

双斑东方鲀鱼皮胶原多肽的制备及其在化妆品中的功效与刺激性评价

陈 贝¹, 张 鸽², 乔 琨¹, 许 旻¹, 蔡水淋¹, 廖登远¹, 刘智禹^{1*}

¹福建省水产研究所 国家海水鱼类加工技术研发分中心(厦门)

福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 厦门 361013;

²集美大学食品与生物工程学院, 厦门 361021

摘要:河豚鱼皮中富含胶原蛋白,是一种优质的胶原多肽制备原料。鱼皮的精深加工不仅能减缓资源的浪费也能扩大我国河豚鱼的加工模式。本研究以双斑东方鲀鱼皮为实验对象,通过单因素实验和正交实验制备得到双斑东方鲀鱼皮多肽(*Fugu bimaculatus* collagen peptide, FBCP)并对其功效性及皮肤刺激性进行了研究。结果显示,碱性蛋白酶制备 FBCP 的最佳工艺条件为固液比 1:10、酶解温度 50 °C、加酶量 8 000 U/g、酶解 pH 值 9.0、酶解时间 4 h。在此条件下, FBCP 的肽得率为 39.65%。利用超滤膜将胶原多肽提取液分离成不同分子量的四种组分,分别为 FBCP1 (Mw < 1 kDa)、FBCP2 (1 kDa < Mw < 5 kDa)、FBCP3 (5 kDa < Mw < 10 kDa) 和 FBCP4 (Mw > 10 kDa)。吸湿保湿试验中, FBCP1 组分显示出优于其它组分的吸湿和保湿性能。体外抗氧化实验结果表明, FBCP1 自由基清除活性最好,其对超氧阴离子 O₂⁻、羟基自由基·OH 和 DPPH 的 IC₅₀ 分别为 1.659、5.582 和 1.801 mg/mL。多次皮肤刺激和急性眼刺激实验表明,涂抹高达 50% (W/V) FBCP 对受试兔皮肤及兔眼均无刺激性。综上所述, FBCP 具有良好的抗氧化和保湿功效且对皮肤和眼睛无刺激性,可为其在化妆品中的应用提供基础参考。

关键词:双斑东方鲀;鱼皮胶原多肽;化妆品功效;刺激性评价

中图分类号:P745

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)7-1190-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.7.014

Preparation of collagen peptide from *Fugu bimaculatus* skin and its efficacy and irritation evaluation in cosmetics

CHEN Bei¹, ZHANG Ge², QIAO Kun¹, XU Min¹, CAI Shui-lin¹, LIAO Deng-yuan¹, LIU Zhi-yu^{1*}

¹ Fisheries Research Institute of Fujian, National Research and Development Center for Marine Fish Processing

(Xiamen), Key Laboratory of Cultivation and High value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China;

² College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: The skin of puffer fish is rich in collagen, which can be a high-quality preparation material for collagen peptide. The deep processing of fish skin can not only reduce the waste of resources but also expand the processing mode of puffer fish in China. In this research, *Fugu bimaculatus* collagen peptide (FBCP) was prepared by conducting a single factor experiment and an orthogonal experiment, in which, the cosmetic efficacy and skin irritation of FBCP were studied. The optimum enzymatic hydrolysis conditions of FBCP by alkaline proteinase were determined as follows: the solid-liquid ratio was 1:10, with the enzymolysis temperature as 50 °C, 8 000 U/g of quantity of enzyme, with enzymolysis pH as 9 and the enzymolysis time as 4 h. The peptide yield of FBCP from the skin is 39.65% under these conditions. Ultrafiltration membranes were selected and four components of FBCP with different molecular weights, namely, FBCP1 (Mw < 1 kDa), FBCP2 (1 kDa < Mw < 5 kDa), FBCP3 (5 kDa < Mw < 10 kDa), and FBCP4 (Mw > 10 kDa), were separated, respectively. Besides, the result showed that the hygroscopicity and moisture retention of FBCP1 were better than those in other three components. Moreover, the results of

收稿日期:2019-10-17 接受日期:2020-06-17

基金项目:福建省海洋渔业结构调整专项(2020HYJG07);福建省种业创新与产业化工程(2017FJSCZY03);福建省海洋渔业结构调整专项(2017HYJG07)

* 通信作者 E-mail:13906008638@163.com

antioxidant test suggested that the FBCP1 radical scavenging rate was the highest, with the LC50 of $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ and DPPH radical scavenging tests as 1.659, 5.582 and 1.801 mg/mL, respectively. Multiple skin irritation and acute eye irritation experiments showed that application of up to 50% (W/V) FBCP was not irritating to the rabbit skin and rabbit eyes. In summary, FBCP has excellent anti-oxidation and moisturizing effects, along with non-irritating to skin and eyes, thus capable of providing a basic reference for its application in cosmetics.

