

文章编号:1000-0615(2008)03-0478-06

鲟鱼硫酸软骨素的纯化及其特性

郑江, 关瑞章, 黄文树, 黄世玉

(集美大学水产学院,福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室,福建 厦门 361021)

摘要:采用乙醇分级沉淀、柱层析等方法纯化了鲟鱼硫酸软骨素,并对提取纯化的鲟鱼硫酸软骨素(色谱纯)与Sigma的鲨鱼硫酸软骨素(色谱纯)进行了比较,探讨了二者在分子量、旋光度、硫酸基团含量和紫外可见光谱等方面的差异。结果表明,鲟鱼硫酸软骨素的重均、数均和Z均分子量、比旋光度、硫酸基团含量均与鲨鱼硫酸软骨素存在显著差异($P<0.05$);在紫外可见光谱图中,鲟鱼硫酸软骨素的最高吸收波长在220 nm,而鲨鱼硫酸软骨素则在230 nm。这些差异表明,鲟鱼硫酸软骨素在生物活性和药用功能方面可能与鲨鱼硫酸软骨素存在区别,并推测鲟鱼硫酸软骨素可能具有较好的抗氧化活性和抗凝血活性。

关键词:鲟鱼;硫酸软骨素;纯化;分子量;比旋光度;硫酸基团含量;紫外可见光谱

中图分类号:Q 538;TQ 464.1

文献标识码:A

硫酸软骨素(简称CS)是从动物软骨组织中提取纯化出的具有多种异构体的酸性粘多糖。它能降低血脂^[1],促进骨的形成和愈合^[2-3],对肿瘤细胞和病毒有抑制作用^[4-5],并具有较高的粘性和较好保水性^[6],因此在医药、食品和化妆品行业有广泛应用。目前市场上的硫酸软骨素产品主要为鲨鱼硫酸软骨素,但由于鲨鱼资源有限,限制了它的开发应用。鲟鱼属软骨鱼纲、鲟形目,软骨组织含量丰富。近年来,鲟鱼养殖规模的不断扩大、成本的逐渐降低,为鲟鱼硫酸软骨素的研究开发提供了较好的条件。

本文以鲟鱼硫酸软骨素的粗制品为原料,对其进行进一步的纯化分离,并对纯化产品的分子量、旋光性、硫酸基团含量和紫外可见光谱等进行了比较分析研究。

1 材料和方法

1.1 材料

鲟鱼硫酸软骨素粗制品,为本实验室从史氏

鲟(*Acipenser schrencki*)软骨中提取制备得到;鲨鱼硫酸软骨素,Sigma公司产品,色谱纯;葡聚糖标准品(Dextran,分子量为5 000 u,12 000 u,50 000 u,81 400 u,150 000 u),Sigma公司产品。

1.2 鲟鱼硫酸软骨素的纯化

乙醇分级沉淀 参考文献[7]的方法,取1 g 鲟鱼硫酸软骨素粗制品,用200 mL pH 4.6的醋酸钙缓冲液溶解后,在强力搅拌下缓缓加入58 mL 无水乙醇,4℃静置过夜;4000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液在强力搅拌下缓缓加入40 mL 无水乙醇,4℃静置过夜;离心去除硫酸乙酰肝素等沉淀,上清液放至室温后,在强力搅拌下缓缓加入50 mL 无水乙醇,4℃静置过夜,次日离心收集沉淀。

过葡聚糖凝胶G-50柱 上述沉淀用双蒸水溶解后配成20 mg·mL⁻¹样品液,过葡聚糖凝胶G-50柱(75 cm×1.6 cm),上样量600 mg,上样体积30 mL,双蒸水为洗脱液,流速1 mL·min⁻¹,每管1.0 mL收集洗脱液。用咔唑法^[8]测定每管硫酸软骨

收稿日期:2007-04-05

资助项目:厦门市科技计划项目(3502Z20031048)

作者简介:郑江(1971-),男,福建惠安人,副教授,硕士,主要从事海洋生物活性物质和海洋生物工程方面的研究。Tel:0592-8959980, E-mail: zhengjiang618@gmail.com

通讯作者:关瑞章, E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

素的含量,合并含有硫酸软骨素的洗脱液。

过丙稀葡聚糖凝胶柱 将上述洗脱液再过丙稀葡聚糖凝胶柱 Sephacryl S-300(75 cm×1.6 cm),上样体积 10 mL,双蒸水为洗脱液,流速 0.5 mL·min⁻¹,每管 1.0 mL 收集洗脱液。用咔唑法^[8]测定每管硫酸软骨素的含量,合并含有硫酸软骨素的洗脱液。

