

# 大麻哈鱼硫酸软骨素及其酸降解产物的抗氧化活性

赵玲<sup>1,2</sup>, 曹荣<sup>1,2</sup>, 刘淇<sup>1,2\*</sup>, 杨贤庆<sup>2,3</sup>, 赵丹<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071; 2. 农业部水产品加工重点实验室, 广州 510300;  
3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

**摘要:** **目的** 以大麻哈鱼鼻软骨为研究对象, 制备硫酸软骨素粗提物、醇沉产物和酸降解产物, 对比分析其体外抗氧化活性。**方法** 通过测定硫酸软骨素粗提物、醇沉产物和酸降解产物对 DPPH·、·OH 和 O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>自由基的清除特性, 比较其抗氧化能力。**结果** 醇沉产物对 DPPH·没有明显的清除作用, 粗提物和酸降解产物对 DPPH·有一定的清除作用, 但后者的清除能力远大于前者。粗提物、醇沉产物和酸降解产物对·OH 自由基均有明显的清除作用; 粗提物和醇沉产物对 O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>自由基均无清除作用, 但酸降解产物对 O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>自由基有较强的清除作用。酸降解产物对 3 种自由基的清除能力均较强, IC<sub>50</sub> 值均小于 1.5 mg/mL。**结论** 大麻哈鱼鼻软骨硫酸软骨素酸降解产物的抗氧化活性最强。

**关键词:** 大麻哈鱼; 硫酸软骨素; 酸降解产物; 抗氧化

## Antioxidant activities of chondroitin sulfate and its acid degradation products of *Oncorhynchus keta*

ZHAO Ling<sup>1,2</sup>, CAO Rong<sup>1,2</sup>, LIU Qi<sup>1,2\*</sup>, YANG Xian-Qing<sup>2,3</sup>, ZHAO Dan<sup>1,2</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;  
2. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China;  
3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**ABSTRACT: Objective** Using *Oncorhynchus keta* nasal cartilage as research object, the crude chondroitin sulfate extracts, ethanol precipitated chondroitin sulfate and acid degradation products were prepared, and their antioxidant activities *in vitro* were compared and analyzed. **Methods** The scavenging capacities on three kinds of free radicals including DPPH·, ·OH and O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> of the crude chondroitin sulfate extracts, ethanol precipitated chondroitin sulfate and acid degradation products were measured, so as to compare their antioxidant activities. **Results** The ethanol precipitated chondroitin sulfate had no obvious scavenging effect on DPPH·, while the crude chondroitin sulfate extracts and acid degradation products had certain scavenging effects on DPPH·, and the scavenging ability of acid degradation products was much greater than that of crude chondroitin sulfate extracts. The crude chondroitin sulfate extracts, ethanol precipitated chondroitin sulfate, and acid degradation products of chondroitin sulfate all had obvious scavenging effects on ·OH. The crude chondroitin sulfate extracts and ethanol precipitated chondroitin sulfate had no scavenging effects on O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>, but acid degradation products of chondroitin sulfate had a strong scavenging effect on O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>. The scavenging capacities of acid degradation products of chondroitin sulfate to DPPH·, ·OH and O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> was the

基金项目: 农业部水产品加工重点实验室开放基金项目(NYJG201505)

**Fund:** Supported by Fund of Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, China (NYJG201505)

\*通讯作者: 刘淇, 研究员, 主要研究方向为水产品加工与综合利用。E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

\*Corresponding author: LIU Qi, Researcher, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China. E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

best, and their  $IC_{50}$  values were less than 1.5 mg/mL. **Conclusion** The antioxidant activity of acid degradation products of chondroitin sulfate from *Oncorhynchus keta* nasal cartilage is the best.

