

文章编号: 1674-5566(2019)02-0305-08

DOI:10.12024/jsou.20180702365

高速逆流色谱法分离制备南极磷虾虾粉抗氧化肽

李芙蓉¹, 施文正^{1,2,3}, 李 燕^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 国家淡水水产品加工技术研发分中心, 上海 201306)

摘要: 采用复合蛋白酶酶解南极磷虾得到虾粉多肽, 经超滤分离和高速逆流色谱技术进行分离纯化并检验其体外抗氧化活性。结果表明: 经超滤分离后的多肽在分子量范围为 5 ~ 10 ku 时多肽抗氧化活性最好, 当浓度为 10 mg/mL 时, 其超氧阴离子自由基清除率达到 21.28%, DPPH 自由基清除率为 86.52%, 对羟基自由基清除率为 53.49%, Fe²⁺ 螯合率为 85.35%。对分子量范围在 5 ~ 10 ku 的多肽进行高速逆流色谱分析, 采用体积比为氯仿: 丁醇: 甲醇: 水 = 4: 0.75: 3: 2 作为两相溶剂体系, 下相作固定相, 上相作流动相; 反转, 转速 900 r/min, 恒温水浴温度为 25 °C, 在流动相的流速 1.5 mL/min, 进样浓度 20 mg/mL 的条件下分离得到 5 个组分。经测定: 当浓度为 5 mg/mL 时, P3 组分清除超氧阴离子自由基的能力和 Fe²⁺ 螯合能力均显著高于其余 4 个组分, 分别为 37.18% 和 92.33%, P2 组分的 DPPH 自由基清除率最高, 为 90.33%, P5 组分的羟基自由基清除率最高, 为 70.11%。与未经 HSCCC 分离的对照组相比, 抗氧化活性均得到明显增强。

关键词: 南极磷虾; 多肽; 酶解; 高速逆流色谱; 抗氧化

中图分类号: TS 254 **文献标志码:** A

南极磷虾是围绕极地分布的无脊椎动物, 主要以最小的浮游植物为食, 是迄今为止发现的含有最高蛋白质的生物^[1], 蛋白水解产物中氨基酸种类丰富, 含有 18 种氨基酸, 包含人体所需的 8 种必需氨基酸^[2], 因此其开发和利用空间巨大。生物活性肽是指一类具有生理作用的肽类化合物, 目前具有易被人体消化吸收、促进免疫力、延缓衰老、抑制微生物生长、抗病毒、降血压、降血脂等功效, 其分子量一般在 10 ku 以下, 是目前国内外极具研究性和发展前景的功能因子^[3]。目前, 已有南极磷虾抗氧化肽的相关研究, 高颖等^[4]研究发现 3 种低氟南极磷虾多肽的抗氧化活性与选用的蛋白水解酶、氨基酸组成、分子量分布和其二级结构有关。赵敏等^[5]研究发现通过在饲料中添加南极磷虾粉可以显著提高雄鱼的抗氧化功能。王继宏等^[6]利用中性蛋白酶和胰蛋白酶酶解南极磷虾得到分子量为 5 ~ 10 ku 的活性肽具有良好的超氧阴离子自由基、DPPH 自由基以及羟基自由基清除能力。

高速逆流色谱 (High-speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) 是一种新型的液-液分配的色谱技术, 由于不采用固体支持物, 有效地避免了样品出现不可逆吸附、污染、变性失活等情况^[7]。本研究通过选用复合酶酶解南极磷虾虾粉, 经超滤分离得到不同分子量范围的多肽, 进一步采用高速逆流色谱技术进行分离纯化, 通过比较 4 个抗氧化指标综合评定具有较好抗氧化活性的组分, 为研究水产品中的生物活性成分提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料

捕捞于南极 FAO 48.2 区的南极磷虾运至实验室后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.1.2 试剂

木瓜蛋白酶(酶活为 53736U)购于上海生物工程股份有限公司, 枯草杆菌中性蛋白酶(酶活

收稿日期: 2018-07-17 修回日期: 2018-09-27

基金项目: 国家科技支撑计划(2015BAD17B02)

作者简介: 李芙蓉(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为多肽的分离纯化及生物活性。E-mail: furongfr@163.com

通信作者: 李 燕, E-mail: liyan@shou.edu.cn

为 29290U)、复合酶(酶活为 52238U)购于上海源叶生物科技有限公司,抗超氧阴离子自由基试剂盒购于南京建成生物科技研究所,超低分子量标准蛋白购于 BIO-RAD,2,2-联苯基-1-苦基胍基购于美国 Sigma 公司,L-抗坏血酸、三氯化铁、水杨酸、铁氰化钾、三氯乙酸、菲洛嗪、无水甲醇、过氧化氢均购自中国国药集团。

