

银杏抗氧化肽的分离纯化及活性鉴定^{*}

贾韶千 吴彩娥 范龚健 李婷婷

(南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

【摘要】 为了分离制备银杏抗氧化肽,通过葡聚糖凝胶 Sephadex G-25、Sephadex G-10 和半制备型液相色谱对银杏抗氧化肽进行纯化,得到了具有抗氧化活性的肽段。纯化后的银杏抗氧化肽经过高效液相色谱鉴定为单一组分,采用液相色谱串联四极杆飞行时间质谱测定其相对分子量为 452.21 Da。抗氧化试验结果表明,纯化后的银杏抗氧化肽质量浓度为 1.0 mg/mL 时,对羟自由基和 DPPH 自由基具有很强的清除作用,清除率分别达到 80.26% 和 83.57%。

关键词: 银杏 抗氧化肽 分离纯化 飞行时间质谱

中图分类号: S664.3; TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2011)06-0152-04

Purification and Activity Identification of Ginkgo Antioxidant Peptide

Jia Shaoqian Wu Caie Fan Gongjian Li Tingting

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract

In order to separate and prepare ginkgo antioxidant peptide, Sephadex G-25 gel filtration chromatography, Sephadex G-10 gel filtration chromatography and reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) were used to purify ginkgo peptide. The purity of the ginkgo peptide was confirmed by HPLC. Liquid chromatography quadrupole time of flight mass showed that the relative molecular mass was 452.21 Da. Results of antioxidation test indicated that ginkgo antioxidant peptides exhibited strong scavenging capability to hydroxyl radicals and DPPH radicals with the scavenging rates reached to 80.26% and 83.57%, respectively.

Key words Ginkgo, Antioxidant peptide, Purification, Time of flight mass spectrometer

引言

银杏种仁(俗称白果)中蛋白质含量丰富,具有抗氧化^[1-2]、抑菌^[3-4]、抗肿瘤^[5]、抗衰老^[6]和免疫调节^[7-8]等多种功能作用。银杏种仁蛋白经过酶解可以制得活性多肽,使其抗氧化活性得到明显提高。前人对银杏抗氧化肽的研究主要集中在制备和活性的检验,并未对银杏抗氧化肽进行纯化和结构鉴定^[9-11]。

已有研究表明,多肽结构与抗氧化活性有密切关系,多肽的结构鉴定对揭示其构效关系有十分重要的意义^[12]。结构鉴定对多肽的纯度有较高要求,

因此多肽的分离纯化就显得非常重要。本研究采用 2709 碱性蛋白酶和胃蛋白酶分步水解银杏种仁蛋白制备银杏抗氧化肽。银杏抗氧化肽粗品经过 Sephadex G-25 和 Sephadex G-10 初步分离纯化,然后通过半制备型液相色谱进行纯化,得到单一的抗氧化肽组分,为进一步进行结构鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

银杏种仁蛋白,南京林业大学食品实验室制备; 2709 碱性蛋白酶,北京东华强盛生物技术有限公司;胃蛋白酶,上海源聚生物科技有限公司;二苯基

收稿日期: 2011-03-23 修回日期: 2011-04-22

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30872055)、高等学校博士点专项科研基金资助项目(200802980004)和江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(CX10B_244Z)

作者简介: 贾韶千,博士生,主要从事食品活性物质分离与纯化方面研究,E-mail: qian12358@163.com

通讯作者: 吴彩娥,教授,博士生导师,主要从事食品工程技术及食品活性物质分离纯化方面研究,E-mail: sxwucaie@163.com

苦基苯肼 (DPPH), 日本 WAKO 公司。

乙腈 (色谱纯); 三氟乙酸; 无水乙醇; 水杨酸; 双氧水。

1.2 实验仪器

LC-8A 型半制备液相色谱仪; Shim-pack PRC-ODS 型高效液相制备柱 (250 mm × 50 mm), 日本岛津公司; 高效液相色谱, 美国 Agilent 公司; 液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪, 美国 Waters 公司; TU-1800PC 型紫外可见分光光度计; 玻璃层析柱 (16 mm × 500 mm); BSZ 型自动部分收集器; QT-58A 型智能紫外检测仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 银杏抗氧化肽粗品的制备

银杏种仁蛋白由 2709 碱性蛋白酶和胃蛋白酶分步水解制得, 经冷冻干燥得到银杏抗氧化肽粗品。

1.3.2 银杏抗氧化肽的分离纯化

葡聚糖凝胶 Sephadex G-25: 将处理好的样品配制成质量浓度 50 mg/mL 的溶液, 在 Sephadex G-25 凝胶柱上进行分离纯化, 上样量为 5 mL。以去离子水为洗脱液, 洗脱流速为 0.5 mL/min, 采用自动部分收集器收集洗脱液 (3 mL/管), 用紫外检测仪在 280 nm 处检测, 收集各洗脱峰, 真空浓缩, 冷冻干燥各级洗脱组分; 以 DPPH 自由基清除率为检测指标筛选抗氧化活性最高的组分。