**KEY WORDS:** *Oncorhynchus keta*; chondroitin sulfate; acid degradation product; antioxidant

## 1 引言

研究证实许多疾病的产生与自由基及其他活性氧的存在有关,包括类风湿性关节炎、肝病、动脉粥样硬化等<sup>[1,2]</sup>。硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)是来自动物组织器官中的一种酸性粘多糖,以蛋白聚糖的形式存在于软骨、腱、韧带和主动脉等组织中,其中软骨是获取 CS 的最佳来源<sup>[3,4]</sup>。硫酸软骨素在自由基清除方面具有良好的效果,其清除能力与 CS 纯度和分子量密切相关。

郑丽等<sup>[5]</sup>报道了乌贼硫酸软骨素的保水性、抗氧化性及抑制黑色素瘤生长的研究,熊双丽等<sup>[6]</sup>研究了猪肺管硫酸软骨素的提取分离与抗氧化活性;而关于大麻哈鱼鼻软骨硫酸软骨素抗氧化活性的研究报道相对较少。本研究以大麻哈鱼鼻软骨为原料,探究其 CS 粗提物、醇沉产物在自由基清除方面的作用,同时将大分子 CS 样品通过酸降解制备得到低聚糖<sup>[7]</sup>,研究其抗氧化活性,以期为大麻哈鱼加工副产物的开发应用提供参考。

## 2 材料与方 法

### 2.1 实验材料

大麻哈鱼鼻软骨,由烟台嘉惠海洋生物科技有限公司提供,用水冲洗干净后冻干,粉碎成粉末后储存备用。

### 2.2 仪器与试剂

HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); BT224S 分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); PB-10 pH 计(德国赛多利斯股份公司); UV-2802 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器设备有限公司)。

二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)标准品(纯度 95%, 1 g, 美国 Sigma 公司); Tris Base(北京索莱宝科技有限公司); 邻苯三酚、七水合硫酸亚铁、30%过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司); 盐酸(山东莱西经济技术开发区精细化工厂); 水杨酸(上海凌峰化学试剂有限公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 样品的制备

称取适量大麻哈鱼鼻软骨粉,采用碱—酶两步法提取硫酸软骨素。第一步碱提制备的粗提物,编号 A1; 第二步添加碱性蛋白酶,在其最佳工艺条件下继续提取,制备得到的粗提物编号 E1。粗提物 A1 和 E1 经醇沉工艺得到产物 A2 和 E2。醇沉产物 A2 和 E2, 分别经如下步骤: 溶解到 50 mL 0.4 mol/L 盐酸溶液中,置水浴锅中 65 °C 恒温

反应 24 h 后, 5000 r/min 离心 20 min, 上清液过 0.5 μm 的超滤膜。采用 0.4 mol/L NaOH 中和酸降解溶液至中性后, 加 1.5 倍体积无水乙醇沉淀, 4 °C 静置 12~24 h, 离心, 无水乙醇洗涤沉淀数次, 得到 CS 酸降解产物, 编号 A3 和 E3。

#### 2.3.2 DPPH·清除率测定

参照文献<sup>[8]</sup>的方法测定, 每组实验平行测定 3 次取平均值。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率: } E(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$$

式中:  $A_0$ : 无水乙醇+DPPH·的吸光度;  $A_i$ : 样品溶液+DPPH·的吸光度;  $A_j$ : 样品溶液+无水乙醇的吸光度。

#### 2.3.3 ·OH 清除率测定

参照文献<sup>[9]</sup>的方法, 以去离子水作为空白对照, 每组实验平行测定 3 次取平均值。

$$\cdot\text{OH 清除率: } E(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$$

式中:  $A_0$ :  $H_2O + Fe^{2+} + H_2O_2 +$ 水杨酸的吸光度;  $A_i$ : 样品+ $Fe^{2+} + H_2O_2 +$ 水杨酸的吸光度;  $A_j$ : 样品+ $Fe^{2+} + H_2O_2$ 的吸光度。