1.1.3 仪器与设备

真空冷冻干燥箱 CHRIST ALPHA1-2(京博励行仪器有限公司);超滤杯及超滤膜 8400(上海摩速科学器材有限公司);冷冻离心机 GL-20G-11(上海安亭科学仪器厂);酸度计 PHS-3E(深圳市优米仪器设备有限公司);紫外分光光度计 UV-2000(北京普析通用仪器有限责任公司);匀浆仪 BILON-WX08(上海比朗仪器制造有限公司);高速逆流色谱仪 TBE20A/300B(上海同田生化技术有限公司);高效液相色谱仪 Agilent 1260(安捷伦科技有限公司);反相柱 RESOURCE RPC(美国 GE)。

1.2 实验方法

1.2.1 南极磷虾粉多肽的制备

取冷冻南极磷虾于无菌采样袋中,冷水解冻后经真空冷冻干燥制得虾粉。分别选择木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和复合酶作为水解酶,在其最适温度和 pH 条件下,按料液质量体积比 1:10(g/mL)加入 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液水浴酶解 4 h,沸水浴灭酶 15 min,离心取上清液后,采用甲醛滴定法测其水解度^[8],最终选取水解度最高的酶作为实验水解酶。后将上清液经超滤分离得到分子量 <1 ku、1~3 ku、3~5 ku、5~10 ku 和 >10 ku 5 个分子量范围的多肽,经真空冷冻干燥制成南极磷虾多肽粉。

1.2.2 南极磷虾粉多肽的体外抗氧化实验

以超氧阴离子自由基清除率、羟基自由基清除率、DPPH 自由基清除率和 Fe^{2+} 螯合率为指标,评价南极磷虾粉多肽的体外抗氧化活性。超氧阴离子自由基清除率按照抗超氧阴离子试剂盒说明书进行测定(货号 A052)。DPPH 自由基清除率根据布冠好等^[9]的实验方法测定。羟基自由基清除率参照王继宏等^[6]的方法。 Fe^{2+} 螯合率的测定参照 JMO 等^[10]的方法。

1.2.3 分子量 5~10 ku 多肽的高效液相色谱检测

利用高效液相色谱技术(HPLC)对样品进行扫描,可以了解样品组分的复杂程度和极性^[11],选用 C18 反相色谱柱,在流速为 1 mL/min、最大压力为 3 000 psi、上样浓度为 4 mg/mL、上样量为 20 μ L、检测波长为 214 nm、柱温 20 $^{\circ}$ C 的条件下进行梯度洗脱。流动相 A 选用 2% 乙腈和水(含有 0.1% 三氟乙酸),流动相 B 选用 80% 乙腈和水(含有 0.1% 三氟乙酸),梯度洗脱条件见表 1。

表 1 HPLC 梯度洗脱流动相比

Tab. 1 HPLC gradient elution mobile phase ratio

时间 Time/min	流动相 A Mobile phase A/%	流动相 B Mobile phase B/%
1~10	100	0
10~25	80	20
25~40	50	50
40~50	30	70
50~60	0	100

1.2.4 溶剂体系的筛选和系统分配系数的确定

根据 HPLC 检测出的多肽极性,选择进行 HSCCC 分离的溶剂体系,并对各个体系进行分配系数(K 值)的测定。K 值是达到分配平衡时样品在两种互不相溶的溶剂中的活度(常近似为浓度)之比,采用 HPLC 进行测定^[12]。

1.2.5 HSCCC 的条件选择

固定相的保留率与分离效果有着直接的关系,因此主机转速、水浴温度和流动相流速等影响因素的参数均以固定相的保留率为指标。操作步骤:在制备型 HSCCC 上,以 20 mL/min 的流速将固定相泵满主机,再以适当的流速泵入流动相,在出口处收集固定相,当出口处有流动相流出时,表明固定相和流动相在螺旋管内达到了动态平衡。固定相的保留率为

$$W = (V_1 - V_2) / (V_1 - V_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中:W 为保留率; V_1 为主机螺旋管及管道体积, mL; V_2 为推出的流动相体积, mL; V_0 为进样环体积, mL。

1.2.6 数据处理

实验数据采用 Origin 9.1 和 SPSS 21.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 3种蛋白酶加酶量及水解度的测定

