

鲟鱼硫酸软骨素的制备工艺研究

许永安¹ 陈守平² 吴靖娜¹ 廖登远¹ 王茵¹

(¹福建省水产研究所, 厦门 361012)

(²福建晋江商品检验检疫局, 362200)

摘要 以史氏鲟鱼软骨为原料,按碱提-酶解-乙醇沉淀工艺流程进行提取硫酸软骨素的主要工序工艺的研究。通过单因素试验及正交试验,得出最佳碱提工艺为以两倍量 6% 的 NaOH 为溶剂,于 40℃ 的水浴中搅拌提取 4 h。通过正交试验,得出最佳酶解工艺条件是先将浸提液调节 pH 至 8.6,加入胰酶 0.5%,50℃ 保温水解 3 h;后降温至 40℃,调 pH 至 5.7,加入胃蛋白酶 0.3%,保温水解 2h。通过单因素试验,得出最佳的乙醇沉淀工艺条件是将滤液 pH 调为 6.5,加入 95% 的乙醇至醇沉浓度为 70%,静置过夜。制备的硫酸软骨素经检测符合 WS1-C3-0030-2000(硫酸软骨素口服片)和 WS-10001-(HD-0892)-2002(硫酸软骨素注射品)标准的要求。

关键词 史氏鲟 软骨 碱提 酶解 醇沉 硫酸软骨素

中图分类号 S986 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)03-0121-09

Study on extraction of chondroitin sulfate from Amur sturgeon

XU Yong-an¹ CHEN Shou-ping² WU Jing-na¹

LIAO Deng-yuan¹ WANG Yin¹

(¹Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012)

(²Jinjiang Commodity Inspection and Quarantine Bureau, 362200)

ABSTRACT Chondroitin sulfate was extracted from the cartilages of the Amur sturgeons using the process of alkali extraction, enzymatic hydrolysis and alcohol precipitation. The single factor test and the orthogonal test results showed that the optimum alkali extraction process was: 2 volumes of 6% NaOH were added, followed by stirring in water bath at 40℃ for 4h. The orthogonal test results indicated that the optimum enzymolysis procedure was as follows: 0.5% pancreatin was added to the extraction solution adjusted to pH 8.6, and kept at 50℃ for 3h for hydrolysis, and then 0.3% pepsin was added to the solution adjusted to pH 5.7 and kept at 40℃ for 2h. The single factors test results of ethanol solution revealed that the best procedure was as follows: after adjusting pH of the obtained hydrolysate to 6.5, 95% ethanol was added to adjust the consistency of precipitation system to 70%. The quality of the product met the standard requirement of WS1-C3-0030-2000 (Chondroitin sulfate tablets) and WS-10001-(HD-0892)-2002 (Chondroitin sulfate injection).

KEY WORDS Amur sturgeon Cartilage Alkali extraction Enzymatic hydrolysis
Alcohol precipitation Chondroitin sulfate

鲟鱼是现在世界上最大的、最原始的硬骨鱼类,它们大约在 250 万年前已演变成鲟科,属于硬骨鱼纲、辐鳍鱼亚纲、硬鳞总目、鲟形目。近年来许多国家先后开展了人工养殖,我国也不例外。随着鲟鱼养殖在我国迅猛发展,鲟鱼养殖的年产量迅速增加,现在我国已成为世界第一鲟鱼养殖大国,养殖年产量已达 2.5 万 t。鲟鱼全身都是宝,肉质鲜美,其肌肉中含有 10 余种人体必需氨基酸,鲟鱼活体的肉质优于三文鱼,做成生鱼片的嫩、滑、爽优于龙虾。尤其是鲟鱼的头、脊索、鳍中软骨占鱼体的 10% 左右,有研究发现鲟鱼软骨所提取的硫酸软骨素对乳腺癌细胞株、胃癌细胞株、肝癌细胞株具有显著的抑制作用,其抗癌效果与鲨鱼硫酸软骨素相似,同时还具有其他陆上动物硫酸软骨素的功效。如:可用于治疗风湿病和关节炎(Sauerland *et al.* 2003)、防治动脉硬化和血栓(韩晓量等 1995)、化妆品(Takenouchi *et al.* 1990)、食品(李南 1998)、保存角膜(坑彩霞等 1993)、治疗肾炎(朱瑞芬等 2000)等。因此,在我国进行鲟鱼硫酸软骨素的开发和应用研究,可弥补天然鲨鱼软骨量的不足,提高鲟鱼的经济价值,对促进鲟鱼养殖业的发展、延伸鲟鱼产业链、提高人民的身体健康水平都具有重大的意义。

硫酸软骨素目前的生产工艺很多,提取方法有碱法(Way *et al.* 2000)、碱-盐法(刘智等 1990)、酶法(于兹东等 2003;罗曼等 2000;王凤琴 2003;华子义 2001)、超声波法(蒲志军等 2000)、乙酸法等(Nakano *et al.* 2000);分离制备方法有溶剂法(马淑涛等 1993;Volpi 1996)、超滤膜法(陈健等 2003;Lignot *et al.* 2003)、季铵盐沉淀法(Kakeki *et al.* 1997)、离子交换色谱法等(Ranhakrishnamurthy *et al.* 1976; Hidemitsu *et al.* 2001; Bohn *et al.* 1971; Meyer *et al.* 1983; Falshaw *et al.* 2000)、电泳法等(Hanna 1986; Volpi 1999, 1996a, 1996b),每种方法各有其优缺点。目前,生产上最常用的是碱-酶解复合提取法和有机溶剂分离制备法。本研究采用目前生产上最常用的方法,采用单因素和正交试验法进行工艺优化,较系统地摸索出鲟鱼硫酸软骨素的生产工艺,为今后用鲟鱼软骨生产硫酸软骨素提供工艺依据。

1 材料与方 法

1.1 原料及其制备

1.1.1 鲟鱼

购自福建省厦门市同安勤得利鲟苗种繁育养殖场。

1.1.2 洗净鲟鱼软骨制备

将鲟鱼剥皮、去肉,取出头部、脊索、鳍软骨,投入 80~100 °C 水中烫浸 5 min 左右,取出放冷后剔除头部、脊索软骨上残留的肌肉、脂肪和其他结缔组织,用绞肉机绞碎,放入水中搅拌,然后过筛清洗,以除去碎肉和脂肪,称量冷冻备用。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅:DK-S16 型,上海森信实验有限公司生产;酸度计:pHS-25 型,上海理达仪器厂生产;电动搅拌器:SG-3040 型,上海硕光电子科技有限公司生产;离心机:LXJ-II 型,上海医用分析仪器厂生产;电子天平:JA2002 型,上海精天电子仪器厂生产;电热恒温鼓风干燥箱:DH9-9075A 型,上海一恒科技有限公司生产;紫外可见分光光度计:TU-1800PC 型,北京普析通用仪器有限公司生产;全自动定氮仪:DDY-5 型,北京北仪创新真空技术有限公司生产。

1.3 试剂

胰蛋白酶:活力 ≥ 250 U/mg;上海生化试剂公司生产;胃蛋白酶:活力 $\geq 1\ 200$ U/mg;上海生化试剂公司生产;颗粒状活性炭:江苏溧阳活性炭联合工厂生产;95% 的食用酒精:广东汕头市西陇化工厂生产;盐酸氨基葡萄糖标准品:分析纯,美国 Sigma 公司生产;对二甲氨基苯甲醛:分析纯,天津傲然精细化工研究所生产;乙

酰丙酮:分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司生产;碳酸钠:分析纯,北京化工厂生产;其他试剂:国产分析纯。

1.4 实验工艺流程及方法

湿鲟鱼软骨→碱提取→酶解→乙醇沉淀→干燥→硫酸软骨素(以下简称产品)

1.4.1 碱提取

称取鲟鱼软骨 100 g(以湿基计,水分含量 89.77%),加入一定浓度的 NaOH 溶液,控制一定的温度提取,直至软骨全部溶解。提取液用双层纱布过滤,弃滤渣,取滤液待用。

1.4.2 酶解

称取一定量的酶加到滤液中进行保温酶解,水解过程不断调节 pH 使之恒定,用三氯乙酸检查水解终点。酶解结束后将水解液升温至 80 °C 将酶灭活,冷却后,加少量活性炭搅拌脱色,滤纸过滤后得酶解液。

1.4.3 乙醇沉淀

将酶解液调至一定的 pH,然后加入 95% 的乙醇至其醇沉体系的乙醇为一定的浓度,室温静置过夜后离心,沉淀用少量无水乙醇洗涤脱水两次,于 60 °C 控温干燥,粉碎后得到硫酸软骨素提取物。

