

中华圆田螺肉抗氧化肽的分离纯化及小鼠体内外活性研究

Purification of antioxidant peptides from the meat of *Oncomelania sinensis* and its in vivo and in vitro of mice activity

吴明泽 王 笑 胡祥昊 马青琳

WU Ming-ze WANG Xiao HU Xiang-hao MA Qing-lin

李亚男 董丹华 高 鹏 代 龙

LI Ya-nan DONG Dan-hua GAO Peng DAI Long

(山东中医药大学国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 山东 济南 250355)

(Third Level Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China)

摘要:采用超滤、大孔树脂、凝胶过滤色谱和半制备液相色谱对中华圆田螺肉的酶解液进行分离纯化,以 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、铁离子还原能力 (FRAP)、氧自由基吸收能力 (ORAC) 为指标,制备抗氧化肽,并通过小鼠体内抗氧化酶活性及 MDA 生成量进行测定试验。结果表明:分子质量 < 1 kDa 部位的抗氧化活性最强,分离出的混合物抗氧化肽纯度达到 90%。体外抗氧化活性显示,该抗氧化肽的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、ORAC 均为最高,且 ORAC 与谷胱甘肽相比效果无显著差异 ($P > 0.05$),通过小鼠体内抗氧化酶及 MDA 增加值的测定显示,除 GSH-Px 外,试验组与谷胱甘肽阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$),说明试验所获得的抗氧化肽具有和谷胱甘肽相当的抗氧化活性,具有深层的开发利用价值。

关键词:中华圆田螺;肉;肽;抗氧化;体内外活性

Abstract: Ultrafiltration, macroporous resin, gel filtration chromatography and semi preparative liquid chromatography were used to separate and purify the enzymatic hydrolysate of Chinese roundabout meat, DPPH free radical scavenging rate, ABTS radical scavenging rate, iron reduction capacity (FRAP) and oxygen

free radical absorbability (ORAC) were used as indicators to prepare antioxidant peptides with high purity and strong antioxidant activity. Enzyme activity and MDA production were measured. The results showed that the antioxidant activity of the enzyme hydrolysate after ultrafiltration was the strongest when the molecular weight was < 1 kDa. Macroporous resin, gel filtration chromatography and semi preparative liquid chromatography were used to isolate the mixture containing antioxidant peptides (the purity of antioxidant peptide reached 90%). In vitro antioxidant activity showed that DPPH free radical scavenging rate, ABTS free radical scavenging rate and ORAC of the antioxidant peptide were the highest, and there was no significant difference between ORAC and glutathione ($P > 0.05$). Through the determination of antioxidant enzymes and MDA increase value in mice, except for GSH-Px, there was no significant difference between the test group and glutathione positive control group ($P > 0.05$), indicating that the anti-inflammatory effect of this study was obtained. Oxidized peptide has the same antioxidative effect as glutathione, and has deep development and utilization value.

Keywords: *Cipangopaludina chinensis*; meat; peptide; antioxidant; in vitro and in vivo activity

基金项目:国家自然科学基金(编号:81073031);山东省自然科学基金(编号:ZR2011HM051);山东省重点研发计划(编号:2017YYSP014)

作者简介:吴明泽,男,山东中医药大学在读硕士研究生。

通信作者:代龙(1964—),男,山东中医药大学教授,博士生导师,硕士。E-mail:shouyaodruglab@163.com

收稿日期:2019-09-06

中华圆田螺俗名田螺、香螺,属软体动物门腹足纲田螺科圆田螺属^[1],广泛分布于稻田、湖泊、沼泽、河流、小溪等处,是淡水螺中较大型的食用螺^[2]。田螺肉丰腴红腻,味道鲜美,营养丰富,每 100 g 内含蛋白质 18.2 g、脂肪 0.6 g,还有磷、钙、铁、 V_B 以及丰富的 V_A 等,是典型的高蛋白、低脂肪的天然保健食品^[2]。郑汉丰等^[3]研究表

明,中华圆田螺肉富含人体必需的 8 种氨基酸,必需氨基酸占总氨基酸的比例均在 35%左右,与 WHO/FAO 模式推荐的模式(35.38%)接近。

氧化应激是指机体内产生过多活性氧簇(ROS)自由基,超出机体清除能力,导致体内氧化系统与抗氧化系统失衡^[4]。而体内氧化还原状态失衡与慢性代谢性疾病,如心脑血管疾病、糖尿病、类风湿性关节炎和癌症发生、发展等^[5-6]有关。目前,中华圆田螺资源开发集中在普通食品及饲料行业,杨丽丽等^[1]已发现中华圆田螺抗菌肽对人体肺癌细胞 A549 细胞的生长抑制作用,但对其他生物活性尤其是抗氧化活性的研究开发尚未见报道。