葡聚糖凝胶 Sephadex G-10: 对由 Sephadex G-25 分离得到的活性最高的组分进行多次收集, 冷冻干燥, 然后配制成质量浓度 50 mg/mL 的溶液, 在 Sephadex G-10 凝胶柱上进行分离纯化, 上样量为 5 mL。以去离子水为洗脱液, 洗脱流速为 0.5 mL/min, 采用自动部分收集器收集洗脱液 (3 mL/管), 用紫外检测仪在 280 nm 处检测, 收集各洗脱峰, 真空浓缩, 冷冻干燥各级洗脱组分; 以 DPPH 自由基清除率为检测指标筛选抗氧化活性最高的组分。

半制备型液相色谱: 对由 Sephadex G-10 分离得到的活性最高的组分进行多次收集, 冷冻干燥, 然后配制成质量浓度 20 mg/mL 的溶液, 采用半制备型液相色谱进行分离纯化, 上样量为 2 mL。以质量分数 10% 的乙腈和 0.1% 的 TFA 为洗脱液, 洗脱流速为 10 mL/min, 手动收集各洗脱峰, 真空浓缩, 冷冻干燥各级洗脱组分, 以 DPPH 自由基清除率为检测指标筛选抗氧化活性最高的组分。

1.3.3 银杏抗氧化肽的纯度检验

采用高效液相色谱对纯化效果进行检验。

1.3.4 银杏抗氧化肽的活性检验

采用羟自由基清除率^[13]和 DPPH 自由基清除

率^[14]对银杏抗氧化肽的活性进行鉴定。

1.3.5 银杏抗氧化肽分子量分析

采用液相色谱串联四极杆飞行时间质谱对银杏抗氧化肽的分子量进行测定。

2 结果与讨论

2.1 Sephadex G-25 分离纯化结果

银杏抗氧化肽粗品的 Sephadex G-25 分离纯化结果如图 1 所示。

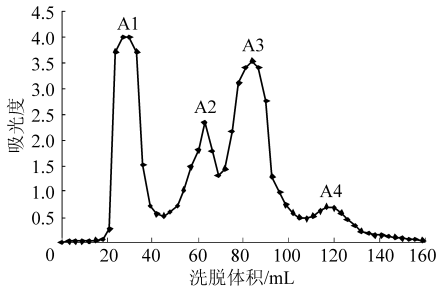


图 1 银杏抗氧化肽的 Sephadex G-25 层析洗脱图
Fig. 1 Elution profile of ginkgo antioxidant peptide on Sephadex G-25 column

从图 1 可以看出, 银杏抗氧化肽粗品经 Sephadex G-25 纯化后, 被分离成 A1、A2、A3、A4 4 个组分。Sephadex G-25 的分离范围是 1 000 ~ 5 000 Da, 组分 A1 为穿透峰, 即没有进入凝胶颗粒, 直接从凝胶的缝隙中被洗脱下来, 因此 A1 组分中以分子量为 5 000 Da 以上的成分为主; A2、A3 和 A4 3 个组分是进入到凝胶颗粒而被分离开来, 因此这 3 个组分中以分子量为 5 000 Da 以下的成分为主。将这 4 个组分分别收集, 冷冻干燥, 然后配成相同质量浓度的溶液, 分别测定 4 个组分的 DPPH 自由基清除率, 结果发现组分 A3 的 DPPH 自由基清除率最高。因此, 将组分 A3 所在的试管进行合并, 冷冻干燥, 供下一步分离纯化使用。

2.2 Sephadex G-10 分离纯化结果

银杏抗氧化肽粗品经 Sephadex G-25 纯化后的组分 A3 再经过 Sephadex G-10 进行分离纯化, 结果如图 2 所示。

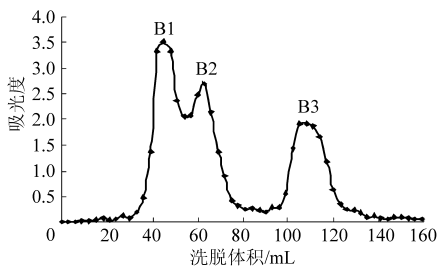


图 2 银杏抗氧化肽的 Sephadex G-10 层析洗脱图
Fig. 2 Elution profile of ginkgo antioxidant peptide on Sephadex G-10 column