Key words: *Fugu bimaculatus*; skin collagen polypeptide; cosmetic effect; irritation evaluation

河豚鱼肉味鲜美,营养丰富,尤其在亚洲国家被视为美味。双斑东方鲀是福建省养殖河豚的主要品种之一。养殖双斑东方鲀品质优良、毒性较低,其中鱼皮与鱼肉均为无毒级别,可安全食用。目前双斑东方鲀的加工尚处于起步摸索阶段,加工制品种类少且加工深度不足。鱼皮作为双斑东方鲀的无毒部分,其深度加工利用和高附加值产品的研发,对于充分利用河豚鱼资源,提高加工技术含量,调整河豚鱼产业结构都具有重要的意义。

水解胶原多肽能为人体胶原蛋白的合成提供优质的氨基酸原料,促进皮肤胶原蛋白合成,提高皮肤保水能力,减少皱纹形成,延缓皮肤衰老,是一种优质的化妆品添加剂。河豚鱼皮中蛋白质含量占干重的80%以上,其中胶原蛋白占总蛋白质的90%左右,是一种优质的胶原蛋白及胶原多肽原料。本研究以双斑东方鲀鱼皮为实验对象,利用碱性蛋白酶酶解获得双斑东方鲀鱼皮胶原多肽(*Fugu bimaculatus* collagen peptide, FBCP),明确最佳酶解工艺,分析不同分子量FBCP的保湿和抗氧化性能,并对FBCP皮肤刺激性和眼刺激性进行评估,为FBCP在化妆品中的应用提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 实验试剂

碱性蛋白酶(B8360)购于北京索莱宝科技有限公司;猪胶原多肽粉(ARTHRED™ P Standardized)和牛胶原多肽粉(ARTHRED™ Standardized)购于嘉吉生化有限公司;邻苯三酚、水杨酸、 H_2O_2 及其他常规试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验动物

双斑东方鲀(*Fugu bimaculatus*),购于漳州市漳浦县福建鸿鲀水产养殖有限公司,生产许可证号:闽(浦渔2018)海渔苗种许字01号;成年新西兰白兔,体重2.0~2.5 kg,实验动物采购及刺激性评价均委托国家化妆品质量监督检验中心进行。

1.3 仪器

绞肉机(MM12,广东韶关市食品机械厂),真空冷冻干燥机(SCIENTZ-10N,宁波新芝生物科技股

份有限公司),酶标仪(M200 Pro, Tecan),凯氏定氮仪(Kjeltec™400, FOSS), pH计(MID5X, METTLER TOLEDO),数显恒温水浴锅(SCIENTZ-10N,宁波新芝科技股份有限公司),分析天平(BSA224S, SRTORIUS),多探头皮肤测试系统(MPA4, CK公司),电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9146A,上海精宏实验设备有限公司)。

2 实验方法

2.1 双斑东方鲀鱼皮基本组分分析

分别按照 GB5009.5-2010、ISO3496:1994(E)、GB/T5009.3-2010、GB5009.6-2003 和 GB5009.4-2010,测定样品的粗蛋白含量、羟脯氨酸含量、水分含量、脂肪含量和灰分含量。

2.2 FBCP 提取工艺

双斑东方鲀经皮肉分离后,去除鱼鳍,之后将干净鱼皮切成(约 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$)碎片,冷冻干燥,备用。冻干处理后的鱼皮浸泡浓度为9% NaCl溶液(1:30)^[1],连续搅拌24 h,每12 h换一次NaCl溶液,浸泡后用蒸馏水水洗鱼并用尼龙纱过滤,重复3次,除去非胶原蛋白。

鱼皮经过预处理后,按一定的料液比加入纯水,调节pH和酶解温度,加入碱性蛋白酶进行酶解。酶解完成后,100℃将酶灭活10 min,待酶解液冷却至室温,调节酶解液的pH至中性,离心取上清,经超滤膜分离得到4种不同分子量的双斑东方鲀鱼皮胶原多肽组分。冷冻干燥获得胶原多肽粉末。

2.3 FBCP 提取单因素实验

以肽得率为指标,研究酶用量、温度、时间、pH四个因素对双斑东方鲀鱼皮酶解效果的影响,以确定各因素的最佳酶解条件。酶解的基本条件为加酶量4 000 U/g,温度50℃,时间4 h, pH 9.0,料液比1:10。选择固料比1:10为固定参数,改变其他任意一个条件,分别考察酶添加量(4 000、6 000、8 000、10 000、12 000 U/g)、酶解温度(45、50、55、60、65℃)、酶解时间(1、2、3、4、5 h)和pH(7.0、8.0、9.0、10.0、11.0)对酶解效果的影响。

2.4 FBCP 提取正交试验

本研究根据以上的单因素实验分析结果,选择固料比 1:10 为固定参数,以肽得率为指标,设计酶

解温度、酶解时间、酶解 pH 值、加酶量的四因素三水平正交实验 $L_9(3^4)$ (表 1)。

表 1 正交因素水平

Table 1 The factors and levels of orthogonal test

组别 Group	A	B	C	D
	温度 Temperature(°C)	酶添加量 Additive amount of enzyme(U/g)	时间 Time(h)	pH
1	40	4 000	2	7
2	50	6 000	4	9
3	60	8 000	6	11

2.5 肽得率的测定

采用三氯乙酸(TCA)沉淀法结合甲醛滴定法测得肽得率^[2]。主要原理是利用 TCA 沉淀酶解液中的大分子蛋白质,继而以凯氏定氮法测定上清液中可溶性氮的含量,随后减去上清中氨态氮(游离氨基酸)的含量,再与酶解样品中的总氮量相比,从而确定其多肽得率。计算公如下:

蛋白肽得率 =

$$\frac{\text{TCA 沉淀后上清液中蛋白含量} - \text{上清液氨态氮总}}{\text{酶解样品总蛋白含量}} \times 100\%$$