试验拟在前期研究的基础上,通过碱性蛋白酶、胰蛋白酶进行双酶酶解制备中华圆田螺肽,采用超滤、大孔树脂、葡聚糖凝胶色谱和半制备液相色谱对其进行分离纯化,以 1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)自由基清除率、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除率、铁离子还原能力(FRAP)、氧化自由基吸收能力(ORAC)为指标,进行活性追踪,制备获得活性较高的抗氧化肽,并通过小鼠体内抗氧化酶及 MDA 增加值的测定验证其体内抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

中华圆田螺:山东省济宁市微山湖田螺养殖场;

胰蛋白酶、碱性蛋白酶: 1.0×10^5 U/g,上海源叶生物科技有限公司;

昆明种封闭群小白鼠:动物合格证号 SCXK(鲁)2017-0011,雌雄各半,济南朋悦实验动物繁育有限公司;

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)Elisa 试剂盒、微量丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)、总抗氧化能力(T-AOC)测试盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒:武汉纯度生物科技有限公司;

偶氮二异丁脒盐酸盐(AAPH):美国 Secoma 公司;

荧光素钠(Fluorescein 2Na)、ABTS、DPPH:美国 Sigma 公司;

2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、还原型谷胱甘肽、水溶性 V_E :北京 Solarbio 公司;

超滤管:1 000,3 000 Da,美国 Millipore 公司;

葡聚糖凝胶:Sephadex G-10 型,北京 Solarbio 公司;

大孔树脂:DA201-C 型,上海源叶生物科技有限公司。

1.1.2 仪器设备

电脑自动部分收集器:BS-110 型,上海精科实业公司;

高速组织捣碎机:JJ-2 型,上海谷宁实业有限公司;

膜分离设备:1812 型,杭州瑞纳膜工程有限公司;

精密增力电动搅拌机:JJ-1 型,江苏省金坛市宏华仪器有限公司;

冷冻干燥机:FD-1A-50 型,北京博医康实验仪器有限公司;

半制备液相色谱系统:LC-20A 型,日本岛津株式会社;

紫外—可见分光光度计:UV-1800 型,日本岛津株式会社;

分析天平:X5105 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

高速冷冻离心机:GL-21M 型,湖南湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 田螺肉酶解液的制备 取田螺在水中滴加 3 滴香油养殖 3 d,80 °C 水煮田螺 15 min,充分洗净后,挑出田螺肉,置于冰箱冷冻保存备用。称取田螺肉 1 kg,加水 5 000 mL 匀浆,85 °C 加热 15 min,冷却,采用胰蛋白酶、碱性蛋白酶酶解,酶解条件为 pH 9、酶解温度 55 °C、每种酶的酶用量 3 000 U/g,酶解时间 3 h,酶解结束后,酶解液在 85 °C 下加热 10 min,5 000 r/min 离心 5 min,收集上清液冻干以获得酶解产物,使用前将其冷冻在 -20 °C 下保存。

1.2.2 田螺肉中抗氧化肽的分离纯化

(1) 超滤分段:取酶解液冻干粉,用水复溶,通过 1 000,3 000 Da 超滤膜分段为 <1 000,1 000~3 000,>3 000 Da 3 个部分,将冻干粉配制制成 1.2 mg/mL 溶液,测定各部位的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、铁离子还原能力(FRAP)、氧自由基吸收能力(ORAC),筛选出活性最强的部位进行下一步分离纯化。

(2) 大孔树脂分离纯化:取超滤后体外活性最强的部位冻干粉用水复溶,浓度为 10 mg/mL,将处理好的 DA201-C 大孔树脂装柱(16 mm×190 mm),样品上柱。大孔树脂柱分别用 3 BV 的去离子水、50%乙醇、75%乙醇洗脱,洗脱流速为 1 mL/min,收集各洗脱部位,浓缩冻干后配制为 1.2 mg/mL 溶液,测定其 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、铁离子还原力(FRAP)、氧自由基吸收能力(ORAC),筛选出活性最强的部位进行下一步分离纯化。

(3) 凝胶过滤色谱的分离纯化:去大孔树脂纯化后活性最强的部位冻干粉用水复溶,浓度为 25 mg/mL,将处理好的 Sephadex G10 装柱(20 mm×100 mm),样品上柱。先用去离子水平衡色谱柱,然后进行洗脱,洗脱溶剂为去离子水,洗脱流速为 1 mL/min,2 mL 收集一支 EP 管,在 280 nm 下检测其吸光度,收集各洗脱峰,浓缩并冻干制备成 1.2 mg/mL 溶液,测定其 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、铁离子还原能力(FRAP)、氧自

由基吸收能力(ORAC),选择活性最强的部位进行下一步的分离。

(4) 半制备液相色谱的分离纯化样品:凝胶过滤色谱所得最强活性部位冻干粉,用水复溶,过 0.22 μm 的微孔滤膜,制备样品,进半制备液相。参考王少平等^[7]的色谱条件进行半制备液相色谱分离纯化,收集各洗脱峰,冻干后制备为 1 mg/mL 溶液,检测其肽含量、DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、铁离子还原力(FRAP)、氧自由基吸收能力(ORAC)确定活性最强的部位。

