

引用格式:杜博玮,徐晓冰,郭尚伟,等.高抗氧化性小分子阿胶的研究[J].北京化工大学学报(自然科学版),2019,46(6):15-20.

DU BoWei, XU XiaoBing, GUO ShangWei, et al. Preparation of a high-antioxidant hydrolysate from *Colla Corii Asini*[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2019, 46(6): 15-20.

高抗氧化性小分子阿胶的研究

杜博玮 徐晓冰 郭尚伟 黄雅钦*

(北京化工大学 材料科学与工程学院, 北京 100029)

摘要:用碱性蛋白酶对阿胶进行酶解,并采用超滤技术分离制备了平均分子量小于1 kDa的小分子阿胶(CCAH-II)。通过多种抗氧化评价方法分析发现制备的CCAII具有较高的抗氧化活性,质量浓度2 mg/mL的CCAII对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、2,2-联氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基和羟基自由基的清除率分别可以达到 $(53.79 \pm 1.18)\%$ 、 $(70.53 \pm 0.65)\%$ 、 $(80.00 \pm 0.45)\%$ 。通过氨基酸组成和圆二色谱分析,发现CCAII中疏水性氨基酸的摩尔分数高达42.40%, β -转角和无规卷曲结构的摩尔分数分别为30.4%、46.8%;推测高占比的疏水性氨基酸、 β -转角和无规卷曲结构与小分子阿胶的高抗氧化性密切相关。

关键词: 阿胶; 水解物; 酶解; 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2019.06.003

引言

随着科学技术的飞速发展和人们生活水平的不断提高,健康科学领域相关的研究逐渐成为热点。人们期待理解不可逆的衰老过程,揭示其中涉及到的科学规律,这给科学家们带来了巨大的挑战。研究发现,体内的自由基可与脱氧核糖核酸(DNA)和蛋白酶反应,夺取电子并破坏其原有的分子结构。DNA的变性和蛋白酶的失活会引起膜损伤,导致细胞、组织和器官功能下降,最终引发一系列的慢性疾病,并加速生命体衰老过程的进行^[1]。抗氧化剂可以优先与自由基结合或诱导细胞表达更多的抗氧化酶,达到减少氧化损伤的目的^[2]。因此,关于清除自由基的抗氧化机理与高效抗氧化剂的研究开发吸引了众多研究者的关注。人们开发了多种有效的抗氧化剂,主要包括人工合成抗氧化剂和天然抗氧化剂。其中天然抗氧化剂的高安全性和高效性引起了食品科学领域研究人员的高度重视,特别是天然多

肽,因其具有丰富的功能性官能团,展示出高的生物活性,从而表现出巨大的开发潜力^[3]。多种抗氧化肽,特别是以动物结缔组织中的胶原为原料经可控降解得到的多肽被相继开发出来^[4-5]。以胶原的适度降解产物明胶为原料,通过设计筛选不同种类的酶和催化方式,可以制备得到具有高抗氧化性的胶原肽。该类胶原肽不但可以保护细胞免受氧化损伤,而且比许多其他蛋白质来源的抗氧化肽更能有效地抑制脂质过氧化^[6]。已有很多动物的胶原被用于制备抗氧化性多肽,包括猪、牛和鱼等^[7-8]。

阿胶是驴皮经煎煮、浓缩制成的固体胶^[9],是我国传统名贵中药材,距今已有3 000多年的历史,被李时珍誉为“补血圣药”。现代研究证明,阿胶在抗疲劳^[10]、增强免疫力^[11]、美容养颜^[12]、抗衰老^[13]等方面具有良好的效果,另外还能抑制肿瘤的生长,在肿瘤放/化疗过程中具有协同增效的作用^[14]。目前的研究表明,阿胶的疗效功能一定程度上与其具有良好的抗自由基能力密切相关^[15-18],为此,有必要对阿胶及其降解产物的抗氧化性进行系统的研究。

