

铁肽螯合物不同组分对缺铁性贫血大鼠贫血改善的研究

霍健聪¹, 邓尚贵^{1*}, 励建荣²

(1. 浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江 舟山 316000;

2. 渤海大学化学化工与食品安全学院, 辽宁 锦州 121013)

摘要: 为有效利用带鱼加工下脚料类资源, 本研究采用凝胶层析法对制备所得的带鱼加工下脚料酶解亚铁螯合物进行了分离分级, 初步确定了不同分离组分的分子量及回收率, 采用氨基酸自动分析仪确定了不同分子量组分的氨基酸成分与含量, 并进行了氨基酸评分; 而后通过缺铁性贫血大鼠模型研究了不同分子量组分对大鼠贫血的改善效果。结果显示, 带鱼下脚料经酶解、亚铁螯合修饰和层析分离后得到 4 类分离产物, 分子量分别约为 35 400, 8 720, 465 和小于 200 u; 除组分 II 含有 8 种必需氨基酸外, 其他组分均属于不完全蛋白质; 理想氨基酸模式评价结果表明 4 类螯合物氨基酸价分别达到理想氨基酸模式的 85.31%、88.22%、101.32% 和 105.83%, 仍然属于质量较高的蛋白质; 不同分子量螯合物中铁含量存在显著差异, 其中以组分 I 含量最高(5.23%), 组分 II 含量最低(3.34%), 组分 III 和组分 IV 铁含量接近(4.22% 和 4.58%); 不同分子量螯合物对大鼠体质量、Hb、血清铁、血清铁结合力、肝脏 MDA 和 SOD 影响不同, 其中组分 II 对缺铁性贫血大鼠贫血改善效果最好, 且效果优于 FeSO₄, 组分 I 在螯合物中效果最差, 但仍有一定改善效果。

关键词: 带鱼下脚料; 分子量; 螯合物; 贫血; 氨基酸

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

带鱼(*Trichiurus haumela*)是我国传统“四大海产”中唯一能形成渔汛的大宗水产品, 国内捕捞与进口量约为 110 万 t。带鱼加工过程中会产生鱼头、鱼骨、鱼内脏等大量下脚料, 约占鱼体质量的 40%~45%。这类下脚料富含蛋白质、矿物质等营养成分, 而国内对包括带鱼加工下脚料在内的水产品加工副产物的利用主要为用于生产低值鱼粉。尽管已有部分学者发现水产品加工下脚料可用于生产水解蛋白或鱼露等高附加值产品, 但仍存在生产成本低、生产工艺复杂等问题^[1-2]。如何高效利用水产品加工下脚料成为当前研究热点。

缺铁性贫血 (IDA, iron-deficiency anemia) 是世界上最常见营养缺乏疾病之一, 其中以妇女、孕妇及儿童为高发人群, 我国居民缺铁性贫血发病

率也接近 20%^[3]。长期以来, IDA 的治疗主要依赖于补铁制剂, 尽管目前补铁制剂已经发展到第三代, 但由于提取成本、安全性等问题的存在, 使得临床上治疗缺铁性贫血主要仍然依赖硫酸亚铁等常规补铁制剂。尽管蛋白肽及氨基酸类螯合铁是当前出现的第三代铁补充制剂, 具有铁元素生物利用度高、对人体刺激小等优点, 然而目前大多数氨基酸类铁补充剂主要采用化学方法制备, 产品也仅局限于牲畜饲料应用。自 Agar 等^[4]发现人体肠道能够直接吸收双甘氨酸以及 Newey 等^[5]首次提出肽可被整体吸收的理论后, 传统的蛋白质营养实质上是氨基酸营养的观点得到了有益补充, 人体摄取的蛋白质经消化道酶水解后, 不仅仅以氨基酸形式被吸收, 还可以以肽的形式被人体直接吸收。因此, 利用这一特点, 开发生物铁

收稿日期: 2014-07-14 修回日期: 2014-11-05

资助项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD29B06); 国家自然科学基金(31471609)

通信作者: 邓尚贵, E-mail: dengshangui@163.com

利用率更高的新一代天然、安全的活性肽螯合铁补充剂成为今后研究热点。本研究以带鱼下脚料为原料制备酶解亚铁螯合物(Fe-HPC, Fe-hydrolyzed protein chelation),对其进行分离分级,并对不同分离组分分子量、氨基酸组成等特性进行了研究,又以缺铁性贫血大鼠为对象,对不同分离组分的抗缺铁性贫血功效进行研究,以期带鱼下脚料等水产品加工副产物的高值化利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

带鱼下脚料酶解亚铁螯合物,自制;酶解过程在参考Deng等^[6]基础上,改用中性蛋白酶和风味酶,其中中性蛋白酶活力为200 000 IU/g,风味酶活力为20 000 IU/g,具体制备方式为带鱼下脚料蛋白用组织搅拌机打碎成糊状,按带鱼下脚料用量4.1 g/100 mL、温度40 ℃、中性蛋白酶和风味酶复合比1:1、复合酶酶量 6×10^3 IU/100 mL、pH值为7的条件水解,水解时间1.5 h,而后100 ℃灭酶10 min,过滤,得水解液;采用FeCl₂为亚铁盐,配置成0.1 mol/L溶液,按照1(FeCl₂溶液):100(水解液)(V:V)加入到水解液中,加入0.1%的抗坏血酸(M:M),调节螯合体系溶液pH为7.0,磁力搅拌器开动后保持15 min,螯合温度20 ℃。螯合结束后离心除沉淀,浓缩后冷冻干燥,置于干燥皿4 ℃保藏备用。