1.2.3 肽纯度检测 将半制备液相色谱分离获得的活性最强部位,过 0.45 μm 滤膜后,利用分析型高效液相色谱仪检测其纯度。检测条件为: BAX-ZOR300SB-C₁₈ 柱(150 mm×6 mm, 5 μm),流动相 A: 0.1% 三氟乙酸(TFA);流动相 B: 乙腈 + 0.1% TFA;梯度洗脱: 0~50 min, 5% B~50% B; 50~65 min, 50% B~95% B;流速: 1 mL/min;检测波长: 280 nm;进样量: 10 μL 。

1.2.4 田螺肽的活性检测

(1) DPPH 自由基清除率的测定: 根据 Samad 等^[8]的测定方法,将 2 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液(溶剂为无水乙醇)和 2 mL 待测溶液混匀。在室温暗处静置 30 min 后,测量其在 519 nm 处的吸光度 A_t 。测定混有蒸馏水的待测溶液的吸光度 A_r 以及 DPPH 溶液的吸光度 A_0 。DPPH 自由基清除率 c 根据式(1)计算。

$$c = \frac{A_0 - (A_t - A_r)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

(2) ABTS 自由基清除率的测定: 参照 Dauthal 等^[9]用 ABTS 和过硫酸钾制备自由基溶液,以 2.45 mmol/L 的终浓度稀释在水中,并且在黑暗中放置 16 h 以允许自由基生长,稀释溶液以在 734 nm 处达到约 0.7 的吸光度 A_0 ,将 0.96 mL ABTS⁺ 自由基溶液与 0.04 mL 各样品混合,734 nm 处反应 3 min 后测量吸光度 A_t ,使用去离子水作为空白。ABTS 自由基清除率 d 根据式(2)计算。

$$d = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

(3) 铁离子还原能力的测定: 参照郭晓青等^[10]的方法并加以改进。在反应管中加入 100 μL 待测液,再加入 2.4 mL FRAP 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,于 593 nm 处测定吸光度。以 0.1~1.6 mmol/L 的 FeSO_4 标准液替代样品绘制标准曲线。以 1.0 mmol/L 的 FeSO_4 为标准,样品抗氧化活性以达到同样吸光度值为一个 FRAP 值,计算结果。

(4) ORAC 的测定: 参照戴慧卿等^[11]的方法,将供试品荧光衰减曲线下的保护面积代入 Trolox 方程,得到供试品的 ORAC,结果用 Trolox 浓度表示。

(5) 肽含量的测定: 在反应管中加入 1 mL 待测液,再加入 1 mL 碱性铜试剂和 4 mL 福林酚试剂,55 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min,冰水浴 10 min,于 650 nm 处测定吸光度。以

0.0~0.2 mg/mL 牛血清白蛋白的标准液替代样品绘制标准曲线,利用标准曲线计算结果。

$$w = \frac{c \times V}{m} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

w ——肽含量, %;

c ——待测液浓度(根据标准曲线计算), mg/mL;

V ——待测液体积, mL;

m ——待测物质量, mg。

1.2.5 田螺肽的体内抗氧化活性检测

(1) 小鼠饲养及训练条件: 小鼠按照体重随机分组,共 5 组,1 个空白组、3 个试验组和 1 个阳性对照组。日常自由饮食,灌胃饲养 40 d,运动前 1.5 h 灌胃,空白组灌胃双蒸水,试验组灌胃中华圆田螺抗氧化肽,阳性对照组灌胃谷胱甘肽,饲喂量为小鼠体重的 3%。每日游泳训练 1 次,不负重,每次 30 min,水温(30±2) $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 血清、组织匀浆的制备及指标检测: 参照文献^[12]。

1.3 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件进行显著性差异分析,方法为 Duncan multiple, $P < 0.05$ 为差异显著。采用 Origin 2017b 进行作图^[13]。

2 结果与分析

2.1 田螺肽的分离纯化

2.1.1 超滤 如图 1 所示,各项指标随样品浓度的增加而增大。在浓度为 2 mg/mL 时, <1 kDa 部位的 DPPH 自由基清除率为 76.81%,显著高于其他两个部位($P < 0.05$);两个浓度下, <1 kDa 部位的 ORAC 均显著高于另外两个部位($P < 0.05$), <1 kDa 和 1~3 kDa 部位的 ABTS 自由基清除率和 FRAP 相当且均高于 >3 kDa 部位的。分子量较小的 <1 kDa 部位具有良好的捕捉 DPPH、ABTS 自由基电子的能力及还原物质的能力。