具体方法为取酶灭活后的胶原多肽提取液 10 mL,加入等量 30% TCA 溶液,充分混匀,静置 10 min,4 000 rpm 离心 10 min。取 2 mL 离心后的上清液,凯氏定氮测其蛋白质含量,再取 2 mL 上清液定容至 10 mL,以酚酞作指示剂取 5 mL 稀释液加入中性甲醛溶液 2 mL 混匀,于 0.05 mol/L 的标准氢氧化钠滴定至紫红色(pH 值 8.7~9.0)。记录消耗氢氧化钠体积。氨态氮含量计算公式如下:

$$\text{氨态氮} = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.014}{m \times V_3 / V_4} \times 100\%$$

其中, V_1 :待测液消耗氢氧化钠体积,单位为毫升(mL); V_2 :滴定空白对照消耗氢氧化钠体积,单位为毫升(mL); c :标准氢氧化钠溶液的摩尔浓度; 0.014:与 1.00mL 氢氧化钠标准滴定溶液 [(NaOH) = 1.00 mol/L] 相当于氮的质量(g); m :称取式样的质量(g); V_3 :式样稀释液的取用量(mL); V_4 :式样稀释液的定容体积(mL)。

2.6 FBCP 化妆品功效性研究

依次通过截留分子量为 10、5、1 kDa 的超滤膜,分离得到四种不同分子量的河鲀鱼胶原多肽组分

FBCP1 ($M_w < 1$ kDa)、FBCP2 ($1 \text{ kDa} < M_w < 5$ kDa)、FBCP3 ($5 \text{ kDa} < M_w < 10$ kDa) 和 FBCP4 ($M_w > 10$ kDa)。经冻干得到四种组分河豚鱼胶原多肽粉末。同时购买市售猪皮和牛皮来源的胶原多肽,同双斑东方鲀鱼皮胶原多肽进行对比。

2.6.1 吸湿保湿功效研究

将不同胶原多肽粉末置于 105 °C 的烘箱中充分干燥至衡重。选用两个相同大小的干燥器,分别在底部加入饱和硫酸铵和饱和碳酸钾溶液,使之分别维持 70% 的相对湿度(RH)及 40% 的相对湿度(RH),其中 RH = 70% 模拟夏天空调房最佳湿度, RH = 40% 模拟冬天空调房最佳湿度。胶原多肽各取 1 g 分别置于两个干燥器内,在保持环境温度为 25 °C 左右的条件下放置 2、4、6、8、10 h,取出后精确称量并计算得出吸湿率^[1,3]。计算公式为:

$$\text{吸湿率} = \frac{W_n - W_0}{W_0} \times 100\%$$

其中: W_0 :放置前样品质量(g); W_n :放置后样品质量(g)。

胶原多肽各取 1 g 分别加入 2 mL 蒸馏水充分溶解后置于干燥器内,放置 2、4、6、8、10 h,称量并计算出保湿率^[1,3]。计算公式为:

$$\text{保湿率} = \frac{H_n}{H_0} \times 100\%$$

其中: H_0 :放置前样品质量(g); H_n :放置后样品质量(g)。

2.6.2 抗氧化功效研究

2.6.2.1 超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)清除能力测定

利用邻苯三酚自氧化法研究 FBCP 清除 $O_2^{\cdot -}$ 能力。具体方法^[1]为:取 10 mL 试管,依次分别加入 50 mmol/L、pH = 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 4.7

mL、去离子水 4 mL,充分混匀后于 25 ℃ 水浴锅中保温 10 min,取出后加入 0.3 mL 已预热的 5 mmol/L 邻苯三酚(以 10 mmol/L HCl 配置),充分混匀后于波长 320 nm 下分别测定 1 min 和 4 min 吸光值,并按以下公式计算邻苯三酚自动氧化速率:

$$\Delta A_0 = \frac{A_4 - A_1}{A_3} \times 100\%$$

其中: A_0 :邻苯三酚的自氧化速率; A_1 :第 1 min 的 OD 值; A_4 :第 4 min 的 OD 值。

胶原多肽抑制邻苯三酚自氧化速率的测定:分别依次加入 50 mmol/L、pH = 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 4.7 mL 以及不同浓度的胶原多肽溶液 4 mL,于 25 ℃ 水浴锅中保温 10 min,取出后加入 0.3 mL 已预热的邻苯三酚立即混匀并同上测定 OD 值并计算自氧化速率 ΔA 。胶原多肽对超氧离子的清除率计算公式如下:

$$O_2^- \text{ 清除率} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \times 100\%$$

