

# 杂交鲟(*Sturgeon cartilage*)软骨中硫酸软骨素的提取方法及分析鉴定\*

陈小娥<sup>1①</sup> 方旭波<sup>1</sup> 余辉<sup>1</sup> 施金玉<sup>1</sup> 吴常文<sup>2</sup>

(1. 浙江海洋学院食品与药学院 舟山 316004; 2. 浙江海洋学院海洋科学学院 舟山 316004)

**提要** 采用稀碱浸提、蛋白酶水解与三氯乙酸沉淀相结合脱蛋白的工艺,对杂交鲟软骨提取硫酸软骨素的方法进行了较系统的研究。综合考察各种影响因素,设计了正交试验对提取工艺参数进行了优化,并对产品的质量指标进行了检验。结果表明,最佳提取工艺参数为:碱提取时料液比为 1:2.0,碱浓度为 4%,碱提温度为 40℃;胰蛋白酶的酶解温度为 55℃,酶量为 2%,酶解时间为 10h,制备的硫酸软骨素为白色粉末,得率为 28.9%,纯度为 92.3%,蛋白质含量为 2.59%,各项质量指标完全符合标准要求。与目前已报道的其他软骨素制备工艺相比较,该方法具有工艺简便,提取率高,产品纯度高的特点。光谱分析法结构鉴定结果表明它是一种软骨素肽,其主要成分为硫酸软骨素 C。

**关键词** 杂交鲟,硫酸软骨素,提取工艺,鉴定

**中图分类号** Q53

硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, 简称 Chs)是一种天然酸性粘多糖(mucopolysaccharide),属生物高分子化合物,广泛存在于人和一些动物如猪、牛、羊、鱼等软骨组织中,且通过共价键与核心蛋白相结合。近年来,海洋生物作为新的药用资源日渐受到重视,据报道,鱼类软骨中所含的硫酸软骨素具有促进冠状动脉循环、降血脂、抗凝血、抗肿瘤和防止血管硬化等活性(刘坤等, 2004; Timar *et al.*, 1995; Mourano *et al.*, 1996),因而引起世界医药界的广泛兴趣。目前,有关鱼类软骨素的提取和分离研究,主要集中在鲨鱼和鳐鱼及其相关品种上,对从海水养殖杂交鲟软骨中提取和分离硫酸软骨素的研究,迄今未见类似报道。

杂交鲟(*Sturgeon cartilage*)是由鳊鱼(*Acipenser dabryanus*)和鲟鱼(*Acipenser sturio* Linnaeus)杂交产生的,是目前最具生长优势的养殖鲟鱼类(吴常文等, 2006),杂交鲟深水网箱养殖技术已在舟山市获得成

功,并形成了相应的加工产业链。作者以网箱养殖杂交鲟加工下脚料为原料,首次研究了杂交鲟软骨的硫酸软骨素提取工艺,并对产品的理化性质及化学结构进行了初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

杂交鲟(*Sturgeon cartilage*)加工下脚料由浙江大海洋生物科技有限公司提供。Chs-A、Chs-C 标准品、葡萄糖醛酸、明胶、盐酸氨基葡萄糖, Sigma 产品。间苯三酚, Fluka 公司产品。胰蛋白酶, 酶活力为  $5 \times 10^4$  U/g, 购于上海生化试剂厂。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 工艺流程** 软骨碎块  $\xrightarrow{\text{碱提取}}$  浸提液  $\xrightarrow{\text{过滤}}$  滤液  $\xrightarrow{\text{酶水解}}$  酶解液  $\xrightarrow{\text{过滤}}$  滤液  $\xrightarrow{\text{乙醇}}$  沉淀物  $\xrightarrow{\text{丙酮、乙醚}}$  湿品  $\xrightarrow{\text{真空冷冻干燥}}$  成品。

\* 国家 863 项目资助, 2006AA100301 号; 浙江省科技支撑和引导计划项目, 2007C33065 号; 浙江省高校青年教师资助项目, 111041002 号。