2.1.2 大孔树脂分离纯化 将 <1 kDa 部位经 DA201-C 大孔树脂分离为水、50% 乙醇、75% 乙醇洗脱部位。由图 2 可知,各指标均随样品浓度增大而增大,在 1, 2 mg/mL 下水洗脱部位的 DPPH 自由基清除率分别为 57.23%, 80.14%, FRAP 分别为 0.387, 0.734, ORAC 分别为 854.23, 1 576.76 $\mu\text{mol/L}$,均显著高于其他两个部位的($P < 0.05$); ABTS 自由基清除率分别为 48.27%, 88.23%,与 75% 乙醇部位的相当。以上表明,经大孔树脂分离的极性较大的 <1 kDa 水部位具有较强的抗氧化能力。

2.1.3 凝胶过滤色谱分离纯化 由图 3 可以看出,水洗脱部位经 Sephadex G-10 分离后被分成了 3 个部位。

由图 4 可以看出,3 个部位的各项指标随着样品浓度

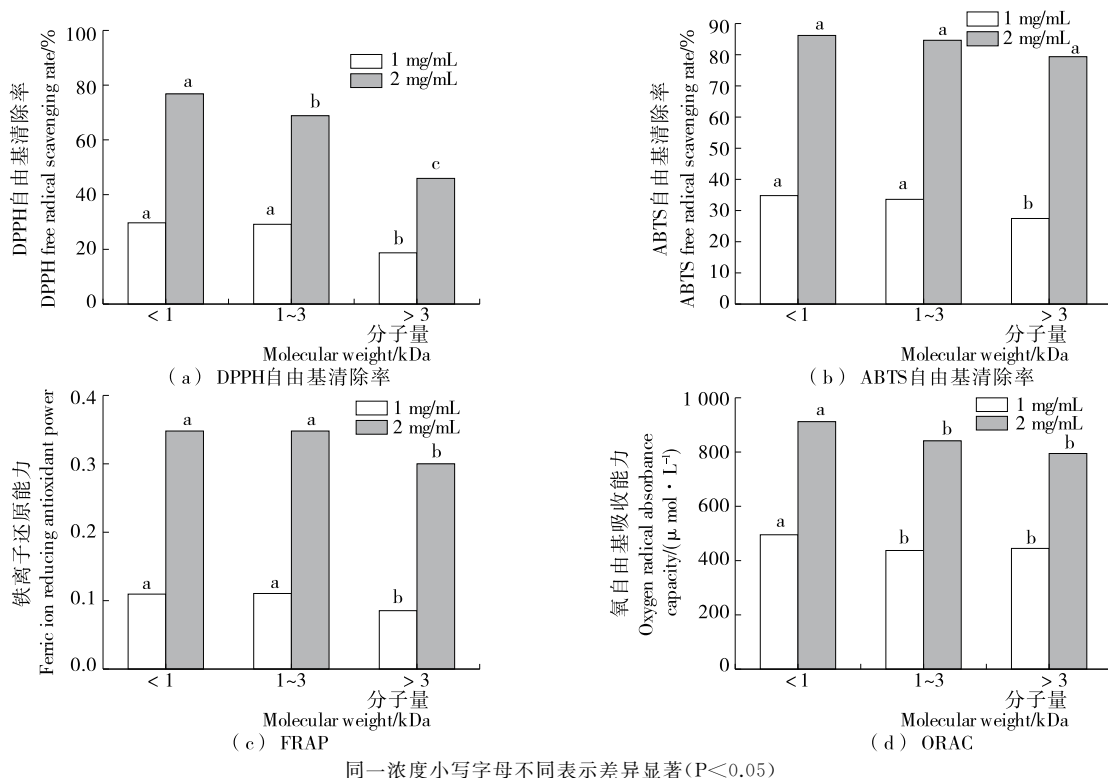


图 1 超滤分段后各部位的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、FRAP、ORAC

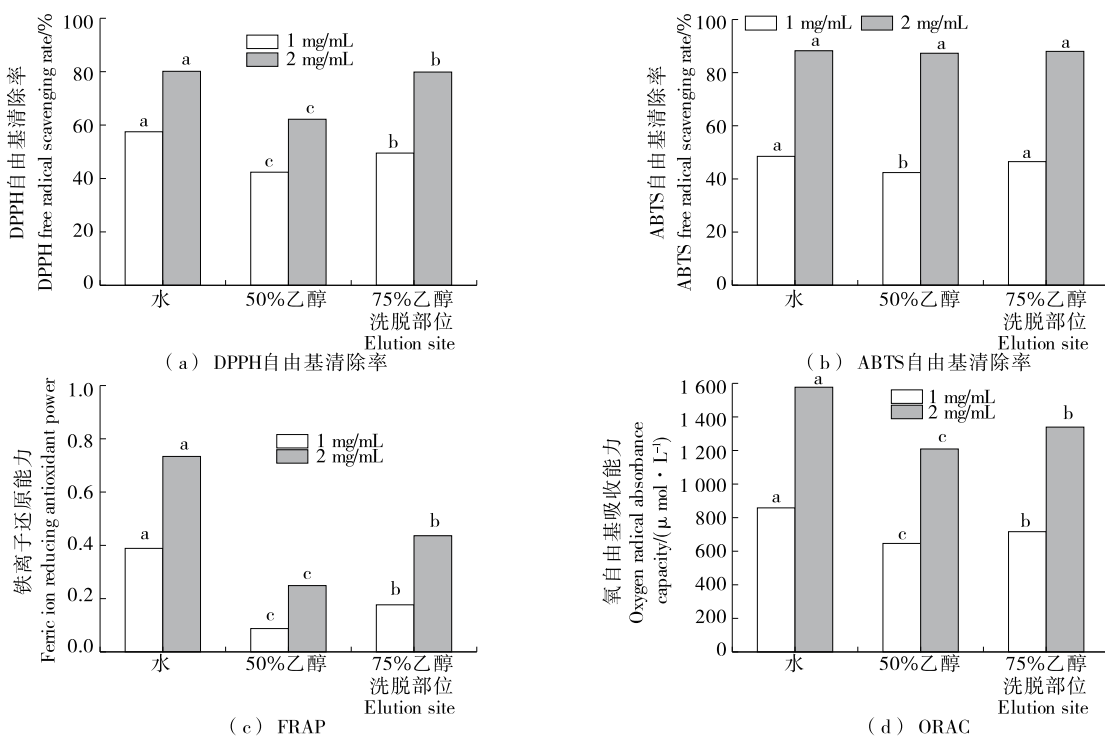
Figure 1 DPPH free radical scavenging rate, ABTS free radical scavenging rate, FRAP, ORAC of all parts after ultrafiltration segmentation ($n=3$)

