

文章编号:1673-1689(2006)04-0085-04

猪喉软骨硫酸软骨素的制备和自由基清除活性

熊双丽, 金征宇

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 直接用木瓜蛋白酶水解软骨, 三氯醋酸除蛋白质, 乙醇沉淀干燥得硫酸软骨素粗多糖, 经 DEAE-Sephrose fast flow 离子交换层析分离纯化, 高效凝胶渗透色谱和琼脂糖凝胶电泳测定其相对分子质量和纯度, 比较硫酸软骨素粗品和纯品的体外自由基清除活性。结果显示硫酸软骨素粗品和纯品提取率分别为 $31.56 \pm 0.46\%$ 和 $19.79 \pm 0.78\%$, 后者相对相对分子质量为 75 174, 粗品的 DPPH· 和 ·OH 清除活性最强, 随着产品纯度的提高, 活性降低, 而对于 $O_2^{\cdot-}$ 清除活性结果则相反。

关键词: 软骨; 硫酸软骨素; 分离纯化; 自由基

中图分类号: Q 81

文献标识码: A

Preparation of Chondroitin Sulfate from Pig Laryngeal Cartilage and Free Radicals-Scavenging Activities

XIONG Shuang-li, JIN Zheng-yu

(School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The crude chondroitin sulfates were extracted by papain, then isolated and purified by trichloroacetic acid and DEAE-Sephrose Fast Flow ion exchange column chromatography. Purified chondroitin sulfate was identified by spectrum, agarose gel electrophoresis and high performance gel permeation chromatography. The free radicals-scavenging activities of the crude chondroitin sulfate complex were compared to those of purified chondroitin sulfate. The recovery rate of the crude and pure chondroitin sulfate-were $31.56 \pm 0.46\%$ and $19.79 \pm 0.78\%$, respectively. The relevant molecular weight of the was 75174 Da. The DPPH· and ·OH scavenging activities of crude chondroitin sulfates were better than those of the purified chondroitin sulfate, but the results were reverse for the case of $O_2^{\cdot-}$.

Key words: cartilage; chondroitin sulfate; isolation and purification; free radical

硫酸软骨素(ChS)具有降血脂、抗病毒、抗肿瘤等重要生物功能^[1], 现在对软骨的利用主要是提取硫酸软骨素作为保健品、化妆品和药品, 传统工艺为稀碱-酶解提取法, 忽略了碱提取过程中糖的去皮反应对糖的降解, 产品质量不易控制, 环境污染严

重^[2-3]。Volpi 等报道只有大分子硫酸软骨素才能阻止铜离子引起的低密度脂蛋白的氧化^[4]。木瓜蛋白酶肽键作用广泛, 作用条件温和, 不降解硫酸软骨素, 无污染。作者直接用木瓜蛋白酶水解软骨得到硫酸软骨素粗多糖, DEAE-SephroseFF 分离

收稿日期: 2005-07-04; 修回日期: 2005-10-18.

作者简介: 熊双丽(1977-), 女, 四川眉山人, 碳水化合物与生物技术博士研究生。

纯化得到硫酸软骨素纯品,并探讨硫酸软骨素粗品和纯品的自由基清除特性,为将来软骨硫酸软骨素和蛋白质的综合利用提供理论依据。

1 材料与仪器

原料:猪喉软骨;无锡天鹏集团提供。
试剂:木瓜蛋白酶;上海源聚生物科技有限公司产品;葡萄糖醛酸:Fluca 产品;硫酸软骨素 A:Sigma 公司产品;甲苯胺蓝:北京莱博生物材料有限公司产品;DEAE-sepharoseFF:Phamacia 产品;三氯乙酸、氢氧化钠和丙酮等皆为分析纯。
仪器:Waters 600 高效液相色谱仪(示差折光检测器);美国 Nicolet Nexus FT-IR 傅立叶变换红外光谱仪;美国安捷伦液相色谱仪(Agilent 1100)。

2 实验方法

2.1 软骨水解

猪喉软骨→预处理→石油醚脱脂→风干粉碎制成风干样品→木瓜蛋白酶提取→表面活性剂、三氯乙酸除蛋白质→抽滤→离心(4 000 r/min,10 min)→真空旋转浓缩→乙醇沉淀→离心收集沉淀,低温真空干燥挥发乙醇→透析→冷冻真空干燥,得到硫酸软骨素粗多糖。