葡聚糖凝胶Sephadex G-25,北京索莱宝科技有限公司;血清铁检测试剂盒等购于南京建成生物工程研究所。其余化学试剂及标准品等均购自国药集团上海化学试剂有限公司,分析纯。

原子吸收分光光度计(AA2610),日立紫外分光光度计(U-2800),全自动浓缩系统(Syncorer-6),真空冷冻干燥机(FD-1000),氨基酸自动分析仪(L-8900),核酸蛋白层析设备(MA99-2,其中层析柱规格为1.6 cm × 100 cm),全自动血细胞计数分析仪(SK8800)。

1.2 实验动物

2周龄健康Wistar大鼠80只,雌雄各半,由浙江省医学科学研究所提供,体质量40~50 g,血红蛋白含量(Hb)≥120 g/L。大鼠按性别分别在专用鼠笼中饲养,5只1笼,饲养室保持恒温(26±2)℃,湿度维持在50%~60%,按正常日出

日落给予光照时间。各组大鼠喂以基础饲料,自由摄食,每日记录进食量,定期称重,待体质量增长至150 g时进行造模。

1.3 贫血造模

贫血大鼠模型造模通过给大鼠喂养低铁饲料和放血实现,其中大鼠低铁饲料配方参考美国公职分析化学工作者协会(AOAC)推荐的低铁饲料,具体配方为,淀粉54%、奶粉40%、植物油(大豆油)5%、食盐1%,按比例混合后用去离子水搅拌制成棒状饲料,烘干至水分含量约10%,采用原子吸收法测定铁含量为6.23 mg/kg;单纯依赖低铁饲料喂养造模耗时长,由于1 mL血液中含有0.5 mg铁,故低铁饲料喂养2周后在马娟^[7]方法基础上改为尾静脉放血加速造模,具体为每3 d将大鼠尾巴浸泡在40 ℃温水中5 min,使尾部血管扩张,用医用剪刀剪掉尾尖,挤压尾根放血,每次放血量为1~1.5 mL;放血结束后尾尖涂抹少量抗生素软膏以防感染。约3周后测定大鼠Hb含量和红细胞(RBC)计数,以Hb<90 g/L、RBC< 4.5×10^{12} 为造模成功。

1.4 动物实验方案

选取体型接近的大鼠分为若干组。为验证酶解亚铁螯合物对缺铁性贫血大鼠的补铁效果,本研究以临床常用补铁剂硫酸亚铁为阳性对照,用于比较不同分子量螯合组分与硫酸亚铁组补铁功效:将缺铁性贫血大鼠分为空白对照组(A),采用去离子水灌胃;阳性对照组(B),采用硫酸亚铁(FeSO₄)灌胃,灌胃剂量为10 mg/100(g·bw) (“g·bw”代表“克·体质量”)(以Fe计);C、D、E实验组采用不同分子量酶解亚铁螯合物灌胃,灌胃剂量10 mg/100(g·bw)(以Fe计,具体灌胃剂量通过不同螯合物含铁量进行折算,对螯合物干粉进行溶解、浓缩后灌胃)。每天灌胃1次,实验时间20 d,实验期间每周末记录体质量并进行心脏取血,测定Hb、血清铁及其他生化指标;20 d后腹股动脉取血,测定肝脏丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)。

1.5 实验方法

不同分子量酶解亚铁螯合物制备及分子量分布估算 不同分子量酶解亚铁螯合物制备采用凝胶层析柱法,将制备得到的带鱼下脚料酶解亚铁螯合物用适量洗脱液溶解后过0.22 μm滤膜,后上

柱层析分离,洗脱液为 pH 5.4 的 25 mmol/L 醋酸钠溶液,洗脱液温度 25 °C,流速为 0.6 mL/min,每 7 min 收集 1 管,每管收集 4.2 mL,核酸蛋白检测仪检测其 280 nm 波长吸光值,收集各吸收峰。得到的不同组分酶解亚铁螯合物经浓缩后冷冻干燥而成,干燥后的螯合物于干燥皿中 4 °C 保藏。

取已经处理好的 Sephadex G-25 凝胶柱,洗脱条件同“不同分子量酶解亚铁螯合物制备及分子量排布估算”中的方法,取螯合物干燥粉 10 mg,溶解于 1 mL 洗脱液中,上柱洗脱,用量筒记录最大吸收峰出现时洗脱液的流出体积 (mL);取还原型谷胱甘肽 (MW307)、维生素 B₁₂ (MW1355)、细胞色素 C (MW12300) 和胃蛋白酶 (MW35500) 各 10 mg,溶解于 1 mL 洗脱液中,按上述操作进行,也记录出现最大吸收峰时洗脱液的流出体积 (mL)。