图 2 大孔树脂分离纯化后各部位的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、FRAP、ORAC

Figure 2 DPPH radical scavenging rate, ABTS radical scavenging rate, FRAP, ORAC of each part after separation and purification with macroporous resin ($n=3$)

增大而增大。峰 2 的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、FRAP、ORAC 在 1,2 mg/mL 时都为最大,分别为 61.28%,89.21%;55.29%,90.87%;0.409,0.816;902.67,1 632.45 $\mu\text{mol/L}$,均显著高于其他部位的($P<0.05$)。结果表明峰 2 部位具有较强的抗氧化能力。

2.1.4 半制备液相色谱纯化 由图 5 可知,凝胶过滤色谱得到的 2 号峰经过半制备液相色谱分离纯化后被分成了 4 个部位。

由图 6 可知,在酶解液浓度 1 mg/mL 时,峰 2 的 DPPH 自由基清除率和 ABTS 自由基清除率最强分别为 60.42%,54.96%;ORAC 也最高,为 932.58 $\mu\text{mol/L}$,且均

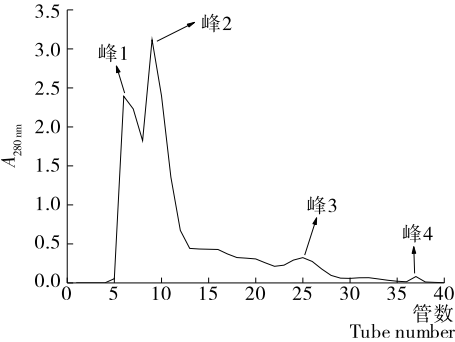
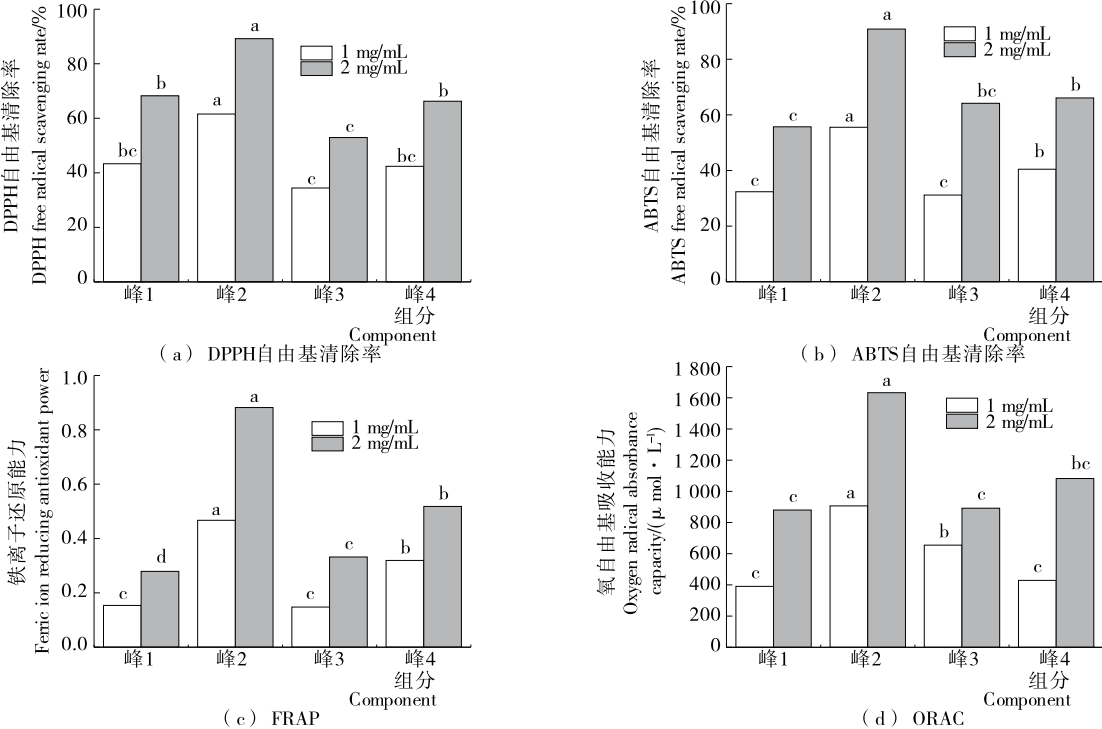


