

文章编号: 1674-5566(2010)04-0553-07

史氏鲟鱼硫酸软骨素的提取及 抗肿瘤活性的研究

许永安¹, 陈守平², 苏金华³, 吴靖娜¹

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012 2 福建晋江商品检验检疫局, 福建 晋江 362200
3 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 以史氏鲟鱼软骨为原料, 按碱提—酶解—醇沉的工艺流程, 进行硫酸软骨素的碱提工艺优化研究。分别通过碱浓度、碱液温度、碱液量的单因素试验及该3个因素的正交试验, 研究其对产品得率及其氨基己糖含量的影响, 综合分析得出最佳的碱提工艺为2倍量6%的NaOH于40℃的水浴中搅拌提取4h。该工艺条件制备鲟鱼硫酸软骨素的得率可高达40.45%, 产品质量符合硫酸软骨素口服片(WSI-C3-0030-2000)标准的要求。鲟鱼硫酸软骨素精品和粗品对3种细胞乳腺癌细胞株(MCF-7细胞)、胃癌细胞株(MG803细胞)、肝癌细胞株(SMMC7721)作用72h时, 其IC₅₀分别为7.28 mg/mL, 7.68 mg/mL, 4.25 mg/mL和8.86 mg/mL, 9.27 mg/mL, 7.37 mg/mL。与鲨鱼硫酸软骨素精品和粗品有着相似的抗肿瘤活性。

关键词: 史氏鲟; 软骨; 碱提; 硫酸软骨素; 得率; 氨基己糖; 抗肿瘤

中图分类号: R 945 S 986.2 **文献标识码:** A

Extraction of chondroitin sulfate from Amur sturgeon and its antitumor activity

XU Yong an, CHEN Shou pin, SU Jin-hua, WU Jing-na

(1. Fujian Fisheries Research Institute Xiamen 361012 China

2. Jjiang Commodity Inspection and Quarantine Bureau Jjiang 362200 China

3. Medical College Xiamen University Xiamen University Xiamen 361005 China)

Abstract: In this paper, cartilages of the Amur sturgeon were used as the material to study the optimized protocol for the alkali extraction technology of chondroitin sulfate based on the process of alkali extraction, enzymatic hydrolysis, alcohol precipitation. By single factors (different alkali concentration, alkali liquor temperature, alkali liquor content) and orthogonal test, the effects on yield of product and hexosamine content were studied. The results showed that the optimum alkali extraction technology was as follows: adding 2 times amount of 6% NaOH and stirring in water at 40℃ for 4 h. And the yield of chondroitin sulfate made by this technology reached 40.45%, the quality met the requirement of WSI-C3-0030-2000. The breast cancer cell line (MCF-7 cell), gastric cancer cell line (MG803 cell) and hepatoma cell line (SMMC7721) were treated 72 h with the pure and crude samples of sturgeon chondroitin sulfate and its IC₅₀ were 7.28 mg/mL, 7.68 mg/mL, 4.25 mg/mL and 8.86 mg/mL, 9.27 mg/mL, 7.37 mg/mL respectively. Its antitumor activities

收稿日期: 2009-08-11

基金项目: 厦门市科学技术局项目(3502Z0042019)

作者简介: 许永安(1955-), 男, 研究员, 主要从事水产品综合利用方面的研究。E-mail: xuyy@fjscs.ac.cn

were similar to the pure and rough samples of shark

Key words: Amur sturgeon, cartilage, alkali extraction, chondroitin sulfate, yield, hexamine, antitumor activity

