

高分辨液相色谱-串联质谱法分析冻干西洋参抗氧化多肽

赵艺科¹, 吴桐¹, 孙孟琪², 万茜淋¹, 张哲¹, 杨洪梅¹

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 长春科技学院, 吉林 长春 130600)

摘要: 本研究利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱串联质谱(UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS)技术快速鉴定冻干西洋参多肽的氨基酸组成。采用碱溶酸沉法提取冻干西洋参粗蛋白,以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率为评价指标,筛选酶解冻干西洋参粗蛋白的最佳蛋白酶,并用最佳蛋白酶将粗蛋白酶解,经 3 ku 截留分子质量的透析袋透析得到不同组分,采用蛋白液相分析系统分离纯化抗氧化活性较好的组分。结果表明,选择胃蛋白酶酶解 1 h 时, DPPH 自由基清除活性较好,清除率为(56.02±2.01)%,且透析得到<3 ku 组分的抗氧化活性优于>3 ku 组分和内源性肽组分。用蛋白液相分析系统对抗氧化活性较好的组分(<3 ku)进行分离,评价所得各组分的 DPPH 自由基和羟自由基清除能力。结果表明,组分 F1 和 F2 具有较强的抗氧化活性。经 UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS 法鉴定,这 2 个组分均为由 2~4 个氨基酸组成的多肽,包括疏水氨基酸甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)和亮氨酸(Leu),这可能是其具有较强抗氧化活性的原因。该方法可快速有效地鉴定冻干西洋参抗氧化多肽的组成,为揭示其组成与抗氧化活性的关系提供了依据。

关键词: 高分辨液相色谱-串联质谱; 冻干西洋参; 多肽; 抗氧化活性; 氨基酸鉴定

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0851-10

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0100

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0100

Analysis of Antioxidant Peptides Extracted from Freeze-dried American Ginseng by High Resolution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ZHAO Yi-ke¹, WU Tong¹, SUN Meng-qi², WAN Xi-lin¹, ZHANG Zhe¹, YANG Hong-mei¹

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, China)

Abstract: American ginseng contains a variety of active ingredients. Bioactive peptides with biological functions can be obtained by protease hydrolysis, which has physiological activities such as lowering blood pressure, anti-oxidation and antibacterial. The inorganic salts, polysaccharides and free amino acids contained in the hydrolysate of protease will affect the biological activity of peptides to some extent, so it is necessary to further separate and purify the hydrolysate. At present, the commonly used peptides separation methods are time-consuming and labor-intensive, and the yield of target peptide components is low. In this study, large-scale separation and purification of proteins in a short time can be achieved by the protein purification system, which improves work efficiency and

reduces costs. Biological activity and functional properties of peptides are stronger than those of protein. Therefore, it is of great significance to study the antioxidant peptides in freeze-dried American ginseng for nutritional evaluation and pharmacological effects. The amino acid composition of the peptides extracted from freeze-dried American ginseng was investigated by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole electrostatic field-Orbitrap tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS). The crude protein in freeze-dried American ginseng was extracted by alkali-soluble acid precipitation method, and hydrolyzed by various proteases. The optimal protease for enzymatic defrosting of the crude protein was screened out using DPPH free radical clearance as an evaluation index. The crude protein was enzymolized with the best protease, and different components were obtained by 3 ku dialysis bags. The components with better anti-oxidation activity were separated by protein liquid phase analysis system. The results showed that after pepsin hydrolysis for 1 h, DPPH free radical scavenging activity is the best, and the clearance rate is $(56.02 \pm 2.01)\%$. Further, the antioxidant activity of <3 ku components is better than that of >3 ku components or endogenous peptides. The components with good antioxidant activity (<3 ku) were separated by ÄKTATM pure protein liquid phase analysis system to evaluate the DPPH free radical scavenging ability and hydroxyl free radical scavenging ability of each fraction, among which F1 and F2 have strong antioxidant activities. The amino acid composition was identified by UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS. The hydrophobic amino acids such as Gly, Val and Leu are identified in F1 and F2, which may make them have good antioxidant activities. This method can quickly and effectively identify the antioxidant peptides composition in freeze-dried American ginseng, and provides a basis for revealing the relationship between antioxidant peptides composition and antioxidant activity.

Key words: high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry; freeze-dried American ginseng; peptides; antioxidant activity; amino acid identification

西洋参(*Panax quinquefolium* Linn.)原产于加拿大南部和美国北部,又称花旗参、洋参、美国人参、西洋人参等,为五加科(Araliaceae)人参属(*Panax* L.)多年生宿根草本植物^[1-4],是药食同源的名贵中药材,含有多种活性成分,如氨基酸、皂苷、挥发油等^[5]。其中,氨基酸是构成蛋白质的基本单位,对研究西洋参的药理作用和营养价值有重要意义^[6]。蛋白质经蛋白酶水解可获得具有生物功能的生物活性肽,有着降血压、抗氧化和抑菌等生理活性^[7]。不同蛋白酶的作用肽键位点不同,导致酶解得到的肽段长度、氨基酸序列不同,使多肽的分子质量、疏水性存在差异,从而对多肽的生物活性具有重要影响^[8-9]。因此,选择适宜的酶是制备高活性抗氧化肽的前提。

蛋白酶解液中所含的无机盐、多糖、游离氨基酸等在一定程度上会影响多肽的生物活性^[10-13],因此需要对酶解液进行分离纯化。目前,较常用的多肽分离方法有超滤、离子交换层析色谱、凝胶过滤色谱等^[14-15],但这些分离方法耗时耗力,