其中: ΔA_0 :邻苯三酚的自氧化速率; ΔA :加入待胶原多肽后邻苯三酚的自氧化速率。

2.6.2.2 羟基自由基($\cdot OH$)清除能力测定

测定方法参考 Zhang 和 Ding 等方法^[46],具体如下,取 10 mL 试管依次加入 $FeSO_4$ (9 mmol/L) 1 mL、水杨酸-乙醇(9 mmol/L) 1 mL、不同浓度胶原多肽溶液 1 mL,混匀后加入 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL 启动反应,37 ℃ 水浴加热反应 30 min,以蒸馏水为参照,在 510 nm 下测量吸光值。以不添加 H_2O_2 的溶液为待测溶液的本底吸收值。清除率计算公式如下:

$$\cdot OH \text{ 清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\%$$

其中: A_0 :空白对照液的吸光度; A_x :加入胶原多肽后的吸光度; A_{x0} :不加显色剂 H_2O_2 的待测溶液本底的吸光度。

2.6.2.3 二苯代苦味酰自由基(DPPH)清除能力测定

具体方法^[5,7]为,取 5 mL 离心管加入不同浓度胶原多肽溶液 2 mL,加入 2 mL 0.1 mmol/L DPPH·乙醇溶液,混匀避光反应 20 min,在 517 nm 测得吸光值。以乙醇与不同浓度胶原多肽溶液等量混合液为对照管,DPPH 溶液与去离子水等量混合后为空白管,清除率计算公式如下所示:

$$DPPH \text{ 清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\%$$

其中: A_x :加入待测样品后的吸光度; A_{x0} :待测样品与乙醇混合液的本底吸光值; A_0 :DPPH 溶液与去离子水等量混合液的吸光值。

2.7 FBCP 的皮肤刺激及眼刺激评价

2.7.1 多次皮肤刺激实验

采用自体对照方式,选择健康、成年、皮肤无损的白色家兔 4 只,试验前 24 h 用 8% 硫化钠将试验动物背部脊柱两侧背毛去除,去除面积左右各约 3 cm × 3 cm,将 0.5 mL 50% (W/V) 双斑东方鲀鱼皮胶原多肽溶液涂抹于一侧,另一侧作为空白对照,每天涂抹一次,涂抹后清洗观察皮肤状态,连续涂抹观察 14 天。第二天开始,每次涂抹前剪毛,用水清除残留受试物。涂抹 1 h 后观察结果,根据 2015 年版《化妆品卫生规范》^[8] 中皮肤刺激性反应评分标准对实验结果进行评分,计算给药动物积分均值,并对照皮肤刺激强度评分表判定皮肤刺激强度。

2.7.2 急性眼刺激试验

按照《化妆品卫生规范》2015 版所示方法^[8] 进行测定,试验开始前 24 h 对受试动物眼睛进行检查,选用眼睛健康的受试动物,将 50% (W/V) 双斑东方鲀鱼皮胶原多肽溶液滴入受试动物一只眼睛结膜囊中,使上、下眼睑被动闭合 1 s,另一侧眼睛作空白对照对照,30 s 后用水安全流速冲洗 30 s。滴入受试物后分别 1、24、48、72 h 以及第 4 天、第 7 天对受试动物眼睛进行检查,根据眼损害的评分标准记录受试动物眼刺激反应进行积分,若观察 72 h 未出现刺激反应,即可终止试验。若发现眼刺激作用且 7 天内不可恢复,则为确定该损害的可逆性或不可逆性,需延长观察时间。根据受试动物角膜、虹膜或结膜分别在 24、48 或 72 h 观察点的刺激反应的最高积分和恢复时间,根据眼刺激反应分级表确定受试物对眼的刺激强度。

3 结果与讨论

3.1 双斑东方鲀鱼皮基本组分分析

双斑东方鲀鱼皮中,胶原蛋白含量占鱼皮的 23.80%,占粗蛋白的 88.08% (表 2)。可见胶原蛋白是双斑东方鲀鱼皮的主要蛋白质,具有极高的利用价值,这为提取胶原多肽及研究河鲀鱼皮胶原多肽活性提供了研究基础。Zhang 等^[9] 测定了暗纹东方鲀鱼皮基本成分:水分含量 75.65%、粗蛋白含量 96.53% (干重)、胶原蛋白含量 88.50% (干重),胶原蛋白占总蛋白含量的 91.68%。任俊风测定红鳍东方鲀鱼皮基本成分,总蛋白含量 97.3%,胶原蛋

白含量 87.6%, 胶原蛋白占总蛋白含量的 90%^[10]。本研究结果与文献报道其他品种河鲀鱼皮基本成分结果相似, 这间接表明了本研究结果的真实可靠性,

亦表明双斑东方鲀鱼皮是胶原蛋白的良好来源, 也为后续胶原多肽的提取实验奠定了良好的基础。

表 2 双斑东方鲀鱼皮基本成分

Table 2 Elementary composition of the skin of *F. bimaculatus*

成分 Composition	水分 Water	胶原蛋白 Collagen	粗蛋白 Total protein	脂肪 Fat	灰分 Ash
含量 Content	70.32%	23.80%	27.02%	0.97%	0.93%

3.2 FBCP 提取单因素分析

结果如图 1 所示, 伴随温度的升高, 肽得率呈现先增加后下降的趋势。在 45 ~ 50 °C 的温度范围内, 反应温度的升高促使酶促反应速度加快, 能高效酶解河鲀鱼皮, 当温度高于 50 °C 时胶原多肽得率显著降低。随着酶解时间的延长, 肽得率逐渐上升, 当酶解时间大于 4 h 时, 肽得率无明显差异。因此初步

确定 4 h 为适宜酶解时间。在 pH 值为 9.0 时肽得率达到最高, 低于 9.0 或高于 9.0 肽得率均有所下降。随着加酶量增加, 肽得率呈现一种先上升后下降的趋势。酶添加量为 8 000 U/g 时, 肽得率达到最大值, 由此选择 8 000 U/g 为酶解反应的适宜加酶量。因此, 最终选择温度 50 °C, 酶解 4 h, pH 9.0, 8 000 U/g 的加酶量作为正交实验的基础。