① 通讯作者: 陈小娥, 博士, 副教授, E-mail: xiaoechen@163.com

收稿日期: 2007-01-26, 收修改稿日期: 2007-05-21

### 1.2.2 操作要点

**软骨处理** 将杂交鲟头骨和脊椎骨投入 80℃ 恒温蒸煮锅煮 0.5h, 取出用清水洗净, 剔肉去杂质, 得到干净软骨, 脱脂粉碎。

**碱提取** 准确称取 100g 软骨碎块于 500ml 烧杯中, 根据正交实验表 1 在各自即定条件下反应, 而后以软骨素提取率为评价指标, 采用间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素含量, 选择最佳的工艺条件。

**酶解** 准确称取 100g 软骨碎块于 500ml 烧杯中, 以碱浓度 4%, 碱提温度 40℃, 料液比 1:2.0 为条件进行提取。根据正交实验表 3 在各自即定条件下加入胰蛋白酶水解, 在 85℃ 下进行灭酶。酶解完毕, 加入三氯乙酸检验水解程度, 4℃ 放置过夜后 10000r/min 冷冻离心 10min, 弃去沉淀。用 10% 醋酸钠调节上清液 pH 为 6.0 左右, 加入三倍体积的乙醇, 10000 r/min 冷冻离心 15min, 分别用丙酮、乙醚洗涤沉淀两次, 得到白色粉末。所得产品进行蛋白质含量测定, 以残留蛋白质含量为指标选出最佳酶解条件。

### 1.2.3 硫酸软骨素的分析鉴定

#### (1) 理化分析

**水分的测定** 常压干燥法。

**蛋白质含量测定** Bradford 法(路阳, 1992)。

**澄清度测定** 用分光光度法测定 640nm 处 50g/L 溶液的吸光值。

**硫酸软骨素含量测定** 间苯三酚分光光度法(高华等, 2000)。

**己糖醛酸含量测定** 咔唑法(张惟杰, 1987)。

**己糖胺含量测定** Elson-Morgan 反应(张惟杰,

1987)。

**硫酸基含量的测定** Dodgson-Price 比浊法测定(Dodgson *et al*, 1962)。

#### (2) 光谱分析

**紫外光谱** 配制 1.0mg/ml 的样品溶液, 用 UV-240 紫外可见分光光度计在 190—330nm 区域内进行紫外光谱扫描。

**红外光谱** 硫酸软骨素 Chs-A、Chs-C 标准品和微量样品分别用 KBr 压片后, 用 Nicolet Nexus 5DXC FT-IR 傅立叶红外光谱仪在 4000-500cm<sup>-1</sup> 区域内进行红外扫描。

#### (3) 氨基酸定性和定量分析

**茚三酮反应** 将制备的硫酸软骨素溶于蒸馏水中(5mg/ml), 取 1ml 溶液加入 0.5ml 磷酸盐缓冲液和 0.2% 的茚三酮试剂, 混匀煮沸 15min, 冷却后观察其颜色变化(胡文婷等, 2006)。

**氨基酸定量分析** 准确称取一定量硫酸软骨素样品, 缓慢加入 6mol/L HCl 8ml, 真空封管, 在 (110 ± 1)℃ 水解 24h。切开水解管用重蒸水定容于 50ml 容量瓶中, 过滤后取滤液 1ml 置于 5ml 的烧瓶中, 旋转蒸发干燥, 加入 1ml pH 2.2 的盐酸溶液溶解后, 转移到样品瓶中, 自动进样, 采用 Agilent1100 液相色谱仪对其主要氨基酸的组成和含量进行测定。

**1.2.4 计算公式** 硫酸软骨素提取率 = 软骨素含量(g)/杂交鲟软骨质量(g) × 100%, 以干基(扣除杂交鲟软骨原料水分含量)计。

硫酸软骨素得率 = 提取的软骨素质量(g)/杂交鲟软骨质量(g) × 100%, 以干基计。

表 1 碱浸提正交实验结果

Tab. 1 Result of orthogonal experiment for alkali extraction

实验号	因素			软骨素提取率(%)
	A 料液比(V/W)	B 浸提温度(℃)	C 碱浓度(%)	
1	1:1.0	30	2	27.32
2	1:1.0	40	4	27.78
3	1:1.0	50	6	30.60
4	1:1.5	30	4	27.20
5	1:1.5	40	6	34.10
6	1:1.5	50	2	29.06
7	1:2.0	30	6	30.62
8	1:2.0	40	2	29.15
9	1:2.0	50	4	31.39
K <sub>1</sub>	28.57	28.38	28.51	
K <sub>2</sub>	30.12	30.34	28.79	
K <sub>3</sub>	30.39	30.35	31.77	
R	1.82	1.97	3.26	