#### 2.3.4 $O_2\cdot$ 清除率测定

参照文献<sup>[10]</sup>的方法, 每组实验平行测定 3 次取平均值。

$$O_2\cdot\text{清除率测定: } E(\%) = [1 - (A_x - A_{x0})/(A_0 - A)] \times 100\%$$

式中:  $A_{x0}$ : Tris-HCl+样品溶液+蒸馏水+邻苯三酚的吸光度;  $A_x$ : Tris-HCl+样品溶液+蒸馏水的吸光度;  $A_0$ : Tris-HCl+蒸馏水+邻苯三酚的吸光度;  $A$ : Tris-HCl+蒸馏水+10 mmol/L HCl 的吸光度。

#### 2.3.5 半抑制浓度(hemi-inhibitory concentration, $IC_{50}$ )的测定

半抑制浓度是指对自由基的抑制率达到 50%时样品的浓度, 用  $IC_{50}$  表示, 可以更清晰地比较不同样品间的抗氧化能力。

## 3 结果与讨论

### 3.1 对 DPPH·清除能力的比较

DPPH·是人工合成以氮为中心的一种自由基, 因其稳定的特性常被用来评价各种化合物潜在的抗氧化活性<sup>[11]</sup>。

粗提物 A1 和 E1、醇沉产物 A2 和 E2、酸降解产物 A3 和 E3 6 种样品对 DPPH·的清除效果如图 1 所示。由图 1(a)可知, 醇沉产物 A2 对 DPPH·自由基的清除率小于 10%, 没有明显的清除作用; 而粗提物 A1 表现出一定的清除能力, 可能是其中含有的多肽成分对 DPPH·有较强的清除作用, 酸降解产物 A3 在浓度为 2 mg/mL 时清除率就达到 50%左右, 清除能力显著高于 A1 和 A2, 这可能是酸降解产生的不饱和糖醛酸结构发挥了重要的作用。由图 1(b)可知, E1 有一定的清除作用, 但 E2 的清除作用几乎为 0; E3

对 DPPH·的清除效果较好, 具有很强的抗氧化能力。试验结果表明, 醇沉产物对 DPPH·自由基没有明显的清除作用, 粗提物和酸降解产物对 DPPH·有一定的清除作用, 但后者的清除能力远大于前者。

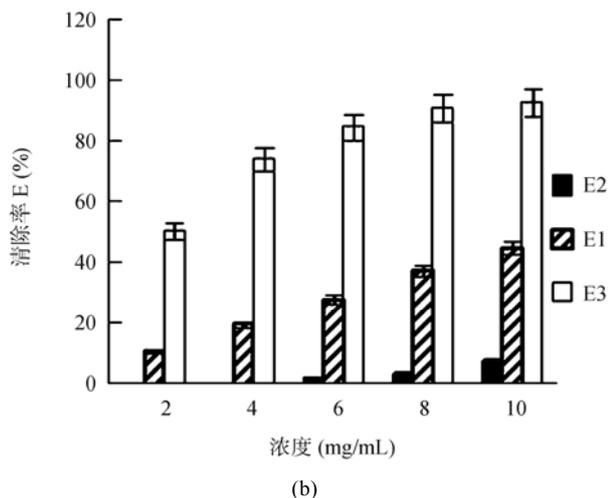
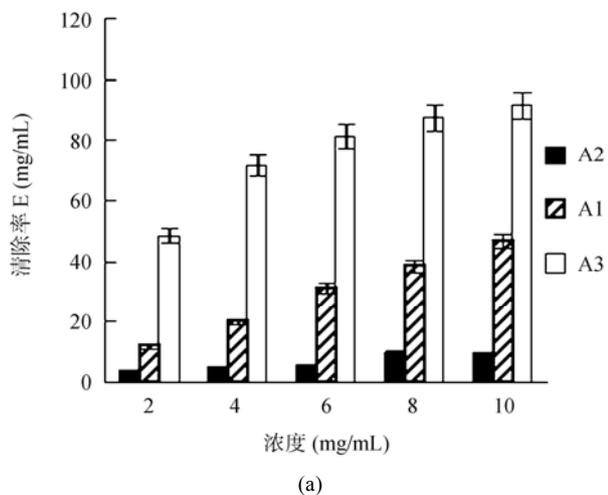