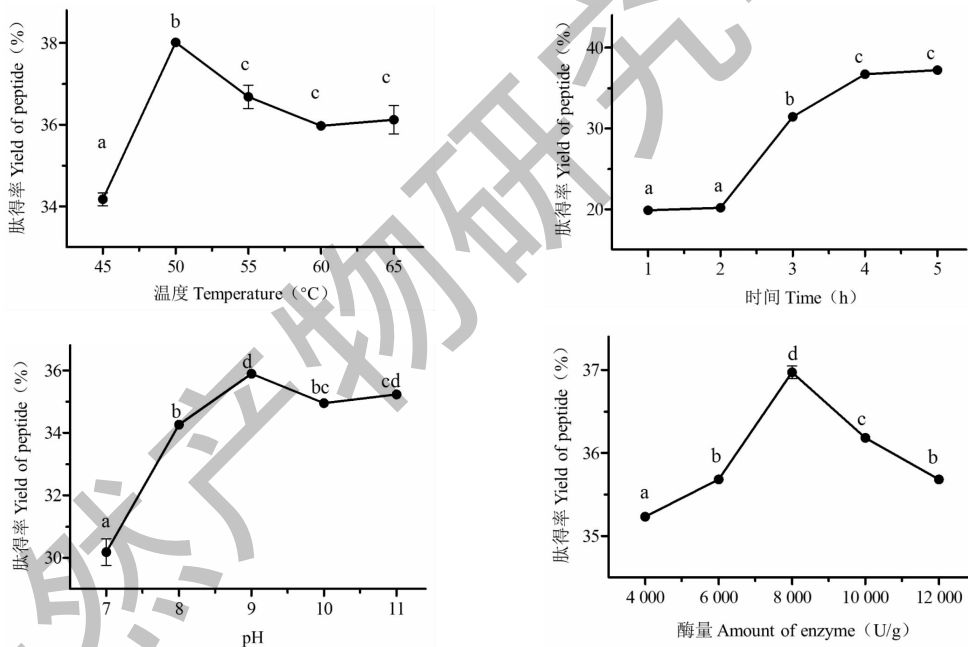


图 1 酶解条件对肽得率的影响

Fig. 1 The effect of hydrolysis condition on peptide yield

注: 数据进行 One-way ANOVA 方差分析, 并用 Tukey 法多重比较法进行差异显著性分析。同一列中标有不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$); 标有相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。Note: The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. The different letter in the same column means significant difference between groups ($P < 0.05$); the same letter indicates no significant difference ($P > 0.05$).

3.3 FBCP 正交试验分析

通过正交试验分析, 可知该实验中对肽得率的影响主次顺序为温度 > 加酶量 > 酶解 pH 值 > 时间 (表 3)。对正交试验进行方差分析可知 (表 4), 温度、加酶量、酶解 pH 三因素均达到极显著水平, 酶

解时间对肽得率无显著影响, 结合单因素实验结果和时间成本双重方面考虑, 选择酶解时间为 4 h, 因此通过极差分析得出的河鲀鱼皮胶原多肽的最佳提取工艺为 $A_2B_3D_2C_2$, 即料液比 1: 10、酶解温度 50 °C、加酶量 8 000 U/g、酶解 pH 值 9.0、酶解时间 4

h。采用上述工艺条件进行实验验证,三次平行实验 39.93%、39.65%、39.37%。测得的双斑东方鲀鱼皮胶原多肽的提取率分别为

表3 正交实验分析表

Table 3 The factors and levels of orthogonal test

试验号 No.	A	B	C	D	肽得率 Yield of peptide (%)
	温度 Temperature(℃)	酶添加量 Additive amount of enzyme(U/g)	时间 Time(h)	pH	
1	1	1	1	1	36.14
2	1	2	2	2	37.68
3	1	3	3	3	37.27
4	2	1	2	3	36.21
5	2	2	3	1	37.33
6	2	3	1	2	38.31
7	3	1	3	2	35.14
8	3	2	1	3	35.07
9	3	3	2	1	35.47
K ₁	111.090	107.490	109.520	108.940	-
K ₂	111.849	110.079	109.360	111.130	-
K ₃	105.681	111.051	109.740	108.549	-
k ₁	37.030	35.830	36.507	36.313	-
k ₂	37.283	36.693	36.453	37.043	-
k ₃	35.227	37.017	36.580	36.183	-
R	2.056	1.187	0.127	0.860	-

A > B > D > C

表4 方差分析表

Table 4 Analysis of variance table

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	显著水平 Significance
A	7.54	2	3.77	377	**
B	2.26	2	1.33	133	**
C	0.02	2	0.01	1	-
D	1.22	2	0.61	61	**
总变异 Total variation	-	8	-	-	-

注: *表示差异显著($P < 0.05$); **表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: * Significant difference ($P < 0.05$); ** Extremely significant difference ($P < 0.01$).