目前,我国已成为世界第一鲟鱼养殖大国,史氏鲟(Acipenser schrenckii)养殖年产量已达2.5万吨。其头、脊索、鳍中软骨占鱼体的10%左右,是提取硫酸软骨素的良好原料,硫酸软骨素可用于治疗风湿病和关节炎^[1];防治动脉硬化和血栓^[2];化妆品^[3];食品^[4];保存角膜^[5];治疗肾炎^[6]等。甚至据说鲟鱼硫酸软骨素具有抗癌的特殊功效,其效果并不亚于鲨鱼硫酸软骨素,但未见有相关的研究结果。硫酸软骨素的提取方法有碱法、碱盐法、酶法、超声波法和乙酸抽提法等^[7-12],目前国内普遍采用稀碱和浓碱的提取法,国外报道用稀碱稀盐综合提取法,这些制备工艺一般都要经过酶解和活性碳或白陶土等处理。本研究用目前国内普遍使用的碱提-酶解-醇沉分离制备法,采用单因素试验法和正交试验法进行碱提工艺优化,为今后用鲟鱼软骨生产硫酸软骨素提供工艺依据,并用研制的鲟鱼硫酸软骨素对乳腺癌细胞株(MCF-7细胞)、胃癌细胞株(MG803细胞)、肝癌细胞株(SMMC7721)进行了体外抗肿瘤活性研究,其结果如下。

1 材料与方 法

1.1 原料及其制备

将自厦门市同安勤得利鲟苗种繁育养殖场的鲟鱼剥皮、去肉,取出头部、脊索、鳍软骨,投入80~100℃水中烫浸5min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 试剂

胰蛋白酶,活力≥250 u/mg;颗粒状活性碳;95%的食用酒精;盐酸氨基葡萄糖标准品,分析纯(Sigma)。对二甲氨基苯甲醛、乙酰丙酮、碳酸钠等,皆为分析纯。

1.3 实验工艺流程及方法

鲟鱼软骨(100g以湿基计) $\xrightarrow{\text{碱液, 4 h}}$ 浸提液 $\xrightarrow{\text{双层纱布}}$ 滤液 $\xrightarrow{\text{20\% HCl调 pH 6~8, 9}}$ 酶解液 $\xrightarrow{\text{加胰酶 0.5\%, 5 h 50\text{ }^\circ\text{C}}}$

$\xrightarrow{\text{80 }^\circ\text{C, 20 min}}$ 处理液 $\xrightarrow{\text{活性碳, 搅拌吸附, pH 7.0, 15 min}}$ 滤液 $\xrightarrow{\text{静置过夜, 离心}}$ 沉淀物 $\xrightarrow{\text{无水乙醇脱水, 60 }^\circ\text{C, 干燥}}$ 鲟鱼硫酸软骨素

硫酸软骨素

1.3.1 碱提取

称取鲟鱼软骨100g(以湿基计,水分含量89.77%),加入一定浓度、定量的NaOH溶液,控制一定的温度提取,直至软骨全部溶解,约4h提取液用双层纱布过滤,弃滤渣,取滤液待用。

1.3.2 酶解

称取0.5%的胰酶添加到滤液中进行保温酶解,水解过程不断调节pH使之恒定^[13],用三氯化乙酸检查水解终点。酶解结束后将水解液升温至80℃灭酶20min冷却后,加少量活性碳搅拌脱色,滤纸过滤后得酶解液。

1.3.3 乙醇沉淀

将酶解液调至pH7.0然后加入95%的乙醇至其醇沉体系的乙醇为75%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二次,于60℃控温干燥,粉碎后得到硫酸软骨素提取物。

1.4 产品分析方法

$$Y = \frac{W(1 - M_1)}{100 \times (1 - M_2)} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y为得率(%);W为产品重量(g);M₁为产品水分含量(%);M₂为软骨水分含量(%)。

氨基己糖:按硫酸软骨素(供注射用)含量测定法进行^[14]。

含氮量:用全自动定氮仪,按凯氏定氮法测定^[13]。

1.5 硫酸软骨素的抗肿瘤活性实验方法^[15]

利用MTT比色法对活细胞数量进行检测,来判断硫酸软骨素对癌细胞株的抑制作用。

1.5.1 细胞

乳腺癌细胞株(MCF-7细胞)、胃癌细胞株(MG803细胞)、肝癌细胞株(SMMC7721细胞),其细胞浓度每毫升10⁵个;培养条件:10%

NCS1640 37 °C, 5% CO₂ 96孔板培养。

1.5.2 样品处理

鲟鱼、鲨鱼硫酸软骨素粗品 (系指未经过酶解除氮及乙醇沉淀的碱解中和粗溶液) 浓度分别为 150 mg/mL 和 100 mg/mL, 鲟鱼、鲨鱼硫酸软骨素精品 [粉状产品, 质量符合 WS10001-(HD-0892)-2002 (硫酸软骨素注射品) 标准的要求] 分别取 1 置于 10 mL 双蒸水中, 充分摇匀, 使其溶解, 最终浓度为 100 mg/mL, 置 -20 °C 冰箱保存备用。

1.5.3 实验方法

4种样品的 1/2 母液浓度为第一浓度, 按倍比稀释法设 5个浓度; 细胞接种 96孔板培养 24 h后加样品药物浓度, 继续培养 48 h后加 MIT 检测, 4 h后用酶标仪测出 OD值。生长抑制率计算如下:

$$I = \frac{OD_a - OD_b}{OD_a - OD_k} \times 100\% \quad (2)$$

式中: I 为生长抑制率 (%); OD_a 为对照组吸光值; OD_b 为实验组吸光值; OD_k 是空白组吸光值。

用 F 检验分析实验结果。

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 2 倍量碱液及 40 °C 的碱提工艺作了不同碱浓度单因素提取试验, 其结果如图 1、图 2 所示。

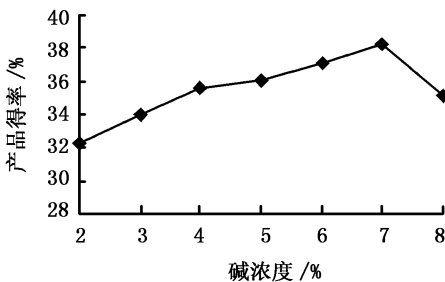


图 1 碱浓度对产品得率的影响
Fig 1 Effect of alkali concentration on yield

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% 时候达到最高。氨基己糖含量也随碱浓度的升高呈上升趋势, 在

6% 的时候达到最高, 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 硫酸基因亲核攻击造成的脱落和糖基结构变化^[19], 使硫酸软骨素易发生降解而导致产品得率和氨基己糖含量降低。

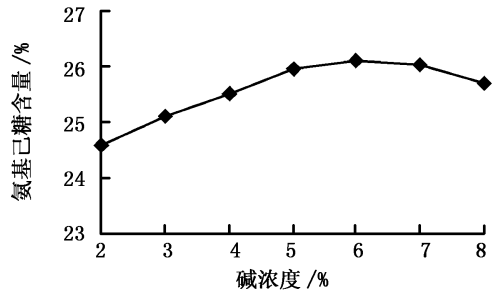


图 2 碱浓度对氨基己糖含量的影响
Fig 2 Effect of alkali concentration on hexosamine content

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 倍量碱液及碱浓度 6% 时进行了碱提温度单因素试验, 其结果如图 3、图 4 所示。

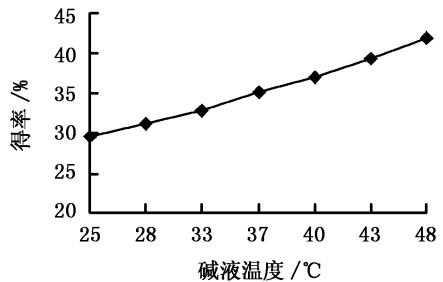


图 3 碱液温度对产品得率的影响
Fig 3 Effect of alkali liquor temperature on yield

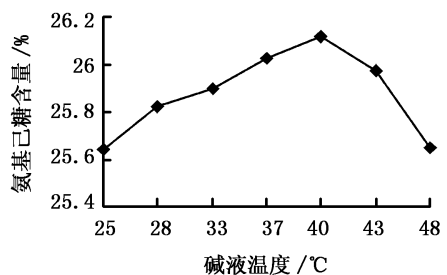


图 4 碱液温度对氨基己糖含量的影响
Fig 4 Effect of alkali liquor temperature on hexosamine content

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℃氨基己糖含量有所下降。而且本试验还发现超过 40℃的产品颜色较深。综合以上因素考虑，碱液温度选取 40℃为宜。

2.1.3 碱液量的影响

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，本研究按碱浓度 6%和碱提温度 40℃进行了不同碱液量的单因素试验，其结果如图 5、图 6 所示。

由图 5、图 6 可以看出：产品得率随碱液量呈先上升后下降的趋势，在 2 倍量的时候达到最高，随后下降。氨基己糖含量随碱液量的升高呈上升趋势，在 2.5 倍量的时候达到最高，随后又下降。综合以上因素考虑，碱液量选取 2 倍量为宜。

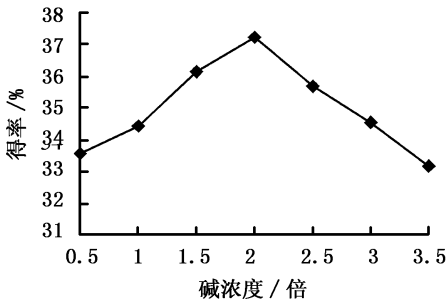


图 5 碱液量对产品得率的影响

Fig 5 Effect of alkali liquor content on yield

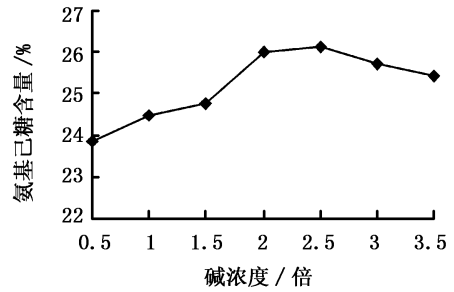


图 6 碱液量对氨基己糖含量的影响

Fig 6 Effect of alkali liquor content on hexosamine content

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 $I_9(3^3)$ 正交表，以得率、氨基己糖含量为指标，进行试验，其结果如表 1 所示。

正交试验结果通过 DPS 软件进行方差分析如表 2、表 3 所示，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，其它因素无显著差异；影响氨基己糖含量的最大因素是碱浓度和碱液量，具有显著差异，分别以碱浓度 6%和碱液量 2 倍提取时氨基己糖含量最高，而温度无显著差异。根据直观分析以及综合考虑，选定碱提取工艺为：碱浓度为 6%，碱液温度为 40℃，碱液量为 2 倍量，与单因素实验有着相似的结果。

表 1 碱提取的正交实验结果

Tab 1 Orthogonal experiment result of extraction technology

组别	A碱液温度 (°C)	B碱液量 (倍)	C碱浓度 (%)	得率 (%)	氨基己糖含量 (%)
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 \bar{K}_1	34.25	36.54	36.63		
\bar{K}_2	36.98	38.14	36.75		
\bar{K}_3	40.24	36.78	38.09		
R	5.99	1.60	1.46		
主次因素	1	2	3		
含量 \bar{K}_1	25.03	25.00	24.57		
\bar{K}_2	25.46	25.40			
\bar{K}_3	25.32	25.86			
R	0.43	0.49	1.29		
主次因素	3	2	1		

表 2 得率方差分析

Tab 2 Variance analysis of yield

因素	SS	df	MS	F	F临界值	显著水平
A	54.022	2	27.011	28.257		<0.05
B	4.491	2	2.250	2.350	5.140	>0.05
C	3.960	2	1.980	2.071		>0.05
误差	62.47	6				

表 3 氨基己糖含量方差分析

Tab 3 Variance analysis of hexosamine content

因素	SS	df	MS	F	F临界值	显著水平
A	0.284	2	0.142	4.392		>0.05
B	0.373	2	0.186	5.767	5.140	<0.05
C	2.550	2	1.275	39.468		<0.05
误差						

2.2 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 40.45%,所制备的样品经委托相关单位检测,结果如表 4 所示,完全符合 WS-C3-0030-

2000(硫酸软骨素口服片)标准的要求,而含氮量则比 WS10001-(HD-0892)-2002(硫酸软骨素注射品)标准稍高。

表 4 鲟鱼硫酸软骨素产品质量测定结果

Tab 4 Quality analysis of the chondroitin sulfate from Amur sturgeon

项目	标准指标		测定结果
	硫酸软骨素口服片	硫酸软骨素注射品	
性状	白色粉末	白色粉末	白色粉末
氨基己糖含量(以干品计)	≥ 24.0%	≥ 30.0%	31.0%
含氮量(以干品计)	2.5%~3.8%	2.5%~3.5%	3.7%
干燥失重	≤ 10%	≤ 10%	9.0%
澄清度	≤ 0.05	≤ 0.040	0.035
pH值	5.5~7.5	6.0~7.0	6.8
重金属	≤ 20×10 ⁻⁶	≤ 20×10 ⁻⁶	符合规定
氯化物	≤ 1.0%	≤ 0.6%	0.5%

2.3 对乳腺癌细胞株(MCF-7细胞)、胃癌细胞株(MG803细胞)、肝癌细胞株(SMMC7721)的抑制作用

通过检测各硫酸软骨素样品不同浓度对 MCF-7、MG803 和 SMMC7721 的抑制率,其结果如图 9、10 和 11 所示,用 F 检验分析可知鲟鱼硫酸软骨素粗品对 3 种细胞的抑制效果 MCF-7 与 MG803 有差异、MG803 与 SMMC7721 有差异、MCF-7 与 SMMC7721 无差异;鲨鱼硫酸软骨素粗品对 3 种细胞的抑制效果 MG803 与 SMMC7721 有差异、其余之间无差异;鲟鱼硫酸软骨素精品和鲨鱼硫酸软骨素精品对 3 株细胞均无差异,MCF-7 和 MG803 细胞对 4 种硫酸软骨

素样品均无差异;SMMC7721 细胞对鲟鱼硫酸软骨素粗品与鲨鱼硫酸软骨素粗品之间有差异、对鲨鱼硫酸软骨素粗品与鲨鱼硫酸软骨素精品之间有差异、其余各组之间无差异。

另外,通过 IC₅₀数值分析,其结果如图 12 所示,鲟鱼硫酸软骨素精品和粗品对 3 种细胞 MCF-7、MG803、SMMC7721 的 IC₅₀分别为 7.28 mg/mL、7.68 mg/mL、4.25 mg/mL 和 8.86 mg/mL、9.27 mg/mL、7.37 mg/mL,对这 3 种肿瘤细胞的抑制效果都是 SMMC7721 > MCF-7 > MG803;鲨鱼硫酸软骨素精品和粗品对 3 种细胞 MCF-7、MG803、SMMC7721 的 IC₅₀分别为 4.53 mg/mL、4.82 mg/mL、3.62 mg/mL 和 6.28 mg/mL、6.73 mg/mL、4.13 mg/mL,对这 3 种肿瘤细胞的

抑制效果同样都是 SMMC7721 > MCF-7 > MGC803 同时从 IC_{50} 数值分析还可以看出四种样品对这 3 株肿瘤细胞的抑制作用顺序是鲨鱼硫酸软骨素精品 > 鲨鱼硫酸软骨素粗品 > 鲟鱼硫酸软骨素精品 > 鲟鱼硫酸软骨素粗品; 鲨鱼硫酸软骨素精品对这 3 株肿瘤细胞的抑制作用最好, 鲨鱼硫酸软骨素粗品和鲟鱼硫酸软骨素精品对这 3 株肿瘤细胞的抑制作用无明显差异。

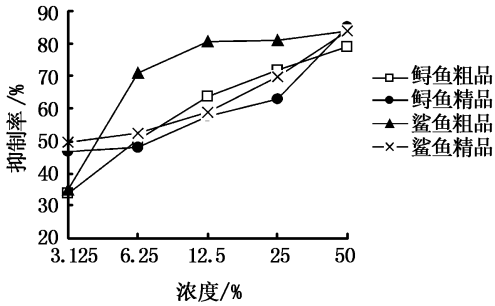


图 7 鲟鱼、鲨鱼硫酸软骨素粗、精制品不同浓度对 MCF-7 乳腺癌细胞生长抑制作用
Fig 7 Inhibiting effects of the pure and crude samples of surgeon chondroitin sulfate and shark chondroitin sulfate in vitro against MCF-7

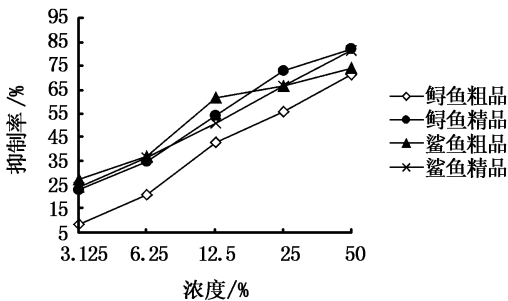


图 8 鲟鱼、鲨鱼硫酸软骨素粗、精制品不同浓度对 MGC-803 胃癌细胞生长抑制作用
Fig 8 Inhibiting effects of the pure and crude samples of surgeon chondroitin sulfate and shark chondroitin sulfate in vitro against MGC803

抗肿瘤试验结果表明鲟鱼硫酸软骨素粗品比鲟鱼硫酸软骨素精品差, 这可能是由于鲟鱼硫酸软骨素粗品中含氮量较高以及含有其它杂质所致, 这有待今后进一步研究。本实验鲟鱼硫酸软骨素粗精品和鲨鱼硫酸软骨素粗精品对 MCF-7、MGC-803、SMMC7721 3 种肿瘤细胞生长都有不同程度的抑制作用。从图 12 中可以看出: 鲟鱼硫酸软骨素粗精品的抑制作用低于鲨鱼硫

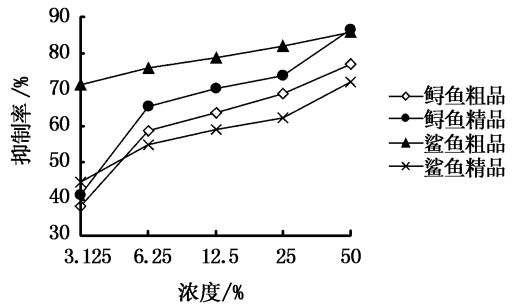


图 9 鲟鱼、鲨鱼硫酸软骨素粗、精制品不同浓度对 SMMC7721 肝癌细胞生长抑制作用
Fig 9 Inhibiting effects of the pure and crude samples of surgeon chondroitin sulfate and shark chondroitin sulfate in vitro against SMMC7721

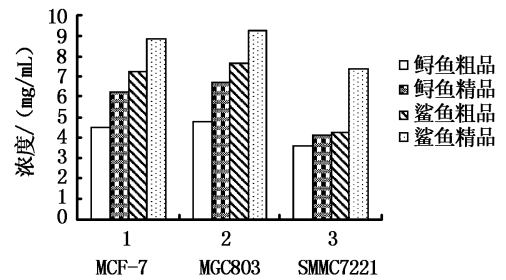


图 10 鲟鱼、鲨鱼硫酸软骨素粗、精制品对不同肿瘤细胞生长抑制作用 IC_{50} 浓度的比较
Fig 10 Comparison of the IC_{50} values of pure and crude surgeon chondroitin sulfate samples against MCF-7 MGC803 SMMC7721

酸软骨素粗精品, 这可能与鲟鱼硫酸软骨素制品的提纯技术有关。下一步我们将完善鲟鱼硫酸软骨素粗精品的制备方法, 提高制品的纯度, 并进行动物体内的抑瘤实验研究。

3 结论

制备鲟鱼硫酸软骨素最佳的碱提取工艺以 2 倍量 6% 的 NaOH 为溶剂, 于 40 °C 的水浴中搅拌提取 4 h 按所研究的最佳碱提工艺条件制备鲟鱼硫酸软骨素其得率可高达 40.45%, 含氮量 3.7%, 氨基己糖含量达 31.0%, 符合 WS-0030-2000 (硫酸软骨素口服片) 标准的要求, 而含氮量则比硫酸软骨素注射品的标准 WS10001-(HD-0892)-2002 要求稍高。

抗肿瘤实验结果表明鲟鱼硫酸软骨素精品和粗品对 3 种细胞乳腺癌细胞株 (MCF-7 细胞)、胃癌细胞株 (MG803 细胞)、肝癌细胞株

(SMMC7721)作用 72 h时 IC_{50} 分别为 7.28 mg/mL、7.68 mg/mL、4.25 mg/mL和 8.86 mg/mL、9.27 mg/mL、7.37 mg/mL,与鲨鱼硫酸软骨素精品和粗品有着相似的抗肿瘤活性,鲟鱼硫酸软骨素精品和鲨鱼硫酸软骨素粗品对这 3株肿瘤细胞的抑制作用无明显差异。

参考文献:

- [1] Karin S, Anna H, K P, Ruth X R, et al. The sulfation pattern of chondroitin sulfate from articular cartilage explants in response to mechanical loading [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2003, 1638: 241-244.
- [2] 韩晓量, 赵培真, 杨方. 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-FG 的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1995, 3(3): 232-235.
- [3] Takenouchi M, Hira Y. Skin cosmetics containing oil in water and natural surfactants and liposome water dispersions [J]. *Fr Dermatol* 1990, (2): 614-617.
- [4] 朱瑞芬, 童兴龙, 李颖. 硫酸软骨素的研制 [J]. *中国医药工业杂志*, 2000, 31(6): 255-256.
- [5] 李南. 硫酸软骨素的开发及质量控制 [J]. *上海水产大学学报*, 1998, 7(1): 38-40.
- [6] 坑彩霞, 邹留河, 洪涛, 等. 角膜保存的研究进展 [M]. *国外医学眼科分册*, 1993, 17(5): 279-284.
- [7] 马淑涛, 张天民. 硫酸软骨素生产工艺探讨 [J]. *中国药理学杂志*, 1993, 2(12): 741-743.
- [8] 钟华. 应用正交试验法选择硫酸软骨素的最佳工艺条件 [J]. *中国生化药物杂志*, 1992, 3: 49-50.
- [9] 高华, 刘坤, 于兹东, 等. 硫酸软骨素生产新工艺研究 [J]. *青岛大学学报*, 2003, 18(4): 55.
- [10] 邹开朗, 邹国林. 硫酸软骨素快速提取法研究 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2000, 22(3): 22.
- [11] 于兹东, 高华, 刘坤. 硫酸软骨素钙制备研究 [J]. *青岛大学学报*, 2003, 18(3): 50-52.
- [12] Nakano T, Ikawa N, Ozimok L. An economical method to extract chondroitin sulfate peptide from bovine nasal cartilage [J]. *Canadian Agriculture Engineering*, 2000, 42(4): 205.
- [13] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T5009.5-2003 食品中蛋白质的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [14] 国家食品药品监督管理局. WS10001-(HD-0892)-2002 硫酸软骨素(供注射用), 含量测定 [S].
- [15] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版公司, 2004, 250-252.
- [16] Wayne K W, Kathleen G, Andrew G B. Determination of chondroitin sulfate in nutritional supplements by liquid chromatography [J]. *Journal of liquid chromatography and relation technology*, 2000, 23(18): 2851-2860.