酶解亚铁螯合物铁含量测定 铁含量测定采用原子吸收法,样品测定重复 3 次。

酶解亚铁螯合物氨基酸组分测定 氨基酸组分测定采用氨基酸自动分析仪进行。

大鼠 Hb 含量测定 采用氰化高铁法^[8]。精确称取 140 mg NaHCO₃、50 mg KCN 和 200 mg K₃Fe(CN)₆,溶解于 1 L 去离子水中,即为氰化高铁工作液,使用时于试管中加入 2.5 mL 工作液,加入 10 μL 全血,震荡混合后静置 15 min,540 nm 波长下测定吸光值,以去离子水做空白,则 Hb (g/L) = OD × 736,其中 OD 为待测液在 540 nm 处吸光度。

血清铁及血清铁结合力测定 采用双吡啶比色法,按照说明书进行操作测定。

大鼠肝脏 MDA 及 SOD 测定 采用丙二醛与超氧化物歧化酶试剂盒测定,按照说明书进行操作。

数据处理 采用 SPSS 统计软件包的方差分析进行统计学检验。

2 结果与讨论

2.1 酶解亚铁螯合物凝胶层析分离

带鱼下脚料酶解亚铁螯合物经 Sephadex25 凝胶层析分离后得到 4 部分不同分子量组分 (图 1),按分离先后顺序将 4 个组分分别命名为 I、II、III 和 IV;在相同凝胶层析条件下对还原型谷胱

甘肽等 4 个分子量标准品进行层析,根据洗脱液体积和分子量 (表 1) 绘制标准品分子量标准曲线 (图 2),则根据标准曲线回归方程计算可得 I、II、III 和 IV 的分子量 (MW) (表 2)。

由于单次上样得到的组分量较少,故多次上样后将不同组分合并回收,经浓缩和冷冻干燥后分别计算回收率。回收率由高到低分别为 II、I、III 和 IV;此外,利用分子量标准品标准曲线的回归方程计算各分离组分的平均分子量,其中组分 I、II、III 和 IV 分子量逐渐降低,分别约为 35 400、8 720、465 和低于 200 u (表 2),这表明组分 IV 可能为简单多肽或氨基酸。

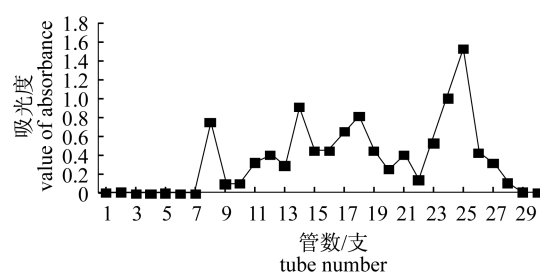


图 1 Sephadex25 凝胶层析分离结果

Fig. 1 Result of chromatographic separation of Sephadex 25

表 1 分子量标准品洗脱体积
Tab. 1 Elution volume of standard sample

标准品 standard samples	还原型谷胱甘肽 reduced glutathione	V _{B₁₂}	细胞色素 C cytochrome C	胃蛋 白酶 pepsase
分子量/u molecular weight	307	1 355	12 300	35 500
洗脱体积/mL eluent volume	78.3	65.8	48.3	38.1

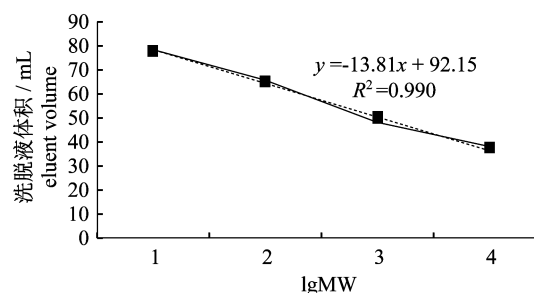


图 2 标准品标准曲线

Fig. 2 Standard curve of sample

表 2 不同分子量螯合物分子量估算及分离回收率
Tab.2 MW and recovery of Fe-HPC with different molecular weight

组分 component	分子量/u MW	回收率/% recovery
I	35 400	34.59
II	8 720	42.97
III	465	12.56
IV	<200	9.88

2.2 不同分子量螯合物氨基酸组成分析

对不同组分螯合物进行氨基酸组分测定可知,4种分离组分中除组分 II 含有 8 种必需氨基酸外,其他组分均缺少色氨酸,属不完全蛋白质,但将 4 种螯合物中各必需氨基酸累加后,其必需氨基酸总量分别达到总氨基酸量的 23.45%、23.46%、25.45% 和 28.31% (表 3);表 4 是根据 FAO/WHO 的理想氨基酸模式对 4 种螯合物的蛋白质营养进行评价后的结果,可知不同螯合物组分的氨基酸价分别达到理想氨基酸模式的 85.31%、88.22%、101.32% 和 105.83%,表明尽管从必需氨基酸种类角度分析,4 种分离组分并非完全蛋白质(除组分 II),但由于氨基酸评分较高,仍然属于质量较高的蛋白质。