3.4 双斑东方鲀鱼皮胶原多肽在化妆品中的功效性研究

3.4.1 吸湿保湿功效测定

在高湿度环境(RH = 70%)和低湿度环境(RH = 40%)中,不同试样的吸湿率都随时间的推移而逐渐增大(图2),说明各试样均具有良好的吸湿性。

吸湿 10 h 后,甘油的吸湿率最高,其次为 FBCP1,分别为 $4.54\% \pm 0.12\%$ (RH = 40%) 和 $4.13\% \pm 0.08\%$ (RH = 70%), FBCP1 的吸湿率均高于其余胶原多肽,且 FBCP1 的吸湿率在不同湿度环境下变化不显著。由各试样的保湿率测定结果可知,在 RH 为 40% 和 70% 环境下,各试样具有一定的保湿

能力。甘油保湿率最高, FBCP 各组分中 FBCP1 较

其余胶原多肽同样具有较好的保湿效率。

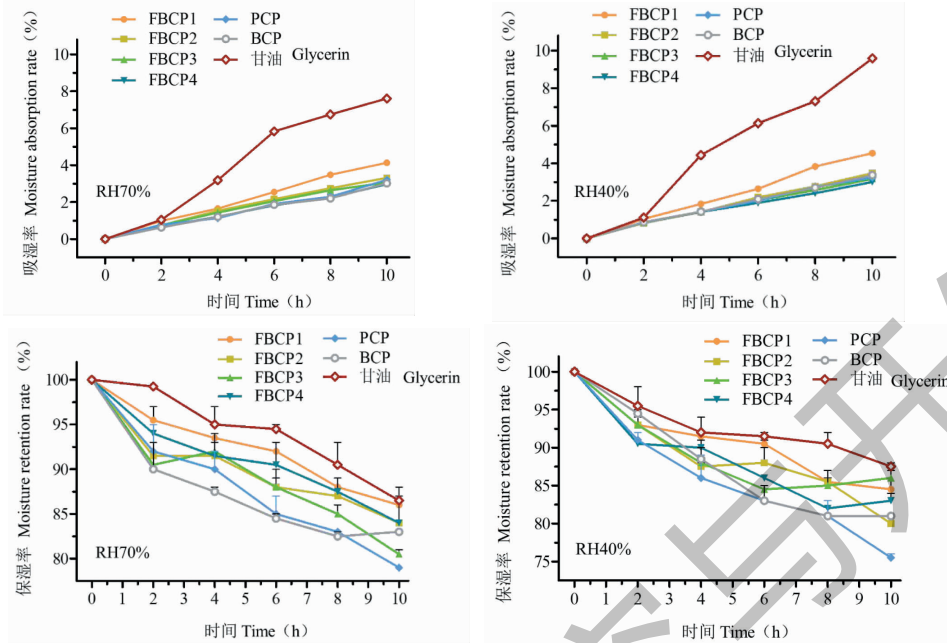


图2 不同湿度条件下吸湿率与保湿率测定

Fig. 2 Moisture-absorbing and moisture-retention capacities at different RH

从上述吸湿保湿活性测定结果看出,四种组分中 FBCP1 具有更优越的吸湿性和保湿性。吸湿性是物质吸附或摄取水分的能力,保湿性是物质保持水分的能力,多肽可通过氨基酸侧链和蛋白质的肽键与水分子间的相互作用,防止水分蒸发,是良好的吸湿和保湿剂^[11]。不同多肽分子对水分子的作用力不同,吸收水分和保持水分的能力也不同^[12]。FBCP1 分子量小,可能结构上相较于其他三种组分暴露出更多的亲水基团(氨基、羧基和羟基等),对水分子结合力强,吸收水分和保持水分的能力也较大。

3.4.2 抗氧化功效测定

比较不同胶原多肽对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH 的清除作用(图3)后发现,试样对三种自由基都具有不同程度的清除作用,清除率随着浓度增高而增大。当浓度为4和5 mg/mL时,FBCP1 的 $O_2^{\cdot-}$ 清除率较其他胶原多肽高,且具有显著差异。当浓度为15 mg/mL时,FBCP1 的 $\cdot OH$ 清除率较其他5种胶原多肽有显著提高。由 FBCP 对 DPPH 的清除率结果可知,FBCP1 与 BCP 和 PCP 抗氧化效果相当,是4种分子量 FBCP 中清除率最高的胶原多肽。由表5可看出,FBCP1 对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH 的 IC_{50} 分别

为1.659、5.582和1.801 mg/mL,均小于其余5种胶原多肽,因此 FBCP1 具较理想的抗氧化能力。近年研究发现低分子量的多肽往往具有较高的抗氧化活性。Liu 等^[13]将鳕鱼皮胶原多肽分离纯化分为分子量小于1 kDa、1~5 kDa、大于5 kDa三种组分,并比较其对 $\cdot OH$ 和 DPPH 的清除能力,实验结果表明分子量小于1 kDa的胶原多肽对 DPPH 和 $\cdot OH$ 的清除力强于另外两种分子量肽。Cai 等^[14]利用碱性蛋白酶酶解草鱼鱼皮后分离纯化得到分子量小于3 kDa、3~5 kDa、5~10 kDa、大于10 kDa四种组分并研究其对 $O_2^{\cdot-}$ 和 DPPH 的清除能力,结果表明分子量小于3 kDa的抗氧化性优于其他三个组分。海参多肽经超滤分离后分子量小于3 kDa的组分对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的清除能力最强,抗氧化活性呈现出随分子量降低而增强的趋势^[15]。

