 2 000,酶解产物大鲵肽为低聚肽,并且生产的大鲵肽牙膏质量符合国家标准。大鲵肽牙膏水溶液清除 DPPH 自由基、·OH、超氧阴离子自由基以及 ABTS 自由基的效果较好。大鲵肽牙膏在牙膏行业首创了牙齿抗衰老的理念,大鲵肽天然物质在牙膏中的应用有望取代合成抗氧化剂的使用,令牙膏更“绿色”,可避免安全性方面的隐患,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 牟洪民,李媛,姚俊杰,等.大鲵生物学研究的新进展[J].水产科学,2011,30(8):513-516.
- [2] 曲敏.大鲵黏液低聚糖肽的制备、性质和生物活性及应用研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2012.
- [3] 王文莉,张伟,于新莹,等.大鲵肉酶解产物的制备及其抗氧化性的研究[J].河北渔业,2012(9):1-4.
- [4] 中国国家标准化管理委员会.牙膏:GB 8372-2008[S].北京:国家质量监督检验检疫总局,2008.
- [5] Yamaguchi T,Takamura H,Matoba J,et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(6):1201-1204.
- [6] Beeley J G. Glycoprotein and proteoglycan techniques, as laboratory techniques in biochemistry and molecular biology[M]. New York: Elsevier Amsterdam, 1985.
- [7] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(3):469-474.
- [8] 陈卫云,张名位,魏振承,等.不同方法提取荔枝多糖抗氧化活性的比较[J].食品工业科技,2012,33(4):192-194.

(编辑:杨旭)