且目标多肽成分收率较低。蛋白纯化系统可实现在短时间内大规模分离纯化蛋白,多用于分离纯化各种生物样品,如蛋白、多糖、生物碱和生物酸等,可精准控制系统,提高工作效率,减少成本。多肽作为蛋白质的水解产物,具有比蛋白质更强的生物活性和功能特性。不同分子质量的多肽呈现的生物活性及功能特性有差异^[16]。因此,研究冻干西洋参中抗氧化多肽成分对于定性分析、质量控制、营养评价及药理作用具有重要意义。

质谱技术具有高灵敏度、高分辨率和高通量的优点^[17-18]。王东萍等^[19]采用液相色谱-质谱联用技术分析秦巴晒菇提取物活性成分,发现了126种主要化合物。毛前程等^[20]基于液相色谱-质谱技术定性分析百合地黄汤水煎液的化学成分,鉴定出69种化合物。液相色谱-质谱联用技术在冻干西洋参氨基酸定性分析中的应用^[21]不仅有助于更全面地了解冻干西洋参抗氧化多肽的组成成分,还可为其他中药材的结构与功能分析提供依据。

基于此,本研究首先用蛋白液相分析系统对抗氧化活性较好的组分进行分离纯化,进一步利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS)法测定冻干西洋参抗氧化多肽中的氨基酸组成,探究冻干西洋参抗氧化多肽组成与抗氧化活性的关系,为后续的相关研究提供参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪:美国赛默飞世尔科技有限公司产品;BT25S电子天平:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产品;电子恒温水浴锅:苏州国飞实验室仪器有限公司产品;高速离心机:德国Eppendorf公司产品;旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂产品;pH计:上海仪电科学仪器股份有限公司产品;冷冻干燥机:日本EYELA公司产品;转移脱色摇床、旋涡振荡机:海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品;酶标仪:美国BioTek公司产品;ÄKTA™pure蛋白液相分析系统:瑞典Cytiva公司产品。

1.2 主要材料与试剂

西洋参:购于吉林长白山地区,经长春中医药大学杨洪梅研究员鉴定为五加科人参属西洋参(*Panax quinquefolium* Linn.)的干燥根;胃蛋白酶(1:30 000)、中性蛋白酶(100 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、水杨酸、2,2'-联氨双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、硫酸亚铁七水合物($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、二

水合乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)、普通型透析袋(截留分子量3 ku,货号:MD3034-5m):上海源叶生物科技有限公司产品;还原型谷胱甘肽(GSH):纯度 $\geq 98\%$,优级纯,美国Sigma公司产品;过硫酸钾:天津市大茂化学试剂厂产品;正己烷:天津市天力化学试剂有限公司产品;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):北京Solarbio公司产品;无水乙醇:天津新通精细化工有限公司产品;邻苯二酚紫:上海Aladdin公司产品;水为超纯水;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 样品制备

1.3.1 冻干西洋参蛋白的提取 参照文献^[22]建立的提取方法。冻干西洋参经粉碎、过筛、脱脂后得脱脂冻干西洋参粉,与超纯水按1:15(g/mL)料液比进行混合得悬浮液。在4℃下离心20 min,收集沉淀。将所得蛋白沉淀溶于超纯水中,冻干后备用。

1.3.2 冻干西洋参蛋白的酶解 用适量超纯水溶解1.3.1节获得的冻干西洋参蛋白粉,使用3 ku透析袋进行透析,透析袋内(>3 ku)的液体冻干后进行后续酶解实验,透析袋外(<3 ku)的液体旋转蒸发至少量液体,冻干后得到内源性肽。称取适量>3 ku的冻干西洋参蛋白粉末,用超纯水溶解,进一步酶解,筛选不同种类蛋白酶对冻干西洋参蛋白酶解的影响,其工艺条件列于表1。按照酶解时间反应后取出,置于100℃金属浴中灭活处理15 min,4℃下离心15 min,取上清液,冷冻干燥后测定DPPH自由基清除率,筛选出适宜的蛋白酶。

表1 不同蛋白酶酶解冻干西洋参蛋白的工艺条件

Table 1 Technological conditions of defrosting dried American ginseng protein with different protease enzymes

蛋白酶种类 Protease species	酶底比 Enzyme substrate ratio/%	酶解pH值 pH of enzymolysis	酶解时间 Enzymatic hydrolysis time/h	酶解温度 Enzyme cleavage temperature/℃
胃蛋白酶	2	2.0	1.0, 2.0, 4.0, 6.0	37
木瓜蛋白酶	2	7.0	1.0, 2.0, 4.0, 6.0	55
碱性蛋白酶	2	10.0	1.0, 2.0, 4.0, 6.0	50
中性蛋白酶	2	7.0	1.0, 2.0, 4.0, 6.0	50

1.3.3 冻干西洋参多肽的制备及抗氧化活性研究 用胃蛋白酶酶解冻干西洋参蛋白1 h,将最优酶解液用3 ku透析袋于4℃透析,收集得到多肽组分PPH-I(<3 ku)、PPH-II(>3 ku),用真空冷冻干燥机进行干燥。将PPH-I、PPH-II组分与

1.3.2节得到的内源性肽组分进行比较,考察DPPH自由基清除能力、羟自由基清除能力、螯合铜离子能力和ABTS自由基清除能力。

1.3.4 冻干西洋参多肽的纯化 采用ÄKTA™pure蛋白纯化系统和Superdex 30 increase层析柱进

行蛋白纯化,取 100 mg 相对分子质量 < 3 ku 的组分溶于 600 μL 超纯水中,过 0.22 μm 滤膜,取上清液,以流速 0.1 mL/min、检测波长 280 nm 收集相应组分,冷冻干燥,待用。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 Waters UPLC BEH-C18 柱 (1.7 μm × 2.1 mm × 100 mm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~5 min (15%B), 5~20 min (15~100%B), 20~30 min (100%B), 30~35 min (100~10%B); 流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μL 。

