

鲟鱼软骨硫酸软骨素降解产物的结构分析

王俊¹, 张扬星¹, 熊光权¹, 吴文锦¹, 黄镭², 汪兰¹

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064)

(2. 武汉设计工程学院食品与生物科技学院, 湖北武汉 430205)

摘要:以鲟鱼软骨为原料,采取碱提-酶解-醇沉的方式提取硫酸软骨素后,采用普通粉碎、超微粉碎联合辐照技术分别对硫酸软骨素样品进行降解后,再利用离子色谱法、紫外-可见光光谱扫描法、红外吸收光谱法、核磁共振波谱法研究硫酸软骨素的化学结构。单糖分析表明,粗样中的鼠李糖经超微粉碎加辐照共处理后含量从56.16%增加到59.31%,粗样中的葡萄糖醛酸经超微粉碎加辐照共处理后含量由33.69%降低到31.84%;而纯化样品中葡萄糖醛酸含88.77%。紫外光谱分析表明硫酸软骨素经超微粉碎与辐照的共处理方式使硫酸软骨素的分子结构发生断裂即糖苷键的分裂及产生C=O基团。红外光谱结果表明普通粉碎及经超微和辐照降解共处理的硫酸软骨素均呈现4-硫酸软骨素和6-硫酸软骨素的典型特征。核磁共振分析得出超微粉碎和辐照的处理使硫酸软骨素上的乙酰半乳糖胺和葡萄糖质子信号增强,且推测鲟鱼硫酸软骨素包含GlcA(β 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc-4SO₃和GlcA(β 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc-6SO₃重复单元结构。

关键词: 硫酸软骨素; 制备; 降解; 超微粉碎; 辐照; 结构

文章篇号: 1673-9078(2019)12-102-111

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.014

Structural Analysis of the Degradation Products of Chondroitin Sulfate from Sturgeon Cartilage

WANG Jun¹, ZHANG Yang-xing¹, XIONG Guang-quan¹, WU Wen-jing¹, HUANG Lei², WANG Lan¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear Agriculture, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China) (2. School of Food and Biotechnology, Wuhan Institute of Design and Engineering, Wuhan 430205, China)

Abstract: Using sturgeon cartilage as the raw material, chondroitin sulfate was extracted via the alkaline extraction-enzymatic-ethanol precipitation process, degraded by conventional comminution and superfine pulverization combined with irradiation technology, and then subjected to chemical and structural analyses of chondroitin sulfate using ion chromatography, ultraviolet-visible spectroscopy, infrared absorption spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Monosaccharide analysis showed that the content of rhamnose in the crude sample increased from 56.16% to 59.31% after the co-treatment of superfine comminution combined with irradiation, and the content of glucuronic acid in the crude sample decreased from 33.69% to 31.84% after the co-treatment of superfine comminution combined with irradiation. The final purified samples contained 88.77% glucuronic acid. Ultraviolet spectroscopy revealed that the co-treatment by superfine pulverization combined with irradiation caused breakdown in the molecular structure of chondroitin sulfate i.e. the cleavage of glycoside bonds and the production of C=O groups. The results of infrared spectroscopy showed that the chondroitin sulfate treated by conventional comminution or the co-treatment of superfine comminution combined with irradiation treatment. The nuclear magnetic resonance analysis showed that the proton signals of acetylgalactosamine and glucose on chondroitin sulfate were enhanced after the treatment of superfine pulverization combined with irradiation. It is speculated that the chondroitin sulfate from sturgeon cartilage contained GlcA (β 1 $\rightarrow$ 3) GalNAc-4SO₃ and GlcA (β 1 $\rightarrow$ 3) GalNAc-6SO₃ repeating structural units.

Key words: chondroitin sulfate; preparation; degradation; superfine comminution; irradiation; structure

收稿日期: 2019-04-23

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-46); 湖北省技术创新专项(重大项目)家禽屠宰副产物高值化利用关键技术研发(2018ABA112)

作者简介: 王俊(1981-),女,副研究员,研究方向:水产品加工及副产物综合利用

通讯作者: 汪兰(1981-),女,博士,研究员,研究方向:水产保鲜加工及综合利用

鲟鱼(Sturgeon)是现存起源最早的脊椎动物之一,由于其特有的科研价值、经济价值、营养价值和药用价值而备受各界学者的关注^[1]。鲟鱼软骨是鲟鱼产品的主要副产物之一,且鲟鱼的头、脊索、鳍中软骨占鱼体的10%左右,但作为鱼类加工的副产物却通常作为废弃物被丢弃,既浪费资源又污染环境^[2,3]。目前研究发现,鲟鱼的软骨中含有大量硫酸软骨素。且近年

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丰富的来源和较好的条件^[4]。硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)为白色或类白色、无臭的易吸湿性粉末, 易溶于水, 不溶于乙醇等有机溶剂^[5]。其是通过共价化学键连接在蛋白质上形成蛋白聚糖的一类线性、复杂、聚合度分散的酸性粘多糖-糖胺聚糖, 主要是由 D-葡萄糖醛酸和氨基己糖二糖单位交替连结形成, 而二糖单位之间以 β -1,4糖苷键连接而成, 其分子中含有羧基、硫酸基和乙酰基^[6-9]。不同来源的硫酸软骨素的分子量、硫酸化程度等都不相同, 不同生物或者同一生物的不同组织所含硫酸软骨素的种类也均不相同, 具有明显的种属和组织差异性^[10,11], 而不同结构的硫酸软骨素也具有不同的活性。CS 广泛存在于各种动物软骨、结缔组织中^[12], 具有降血脂、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗关节炎及免疫调节等^[13,14]重要生物活性功能, 在医药、功能性食品、生物材料以及化妆品原料^[15-18]等领域具有重要的应用。CS 的相对分子质量大小对其发挥生物活性有着重要的影响。由于大分子的多糖体积较大, 较难透过细胞膜从而不能很好的在机体内发挥其多种药理功能, 而低分子量的 CS 具有溶解性好、粘度小、易吸收和生物利用度高等^[19]。在本实验室前期的实验中发现鲟鱼硫酸软骨素具有抗氧化性, 这与其分子中的羧基、硫酸基等密切相关。而目前有关于鲟鱼骨中硫酸软骨素优化提取并研究其化学结构的研究尚不多, 本实验以鲟鱼加工的下脚料-软骨为原料, 提取硫酸软骨素并采用物理方法对其进行降解后研究其化学结构组成, 可以变废为宝, 对充分利用鲟鱼软骨资源, 为鲟鱼软骨硫酸软骨素的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲟鱼软骨, 湖北天峡鲟业有限公司。

木瓜蛋白酶>800 U/mg, 丙烯葡聚糖凝胶 S-300 HR, 上海源叶生物科技有限公司; 胰蛋白酶>280 U/mg, 德国 BioFroxx 公司; Sephadex G-50, Biosharp 公司。

其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

QE-100 型中药粉碎机, 浙江屹立工贸有限公司; PM-100 行星型球磨机, 德国 Retsch 公司; DIONEX ICS-3000 USA 离子色谱仪, 美国戴安公司; UV-2802 紫外可见分光光度计, 日本 Hitachi 公司; Nexus FT-IR

