

鮫鰈鱼硫酸软骨素的提取及性质研究

张小军^{1,2}, 张虹^{1,*}

(1.浙江工商大学, 浙江杭州 310035;

2.浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316100)

摘要:建立了从鮫鰈鱼骨中提取硫酸软骨素的方法,并对提取工艺进行了优化。样品用20%氯化钠碱溶液浸提, pH7.8 条件除去中性蛋白, pH2.5 除去酸性蛋白, 然后用70% (v/v) 乙醇沉淀获得鮫鰈鱼硫酸软骨素。本方法硫酸软骨素的得率为3.47%, 所得鮫鰈鱼硫酸软骨素产品为白色粉末, 纯度为90.94%。对鮫鰈鱼硫酸软骨素的理化性质研究表明, 其水分含量为8.88%, 氮含量为2.86%, 氨基己糖含量为30.12%, 葡萄糖醛酸含量为31.40%。从鮫鰈鱼骨中提取出的硫酸软骨素产品电泳实验显示为单点, 表明其为单一糖胺聚糖, 红外光谱吸收特征显示其为硫酸软骨素 C。

关键词: 鮫鰈鱼, 硫酸软骨素, 提取, 分析

Preparation and properties of chondroitin sulfate from *Lophius litulon* bones

ZHANG Xiao-jun^{1,2}, ZHANG Hong^{1,*}

(1.Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;

2.Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316100, China)

Abstract: A method of preparation of chondroitin sulfate from *Lophius litulon* bones was studied. Briefly, sample were extracted with 20% NaCl, and the solution was removed neutral protein at 90°C, pH7.8, then centrifuging to remove the acidic protein again at pH2.5, finally using 70% (v/v) ethanol to deposit the CS. The yield of this method was 3.47%, and the chondroitin sulfate product was white power, the purity was 90.94%. The CS physicochemical analysis showed that the contents of moisture, nitrogen, hexosamine and uronic acid were 8.88%, 2.86%, 30.12%, 31.40%, respectively. The results of agarose gel electrophoresis reflected that the chondroitin sulfate from *Lophius litulon* was purified. The IR spectrum showed that chondroitin sulfate from *Lophius litulon* was CS-C.

Key words: *Lophius litulon*; chondroitin sulfate; extraction; analysis

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)12-0258-03

硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, CS)是一类糖胺聚糖(GAGs),它是由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰-D-氨基半乳糖以1,3糖苷键结合的双糖为基本单位聚合而成的大分子多糖,根据硫酸基团在N-乙酰-D-氨基半乳糖上的位置不同可分为硫酸软骨素A(CS-A)、硫酸软骨素C(CS-C)等。CS资源丰富,广泛存在于人和动物的骨骼、软骨、肌腱、韧带等组织中。CS作为一种药物,主要用来治疗关节炎和冠心病^[1-2],对神经痛、偏头痛、动脉粥样硬化等^[3]也有一定疗效。硫酸软骨素传统上主要从猪、牛、羊等畜类软骨组织中提取获得,来源和工艺^[4]较为单一。近年来,海洋生物作为新的药用资源日渐受到重视,有研究从孔鲷^[5]、鲑鱼^[6]中提取硫酸软骨素,但对于其他

海洋鱼类硫酸软骨素的研究鲜有报道。鮫鰈鱼(*Lophius litulon*)在我国资源主要分布在黄海、渤海及东海北部,由于日本、美国等国家居民喜食鮫鰈鱼,近年来出口需求旺盛,产量和价格均有大幅增加。鮫鰈鱼经产业化加工后鱼肉、鱼肝等用于出口,同时产生大量的下脚料-鱼骨,有待进一步开发利用。实际生产中鱼骨如不加处理,会造成环境污染,同时也是对宝贵资源的浪费。针对这一问题,本文以简便、成本低廉的方法从鮫鰈鱼骨中提取硫酸软骨素,并研究了鮫鰈鱼硫酸软骨素的理化性质,以提高其经济价值,为有效利用鮫鰈鱼加工下脚料资源提供新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鮫鰈鱼骨 舟山水产公司提供;硫酸软骨素 A 美国 Sigma 公司;盐酸氨基葡萄糖、D-葡萄糖醛酸 国药集团化学试剂有限公司;对二甲氨基苯甲醛、巴