以水解度为指标来选取水解酶,意在比较水解程度与抗氧化活性之间的关系。结果表明:中性蛋白酶的最适酶添加量为 2 500 U/g,水解度达到 31.34%;木瓜蛋白酶的最适酶添加量为 2 200 U/g,水解度达到 33.26%;复合酶的最适酶添加量为 2 000 U/g,水解度达到 37.75%(图 1)。因此,复合酶在其最佳水解条件下水解度最高,即水解更充分,其次是木瓜蛋白酶和中性蛋白酶。这是因为复合酶既发挥了中性蛋白酶对肽链水解位点的无明显选择性,又发挥了木瓜蛋白酶的专一性,使得水解程度大大增加,因此采用复合酶作为实验水解用酶,加酶量为 2 000 U/g。

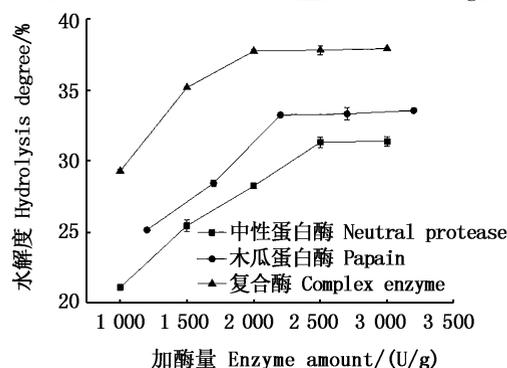


图 1 3种蛋白酶加酶量对水解度的影响

Fig. 1 Effect of the amount of three proteases added on the degree of hydrolysis

2.2 超滤分离后多肽的抗氧化能力测定

由表 2 可知,分子量小于 10 ku 时,随着分子量的增加,其对超氧阴离子、DPPH、羟基自由基清除率和 Fe^{2+} 的螯合率都随之增加。通过数据的显著性差异分析,可以得出分子量范围在 5 ~ 10 ku 的多肽抗氧化活性显著高于其余组分。当多肽浓度为 10 mg/mL 时,其超氧阴离子自由基清除率达到 21.28%,DPPH 自由基清除率为 86.52%,对羟基自由基清除率达到 53.49%, Fe^{2+} 螯合率为 85.35%。张元元等^[13]使用木瓜蛋白酶提取到南极磷虾多肽,研究结果表明分子量小于 5 ku 的多肽具有较好的抗氧化活性,且在多肽浓度为 20 mg/mL 时超氧阴离子自由基清除率为 19.62%,DPPH 自由基清除率为 74.33%,其结果均低于本研究。原因可能是选取不同蛋白酶酶解得到的多肽链不同。就目前关于多肽的研究来看,这可能是因为抗氧化作用与组氨酸有关^[14]。

2.3 分子量 5 ~ 10 ku 多肽的高效液相色谱

多肽样品的复杂程度及极性大小可以通过 HPLC 扫描有初步了解。从图 2 可以看出,在 20 min 时大部分多肽组分已经被洗脱出来,根据梯度洗脱的条件,表明这些组分是由含量小于 20% 的乙腈洗脱出来的,从而可以判断出多肽样品偏极性,因此在 HSCCC 中应采用极性或中等极性溶剂体系作进一步分离。

表 2 多肽分子量对抗氧化能力的影响

Tab. 2 Effect of molecular mass on antioxidant capacity

分子量范围 Molecular weight range	超氧阴离子自由基清除率 Superoxide anion free radical scavenging rate	DPPH 自由基清除率 DPPH free radical scavenging rate	羟基自由基清除率 Hydroxyl free radical scavenging rate	Fe^{2+} 螯合率 Fe^{2+} chelation
< 1 ku	2.97 ± 0.31 ^a	61.76 ± 0.31 ^a	20.82 ± 0.31 ^a	65.03 ± 0.12 ^a
1 ~ 3 ku	8.42 ± 0.16 ^b	68.42 ± 0.38 ^c	41.13 ± 0.81 ^c	79.56 ± 0.38 ^b
3 ~ 5 ku	13.59 ± 0.66 ^c	80.50 ± 0.10 ^d	50.91 ± 0.23 ^d	84.41 ± 0.41 ^c
5 ~ 10 ku	21.28 ± 0.27 ^e	86.52 ± 0.51 ^e	53.49 ± 0.42 ^e	85.35 ± 0.38 ^d
> 10 ku	14.98 ± 0.19 ^d	64.30 ± 0.47 ^b	30.63 ± 0.39 ^b	85.78 ± 0.21 ^d