傅立叶变换红外光谱仪, 美国尼高力仪器公司; DPX 300 Bruker 磁核共振波谱仪, 布鲁克(北京)科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鲟鱼软骨硫酸软骨素的制备

以鲟鱼软骨为原料, 硫酸软骨素的提取按照碱提-酶解-乙醇沉淀工艺流程进行^[20], 将所得沉淀于 65 °C 的烘箱中干燥 2.5 h, 后使用研磨器研磨得到产物为淡黄色、无臭、易吸潮的硫酸软骨素粗品粉末, 利用吡啶法检测此产物中硫酸软骨素含量。

1.3.2 硫酸软骨素的纯化

取鲟鱼硫酸软骨素粗制品先进行乙醇分级沉淀, 之后将沉淀过葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱再过丙稀葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300 HR 柱分离纯化, 用双蒸水洗脱, 流速分别设为 1 mL/min 和 0.5 mL/min, 每管均 4 mL 收集洗脱液。用吡啶法测定每管硫酸软骨素含量, 合并含有硫酸软骨素的洗脱液。将洗脱液进行真空冷冻干燥得到纯化产物, 并检测其分子量及鉴定其纯度^[4]。

1.3.3 硫酸软骨素纯度分析

采用高效凝胶渗透色谱法鉴定多糖的纯度。Waters 高效液相色谱系统, 色谱条件: UltrahydrogelTM 2000 (7.8 mm×30 cm) 色谱柱, 检测器为 Waters 2410 Refractive Index Detector; 柱温为 35 °C; 流动相为 0.1 mol/L NaNO₃; 流速 0.6 mL/min; 进样量: 100 μ L。

1.3.4 硫酸软骨素的降解

1.3.4.1 样品超微粉碎处理

称取两份一定量的硫酸软骨素粗品, 分别于球磨机中超微粉碎 5 h 和 10 h。所得超微粉碎 5 h 和超微粉碎 10 h 2 种样品。

1.3.4.2 样品辐照处理

称取一定量的硫酸软骨素粗品, 配制饱和溶液 (20 g 硫酸软骨素粉末溶于 150 mL 蒸馏水), 装于塑料袋, 并用封口机封口, 于不同辐照剂量 (4、6、8、10、12 kGy) 下进行辐照, 再向辐照后的样品溶液中加入一定量的无水乙醇, 使其成为乙醇浓度为 70% 的乙醇体系, 室温静置过夜, 于 5000 r/min 下离心 10 min, 取沉淀物, 于 65 °C 的烘箱中干燥 2.5 h, 再用粉碎机打磨成粉末状, 依次获得 4、6、8、10、12 kGy 5 种不同辐照的样品。

1.3.4.3 样品超微粉碎加辐照处理

称取两份一定量的硫酸软骨素粗品, 先分别于球磨机中超微粉碎 5 h 和 10 h, 后将 2 种经超微粉碎过的样品按照 1.3.2.2 的方法分别进行 8 kGy 辐照处理,

所得超微粉碎 5 h 加 8 kGy 辐照和超微粉碎 10 h 加 8 kGy 2 种样品。

1.3.5 单糖组成分析

采用离子色谱法分析鲟鱼骨硫酸软骨素的单糖组成。准确称取 10 mg 样品, 加入 4 mol/L 的三氟乙酸 4 mL, 氮吹排出瓶内空气, 于 120 °C 水解 4 h, 待冷却后氮气吹干水解液, 除去过量的三氟乙酸, 加超纯水定容至 10 mL。进样前把样品进行相应的稀释后于 0.2 μm 滤膜过滤, 进样。

色谱条件: 色谱柱: 分析柱: Carbo Pac TMPA 10 4×250 mm analytical; 淋洗液: NaOH 和 NaAC; 流速: 1 mL/min; 进样体积: 10 μL; 柱温: 35 °C; 检测器: 脉冲安培检测器, 金电极。梯度洗脱条件: A 为水, B 为 200 mM 的 NaOH, C 为 1 M 的 NaAC 0~20 min, 91% A, 9% B, 0% C; 20~20.1 min, 86% A, 9% B, 5% C; 20.1~35 min, 71% A, 9% B, 20% C。

1.3.6 紫外-可见光光谱

将样品配置成 0.5 mg/mL 的供试品, 以蒸馏水做空白对照, 在波长 190~800 nm 之间进行扫描得紫外-可见光扫描图。

1.3.7 红外光谱

采用溴化钾压片法进行测定^[21]。或称取约 2 mg 的样品, 在红外灯的照射下, 置于玛瑙研钵中研磨 4.0~10.0 min, 再和 150 mg 左右干燥的溴化钾粉末充分混合, 继续研磨 2.0~5.0 min。将研磨好的混合物粉末倒在硫酸纸上, 灌注于压膜中, 抽真空 2 min, 以免混入空气影响样品薄片的透明度。缓慢加压至 10 t, 保持 5 min, 切断真空, 缓慢除去压力, 取出样品薄片, 放入样品架上, 置于红外光谱仪 4000~400 cm⁻¹ 内扫描, 绘出红外光谱图^[22]。

1.3.8 核磁共振波谱

采用氘代二甲基亚砷溶解硫酸软骨素多糖进行 ¹H NMR 分析。取 60 mg 冷冻干燥好的样品, 加 1.5 mL 氘代二甲基亚砷溶解置换三次, 反复冻干后, 取约 30 mg 溶解于 1.0 mL 氘代二甲基亚砷, 用 5 mm 样品管测试。所有样品均在 DPX 400 Bruker 核磁共振仪上测定, 测试温度为 70 °C。

2 结果与讨论

2.1 鲟鱼硫酸软骨素含量测定

以鲟鱼软骨为原料, 按照碱提-酶解-醇沉工艺流程提取硫酸软骨素后, 采用吡啶法测得产物中硫酸软骨素的含量为 49.11%^[20]。

2.2 鲟鱼硫酸软骨素的分子量测定及纯度鉴定

硫酸软骨素粗提物经过乙醇分级沉淀后再过葡聚糖凝胶 G-50 柱层析和 Sephacryl 300-HR 凝胶柱层析, 可得到纯度较高的白色絮状物。从图 1 的图谱中可看出经 HPGPC 检测该多糖的主峰呈单一峰, 进一步显示出纯化为一组分, 末端的极小峰可能为溶剂峰, 也可能是因为 CS 类为阴离子类物质, 纯化时盐类小分子未完全除净^[23]。