1.4.2 质谱条件 Full MS/dd-MS² 扫描模式; 分析时长 35 min; 正离子模式检测; 母离子质量扫描范围 m/z 100~1 200; 一级质谱分辨率 70 000; 自动气体控制 (AGC) 目标为 1×10^6 ; 一级最大注射时间 100 ms; 扫描范围数为 1; 动态排除为 40.0 s/次; MS² 激活类型为高能量碰撞解离 (HCD); 二级质谱分辨率 17 500; 微扫描为 1; 二级最大注射时间 50 ms; 碰撞能量 45 eV。

电喷雾离子源 (ESI); 载气: 高纯氮气, 纯度 > 99.5%; 喷雾电压 3.5 kV; 毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 辅助气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 冻干西洋参多肽的体外抗氧化实验

1.5.1 DPPH 自由基清除能力的测定 参照文献^[23]方法测定 DPPH 自由基清除能力。将 1 mL 样品 (溶于超纯水) 与 0.1 mmol/L DPPH (溶于 99.7% 乙醇) 溶液混合作为样品组, 室温下避光孵育 30 min, 平行 3 次。在 517 nm 条件下测定反应体系的吸光度, 计算不同样品对 DPPH 自由基的清除率, 示于式 (1):

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 、 A_1 、 A_2 分别表示空白组、样品、对照组的吸光值。

1.5.2 羟自由基清除能力的测定 参照文献^[24]方法测定羟自由基清除能力。将 50 μL 6 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液加入到 50 μL 样品溶液中, 平行 3 次, 室温静置反应 10 min 后, 加入 50 μL 6 mmol/L 水杨酸乙醇溶液, 黑暗反应 30 min。在 510 nm 条件下测定反应体系的吸光度, 示于式 (2):

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_0 、 A_1 、 A_2 分别表示对照组 (以 50 μL 超纯水代替样品溶液)、样品、不加含水杨酸组 (以 95% 乙醇代替水杨酸) 的吸光值。

1.5.3 铜离子螯合能力的测定 参照文献^[25]方法测定铜离子螯合能力。将 0.1 g/L CuSO_4 溶液与 1 mL 样品溶液混合, 加入 20 μL 0.1% 邻苯二酚紫, 反应完成后, 在 632 nm 处测量样品的吸光度。使用超纯水作为对照, 计算铜离子螯合能力, 示于式 (3):

$$\text{铜离子清除率}(\%) = [1 - (A_1/A_2)] \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_1 、 A_2 分别表示样品、对照组的吸光值。

1.5.4 ABTS 清除能力的测定 参照文献^[26]方法测定 ABTS 清除能力。使用 7 mmol/L ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液以 1:1 (V/V) 制备储备溶液。在 734 nm 波长下测定吸光度, ABTS 清除能力通过式 (4) 计算:

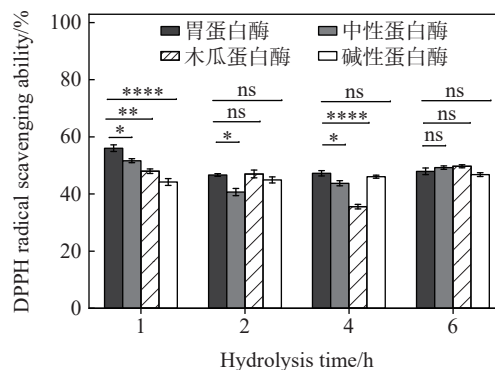
$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\% \quad (4)$$

式中, A_0 、 A_1 、 A_2 分别表示空白组、样品、ABTS 溶液的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 冻干西洋参粗蛋白酶解物的 DPPH 自由基清除活性探究

选择胃蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶水解冻干西洋参粗蛋白, 进行 DPPH 自由基清除活性探究, 结果示于图 1。可知, 冻



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns 无显著性差异

图 1 不同冻干西洋参粗蛋白酶解物的 DPPH 自由基清除能力柱状图

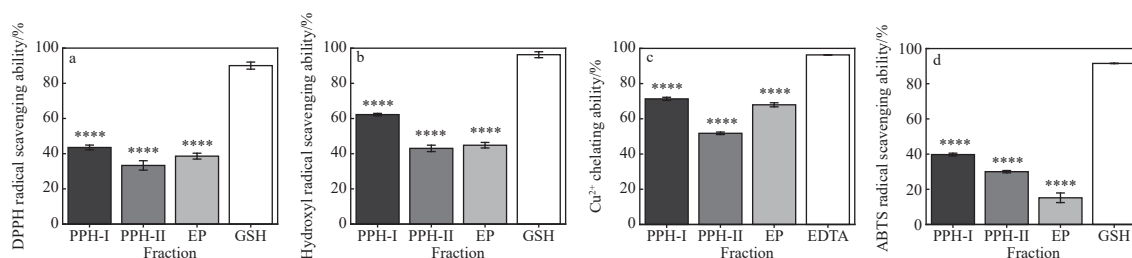
Fig. 1 Histogram of DPPH free radical scavenging ability of different crude protease hydrolysates of freeze-dried American ginseng

干西洋参多肽有较强的 DPPH 自由基清除能力, 其中, 胃蛋白酶的整体酶解效果最好。当粗蛋白浓度为 3 g/L 时, 胃蛋白酶酶解 1 h 的酶解物 DPPH 自由基清除活性最高, 清除率为 (56.02±2.01)%。因此, 选用冻干西洋参胃蛋白酶酶解 1 h 的酶解物开展后续实验。