注:同列中标有不同小写字母表示组间有显著性差异($P < 0.05$),标有相同小写字母表间无显著性差异($P > 0.05$)

Notes: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between the groups ($P < 0.05$), marking with the same lowercase letters indicating no significant difference between the groups ($P > 0.05$)

2.4 HSCCC 法分离纯化条件的选择

2.4.1 溶剂体系的选择

高速逆流色谱是一种液-液分配色谱技术,其原理是利用被分离物质的分配系数差异使物质分离。表 3 中 G1、G2、G3 为中等溶剂体系,G4、

G5、G6 为极性溶剂体系。这 6 种溶剂体系符合以下要求:上下相分层时间在 30 s 内, K 值为 0.5 ~ 2.0,适合作为 HSCCC 分离南极磷虾粉多肽的系统^[15]。对这 6 个溶剂体系进行 HSCCC 发现,含有氯仿和正丁醇的体系有利于南极磷虾

虾粉活性肽的分离,即 G6 体系有初步的分离效果,其分析型 HSCCC 的图谱如图 3 所示,结果显示 G6 体系已有分离趋势,因此调整 G6 体系中丁醇的用量,最终确定溶剂体系体积比为氯仿:正丁醇:甲醇:水=4:0.75:3:2(G7),色谱条件:进样量 5 mg,下相做固定相,上相做流动相,反转,转速为 1 700 r/min,流动相流速为 0.5 mL/min,214 nm 下进行洗脱。根据图 4 可以看出,G7 体系下的色谱图分离趋势比较明显,可以标注出 5 个组分,记为 P1、P2、P3、P4、P5。后经 HPLC 测定溶剂体系的 K 值见表 3。

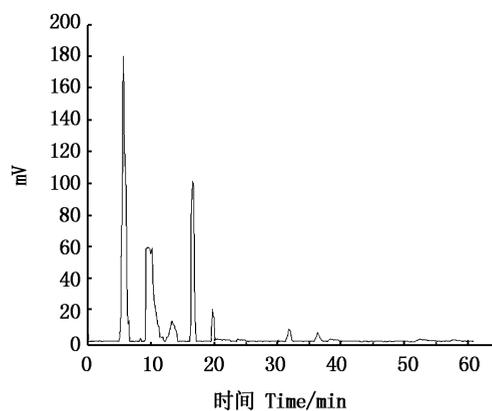


图 2 分子量范围 5~10 ku 多肽的高效液相色谱图
Fig. 2 High performance liquid chromatogram of molecular mass range 5-10 ku polypeptide

表 3 溶剂系统的筛选及 K 值测定

Tab. 3 Screening of solvent system and determination of K value

编号 Number	溶剂系统 Solvent system	体积比 Volume ratio	分层时间 Stratification time/s	K 值 K value
G1	正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水	1:1:1:1	13.55	0.689
G2	甲基叔丁基醚-乙腈-水	2:2:3	18.88	0.842
G3	氯仿-甲醇-水	4:3:2	22.76	0.864
G4	醋酸乙酯-丁醇-甲醇-水	4:1:0.5:6	26.66	0.998
G5	醋酸乙酯-丁醇-水	4:1:5	28.33	1.112
G6	氯仿-丁醇-甲醇-水	4:0.5:3:2	23.12	1.223
G7	氯仿-丁醇-甲醇-水	4:0.75:3:2	26.39	1.432

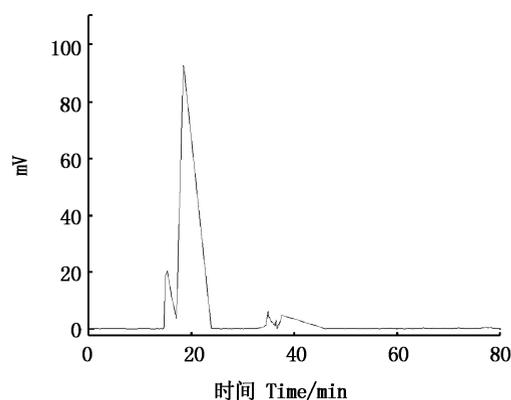


图 3 G6 体系下分子量 5~10 ku 多肽的分析型 HSCCC 图

Fig. 3 Analytical HSCCC map of molecular mass 5-10 ku polypeptide under G6 system