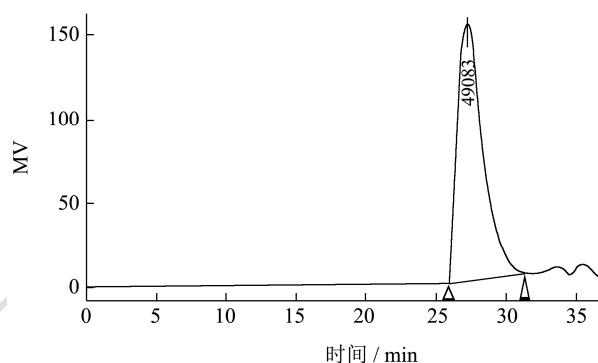


图1 硫酸软骨素的高效凝胶渗透色谱图

Fig.1 HPGPC of chondroitin sulfate

2.3 鲟鱼硫酸软骨素降解产物单糖组成分析

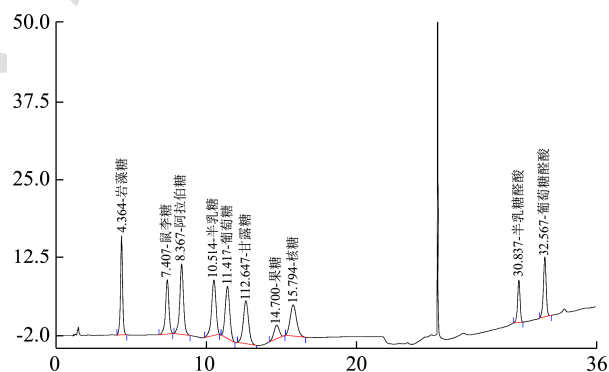


图2 单糖标准品

Fig.2 Sugar standards

如图 2, 本实验采用岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸作标准。由图 3 和表 1 可知, 粗品原样及经超微和辐照的样品中单糖均包含鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸。鲟鱼硫酸软骨素粗品原样中鼠李糖含 56.16%, 葡萄糖醛酸含 33.69%; 硫酸软骨素超微粉碎 10 h 中鼠李糖含 57.54%, 葡萄糖醛酸含 32.41%; 硫酸软骨素超微粉碎 10 h+8 kGy 辐照中鼠李糖含 59.31%, 葡萄糖醛酸含 31.84%。3 种处理

的硫酸软骨素中的鼠李糖和葡萄糖醛酸的含量均较高,阿拉伯糖,半乳糖和葡萄糖的含量均较低。硫酸软骨素经超微粉碎加辐照的共处理的鼠李糖含量比经超微粉碎处理的增加,但葡萄糖醛酸的含量减少。经过物理降解处理的硫酸软骨素中的鼠李糖含量均比原样大,葡萄糖醛酸相比原样减小。研究表明,超微粉

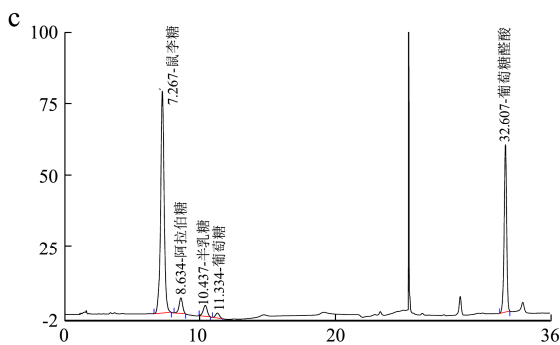
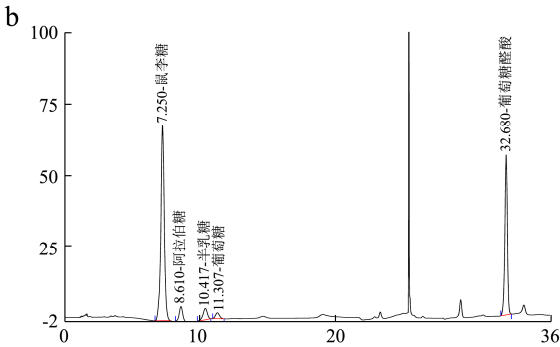
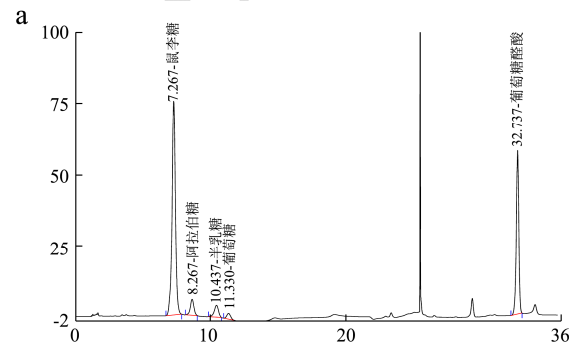
碎和辐照技术能够使多糖类物质降解,发生糖苷键断裂,使其产生少量的还原糖或者使带有还原性多糖基团显现出来,致使还原糖含量稍有增加^[24]。而经纯化的样品中单糖仅包含半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸,纯品原样中葡萄糖醛酸含 88.77%,葡萄糖含 8.23%,半乳糖含 3.00%。

表 1 鲟鱼硫酸软骨素降解产物单糖组成

Table 1 Analysis results of monosaccharides composition content of chondroitin sulfate

样品	No.	Ret. Time/min	Peak Name	Height/nC	Area/nC*min	Rel. Area/%	Amount/(μg/mL)
CS 粗制原样	1	7.25	鼠李糖	68.585	20.323	56.16	182.89
	2	8.61	阿拉伯糖	5.243	1.545	4.27	9.64
	3	10.42	半乳糖	3.944	1.434	3.96	9.7
	4	11.31	葡萄糖	2.033	0.694	1.92	5.05
	5	32.68	葡萄糖醛酸	56.148	12.193	33.69	122.86
CS 超微粉碎 10 h	1	7.27	鼠李糖	75.396	22.273	57.54	200.44
	2	8.63	阿拉伯糖	5.623	1.712	4.42	10.71
	3	10.44	半乳糖	4.186	1.519	3.92	10.29
	4	11.33	葡萄糖	2.001	0.658	1.70	4.8
	5	32.74	葡萄糖醛酸	57.524	12.546	32.41	126.41
CS 超微粉碎 10 h +8 kGy 辐照	1	7.27	鼠李糖	78.952	23.789	59.31	214.08
	2	8.63	阿拉伯糖	5.465	1.635	4.08	10.21
	3	10.44	半乳糖	3.882	1.330	3.32	8.97
	4	11.33	葡萄糖	1.767	0.585	1.46	4.29
	5	32.61	葡萄糖醛酸	59.337	12.771	31.84	128.68
CS 纯化原样	1	6.12	半乳糖	1.710	0.388	3.00	0.065
	2	6.67	葡萄糖	4.968	1.064	8.23	0.155
	3	30.67	葡萄糖醛酸	77.984	11.479	88.77	4.494

硫酸软骨素中一般含有鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)和甘露糖(Man)等^[25]。杜晓东等用盐酸甲醇水解-硅烷化气相色谱鉴别扇贝 GAG 中中性糖种类,发现其主要含有鼠李糖、岩藻糖、木糖、半乳糖和葡萄糖^[26]。胡靖等采用 PMP-柱前衍生反相色谱 HPLC 法检测鲟鱼硫酸软骨素的单糖组成,发现其主要由乙酰氨基半乳糖、葡萄糖醛酸以及少量的葡萄糖组成^[27]。显示不同软骨素以及不同动物同种软骨素在中性单糖的组成和数量上各有差异。