从图 2 可以看出,组分 A3 经 Sephadex G - 10 纯化后,又被分离成 B1、B2、B3 3 个组分。将这 3 个组分分别收集,冷冻干燥,然后配成相同质量浓度的溶液,分别测定 3 个组分的 DPPH 自由基清除率,结果发现组分 B3 的 DPPH 自由基清除率最高。Sephadex G - 10 的分离小于 700 Da,因此,初步断定组分 B3 的分子量小于 700 Da。将组分 B3 所在的试管进行合并,冷冻干燥,供下一步分离纯化使用。

2.3 半制备型液相色谱分离纯化结果

经 Sephadex G - 10 纯化后的组分 B3 再经过半制备型液相色谱进行纯化,结果如图 3 所示。

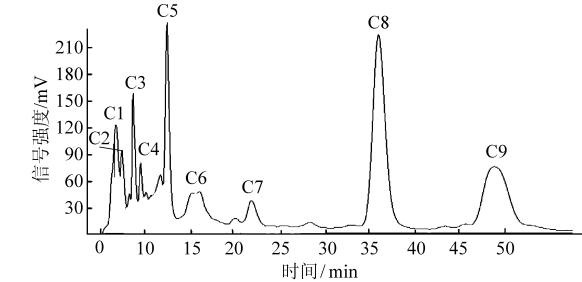


图 3 银杏抗氧化肽的半制备型液相色谱分离图谱
Fig. 3 Ginkgo antioxidant peptide separated by semi-preparing RP-HPLC

如图 3 所示,经过 Sephadex G - 10 分离纯化得到的组分 B3 经半制备型液相色谱分离后,收集得到 9 个主要组分。重复进样,多次收集各组分,冷冻干燥。将所得各组分溶于超纯水中配制成相同质量浓度的溶液,进一步测定各组分的抗氧化活性。结果发现组分 C8 的 DPPH 自由基清除率最高。

2.4 HPLC 液相色谱分析

将经过半制备型液相色谱纯化得到的组分 C8 进行纯度检验,结果见图 4。

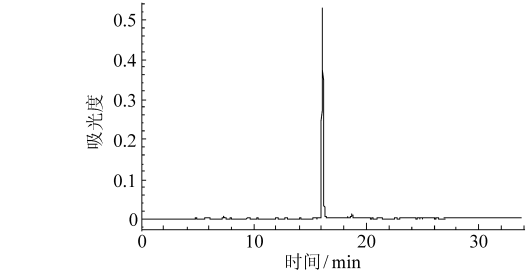


图 4 银杏抗氧化肽的 HPLC 分析图谱
Fig. 4 Analytical HPLC profiles of ginkgo antioxidant peptide

从图 4 中可以看出,组分 C8 的高分辨率 HPLC 图谱显示为单一主峰,据此可以判断组分 C8 为纯度较高的肽段,可以进行下一步结构鉴定分析。

2.5 质谱分析图

采用液相色谱串联四极杆飞行时间质谱对组分

C8 的分子量进行分析,结果见图 5。



图 5 组分 C8 的质谱图
Fig. 5 MS profile of fraction C8

图 5 中 453.209 4 的峰为组分 C8 的质子化分子($[M + H]^+$)峰,组分 C8 的实际分子量应该是 453.209 4 减去一个氢离子分子量。因此,组分 C8 的分子量约为 452.21 Da。

2.6 抗氧化性检验

组分 C8 经过重复收集,冷冻干燥,配成质量浓度 1.0 mg/mL 的溶液,进行抗氧化性试验,以相同浓度的还原型谷胱甘肽作对照,结果见表 1。

表 1 组分 C8 对羟自由基和 DPPH 自由基的清除率		
Tab.1 Scavenging rates of fraction C8 to hydroxyl radicals and DPPH radicals		
组分	羟自由基清除率	DPPH 自由基清除率
C8	80.26	83.57
GSH	80.63	82.15

从表 1 可以看出,纯化后的组分 C8 对羟自由基和 DPPH 自由基有着较强的清除作用,所以组分 C8 为高纯度的抗氧化肽。

3 结束语

采用葡聚糖凝胶 Sephadex G - 25 和 Sephadex G - 10 对酶解得到的银杏抗氧化肽粗品进行初步纯化,然后再利用半制备型液相色谱进一步分离,得到抗氧化活性较高的肽段。说明采用葡聚糖凝胶结合液相色谱法纯化银杏抗氧化肽是可行的。纯化后的银杏抗氧化肽经高效液相色谱鉴定为单一组分,采用液相色谱串联四极杆飞行时间质谱测定抗氧化肽的相对分子质量为 452.21 Da。抗氧化试验结果表明,纯化后的银杏抗氧化肽对羟自由基和 DPPH 自由基有较强清除能力,当质量浓度为 1.0 mg/mL 时,清除率分别达到了 80.26% 和 83.57%。通过本研究,得到了银杏抗氧化肽的纯化工艺,为之后的结构鉴定分析奠定了基础。同时,银杏抗氧化肽的开发为银杏产品的深加工开辟了新的途径。