收稿日期:2009-11-11 * 通讯联系人

作者简介:张小军(1982-),男,工程师,在读博士,研究方向:水产品加工及水产品质量安全。

表2 不同 pH 条件下盐解除蛋白方法的比较(n=6)

条件	pH7.8 盐解	pH2.5 盐解	先 pH2.5 盐解 后 pH7.8 离心	先 pH7.8 盐解 后 pH2.5 离心
盐解后溶液状态	黄色较混浊	微混浊	接近透明	接近透明
蛋白质含量(ABS)	0.1724	0.1633	0.1612	0.1592

比妥 上海化学试剂厂;乙酰丙酮、硫酸 优级纯;吡啶、甲苯胺蓝、冰乙酸、盐酸、十六烷基三甲基溴化铵、甲酚红、琼脂糖、氢氧化钠、氯化钠、无水乙醇均为分析纯,购自华东医药公司。

723 分光光度计 上海第三分析仪器厂;pH 计 杭州华光无线电厂;旋转蒸发仪 郑州科工贸有限公司;恒温水浴箱 上海医疗器械五厂;水平电泳槽 北京市六一仪器厂;AVATAR-360 型红外光谱仪 美国尼高力公司;搅拌机 杭州仪表电机厂;离心沉淀机 上海医用分析仪器厂;冷冻干燥仪 北京博医康实验仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料处理 新鲜鮫鱼骨将余肉剔净,湿骨 60℃烘干后粉碎成粉末,4℃干燥保存。

1.2.2 提取工艺 浸提:取 100g 干骨粉加 20% 的 NaCl 溶液 500mL,搅拌使其溶解,然后用 10% 的 NaOH 溶液调 pH 至 12.5,40℃恒温搅拌提取 10h,提取过程中随时校正 pH 至 12.5。提取液过滤,滤渣在相同条件下重复提取一次,合并两次滤液。

盐解除蛋白:滤液用 10% 的 HCl 溶液调 pH 至 7.8,90℃恒温盐解 20min,迅速降温至室温,静置 2h,得盐解液。盐解液 3000r/min 离心 10min,过滤除去中性蛋白沉淀。滤液继续调盐解液 pH 至 2.5,搅拌 10min,3000r/min 离心 10min,过滤除去酸性蛋白沉淀,然后滤液调 pH 至 6.5,得清亮的盐解液。

乙醇沉淀:在所得盐解液中不断搅拌加乙醇至溶液体系中乙醇体积分数为 70%,静置 12h 以上,收集沉淀用无水乙醇洗涤两次,真空冷冻干燥得鮫鱼硫酸软骨素产品。

1.3 分析方法

1.3.1 氨基己糖含量测定 采用卫生部颁布药品标准规定的方法^[7],并根据谢继青等人^[8]对关键的两步:乙酰化和显色操作分别进行了改进,做到冰浴乙酰化同时计时,显色随加随计时。氨基己糖含量 × 2.82 即为 CS 的含量。

1.3.2 葡萄糖醛酸含量测定 按照文献方法^[9]进行测定。

1.3.3 氮含量测定 按照微量凯氏定氮法^[10]进行测定。

1.3.4 水分含量测定 按照常压干燥法^[11]进行测定。

1.3.5 琼脂糖电泳法分析 按照文献方法^[12]进行测定。

1.3.6 红外光谱分析 在 400~4000cm⁻¹波数范围内扫描,KBr 压片测定。

2 结果与分析

2.1 提取工艺

2.1.1 不同盐离子强度对 CS 提取率的影响 取四

份 100g 干头骨粉分别以 15%、20%、25% 的 NaCl 溶液对其进行浸提,其它提取步骤均按基本提取工艺,结果如表 1 所示。溶液中盐浓度对提取有很大的影响,盐浓度较低时,离子强度低,造成提取不完全,同时得到的产品含有较多蛋白质,造成溶解性偏低;当盐浓度过高时,高浓度盐在后续工艺中造成产品变色,同时提取率会降低。实验表明,20% NaCl 对 CS 的提取效果最好。