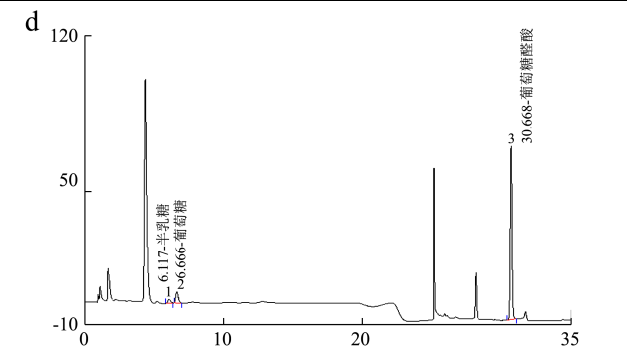


图 3 鲟鱼硫酸软骨素降解产物单糖组成

Fig.3 Analysis results of monosaccharides composition content of chondroitin sulfate

注: a: 粗品原样; b: 超微粉碎 10 h; c: CS 超微粉碎 10 h+8 kGy; d: 纯化原样。

2.4 鲟鱼硫酸软骨素的紫外-可见光光谱分析

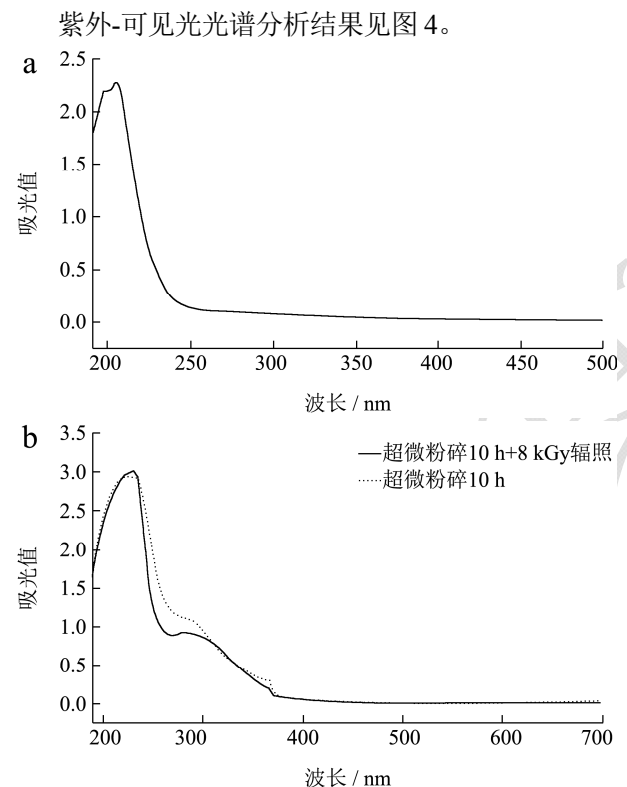


图 4 鲟鱼硫酸软骨素降解产物的紫外光谱图

Fig.4 Ultraviolet spectrum of chondroitin sulfate degradation products of sturgeon

注: a: CS 纯化原样, b: CS 超微粉碎 10 h 和 CS 超微粉碎 10 h+8 kGy 辐照。

由图 4 可知, 紫外扫描结果显示, 所有样品均在 200nm 附近的糖类特征吸收处有明显的吸收峰, 峰形尖锐, 且原样在 260 nm 及 280 nm 处没有吸收峰, 说明不含有核酸和蛋白质, 但辐照处理的样品除了在 200~240 nm 存在糖吸收峰外, 在 280 nm 附近出现微

弱的肩峰, 这是由于辐照处理使硫酸软骨素分子结构发生断裂, 即糖苷键分裂和单糖基团产生的 C=O 基团^[24]。说明辐照处理与普通粉碎处理相比对硫酸软骨素的结构有影响, 其中辐照处理比超微粉碎处理更能影响硫酸软骨素的结构。

王晓军^[28]在研究鸡腿骨中硫酸软骨素的紫外光谱时发现在 210~220 nm 处显示出肽键吸收峰; 260 nm、280 nm 处无明显的紫外吸收峰, 得出所提取得样品中不存在核酸物质及蛋白质, 推测鸡腿骨的硫酸软骨素为硫酸软骨素与少数氨基酸共价结合而形成的硫酸软骨素肽。李利晓等研究牛鼻软骨粉中硫酸软骨素的紫外光谱时得出在波长 196 nm 附近有葡萄糖醛酸的典型吸收峰, 且无蛋白和核酸的吸收峰, 说明牛鼻的硫酸软骨素不存在核酸和蛋白质^[29]。对比显示不同来源的硫酸软骨素中的化合物组成有差异。

2.5 鲟鱼硫酸软骨素的红外光谱分析

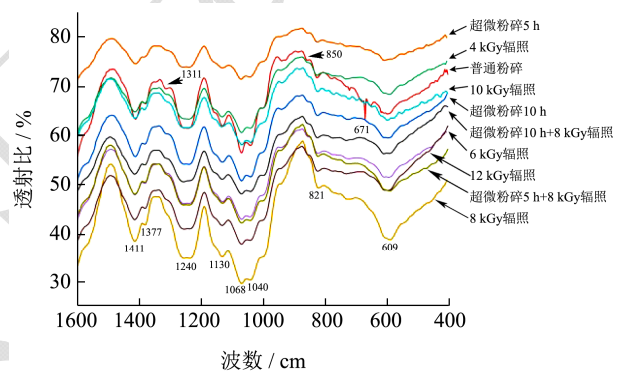


图 5 鲟鱼硫酸软骨素降解产物的红外光谱图

Fig.5 Infrared spectrum of chondroitin sulfate degradation products

如图 5 所示, 对普通粉碎、超微以及超微联合辐照处理的硫酸软骨素在 1600~400 cm⁻¹ 波数范围内的红外光谱进行了放大比较, 并将硫酸软骨素的官能团进行归属 (见表 2)。