2.2 硫酸软骨素的纯化

将 DEAE-sepharose FF 预处理后填充 2.5 cm×40 cm 封口层析柱,用 pH 5.50,浓度 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液平衡层析柱,首先用 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液洗脱,后用 0~2 mol/L 氯化钠梯度洗脱,体积流量 130 mL/h,3 min/管收集,苯酚硫酸法监测多糖。收集各洗脱峰,4 ℃透析 36 h,冷冻真空干燥。

2.3 己糖醛酸的测定

间羟基联苯法^[5]。

2.4 氨基酸分析

精确称取一定量样品于特制水解管底部,加 6 mol/L 盐酸,(110±1)℃水解 24 h,上安捷伦液相色谱仪测定水解氨基酸含量。

2.5 相对分子质量的测定和纯度鉴定

2.5.1 琼脂糖凝胶电泳 见文献^[5]。

2.5.2 高效凝胶渗透色谱(HPGPC) 标准品为葡聚糖(Dextran),葡萄糖测定 V_t ,蓝色葡聚糖测定 V_0 。

2.6 紫外光谱和红外光谱分析

将样品配成一定浓度进行紫外扫描;红外光谱为溴化钾压片,波数 4 000/cm~400/cm 扫描。

2.7 体外自由基清除活性

超氧阴离子自由基($O_2\cdot^-$)和羟基自由基($\cdot OH$)的清除活性

$$\text{抑制率}(\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为空白发光值, A_s 为样品发光值。以样品浓度对抑制率作图,根据拟合方程求出抑制率为 50% 时所需要样品的浓度。即半数抑制浓度 IC_{50} ^[6-7]。

3 结果和分析

3.1 产品得率及己糖醛酸分析

木瓜蛋白酶肽键作用广泛,能裂解精氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、X-氨基酸残基,能降解软骨基质内胶原、连接蛋白及蛋白聚糖核心蛋白,释放软骨硫酸软骨素,提取率高(见表 1)。糖醛酸含量在 24 % 以上可用于制药,20 % 可用于化妆品添加剂,本产品完全可以用来做药剂、保健品或者化妆品原料^[8-9]。传统工艺提取率为 10%~14%,引入碱后,还要脱色,提取时间长,工序复杂^[10]。本工艺有望取代传统工艺稀碱-胰酶法提取硫酸软骨素。

表 1 产品得率和己糖醛酸质量分数测定

Tab.1 Recovery rate of products and content of hexuronic acid

样品名称	硫酸软骨素得率/%	己糖醛酸质量分数/%
粗品	31.56±0.46	27.13±0.27
纯品 D	19.79±0.78	35.15±0.41

3.2 DEAE-sepharoseFF 离子交换柱层析

硫酸软骨素类糖胺聚糖含有丰富的羧基和硫酸基,因此利用阴离子交换树脂可以将其与非电负性的物质分离;同时多糖中的羧基和硫酸基的取向、类型和数量有差异,可以利用不同离子强度的氯化钠溶液梯度洗脱,同时 DEAE-sepharoseFF 具有良好的分子筛效应,本文利用 DEAE-sepharoseFF 分离纯化硫酸软骨素糖胺聚糖,各组分得到分离,洗脱曲线见图 1。上样后,起始缓冲液直接洗出前两个组分,梯度洗脱后,洗出 C 和 D 峰,其中峰 D 与甲苯胺蓝反应呈阳性,进一步将 D 进行琼脂糖凝胶电泳判断是否为硫酸软骨素。