2.2 透析后不同组分多肽抗氧化活性探究

比较透析得到的分子质量 < 3 ku、> 3 ku 的多肽和内源性肽组分的 DPPH 清除能力、羟自由基清除能力、Cu²⁺ 螯合能力、ABTS 清除能力, 结果示于图 2。由图 2a 可知, 冻干西洋参抗氧化多肽对 DPPH 自由基有一定的清除效果, PPH-I

组分的 DPPH 自由基清除活性最好, 清除率为 (43.51±2.35)%。由图 2b 可知, 冻干西洋参多肽对羟自由基有较好的清除效果, PPH-I 组分自由基清除活性最好, 清除率为 (62.24±1.18)%。由图 2c 可知, 冻干西洋参多肽对 Cu²⁺ 有较好的螯合能力, PPH-I 组分的螯合二价铜离子能力较好, 清除率为 (71.33±1.55)%。由图 2d 可知, 冻干西洋参多肽对 ABTS 自由基有一定的清除能力, PPH-I 组分的清除能力最好, 清除率为 (39.73±1.37)%。研究表明, 分子质量 < 3 ku 的组分抗氧化活性最强, 低分子质量的多肽可能表现出更强的自由基清除能力和更高的抗氧化能力。



注: PPH-I 表示胃蛋白酶酶解物 < 3 ku 的组分; PPH-II 表示胃蛋白酶酶解物 > 3 ku 的组分; EP 表示内源性肽组分; GSH、EDTA 为对照

图 2 样品透析后各组分的 DPPH 清除能力(a)、羟自由基清除能力(b)、Cu²⁺ 螯合能力(c)和 ABTS 清除能力(d)柱状图

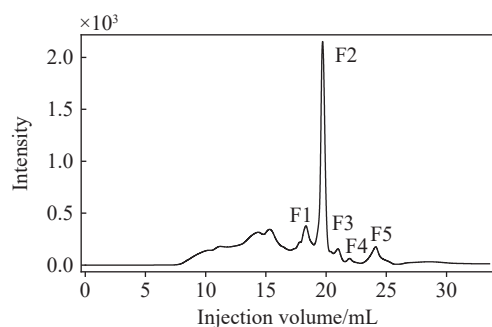
Fig. 2 Histogram of DPPH radical scavenging ability (a), hydroxyl radical scavenging ability (b), Cu²⁺ chelating ability (c), and ABTS scavenging ability (d) of each fraction after dialysis

2.3 蛋白层析系统分离纯化冻干西洋参 < 3 ku 组分

本实验经蛋白纯化系统分离共收集到 5 个组分, 示于图 3。采用 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力评价各组分的抗氧化活性。

2.4 多肽分离纯化后不同组分的抗氧化活性探究

使用 ÄKTA™ pure 蛋白液相分析系统对抗



注: F1、F2、F3、F4、F5 代表蛋白纯化后的相应组分

图 3 冻干西洋参多肽的分离纯化图

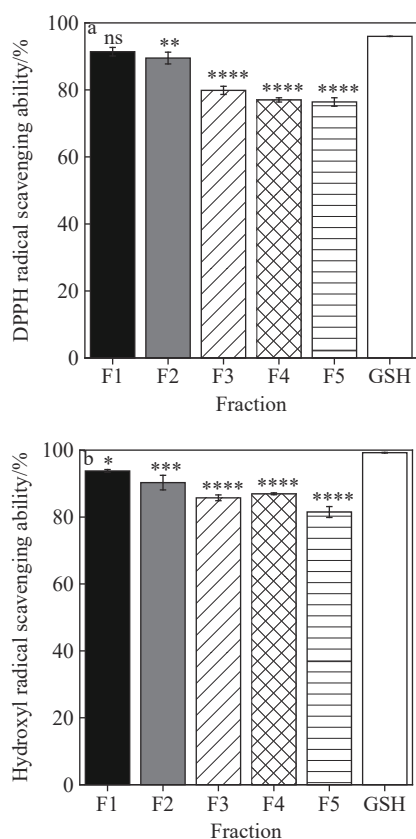
Fig. 3 Chromatograph of the peptides of freeze-dried American ginseng

氧化活性较好的组分 (< 3 ku) 进行分离, 并评价各组分的 DPPH 自由基清除能力、羟自由基清除能力, 筛选出抗氧化活性较强的组分, 结果示于图 4。可见, 经蛋白纯化后, 当抗氧化多肽浓度为 2 g/L 时, F1 组分的 DPPH 自由基清除能力为 (91.41±2.20)%, 羟自由基清除能力为 (93.78±0.71)%, 均得到增强, 表明冻干西洋参中抗氧化多肽经纯化后表现出更好的抗氧化活性。选择抗氧化活性较强的 F1、F2 组分, 利用高分辨液相色谱-串联质谱对其进行后续的组成鉴定。

2.5 多肽活性组分 F1、F2 的氨基酸序列鉴定

采用液相色谱-质谱联用技术分析具有较强抗氧化活性 F1、F2 组分的成分。F1、F2 组分中包含多个肽, 信号响应值较强的离子有 *m/z* 175.119 2、342.156 3 和 378.266 8, F2 组分中信号响应较强的有 *m/z* 320.026 8 和 328.322 3。F1 和 F2 组分中氨基酸的质谱数据及鉴定结果列于表 2。