**1.2.5 碱提工艺的确定** 碱提取的目的是为了提高硫酸软骨素(粘多糖)的提取率。碱提取过程中影响多糖提取效果的主要因素有料液比、浸提温度、浸提时间、碱浓度。通过单因素实验表明,浸提时间过长,颜色加深,多糖结构易发生改变,蛋白质含量相对增多,影响到成品的纯度,所以浸提时间宜选择在 6h 左右,由于一次浸提后,浸提液几乎没有残渣,实验进行一次浸提即可。取上清液,以硫酸软骨素提取率为指标,考察了料液比、浸提温度、碱浓度三因素,设计了  $L_9(3^4)$  正交实验表,实验结果见表 1,方差分析结果见表 2。

由正交实验结果可知,影响提取效果的主要因素是碱浓度,其次是碱提温度和料液比。在试验设定的范围内,最佳方案为碱浓度 6%、碱提温度为 50℃、料液比 1:2.0。实验中发现碱浓度越高,将导致产品的杂质含量增高,同时产品色泽偏黄,除杂较困难,增加了后续纯化的复杂性,而产品本身在除杂中会损耗一部分。综合考虑,本实验中的碱浓度宜选择 4%。另外温度过高,多糖很容易氧化,成品颜色也会加深,直接影响产品的纯度,所以,碱提温度设定为 40℃更为合理。因而从整体上看,较优的工艺条件

分别是碱浓度 4%,碱提温度 40℃,料液比为 1:2.0。

**1.2.6 酶解脱蛋白工艺的确定** 蛋白质是硫酸软骨素中的主要杂质之一,所以在提取工艺上必须用蛋白酶进一步除杂。胰蛋白酶可作用于蛋白质分子中的某些肽键,使其降解成醇溶性的短肽或氨基酸,从而有利于粘多糖的分离提取(刘坤等, 2004)。实验先通过加热等预处理,使蛋白质部分变性,部分结合键发生断裂,蛋白质的结构由坚实的立体结构变为松散的结构,这样更有利于胰蛋白酶和底物蛋白质作用(肖凯军等, 1999)。影响胰蛋白酶作用效果的因素主要有酶解温度、pH、酶量和酶解时间,本实验中的胰蛋白酶在 pH 为 8.0 的条件下,以酶解温度、酶解时间和酶量为因素,直接醇沉测定半成品中的蛋白质含量。在单因素实验的基础上,设计的胰蛋白酶酶解正交实验表如表 3,方差分析见表 4。

结果显示,胰蛋白酶用量对成品中的蛋白质含量影响显著。多糖链和蛋白质片段相连,酶用量过少,蛋白质水解不彻底,在三氯乙酸沉淀时,多糖也被沉淀下来造成损失(刘智等, 1990)。用量过多,蛋白质水解程度不再提高,酶本身作为一种未被水解的蛋白质,残留在该体系中会使酶解物中的葡萄糖醛酸的

表 2 碱浸提方差分析表

Tab. 2 Statistics of variance analysis on alkali extraction

因素	偏差平方和 $M$	自由度 $f$	均方 $MS$	$F$ 检验	显著性
A	5.796	2	2.898	0.825	
B	7.736	2	3.868	1.101	
C	19.628	2	9.814	2.794	*
误差	7.030	2	3.515		

注: \*表示差异显著( $P < 0.05$ )

表 3 酶解脱蛋白正交实验表

Tab. 3 Result of orthogonal experiment for enzymolysis on protein removal

实验号	因素			蛋白质含量(%)
	A 温度(℃)	B 时间(h)	C 酶量(%)	
1	45	6	1.0	3.64
2	45	8	1.5	2.71
3	45	10	2.0	1.81
4	50	6	1.5	3.43
5	50	8	2.0	2.24
6	50	10	1.0	3.59
7	55	6	2.0	1.93
8	55	8	1.0	3.45
9	55	10	1.5	2.15
$K_1$	2.72	3.00	3.56	
$K_2$	3.09	2.80	2.73	
$K_3$	2.51	2.52	1.99	
R	0.58	0.48	1.56	