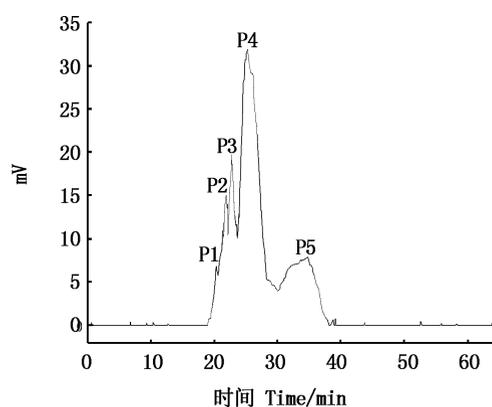


图 4 G7 体系下分子量 5~10 ku 多肽的分析型 HSCCC 图

Fig. 4 Analytical HSCCC map of molecular mass 5-10 ku polypeptide under G7 system

2.4.2 主机转速对固定相保留率的影响

在使用 HSCCC 分离样品的过程中,应选择合适的转速以提高其固定相的保留率。由图 5 可知:当转速小于 900 r/min 时,随着转速的增加固定相保留率也随之增加。这是因为随着转速的增加,螺旋柱在做行星运动时产生的离心力增加,使得流动相与固定相能在螺旋管内得到较好的分配,从而提高固定相的保留率。当转速高于 950 r/min 时,固定相的保留率开始下降。其原因是两相体系在螺旋管内剧烈混合产生了溶剂乳化的现象,造成固定相的流失^[16]。因此,在本体系中最终采用 900 r/min 的主机转速进行实验。

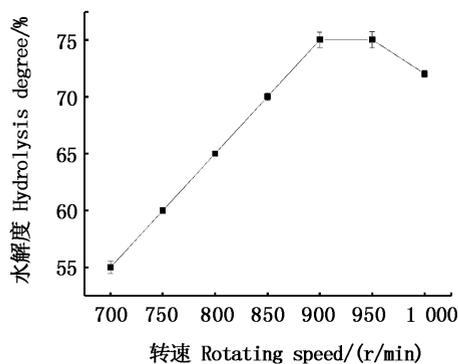


图 5 主机转速对固定相保留率的影响
Fig. 5 Effect of host speed on stationary phase retention

2.4.3 水浴温度对固定相保留率的影响

从图 6 可以看出,当恒温水浴的温度小于 25 °C 时,固定相的保留率随着温度的升高而升高。这是由于温度升高后,使得两相溶剂系统的分层时间缩短,减小了溶液的传质阻力而实现固定相保留率的提高。当温度达到 25 °C 时,其保留率达到最大。当温度高于 25 °C 后,随着温度的升高固定相的保留率开始下降。这是因为温度升高使得体系的黏度发生变化,同时温度较高时螺旋管在高速旋转时会产生较强的摩擦热,从而对固定相的保留率及设备都产生影响^[17]。因此,最终采用 25 °C 的恒温水浴温度。

2.4.4 流动相流速对固定相保留率的影响

流动相流速的大小会影响到 HSCCC 螺旋管内上相和下相的平衡体系,从而关系到固定相保留率的大小。一般来讲,流动相的流速与固定相的保留率成反比。由图 7 可以看出,流速越小时

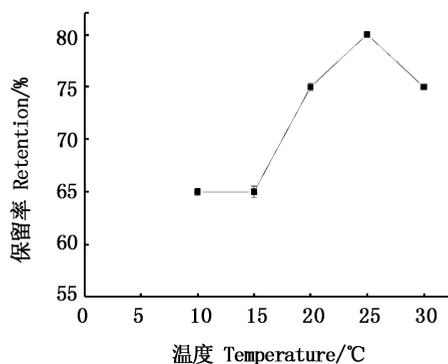


图 6 水浴温度对固定相保留率的影响
Fig. 6 Effect of water bath temperature on retention of stationary phase

固定相保留率越低。流速过大会导致固定相的流失,而流速过小会使得分离时间过长,从而降低其分离效率。综合考虑本研究中流速选择为 1.5 mL/min,此时固定相的保留率为 80%。

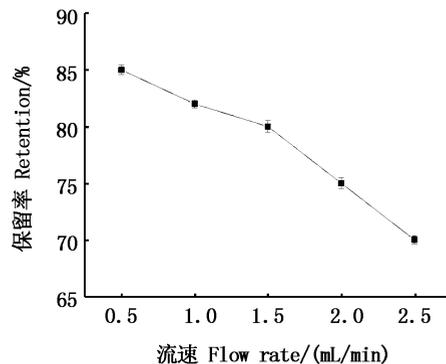


图 7 流动相流速对固定相保留率的影响
Fig. 7 Effect of mobile phase flow rate on stationary phase retention