沉淀干燥 上述洗脱液加入一定量的 NaCl(使其浓度达到 5%),然后边搅拌边加入 2.5~3.0 倍体积的无水乙醇,4℃静置过夜,次日 4000 r·min⁻¹离心 10 min,收集沉淀,真空干燥,得鲟鱼硫酸软骨素纯品。

1.3 硫酸软骨素的纯度鉴定

首先采用纸层析方法^[9]以确定样品中是否含有氨基酸和肽类杂质。然后再用 Agilent 1100 高效液相色谱仪和示差折光检测器检测样品是否为单一谱峰。色谱条件为:TSK G 4000 PW 凝胶色谱柱,柱温 30℃;流动相为 0.1 mol·L⁻¹ NaNO₃,流速 0.5 mL·min⁻¹,样品溶于流动相,制成 4 mg·mL⁻¹浓度的溶液后进行测定。

1.4 分子量的测定

用 Agilent 1100 高效液相色谱仪和示差折光检测器测定,色谱条件同上。用已知分子量的葡聚糖标样制作标准曲线,样品的重均分子量

(Mw)、数均分子量(Mn)和 Z 均分子量(Mz)由仪器自带软件计算得到。

1.5 旋光度的测定

准确配制浓度为 10 mg·mL⁻¹的硫酸软骨素样品溶液,在 20℃下,采用钠光 D 线(波长 589.3 nm),用 WZZ-2B 数显自动旋光仪测定旋光度 α ,然后计算其比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ 。

1.6 紫外可见吸收光谱的测定

将样品配成 1%的水溶液,用 DU520 紫外可见分光光度计在 190~800 nm 波长范围内每隔 5 nm 测一吸收值,绘制吸收值与波长的光谱图,即得样品的紫外可见吸收光谱图。

2 结果

2.1 鲟鱼硫酸软骨素的纯化

鲟鱼硫酸软骨素粗制品经乙醇分级沉淀后,纸层析检测显色,表明其中仍还含有少量的氨基酸类的杂质;而经 G-50 柱层析后,纸层析检测不显色,说明小分子的氨基酸类杂质已被清除,但高效液相色谱图显示样品中还含有 2 个杂质峰(图 1-a);样品再经 Sephacryl S-300 柱层析后,色谱图上显示样品在分子量 5 000~700 000 u 范围内呈单一谱峰,已无杂质峰(图 1-b),表明该样品已达色谱纯。

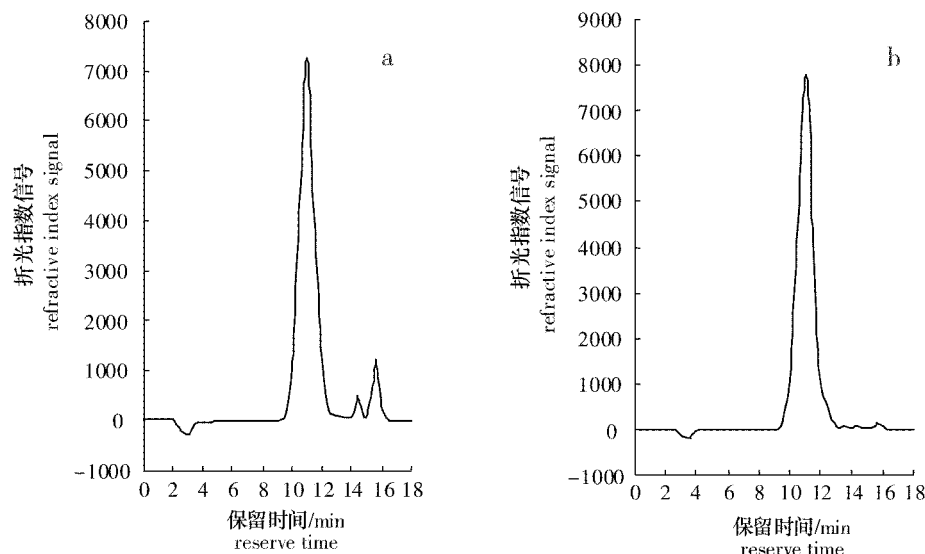


图 1 鲟鱼硫酸软骨素样品经 G-50 柱(a)和 Sephacryl S-300 柱(b)后的液相色谱图

Fig. 1 HPLC spectrum of sturgeon chondroitin sulfate through G-50 column (a) or Sephacryl S-300 column (b)