对 F1 组分中一级质谱信号较强的多肽进行二级质谱分析, *m/z* 175.119 2 多肽可得到碎片均



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$,
ns 无显著性差异

图4 纯化后各组分的DPPH清除能力(a)和羟自由基清除能力(b)柱状图

Fig. 4 Histogram of DPPH radical scavenging ability (a) and hydroxyl radical scavenging ability (b) of each fraction after purification

匀分布的二级质谱图及可信度较高的氨基酸序列,示于图5a, 5b。通过一级和二级质谱图获得被分析物和碎片离子的质荷比,对F1组分进行结构鉴定,得到1种二肽,在二级质谱图中发现

碎片离子 m/z 98.0609[M+Na]⁺、118.0868[M+H]⁺, 其相对分子质量分别为75.0609和117.0868, 推测 m/z 175.1192[M+H]⁺为1分子Gly与1分子Val脱水缩合而成,氨基酸序列为Gly-Val,分子质量为174.1192。

多肽 m/z 342.1563可得到碎片分布均匀的二级质谱图及可信度较高的氨基酸序列,示于图5d。通过一级和二级质谱图获得被分析物和碎片离子的质荷比,对该组分进行结构鉴定,得到1种四肽,在二级质谱图中发现碎片离子 m/z 76.6918[M+H]⁺、171.8842[M+K]⁺,推测 m/z 342.1563[M+K]⁺为3分子Gly与1分子Orn脱水缩合而成,氨基酸序列为Gly-Gly-Orn-Gly,分子质量为303.1663。

多肽 m/z 378.2668可得到碎片分布均匀的二级质谱图及可信度较高的氨基酸序列,示于图5f。通过一级和二级质谱图获得被分析物和碎片离子的质荷比,对该组分进行结构鉴定,得到1种三肽,在二级质谱图中发现碎片离子 m/z 185.0805[M+K]⁺、272.4509[M+Na]⁺,相对分子质量分别为146.6918和249.4509,推测 m/z 378.2668[M+H]⁺为2分子Lys与1分子Cys脱水缩合而成,氨基酸序列为Lys-Cys-Lys,分子质量为377.2668。

F2组分中信号响应较强的有 m/z 320.0268和328.3223。对一级质谱信号较强的多肽进行二级质谱分析, m/z 320.0268可得到碎片分布均匀的二级质谱图及可信度较高的氨基酸序列,示于图6b。通过一级和二级质谱图获得片段的质荷比,对F2组分进行结构鉴定,得到1种三肽,在二级质谱图中发现碎片离子 m/z 114.0917[M+K]⁺、160.0257[M+K]⁺,相对分子质量分别为

表2 F1和F2组分中氨基酸残基的鉴定结果

Table 2 Identified result of the amino acids of F1 and F2

氨基酸 Amino acid	分子式 Molecular formula	实际测量值 Measured value (m/z)	理论预测值 Predicted value (m/z)	误差 Mass error/ $\times 10^{-6}$
Gly	C ₂ H ₃ NO ₂	98.0609[M+Na] ⁺	98.0218[M+Na] ⁺	4.0
		76.6918[M+H] ⁺	76.0398[M+H] ⁺	8.6
Val	C ₄ H ₇ NO ₂	118.0868[M+H] ⁺	118.0868[M+H] ⁺	0.0
Orn	C ₃ H ₁₂ N ₂ O ₂	171.8842[M+K] ⁺	171.1878[M+K] ⁺	4.0
Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	185.0805[M+K] ⁺	185.2035[M+K] ⁺	-0.6
Cys	C ₃ H ₇ NO ₂ S	160.0257[M+K] ⁺	160.1177[M+K] ⁺	-0.6
Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1017[M+H] ⁺	132.1024[M+H] ⁺	0.0