表 3 不同分子量螯合物氨基酸组成
Tab.3 Amino acid composition of Fe-HPC with different molecular weight %

氨基酸名称 name of amino acid	I	II	III	IV
天门冬氨酸 Asp	9.67	8.67	9.23	6.54
苏氨酸 Thr	3.73	3.23	3.43	4.34
丝氨酸 Ser	4.12	4.33	2.32	4.56
谷氨酸 Glu	10.95	12.21	4.53	12.32
甘氨酸 Gly	14.12	13.12	10.32	11.41
丙氨酸 Ala	6.76	6.66	9.48	4.65
胱氨酸 Cys	—	1.12	—	2.43
缬氨酸 Val	5.56	3.23	4.23	4.86
蛋氨酸 Met	1.68	2.54	5.32	3.33
异亮氨酸 Ile	5.12	5.44	4.67	7.74
亮氨酸 Leu	4.09	4.34	6.87	5.54
酪氨酸 Tyr	4.21	4.44	2.45	4.32
苯丙氨酸 Phe	2.43	3.12	4.44	2.06
赖氨酸 Lys	3.89	4.08	5.09	3.48
氨 NH ₃	6.76	3.12	3.43	5.43
组氨酸 His	1.21	1.02	3.57	2.22
精氨酸 Arg	4.67	4.59	7.48	4.1
色氨酸 Trp	—	0.12	—	—
脯氨酸 Pro	7.43	8.47	9.48	9.10
总氨基酸 total amino acid	96.4	93.85	96.34	98.43

注:“—”表示含量极低或未检出

Notes:“—”means extremely low in content or undetectable

表 4 不同分子量螯合物必需氨基酸组成与 FAO/WHO 模式比较
Tab.4 Comparison of essential amino acid composition of Fe-HPC with FAO/WHO pattern

必需氨基酸 essential amino acid	理想模式 ideal model	I		II		III		IV	
		含量/ (mg/g) content	百分比/ % percentage	含量/ (mg/g) content	百分比/ % percentage	含量/ (mg/g) content	百分比/ % percentage	含量/ (mg/g) content	百分比/ % percentage
异亮氨酸 Ile	40	51.2	128	55.4	138	46.7	117	77.4	193
亮氨酸 Leu	70	40.9	58.4	43.4	62	68.7	98	55.4	79
赖氨酸 Lys	55	38.9	79.7	40.8	82	50.9	101	34.8	63
蛋氨酸 + 胱氨酸 Met + Cys	35	16.8	48	36.6	105	53.2	152	57.6	164
苯丙氨酸 + 酪氨酸 Phe + Tyr	60	66.4	110	75.6	126	68.9	115	63.8	106
苏氨酸 Thr	40	37.3	93	32.3	81	34.3	86	43.4	108
色氨酸 Trp	10	—	0	1.20	12	—	0	—	0
缬氨酸 Val	50	55.6	111	32.3	65	42.3	85	48.6	97
总量 total amount	360	307.1	85.31	317.6	88.22	365	101.32	381	105.83

2.3 不同分子量螯合物铁含量测定

不同分子量螯合物铁含量存在显著差异,其中以组分 I 含量最高(5.23%),组分 II 含量最低(3.34%),组分 III 和组分 IV 铁含量接近(4.22%和 4.58%),且不存在显著差异,而组分 I 和组分

II 同其他两个组分相比铁含量存在显著差异 ($P < 0.05$) (图 3)。补铁制剂铁含量一直是人们关注的焦点,除以 FeSO_4 为代表的第一代补铁制剂外,从铁含量角度而言,第二代乃至第三代铁补充制剂铁含量通常也都较高。但螯合物

铁含量不但低于 FeSO_4 ,也低于糖苷铁^[9]、葡聚糖铁^[10]、海藻酸铁^[11]、当归多糖铁^[12]等多糖类生物补铁制剂。同含铁量相比,铁元素的生物利用率更有意义。缺铁性贫血患者短期内摄入大量生物利用率较低的铁补充制剂存在多种负面效果,如由于自由基生成而导致的肝脏损伤等^[13-14],因此,生物利用率成为今后铁补充制剂研发的关键因素之一。

2.4 补铁制剂对大鼠体质量增长的影响

所有实验组大鼠体质量增长均高于空白对照组,除 C 组外,其他实验组大鼠体质量同空白组相比存在显著性差异 ($P < 0.05$),表明给予补铁制剂后大鼠体质量增长显著(表 5)。其中不同分子量螯合物对大鼠体质量影响各不相同,C 组对大鼠体质量增长效果较差,D 组效果最好,且同 B 组相比存在显著性差异 ($P < 0.05$),E 组和 F 组对大鼠体质量增长效果接近,在 20 d 实验期内,

E、F 两组对大鼠体质量影响效果同 B 组接近 ($P > 0.05$)。尽管各组分对大鼠体质量增重效果不同,但各组并未出现蛋白质质量越高,增重效果越好的结果,这表明各组灌胃的螯合物并未起到补充蛋白质的效果,也可能与灌胃的螯合物剂量较小有关。