表1 不同浓度 NaCl 对 CS 得率和颜色的影响(n=6)

NaCl 浓度(%)	10	15	20	25
CS 提取率(%)	2.46	2.69	3.47	3.07
CS 颜色	白色	白色	白色	浅褐色
溶解性	难溶	较难溶	易溶	易溶

2.1.2 不同 pH 对除蛋白的影响 取四份经基本工艺步骤 2.1.1 提取得到的浸提液,进行如下盐解除蛋白操作:第一份在 pH7.8 条件下升温盐解,然后离心除蛋白;第二份在 pH2.5 条件下升温盐解,然后离心除蛋白;第三份先在 pH2.5 条件下升温盐解,然后离心除蛋白,接着再调 pH 至 7.8,再离心除蛋白;第四份先在 pH7.8 条件下升温盐解,然后离心除蛋白,接着再调 pH 至 2.5,再离心除蛋白。Bradford 染料结合法^[9]测定以上除蛋白后各盐解溶液的吸光值。

对不同 pH 条件处理盐解液除蛋白的结果如表 2 所示。结果表明,采用先在 pH7.8 条件下升温盐解,然后离心除去中性蛋白,接着再调 pH 至 2.5,再离心除去酸性蛋白的方法除蛋白效果最好。此时溶液呈澄清透明,蛋白质含量最低,证明使用该方法可获得较好的除蛋白效果。

2.1.3 醇沉条件的选择 取四份 100g 干骨粉按基本提取工艺提取 CS,在乙醇沉淀时,分别加乙醇至体系中乙醇含量分别为 60%、65%、70%、75%,其结果如表 3 所示。由表 3 可知,60% 乙醇沉淀 CS 含量最高,但得率较低,并未将硫酸软骨素完全沉淀;75% 的乙醇使溶液总体积过大,不利于收集,造成了沉淀收集时的损失从而使得率偏低;70% 乙醇得到的得率最高,在该浓度条件下溶液中糖胺聚糖的沉淀效果最好。因此选择 70% 乙醇沉淀糖胺聚糖,此时得率为 3.52%,氨基己糖含量为 26.42%。

表3 不同乙醇浓度(v/v)对提取效果的影响(n=6)

乙醇浓度(%)	60	65	70	75
CS 得率(%)	3.33	3.40	3.52	3.41
氨基己糖含量(%)	30.26	30.19	26.42	24.13

2.2 理化性质分析

取 100g 鮫鱼骨粉按照优化的工艺提取 CS,然后测定所得 CS 的各项指标,其结果如表 4 所示。结果表明,鮫鱼硫酸软骨素各项指标均符合卫生部颁布药品标准规定的硫酸软骨素指标^[7]。

表4 鮫鳔鱼硫酸软骨素的理化性质(n=6)

理化指标	标准	CS
颜色	白色或类白色	洁白
水分含量(%)	≤10.0	8.88
氨基己糖含量(%)	国内≥24.0 出口≥30.0	30.12
N含量(%)	2.5~3.8	2.86
葡萄糖醛酸含量(%)		31.40
CS含量(%)		90.94
CS得率(%)		3.47

注:除CS得率和水分含量外各项数值均为干基含量。

2.3 琼脂糖凝胶电泳

分别对椎骨提取所得CS和头骨提取所得CS进行电泳,结果如图1所示。电泳结果显示,椎骨和头骨所得提取物均与CS标准品一致,且均为单一的蓝紫色电泳点,证明所得产品纯度较高,不含其他糖胺聚糖。

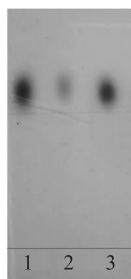


图1 鮫鳔鱼硫酸软骨素的琼脂糖电泳图

注:图中1为硫酸软骨素标准品,
2为鮫鳔鱼椎骨提取硫酸软骨素,
3为鮫鳔鱼头骨提取硫酸软骨素。

2.4 红外吸收光谱

鮫鳔鱼硫酸软骨素的红外光谱图如图2所示,红外光谱在 3440cm^{-1} 附近有强吸收,说明有多糖羟基(-OH);在 1569 、 1635cm^{-1} 附近有强吸收,说明有乙酰氨基(-NHCOCH₃-)存在; 1423cm^{-1} 附近有吸收,说明有羧基(-COO⁻)存在。在 1249cm^{-1} 附近有弱吸收,说明有硫酸基(-O-SO₃-)存在。以上这些红外光谱特征与CS-C的国外报道^[13]一致,表明鮫鳔鱼硫酸软骨素为硫酸软骨素C。