2.2 两种硫酸软骨素分子量的比较

经液相色谱后,标准葡聚糖分子量的自然对

数与其保留时间的关系曲线,即分子量的标准曲线显示,其线性相关系数 $R^2 = 0.9974$,用 t 检验

对线性回归进行显著性分析,为极显著线性相关 ($P<0.01$)(图 2)。鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素的三种分子量中,数均分子量 M_n 最小,Z 均分子量 M_z 最大,而重均分子量 M_w 则介于二者之间(表 1)。比较两种硫酸软骨素的分子量发现,鲟鱼硫酸软骨素的 M_n 显著高于鲨鱼硫酸软骨素($P<0.05$),但 M_w 和 M_z 却显著小于鲨鱼硫酸软骨素($P<0.05$)。通过 t 检验法发现,鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素的分子量分布也呈现显著差异($P<$

0.05),相应的变异系数 $v(v=SD/\bar{X})$ 分别为 0.001 7(鲟鱼 CS)和 0.006 25(鲨鱼 CS),说明纯化出的鲟鱼硫酸软骨素的分子量组分更为均一、集中,纯度也更高。

2.3 两种硫酸软骨素硫酸基团含量的比较

硫酸基团的含量与硫酸多糖的活性密切相关,鲟鱼硫酸软骨素的硫酸基团含量为 11.96%,鲨鱼硫酸软骨素为 16.38%,二者差异极显著 ($P<0.01$)(图 3)。

表 1 鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素的分子量及其分布
Tab.1 Molecular weight and its distribution of sturgeon and shark chondroitin sulfates $\bar{X}\pm SD$

样品 sample	平均分子量 average molecular weight			分子量分布 molecular weight distribution(重均/数均)
	数均 M_n	重均 M_w	Z 均 M_z	
鲟鱼硫酸软骨素 sturgeon CS	72504±3053	87158±3562	99811±2741	1.20±0.002
鲨鱼硫酸软骨素 shark CS	70734±2709	90625±3179	106970±2807	1.28±0.008

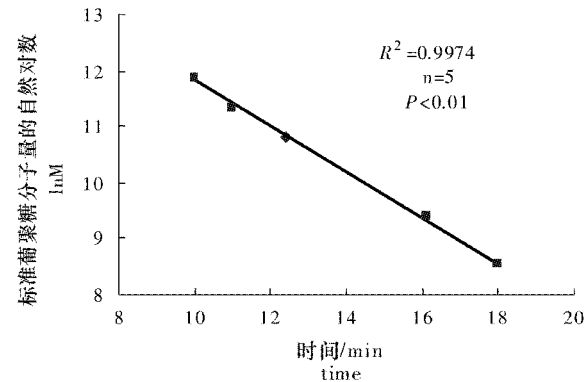


图 2 液相色谱分析后标准葡萄糖分子量的自然对数与其保留时间的关系曲线

Fig.2 Plot of the logarithm of standard dextran's molecular weights vs their reserve time through HPLC

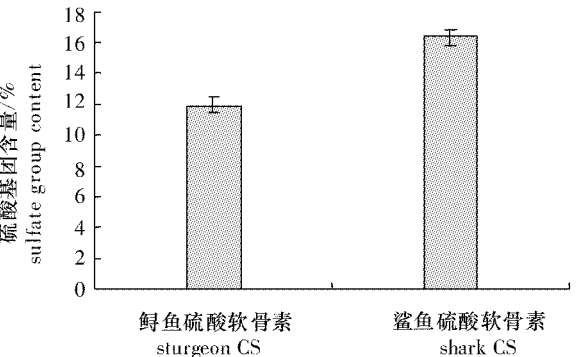


图 3 两种硫酸软骨素硫酸基团含量的比较
Fig.3 Comparison between sulfate group contents of sturgeon and shark CSs

2.4 两种硫酸软骨素比旋光度的比较

鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素的比旋光度都是负值,都为左旋多糖,但鲟鱼硫酸软骨素在 20℃、钠光下的比旋光度 $[\alpha]_D^{20}=-17.5^{\circ}\pm0.1^{\circ}\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$,而鲨鱼的比旋光度 $[\alpha]_D^{20}=-20^{\circ}\pm0.05^{\circ}\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$,二者存在极显著差异($P<0.01$)(图 4)。

2.5 两种硫酸软骨素紫外可见吸收光谱的比较

鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素在 260 nm 和 280 nm 处均无核酸和蛋白质的吸收峰,在 220~240 nm 附近则有糖的吸收,而在 400~800 nm 之间的吸收都较低;鲟鱼硫酸软骨素的最大吸收峰在 220 nm,峰形较尖锐,而鲨鱼硫酸软骨素的最大吸收峰在 230 nm,峰形较平、较宽,无明显尖峰(图 5)。