图 3 1 kDa 部位凝胶过滤色谱图

Figure 3 1 kDa component gel filtration chromatogram



同一浓度小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 4 凝胶过滤色谱分离纯化后各部位的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、FRAP、ORAC
Figure 4 DPPH free radical scavenging rate, ABTS radical scavenging rate, FRAP and ORAC were determined after gel filtration chromatography ($n=3$)

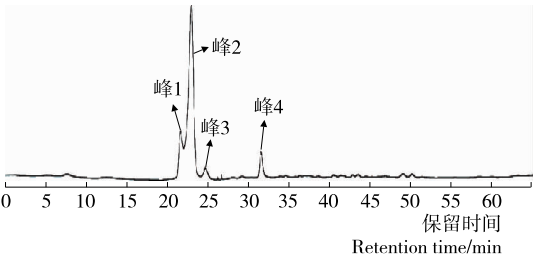


图 5 半制备液相色谱分离色谱图

Figure 5 Separation chromatogram of semi-preparative liquid chromatography

显著高于其他组($P<0.05$);FRAP 低于峰 3,为 0.378。以谷胱甘肽为阳性对照,1 mg/mL 谷胱甘肽溶液的 DPPH 自由基清除率为 65.29%,ABTS 自由基清除率为 62.09%,FRAP 为 0.599,ORAC 为 937.37 $\mu\text{mol/L}$ 。峰 2 的 DPPH 自由基清除率和 ABTS 自由基清除率略低于谷胱甘肽,ORAC 与谷胱甘肽相当。ORAC 法是基于氢原子转移的反应,目前氢原子转移反应被认为是自由基氧化反应的主要机制^[14],因此,峰 2 为抗氧化活性最强的部位。