图 1 样品 A1、A2、A3(a)和 E1、E2、E3(b)对 DPPH·自由基的清除作用(n=3)

Fig. 1 Scavenging rates of samples A1, A2, A3 (a) and E1, E2, E3 (b) to DPPH· at different concentrations (n=3)

### 3.2 对·OH 清除能力的比较

采用 Fe<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-水杨酸体系测定样品对·OH 自由基的清除能力<sup>[12]</sup>。不同样品对·OH 自由基的清除效果如图 2 所示。从图 2(a)可以看出, A1、A2 对·OH 有明显的清除作用, 但 A1 的清除能力略低于 A2, 可能是因为醇沉产物 A2 中 CS 纯度高, 对·OH 的清除能力更强; A3 与 A2 对·OH 清除能力几乎没有差异。由图 2(b)可知, E1 和 E2 对·OH 都有显著的清除作用, 对·OH 的清除能力依次为 E3>E2>E1。比较图 2(a)和图 2(b)可知, 在同一浓度条件下, A1 对·OH 的清除率高于 E1, A2 高于 E2; 说明不同工艺提取得到的 CS, 对

·OH 的清除能力存在一定差异, 分析认为差异可能与粗提产物的组成及 CS 的化学结构有关。酸降解产物对·OH 的清除率有所提高, 但 A3 和 E3 对·OH 的清除率不存在差异; 这可能是酸降解破坏了 CS 完整的糖链结构, 从而生成小分子 CS 寡聚糖, 其含有的不饱和糖醛酸结构成为影响抗氧化能力的主要因素。

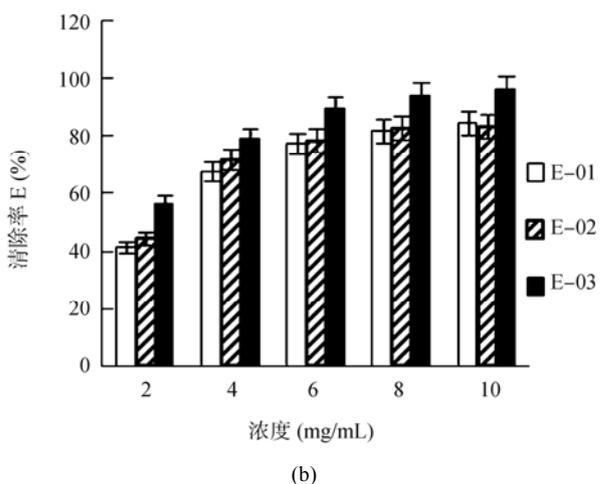
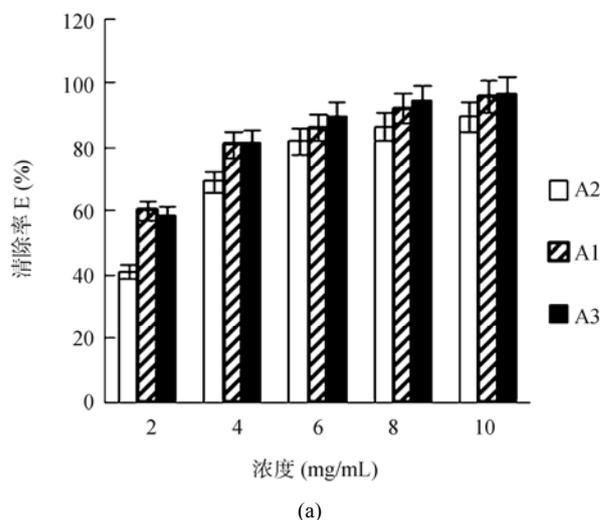