3.5 双斑东方鲀鱼皮胶原多肽多次皮肤刺激及眼刺激测定

3.5.1 多次皮肤刺激实验

多次皮肤刺激试验结果如下表所示,涂抹 FBCP 溶液14天后,4只受试兔皮肤均未见红斑和水肿,计算获得每天每只动物的积分均值为0,因此涂抹50%双斑东方鲀胶原多肽溶液对皮肤无刺激性。

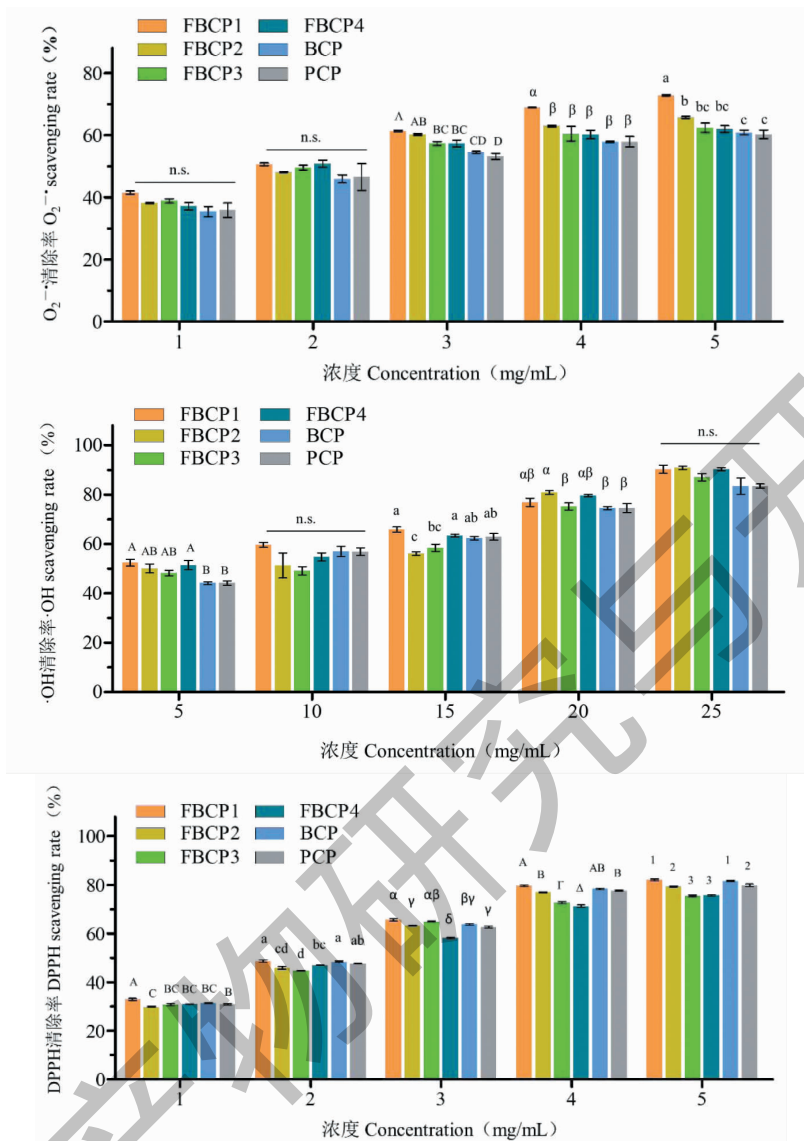


图3 FBCP对自由基的清除作用

Fig. 3 Scavenging capacity of FBCP on free radical

注:数据进行 One-way ANOVA 方差分析,并用 Tukey 法多重比较法进行差异显著性分析。同一列中标有不同字母或数字表示组间差异显著 ($P < 0.05$);标有相同字母或数字表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。Note:The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. The different letter in the same column means significant difference between groups ($P < 0.05$);The same letter indicates no significant difference ($P > 0.05$).

表5 不同胶原多肽及谷胱甘肽自由基清除 IC_{50} 比较

Table 5 Comparison of IC_{50} of free radical scavenging capacity among different collagen peptides and glutathione

自由基 Free radical	IC_{50} (mg/mL)						
	FBCP4	FBCP3	FBCP2	FBCP1	PCP	BCP	谷胱甘肽 Glutathione
$O_2^{\cdot -}$	2.087	2.037	1.966	1.659	2.488	2.470	0.256
$\cdot OH$	6.192	7.309	6.907	5.582	7.068	7.075	1.735
DPPH	2.069	2.013	1.974	1.801	1.871	1.921	0.414

表6 FBCP 皮肤刺激性测定
Table 6 Dermal irritation test of FBCP

测试项目 Test item	刺激反应积分 Irritation score					
	样品组 FBCP group			对照组 Control group		
	红斑 Erythema formation	水肿 Edema formation	总分 Total score	红斑 Erythema formation	水肿 Edema formation	总分 Total score
每天每只动物积分均值 Mean irritation score per day per animal	0	0	0	0	0	0