参 考 文 献

- 1 黄文,谢笔钧,王益,等. 白果蛋白质的分离、纯化、理化特性及其抗氧化活性研究[J]. 中国农业科学,2004,37(10): 1 537 ~ 1 543.
Huang Wen,Xie Bijun,Wang Yi,et al. Study on separation and purification of protein from ginkgo seed and its antioxidant activity[J]. Scientia Agricultura Sinica,2004,37(10):1 537 ~ 1 543. (in Chinese)
- 2 Wen Huang,Deng Qianchun,Xie Bijun. Purification and characterization of an antioxidant protein from ginkgo biloba seeds [J]. Food Research International,2010,43(1):86 ~ 94.
- 3 牛卫宁,郭霭光. 银杏种仁中抗菌蛋白的纯化及性质[J]. 西北植物学报,2003,23(9):1 545 ~ 1 549.
Niu Weining,Guo Aiguang. Purification and characterization of an antimicrobial protein from seeds of ginkgo biloba[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2003,23(9):1 545 ~ 1 549. (in Chinese)
- 4 黄小炯,区子弁,王琴. 银杏抗菌蛋白的提取及其抗菌性研究[J]. 食品工业科技,2008,29(10):139 ~ 145.
Huang Xiaojiong,Ou Zibian,Wang Qin. Study on extract of antibacterial protein from ginkgo biloba[J]. Science and Technology of Food Industry,2008,29(10):139 ~ 145. (in Chinese)
- 5 邓乾春,黄文,谢笔钧. 白果清蛋白抑制肿瘤活性及其机制的初步研究[J]. 营养学报,2006,28(3):259 ~ 262.
Deng Qianchun,Huang Wen,Xie Bijun. The preliminary studies on anti-tumor activity of ginkgo albumin and its mechanism [J]. Acta Nutrimenta Sinica,2006,28(3):259 ~ 262. (in Chinese)
- 6 邓乾春,汪兰,吴佳,等. 一种白果清蛋白的抗衰老活性研究[J]. 中国药理学通报,2006,22(3):352 ~ 357.
Deng Qianchun,Wang Lan,Wu Jia,et al. Studies on anti-aging activity of ginkgo album in protein(GAP) [J]. Chinese Pharmacological Bulletin,2006,22(3):352 ~ 357. (in Chinese)
- 7 邓乾春,段会轲,谢笔钧,等. 白果清蛋白对免疫功能低下小鼠的调节作用[J]. 食品科学,2006,27(6):195 ~ 199.
Deng Qianchun,Duan Huike,Xie Bijun,et al. Regulating function of ginkgo albumin protein(GAP) on immunosuppressive model in mice[J]. Food Science,2006,27(6):195 ~ 199. (in Chinese)
- 8 邓乾春,唐瑛,黄文,等. 白果清蛋白的免疫调节活性研究[J]. 食品科学,2006,27(3):219 ~ 223.
Deng Qianchun,Tang Ying,Huang Wen,et al. Studies on immune regulating effect of ginkgo albumin[J]. Food Science, 2006,27(3):219 ~ 223. (in Chinese)
- 9 张焕新,臧大存,刘靖,等. 银杏肽的抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(12):27 ~ 29.
Zhang Huanxin,Zang Dacun,Liu Jing,et al. Antioxidant activity of ginkgo peptides[J]. Food Research and Development, 2008,29(12):27 ~ 29. (in Chinese)
- 10 邓乾春,陈春艳,潘雪梅,等. 白果活性蛋白的酶法水解及抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报,2005,21(11):155 ~ 159.
Deng Qianchun,Chen Chunyan,Pan Xuemei,et al. Enzymic hydrolysis of ginkgo albumin protein and its antioxidant activity [J]. Transactions of the CSAE,2005,21(11):155 ~ 159. (in Chinese)
- 11 陈西娟,王成章,陈虹霞,等. 响应曲面法研究白果蛋白的酶解工艺[J]. 安徽农业科学,2010,38(10):5 326 ~ 5 329, 5 343.
Chen Xijuan,Wang Chengzhang,Chen Hongxia,et al. Study on enzymolysis process of ginkgo protein with response surface methodology[J]. Journal of Anhui Agri. Sci.,2010,38(10):5 326 ~ 5 329,5 343. (in Chinese)
- 12 Meisel H,Bockelmann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins proeolytic activation and thropho functional properties[J]. Antonie Van Leeuwenhoek,1999,76(1 ~ 4):207 ~ 215.
- 13 Kunio Suetsuna,Hiroyuki Ukeda,Hiroto Ochi. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry,2000,11(3):128 ~ 131.
- 14 Kuochiang Hsu,Genghwang Lu,Chialing Jao. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (bacillus subtilis) [J]. Food Research International,2009,42(5 ~ 6):647 ~ 652.