表 2 鲟鱼硫酸软骨素红外光谱图分析

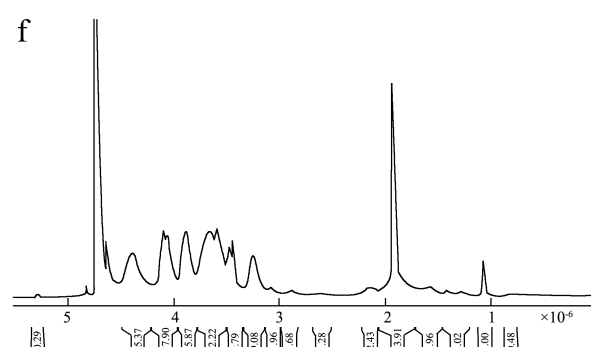
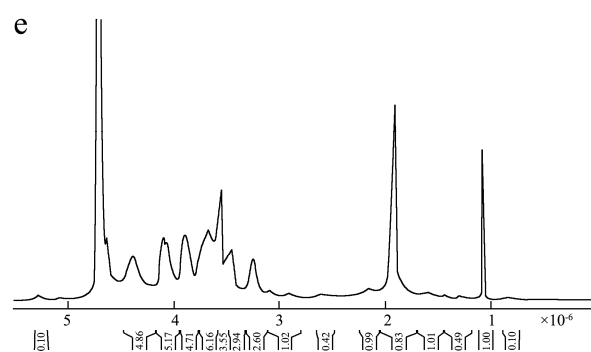
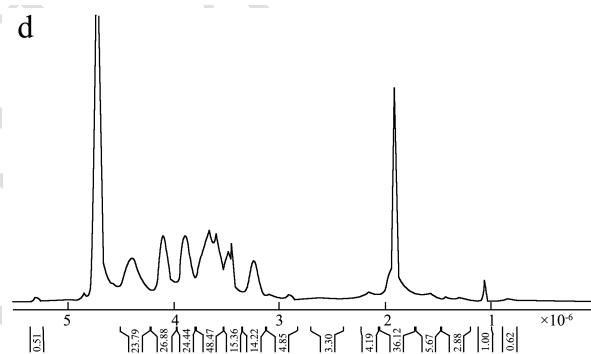
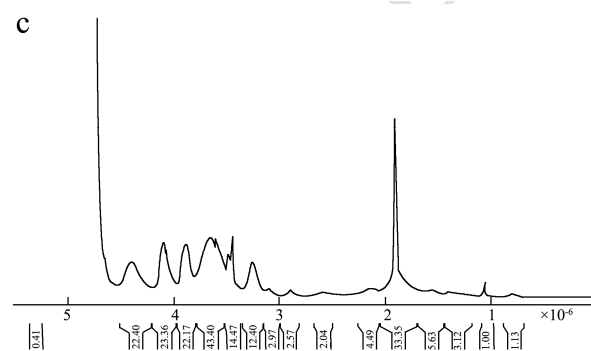
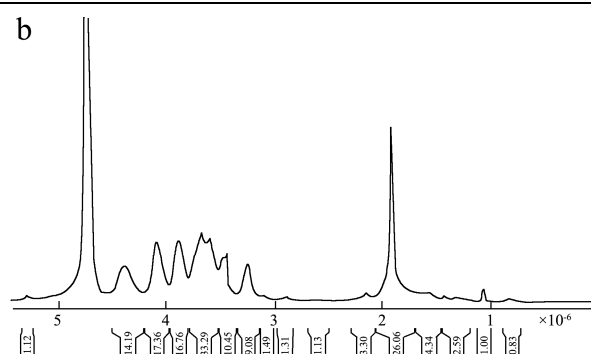
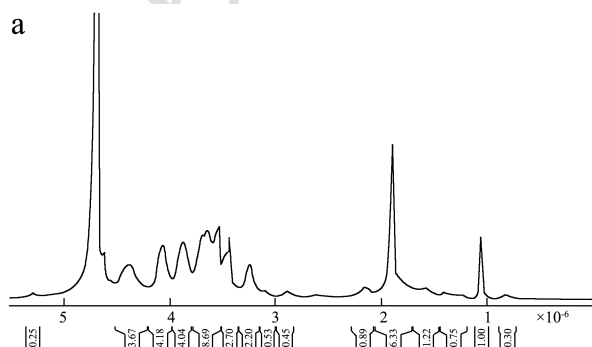
Table 2 Infrared spectrogram analysis of chondroitin sulfate

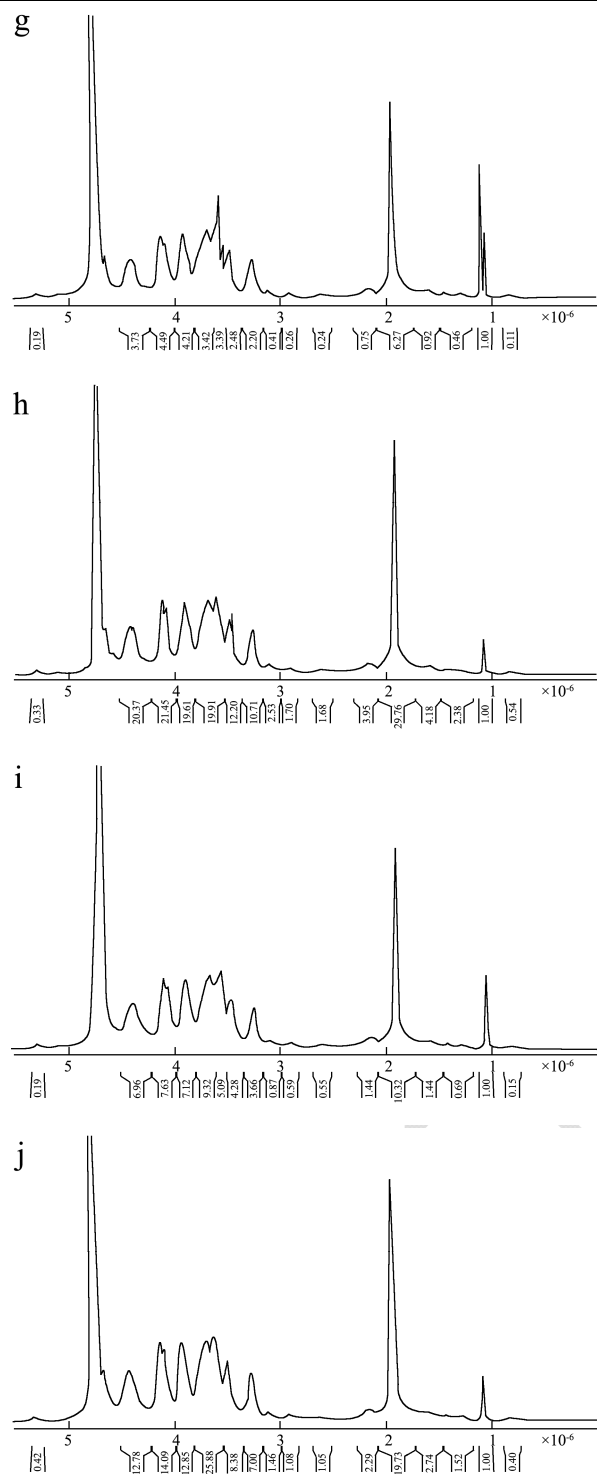
波长/cm ⁻¹	官能团归属
1411	C-O 伸缩振动
1377	O-H 变角振动耦合
1240	S=O 伸缩振动
1130	C-O 伸缩振动
1068	同上
1040	C-O-C 伸缩振动
850	C-O-S 伸缩振动 (轴向配位)
821	C-O-S 伸缩振动 (赤道配位)