3.5.2 急性眼刺激实验

急性眼刺激实验结果如下表所示,滴入 50% (W/V)FBCP 溶液后,3 只受试兔眼睛的结膜未见

充血,角膜未见浑浊异常,虹膜正常,观察点的刺激反应的积分均为 0,因此滴入 50% 双斑东方鲀胶原多肽溶液对眼无刺激性。

表7 FBCP 急性眼刺激测定
Table 7 Acute eye irritation test of FBCP

部位 Parts of eye	眼刺激性反应积分 Eye irritation score											
	1 h		24 h		48 h		72 h		4 天		7 天	
	样品 FBCP	对照 Control	样品 FBCP	对照 Control	样品 FBCP	对照 Control	样品 FBCP	对照 Control	样品 FBCP	对照 Control	样品 FBCP	对照 Control
结膜 Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
虹膜 Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
角膜 Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

本研究通过多次皮肤刺激实验和急性眼刺激实验等体内实验测定 FBCP 的刺激性,实验结果均表明 FBCP 无刺激性。大量研究已证实了鱼源水解胶原多肽的无刺激性,Li 等^[16]开展了罗非鱼鱼皮胶原多肽复配润肤霜的安全性研究,实验结果表明添加罗非鱼鱼皮胶原多肽的润肤霜无任何刺激作用,Zhou 等^[17]研究了口服小分子鱼胶原蛋白粉对改善女性面部肤质的有效性和安全性,受试组面部皮肤的细纹、毛孔、纹理、紫质、水份、油脂改善明显,且无明显不良反应,具有较好的安全性和有效性。上述实验均表明鱼皮胶原多肽作为护肤品原料的可行性,这为后续研制开发双斑东方鲀鱼皮胶原多肽化妆品奠定了基础。

4 结论

本研究利用现代酶学技术,通过单因素和正交实验,确定了制备具有较高肽得率的 FBCP 的最佳酶解工艺条件:碱性蛋白酶为水解酶,料液比 1:10、酶解温度 50 °C、加酶量 8 000 U/g、酶解 pH 值 9.0、

酶解时间 4 h。本研究提取的 FBCP 在抗氧化、体内外保湿方面均有显著效果。研究表明,FBCP1 (< 1kD)具有最佳的自由基清除能力和保湿吸湿能力。同时,FBCP 不具有皮肤刺激性和眼刺激性,作用温和,这为将来用于化妆品的添加剂提供理论基础。

参考文献

- 1 Zhu HZ. Study on the extraction of collagen peptide from *Acaudina molpadioide* and the application in cosmetics[D]. Fuzhou:Fujian Agriculture and Forestry University(福建农林大学),2011.
- 2 Zhao YL. Preparation and sepatation of short peptides by controlled-enzymatic hydrolysis of sodium caseinate [D]. Guangzhou:South China University of Technology(华南理工大学),2003.
- 3 Shi CS,Cui FL,Zhang HG,et al. Research on the function of normal moisturizing medication in cosmetic[J]. Deterg Cosmet (日用化学品科学),2007,30(1):25-30.
- 4 Zhang Q,Zhang LM. Study on the antioxidative activity of

- ferulate of *Poria cocos* polysaccharides [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技),2011,27:1077-1080.
- 5 Ding YR, Chen S, Zhu ZS, et al. Fermentation condition and antioxidant activity of kombucha[J]. Food Sci Technol(食品科技),2016,41(3):21-26.
 - 6 Qu ZC, He QX, Li XE, et al. Multiple efficiency and safety of baicalein in cosmetics[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:2006-2010.
 - 7 Li Y, Zhao MM, Yu LM, et al. Purification of proanthocyanidins from *Pinus massoniana*' s bark on macroporous adsorption resins and studies on its antioxidant activities[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业),2006,32(12):145.
 - 8 Ministry of Health of the People's Republic of China(中华人民共和国卫生部). Hygienic Standard for Cosmetics(化妆品卫生规范)[S]. 2015.
 - 9 Zhang YP, Xie RW, Sun JP, et al. Study on the extracting process of gelatin from balloonfish[J]. J Fujian Fish(福建水产),2011,33(4):5-8.
 - 10 Ren JF, Ren TT, Zhu BW. Studies on the extraction and antioxidant activity of the collagen peptide from pufferfish (*Fugu rubripes*) skin[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报),2009,9(1):77-83.
 - 11 Chen XL, Liu P, Chen FS. Determination of antioxidative and moisture absorption and moisture retention properties of wheat bran peptide[J]. J Qilu Univ Technol(齐鲁工业大学学报),2018,32(2):8-12.
 - 12 Qin YR, Wang CT, He CF, et al. A method for *in vitro* evaluation of moisturizing function of a single moisturizing agent [J]. China Surf Deterg Cosmet(日用化学工业),2006,36:199-201.
 - 13 Liu Q, Li H, Zhao L, et al. Study on functional properties and antioxidation activity of collagen polypeptide from codfish skin[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2012,33(1):135-137.
 - 14 Cai LY, Leng LP, Li XX, et al. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of different molecular weight peptide fractions from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2017,38(12):58-64.
 - 15 Wang J. Preparation of peptides from enzymic hydrolysates of *Stichopus japonicus* and its antioxidant properties *in vitro* [D]. Yantai: Yantai University(烟台大学),2010.
 - 16 Li JC, Kong SZ, Li DD, et al. Application and properties of collagen peptide from tilapia skin in moisturizing cream[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2018,39(5):23-29.
 - 17 Zhou SL, Wang HY, Yue DX, et al. Clinical effects and safety of oral treatment with low-molecular fish collagen hydrolysate on female facial skin properties[J]. J Pract Dermatol(实用皮肤病学杂志),2011,4(3):143-146.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				