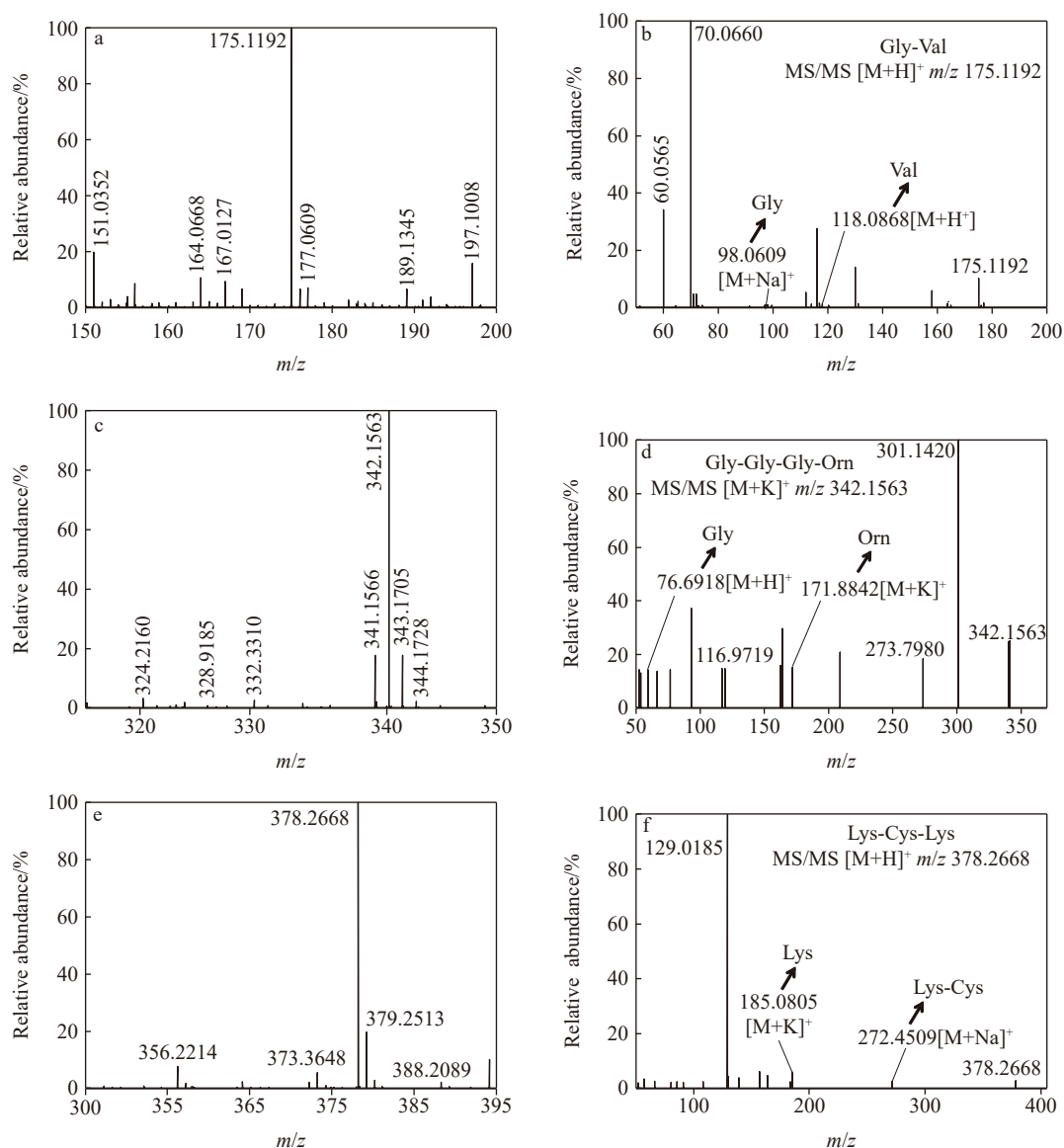


图5 F1组分中 m/z 175.1192(a,b)、342.1563(c,d)、378.2668(e,f)的一级及二级质谱图

Fig. 5 MS and MS/MS spectra of m/z 175.1192 (a, b), 342.1563 (c, d) and 378.2668 (e, f) in F1

75.0917和121.0257,推测母离子 m/z 320.0268 $[M+K]^+$ 为2分子Cys与1分子Gly脱去2分子水缩合而成,氨基酸序列为Cys-Gly-Cys,分子质量为281.0268。

母离子 m/z 328.3223可得到碎片分布均匀的二级质谱图及可信度较高的氨基酸序列,示于图6d。通过一级和二级质谱图获得被分析物和碎片离子的质荷比,对F2组分进行结构鉴定,得到1种三肽,在二级质谱图中发现碎片离子 m/z 132.1017 $[M+H]^+$,相对分子质量为131.1017,推测碎片离子 m/z 219.7004 $[M+H]^+$ 为1分子Leu与1分子Ser脱水缩合而成。因此,推测 m/z 328.3223 $[M+Na]^+$ 为2分子Ser与1分子Leu脱去2分子水

缩合而成,氨基酸序列为Ser-Leu-Ser,分子质量为305.3223。

研究表明^[27],肽的抗氧化活性与其疏水性存在正相关,随着疏水氨基酸所占比例增大,肽的抗氧化活性增强。疏水氨基酸(Val、Leu等)和芳香族氨基酸(Phe、His、Tyr和Trp)可增强肽的自由基清除能力。肽的疏水性易于接近疏水性靶标,且疏水性肽可以很容易地穿过活细胞中的细胞膜,同时提高肽在脂质中的溶解度,促进肽与疏水性自由基的接触。组分F1和F2中均含有疏水氨基酸,这可能是其具有较强抗氧化活性的原因。