几种降解方法所得的硫酸软骨素所共有官能团在

吸收峰的波数和振动强度上存在着一定的差异。所有的降解方式均在 $1440\sim 1395\text{ cm}^{-1}$ 处有 $-\text{COOH}$ 的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动产生的 1 个吸收峰,说明均存在糖醛酸上游离羧基结构^[30]。在 1377 cm^{-1} 所看到的吸收峰是羧基谱峰,其主要是以葡萄糖醛酸的形式存在,因此推断此硫酸软骨素中存在离子化的葡萄糖醛酸^[31],且超微粉碎 5 h 的羧基振动峰比较微弱,说明经超微粉碎 5 h 的硫酸软骨素中的羧基减少,葡萄糖醛酸含量减少。普通粉碎处理在 1311 cm^{-1} 处存在微弱的波峰,而其他处理的吸收峰均呈平缓或减弱趋势,表明辐照和超微粉碎处理使分子间缔合氢键减少。所有降解方式在 1240 cm^{-1} 处也均存在 SO_4^{2-} 中 $\text{S}=\text{O}$ 伸缩振动特征吸收峰,超微粉碎 5 h 吸收峰的峰形呈宽且钝,8 kGy 辐照最陡。且所有降解方式均在 1130 cm^{-1} 和 1068 cm^{-1} 处出峰,为分子中 $\text{C}-\text{O}$ 键的伸缩振动,是碳氧键伸缩振动的特征^[32],两个出峰均以普通粉碎的峰形最为尖锐,而其他处理的峰形相应减缓,可能是普通粉碎中碳氧键弯曲较难,伸缩较易,推测可能与其缔合的氢键较多有关。所有降解处理的样品在 1040 cm^{-1} 的出峰,为吡喃糖环醚键 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸缩振动特征吸收峰,以及在 821 cm^{-1} (存在硫酸基)出现的特征吸收峰,为 $\text{C}-\text{O}-\text{S}$ 伸缩振动(赤道配位)^[33],其中以普通粉碎峰形最为尖锐,而此处存在的吸收峰,为硫酸基的振动峰,表明硫酸基是结合在糖环上 C6 位置,也可能含有乙酰胺基、己糖醛酸和 6 硫酸化类糖胺聚糖^[34,35]。普通粉碎在 850 cm^{-1} (存在硫酸基)处存在的特征吸收峰,是 $\text{C}-\text{O}-\text{S}$ 伸缩振动(轴向配位),其他降解方式存在的此峰峰形微弱,即说明长时间的超微粉碎及辐照处理对硫酸软骨素的硫酸基有一定降解作用。所有降解处理的样品同时存在 850 cm^{-1} 和 821 cm^{-1} 的振动峰,表明其结构中同时存在有 C4 和 C6 的硫酸基,说明所得的硫酸软骨素是一种 4, 6 硫酸化硫酸软骨素。另外,普通粉碎在 671 cm^{-1} 处出现一个小尖峰且所有样品均在 609 cm^{-1} 处有吸收峰。

2.6 鲟鱼硫酸软骨素的核磁共振波谱图分析



图6 鲟鱼硫酸软骨素降解产物的¹H-NMR图谱Fig.6 ¹H-NMR spectrum of chondroitin sulfate degradation products

注: a: CS 普通粉碎; b: CS 超微粉碎 5 h; c: CS 超微粉碎 10 h; d: CS 4 kGy 辐照; e: CS 6 kGy 辐照; f: CS 8 kGy 辐照; g: CS 10 kGy 辐照; h: CS 12 kGy 辐照; i: CS 超微粉碎 5 h+8 kGy 辐照; j: CS 超微粉碎 10 h+8 kGy 辐照。

核磁共振波谱图结果见图 6。由图 6 可得普通粉碎、超微以及超微联合辐照处理的硫酸软骨素质子信

号均集中在 $\delta 1.89 \times 10^{-6}$ 和 $\delta 3 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-6}$ 区域之间。与 Mucciad 等^[36]报道的结果一致。比较不同处理的硫酸软骨素的¹H-NMR 的精细结构差异发现在 $\delta 1.05 \times 10^{-6}$ 处均出现三重峰,可归属为鼠李糖中的亚甲基质子,经超微及 4 kGy 辐照后的亚甲基质子信号减弱,而经 6 kGy 和 10 kGy 辐照后的亚甲基质子信号增强。不同处理的样品均在 $\delta 1.89 \times 10^{-6}$ 处出现信号,其可归属为 GalNAc 的乙酰基(CH₃CO)甲基质子信号^[37]。其中,以超微粉碎 10 h+8 kGy 辐照的质子信号最为强烈,普通粉碎的质子信号最弱。 $\delta 3.50 \times 10^{-6} \sim 3.65 \times 10^{-6}$ 处的信号归属为 GlcA 的 H2 和 H3 的信号峰,而经 6 kGy 辐照和 10 kGy 辐照降解处理的样品的质子信号明显增强^[36],而其他降解处理的样品在此处的质子信号没有明显变化。且不同处理的样品均在 $\delta 4.69 \times 10^{-6}$ (H-1)处有明显的葡萄糖醛酸残基端质子的特征化学位移信号,此信号属于 4-连接葡萄糖醛酸残基的信号,同时在 $\delta 4.10$ 处存在 Ch4S 中 GlcA 的异头氢信号,即均可归属于 GlcA (Ch4S)质子信号,这与硫酸软骨素分子中的糖苷键类型一致^[38-40]。再有,不同处理的样品在 $\delta 3.12 \times 10^{-6} \sim 4.75 \times 10^{-6}$ 处均存在葡萄糖醛酸和 N-乙酰半乳糖糖环上的二糖单元亚甲基以及次甲基的质子峰^[41],即可归属于 GalNAc-4SO₃ 质子信号。另外,不同处理的样品在 $\delta 4.10$ 处同时存在 Ch6S 中 GlcA 的异头氢信号,且 $\delta 4.43$ 和 $\delta 4.185$ 处存在的信号被归属于 GalNAc6SO₃ 的 H6 质子信号^[42,43]。在此图谱中没有发现艾杜糖醛酸(1doA)的质子化学信号。由此可以推测鲟鱼软骨硫酸软骨素包含 GlcA ($\beta 1 \rightarrow 3$)GalNAc-4SO₃ 和 GlcA ($\beta 1 \rightarrow 3$)GalNAc-6SO₃ 重复单元结构。

3 结论

3.1 有研究表明,CS 多糖的抗氧化性与其化学结构有关。王俊等^[20]人通过比较超微粉碎及辐照降解硫酸软骨素寡糖发现,辐照联合超微粉碎降解对 DPPH·、·OH 的抑制能力以及对 Fe³⁺ 的还原能力比只超微粉碎效果好,即辐照联合超微粉碎对硫酸软骨素有一定抗氧化性。说明由于辐照及超微粉碎降解硫酸软骨素导致其化学结构发生改变,从而影响其抗氧化性。本试验则进一步通过物理方式降解硫酸软骨素,对降解的硫酸软骨素产物的结构组成进行测试后比较分析得出:(1)采用离子色谱法测鲟鱼骨中硫酸软骨素的单糖组成,经超微粉碎 10 h、硫酸软骨素超微粉碎 10 h+8 kGy 辐照方式降解后的硫酸软骨素粗品中单糖均主要存在鼠李糖与葡萄糖醛酸,且纯品中主要存在葡萄糖醛酸,符合硫酸软骨素主要是以葡萄糖醛酸作为其重要组成成分的依据,也说明硫酸软骨素是