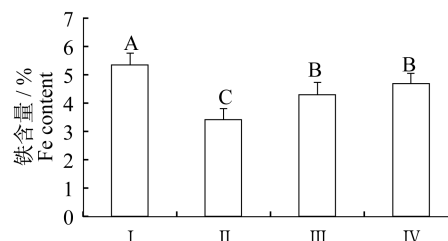


图 3 不同分子量螯合物铁含量

不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Content of Fe in different Fe-HPC

Different letters indicates the presence of significant difference

表 5 不同分子量螯合物对大鼠体质量的影响

Tab. 5 Effect of Fe-HPC with different molecular weight on body weight of mice

实验组别 experimental group	灌胃剂量(以铁计)/[mg/100(g·bw)] intra-gastric dose (with Fe)	体质量/g body weight		
		7 d	14 d	20 d
A	0	161.2 ± 4.8	178.9 ± 6.1	189.4 ± 5.2
B	10	178.4 ± 3.4	188.5 ± 4.5	203.8 ± 6.4
C I	10	162.2 ± 3.9	180.1 ± 5.4	195.8 ± 8.2
D II	10	183.3 ± 5.2	201.2 ± 5.9	210.4 ± 7.7
E III	10	176.6 ± 5.3	190.0 ± 4.4	200.3 ± 6.1
F IV	10	175.5 ± 6.8	188.1 ± 3.4	199.5 ± 7.5

2.5 补铁制剂对大鼠 Hb 的影响

所有实验组大鼠的 Hb 均明显高于 A 组 ($0.01 < P < 0.05$),表明所有补铁制剂对大鼠 Hb 均有显著提高作用;不同分子量螯合物对大鼠 Hb 的提高效果存在差异,其中组分 I 在实验期间内与 B 均存在极显著性差异 ($P < 0.01$),大鼠 Hb 含量也低于其他实验组,表明组分 I 对大鼠 Hb 提高效果较差;而组分 III 和 IV 对大鼠 Hb 提高效果相近,除组分 IV 在第 7 天时大鼠 Hb 同 B 组接近外,其余时间均低于 B 组 ($0.01 < P < 0.05$);在螯合物实验组中组分 II 对大鼠 Hb 提高效果最明显,不仅显著高于 A 组,而且高于 B 组,表明不同分子量螯合物对大鼠 Hb 的影响效果有差异,其中组分 II 效果最好,且优于 B 组(表 6)。各组分对大鼠 Hb 的影响效果差别巨大,这可能是由分

子量不同导致。组分 I 分子量达到 35 400 u,已接近标准品中胃蛋白酶分子量(35 500 u),尽管自身铁含量在各组分中最高(5.23%),但推测这部分铁の利用方式仍然是蛋白经降解形成游离态后重新利用,从而导致机体对铁の利用率降低;组分 III 和 IV 对 Hb 的提高能力低于硫酸亚铁,但又高于组分 I,这一方面可能是由于肽链长度不合适(组分 III),致使肽段与铁元素的结合能力较弱,且铁元素容易被其他物质如植酸等剥夺,或是水解度过大,导致由氨基酸残基构成的短肽段对铁元素的螯合效应较低(组分 IV)。

2.6 补铁制剂对大鼠血清铁的影响

不同补铁制剂对大鼠血清铁均有提高效果,但在第 7 天时对血清铁提高效果均不明显(同 A 组相比 $P > 0.05$),自 14 d 开始所有实验组大鼠

血清铁均显著高于 A 组 ($0.01 < P < 0.05$), 表明 FeSO_4 与不同分子量螯合物对大鼠血清铁均有显著提高作用(表 7)。但同 B 组相比, 不同分子量螯合物对大鼠血清铁提高效果存在差异, 这种差异与各螯合物对大鼠 Hb 的影响类似; 血清铁结合力 (total iron binding capacity, TIBC) 是指 100 mL 血清中全部转铁蛋白结合的最大铁量, 可间接反映机体对铁的吸收效果, 缺铁时机体内相应铁转运蛋白含量增加, 血清铁结合力升高; 反之则降低。第 7 天时, 所有实验组血清铁结合力均较高, 说明机体仍处于相对缺铁状态, 而第 20 天时随着血清铁含量升高, 血清铁结合力随之降低, 其中 D 组血清铁结合力在实验初期高于所有实验

组, 而末期低于其他实验组, 也表明组分 II 对大鼠补铁效果最好(表 7)。对于蛋白肽类铁补充剂, 分子量并不是决定其铁吸收利用率的关键因素。分子量较小的氨基酸铁同样具有较高的生物补铁效果, 甘氨酸螯合铁同样对缺铁性贫血大鼠具有较好的补铁效果^[15-16]。由于实验设计及方法的不同, 本实验结果同周桂莲等^[15]实验结果并不能进行定量比较, 但组分 II 作为分子量达到 8 720 u 的螯合铁肽, 同样能在血清铁及血清铁结合力方面具有较好的补铁功效, 其分子结构特点以及其对血清铁蛋白及血清可溶性转铁蛋白受体的影响都需要进一步研究和确认。