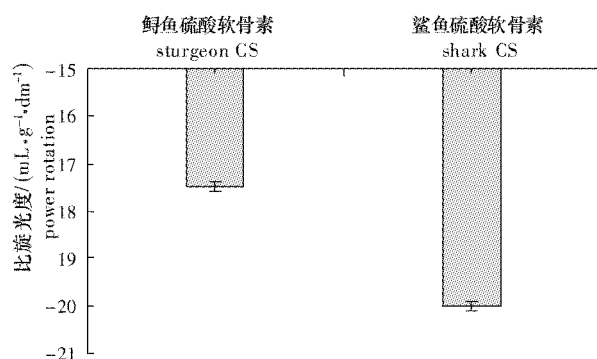


图4 两种硫酸软骨素比旋光度的比较

Fig.4 Comparison between power rotations of sturgeon and shark CSs

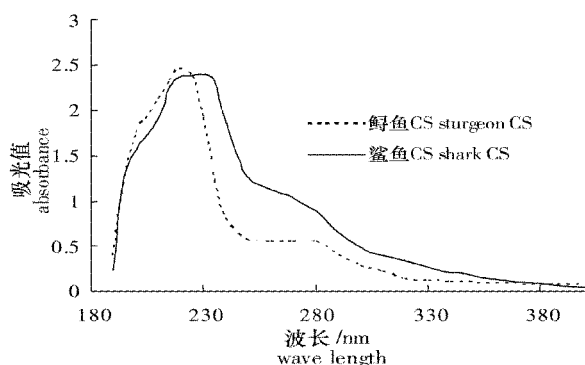


图5 鲨鱼和鲟鱼硫酸软骨素的紫外可见吸收光谱图

Fig.5 UV and visible absorbance spectra of sturgeon and shark CSs

3 讨论

3.1 鲟鱼硫酸软骨素的纯化

通常采用乙醇分级沉淀和柱层析的方法来进行硫酸软骨素的纯化^[7]。我们的研究表明,仅仅通过乙醇分级沉淀和 G-50 柱层析虽能去除硫酸乙酰肝素、氨基酸和蛋白质等杂质,但样品中仍残留有少量杂质。液相色谱的保留时间表明,这部分杂质的分子量在 10 000~20 000 u,分析有可能是提取过程中产生的一些多糖碎片,也可能是一些极微量的蛋白质杂质,用纸层析已难以鉴别出。因此还需采用 S-300 柱以进一步纯化。

3.2 分子量与活性的关系

硫酸多糖的分子量大小与其活性密切相关,因此分子量及其分布是多糖类化合物的一项重要指标。数均分子量 M_n 、重均分子量 M_w 和 Z 均分子量 M_z 是采用不同的统计平均方法得到的

三种分子量,其中 M_n 对低分子量的成分较敏感,而 M_w 和 M_z 则对高分子量成分较为敏感。鲨鱼硫酸软骨素的 M_n 较低,而 M_w 和 M_z 较高,表明鲨鱼硫酸软骨素中的低分子量成分和高分子量成分占的比重较大,即鲨鱼硫酸软骨素的分子量分布差异较大、呈现一定的两极化。分子量分布指标 M_w/M_n 也进一步证实了鲨鱼硫酸软骨素的分子量分布要比鲟鱼硫酸软骨素的宽,即鲟鱼硫酸软骨素的纯度更高。我们的研究还显示,鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素的分子量均高于目前医疗注射用的硫酸软骨素^[10],这虽然不利于人体吸收,但高分子量的硫酸软骨素能与低密度脂蛋白结合,对于降低血脂、减少冠心病的发生有重要意义^[11];另外,高分子量的硫酸软骨素在体外能提高胶原纤维的强度,是一种较好的医用生物材料^[12],这也为硫酸软骨素的研发提供了一个新的方向。

3.3 硫酸基团与活性的关系

硫酸多糖的活性还与硫酸基团的含量和结合形式有直接关系。邓成华等^[13]研究了硫酸虎奶多糖的抗氧化作用后发现,硫酸取代度较低的多糖,其抗氧化活性均高于取代度较高的多糖。Mulloy 等^[14]则发现,硫酸软骨素的抗凝血活性与硫酸基团的位置密切相关,当 C_4 位的硫酸基变为 C_6 位时,其抗凝活性完全丧失,因此 C_4 位的硫酸基有利于硫酸软骨素的抗凝血活性。我们的前期研究还发现,鲟鱼软骨素中同时存在有 C_4 和 C_6 的硫酸基,而鲨鱼硫酸软骨素中只有 C_6 硫酸基(研究结果已被《光谱学和光谱分析》杂志接受)。这些表明,与鲨鱼硫酸软骨素相比,鲟鱼硫酸软骨素可能具有较好的抗氧化活性和抗凝血作用。