3.3 相对分子质量的测定和纯度鉴定

从电泳图 2 可知 D 为硫酸软骨素,其移动速度比 Sigma 公司硫酸软骨 A 标准稍快,可能是因为该硫酸软骨素含有少量氨基酸,负电荷增多,移动速度加快。

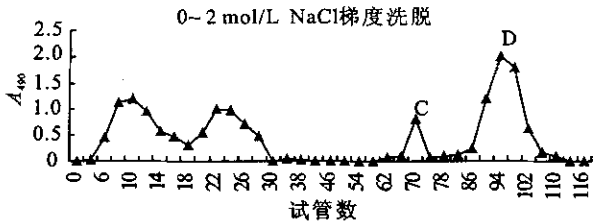


图 1 硫酸软骨素粗品的 DEAE-Sepharose FF 洗脱曲线

Fig. 1 Elution pattern of crude chondroitin sulfate on DEAE-Sepharose FF

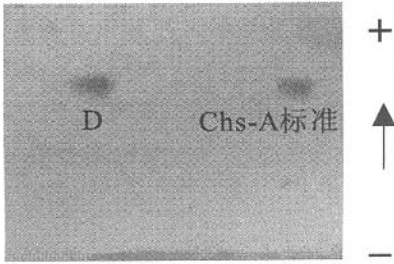


图 2 硫酸软骨素的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of Chs

分离纯化后的纯品 D 的 HPGPC(见图 3), 相对分子质量为 75 174。这比一般碱提取的相对分子质量(相对分子质量 6 000~20 000 左右)大, 这主要是因为以往提取有碱的存在, 会发生 β 消除反应, 使糖链发生降解。从图谱中可以看出该峰对称性好, 成分单一, 纯度达 99.09%, 但是在 $t=24.083$ 时, 有一个极小峰出现, 这可能是溶剂峰, 也可能是由于糖胺聚糖类物质吸水作用极强, 有小分子钠盐存在。

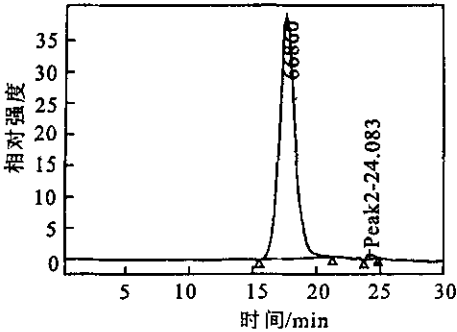


图 3 硫酸软骨素的 HPGPC

Fig. 3 Spectra of HPGPC of Chs

3.4 样品 D 的紫外光谱红外光谱

图 4 示显示在 210~220 nm 处有肽键吸收峰, 280 nm 处没显示出蛋白质存在吸收峰, 说明该产品中含有肽键, 但不存在大分子蛋白质, 260 nm 处无紫外吸收, 与琼脂糖电泳-EB 染色结果一致, 说明无核酸存在。硫酸软骨素的红外光谱图 5 与 Sigma 公司的硫酸软骨素 A 吸收曲线一致, 927/cm 和

850/cm 处有典型的硫酸软骨素 A 的吸收特征。

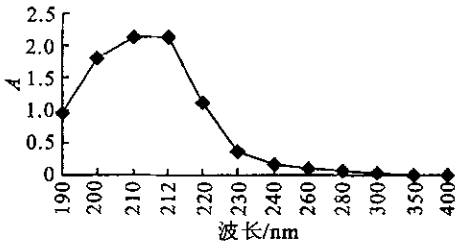


图 4 硫酸软骨素的紫外光谱图

Fig. 4 UV spectrum of Chs

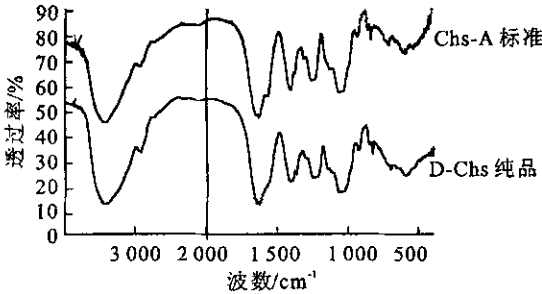


图 5 硫酸软骨素的红外光谱

Fig. 5 IR spectrum of Chs

3.5 硫酸软骨素的氨基酸分析

硫酸软骨素粗品中含有相当数量的肽或者 AA, 纯品中也含有 2.27% 共价结合的 AA(表 2), 这部分 AA 的存在可能影响硫酸软骨素空间结构, 致使其自由基清除活性不同。

3.6 自由基清除实验

多糖对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟基自由基($\cdot OH$)的清除活性对 $\cdot OH$ 清除活性强弱依次为硫酸软骨素乙醇沉淀粗品、初步透析粗品和硫酸软骨素纯品, 半数抑制质量浓度($IC_{50}\%$)分别为 0.8、3.5 和 8.9 mg/mL, 但是对于 $O_2^{\cdot-}$ 硫酸软骨素乙醇沉淀粗品在 10 mg/mL 质量浓度范围内皆没有活性, 硫酸软骨素初步透析粗品和纯品的 $IC_{50}\%$ 分别为 7.5 和 0.9 mg/mL, 说明直接用木瓜蛋白酶提取的 ChS 粗品和纯品对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的清除活性机理可能不同, 有待将硫酸软骨素和肽进一步分离纯化进行抗氧化活性探讨。