2.4.5 上样浓度对分离效果的影响

样品溶解液的加入会改变两相之间的动态平衡,使得固定相有一定的流失,因此适宜的加样浓度在分离中也有很大影响。本研究用流动相溶剂配置质量浓度分别为 5、10、20 和 30 mg/mL 的样品溶液,在上述最佳条件下,即主机转速为 900 r/min、恒温水浴温度为 25 °C、流动相的流速为 1.5 mL/min 时进样,进样量为 5 mL。比较得出当样品的质量浓度为 20 mg/mL 时,样品既具有较高的保留率,又能实现样品组分的分离,分离图谱见图 8,结果显示该实验体系在合适的时间内达到较好的分离,因此选用最佳的进样质量浓度是 20 mg/mL。

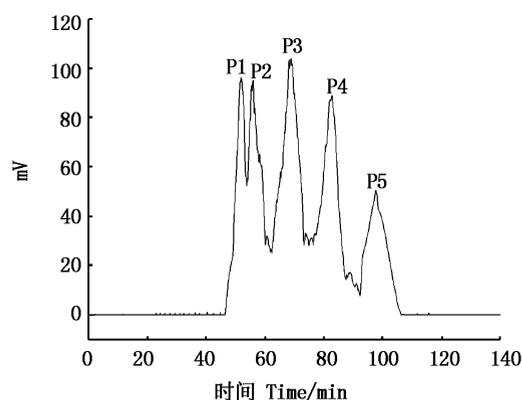


图8 G7体系下分子量5~10 ku多肽的制备型HSCCC图谱

Fig.8 Preparative HSCCC map of molecular mass 5-10 ku polypeptide under G7 system

2.5 HSCCC分离后所得多肽的体外抗氧化实验

HSCCC的出峰顺序与被分离物质的 K 值有关,分配系数小的先被洗脱出来,分配系数大的后被洗脱下来,即P1~P5组分在该体系中 K 值是依次增大的。将经HSCCC分离收集到的5个

组分进行体外抗氧化实验,各多肽组分的质量浓度均为5 mg/mL,结果见表4。结果表明:P3组分清除超氧阴离子自由基的能力和 Fe^{2+} 螯合能力均显著高于其余4个组分($P < 0.05$),分别为37.18%和92.33%;P2组分的DPPH自由基清除率最高,为90.33%;P5组分的羟基自由基清除率最高,为70.11%。与未经HSCCC分离的对照组相比,抗氧化活性均得到明显增强。在相同多肽浓度下,王继宏^[18]对南极磷虾肽进行HSCCC分离纯化得到7个多肽组分,经抗氧化研究表明,其清除羟基、DPPH自由基和超氧阴离子自由基能力最高为61.35%、27.43%和70.98%。对比本研究得到的P5组分的多肽,其羟基自由基清除率比王继宏^[18]的研究结果高出14.28%,DPPH自由基清除率高出2.21倍,这可能是木瓜蛋白酶属巯基蛋白酶,可水解多肽中精氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸的羧基端,并能优先水解芳香L-氨基酸的肽键。相关研究^[19]表明,具有芳香族氨基酸残基的多肽有较好的抗氧化效果。

表4 HSCCC分离后多肽的抗氧化活性

Tab.4 Antioxidant activity of peptides after separation by HSCCC

%

组别 Groups	超氧阴离子自由基清除率 Superoxide anion free radical scavenging rate	DPPH自由基清除率 DPPH free radical scavenging rate	羟基自由基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate	Fe^{2+} 螯合率 Fe^{2+} chelation rate
P1	3.42 ± 0.22 ^a	33.12 ± 0.87 ^b	18.12 ± 0.16 ^a	31.22 ± 0.32 ^a
P2	9.22 ± 0.20 ^b	90.33 ± 0.67 ^c	60.95 ± 0.24 ^d	44.86 ± 0.30 ^c
P3	37.18 ± 0.50 ^e	60.53 ± 0.48 ^c	40.11 ± 0.71 ^c	92.33 ± 0.71 ^e
P4	11.52 ± 0.69 ^c	31.22 ± 0.47 ^a	20.06 ± 0.35 ^b	42.19 ± 0.26 ^b
P5	17.18 ± 0.24 ^d	88.19 ± 0.42 ^d	70.11 ± 1.21 ^e	88.15 ± 0.51 ^d

注:同列中标有不同小写字母表示组间有显著性差异($P < 0.05$),标有相同小写字母间无显著性差异($P > 0.05$)

Notes: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between the groups ($P < 0.05$), marking with the same lowercase letters indicating no significant difference between the groups ($P > 0.05$)