一种杂多糖物质。其中硫酸软骨素经超微粉碎加辐照的共处理比经超微粉碎处理的鼠李糖的含量有所增加,但葡萄糖醛酸的含量减少。经过降解处理的硫酸软骨素中的鼠李糖含量均比原样大,葡萄糖醛酸相比原样减小。(2)由紫外光谱分析可知原样,超微粉碎及超微粉碎加辐照的样品均在 200 nm 附近的糖类特征吸收处有明显的吸收峰,但辐照处理的样品在 280 nm 附近出现微弱的肩峰。说明辐照处理与普通粉碎处理相比对硫酸软骨素的结构有影响,其中辐照处理比超微粉碎处理更能影响硫酸软骨素的结构。(3)比较不同物理方式降解处理的红外光谱可以发现,所有光谱整体上较为相似,所有经物理降解处理后的硫酸软骨素中均含有羧基、硫酸基、乙酰氨基等官能团,且经不同降解处理后的鲟鱼硫酸软骨素均含有 4-硫酸和 6-硫酸软骨素典型特征。(4)核磁共振分析得出不同物理方式降解方式所得鲟鱼硫酸软骨素的结果大致相同,同时存在有 N-乙酰半乳糖胺和葡萄糖醛酸等化学质子信号,超微粉碎 10 h+8 kGy 辐照处理使硫酸软骨素乙酰半乳糖胺的乙酰基甲基质子信号增强,6 kGy 辐照和 10 kGy 辐照处理使硫酸软骨素鼠李糖亚甲基质子和葡萄糖质子信号增强,且推测鲟鱼硫酸软骨素包含 GlcA (β 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc-4SO₃ 和 GlcA (β 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc-6SO₃ 重复单元结构。

3.2 通过研究鲟鱼软骨中硫酸软骨素的结构,可将其作为一种重要硫酸软骨素的资源,同样也可以使水产骨类得到更好的综合利用,拓展水产副产物产业链,防止环境污染,因此对鲟鱼软骨硫酸软骨素的研究具有实际应用价值和社会效益。

参考文献

- [1] 朱国平.中国鲟鱼产业化发展的探讨与思考[J].湖北农业科学,2017,56(19):3708-3710
ZHU Guo-ping. Discussion and reflection on the industrialization development of sturgeon industry in China [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(19): 3708-3710
- [2] 李平兰,桂萌,张黎,等.鲟鱼硫酸软骨素胶囊制备技术[J].中国水产,2017,8:96
LI Ping-lan, GUI Meng, ZHANG Ni, et al. Preparation technology of sturgeon chondroitin sulfate capsule [J]. Chinese Fisheries, 2017, 8: 96
- [3] Liang Q, Wang L, Sun W, et al. Isolation and characterization of collagen from the muscle of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) [J]. Process Biochemistry, 2014, 19(5): 935-941
- [4] 郑江,关瑞章,黄文树,等.鲟鱼硫酸软骨素的纯化及其特性[J].水产学报,2008,3:478-483
ZHENG Jiang, GUAN Rui-zhang, HUANG Wen-shu, et al. Purification and characteristics of sturgeon chondroitin sulfate [J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 3: 478-483
- [5] 张玉倩.伊拉兔耳糖胺聚糖的提取分离、结构表征及其生物活性的评价[D].青岛:中国海洋大学,2014
ZHANG Yu-qian. Extraction, isolation, structural characterization and bioactivity evaluation of the glycosaminoglycan from the ears of Hyla rabbits [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014
- [6] 李燕妮,郭琳,许维娜.来源于不同品种鲟鱼硫酸软骨素理化性质比较[J].食品工业科技,2016,37(20):171-173
LI Yan-ni, GUO Lin, XU Wei-na. The properties of chondroitin sulfate from various omastrephidae [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(20): 171-173
- [7] 薛洪宝,梁丽丽,常华兰,等.硫酸软骨素药效成分糖胺聚糖含量分析研究[J].宁夏师范学院学报,2018,39(10):62-70
XUE Hong-bao, LIANG Li-li, CHANG Hua-lan, et al. Content analysis of efficacy ingredients glycosaminoglycans content in chondroitin sulfate [J]. Journal of Ningxia Normal University, 2018, 39(10): 62-70
- [8] Volpi N, Mucci A, Schenetti L. Stability studies of chondroitin sulfate [J]. Carbohydrate Research, 1999, 315(3-4): 345-349
- [9] 于广利,赵峡,张天民.硫酸软骨素的结构特点及其质量控制[J].食品与药品,2010,12(5):153-157
YU Guang-li, ZHAO Xia, ZHANG Tian-min. Structural character and quality control of chondroitin sulfate [J]. Food and Drug, 2010, 12(5): 153-157
- [10] Jackson R L, Busch S J, Cardin A D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes [J]. Physiological Reviews, 1991, 71(2): 481-539
- [11] Schiraldi C, Cimini D, Rosa M D. Production of chondroitin sulfate and chondroitin [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 87(4): 1209-1220
- [12] 侯美曼,任丽萍,范慧红.硫酸软骨素质量控制研究进展[J].中国药学杂志,2016,51(12):962-966
HOU Mei-man, REN Li-ping, FAN Hui-hong. Research progress on quality control of chondroitin sulfate [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2016, 51(12): 962-966
- [13] Campo G M, Avenoso A, Campo S, et al. Hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate treatment reduces damage in carbon tetrachloride-induced acute rat liver injury [J]. Life