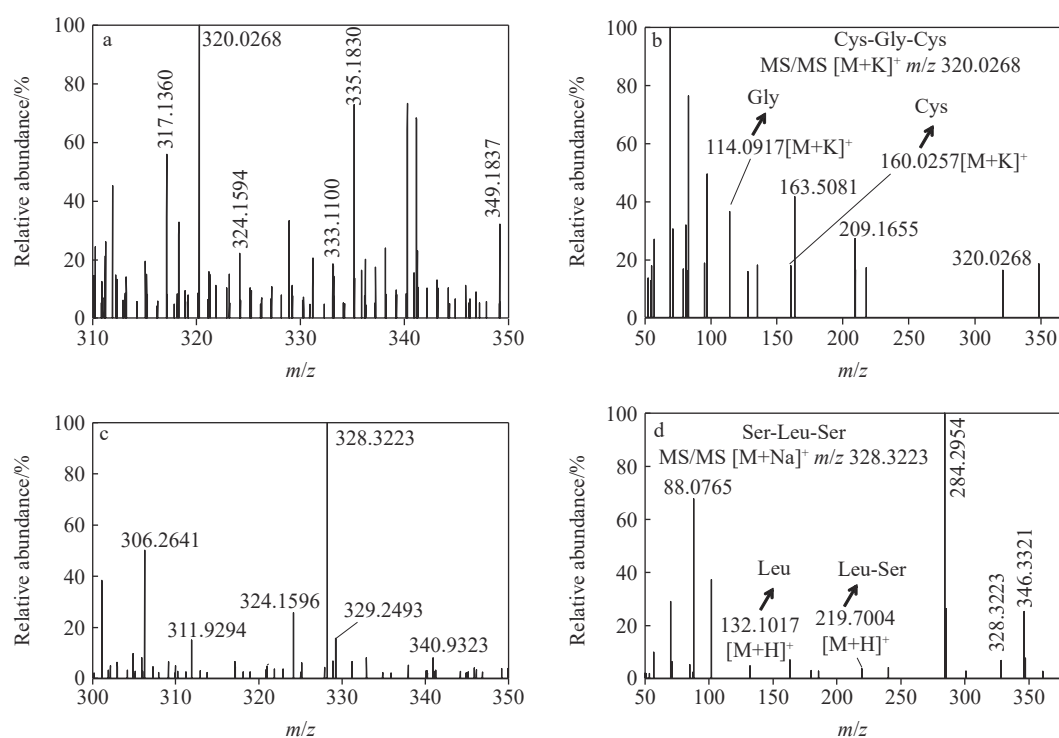


图6 F2组分中 m/z 320.0268(a, b)和 m/z 328.3223(c, d)的一级及二级质谱图
Fig. 6 MS and MS/MS spectra of m/z 320.0268 (a, b) and m/z 328.3223 (c, d) in F2

3 结论

本研究利用UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS技术快速鉴定冻干西洋参多肽的氨基酸组成。采用碱溶酸沉法提取冻干西洋参粗蛋白,以DPPH自由基清除率为评价指标,筛选酶解冻干西洋参抗氧化多肽的最佳蛋白酶。当选用胃蛋白酶酶解1 h时,DPPH自由基的清除活性较好,透析得到<3 ku组分的抗氧化活性优于>3 ku组分和内源性肽组分。经ÄKTA™pure蛋白液相分析系统分离所得组分F1和F2具有较强的抗氧化活性,为2~4个氨基酸脱水缩合而成,其中在组分F1和F2中鉴定出Gly、Val、Leu等疏水氨基酸,可能是这2个组分具有较强抗氧化活性的原因。随着质谱技术的不断进步和应用领域的拓展,其在西洋参及其他中药材的化学成分分析中具有广阔的应用前景和发展潜力。此外,还可以结合细胞实验和动物实验全面评估多肽的抗氧化能力,验证这些分离出的潜在肽成分在体内的氧化抑制作用。未来,将针对生物体内冻干西洋参是否具有抗氧化作用开展进一步研究。

参考文献:

- [1] 于晓艳,张宇弛,方粟一,葛鹏玲.西洋参的化学成分和药理作用研究进展[J].中医药学报,2024,52(4):99-104.
- [2] YU Xiaoyan, ZHANG Yuchi, FANG Suyi, GE Pengling. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of Radix Panacis Quinquefolii[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2024, 52(4): 99-104(in Chinese).
- [3] ZOU Y, DING M, WANG H, XIE H, JIANG M, ZHAO Y, XU X, HU Y, GAO X, WANG H, YANG W. Integration of ion-mobility high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry-based untargeted metabolomics and desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging to unveil the ginsenosides variation induced by steaming for *Panax ginseng*, *P. quinquefolius* and *P. notoginseng*[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2024, 17(6): 105 781.
- [4] 汤慧丽,王宪昌,李佳,张教洪,单成钢.西洋参皂苷类成分及其生物活性、质量控制的研究进展[J].中国中药杂志,2022,47(1):36-47.
- [5] TANG Huili, WANG Xianchang, LI Jia, ZHANG Jiaohong, SHAN Chenggang. Research progress on saponins, biological activities of saponins, and quality control of *Panax quinquefolium*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(1): 36-47(in Chinese).