3 结论

选取综合抗氧化性能最好的多肽进行HSCCC分离并将分离得到的组分进行同样的抗氧化性能比较,从而确定抗氧化性能最好的组分。本研究以水解度为评价指标,比较了中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和复合酶的水解效果,最终采用复合酶酶解南极磷虾粉。酶解工艺:加酶量2 000 U/g,料液比1:10,酶解温度50 °C, pH 7.5,酶解时间4 h,该条件下南极磷虾粉蛋白水解度为37.75%。然后将经超滤分离后的多肽进行

抗氧化试验。研究表明:复合酶酶解法制备的生物活性肽具有一定的清除超氧阴离子、DPPH自由基、羟基自由基、螯合 Fe^{2+} 的能力,其中以分子量在5~10 ku的多肽抗氧化活性最好。

采用HSCCC对超滤得到的分子量5~10 ku多肽进一步分离纯化,得到了抗氧化效果更好的南极磷虾多肽。其溶剂体系体积比为氯仿:丁醇:甲醇:水=4:0.75:3:2,主机反转,转速900 r/min、恒温水浴温度25 °C、流动相的流速1.5 mL/min,进样浓度20 mg/mL。在该体系下分离共得到5个组分,经测定:当浓度为5 mg/mL时,P3组

分清除超氧阴离子自由基的能力和 Fe^{2+} 螯合能力均显著高于其余 4 个组分,分别为 37.18% 和 92.33%; P2 组分的 DPPH 自由基清除率为 90.33%; P5 组分的羟基自由基清除率为 70.11%。与未经 HSCCC 分离的对照组相比,抗氧化活性均得到明显增强。本实验为南极磷虾肽的分离纯化寻找新的方法并提供理论基础,同时为抗氧化南极磷虾肽产品的开发利用奠定基础。为更好地了解抗氧化能力与多肽结构的关系,后期拟进一步对 P2、P3 和 P5 组分进行氨基酸的组成和排序分析。

参考文献:

- [1] 曾晓波,王海英,林永成. 食物中的生物活性肽: 生物活性及研究进展[J]. 食品工业科技, 2004, 25(4): 151-155.
ZENG X P, WANG H Y, LIN Y C. The bioactivity and its research on bioactive peptide in food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 25(4): 151-155.
- [2] 林琳,李八方. 鲑鱼皮胶原蛋白水解肽抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(4): 48-51.
LIN L, LI B F. Studies on the antioxidation activity of squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin hydrolysate [J]. Chinese Journal of Marine Medicine, 2006, 25(4): 48-51
- [3] WANG Y C, WANG S S, WANG J F, et al. Preparation and anti-osteoporotic activities in vivo of phosphorylated peptides from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. Peptides, 2015, 68: 239-245.
- [4] 高颖,王彦超,常耀光,等. 三种低氟南极磷虾肽的 ACE 抑制作用及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 82-87.
GAO Y, WANG Y C, CHANG Y G, et al. ACE inhibition and antioxidant activities of three types of Antarctic krill (*Euphausia superba*) peptides with low fluorine content[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 82-87.
- [5] 赵敏,梁萌青,郑珂珂,等. 饲料中添加南极磷虾粉对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 雄性亲鱼繁殖性能及抗氧化功能的影响[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 49-55.
ZHAO M, LIANG M Q, ZHENG K K, et al. Effects of dietary antarctic krill on the reproductive performance and antioxidant function in male broodstock tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(6): 49-55.
- [6] 王继宏,汪之和,田鑫,等. 南极磷虾抗氧化多肽制备的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 109-112.
WANG J H, WANG Z H, TIAN X, et al. Preparation of Antarctic krill peptides with anti-oxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(3): 109-112.
- [7] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 11-13.
CAO X L. High-speed countercurrent chromatography separation technology and its application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 11-13.
- [8] 刘丽红,雷清华. 茚三酮比色法与甲醛滴定法测定棉籽粕蛋白水解度的比较[J]. 化学工程与装备, 2012(11): 160-163.
LIU L H, LEI Q H. Comparison of ninhydrin colorimetry and formaldehyde titration in determination of cottonseed protein hydrolytic degree [J]. Chemical Engineering & Equipment, 2012(11): 160-163.
- [9] 布冠好,杨国宇,李宏基. 肌肽对肉品体系中脂类氧化的抑制作用[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2011, 32(4): 44-48.
BU G H, YANG G Y, LI H J. Inhibition effects of carnosine on lipid peroxidation in meat product system [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2011, 32(4): 44-48.
- [10] FERNANDES J M O, SMITH V J. A novel antimicrobial function for a ribosomal peptide from rainbow trout skin [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 296(1): 167-71.
- [11] 邹晓莉,黎源倩,曾红燕,等. 反相高效液相色谱法测定人肌腱中的胶原蛋白[J]. 色谱, 2006, 24(3): 263-266.
ZOU X L, LI Y Q, ZENG H Y, et al. Determination of collagen in tendon by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(3): 263-266.
- [12] 胡菊华,冷欣夫. 反相高效液相色谱法测定某些有机化合物的分配系数[J]. 色谱, 1992, 10(6): 344-346.
HU J H, LENG X F. Determination of partition coefficients for some pesticides by using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Chinese Journal of Chromatography, 1992, 10(6): 344-346.
- [13] 张元元,汪之和,陈敏,等. 南极磷虾肽制备工艺优化及体外抗氧化研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(5): 786-793.
ZHANG Y Y, WANG Z H, CHEN M, et al. Technology optimization of the peptide preparation for *Euphausia superba* and study on the antioxidant activity in vitro [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(5): 786-793.
- [14] WU H C, CHEN H M, SHIAN C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003, 36(9/10): 949-957.
- [15] 程杰,符晓晖,王维娜. 高速逆流色谱在中药分离中溶剂体系的筛选[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1272-1275.
CHENG J, FU X H, WANG W N. Screening of solvent system in Chinese medicine separation by high speed