1.5 产品分析方法

1.5.1 氨基己糖

按硫酸软骨素(供注射用)含量测定法进行[WS-10001-(HD-0892)-2002]。

1.5.2 含氮量

用全自动定氮仪,按凯氏定氮法测定(GB/T 5009.5-2003)。

1.5.3 得率

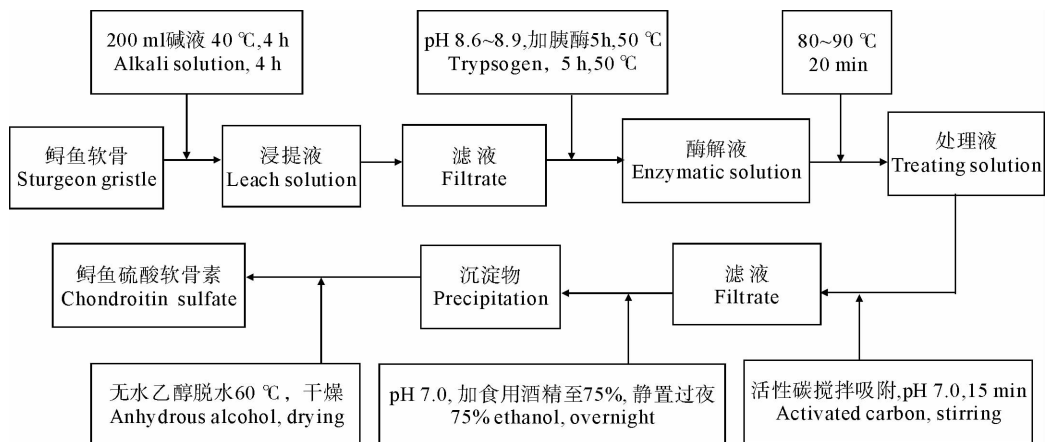
$$\text{得率} = \frac{\text{产品质量}(1 - \text{水分含量})}{\text{软骨样质量}(1 - \text{软骨水分含量})} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 碱提工艺对产品得率及其氨基己糖含量的影响

2.1.1 碱液浓度的影响

为了探讨不同碱浓度提取对产品得率及其氨基己糖含量的影响,本研究按以下的工艺流程进行了试验,其结果见图 1、图 2。



由图 1、图 2 可以看出,产品得率随碱浓度呈先上升后下降的趋势,在 7% 时达到最高。氨基己糖含量也随

碱浓度的升高呈上升趋势,在6%时达到最高,随后又下降。故碱浓度选取6%~7%为宜。因为硫酸软骨素是通过 β 消除反应使羟基氨基酸与多糖链的O-苷键分解而释放,所以强碱碱解也就可能引起GAG糖基上某些O-硫酸基亲核攻击造成的脱落和糖基结构变化(张惟杰 1994),使硫酸软骨素发生降解而导致产品得率和氨基己糖含量降低。

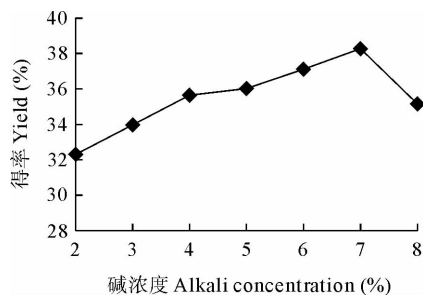


图1 碱浓度对产品得率的影响

Fig. 1 Effect of alkali concentration on yield

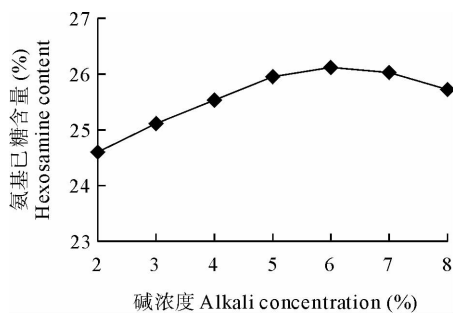


图2 碱浓度对氨基己糖含量的影响

Fig. 2 Effect of alkali concentration on hexosamine content

2.1.2 碱液温度的影响

为了探讨不同碱提温度对产品得率及其氨基己糖含量的影响,本研究按2.1.1工艺流程及碱浓度6%进行了试验,结果见图3、图4。

由图3、图4可以明显看出,碱液温度越高,产品得率越高。但超过40℃时,氨基己糖含量有所下降。而且本试验还发现,超过40℃时,产品颜色较深。综合以上因素考虑,碱液温度选取40℃为宜。

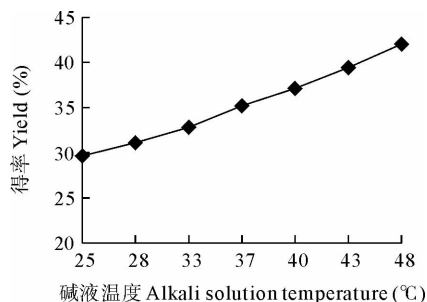


图3 碱液温度对产品得率的影响

Fig. 3 Effect of alkali solution temperature on yield

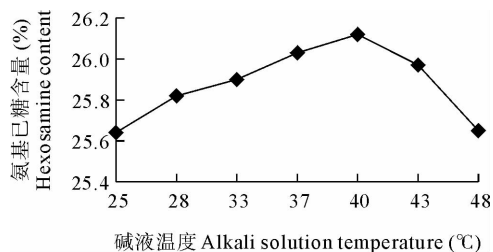


图4 碱液温度对氨基己糖含量的影响

Fig. 4 Effect of alkali solution temperature on hexosamine content

2.1.3 液料比的影响

为了探讨不同碱液量对产品得率及其氨基己糖含量的影响,本研究按2.1.1工艺流程及碱浓度6%进行了试验,结果见图5、图6。

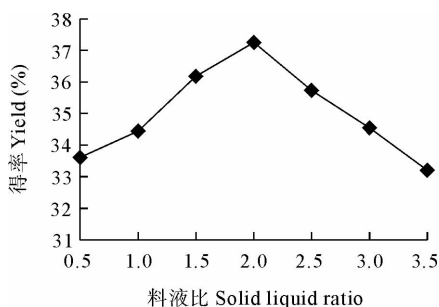


图5 液料比对产品得率的影响

Fig. 5 Effect of solid liquid ratio on yield

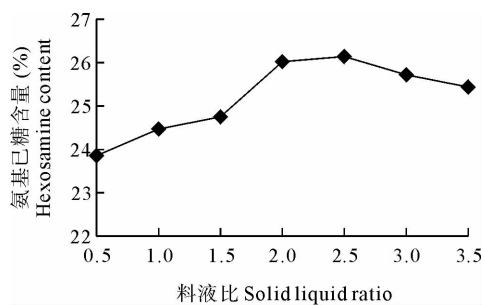


图6 液料比对氨基己糖含量的影响

Fig. 6 Effect of solid liquid ratio on hexosamine content

由图 5、图 6 可以看出, 产品得率随液料比呈先上升后下降的趋势, 在液料比(碱液 : 软骨) = 2(v/w) 时达到最高, 随后下降。氨基己糖含量随液料比的升高呈上升趋势, 在液料比为 2.5 时达到最高, 随后又下降。综合以上因素考虑, 液料比 2 为宜。

2.1.4 碱提取的正交试验

为了摸索出较为合理的碱提取工艺, 作者又对碱液浓度、碱液温度、碱液量各取 3 个水平, 采用 $L_9(3^3)$ 正交表, 以得率、氨基己糖含量为指标, 进行试验, 结果见表 1。

表 1 碱提取的正交实验结果
Table 1 Orthogonal experiment results of alkali extraction technique

组别 Group	碱液温度 Alkali liquor temperature A (°C)	液料比 Solid liquid ratio B (倍)	碱浓度 Alkali concentration C (%)	得率 Yield (%)	氨基己糖含量 Nexosamine content (%)
A ₁ B ₁ C ₁	1(25)	1(1)	1(2)	32.83	23.96
A ₁ B ₂ C ₂	1(25)	2(2)	2(4)	34.45	25.33
A ₁ B ₃ C ₃	1(25)	3(3)	3(6)	35.46	25.82
A ₂ B ₁ C ₂	2(33)	1(1)	2(4)	36.60	25.30
A ₂ B ₂ C ₃	2(33)	2(2)	3(6)	38.63	26.01
A ₂ B ₃ C ₁	2(33)	3(3)	1(2)	35.70	25.08
A ₃ B ₁ C ₃	3(40)	1(1)	3(6)	40.18	25.74
A ₃ B ₂ C ₁	3(40)	2(2)	1(2)	41.35	24.67
A ₃ B ₃ C ₂	3(40)	3(3)	2(4)	39.19	25.56
得率 $\overline{K_1}$ yield	34.25	36.54	36.63		
$\overline{K_2}$	36.98	38.14	36.75		
$\overline{K_3}$	40.24	36.78	38.09		
R	5.99	1.60	1.46		
主次因素 Primary and secondary factors	1	2	3		
含量 $\overline{K_1}$ Content	25.03	25.00	24.57		
$\overline{K_2}$	25.46	25.34	25.40		
$\overline{K_3}$	25.32	25.49	25.86		
R	0.43	0.49	1.29		
主次因素 Primary and secondary factors	3	2	1		

表 2 得率方差分析
Table 2 Variance of yield

因素 Factor	SS	df	MS	F	$F_{0.05}$	显著性 Significant level
A	54.022	2	27.011	28.257		*
B	4.491	2	2.250	2.350	19.00	
C	3.960	2	1.980	2.071		

表 3 氨基己糖含量方差分析
Table 3 Variance of hexosamine content

因素 Factor	SS	df	MS	F	$F_{0.05}$	显著性 Significant level
A	0.284	2	0.142	4.392		
B	0.373	2	0.186	5.767	19.00	
C	2.550	2	1.275	39.468		*

正交试验结果通过 DPS 软件进行方差分析(表 2、表 3),可以看出影响得率的最大因素是温度,具有显著差异,以 40 ℃ 得率最高,其他因素无显著差异;影响氨基己糖含量的最大因素是碱浓度,具有显著差异,以碱浓度 6% 提取时氨基己糖含量最高;其他因素无显著差异。根据直观分析以及综合考虑,选定碱提取工艺为:碱浓度 6%,碱液温度 40 ℃,液料比 2,与单因素实验有相似的结果。

2.2 酶解工艺对产品含氮量及其氨基己糖含量的影响

酶解是提高硫酸软骨素纯度的关键。由于软骨中的其他蛋白质(如胶原蛋白和粘蛋白等)在稀碱条件下不能被完全水解,而且在中性或弱酸溶液中又是可溶的,它们与硫酸软骨素共存于浸提液中,难以被分离除去(孟年文 2003)。酶法是利用蛋白酶水解蛋白质的特异性,使胶原蛋白和粘蛋白等水解成氨基酸,再依据氨基酸与硫酸软骨素在某些溶剂中的溶解性不同,实现硫酸软骨素与其他杂质的提纯分离。酶解反应条件温和,硫酸软骨素不易发生降解。

2.2.1 胰酶酶解的正交试验

胰酶为多种酶的复合物,其中含有胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶等。原料软骨中的化学成分复杂,含有糖原和脂肪等多种大分子物质。胰酶中的胰淀粉酶和胰脂肪酶可将糖原和脂肪水解成醇溶性的小分子物质,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,从而有利于硫酸软骨素的分离提取(刘坤等 2004;王璋 1990)。

为了摸索出较为合理的胰酶酶解工艺,作者按以上研究选定的碱提取工艺及 2.1.1 的工艺流程,经预试验,对酶解时间(4、5、6 h)、酶解温度(40、45、50 ℃)、酶量(0.4%、0.5%、0.6%)各取 3 个水平,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验,以含氮量、氨基己糖含量为指标,实验结果经直观分析及综合考虑,得胰酶酶解的最佳工艺为:水解过程提取液 pH 调至 8.6~8.9,加入胰酶 0.5%,于 50 ℃ 水浴中保温酶解 5 h。

2.2.2 胃蛋白酶酶解正交试验

胃蛋白酶通过作用于蛋白质分子中苯丙氨酸、酪氨酸等氨基酸形成的肽键,可将蛋白质分子水解成醇溶性的短肽或氨基酸,从而有利于硫酸软骨素的分离提取(宁正详 1998)。

为了摸索出较为合理的胃蛋白酶酶解工艺,作者又按以上研究选定的碱提取工艺及 2.1.1 的工艺流程,经预试验,对酶解时间(3、4、5 h)、酶解温度(40、45、50 ℃)、酶解 pH(3.5、4.6、5.7)、酶量(0.2%、0.3%、0.4%)各取 3 个水平,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验,以含氮量、氨基己糖含量为指标,试验结果经直观分析及综合考虑,得胃蛋白酶酶解的最佳工艺为:水解过程提取液 pH 调至 5.7,加入胃蛋白酶 0.3%,于 40 ℃ 水浴中保温酶解 5 h。

2.2.3 胰酶-胃蛋白酶双酶法

由于不同蛋白酶水解蛋白质具有一定的选择性,采用复合酶可以使硫酸软骨素浸提液中的蛋白质得到更充分的水解,有利于硫酸软骨素的分离提取。为此,作者继续按以上研究选定的碱提取工艺及 2.1.1 的工艺流程,分别做了双酶法的水解时间组合对含氮量和氨基己糖含量的影响。

2.2.3.1 双酶法的水解时间组合

表 4 胰酶-胃蛋白酶的水解时间组合试验结果

Table 4 Experimental results of combination of pancreatin and protease hydrolysis

编号 Group	酶名称 Name	酶量 Dosage(%)	水解时间 Time(h)	pH	水解温度 Temperature(℃)	含氮量 Nitrogen content(%)	氨基己糖含量 Hexosamine content(%)
1	胰 酶 Pancreatin	0.5	1	8.6	50	3.48	25.42
	胃蛋白酶 Protease	0.3	4	5.7	40		
2	胰 酶 Pancreatin	0.5	2	8.6	50	3.23	25.96
	胃蛋白酶 Protease	0.3	3	5.7	40		
3	胰 酶 Pancreatin	0.5	3	8.6	50	3.11	26.74
	胃蛋白酶 Protease	0.3	2	5.7	40		
4	胰 酶 Pancreatin	0.5	4	8.6	50	3.40	25.87
	胃蛋白酶 Protease	0.3	1	5.7	40		

胰酶-胃蛋白酶的水解时间组合试验结果见表 4。从其试验结果可以看出,含氮量在酶组合 3 降到最低,而氨基己糖含量则达到最高。由此可见,在胰酶和胃蛋白酶的组合中,在总水解时间为 5 h 的情况下,先加胰酶水解 3 h,后加胃蛋白酶水解 2 h 效果较好。

2.2.3.2 双酶法的酶量组合

表 5 胰酶-胃蛋白酶水解的酶用量组合

Table 5 Experiment results of dosage combination of pancreatin and protease

编号 Group	酶名称 Name	酶量 Dosage(%)	水解时间 Time(h)	pH	水解温度 Temperature(°C)	含氮量 Nitrogen content(%)	氨基己糖含量 Hexosamine content(%)
1	胰 酶 Pancreatin	0.4	3	8.6	50	3.36	25.76
	胃蛋白酶 Protease	0.2	2	5.7	40		
2	胰 酶 Pancreatin	0.3	3	8.6	50	3.62	25.08
	胃蛋白酶 Protease	0.2	2	5.7	40		
3	胰 酶 Pancreatin	0.5	3	8.6	50	3.11	26.74
	胃蛋白酶 Protease	0.3	2	5.7	40		
4	胰 酶 Pancreatin	0.5	3	8.6	50	3.25	26.05
	胃蛋白酶 Protease	0.2	2	5.7	40		

胰酶-胃蛋白酶的酶量组合试验结果见表 5。从其实验结果可以看出,含氮量在酶组合编号 3 时为最低,而氨基己糖含量在这组合中达到最高。由此可见,在胰酶和胃蛋白酶的组合中,胰酶量 0.5%水解 3 h 和胃蛋白酶量 0.3%水解 2 h 效果较好。

2.3 醇沉分离纯化工艺对产品得率及氨基己糖含量的影响

为了摸索出较合理的醇沉工艺,作者按以上研究的碱提取工艺和酶解工艺,用乙醇作为沉淀剂,继续研究了醇沉浓度及其 pH 对产品得率及氨基己糖含量的影响,其结果见图 7、图 8、图 9 和图 10。

2.3.1 乙醇沉淀浓度

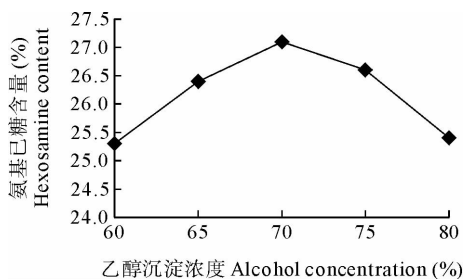


图 7 乙醇沉淀浓度对氨基己糖含量的影响

Fig. 7 Effect of alcohol concentration on hexosamine content

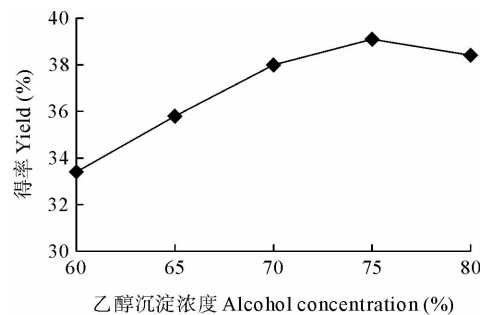


图 8 乙醇沉淀浓度对产品得率的影响

Fig. 8 Effect of alcohol concentration on yield

从图 7、图 8 可以看出,产品得率随着酒精沉淀浓度的升高而提高,在 70%~80% 范围时基本趋于稳定;而氨基己糖含量则先随着酒精沉淀浓度的升高而增加,浓度 70% 时达到最高,之后却有所下降。考虑到醇浓度增加,成本相对增加,而且酒精沉淀浓度 70% 以上得率增加极少,因此乙醇沉淀浓度选择 70% 为宜。

2.4 醇沉溶液的 pH 值

从图 9、图 10 可以看出,氨基己糖含量和产品得率随溶液 pH 值都呈先上升后下降的趋势。在溶液 pH 为 6.5 时,氨基己糖含量和产品得率都达到最高,故溶液 pH 值选取 6.5。

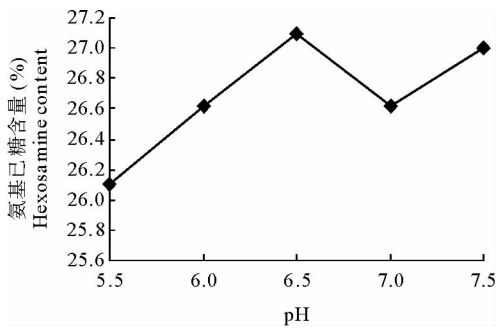


图9 醇沉溶液 pH 值对氨基己糖含量的影响

Fig. 9 Effect of pH on hexosamine content

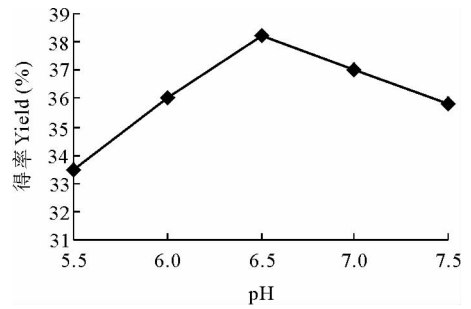


图10 醇沉溶液 pH 值对产品得率的影响

Fig. 10 Effect of pH on yield

2.5 产品的质量

按以上研究的较佳工艺及路线进行产品制备,得率 39.45%,所制备的样品经委托相关单位检测,结果如表 6 所示,完全符合 WS1-C3-0030-2000(硫酸软骨素口服片)和 WS-10001-(HD-0892)-2002(硫酸软骨素注射品)标准的要求。

表 6 鲟鱼硫酸软骨素产品质量测定结果

Table 6 Quality analysis of the chondroitin sulfate from Amur sturgeon

项目 Indexes	标准指标 Standard indices		测定结果 Determination results
	硫酸软骨素口服片 Chondroitin sulfate oral drug	硫酸软骨素注射品 Chondroitin sulfate injection	
性状 Character	白色粉末 White powder	白色粉末 White powder	白色粉末 White powder
氨基己糖含量(以干品计)Hexosamine content	≥24.0%	≥30.0%	31.0%
含氮量(以干品计)Nitrogen content	2.5%~3.8%	2.5%~3.5%	3.2%
干燥失重 Loss from drying	≤10%	≤10%	9.0%
澄清度 Clarity	≤0.05	≤0.040	0.035
pH	5.5~7.5	6.0~7.0	6.8
重金属 Heavy metals	≤20×10 ⁻⁶	≤20×10 ⁻⁶	符合规定 Qualified
氯化物 Chloride	≤1.0%	≤0.6%	0.5%

3 结论

(1)制备鲟鱼硫酸软骨素最佳的碱提取工艺以两倍量 6%的 NaOH 为溶剂,于 40 °C 的水浴中搅拌提取 4 h。

(2)制备鲟鱼硫酸软骨素最佳的酶解工艺条件是:先将浸提液调 pH 至 8.6 左右,接着加入胰酶 0.5%,50 °C 保温水解 3 h,水解过程不断调 pH 至 8.6;后降温至 40 °C,调 pH 至 5.7,加入胃蛋白酶 0.3%,保温水解 2 h,水解过程不断调 pH 至 5.7。

(3)制备鲟鱼硫酸软骨素最佳的乙醇沉淀工艺条件将滤液调 pH 为 6.5,边搅拌边加入 95%的食用酒精至醇沉浓度为 70%,静置过夜。

(4)按所研究的最佳工艺条件制备鲟鱼硫酸软骨素,其得率可高达 39.45%,含氮量 3.2%,氨基己糖含量达 31.0%,符合 WS1-C3-0030-2000(硫酸软骨素口服片)和 WS-10001-(HD-0892)-2002(硫酸软骨素注射品)标准的要求。

参 考 文 献

- 马淑涛, 张天民, 李 南, 徐连连. 1993. 不同工艺硫酸软骨素理化性质和生物活性. 中国医药工业杂志, 24(8):48~52
- 王凤琴. 2003. 硫酸软骨素生产新工艺的研究. 淮阴工学院学报, 12(3):71
- 王 璋主编. 1990. 食品酶学. 北京: 轻工业出版社, 95~102, 181~185
- 宁正祥. 1998. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 703~707
- 刘 坤, 刘 颀. 2004. 孔螭硫酸软骨素的制备. 中国海洋药物, (3): 19~22
- 刘 智, 赖建奇, 罗晓红, 王丁刚. 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, 109
- 华子义. 2001. 硫酸软骨素生产新工艺. 上海大学学报, 7(4): 334~336, 341
- 朱瑞芬, 童兴龙, 李 颖. 2000. 硫酸软骨素的研制. 中国医药工业杂志, 31(6):17~18
- 坑彩霞, 邹留河, 洪 涛, 张士元. 1993. 角膜保存的研究进展. 国外医学眼科分册, 17(5): 279~284
- 张惟杰. 1994. 多糖复合物生物化学技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1: 116
- 李 南. 1998. 硫酸软骨素的开发及质量控制. 上海水产大学学报, 7(1): 38~40
- 陈 健, 郭祁远, 李 琳, 肖凯军. 2003. 声电场强化超滤鲨鱼鳍软骨粘多糖. 华南理工大学学报(自然科学版), 31(2): 9~13
- 孟年文. 2003. 人工关节炎液治疗骨性关节炎. 广西中医学院学报, 6(4): 36~38
- 罗 曼, 蒋立科. 2000. 硫酸软骨素快速提取法研究. 动物学杂志, 35(5): 37~40
- 韩晓男, 赵培真, 杨 方, 杨瑞彪, 陈 忠, 梁凤玲. 1995. 人白细胞 DR 抗原在冠状动脉粥样硬化早期病变中的表达及 CS-PG 的关系. 中国动脉硬化杂志, 3(3): 232~235
- 蒲志军, 马 林, 嘉 庆, 姜 悦. 2000. 超声波法制备硫酸软骨素生产工艺的研究. 四川师范大学学报, 23(6): 640~642
- WS-10001-(HD-0892)-2002, 硫酸软骨素(供注射用), 含量测定
- GB/T 5009.5-2003, 食品中蛋白质的测定
- Bohn, R., and Kalbhen, D. A. 1971. Vergleichende untersuchern uberanalytical verfahren zur auftrnnung saurer mucopolysaccharide. Journal of Chromatography, 62: 409~415
- Falshaw, R., Hubl, U., and Ofman, D. 2000. Comparison of the glycosaminoglycan isolated the skin and head cartilage of Gould's arrow squid. Carbohydrate Polymers, 41: 357~364
- Hanna, W. A. 1986. method for determination of glycosaminoglycans in serum. Biochemical Society Transactions, 621:680~681
- Hidemitsu, U., Bun-ini, O., Junji, I. *et al.* 2001. Binding between calcium ions and chondroitin sulfate chain of salmon nasal cartilage glycosaminoglycan. International Congress Series, 1 223: 205~220
- Kakeki, K., Maeya, Y., Miki, Y. *et al.* 1997. Use of a binary mixture of quaternary ammonium salts in fluorometric determination of glycosaminoglycans. Analytical Biochemistry, 252(1): 56~61
- Lignot, B., Lahogue, V., and Bourseua, P. 2003. Enzymatic extraction of chondroitin sulfate from skate cartilage and concentration-desalting by ultrafiltration. Journal of Biotechnology, 103(3):281~284
- Meyer, R. C., and Takahashi, L. T. 1983. Analysis of cetylpyridinium chloride in the polysaccharide, chondroitin sulfate, via high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 280(1): 159~164
- Nakano, T., Ikawa, N., and Ozimck, L. 2000. An economical method to extract chondroitin sulfate-peptide from bovine nasal cartilage. Canadian Agriculture Engineering, 42(4): 205
- Ranhakrishnamurthy, B., Dalferes, E. R., and Berenson, G. S. 1976. Determination of hexuronic acids in glycosamino glycans by automated ionexchange chromatography. Analytical Biochemistry, 75(1): 160~167
- Sauerland, K., Plaas, A. H. K., Raiss, R. X. *et al.* 2003. The sulfation pattern of chondroitin sulfate from articular cartilage explants in response to mechanical loading. Biochimica et Biophysica acta, 1 638(3): 241~244
- Takenouchi, M., and Hirai, Y. 1990. Skin cosmetics containing oil-in-water and natural surfants and liposome-water dispersions. Fr Demande FR 2, 614, 787
- Volpi, N. 1996a. Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixture by sequential precipitation with various organic solvents. Journal of Chromatography B, 685(1): 27~34
- Volpi, N. 1999. Disaccharide analysis and molecular mass determination to microgram level of single sulfated glycosaminoglycan species in Mixtures following agarose-gelectrophoresis. Analytical Biochemistry, 273: 229~239
- Volpi, N. 1996b. Electrophoresis separation of glycosaminoglycan on nitrocellulose membranes. Analytical Biochemistry, 240:114~118
- Wayne W. W., Gibson, K. G., and Breite, A. G. 2000. Determination of chondroitin sulfate in nutritional supplements by liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 23(18): 2 851~2 860