4 结 论

木瓜蛋白酶水解猪喉软骨得硫酸软骨素粗多糖, 经 DEAE-sepharoseFF 离子交换柱层析分离纯化, 得到高纯度的硫酸软骨素。其粗多糖的 DPPH $\cdot$ 和 $\cdot OH$ 清除活性优于纯品, 而 $O_2^{\cdot-}$ 清除活性相反, 推测软骨中除硫酸软骨素多糖外, 蛋白质水解物(肽或者氨基酸)也可能存在抗氧化活性, 在以后的研究中, 需要进一步分别纯化软骨多糖和

蛋白质肽,并进行活性探讨,充分利用软骨多糖和蛋白质资源。

表 2 硫酸软骨素粗品和纯品的氨基酸分析
Tab. 2 Individual AA contents of crude and purified ChS

非必需氨基酸名称	质量分数/(g/Kg)		必需氨基酸名称	质量分数/(g/Kg)	
	粗品	纯品		粗品	纯品
天冬氨酸(Asp)	11.89	1.68	缬氨酸(Val)	2.63	0.68
谷氨酸(Glu)	20.66	2.94	蛋氨酸(Met)	0.42	0.22
丝氨酸(Ser)	6.61	3.64	苯丙氨酸(Phe)	1.92	1.90
组氨酸(His)	2.80	0.66	亮氨酸(Leu)	3.57	1.50
甘氨酸(Gly)	34.14	2.16	异亮氨酸(Ile)	1.68	1.02
精氨酸(Arg)	20.02	0.50	赖氨酸(Lys)	8.19	0.17
胱氨酸(Cys—Cys)	0.99	0.13	苏氨酸(Thr)	2.60	1.11
酪氨酸(Tyr)	0.86	0.10	丙氨酸(Ala)	9.90	1.28
脯氨酸(Pro)	9.39	3.00	羟脯氨酸 9.98	—	—
总非必需氨基酸量	127.24	16.09	总必需氨基酸量	21.01	6.60
氨基酸总量	148.25	22.69			

参考文献：

[1] 李鑫,姚开,贾冬英,等. 硫酸软骨素的提取和纯化分离技术[J]. 天然产物研究与开发,2004,116(16):597—600.

[2] 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.

[3] 姜艳,林海,左永生. 混凝法在硫酸软骨素废水后处理中的应用[J]. 工业安全与环保,2003,19(11):11—12.

[4] Volpi N, Tarugi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺-mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate[J]. Journal of Biochemistry, 125,(2): 297—304.

[5] 张惟杰. 糖复合生化技术(第2版)[M]. 浙江:浙江大学出版社,1999:21.

[6] 范小兵,李慈娟,沙大年,等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟自由基的建立[J]. 基础医学与临床,1998,18(6):68—71.

[7] 徐靖,杨秀岑. 邻苯三酚—鲁米诺发光体系测定 SOD 活性[J]. 鄯阳医学院学报,1999,18(2):68—70.

[8] 奚俊,张有森. 对硫酸软骨素传统提取方法的改进[J]. 生物学杂志,2000,17(6):33—34.

[9] 华子义. 硫酸软骨素生产新工艺[J]. 上海大学学报(自然科学版),2001,7(4):334—336.

[10] 马淑涛,张天民,李南,等. 不同工艺硫酸软骨素的理化性质和生物活性[J]. 中国医药工业杂志,1993,8:348—352.

[11] Takuo Nakano,Kayo Nakano. Extraction of glycosaminoglycan peptide from bovine nasal cartilage with 0.1M sodium acetate [J]. J Agric Food Chem, 1998,(46): 772—778.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 84 页)

[23] 范小兵,李慈娟,沙大年,等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟基自由基的建立[J]. 基础医学与临床,1998,18(6):68—71.

[24] 陈季武,胡天喜. 测定·OH产生与清除的化学发光体系[J]. 生物化学与生物物理进展,1992,19(2):136—140.

[25] Heinonen I M, Meyer A S. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation[J]. J Agric Food Chem, 1998,46(10):4107—4112.

[26] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,2002.

[27] 周坤福. 分子生物学与中药开发[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.

(责任编辑:朱 明)