阿胶主要成分为蛋白多肽^[19-20],其中也包含了可以形成凝胶的驴皮胶原蛋白肽。开发制备具有高抗氧化活性的小分子阿胶具有重要的实际意义^[21]。本文以阿胶为原料,通过酶解与分离,最终制备出具

收稿日期: 2019-04-19

基金项目: 中央高校基本科研业务费(PYBZ1805)

第一作者: 男,1992年生,硕士生

*通信联系人

E-mail: huangyq@mail.buct.edu.cn

有高抗氧化活性的小分子阿胶,为阿胶的深加工及其质量控制以及功效研究提供依据。

1 实验部分

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 试剂与材料

1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2, 2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、邻苯三酚、三吡啶基三嗪、谷胱甘肽,均为生化试剂,上海源叶生物科技有限公司;四水酒石酸钾钠、硫酸铜、三氟乙酸、三氯化铁、过硫酸钾、硫酸亚铁、过氧化氢、盐酸、氢氧化钠,均为分析纯,北京化工厂。

碱性蛋白酶,北京生物医用材料实验室提供;阿胶,东阿阿胶股份有限公司提供。

1.1.2 实验仪器

Spectra Max M2e 型酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;Vivaflow 50 超滤系统,德国赛多利斯公司;L-8900 型氨基酸分析仪,日立高新技术公司;Chirascan 型圆二色谱仪,英国 Applied Photophysics 公司;Waters1515 型凝胶渗透色谱仪,美国 Waters 公司;JES-FA200 型电子顺磁共振波谱仪,日本电子株式会社;MS 104S 型分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;LGJ-12 型冷冻干燥机,北京机源华兴科技发展有限公司;TU-1810 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;KDN-08C 型凯氏定氮仪,上海洪记仪器设备有限公司;HC-3516 型离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;PHS-3C 型 pH 计,上海精科电子有限公司;HH-4 型数显恒温水浴锅,金坛市宏科仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 小分子阿胶的制备

将阿胶溶解后配制成质量分数 5% 的阿胶溶液, pH 调至 8.2, 加酶量 5 200 U/g, 40 °C 恒温酶解 120 min, 然后沸水浴 10 min 灭活, 采用超滤技术对阿胶酶解物进行分离纯化, 冷冻干燥后使用。其中没有超滤的阿胶多肽记为 CCAH, 经 3 kDa 超滤膜分离后分子量大于 3 kDa 的部分记为 CCAH-I, 分子量小于 3 kDa 的部分为小分子阿胶, 记为 CCAH-II。

1.2.2 DPPH 自由基清除能力的测定

将 100 μ L DPPH 乙醇溶液 (0.2 mmol/L) 和 100 μ L 样品溶液混合, 室温避光放置 1 h 后在 517 nm 处测其吸光度值 (A_1)^[22]。测量时设空白对

照和阴性对照, 其中空白对照的吸光度 (A_0) 测定前用 100 μ L 乙醇溶液替代 100 μ L DPPH 乙醇溶液 (0.2 mmol/L); 阴性对照的吸光度 (A_2) 测定前用 100 μ L 蒸馏水替代 100 μ L 样品溶液。DPPH 自由基清除率 S_1 通过式 (1) 计算。

$$S_1 = [A_2 - (A_1 - A_0)] / A_2 \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 ABTS 自由基清除能力的测定

将 7 mmol/L 的 ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 的 $K_2S_2O_8$ 溶液按照体积比 1:1 混合, 室温下避光放置 12 ~ 16 h, 用 PBS 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释至 734 nm 下的吸光值为 0.68 ~ 0.72, 作为 ABTS 自由基溶液。取 190 μ L ABTS 自由基溶液于 96 孔板中, 预热至 37 °C, 加入 10 μ L 样品溶液, 37 °C 下反应 15 min, 734 nm 下测其吸光度 ($A_{\text{样品}}$)^[23]。测量时设空白对照和阴性对照, 其中空白对照的吸光度 ($A_{\text{空白}}$) 测定前用 190 μ L PBS 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 替代 190 μ L ABTS 自由基溶液; 阴性对照的吸光度 ($A_{\text{阴性}}$) 测定前用 10 μ L 蒸馏水替代 10 μ L 样品溶液。ABTS 自由基清除率 S_2 通过式 (2) 计算。

$$S_2 = (A_{\text{阴性}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}})) / A_{\text{阴性}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 羟基自由基清除能力的测定

在 96 孔板中依次加入 40 μ L 1, 10-菲咯啉 (1.865 mmol/L)、80 μ L 样品溶液、40 μ L $FeSO_4$ (1.865 mmol) 溶液、40 μ L H_2O_2 溶液 (体积分数 0.03%), 37 °C 下反应 60 min, 536 nm 下测吸光度值 (A_1)^[24]。测量时设空白对照和阴性对照, 其中空白对照的吸光度 (A_b) 测定前用 40 μ L 蒸馏水替代 40 μ L H_2O_2 溶液 (体积分数 0.03%); 阴性对照的吸光度 (A_n) 测定前用 80 μ L 蒸馏水替代 80 μ L 样品溶液。羟基自由基清除率 S_3 通过式 (3) 计算。

$$S_3 = (A_1 - A_n) / (A_b - A_n) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.5 圆二色谱 (circular dichroism, CD) 分析

用水配制成质量浓度 0.1 mg/mL 的样品溶液, 利用圆二色谱仪进行扫描, 扫描波长 180 ~ 260 nm, 扫描速率 100 nm/min。每个样品重复扫描 3 次。

1.2.6 分子量分布测定

参照《QB2732—2005 水解胶原蛋白》中相对分子质量的凝胶层析法进行测定。将检测样品用蒸馏水配成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液, 对溶液用微孔膜 (0.22 μ m) 进行过滤, 注射器摄取 50 μ L 样品液, 注射到凝胶渗透色谱仪中进行分子量分布测定, 每个样品重复进样 3 次。利用液相系统中的 GPC 数据处理软件, 根据计算出的标准曲线通过面积归一

化法算出不同分子量区间的分布分数。

1.2.7 氨基酸组成分析

参照《GB/T 5009.124—2003 食品中氨基酸的测定》对样品中 17 种氨基酸(色氨酸除外)进行组成分析。取一定量待测样品,在 6 mol/L 的 HCl 中水解 24 h,水解温度设定为 110 ℃。水解完全后,使用氨基酸分析仪测量样品中的氨基酸种类及其组成含量。

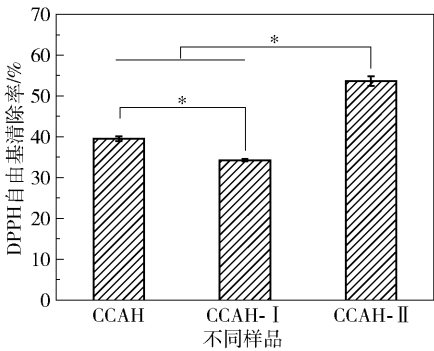
1.2.8 数据分析

实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件的单因素方差分析(one-way ANOVA)处理,以平均值 ± 标准偏差形式表示,显著性分析采用 Tukey 法比较, $p < 0.05$ 表示具有显著差异。

2 结果与讨论

2.1 DPPH 自由基清除能力

图 1 为阿胶酶解多肽中各组分对 DPPH 自由基的清除能力。在阿胶多肽 CCAH、超滤组分 CCAH-I 和 CCAH-II 质量浓度均为 2 mg/mL 时,DPPH 清除率分别为 $(39.60 \pm 0.50)\%$ 、 $(34.41 \pm 0.20)\%$ 和 $(53.79 \pm 1.18)\%$ 。CCAH-I 的 DPPH 清除率比 CCAH 低($p < 0.05$),说明分子量的改变对阿胶多肽的 DPPH 自由基清除能力影响显著,小分子量的多肽清除能力强。



* 表示数据间差异显著($p < 0.05$)。

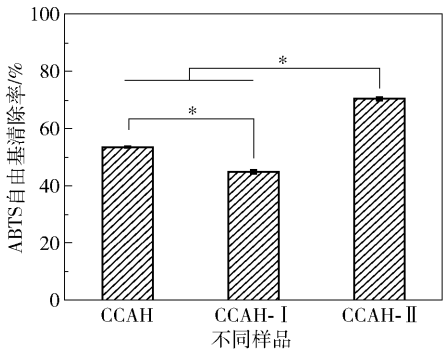
图 1 阿胶酶解多肽中各组分对 DPPH 自由基清除能力比较

Fig. 1 DPPH radical scavenging activity of each component in *Colla Corii Asini* hydrolysate

2.2 ABTS 自由基清除能力

不同分子量组分对 ABTS 自由基的清除能力表现出与 DPPH 自由基相似的趋势,CCAH-II 对 ABTS 自由基的清除率为 $(70.53 \pm 0.65)\%$,CCAH-I 对 ABTS 自由基的清除率为 $(44.92 \pm 0.68)\%$,显著小

于 CCAH-II ($p < 0.05$)。



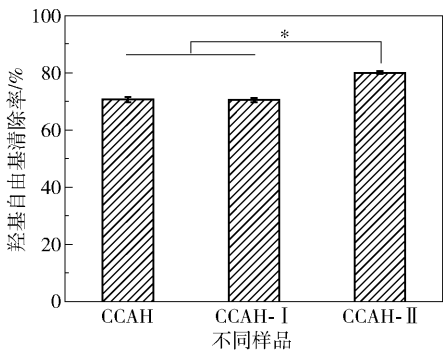
* 表示数据间差异显著($p < 0.05$)。

图 2 阿胶酶解多肽中各组分对 ABTS 自由基清除能力比较

Fig. 2 ABTS radical scavenging activity of each component in *Colla Corii Asini* hydrolysate

2.3 羟基自由基清除能力

图 3 为阿胶酶解多肽中各组分对羟基自由基清除能力比较。由图可知,阿胶多肽与分子量大于 3 kDa 的超滤组分对羟基自由基的清除能力基本相同($p > 0.05$),而分子量小于 3 kDa 的超滤组分 CCAH-II 表现出较强的羟基自由基清除能力($p < 0.05$)。



* 表示数据间差异显著($p < 0.05$)。

图 3 阿胶酶解多肽中各组分对羟基自由基清除能力比较

Fig. 3 OH radical scavenging activity of each component in *Colla Corii Asini* hydrolysate

谷胱甘肽是组织中的一种抗氧化性能很强的三肽化合物,能够保持细胞内氧化还原平衡,具有极强的生物学功能^[25],并被作为一种抗氧化剂的阳性对照。如表 1 所示,与谷胱甘肽的半抑制浓度(IC_{50})值相比,CCAH-II 清除羟基自由基的能力较强, IC_{50} 大约为谷胱甘肽的 1/2 左右。CCAH-II 不仅与人体生物相容性高、安全、易吸收,而且抗氧化能力强,具

有良好的应用价值。

表1 CCAH-Ⅱ与谷胱甘肽的抗氧化性对比
Table 1 Comparison of the antioxidant activities of CCAH-Ⅱ and glutathione

酶解产物	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)		
	DPPH	ABTS	OH
CCAH-Ⅱ	1.753	1.256	0.932
谷胱甘肽	0.123	0.110	1.933

2.4 圆二色谱分析结果

远紫外区域的 CD 吸收可测定蛋白质或多肽的二级结构,CD 图的形状与多肽中 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲结构的含量有直接关系。因此,在一定波长范围内,多肽的碳链骨架结构包括 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲的变化可通过多肽 CD 吸收的变化反映出来。

CCAH 和 CCAH-Ⅱ的 CD 谱图如图 4 所示,CCAH 和 CCAH-Ⅱ在 180~220 nm 均产生负带。通过计算可知,CCAH-Ⅱ的 α-螺旋、β-折叠结构所占的摩尔分数分别为 6.7%、14.3%,比 CCAH 少 1.9%、7.9%;而 β-转角、无规卷曲结构的占比分别为 30.4%、46.8%,比 CCAH 多 4.9%、3.8%。推测该转换可使多肽的二级结构暴露或增多其活性位点,从而增强了抗氧化活性。

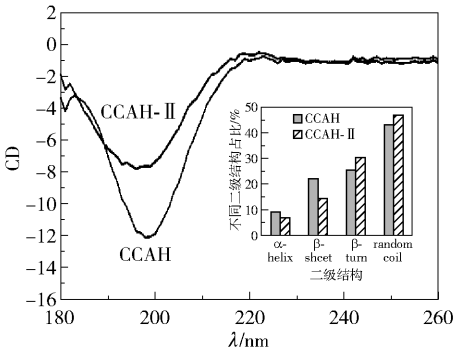


图4 阿胶酶解多肽的 CD 图及其二级构象含量分析
Fig. 4 CD spectra and plot of the proportions of α-helix, β-sheet, β-turn and random coil moieties

2.5 氨基酸组成及其分子量分布

抗氧化性能除了与肽的二级结构有关外,还与其氨基酸组成及分子量分布相关^[8],因此本文测定了各组分中氨基酸的组成及其分子量分布。

由表 2 可以看出,CCAH-Ⅱ中总疏水性氨基酸摩尔分数最高,为 42.40%,其中亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸和脯氨酸含量明

显比其他组分高。通过分子量测定,CCAH-Ⅱ的平均分子量在 1 000 Da 以下,其中相对分子量 400~1 000 Da 的组分占比 84.85%,可推测其主要为 4~7 个氨基酸组成的寡肽。

表2 阿胶酶解多肽中各组分的氨基酸相对组成
Table 2 The amino acid compositions of each component in Colla Corii Asini hydrolysate

氨基酸	摩尔分数/%		
	CCAH	CCAH-Ⅰ	CCAH-Ⅱ
天冬氨酸(Asp)	6.40	7.10	6.50
苏氨酸(Thr)	2.23	2.52	1.98
丝氨酸(Ser)	4.04	4.69	3.12
谷氨酸(Glu)	12.15	12.15	11.45
甘氨酸(Gly)	24.49	24.68	24.87
丙氨酸(Ala)*	10.39	10.02	10.41
半胱氨酸(Cys)	0.73	0.67	0.63
缬氨酸(Val)*	3.14	2.54	2.97
蛋氨酸(Met)*	1.01	0.85	0.99
异亮氨酸(Ile)*	1.74	1.73	2.19
亮氨酸(Leu)*	3.77	3.65	4.01
酪氨酸(Tyr)	1.31	1.15	1.41
苯丙氨酸(Phe)*	2.61	2.51	2.80
赖氨酸(Lys)*	3.98	4.09	4.12
组氨酸(His)*	0.88	0.79	0.91
精氨酸(Arg)	7.77	7.97	7.64
脯氨酸(Pro)*	13.36	12.89	14.00
总疏水性氨基酸	40.88	39.07	42.40

* 为疏水性氨基酸。

3 结论

(1)通过碱性蛋白酶酶解后超滤,制备出具有高抗氧化活性的小分子阿胶 CCAH-Ⅱ。CCAH-Ⅱ对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟基自由基的清除率分别为 (53.79 ± 1.18)%、(70.53 ± 0.65)%、(80.00 ± 0.45)%。

(2)分子量分布测定的结果表明,CCAH-Ⅱ组分分子量主要集中分布在 400~1 000 Da,占比 84.85%,推测 CCAH-Ⅱ主要为含有 4~7 个氨基酸的小分子多肽。根据氨基酸组成分析结果,CCAH-Ⅱ组分含有丰富的疏水性氨基酸,其摩尔分数高达 42.40%,推测疏水性氨基酸与阿胶多肽的高抗氧化能力有关。

(3)CD谱图分析表明,CCAH-II组分中 β -转角和无规卷曲结构占比较高,推测其二级结构与阿胶多肽的高抗氧化活性密切相关。

参考文献:

- [1] DALLE-DONNE I, ROSSI R, COLOMBO R, et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease[J]. *Clinical Chemistry*, 2006, 52(4):601-623.
- [2] LI Y, YU J M. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2015, 18(2):147-156.
- [3] 李振华,龚吉军,赵延华,等. 抗氧化肽的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(6):157-161.
LI Z H, GONG J J, ZHAO Y H, et al. The research progress of antioxidant peptides[J]. *Food Research and Development*, 2011, 32(6):157-161. (in Chinese)
- [4] 涂宗财,唐平平,郑婷婷,等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(5):160-166.
TU Z C, TANG P P, ZHENG T T, et al. Optimization of swimming bladder collagen peptide preparation using response surface methodology and its antioxidant activity research[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(5):160-166. (in Chinese)
- [5] 李婷,于海涛,金玉翠,等. 猪皮胶原肽的抗氧化活性研究[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(8):943-947.
LI T, YU H T, JIN Y C, et al. Study on antioxidative effect of porcine collagen peptide[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2018, 20(8):943-947. (in Chinese)
- [6] KIM S K, KIM Y T, BYUN H G, et al. Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 34(3):219-224.
- [7] 尹利端,黄静,王立志. 鲤鱼鱼鳞胶原蛋白肽抗氧化活性研究[J]. *明胶科学与技术*, 2015, 35(3):133-136.
YIN L D, HUANG J, WANG L Z. Antioxidant activities of collagen peptides from cyprinoid scale[J]. *The Science and Technology of Gelatin*, 2015, 35(3):133-136. (in Chinese)
- [8] GÓMEZ-GUILLÉ N M C, GIMÉNEZ B, LÓPEZ-CABALLERO M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25:1813-1827.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:189-190.
Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of People's Republic of China*[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:189-190. (in Chinese)
- [10] 邸志权,胡金芳,张路,等. 阿胶补血、抗疲劳以及止血作用研究[J]. *药物评价研究*, 2018, 41(4):562-566.
DI Z Q, HU J F, ZHANG L, et al. Study on hematopoiesis, antifatigue and hemostatic effects of *Asini Corii Colla*[J]. *Drug Evaluation Research*, 2018, 41(4):562-566. (in Chinese)
- [11] 李宗铎,李天新,李宗铭,等. 阿胶的药理作用[J]. *河南中医*, 1989(6):27-29.
LI Z D, LI T X, LI Z M, et al. Study on pharmacological action of *Colla Corii Asini*[J]. *Henan Traditional Chinese Medicine*, 1989(6):27-29. (in Chinese)
- [12] KIM J S, KIM D, KIM H J, et al. Protection effect of donkey hide gelatin hydrolysates on UVB-induced photoaging of human skin fibroblasts[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 67:118-126.
- [13] WANG D L, LIU M X, CAO J C, et al. Effect of *colla corii asini* (E'jiao) on D-galactose induced aging mice[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(12):2128-2132.
- [14] 毛跟年,郭倩,瞿建波,等. 阿胶化学成分及药理作用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(11):83-85.
MAO G N, GUO Q, QU J B, et al. Progress on chemical component and drug action of *Colla Corii Asini*[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31(11):83-85. (in Chinese)
- [15] 吴宏忠,杨帆,崔书亚,等. 阿胶有效组分对辐射损伤小鼠造血系统的保护作用研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(4):417-421.
WU H Z, YANG F, CUI S Y, et al. Effective fractions A and B from enzyme-digested *Colla Corii Asini* on hematopoietic recovery in γ -irradiated mice[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2007, 12(4):417-421. (in Chinese)
- [16] 杜怡波,樊慧蓉,阎昭. 阿胶的化学成分及药理作用研究进展[J]. *天津医科大学学报*, 2018, 24(3):267-270.
DU Y B, FAN H R, YAN Z. The progress on chemical component and drug action of *Colla Corii Asini*[J]. *Journal of Tianjin Medical University*, 2018, 24(3):267-270. (in Chinese)
- [17] 李笑尘,闫利华,王智民,等. 阿胶酶解物抗氧化肽的分离与质谱分析[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(7):1021-1025.
LI X C, YAN L H, WANG Z M, et al. Isolation and mass spectrometric analysis of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of roasted pills of *Asini Corii Colla*