图 2 不同样品 A1、A2、A3(a)和 E1、E2、E3(b)对·OH 的清除作用(n=3)

Fig. 2 Scavenging rates of samples A1, A2, A3 (a) and E1, E2, E3 (b) to ·OH at different concentrations (n=3)

### 3.3 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基清除能力的比较

O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基自身是无毒性的, 但它能与其他自由基反应生成有毒的氢过氧化物, 且可以转变成·OH, 从而对机体造成损伤<sup>[13,14]</sup>。采用邻苯三酚自氧化法测定样品对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·的清除能力<sup>[15]</sup>。

经计算可知, 样品 A1 和 E1、A2 和 E2 样品对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·没

有清除作用。A3 和 E3 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除作用见图 3, 由图 3 可知, 样品 A3 和 E3 对  $O_2^{\cdot-}$  有较强的清除效果。样品 A3 和 E3 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除能力均随着浓度的增加而升高, 样品浓度 4 mg/mL 时, 其清除率上升趋势缓慢。

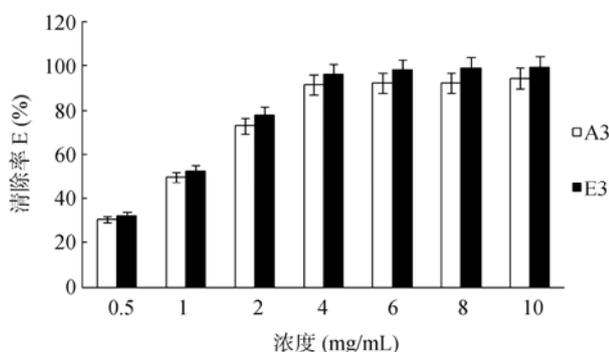


图 3 样品 A3 和 E3 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除作用 ( $n=3$ )

Fig. 3 Scavenging rates of samples A3 and E3 to  $O_2^{\cdot-}$  at different concentrations ( $n=3$ )

### 3.4 不同样品对 3 种自由基的清除能力比较

不同样品对 3 种自由基的  $IC_{50}$  见表 1。由表 1 可知, 粗提物 A1、E1 对 DPPH $\cdot$  和  $O_2^{\cdot-}$  自由基的清除能力较弱, 对  $\cdot OH$  自由基有较强的清除能力。醇沉产物 A2 和 E2 对 DPPH $\cdot$  和  $O_2^{\cdot-}$  自由基的清除能力很弱, 对  $\cdot OH$  自由基有显著的清除作用, 且  $IC_{50}$  值小于粗提物 A1、E1; 酸降解产物 A3 和 E3 对 3 种自由基均有清除作用,  $IC_{50}$  均小于 1.5 mg/mL, 其中对  $O_2^{\cdot-}$  有较强的清除作用。因此, A3 和 E3 对 3 种自由基的清除能力均较强。

张莲等<sup>[16]</sup>发现酸降解产生的 CS 低聚糖具有更好的 DPPH $\cdot$  自由基清除能力和还原能力, 而未降解的 CS 对 DPPH $\cdot$  自由基没有清除作用, 推测可能是 CS 低聚糖中不饱和糖醛酸结构的生成发挥了关键作用; 史敏娟等<sup>[17]</sup>通过自由基降解法制备低分子量 CS, 发现低分子量的 CS 对  $\cdot OH$  和  $O_2^{\cdot-}$  自由基及  $NO_2^{\cdot}$  均有较好的清除作用, 对自由基的清除能力及金属离子的螯合能力均高于未降解 CS。本研究结果与此结论相一致。

表 1 不同样品对 3 种自由基的清除能力比较

Table 1 Comparison of scavenging capacities of different samples to three kinds of free radicals