表 6 不同分子量螯合物对大鼠 Hb 的影响

Tab. 6 Effect of Fe-HPC with different molecular weight on Hb in mice

实验组别 experimental group	灌胃剂量(以铁计) [mg/100(g·bw)] intra-gastric dose (with Fe)	Hb/(g/mL)		
		7 d	14 d	20 d
A	0	0.089 8 ± 0.001 0	0.091 2 ± 0.002 2	0.090 8 ± 0.002 0
B	10	0.112 2 ± 0.010 2 **	0.142 8 ± 0.013 2 **	0.144 5 ± 0.012 0 **
C I	10	0.094 2 ± 0.012 2 * ΔΔ	0.110 4 ± 0.010 5 ** ΔΔ	0.114 2 ± 0.018 2 ** ΔΔ
D II	10	0.122 5 ± 0.010 2 ** Δ	0.153 3 ± 0.012 4 ** Δ	0.160 2 ± 0.011 8 ** Δ
E III	10	0.101 0 ± 0.009 8 ** Δ	0.120 2 ± 0.011 9 ** ΔΔ	0.128 8 ± 0.014 2 ** Δ
F IV	10	0.102 3 ± 0.014 8 **	0.122 5 ± 0.012 3 ** ΔΔ	0.130 2 ± 0.012 9 ** Δ

注: 与 A 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 B 组比较: Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, 下同

Notes: compared with A group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with B group: Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, the same as below

表 7 不同分子量螯合物对大鼠血清铁及血清铁结合力的影响

Tab. 7 Effect of Fe-HPC with different molecular weight on serum iron and TIBC in mice

实验组别 experimental group	灌胃剂量 (以铁计) [mg/100(g·bw)] intra-gastric dose (with Fe)	血清铁/ ($\mu\text{g/mL}$) serum Fe		血清铁结合力/ ($\mu\text{g/mL}$) total iron binding capacity		血清铁/ ($\mu\text{g/mL}$) serum Fe		血清铁结合力/ ($\mu\text{g/mL}$) total iron binding capacity	
		7 d		14 d		20 d			
A	0	0.329 ± 0.089	0.635 ± 0.125	0.332 ± 0.062	0.630 ± 0.103	0.328 ± 0.066	0.637 ± 0.084		
B	10	0.341 ± 0.073	1.092 ± 0.226 **	0.454 ± 0.092 **	0.783 ± 0.148 **	0.544 ± 0.075 **	0.676 ± 0.029 *		
C I	10	0.336 ± 0.082	0.658 ± 0.132 ΔΔ	0.402 ± 0.084 * Δ	0.639 ± 0.112 * ΔΔ	0.448 ± 0.093 * ΔΔ	0.598 ± 0.121 * Δ		
D II	10	0.339 ± 0.066	1.302 ± 0.238 ** ΔΔ	0.440 ± 0.090 **	0.822 ± 0.223 ** Δ	0.552 ± 0.078 **	0.618 ± 0.138 * ΔΔ		
E III	10	0.340 ± 0.070	0.992 ± 0.206 **	0.429 ± 0.079 ** Δ	0.774 ± 0.183 **	0.482 ± 0.098 * Δ	0.633 ± 0.128 Δ		
F IV	10	0.338 ± 0.064	1.029 ± 0.244 **	0.440 ± 0.091 **	0.787 ± 0.114 **	0.476 ± 0.078 * Δ	0.640 ± 0.102 Δ		

2.7 补铁制剂对大鼠肝脏 MDA 和 SOD 的影响

MDA 是机体内脂质过氧化反应的典型产物, 可反映细胞受脂质氧化损伤的程度。实验 20 d 时, 同 A 组相比, 所有实验组 MDA 均存在显著性差异 ($P < 0.05$); 同 B 组相比, 不同分子量螯合物 MDA

效果有差异, 其中 E、F 组接近 B 组、C 组高于 B 组, 而 D 组则显著低于 B 组, 体现出组分 II 对脂质氧化作用最小的效果, 且这一现象在 SOD 中也有体现, 尽管组分 II 的 SOD 水平低于 A 组, 但比 B 组高 20.7%, 仍表现出较低的脂质氧化效应(表 8)。

表 8 不同分子量螯合物对大鼠肝脏 MDA 和 SOD 的影响
Tab. 8 Effect of Fe-HPC with different molecular weight on MDA and SOD in liver

指标 index	时间/d time	A	B	C I	D II	E III	F IV
MDA/(mmol/mg)	20	0.92 ± 0.12	1.23 ± 0.18 ^a	1.54 ± 0.22 ^{ab}	0.95 ± 0.21 ^{abc}	1.12 ± 0.19 ^{ac}	1.09 ± 0.24 ^{ac}
SOD/(U/mg)	20	212.4 ± 13.3	164.2 ± 20.4 ^a	122.3 ± 18.2 ^{ab}	198.3 ± 23.2 ^{bc}	144.8 ± 17.6 ^{abc}	152.4 ± 16.4 ^{ac}