- [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(7): 1021–1025. (in Chinese)
- [18] 姜一朴, 邸志权, 王延涛, 等. 小分子阿胶抗疲劳、抗氧化及止血作用研究[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 203–208.
- JIANG Y P, DI Z Q, WANG Y T, et al. Study on anti-fatigue, anti-oxidative and hemostatic effects of small molecule *Colla Corii Asini* [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2019, 35(2): 203–208. (in Chinese)
- [19] 郭尚伟, 周祥山, 嵇传良, 等. HPLC-MS/MS 法测定阿胶、龟甲胶、鹿角胶中 17 种氨基酸含量[J]. 明胶科学与技术, 2016, 36(2): 86–91.
- GUO S W, ZHOU X S, JI C L, et al. The analysis of 17 amino acids in *Colla Corii Asini*, *Colla Carapacis et Plastris Testudinis*, and *Colla Cornus Cervi* by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. The Science and Technology of Gelatin, 2016, 36(2): 86–91. (in Chinese)
- [20] 郭尚伟, 郝向慧, 段小波, 等. HPLC-MS/MS 法快速测定阿胶中 4 种主要氨基酸[J]. 明胶科学与技术, 2016, 36(3): 131–136.
- GUO S W, HAO X H, DUAN X B, et al. Rapid determination of 4 main amino acids in *Colla Corii Asini* by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. The Science and Technology of Gelatin, 2016, 36(3): 131–136. (in Chinese)
- [21] ARNAO M B, CANO A, ACOSTA M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2001, 73(2): 239–244.
- [22] XU X B, GUO S W, HAO X H, et al. Improving antioxidant and antiproliferative activities of colla corii asini hydrolysates using ginkgo biloba extracts [J]. Food Science & Nutrition, 2018, 6(4): 765–772.
- [23] CHI C F, HU F Y, WANG B, et al. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 15: 301–313.
- [24] JE J Y, QIAN Z J, BYUN H G, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 840–846.
- [25] BLOKHINA O, VIROLAINEN E, FAGERSTEDT K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review [J]. Annals of Botany, 2003, 91: 179–194.

Preparation of a high-antioxidant hydrolysate from *Colla Corii Asini*

DU BoWei XU XiaoBing GUO ShangWei HUANG YaQin*

(College of Materials Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: *Colla Corii Asini* was hydrolyzed with alkaline protease, and the enzymatic hydrolysate was ultrafiltered with a 3k ultrafiltration membrane to afford a *Colla Corii Asini* hydrolysate (CCAH-Ⅱ). DPPH, ABTS and OH radical scavenging activities of CCAH-Ⅱ at a concentration of 2 mg/mL were $(53.79 \pm 1.18)\%$, $(70.53 \pm 0.65)\%$ and $(80.00 \pm 0.45)\%$, respectively. By means of amino acid composition analysis and circular dichroism chromatography, it was found that the content of hydrophobic amino acids in CCAH-Ⅱ was as high as 42.40%. The proportions of β -turn and random coil moieties were 30.4% and 46.8%, respectively, and this high proportion of β -turn and random coil may be responsible for the high antioxidant activity of CCAH-Ⅱ.

Key words: *Colla Corii Asini*; hydrolysate; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

(责任编辑: 吴万玲)