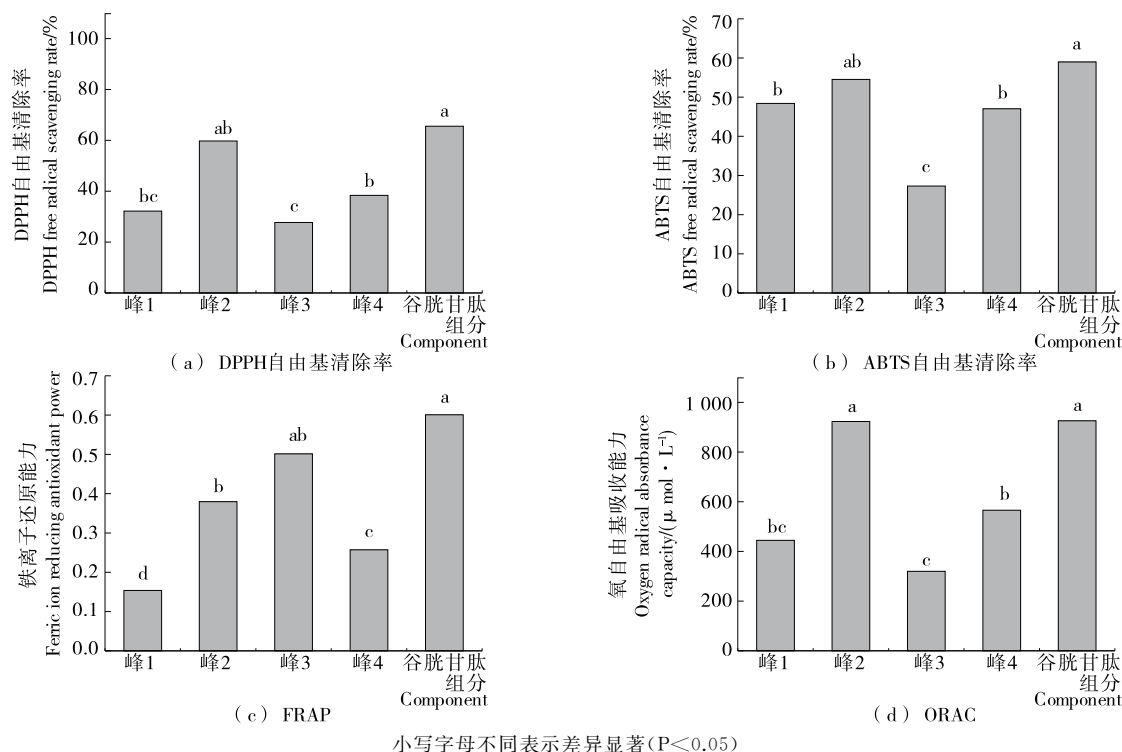


图 6 半制备液相色谱分离纯化后各部位的 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率、FRAP、ORAC
Figure 6 The DPPH radical scavenging rate, ABTS radical scavenging rate, FRAP, ORAC of each fraction were separated and purified by semi-preparative liquid chromatography ($n=3$)

2.2 抗氧化肽纯度

所得肽段经肽含量测定为 $(78.65 \pm 2.02)\%$, 如图 7 所示, 半制备液相色谱所得 2 号峰主要为 1 个大峰, 通过归一化法计算得到峰面积占比达到 90% 以上, 说明通过分离纯化最终得到一个纯度较高的抗氧化肽片段^[15]。

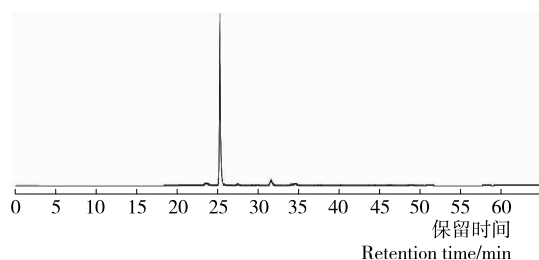
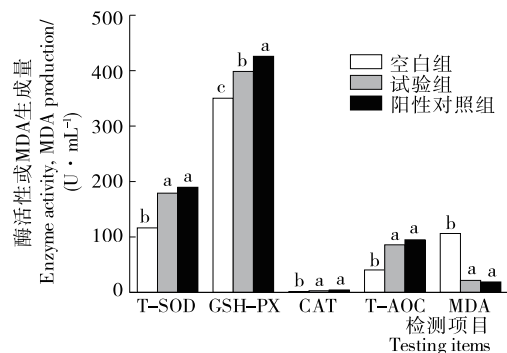


图 7 分析液相色谱图

Figure 7 Analytical liquid chromatography

2.3 抗氧化肽的体内抗氧化活性

由图 8 可知, 试验组小鼠的血清中过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、总抗氧化能力 (T-AOC) 的活力与空白组相比均增大, 且差异显著 ($P < 0.05$), 除 GSH-PX 外, 试验组与谷胱甘肽阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 表明各种抗氧化酶在体内均发挥了与谷胱甘肽相当的抑制自由基的作用。试验组的 MDA 生成量明显低于对照组, 且与谷



同一项目小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 8 小鼠体内抗氧化酶活性及 MDA 生成量
Figure 8 Antioxidant enzyme activity and MDA production in mice ($n=10$)

胱甘肽相当, 以上表明中华圆螺抗氧化肽具有显著的体内抗氧化活性。

3 结论

对中华圆螺肉碱性蛋白酶、胰蛋白酶双酶酶解液进行分离纯化, 经超滤、大孔树脂、凝胶过滤色谱和半制备液相色谱分离后, 获得了一个纯度和体外抗氧化活性均较高的肽段。试验对中华圆螺肽中抗氧化活性肽进行了研究, 据多项研究表明, 抗氧化活性与多种氨基酸的作用息息相关, 如亮氨酸等疏水性氨基酸^[16], 而中华圆