注:a.同 A 组相比 $P < 0.05$;b.同 B 组相比 $P < 0.05$;c.同 C 组相比 $P < 0.05$

Notes:a. compared with A group $P < 0.05$;b. compared with B group $P < 0.05$;c. compared with C group $P < 0.05$

3 结论

当前关于通过酶解及亚铁螯合获得的水产品加工下脚料酶解亚铁螯合物的研究主要集中于抗氧化性及抑菌特性方面^[6,17-19]。这类原料从化学结构上属于螯合铁肽类化合物,具有有利于机体整体吸收且使结合于水解产物上的亚铁进入机体后具有缓慢释放的特性,具备成为一类生物补铁制剂的潜力^[20]。关于铁的吸收机制,除经典的营养学中的吸收机制外,早在 20 世纪 60 年代已有学者在 Agar 等人研究基础上发现氨基酸可以与铁形成螯合物,并作为铁的载体促进肠道对铁的吸收^[21-22],但氨基酸类铁仍然存在铁吸收利用率相对较低的弊端,可能是由于这类铁补充剂中铁元素同氨基酸的结合不牢固,铁元素在胃肠等消化道中仍然易被植酸等吸收抑制因子剥夺,从而导致吸收率降低。

带鱼加工下脚料经生物酶解、亚铁螯合修饰后获得的螯合产物是一类混合物,该研究通过凝胶层析法初步分离获得了 4 类不同组分,并对其生物补铁活性进行了初步研究。动物实验中发现,所有实验组大鼠灌胃给药期间精神状态良好,毛色正常,无任何萎靡等不正常现象出现,这也从侧面表明螯合铁具有一定的安全性和较好的应用潜力。

带鱼下脚料经酶解、亚铁螯合修饰和层析分离后得到 4 类分离产物,分子量由大到小分别约为 35 400、8 720、465 和低于 200 u;除组分 II 含有 8 种必需氨基酸外,其他组分均缺少色氨酸,是不完全蛋白质;根据 FAO/WHO 的理想氨基酸模式对 4 种螯合物的蛋白质营养进行评价,不同分子量螯合物氨基酸价分别达到理想氨基酸模式的 85.31%、88.22%、101.32% 和 105.83%,仍然属于质量较高的蛋白质。

不同分子量螯合物铁含量存在显著差异,其中以组分 I 含量最高(5.23%),组分 II 含量最低

(3.34%),组分 III 和组分 IV 铁含量接近(4.22% 和 4.58%)。动物实验结果表明,不同分子量螯合物对大鼠体质量、Hb、血清铁、血清铁结合力、肝脏 MDA 和 SOD 影响不同,其中组分 II 对缺铁性贫血大鼠贫血改善效果最好,且效果优于 FeSO₄,组分 I 在螯合物中效果最差,但仍有一定改善效果。

组分 II 可能仍然是一类混合物,对其进行进一步分离纯化并进行结构与补铁机理研究是今后工作目标,本研究目标的实现有望为人类提供一种安全高效的生物补铁制剂。

参考文献:

- [1] Deng S G, Peng Z Y, Yang P, *et al.* Application of multi-enzymatic method in fermented fish sauce production from *Harengula zumasi*'s offal[J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 28(2): 32 - 36. [邓尚贵,彭志英,杨萍,等.多酶法在鱼露生产工艺中的应用.食品与发酵工业,2001,28(2): 32 - 36.]
- [2] Yu J, Chen M Z. Study on preparation and application of hydrolyzed eel head protein by enzymatic methods[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2000, 19(5): 50 - 54. [余杰,陈美珍.酶法制备水解鳗鱼头蛋白及其应用的研究.中国海洋药物,2000,19(5): 50 - 54.]
- [3] Clark S F. Iron deficiency anemia[J]. Nutrition in Clinical Practice, 2008, 23(2): 128 - 141.
- [4] Agar W T, Hirdand F J R, Sidhu G S. The uptake of amino acid by the intestine[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1954, 14: 80 - 84.
- [5] Newey B H, Smyth D H. Intracellular hydrolysis of dipeptides during intestinal absorption[J]. Journal of Physiology, 1960, 152: 367 - 380.
- [6] Deng S G, Huo J C, Xie C. Preparation by enzymolysis and bioactivity of iron complex of fish protein hydrolyzed (Fe-FPH) from low value fish[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology,

- 2008,26(3):300-306.
- [7] Ma J. Effect of different doses of iron supplement on iron deficiency anemia rat and its side effects[D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2013. [马娟. 不同剂量铁补充对缺铁性贫血大鼠的疗效及副作用观察. 上海: 第二军医大学, 2013.]
- [8] Shanghai Medical Laboratory. Clinical biochemistry [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1982. [上海市医学化验所. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.]
- [9] Lázaro F J, Larrea A, Abadía A R. Magneto structural study of iron-dextran [J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2003, 257(2-3):346-354.
- [10] Simberg D, Park J H, Karmali P P, et al. Differential proteomics analysis of the surface heterogeneity of dextran iron oxide nanoparticles and the implications for their *in vivo* clearance[J]. Biomaterials, 2009, 30(23-24):3926-3933.
- [11] Sreeram K J, Shrivastava H Y, Nair B U. Studies on the nature of interaction of iron(III) with alginates [J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects, 2004, 1670(2):121-125.
- [12] Dai L Q, Wang K P, Zhang Y, et al. Preliminary study on qualitative identification and content of iron in *Angelica Sinensis*(Oliv.) diols polysaccharide-iron complex[J]. China Pharmacist, 2005, 8(7):609-610. [戴立泉, 王凯平, 张玉, 等. 当归多糖铁的定性鉴别及其铁含量的初步研究. 中国药师, 2005, 8(7):608-610.]
- [13] Darshan D, Anderson G J. Interacting signals in the control of hepcidin expression[J]. Biometals, 2009, 22(1):77-87.
- [14] Tavill A S. Diagnosis and management of hemochromatosis [J]. Hepatology, 2005, 33(5):1321-1328.
- [15] Zhou G L, Han Y W, Teng B, et al. Study of iron absorption and transport of iron amino acid chelate by rats[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2004, 35(1):15-22. [周桂莲, 韩友文, 腾冰, 等. 大鼠对氨基酸螯合铁吸收和转运特点的研究. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1):15-22.]
- [16] Zhang X M, Huang L, Zhu J P, et al. Evaluation of the efficacy of ferrous glycinate for improving nutritional status of rat[J]. Journal of food science and biotechnology, 2008, 27(1):20-25. [张晓鸣, 黄玲, 朱建平, 等. 甘氨酸螯合铁对大鼠补铁效果的评价. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1):20-25.]
- [17] Lin H M, Zhang B, Deng S G, et al. Free radical scavenging activities and antibacterial activity of enzymatic hydrolysates protein ferrous chelates peptides from several low value fish of Zhou Shan sea area[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(1):19-24. [林慧敏, 张宾, 邓尚贵, 等. 舟山海域4种低值鱼酶解蛋白亚铁螯合物自由基清除活性与抑菌活性研究. 中国食品学报, 2012, 12(1):19-24.]
- [18] Huo J C, Deng S G, Xie C. Study on preparation of ferrous polypeptide chelate from off-cuts and its antibacterial activity[J]. Food and Machinery, 2009, 25(1):86-89. [霍健聪, 邓尚贵, 谢超. 多肽亚铁螯合物制备及抑菌活性研究. 食品与机械, 2009, 25(1):86-89.]
- [19] Huo J C, Deng S G, Xie C. Study on compound enzymic peptides iron from hairtail off-cuts and its activity of antioxidation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(4):267-270. [霍健聪, 邓尚贵, 谢超. 带鱼下脚料蛋白多肽亚铁螯合物的制备及抗氧化活性研究. 食品工业科技, 2009, 30(4):267-270.]
- [20] Deng S G, Xu T, Man D H, et al. Fe-FPH prepared from *Gadous Macrocephalus* skin improves nutritional anemia of mice [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(5):719-725. [邓尚贵, 徐涛, 满德慧, 等. 鲳鱼(*Gadous macrocephalus*)皮水解蛋白亚铁修饰对大鼠营养性贫血改善的实验研究. 海洋与湖沼, 2010, 41(5):719-725.]
- [21] Saltman P. The role of chelation in iron mechanism [J]. Journal of Chemical Education, 1965, 42(12):682-687.
- [22] Kore D J, Kaufman N, Klavins J V, et al. Interrelation of amino acids and pH on intestinal iron absorption [J]. American Journal of Physiology, 1966, 211(2):414-418.

Effect of different hydrolyzed ferrous chelates treatment on iron-deficiency anemia in rats

HUO Jiancong¹, DENG Shanggui^{1*}, LI Jianrong²

(1. College of Food and Medicine Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;
2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: This paper focused on the high efficient utilization of by-product of *Trichiurus haumela*. The hydrolyzed ferrous chelate prepared from by-product of *T. haumela* was prepared and initially classified by the method of gel chromatography, and recovery and molecular weight (MW) were confirmed. The constitutes and content of amino acid of different chelates were investigated using automatic amino acid analyzer, while the amino acid score were also confirmed. The therapeutic effect of different molecular weight chelates in improving iron-deficiency anemia was conducted by IDA model rats. The results showed that the chelation was classified into 4 materials, the molecular weight of which were 35 400, 8 720, 465 and less than 200 u, respectively. All of these materials belonged to incomplete protein except component II. The evaluation results of amino acid model of ideal protein showed that AAS of these 4 materials were 85.31%, 88.22%, 101.32%, 105.83%, and were also high quality protein. Content of Fe differed significantly from each other, the content of Fe of component I and II were 5.23% and 3.34%, and there was a similarity in Fe content between III and IV (4.22% and 4.58%). The results of rat experiment showed that different chelation did not have the same effect on weight, serum iron, TIBC, liver MDA and SOD, and component II showed the optimal effect in anemia improvement compared with FeSO₄. Though component I did not possess the significant effect, it also had a certain ability in curing anemia.

Key words: by-product of *Trichiurus haumela*; molecular weight; chelate; anemia; amino acid

Corresponding author: DENG Shanggui. E-mail: dengshanggui@163.com