- Sciences, 2004, 74(10): 1289-1305
- [14] 卢京光,姬胜利,张粤建.硫酸软骨素及其衍生物的研究进展[J].中国海洋药物杂志,2006,25(1):59-63
LU Jing-guang, JI Sheng-li, ZHANG Zun-jian. Progress of studies on chondroitin sulfate and its derivatives [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2006, 25(1): 59-63
- [15] 熊双丽,李安林.酸性多糖的最新研究进展[J].食品科技, 2010,35(5):80-83
XIONG Shuang-li, LI An-lin. The latest research progress of acidic polysaccharides [J]. Food Science and Technology, 2010, 35(5): 80-83
- [16] 沈渤江,窦韵.硫酸软骨素制剂在澳大利亚的应用概况[J].食品与药品,2009,11(1):4-7
SHEN Bo-jiang, DOU Yun. The application of chondroitin sulfate products in Australia [J]. Food and Drug, 2009, 11(1): 4-7
- [17] Way W K, Gibson K G, Breite A G. Determination of chondroitin sulfate in nutritional supplements by liquid chromatography [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2000, 23(18): 2851-2860
- [18] 林洪,姬胜利.硫酸软骨素的药理作用及应用研究进展[J].食品与药品,2006,8(12):4-7
LIN Hong, JI Sheng-li. Research progress in pharmacology and application of chondroitin sulfate [J]. Food and Drug, 2006, 8(12): 4-7
- [19] 王俊,曾凡新,程薇,等.不同降解方式对硫酸软骨素寡糖抗氧化活性的影响[J].湖北农业科学,2015,54(22):5707-5710
WANG Jun, ZENG Fan-xin, CHEN Wei, et al. Effects of different degradation methods on chondroitin sulfate oligosaccharide's antioxidant activity [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(22): 5707-5710
- [20] 王俊,程薇,李静,等.人工养殖鲟鱼脊骨硫酸软骨素的提取工艺研究[J].农产品加工(学刊),2014,1:41-43
WANG Jun, CHEN Wei, LI Jing, et al. Extracting technology of sturgeon chondroitin sulfate [J]. Farm Products Processing, 2014, 1: 41-43
- [21] 熊双丽,李安林,吴照民,等.鸡胸软骨硫酸软骨素的提取及分离纯化[J].农业工程学报,2009,25(1):271-275
XIONG Shuang-li, LI An-lin, WU Zhao-min, et al. Extraction, separation and purification of chondroitin sulfate from chicken keel cartilage [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, 25(1): 271-275
- [22] 李燕妮.不同降解方法制备低分子量硫酸软骨素的比较[J].化学与生物工程,2014,31(3):63-65
LI Yan-ni. Comparative research on preparation of low molecular weight chondroitin sulfate by different degradation methods [J]. Chemistry & Bioengineering, 2014, 31(3): 63-65
- [23] 熊双丽.猪喉软骨硫酸软骨素的制备和抗氧化、降血脂机理研究[D].无锡:江南大学,2006
XIONG Shuang-li. Preparation of chondroitin sulfate from pig laryngeal cartilage and its mechanism of antioxidation and blood lipid reduction [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006
- [24] 师萱.γ-射线辐照对魔芋葡甘聚糖结构、理化性能的影响研究[D].重庆:西南大学,2008
SHI Xuan. Effect of γ-Irradiated on structure and physicochemical properties of konjac glucomannan [D]. Chongqing: Southwest University, 2008
- [25] 方旭波,陈小娥,余辉,等.鱿鱼硫酸软骨素糖蛋白的分离纯化和鉴定[J].中国食品学报,2009,9(4):103-109
FANG Xu-bo, CHEN Xiao-e, YU Hui, et al. Researches on isolation, purification and identification of chondroitin sulfate-glycoprotein from sepia illex Argentinu [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(4): 103-109
- [26] 杜晓东,张庭广,王军,等.鲨鱼酸性粘多糖中的中性糖鉴别[J].中国海洋药物,1991,10(3):1619
DU Xiao-dong, ZHANG Ting-guang, WANG Jun, et al. Identification of neutral sugar in shark acidic mucopolysaccharide [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 1991, 10(3): 1619
- [27] 胡靖,陶圣男,李八方,等.真鱿软骨硫酸软骨素的提取、鉴定及结构分析[J].中国海洋药物,2016,35(3):37-42
HU Jing, TAO Sheng-nan, LI Ba-fang, et al. Extraction and structural characterization of chondroitin sulfate from squid cartilage (*Loligo chinesis*) [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2016, 35(3): 37-42
- [28] 王晓军.鸡骨源硫酸软骨素的提取及结构分析[D].兰州:甘肃农业大学,2018
WANG Xiao-jun. Extraction and structural analysis of chondroitin sulfate from chicken bone source [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2018
- [29] 李利晓,夏延斌.牛鼻软骨粉中硫酸软骨素的碱法提取及光谱分析[J].食品科技,2012,37(9):237-241,244
LI Xiao-li, XIA Yan-bin. Extraction of chondroitin sulfate from bovine nose cartilage powder with alkaline solution and its spectral analysis [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(9): 237-241, 244
- [30] 王亚,陈彦,夏树开,等.硫酸软骨素制备工艺的优化[J].中国生化药物杂志,2006,27(1):12-14

- WANG Ya, CHEN Yan, XIA Shu-kai, et al. Optimization of process for production of chondroitin sulfate [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2006, 27(1): 12-14
- [31] 郑江,关瑞章,黄世玉. 鲟鱼和鲨鱼硫酸软骨素红外光谱特性的比较研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(1): 106-109
- ZHENG Jiang, GUAN Rui-zhang, HUANG Shi-yu. Comparative studies on the characteristics of the Fourier-transform infrared spectra between sturgeon and shark chondroitin sulfates [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(1): 106-109
- [32] 熊双丽,李安林,张晓娟. 猪肺管硫酸软骨素的提取分离与抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 93-96
- XIONG Shuang-li, LI An-lin, ZHANG Xiao-juan. Purification and antioxidant activity of chondroitin sulfate from pig lung trachea [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(17): 93-96
- [33] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版) [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999, 124
- ZHANG Wei-jie. Biochemical Research Technology of Glycoconjugates (2nd Edition) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999, 124
- [34] 吴梧桐. 生物制药工艺学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2013, 409-410
- WU Wu-tong. Biopharmaceutical Technology [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2013, 409-410
- [35] Gamjanagoonchorn W, Wongekalak L, Engkagul A. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage [J]. Chemical Engineering & Processing Process Intensification, 2007, 46(5): 465-471
- [36] Mucci A, Schenetti L, Volpi N. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin [J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 41(1): 37-45
- [37] 吴念. 菲律宾刺参硫酸软骨素及其低分子量寡糖的结构和活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014
- WU Nian. Structure and bioactivity analysis of fucosylated chondroitin sulfate from *Pearsonothuria graeffei* and its oligosaccharides [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014
- [38] 王璐. 葡萄糖醛酸寡糖和 N-乙酰己糖胺寡糖酶法合成的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010
- WANG Lu. Study on the enzymatic synthesis of glucuronic oligosaccharides and n-acetyl hexosamine oligosaccharides [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [39] 刘玉红,王凤山. 核磁共振波谱法在多糖结构分析中的应用[J]. 食品与药品, 2007, 9(8): 39-43
- LIU Yu-hong, WANG Feng-shan. Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in structural analysis of polysaccharides [J]. Food and Drug, 2007, 9(8): 39-43
- [40] Pomin V H, Piquet A A, Pereira M S, et al. Residual keratan sulfate in chondroitin sulfate formulations for oral administration [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(2): 843
- [41] 肖玉良. 新型两亲性低分子量硫酸软骨素的制备及其抑制 ApoE $^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化斑块形成的研究[D]. 济南: 山东大学, 2014
- XIAO Yu-liang. Preparation of a novel amphiphilic low molecular weight chondroitin sulfate and its inhibitory effects on atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-deficient mice [D]. Jinan: Shandong University, 2014
- [42] Scott J E, Heatley F, Wood B. Comparison of secondary structures in water of chondroitin-4-sulfate and dermatan sulfate: implications in the formation of tertiary structures [J]. Biochemistry, 1995, 34(47): 15467-15474
- [43] Gui M, Song J, Zhang L, et al. Chemical characteristics and antithrombotic effect of chondroitin sulfates from sturgeon skull and sturgeon backbone [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 123: 454-460

(上接第 27 页)

- [35] Sun W W, Yu S J, Zeng X A, et al. Properties of whey protein isolate-dextran conjugate prepared using pulsed electric field [J]. Food Research International, 2011, 44(4): 1052-1058
- [36] Spotti M J, Martinez M J, Pilosof A M R, et al. Influence of Maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein/dextran systems [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 223-230