螺中有含量较高的亮氨酸^[17],此外,多种氨基酸构成的小肽比氨基酸活性更强,可能与机体更高的相容性、易吸收及氨基酸的相互作用有关^[18]。但试验针对中华圆田螺分离纯化所得抗氧活性肽未进行肽序测定及接下来的活性研究,对于体内活性测定的指标较为简单,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 杨丽丽,王斌,朱化化,等.中华圆田螺抗菌肽理化性质及抑癌活性测定[J].食品研究与开发,2013,34(20):5-8.
- [2] 郭紫峰,艾欢.中华圆田螺及其生物活性物质[J].食品研究与开发,2015,36(12):132-134.
- [3] 郑汉丰,李家乐.浙江地区3种淡水经济贝类的营养成分分析与评价[J].中国农学通报,2012,28(2):78-82.
- [4] 王永闯,肖兴军.氧化应激在周围神经病变发病机制中的作用[J].卒中与神经疾病,2016(1):73-74.
- [5] 蔡文灿,王海,李瑞青,等.类风湿性关节炎患者氧化还原物水平的测定[J].南方医科大学学报,2005(6):749-750.
- [6] 邓嘉成.磷酸果糖激酶缺陷损伤类风湿性关节炎T细胞ATP的产生、自噬与氧化还原平衡[J].生理科学进展,2014(1):31.
- [7] 王少平,宋晓光,李秉润,等.雄土鳖虫活性物质分离工艺考察[J].中国医院药杂志,2017,37(21):2135-2138.
- [8] SAMAD N B, DEBNATH T, YE M, HASNAT A, LIM B O. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2014, 4(10): 807-815.
- [9] DAUTHAL P, MUKHOPADHYAY M. Antioxidant activity of phytosynthesized biomatrix-loaded noble metallic nanoparticles[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2018, 26(5): 1200-1208.
- [10] 郭晓青,吴金鸿,刘畅,等.明日叶的茎与叶主要抗氧化成分含量及抗氧化性比较[J].食品与发酵工业,2013,39(8):122-127.
- [11] 戴卉卿,陈承瑜,杨滨.22种黄酮、酚酸类化合物和9种中药清除AAPH活性考察[J].中国中药杂志,2010,35(17):2296-2302.
- [12] 张闯,董文宾,张小强,等.猪皮明胶肽体内抗氧化功效的研究[J].中国酿造,2012,31(11):70-72.
- [13] 徐鹏,陈尚海,张亮,等.黑胸散白蚁不同群体在形态分类特征上的差异性研究[J].应用昆虫学报,2019(3):563-578.
- [14] 秦垂新,姚松君,唐青涛,等.抗氧化肽及其化学活性测定方法的研究概述[J].食品工业科技,2014,35(1):394-400.
- [15] 牛瑞,于建生.鳕鱼多肽的抗氧化活性及其分离纯化[J].食品与生物技术学报,2010,29(4):562-566.
- [16] 李阅兵,孙立春,刘承初,等.几种海水和淡水贝类的大宗营养成分比较研究[J].上海海洋大学学报,2012,21(2):297-303.
- [17] 曹壮,李文钊,王强,等.蛋清抗氧化肽分离纯化及结构鉴定[J].食品工业科技,2019,40(4):82-85.
- [18] 李晓英,李勇,周淑青,等.两种淡水螺肉的营养成分分析与评价[J].食品科学,2010,31(13):276-279.
- [15] XU Meng-lei, GAO Yu, HAN Xiao-xia, et al. Detection of pesticide residues in food using surface-enhanced Raman spectroscopy: A review[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2017, 65(32): 6719-6726.
- [16] 王利华,王佳慧,韩艳云,等. Au@Ag 纳米粒子表面增强拉曼光谱法高灵敏检测孔雀石绿[J]. 武汉工程大学学报, 2018, 40(1): 40-45.
- [17] 郭小莹,邱立,张进杰,等.表面增强拉曼光谱对鱼肉中组胺的快速定量分析[J].光谱学与光谱分析,2019,39(8):2561-2567.
- [18] FRENS G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. Nature Physical Science, 1973, 241(1): 20-22.
- [19] 余婉松.基于金属溶胶表面增强拉曼光谱技术检测饲料及水产品中呋喃唑酮和孔雀石绿的研究[D].上海:上海海洋大学,2015:44.
- [20] 王海波,覃文霞,余婉松,等. Au@Ag NPs 表面增强拉曼快速测定奶粉中的三聚氰胺[J].食品研究与开发,2019,40(12):200-205.
- [21] 覃文霞,余婉松,郑娟梅,等.表面增强拉曼光谱快速检测糕点及白酒中糖精钠的研究[J].光散射学报,2019,31(1):19-25.

(上接第86页)

- [8] 何旭峰,黄小兰,易良健,等.气相色谱质谱法检测鸡蛋中五氯酚钠残留[J].食品安全导刊,2018(23):73-74.
- [9] 陈彦宏,陈穗,宋安华,等.基于全自动固相萃取一超高效液相色谱一串联质谱法测定动物源食品中痕量五氯酚及钠盐的方法[J/OL].食品与机械.[2019-08-11].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.ts.20190702.1729.002.html>.
- [10] 唐晓琴,胡黎黎,顾万江.超高效液相色谱一四极杆一静电场轨道阱高分辨质谱法测定猪肉中的五氯酚[J].中国卫生检验杂志,2018,28(2):139-141,154.
- [11] 雷皓宇,陈小曼,李攻科,等.表面增强拉曼光谱法同时检测奶粉中三聚氰胺和二聚氰胺[J].分析科学学报,2017,33(3):312-316.
- [12] 赵宇,温宝英,黄艺伟,等.便携式拉曼光谱仪快速检测唾液中盐酸吡格列酮的含量[J].光谱学与光谱分析,2018,38(12):3769-3772.
- [13] 徐念薇,黄轶群,赖克强.基于表面增强拉曼光谱快速检测苹果汁中亚胺硫磷[J].食品与机械,2019,35(5):72-77.
- [14] CHEN Jian, LIU Mu-hua, YUAN Hai-chao, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for classification of testosterone propionate and nandrolone residues in chicken[J]. Vibrational Spectroscopy, 2018, 99: 7-12.