- countercurrent chromatography[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2008, 39(8): 1272-1275.
- [16] 沈莲清, 许明峰. 高速逆流色谱分离芝麻菜种子中的硫代葡萄糖苷[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(6): 13-16.
- SHEN L Q, XU M F. Separation of glucosinolate from erucasative seed by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(6): 13-16.
- [17] 陆丽利. 黄酒中活性肽的分离纯化的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- LU L L. Preparation and purification of peptides with ACE inhibitory activity from rice wine[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011.
- [18] 王继宏. 南极磷虾抗氧化肽制备和纯化的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- WANG J H. Preparation and purification of antarctic krill peptides with anti-oxidant activity[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [19] 农珍妮, 赵钟兴, 韦藤幼, 等. 具有 DPPH 自由基抑制活性的蚕蛹蛋白酶解液脱色工艺优化[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 12-18.
- NONG Z N, ZHAO Z X, WEI T Y, et al. Decolorization of silkworm pupae protein hydrolyzate with DPPH radical scavenging activity[J]. Food Science, 2015, 36(2): 12-18.

Separation and preparation of *Euphausia superba* antioxidant peptides by high speed countercurrent chromatography

LI Furong¹, SHI Wenzheng^{1,2,3}, LI Yan^{1,2,3}

(1. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Engineering Research Center for Processing and Storage of Shanghai Seawater Products, Shanghai 201306, China; 3. National Freshwater Aquatic Products Processing Technology R&D Center, Shanghai 201306, China)

Abstract: The compound peptide was used to digest the *Euphausia superba* to obtain the shrimp powder polypeptide, which was separated and purified by ultrafiltration separation and high-speed countercurrent chromatography to test its antioxidant activity *in vitro*. The results showed that the peptides isolated by ultrafiltration had the best antioxidant activity when the molecular weight ranged from 5 to 10 ku. When the concentration was 10 mg/mL, the superoxide anion radical scavenging rate reached 21.28%, and the DPPH free radical scavenging rate was 86.52%, the hydroxyl radical scavenging rate was 53.49%, and the Fe²⁺ chelation rate was 85.35%. High-speed countercurrent chromatography was carried out on peptides with a molecular weight ranging from 5 to 10 ku, using chloroform-butanol-methanol-water = 4:0.75:3:2 as the two-phase solvent system, the lower phase as the stationary phase and the upper phase as the mobile phase; As for inversion, the speed was 900 r/min, the constant temperature water bath temperature was 25 °C, the flow rate of the mobile phase was 1.5 mL/min, and the five components were separated under the injection concentration of 20 mg/mL. It was determined that when the concentration was 5 mg/mL, the ability of P3 component to scavenge superoxide anion radicals and Fe²⁺ chelation ability were significantly higher than the other four components, which were 37.18% and 92.33%, respectively. The free radical scavenging rate of P2 was the highest, which was 90.33%, and the P5 component had the highest hydroxyl radical scavenging rate of 70.11%. Antioxidant activity was significantly enhanced compared to the control group not isolated by HSCCC.

Key words: *Euphausia superba*; peptide; enzymatic hydrolysis; high-speed countercurrent chromatography; antioxidant