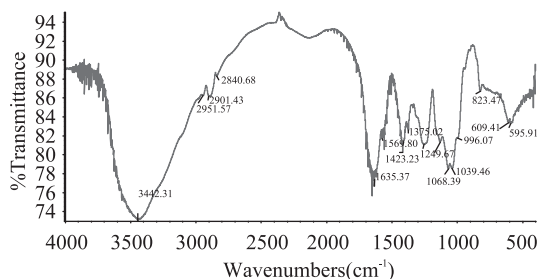


图2 鮫鳔鱼硫酸软骨素红外光谱图

3 结论

通过系统的实验建立了鮫鳔鱼骨中提取硫酸软骨素的方法,为有效利用鮫鳔鱼加工下脚料资源提供了新途径。样品用20%氯化钠碱溶液浸提,接着在pH7.8条件除去中性蛋白,再pH2.5除去酸性蛋白,然后用70%乙醇沉淀获得鮫鳔鱼硫酸软骨素。本方法硫酸软骨素得率为3.47%,所得鮫鳔鱼硫酸软骨素产品为白色粉末,水分含量为8.88%,氨基己糖含量为30.12%,葡萄糖醛酸含量为31.40%。从鮫鳔鱼骨中提取出的硫酸软骨素产品电泳实验显示为单点,表明其为单一糖胺聚糖。红外光谱吸收特征显示其为硫酸软骨素C。

参考文献

- [1] Takamishi GC, Borst CA. Glucosamine and chondroitin in the treatment of osteoarthritis [J]. Women's Health Primary Care, 2001, 4(1): 61.
- [2] Morrison LM, Enrick NL. Coronary heart disease: Reduction of death rate by chondroitin sulfate A [J]. Angiology, 1973, 24: 269.
- [3] Maksimenko A V, Golubykh V L, Tischenko EG. Catalase and chondroitin sulfate derivatives against thrombotic effect induced by reactive oxygen species in a rat artery [J]. Metabolic Engineering, 2003, 5: 177-182.
- [4] 马淑涛, 张天民. 硫酸软骨素生产工艺探讨 [J]. 中国医药工业杂志, 1993, 18: 348.
- [5] 刘坤, 刘飒. 孔鳔硫酸软骨素的制备 [J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 99(3): 19-22.
- [6] 陈小娥, 方旭波, 余辉, 等. 鲑鱼软骨中硫酸软骨素的提取工艺研究 [J]. 食品科技, 2008, 33(12): 214-217.
- [7] 中国药典委员会编. 中华人民共和国卫生部药品标准二部第六册(生化药品第一分册) [S]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 138-139.
- [8] 齐敬总, 闫晓玲, 王凤山. 硫酸软骨素含量测定方法介绍 [J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(3): 162.
- [9] 凌沛学. 透明质酸 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 41.
- [10] 张意静. 食品分析技术 [M]. 中国轻工业出版社, 2001: 162-163.
- [11] 宁正祥. 食品成分分析手册 [M]. 中国轻工业出版社, 1998: 518.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 浙江大学出版社, 1994: 554-556.
- [13] Mathews MB, Wisner LA, Iwayama Y, et al. Isomeric chondroitin sulfate [J]. Nature, 1958, 181: 421.

(上接第257页)

- [14] 孙越, 童建, 李爱民. 3种树脂对水溶液中单宁吸附性能的比较研究 [J]. 离子交换与吸附, 2007, 23(6): 512-518.
- [15] 欧阳玉祝, 李佑稷, 石爱华. 大孔树脂对单宁酸的吸附与解吸行为研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 152-154.

- [16] Anirudhan T S, Ramachandran M. Adsorptive removal of tannin from aqueous solutions by cationic surfactant-modified bentonite clay [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2006, 299: 116-124.