- [4] WANG W, SONG L, YANG L, LI C, MA Y, XUE M, SHI D. *Panax quinquefolius* saponins combined with dual antiplatelet therapy enhanced platelet inhibition with alleviated gastric injury via regulating eicosanoids metabolism[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2023, 23(1): 289.
- [5] FAN J, LIU F, JI W, WANG X, LI L. Comprehensive investigation of ginsenosides in the steamed *Panax quinquefolius* with different processing conditions using LC-MS[J]. *Molecules*, 2024, 29(3): 623.
- [6] JEE H S, CHANG K H, PARK S H, KIM K T, PAIK H D. Morphological characterization, chemical components, and biofunctional activities of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium*, and *Panax notoginseng* Roots: a comparative study[J]. *Food Reviews International*, 2014, 30(2): 91-111.
- [7] 翟晓娜, 胡龙彪, 李媛媛, 梁亮, 胡雪芳, 张志民, 班世栋, 王萍, 裴海生. 菜籽饼超微粉酶解制备抗氧化活性肽[J]. *农业工程学报*, 2024, 40(4): 284-291.
- ZHAI Xiaona, HU Longbiao, LI Yuanyuan, LIANG Liang, HU Xuefang, ZHANG Zhimin, BAN Shidong, WANG Ping, PEI Haisheng. Preparing antioxidant peptides from ultra-fine powder of rapeseed meal[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2024, 40(4): 284-291(in Chinese).
- [8] MARCONE S, BELTON O, FITZGERALD D J. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2017, 83(1): 152-162.
- [9] XU B, DONG YU C, CHEN H, ZHAO Y, ZHANG B, YU P, CHEN M. Advances in research on the activity evaluation, mechanism and structure-activity relationships of natural antioxidant peptides[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(4): 479.
- [10] ZHANG M, HUANG T, MU T. Improvement of thermal, microwave and ultrasonication pretreatment on the production of antioxidant peptides from sweet potato protein via *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2019, 54(7): 2338-2345.
- [11] WANG W, CHU L, CHEN L, YANG R, ZHU S, ZHANG Y, YANG H. Authentication of *Asini Corii Colla* and *Taurus Corii Colla* based on UPLC-MS/MS and the discovery of antioxidant peptides associated with the PI3K-AKT pathway[J]. *Natural Product Research*, 2023, 37(23): 1-6.
- [12] HO T J, TSAI W T, WU J R, CHEN H P. Biological activities of deer antler-derived peptides on human chondrocyte and bone metabolism[J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(4): 434.
- [13] 付稼榕, 胡小静, 马尚玄, 王芳, 郭刚军, 黄克昌, 杨悦雪, 贺熙勇. 不同分子量澳洲坚果多肽制备工艺与抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(20): 414-421.
- FU Jiarong, HU Xiaojing, MA Shangxuan, WANG Fang, GUO Gangjun, HUANG Kechang, YANG Yuexue, HE Xiyong. Preparation technology and antioxidant activities of different molecular weight macadamia nut polypeptides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(20): 414-421(in Chinese).
- [14] TANG Y, LIANG F, YAN Y, ZENG Y, LI Y, ZHOU R. Purification and identification of peptides from *Hydrilla verticillata* (Linn. f.) royle with cytoprotective and antioxidative effect against H₂O₂-treated HepG2 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(8): 4170-4183.
- [15] CHEN X, ZHANG S, CAO M, GUO J, LUO R. Isolation of peptide inhibiting SGC-7901 cell proliferation from *Aspongopus chinensis* Dallas[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12535.
- [16] 唐晓宁, 吕应年, 吴斌华, 林芊杏, 黄庆, 戚怡. 海洋来源多肽生物活性及提纯方法研究进展[J]. *中国海洋药物*, 2021, 40(1): 49-58.
- TANG Xiaoning, LV Yingnian, WU Binhua, LIN Qianxing, HUANG Qing, QI Yi. Advances in research on biological activity and purification methods of marine peptides[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2021, 40(1): 49-58(in Chinese).
- [17] NIU Y, CHEN Y, ZHOU J, SUN W. Online electrochemistry coupling liquid chromatography-mass spectrometry for rapid investigation on the phase I and phase II simulated metabolic reactions of flavonoids[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2024, 416(10): 2541-2551.
- [18] DONG H, YAN G L, HAN Y, SUN H, ZHANG A H, LI X N, WANG X J. UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomic studies on the toxicity mechanisms of traditional Chinese medicine Chuanwu and the detoxification mechanisms of Gancao, Baishao, and Ganjiang[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(9): 687-698.
- [19] 王东萍, 葛万文, 邵晶, 孙延庆. 液相色谱-质谱联用技术分析秦巴晒菇提取物活性成分及其治疗慢性粒细胞白血病的网络药理学研究[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(1): 139-145.
- WANG Dongping, GE Wanwen, SHAO Jing, SUN Yan-

- qing. Analysis of effective components of *Agaricus blazei* Murill extract by LC-MS and network pharmacology analysis in treatment of chronic myeloid leukemia[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2024, 40(1): 139-145 (in Chinese).
- [20] 毛前程, 马柯, 王嘉昀, 房天赫, 刘蔚然, 张洪秀, 张琦, 田义昭, 徐敏真, 宗鑫. 基于 LC-MS 法研究百合地黄汤单煎及共煎液中化学成分变化[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(2): 77-82.
- MAO Qiancheng, MA Ke, WANG Jiayun, FANG Tianhe, LIU Weiran, ZHANG Hongxiu, ZHANG Qi, TIAN Yizhao, XU Minzhen, ZONG Xin. Study of the changes of chemical composition in single frying and decoction of Baihe Dihuang Decoction based on LC-MS method[J]. *Journal of Liaoning University of TCM*, 2024, 26(2): 77-82(in Chinese).
- [21] GONG P, ZONG W, LI H, WU Y, JU H, FAN Z, MA C, LIU W, LI H. Comprehensive analysis of different types of ginsenosides in the different parts of American ginseng by targeted and nontargeted MS/MS scanning[J]. *Journal of Food Science*, 2023, 88(12): 5 063-5 077.
- [22] 石杰, 宋淑敏, 魏连会, 杨庆丽, 董艳, 姬妍茹. 碱提酸沉法提取汉麻籽蛋白粉的优化[J]. *食品工业*, 2021, 42(9): 4-6.
- SHI Jie, SONG Shumin, WEI Lianhui, YANG Qingli, DONG Yan, JI Yanru. Optimization of extraction of hemp seed protein powder by alkali extraction and acid precipitation[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(9): 4-6(in Chinese).
- [23] 陈敏, 高广春, 田新朋, 李艳群, 丁文平, 李姣, 尹浩. 皱纹盘鲍内脏抗氧化肽的制备及活性分析[J]. *食品科技*, 2022, 47(6): 159-166.
- CHEN Min, GAO Guangchun, TIAN Xinpeng, LI Yanqun, DING Wenping, LI Jiao, YIN Hao. Antioxidant peptides from *Haliotis Discus* viscera: preparation and *in vitro* activity evaluation[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(6): 159-166(in Chinese).
- [24] ZHUANG H, TANG N, YUAN Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(4): 1 810-1 821.
- [25] 刘建伟. 鲢鱼皮多肽的制备及抗氧化活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [26] 朱清清, 马瑞娟, 陈剑锋, 谢友坪. 响应面法优化鱿鱼皮蛋白肽的制备工艺及其理化性质分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(7): 217-226.
- ZHU Qingqing, MA Ruijuan, CHEN Jianfeng, XIE Youping. Optimization of preparation process of squid skin peptides by response surface methodology and its physicochemical properties[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(7): 217-226(in Chinese).
- [27] ZHENG Z, SI D, AHMAD B, LI Z, ZHANG R. A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 410-419.

(收稿日期: 2024-06-20; 修回日期: 2024-08-21)