集美大学水产学院的陈强老师和华东理工大学的夏玮老师在分子量的测定方面给予了很大的支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 付德华,何志坚. 鲨鱼酸性粘多糖抗血栓作用的研究[J]. 中国海洋药物,1992, 11(3): 18-19.
- [2] Huter G K, Weinert C A. Inhibition of proteoglycan biosynthesis decreases the calcification of chondrocyte culture[J]. Connect Tissue Res, 1996, 35: 379-384.

- [3] Jean-Pierre B, Henri C, Eugene N. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarthritic system [J]. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2001, 31 (1): 58–68.
- [4] József T, Csaba D, Irén B, *et al.* Modulation of heparan sulfate/chondroitin sulfate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metabolic potential of tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 1995, 62(6): 755–769.
- [5] Barbara C, Barbara B, Antonino D C, *et al.* Sepharose-bound, highly sulfated glycosaminoglycans can capture HIV-1 from culture medium [J]. *Carbohydrate Research*, 2005, 340(4): 759–764.
- [6] 李 南. 硫酸软骨素的开发及生产工艺控制[J]. *上海水产大学学报*, 1998, 7(1): 38–43.
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 科学技术出版社, 1987: 270–272, 293–298.
- [8] 于兹东, 杨桂明, 高 华, 等. 咔唑分光光度法测定硫酸软骨素[J]. *青岛大学学报(自然科学版)*, 2005, 18(3): 41–44.
- [9] 董晓燕. 生物化学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 37–39.
- [10] 孙凌云, 范慧红. 高效凝胶渗透色谱法测定硫酸软骨素的分子量及其分布[J]. *中国生化药物杂志*, 2001, 22(4): 195–196.
- [11] Celso S A, Paulo A S M. Interaction of high molecular weight chondroitin sulfate from human aorta with plasma low density lipoproteins[J]. *Atherosclerosis*, 1988, 73(2-3): 113–124.
- [12] Atul K G, Richard A B, Frederick H S, *et al.* Effect of proteoglycans on type I collagen fibre formation[J]. *Biomaterials*, 1989, 10(6): 413–419.
- [13] 邓成华, 杨祥良, 王 雁, 等. 取代度对硫酸酯化虎奶多糖抗氧化活性的影响[J]. *华中理工大学学报*, 2000, 28(5): 104–107.
- [14] Mulloy B, Mourao P A S, Gray E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 77(1): 123–135.

Purification and characteristics of sturgeon chondroitin sulfate

ZHENG Jiang, GUAN Rui-zhang, HUANG Wen-shu, HUANG Shi-yu

(Fisheries College of Jimei University, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety in Fujian Province University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Chondroitin sulfate (CS) has many functions and is widely used in food, medical and cosmetic industries. Elasmobranch is the main material source of fish chondroitin sulfate. Nowadays the main fish chondroitin sulfate product is from shark cartilage. However, it can not be mass-produced for the limited resources of shark. Sturgeon has resource advantage because it can be fostered by manpower. But the characteristics of sturgeon chondroitin sulfate have not been studied so far. In the present paper, sturgeon chondroitin sulfate was purified by the methods of ethanol classification precipitation and column chromatography. The purified sturgeon CS (chromatographically pure) and shark CS (chromatographically pure) of Sigma company were comparatively studied in molecular weight, rotation, sulfate group content, UV and visible spectra. The results show that the weight average, number average and Z average molecular weights of sturgeon CS are remarkably different from those of shark CS ($P < 0.05$). Molecular weight distribution indicates that the purity of extracted sturgeon CS is much higher than the shark CS ($P < 0.05$). It also shows that the sulfate group content of sturgeon CS is less than that of shark CS ($P < 0.01$). The power rotations of the two CSs are proved to be very different, too ($P < 0.01$). The strongest absorbance wavelength was 220 nm in UV and visible spectrum of sturgeon CS, while 230 nm in shark CS. These characteristics of sturgeon CS suggest its probable speciality in bioactivity and medical function. Presumably, sturgeon CS may have better anti-oxidation and anti-coagulant activities.

Key words: sturgeon; chondroitin sulfate; purification; molecular weight; power rotation; sulfate group content; UV and visible spectra