样品	$IC_{50}$ (mg/mL)		
	DPPH $\cdot$	$\cdot OH$	$O_2^{\cdot-}$
A1	-	2.42	-
E1	-	2.46	-
A2	-	1.42	-
E2	-	2.12	-
A3	1.37	1.33	0.909
E3	1.31	1.38	0.853

## 4 结 论

大麻哈鱼鼻软骨硫酸软骨素粗提物、醇沉产物和酸降解产物体外抗氧化活性研究结果表明:

(1) 粗提物对 DPPH $\cdot$  有一定的清除作用, 醇沉产物对 DPPH $\cdot$  没有明显的清除作用, 这可能是粗提物中含有的活性多肽成分对 DPPH $\cdot$  有较强的清除作用。酸降解产物对 DPPH $\cdot$  有较强的清除作用, 且清除能力显著高于 A1 和 A2, 这可能是酸降解产生的不饱和糖醛酸结构发挥了重要的作用。

(2) 粗提物、醇沉产物和酸降解产物对  $\cdot OH$  均有明显的清除作用。由于提取工艺不同, 粗提物 A1 对  $\cdot OH$  的清除率高于 E1, 醇沉产物 A2 对  $\cdot OH$  的清除率高于 E2, 这种差异可能与粗提物的组成及化学结构不同有关。A3 和 E3 对  $\cdot OH$  的清除能力不存在差异, 可能是因为酸降解破坏了 CS 完整的糖链结构, 生成小分子 CS 寡聚糖, 其含有的不饱和糖醛酸结构成为影响抗氧化能力的主要因素。

(3) 粗提物和醇沉产物对  $O_2^{\cdot-}$  均无清除作用, 但酸降解产物对  $O_2^{\cdot-}$  有较强的清除作用。

(4) 酸降解产物对 3 种自由基均有清除作用, 且  $IC_{50}$  值均小于 1.5 mg/mL。

综合分析认为, 大麻哈鱼硫酸软骨素经酸降解后的产物抗氧化活性最强。

### 参考文献

- [1] 王金凤, 臧恒昌, 李连, 等. 硫酸软骨素的结构和相对分子质量对其生物活性影响的研究进展[J]. 药物生物技术, 2014, 21(2): 185-188. Wang JF, Zang HC, Li L, et al. Effect of structure and relative molecular mass of chondroitin sulfate on its biological activity [J]. Pharm Biotechnol, 2014, 21(2): 185-188.
- [2] 蔡旋脚, 陈小连, 杨帆, 等. 微生物源性抗氧化剂体外抗氧化能力的初步研究[J]. 生物技术, 2011, 21(6): 84-87. Cai XJ, Chen XL, Yang F, et al. A preliminary research of antioxidant capacity by micro-derived antioxidants *in vitro* [J]. Biotechnology, 2011, 21(6): 84-87.
- [3] 赵玲, 殷邦忠, 刘淇, 等. 吸附法制备大麻哈鱼硫酸软骨素的工艺优化[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 112-116. Zhao L, Yin BZ, Liu Q, et al. Optimized absorption method to isolate chondroitin sulfate from *Oncorhynchus keta* [J]. Prog Fish Sci, 2014, 35(3): 112-116.
- [4] 赵丹, 曹荣, 高红岩, 等. 大马哈鱼鼻软骨中硫酸软骨素提取工艺的响应面优化[J]. 湖南农业科学, 2015, (1): 95-98. Zhao D, Cao R, Gao HY, et al. Optimization of chondroitin sulfate extraction from salmon nasal cartilage by response surface method [J]. Hunan Agric Sci, 2015, (1): 95-98.
- [5] 郑丽, 王亚儿, 李和生. 乌贼硫酸软骨素的保水性、抗氧化性及抑制黑色素瘤生长的研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(4): 18-22. Zheng L, Wang YE, Li HS. Squid chondroitin sulfate moisture retention capacity, antioxidant activity, and ability to inhibit melanoma growth [J]. Mod Food Sci Technol, 2016, 32(4): 18-22.