表 4 酶解方差分析表

Tab. 4 Statistics of variance analysis on enzymolysis

因素	偏差平方和 <i>M</i>	自由度 <i>f</i>	均方 <i>MS</i>	<i>F</i> 检验	显著性
A	0.511	2	0.256	6.724	
B	0.354	2	0.177	4.658	
C	3.682	2	1.841	48.447	*
误差	0.08	2	0.040		

注: \*表示差异显著( $P < 0.05$ )

含量下降。以上结果表明, 最优的工艺条件为: 酶解温度 55℃、酶量 2%、酶解时间 10h。

**1.2.7 硫酸软骨素的进一步分离** 经过稀碱水解法和蛋白酶水解法切断了粘多糖与蛋白质相结合的化学键, 但酶水解液中仍含有氨基酸、未完全水解的短肽等杂质, 本实验中采用三氯乙酸检验水解程度。酶水解完毕, 加 60% 三氯乙酸至终浓度 10%, 4℃放置过夜, 于 4℃条件下离心(10000r/min, 10min), 弃去沉淀。在醇沉过程中由于盐离子浓度降低多糖不易析出, 应加入醋酸钠并控制 pH 在 6.0 左右, 此时多糖沉淀最完全。丙酮能脱水、乙醚能除去残余脂肪, 可有效改善杂交软骨素的色泽, 所以沉淀用丙酮、乙醚洗涤数次, 真空冷冻干燥即得成品。

**1.2.8 硫酸软骨素的质量指标** 根据上述工艺, 所制备的产品主要为 ChS-Na, 每千克杂交软骨干原料可获 289g 产品, 产品得率达 28.9%, 产品纯度为 92.3%。样品为白色粉末, 略带咸味, 无臭, 具有较强的吸水性, 易溶于水并形成粘稠溶液, 不溶于酒精、丙酮、乙醚等有机溶剂, 其主要质量指标结果见表 5。

表 5 杂交软骨素主要质量指标  
Tab. 5 Major quality indexes of chondroitin sulfate

项目	标准指标	测定结果
性状	白色粉末	白色粉末
Chs 含量(以干基计)	≥90%	92.3%
己糖醛酸	≥31%	33.37%
己糖胺	≥30%	28.02%
总硫酸基	9.15%—9.6%	9.45%
蛋白质含量	≤3.5%	2.59%
水分含量	≤10%	7.95%
澄清度 $A_{640nm}$	≤0.05	0.02
pH 值(5%溶液)	5.5—7.5	6.5

## 2 分析结果

### 2.1 光谱分析

紫外扫描结果显示, 杂交软骨素样品在 196nm 糖类的特征吸收处有明显的吸收峰, 在 260、280nm 处无吸收峰, 说明该产品中不存在大分子核酸和蛋

白质。在 210—220nm 处有微弱的肽键吸收峰, 表明样品可能是软骨素与少数氨基酸以共价结合的软骨素肽。分析原因, 动物来源的硫酸软骨素(Chs)主要是通过共价键与核心蛋白相连, 以蛋白多糖的形式存在, 用胰蛋白酶能将部分蛋白质降解, 但是还有少量未降解的氨基酸部分与硫酸软骨素构成硫酸软骨素肽。

Chs-C 标准品和样品以及 Chs-A 的红外光谱谱图如图 1 和图 2 所示, 结果显示样品与 Sigma 公司的硫酸软骨 C 的红外光谱图谱基本一致, 3400 $cm^{-1}$  出现的一宽吸收峰为糖类的 O—H 和 N—H 伸缩振动, 在 2920 $cm^{-1}$  处出现的  $CH_2$  或  $CH_3$  的—CH 伸缩振动, 1640 $cm^{-1}$  处有 (C=O, 存在羰基), 1560 $cm^{-1}$  处有 (C—N, 存在乙酰氨基), 1240 $cm^{-1}$  及 860 $cm^{-1}$  处(存在硫酸基)有特征吸收峰。另外, 930 $cm^{-1}$  处是典型硫酸软骨素 A 的特征吸收, 样品在该处微弱的特征吸收, 表明样品中存在少量的 Chs-A。

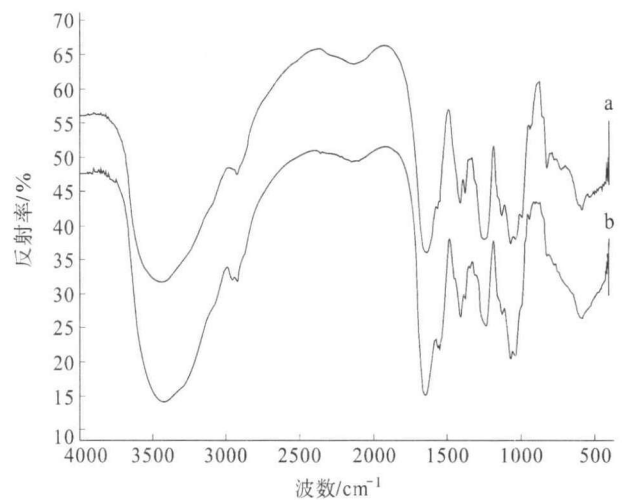


图 1 样品和软骨素 C 标准品的傅立叶红外光谱图  
Fig. 1 Fourier transform infrared spectra of sample and Chs-C standard

a: Chs-C 标准品, b: 样品

### 2.2 氨基酸分析

茚三酮在弱酸溶液中与  $\alpha$ -氨基酸共热, 可使氨基酸氧化脱氨产生酮酸, 酮酸脱羧成醛, 茚三酮本身变为还原茚三酮, 后者再与茚三酮和氨作用产生蓝

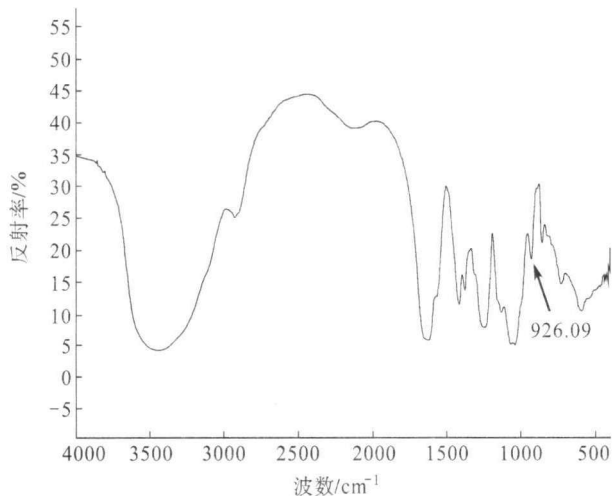


图2 软骨素 A 标准品的傅立叶红外光谱图

Fig. 2 Fourier transform infrared spectra of Chs-A standard

紫色物质。杂交鲟软骨素样品的茚三酮反应呈(蓝紫色)阳性,与紫外光谱结果一致。

杂交鲟软骨素的氨基酸组成如表6所示,经计算,其氨基酸含量为2.34%,与Bradford法测定的结果接近。从表6可以看出,样品的蛋白质中含有全部17种氨基酸,其中丝氨酸的含量最高,其次是谷氨酸,这两种氨基酸约占氨基酸总量的25.59%,另外还含有较高数量的精氨酸、甘氨酸和脯氨酸。

表6 样品中的氨基酸分析

Tab. 6 Composition of amino acids in the samples

氨基酸残基	含量(g/100g)	氨基酸残基	含量(g/100g)
Asp	0.153	Cys-s	0.124
Glu	0.274	Val	0.063
Ser	0.321	Met	0.018
His	0.08	Phe	0.135
Gly	0.232	Ile	0.126
Thr	0.110	Leu	0.092
Ala	0.031	Lys	0.130
Arg	0.224	Pro	0.219
Tyr	0.002	Total	2.34

### 3 讨论

硫酸软骨素属酸性粘多糖,在软骨组织中以蛋白多糖形式存在,多糖链与核心蛋白通过共价键连接(糖肽键),而蛋白多糖的聚集则通过次级键(氢键和盐键等)形成。因此,从杂交鲟软骨组织中提取软骨素仅依靠破坏次级键的方法是不够的,而必须采用降解蛋白质的方法,破坏多糖链与蛋白的共价结合方能达到提取软骨素的目的。为此,作者采用碱提取和复合酶水解的工艺技术,实现硫酸软骨素的有

效提取。

本文首次对杂交鲟软骨硫酸软骨素的生产工艺和理化性质进行了研究。试验结果表明采用碱提取与胰酶水解相结合提取杂交鲟软骨的硫酸软骨素是比较合适的方法,其最佳的提取工艺为:碱提取时料液比1:2.0、碱浓度4%、碱提温度40℃、酶解温度55℃、酶量2%、酶解时间10h。在最佳实验条件下,得到硫酸软骨素为白色粉末,产品纯度达92.3%,收率为28.9%,各项质量指标完全符合标准要求。

红外光谱分析表明,杂交鲟软骨硫酸软骨素以硫酸软骨素C为主,与牛鼻软骨来源软骨素较一致。相比其他动物软骨作为提取软骨素来源(Garnjanagoonchorn *et al.*, 2006),杂交鲟软骨具有预处理简单,提取率高的优势,是一种较为理想的获得软骨素的新原料。

### 参 考 文 献

- 刘坤,刘飒,2004.孔鳐硫酸软骨素的制备.中国海洋药物杂志,99(3):19—22
- 刘智,赖建奇,罗晓红等,1990.硫酸软骨素生产的优化条件.中国医药工业杂志,21(3):106—107
- 肖凯军,郭祀远,李琳等,1999.胰蛋白酶水解鲨鱼鳍软骨提取粘多糖的研究.食品科学,20(7):18—21
- 吴常文,江成国,陈国业,2006.海水养殖杂交鲟的行为习性.应用生态学报,17(2):320—324
- 张惟杰,1987.复合多糖生化研究技术.上海:上海科学技术出版社,283—290
- 胡文婷,孙溢,王跃军,2006.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中抗氧化肽的分离纯化及性质研究.海洋与湖沼,37(1):14—19
- 高华,刘坤,于兹东等,2000.间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素的研究.中国生化药物杂志,21(5):247—248
- 路阳,1992.用考马斯亮蓝G-250迅速灵敏的测定蛋白浓度.生物学杂志,45:24—25
- Dodgson K S, Price R G, 1962. A note on the determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem J, 84: 106—110
- Garnjanagoonchorn W, Wongekalak L, Engkagul A, 2006. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. Chemical Engineering and Processing, 5: 465—471
- Mourano P A S, Pereira M S, Pavao M S G *et al.*, 1996. Structure and anticogulant activity of fucosylated chondroitin sulfate from echinoderms. J Biol Chem, 271(39): 23973—23979
- Timar J, Diczhazi C, Bartha I *et al.*, 1995. Modulation of heparan sulfate/chondroitin sulfate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitor affects liver metabolic potential of tumour cells. Int J Cancer, 62(6): 755—763

## EXTRACTION, ANALYSIS, AND IDENTIFICATION OF CHONDROITIN SULFATE IN *STURGEON* CARTILAGE

CHEN Xiao-E<sup>1</sup>, FANG Xu-Bo<sup>1</sup>, YU Hui<sup>1</sup>, SHI Jin-Yu<sup>1</sup> WU Chang-Wen<sup>2</sup>

(1. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004; 2. Marine Science College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

**Abstract** Preparation of chondroitin sulfate (Chs) from hybrid *Sturgeon cartilage* was introduced. The new procedures include dilute alkali extraction, and deprotein by the combination of enzyme hydrolysis and trichloroacetic acid precipitation. Upon the consideration of influential factors, technological parameters were optimized with orthogonal experiment for determining the physical and chemical properties of the Chs. The optimal conditions were 4% alkali extraction at 40°C in material/solvent ratio at 1 : 2.0, while those of enzymatic hydrolysis were 55°C, 10h duration, and 2% of enzyme amount, under which white-powdered Chs was obtained at yield rate of 28.9%, purity of 92.3%, and protein content of 2.59%; the quality of the product well meets the quality standard. The procedures we used in this experiment are simpler with higher and purer yield than other ones previously reported. Having been identified in spectroscopy, the product is chondroitin sulfate-peptide, an excel Chs-C.

**Key words** Hybrid *Sturgeon cartilage*, Chondroitin sulfate (Chs), Extraction technology, Identification