- [6] 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 SL, Li AL, Zhang XJ. Purification and antioxidant activity of chondroitin sulfate from pig lung trachea [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(17): 93-96.
- [7] 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, 6(16): 597-600.  
Li X, Yao K, Jia DY, *et al.* Progress in extraction, purification and separation of chondroitin sulfate [J]. Nat Prod Res, 2004, 6(16): 597-600.
- [8] 赵玲, 殷邦忠, 刘淇, 等. 4 种海参多肽抗氧化活性的比较研究[J]. 中国海洋药物, 2012, 31(2): 19-24.  
Zhao L, Yin BZ, Liu Q, *et al.* Comparative study on antioxidation activity of polypeptides from four kinds of sea cucumbers [J]. Chin J Mar Drugs, 2012, 31(2): 19-24.
- [9] 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除超氧阴离子自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 8(28): 1823-1826.  
Guo XF, Yue YD, Tang F, *et al.* Detection of antioxidative capacity of bamboo leaf extract by scavenging superoxide anion free radical [J]. Spectrosc Spect Anal, 2008, 8(28): 1823-1826.
- [10] 玄红专, 桑青, 麻建军. 邻苯三酚自氧化法测定不同蜂产品抗氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(4): 137-139.  
Xuan HZ, Sang Q, Ma JJ. Anti-oxidation study of different bee products measured by pyrogallol autoxidation method [J]. Food Sci Technol, 2008, 33(4): 137-139.
- [11] 杨少辉, 宋英今, 王清华, 等. 雪莲果体外抗氧化和自由基清除能力[J]. 食品科学, 2010, 17(31): 166-169.  
Yang SH, Song YJ, Wang QH, *et al.* In vitro antioxidant and free radical scavenging activities of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Tubers [J]. Food Sci, 2010, 17(31): 166-169.
- [12] 董捷, 尹策, 张红城, 等. 杏花花粉中苦杏仁苷的抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 65-68.  
Dong J, Yin C, Zhang HC, *et al.* Research on antioxidative activities of amygdlin from almond pollen [J]. Food Sci, 2007, 28(8): 65-68.
- [13] Bedard L, Young MJ, Hall D, *et al.* Quantitative studies on the peroxidation of human low-density lipoprotein initiated by superoxide and by charged and neutral alkylperoxyl radicals [J]. J Am Chem Soc, 2001, 123: 12439-12448.
- [14] Winterbourn CC, Kettle AJ. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305: 729-736.
- [15] 熊双丽, 张建国, 袁小红, 等. 鸡胸软骨多糖组分的分级及自由基清除活性研究[J]. 食品科学, 2009, 5(30): 68-71.  
Xiong SL, Zhang JG, Yuan XH, *et al.* Fractionation of polysaccharides from chicken keel cartilage and their free radical scavenging activities [J]. Food Sci, 2009, 5(30): 68-71.
- [16] 张莲, 王金鹏, 孔子青, 等. 硫酸软骨素的降解及其降解产物抗氧化活性的测定[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 180-182.  
Zhang L, Wang JP, Kong ZQ, *et al.* Degradation of chondroitin sulfate and antioxidation of its degraded products [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(12): 180-182.
- [17] 史敏娟, 熊双丽, 王莹莹, 等. 低相对分子质量硫酸软骨素的制备及其性质[J]. 精细化工, 2012, 11(29): 1089-1092.  
Shi MJ, Xiong SL, Wang YY, *et al.* Preparation and properties of low molecular weight chondroitin sulfate [J]. Fine Chem, 2012, 11(29): 1089-1092.

(责任编辑: 姚 菲)

## 作者简介



赵 玲, 助理研究员, 主要研究方向为水产品加工与高值化。  
E-mail: zhaoling@ysfri.ac.cn



刘 淇, 研究员, 主要研究方向为水产品加工与综合利用。  
E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn