

同时测定软骨酶解物中硫酸软骨素及透明质酸含量的高效液相色谱法的建立

曹辰辰¹, 郑昕¹, Dongxiao Sun-Waterhouse¹, 丁刘刚^{1,2}, 周勇², 蒋伶俐², 苏国万^{1*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665)

摘要: 为了准确快速同时测定软骨酶解物中硫酸软骨素和透明质酸含量, 以半乳糖胺和葡萄糖胺为测定目标物, 通过优化色谱条件和方法性试验, 建立了一种高效液相色谱的测定方法。使用 ZORBAX C18 柱分离, 用乙腈和乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.00 mL/min, 在波长 250 nm 下测定。方法性试验表明, 硫酸软骨素和透明质酸的质量浓度在 100~500 mg/L 范围与峰面积线性关系良好, 其中硫酸软骨素的检出限为 0.948 mg/L, 重复性偏差 0.089%, 平均回收率 99.71%, 相对偏差 0.35%; 透明质酸的检出限为 0.027 mg/L, 重复性偏差 0.045%, 平均回收率 97.74%, 相对偏差 0.92%。与传统方法相比, 该法具有受杂质干扰影响小, 准确度高, 重复性优异, 回收率以及精确度高的优势, 可以实现准确快速同时测定软骨酶解物中硫酸软骨素和透明质酸的含量。

关键词: 软骨酶解物; 硫酸软骨素; 透明质酸; 高效液相色谱法

文章编号: 1673-9078(2023)05-281-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0707

Establishment of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Chondroitin Sulfate and Hyaluronic Acid in Cartilage Hydrolysate

CAO Chenchen¹, ZHENG Xin¹, Dongxiao Sun-Waterhouse¹, DING Liugang^{1,2}, ZHOU Yong², JIANG Lingli², SU Guowan^{1*}

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510665, China)

Abstract: To accurately and rapidly determine the contents of chondroitin sulfate and hyaluronic acid in cartilage hydrolysate, galactosamine and glucosamine were used as the target substances. A determination method based on high-performance liquid chromatography was developed by optimizing the chromatographic conditions and methodological tests. The ZORBAX C18 column was used for separation, with acetonitrile and ammonium acetate solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1.00 mL/min, and the measurement wavelength was 250 nm. Methodological tests showed that the mass concentration of chondroitin sulfate and hyaluronic acid followed a good linear relationship with the peak area in the range of 100~500 mg/L. The limit of detection of chondroitin sulfate was 0.948 mg/L, its repeatability deviation was 0.089%, average recovery rate was 99.71%, and relative deviation was 0.35%. Meanwhile, the limit of detection of hyaluronic acid was 0.027 mg/L, its repeatability deviation was 0.045%, average recovery rate was 97.74%, and relative deviation was 0.92%. Compared with the conventional method, the proposed method offers the advantages of being less affected by interference from impurities and having high accuracy, excellent repeatability, high recovery rate, and high precision. Using this method, the contents of chondroitin sulfate and hyaluronic acid in cartilage hydrolysate can be detected rapidly and accurately.

引文格式:

曹辰辰, 郑昕, Dongxiao Sun-Waterhouse, 等. 同时测定软骨酶解物中硫酸软骨素及透明质酸含量的高效液相色谱法的建立[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 281-289.

CAO Chenchen, ZHENG Xin, Dongxiao Sun-Waterhouse, et al. Establishment of an HPLC method for simultaneous determination of chondroitin sulfate and hyaluronic acid in cartilage hydrolysate [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 281-289.

收稿日期: 2022-06-02

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2019A1515011952); 广东省科技计划项目 (2020B020226005)

作者简介: 曹辰辰 (1995-), 女, 在读博士, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: feccc5682@mail.scut.edu.cn

通讯作者: 苏国万 (1981-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: fegwsu@scut.edu.cn

Key words: cartilage hydrolysate; chondroitin sulfate; hyaluronic acid; high-performance liquid chromatography

我国作为当今世界上人口最多的国家,对肉类的的需求与日俱增。其中,家禽养殖加工业不仅可生产出高营养价值的肉类,还有诸如骨、血、内脏等大量副产物。通过对副产物进行进一步加工,可获得如骨泥、骨胶、饲料、添加剂等下游产品,能有效提升副产物的利用价值^[1]。软骨作为一种结缔组织在动物体内广泛分布,主要由骨内细胞和细胞间质构成,含有极为丰富的蛋白质、矿物质、胶原蛋白和粘多糖等活性成分,是骨类副产物中加工附加值较高的产品^[2]。因此,对家禽软骨进行精深加工,开发高价值产品,对促进软骨加工产业链的高效、稳定发展意义重大。

当前对软骨的加工与利用主要集中在糖胺聚糖类物质(GAG)以及功能肽类物质的提取与利用。糖胺聚糖又名粘多糖,泛指构成蛋白聚糖的多糖成分,结构复杂,具有极性和负电荷,参与许多生物过程,例如酶调节和细胞黏附、生长、迁移或分化^[3]。由于糖醛酸类型、数量与连接方式的差异,可构成不同类型的糖胺聚糖,包括透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)、硫酸肝素(HS)、硫酸皮肤素(DS)、硫酸角蛋白(KS)和肝素(Hep)等^[4],其中应用较为广泛的糖胺聚糖主要为HA和CS。已有大量研究表明,从各种动物软骨组织中分离得到的GAG具有诸多生理功能,例如降血脂、抗肿瘤、抗炎活性、加速伤口愈合、防皱抗皱等^[5-7],可广泛应用于临床医疗、保健食品、护肤彩妆等行业^[8-10]。

硫酸软骨素是由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基半乳糖以 β -1,4-糖苷键连接而成的重复二糖单位组成的多糖,在动物结缔组织中发挥着极为重要的作用,于2010年被收录于《药典》中,可用于预防及治疗人体内心血管及骨节等疾病,具有抗凝血、抗炎症、修复与保护神经元等生理功能。此外,在食品及化妆品中,还具有改善口感、润滑度、吸湿性等作用^[11,12]。透明质酸是由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖为双糖单位组成的直链高分子多糖,被称为天然保湿因子,越来越广泛应用于医疗、化妆品和制药等行业^[13]。因此,同时测定CS和HA含量的分析方法对于保健食品和药品原料以及成品销售产品的质量控制在必要的。目前测定CS和HA含量的方法主要有显色法^[14-16]、高效液相法^[17-19]、毛细管电泳法^[20-22]等。显色法主要是通过二糖单位在特定条件下和试剂反应生成有色物质或沉淀,继而利用分光光度计测定。此法虽然方便,但由于糖胺聚糖的结构相似度高,且软骨中富含多种粘多糖,专属性差,影响因素多,导致重现性差^[23],

并且试剂具有较强毒性,容易造成安全问题。毛细管电泳法是利用不同物质在电场中移动速度不同从而达到分离效果,但操作繁琐,且实验过程中存在较多干扰因素,基线噪声强,对操作人员实验素质要求高,结果重复性差^[24]。高效液相法主要是将多糖分解后进入色谱柱,利用各组分间极性差异导致吸引力不同这一性质进行分离后再检测。目前已有国标方法(GB/T 20365-2006)测定CS,主要是用液相色谱测定硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的方法,此法对于测定仅含有硫酸软骨素类粘多糖的原料是有效的,但对于测定品中含有其他粘多糖,如透明质酸、肝素等的原料,则存在较大的误差。另外,行标(QB-T 4576-2013)中测定透明质酸的方法仅适用于HA纯度较高的原料。由于软骨酶解物中除了含有大量的CS外,还含有一定量的HA,测定时会有较大干扰。因此,有必要建立可快速准确同时测定软骨酶解物中硫酸软骨素和透明质酸含量的方法。

本研究以软骨酶解物为测试品,利用高效液相色谱仪,通过优化色谱柱柱温、流动相流速等色谱条件建立同时测定软骨酶解物中CS和HA含量的方法,并完成方法学验证,为软骨酶解物中硫酸软骨素和透明质酸纯度鉴定及其在健康食品中应用提供方法保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

软骨酶解物,商品名为软骨提取物,是以鸡胸软骨为原料,经生物酶解、分离、脱色、浓缩、灭菌及喷雾干燥制成的粉末状产品,其蛋白含量63.7%、灰分7.8%、水分5.1%,由广东华肽生物科技有限公司提供。

硫酸软骨素、透明质酸、葡萄糖胺、半乳糖胺、葡萄糖醛酸、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、乙腈、三氯甲烷均为色谱级,购自美国Sigma公司;其余试剂为分析纯,购自广州化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;Waters 600 高效液相色谱仪,美国Waters公司;Ultimate 3000 高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酸水解鸡胸软骨酶解物

精密称取 100.00 mg 鸡胸软骨酶解物样品置于 10 mL 安瓿瓶中,加入 1 mL 的 2 mol/L 盐酸溶液,混匀后,酒精灯封管,置于烘箱中 121 °C 下分别水解 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,取出冷却后,将安瓿瓶中溶液转移至 10 mL 容量瓶中,用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0,用超纯水定容,于 -20 °C 保存备用。

1.3.2 混合标准溶液配制

分别取 50 mg 硫酸软骨素和透明质酸标品于 10 mL 安瓿瓶中,加入 1 mL 浓度为 2 mol/L 的盐酸溶液,混匀封管,按照 1.3.1 样品进行酸解, -20 °C 下保存备用。

1.3.3 PMP 衍生化^[25]

分别取样品和混合标准品溶液 400 μ L 置于 5 mL 具塞试管中,依次加入 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液 400 μ L, 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 400 μ L,混匀,于 70 °C 水浴反应 100 min。反应结束后,分别加入 0.3 mol/L 盐酸溶液 500 μ L 调节 pH 至中性,震荡摇匀,冷却至室温,加入 1 mL 三氯甲烷,涡旋均匀,以 9 000 r/min 离心 5 min,弃去三氯甲烷层,收集上清液,重复以上操作 5 次,最后取上清液过 0.45 μ m 水系膜, -20 °C 保存备用。

1.3.4 色谱条件的探究

1.3.4.1 色谱柱选择

C18 柱又称反向色谱柱,作为长链烷基键合相,具有较高碳含量,疏水性良好,常用于生物大分子分离。分别选取 Kromasil 100-5-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), Agilent ZORBAX SB-C18 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 和 Agilent Eclipse XDB-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 三种作为待筛选色谱柱。

1.3.4.2 流动相

分别选择乙腈-乙酸铵、乙腈-水、乙腈-磷酸盐、乙腈-甲醇和乙腈-甲醇-磷酸盐五种作为流动相,探究不同流动相的分离效果。

1.3.4.3 流动相配比

根据 1.3.4.2 中选择的流动相,研究流动性中不同溶液最佳洗脱浓度配比。预实验发现所有流动相 30 min 内均出峰完毕,故在 30 min 内不断改变乙腈浓度,根据峰形效果来确定洗脱浓度配比。A 为乙腈,0~10 min 时 A 为 20%; 10~20 min 时, A 由 20% 升至 80%; 20~25 min 时, A 由 80% 升至 90%; 25~27 min 时, A 由 90% 降至 20%, 保持 5 min。

1.3.4.4 流速的优化

分别探究 0.6、0.8 和 1.0 mL/min 三种不同流速对分离效果的影响。

1.3.4.5 色谱柱柱温的优化

分别在色谱柱的柱温为 25、30、35、40 °C 时进行检测,比较不同柱温下分离效果。

1.3.4.6 检测波长的优化

经过酸水解后,CS 被分解为葡萄糖醛酸和 N-乙酰半乳糖胺,HA 则被分解为 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖胺。而其中的 N-乙酰半乳糖胺和 N-乙酰葡萄糖胺两个单糖分离度差,因此半乳糖胺和葡萄糖胺正是同时测定 CS 和 HA 的关键。用紫外可见光检测器在 200~500 nm 进行波长扫描,以确定 CS 中 N-乙酰半乳糖胺和 HA 中 N-乙酰葡萄糖胺最大吸收峰的波长。

1.3.5 方法性试验

依据美国 FDA 关于生物制品方法验证的指导原则,主要包括以下几个方面的测定。

1.3.5.1 系统性试验测定

色谱系统性试验通常包括理论塔板数、分离度和拖尾因子三个指标,主要是对分析方法和该色谱条件下的色谱系统适用性进行考察,是对整个系统进行评估的指标。取 1.3.3 中衍生后所得的混合标准品溶液按优化后的色谱条件测定,并计算理论塔板数、分离度及拖尾因子。

1.3.5.2 标准曲线测定

精密称取 25 mg 经 105 °C 干燥 4 h 的硫酸软骨素标准品,加入 200 μ L 乙腈,涡旋使其分散均匀,加 35 mL 超纯水,室温超声溶解后,用超纯水定容至 50 mL, -20 °C 保存,作为储备液。

取适量储备液,加入超纯水配制成 100、150、200、250、300、400、500 mg/L 的标准工作溶液,进行酸解和衍生后,0.45 μ m 有机系滤膜过滤,并将滤液转至液相小瓶中,采用优化后的色谱条件测定,以峰面积对浓度绘制回归曲线。

1.3.5.3 重复性试验

同一操作人员、同一时间段、相同仪器,对该样品进行 6 次平行测定,检验该方法的重复性。

1.3.5.4 中间精密度试验

分别由不同人员、不同时间按优化的色谱方法对该样品溶液中 CS 和 HA 进行含量测定。

1.3.5.5 稳定性试验

取 1.3.3 项中酸解衍生后的样品溶液,分别于 0、2、6、12 h 进样 10 μ L,比较不同时间样品的峰面积及相对标准偏差 RSD。

1.3.5.6 专属性试验

以超纯水作为空白试剂,已知 CS 和 HA 含量的混合标品溶液作为阳性样品,通过测定空白试剂、空白试剂加 CS/HA 标品、样品、样品加 CS/HA 标品做

专属性实验。

1.3.5.7 回收率试验

精密称取已知含量的 CS 和 HA 样品分别进行低、中、高三个浓度水平加标,每个水平浓度做 3 次平行,依据重复性试验结果作为样品均值含量计算回收率。

1.3.5.8 检出限和定量限

(1) 检出限 (LOD)

利用校准曲线参数进行评估,按照下列公式计算:

$$LOD = 3.3\delta / S \quad (1)$$

式中:

LOD——检出限,

δ ——响应值偏差,即测定空白值的标准偏差;

S——标准曲线斜率。

(2) 定量限 (LOQ)

基于响应值偏差和标准曲线斜率计算定量限,按照下列公式计算:

$$LOQ = 10\delta / S \quad (2)$$

式中:

LOQ——定量限;

δ ——响应值偏差,即测定空白值的标准偏差;

S——标准曲线斜率。

1.4 数据统计分析

数据采用 SPSS 23.0 进行相关数据的方差分析和显著性检验,每组实验重复 3 次取平均值,采用 Origin 2021 制图。

2 结果与讨论

2.1 水解时间的优化

盐酸能将 CS 分解为葡萄糖醛酸和 N-乙酰半乳糖胺,HA 则被盐酸分解为 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖胺,而酸解程度不同会直接影响水解体系中各单糖的

浓度。实验中发现软骨酶解物样品中 CS 和 HA 的含量随酸解时间的增长呈现先上升后下降的趋势,在 1.5 h 峰面积达到峰值,因此选择最佳水解时间为 1.5 h,这与黄芳等^[13]在测定面膜化妆品中透明质酸的研究中水解条件的选择结果一致。酸水解位点通常在于氨基酸和糖醛酸之间 β 1-4 糖苷键,这是因为 β 1-3 糖苷键比 β 1-4 糖苷键更加稳定,据相关报道^[26],酸水解位点和软骨裂解酶的位点相同。据祝贺报道^[27],多糖在酸解过程中,首先断裂多糖的 β 1-4 糖苷键并生成二糖(还原端为糖醛酸),第二阶段二糖受高温强酸作用进一步水解为氨基糖和糖醛酸,最后其他剩余的二糖相继水解。经过酸水解后,CS 将分解为 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰半乳糖胺,HA 则分解为 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖胺。在前期实验中,发现软骨酶解物酸解后的半乳糖胺和葡萄糖胺单糖分离度差,而这两种单糖正是鉴定 CS 和 HA 的关键。因此,后续的高效液相色谱条件优化以分离半乳糖胺和葡萄糖胺为方向。

2.2 色谱条件的建立

2.2.1 色谱柱的选择

C18 柱常用于生物大分子分离,其中 XDB 柱选择性范围比较广,pH 值在 2~9 范围内均有很高的性能,对酸性、碱性和中性化合物都具有很好的峰型。而 SB-C18 柱适合分析碱性、酸性和中性化合物,特别适合低 pH 值的化合物,高温条件下也比较稳定,可使用甲酸、乙酸或三氟乙酸的流动相,如使用含三氟乙酸的流动相分离蛋白质和肽。鉴于软骨酶解物中含有肽和多糖物质,根据不同文献报道的用高效液相法测定 CS 和 HA 含量的方法^[25,28,29],各色谱柱分离度如表 1 所示,结果表明,使用 Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱可将半乳糖胺和葡萄糖胺较好分离,色谱峰峰形尖锐,因此使用该色谱柱进行后续的实验。

表 1 不同色谱柱分离度结果

Table 1 The result of different column resolution

色谱柱	硫酸软骨素峰分离度	透明质酸峰分离度
Agilent ZORBAX SB-C18	5.17	2.33
Kromasil 100-5-C18	4.23	2.47
Agilent Eclipse XDB-C18	4.56	3.81

2.2.2 流动相的选择

实验分别探究了乙腈-乙酸铵、乙腈-水、乙腈-磷酸盐、乙腈-甲醇和乙腈-甲醇-磷酸盐等不同流动相对样品的分离程度影响,结果表明含甲醇的流动体系对于多糖分离效果较差,多糖峰分离度低且峰形不好。乙腈-水体系只出现一个峰,没有达到分离出不同单糖

的效果,乙腈-磷酸盐流动相体系峰形拖尾严重。而乙腈-乙酸铵体系分离较好,能成功分离出两个不同的单糖,这与 Biskup 等^[30]在测定 CS 含量时使用的流动相一致。此外,张莉等^[31]在探究眼用粘弹剂中 HA 和 CS 的含量中使用磷酸盐作为流动相,成功分离出两个峰且峰型对称,这与其样品中辅料有关,使用磷酸盐可

以减少谱图中的溶剂峰。

2.2.3 流动相配比及流速

根据 2.1.2 的结果选取乙腈-乙酸铵作为流动相，探讨不同比例乙酸铵对分离效果的影响。实验表明乙酸铵为 0.025 mol/L 时，半乳糖胺、葡萄糖胺、乙酰葡萄糖胺分离效果较好。流动相比例通过反复实验，最终确定洗脱顺序按照以下梯度：A 为乙腈，0~10 min 时 A 为 20%；10~20 min 时，A 由 20% 升至 80%；20~25 min 时，A 由 80% 升至 90%；25~27 min 时，A 由 90% 降至 20%，保持 5 min，这与前人研究结果一致^[13]。确定配比后，继续探究 0.6 mL/min，0.8 mL/min，1.0 mL/min 三种不同的流速对分离效果的影响，结果表明当流速为 1.0 mL/min 时，峰分离效果好，无拖尾和前移现象，峰形良好。

2.2.4 柱温、检测波长的选择

分别在 25、30、35、40 °C 不同柱温下进行测定，发现当柱温为 40 °C 时单糖分离度较好，色谱峰峰形尖锐。对 CS 标准品和 HA 标准品预混剂用紫外可见光检测器在 200~500 nm 进行波长扫描，结果表明在 250 nm 处吸收值最大，杂峰较少，且基线平稳，故采取 250 nm 为液相检测紫外波长。CS 和 HA 均为多糖物质，由于糖类物质极性大，缺乏光学吸收基团，无法满足高灵敏度分析手段的检测要求，而衍生化可使糖链带上紫外或荧光基团，能够在高灵敏度光学检测下同时使离子化效率提高^[25]，从而在特定波长产生吸收峰。

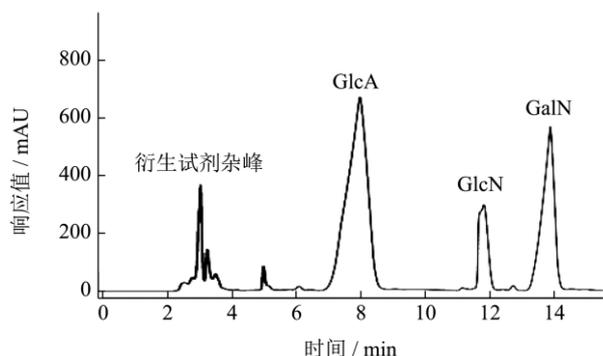


图 1 鸡胸软骨酶解物色图谱

Fig.1 Chromatogram of enzymatic hydrolysate of chicken breast cartilage

综上所述，优化后的色谱条件为：以 Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为分离柱；流速 1.00 mL/min；测定波长 250 nm；进样体积 10 μL。流动相：A 为乙腈，B 为 0.025 mol/L 乙酸铵溶液。梯度洗脱程序：0~10 min 时，A 为 20%；10~20 min 时，A 由 20% 升至 80%；20~25 min 时，A 由 80% 升至 90%；25~27 min 时，A 由 90% 降至 20%，

保持 5 min。最终的样品色谱图如图 1 所示，GlcA 代表葡萄糖醛酸，GlcN 代表葡萄糖胺，GalN 代表半乳糖胺，图中 CS 和 HA 对应的特征峰形尖锐无拖尾，且分离良好。

2.3 系统性实验结果

理论塔板数，分离度和拖尾因子结果如表 2 所示，两种糖的理论塔板数较高，表明色谱柱的效率高；分离度均大于 1.5，表明两个峰完全分离；拖尾因子分别为 1.02 和 1.03，符合《中国药典》中对于峰高法定量时拖尾因子的规定（范围：0.95~1.05）。说明该液相色谱条件能准确清晰的将半乳糖胺和葡萄糖胺分离，且峰形良好。

表 2 系统性实验结果

Table 2 Systematic experimental results of the liquid phase

method			
种类	理论塔板数	分离度	拖尾因子
半乳糖胺	14591	5.17	1.02
葡萄糖胺	17113	2.33	1.03

2.4 标准曲线

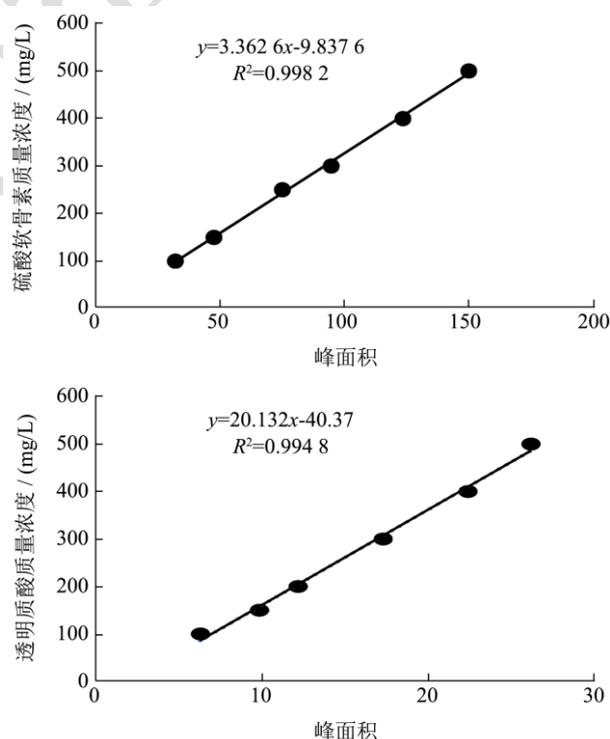


图 2 硫酸软骨素和透明质酸标准曲线

Fig.2 Standard curves of chondroitin sulfate and hyaluronic acid

以峰面积为横坐标 (X)，含量为纵坐标 (Y)，进行线性回归分析，结果如图 2 所示。CS 的线性回归方程为 $y=3.3626x-9.8376$ ，相关系数为 0.9982，HA

的线性回归方程为 $y=20.132x-40.37$ ，相关系数为 0.994 8，线性回归关系良好，说明 CS 和 HA 酸解后的单峰液相峰面积与标品浓度均成正比，可通过该标准曲线对鸡胸软骨酶解物中 CS 和 HA 进行定量测定。

2.5 重复性实验

重复性试验结果如表 3 所示，样品中 CS 和 HA

的测定重复性试验结果均值分别为 30.07% 和 5.04%，RSD 分别为 0.089% 和 0.045%，均小于 1.5%，表明测定系统和方法重复性良好，符合方法要求。相比之下，传统的吡唑法在显色反应过程中对实验温度和反应时间要求较高，反复连续两次的沸水浴和冰浴的实验要求使得该方法的重复性较差^[32]。

表 3 重复性实验测定结果

Table 3 The test results of repeatability

测定目标	测定次数	称样量/g	定容体积/mL	测定浓度/(mg/L)	含量/%	含量均值/%	RSD/%
硫酸软骨素	1	0.150 3	50.00	87.75	30.06	30.07	0.089
	2	0.149 8	50.00	86.88	29.96		
	3	0.150 4	50.00	87.23	30.08		
	4	0.150 6	50.00	87.46	30.12		
	5	0.151 0	50.00	89.36	30.20		
	6	0.150 2	50.00	87.75	30.06		
透明质酸	1	0.490 3	50.00	197.12	4.97	5.04	0.045
	2	0.498 4	50.00	198.35	5.03		
	3	0.504 3	50.00	199.57	5.05		
	4	0.506 4	50.00	199.35	5.08		
	5	0.510 2	50.00	200.54	5.09		

表 4 精密度与回收率结果

Table 4 Test results of the precision and recovery rate

检测项目	加标量/(mg/mL)	样品量/(mg/mL)	测定量/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	
硫酸软骨素	0.5	0.062 4	0.553 214 1	98.16	98.19	0.19	
	0.5	0.062 4	0.554 343 5	98.39			
	0.5	0.062 4	0.552 445 1	98.01			
	透明质酸	1	0.062 4	1.057 232	99.48	98.10	1.08
		1	0.062 4	1.063 235	100.08		
		1	0.062 4	1.053 425	99.10		
		1.5	0.062 4	1.559 572 3	99.81		
		1.5	0.062 4	1.565 351 7	100.20		
		1.5	0.062 4	1.554 125 2	99.45		
透明质酸	0.5	0.060 8	0.554 562 5	98.75	98.94	1.40	
	0.5	0.060 8	0.548 742 4	97.59			
	0.5	0.060 8	0.563 273 4	100.49			
	透明质酸	1	0.060 8	0.956 424 4	97.56	96.19	0.28
		1	0.060 8	1.034 673 5	97.39		
		1	0.060 8	1.054 254 9	99.35		
		1.5	0.060 8	1.498 623 6	95.85		
		1.5	0.060 8	1.506 366 3	96.37		
		1.5	0.060 8	1.505 861 3	96.34		

2.6 精密度与回收率

对软骨酶解物样品进行精密度试验和加标回收率

试验，计算得到的平均回收率和相对标准偏差如表 4 所示，分别对低 (0.5 mg/L)、中 (1.0 mg/L)、高 (1.5 mg/L) 三个浓度水平加标回收率试验，其中 CS

的回收率范围为 98.16%~100.20%，RSD 范围为 0.19%~0.49%；HA 的回收率范围为 95.85%~100.49%，RSD 范围为 0.28%~1.40%，均小于 1.5%，符合方法要求且精密度良好，表明高效液相色谱法较传统的 Elson-Morgan 法和咔唑法对样品检测更加准确。Elson-Morgan 法和咔唑法测定样品中硫酸软骨素含量偏高，原因可能是 Elson-Morgan 法和咔唑法均是多糖中特定单糖和试剂结合产生颜色^[33]，而鸡胸软骨酶解物样品中除了硫酸软骨素外，还含有木糖等其他中性糖以及透明质酸等多糖，Elson-Morgan 法中性糖对结果影响较明显^[34]。而咔唑法中透明质酸中的糖醛酸和硫酸软骨素中的糖醛酸一样会和咔唑试剂结合，这些

类似物质会产生干扰，导致结果偏大^[35]。据报道，咔唑法中硼酸试剂会和糖醛酸生成糠醛，继而与咔唑试剂反应，其中溶液中存在的盐以及磷酸缓冲液会使得整体值偏高^[36]。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液，4℃条件下放置 8 h，分别于 2、6、12 h 进样，记录色谱图，观察主峰的峰面积变化情况，计算 RSD 值。结果如表 5 所示，同一样品不同进样时间，CS 特征峰面积 RSD 为 1.49%，HA 特征峰面积 RSD 为 1.23%，说明该液相方法稳定性良好，样品进样时间对结果准确度影响不大。

表 5 稳定性试验测定结果

Table 5 The test results of the stability on the method

检测项目	峰面积/AU			均值/AU	RSD/%
	2 h	6 h	12 h		
硫酸软骨素	149.735 3	150.525 1	152.627 1	150.962 5	1.49
透明质酸	26.151 5	28.546 6	26.869 6	27.189 2	1.23

2.8 专属性试验

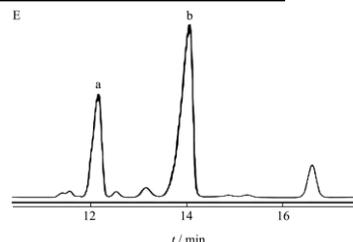
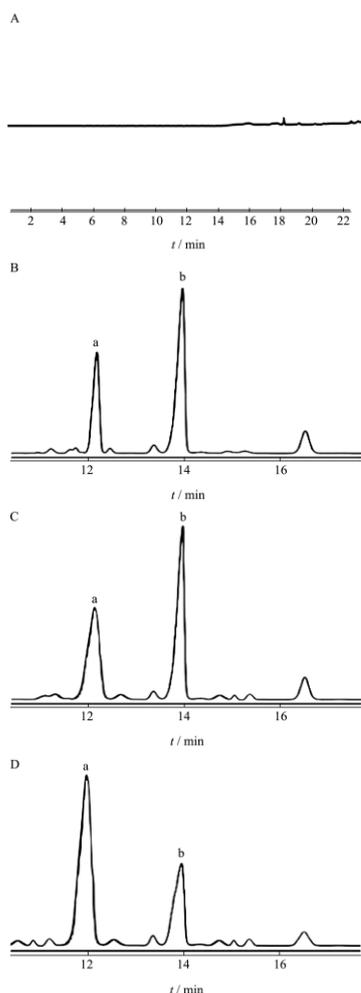


图 3 专属性实验测定结果

Fig.3 The test results of the specificity on the method

注：a 表示葡萄糖胺峰，由透明质酸酸解后得到；b 表示硫酸软骨素酸解后的半乳糖胺特征峰。A 空白试剂；B 透明质酸标品+硫酸软骨素标品；C 鸡胸软骨酶解物样品+硫酸软骨素；D 鸡胸软骨酶解物样品+透明质酸；E 鸡胸软骨酶解物样品。

专属性实验是指在可能存在其他成分下，采用的方法能正确测定出被测物的特性，专属性强特指被测物的特性明显。结果如图 5 所示，CS 和 HA 标品加标分别与鸡软骨酶解物样品加标出峰与目标物保留时间一致，且图 5A 中表明空白试剂在目标物保留时间附近无干扰，专属性符合方法要求。

2.9 定量限与检出限

现代检测分析方法检出限 (LOD) 通常分为方法检出限 (MDL) 和仪器检出限 (IDL)。MDL 指能在可靠范围内将分析物测定信号区别于特定基体背景 (噪音) 的最低浓度或量。作为仪器性能评价指标之一的 IDL，是指能在一定置信度范围内，仪器能将目标物与设备背景相区分开或可靠检测的最低检测量因

此能评价仪器对分析物的检出能力,仪器灵敏度越高,仪器噪音越低,IDL就越低。定量限(LOQ)可分为方法定量限(MQL)和仪器定量限(IQL)两个部分。对标准曲线最低点浓度 100 mg/L 平行测定 10 次,评估检测限与定量限,结果见表 6,CS 和 HA 的 IDL 分别为 0.948 和 0.027 mg/L,MDL 分别为 0.191% 和 0.005%,IQL 分别为 3.160 和 0.090 mg/L,MQL 分别为 0.632% 和 0.018%。

表 6 检出限和定量限测定结果

Table 6 Test results of the limit of detection and Limit of quantification

测定次数	硫酸软骨素 响应值	透明质酸 响应值
1	32.358 9	6.254 5
2	31.235 6	6.305 3
3	32.634 3	6.264 3
4	33.254 3	6.765 5
5	32.524 5	6.223 3
6	31.952 2	6.445 3
7	34.354 2	6.649 4
8	32.653 2	6.239 4
9	33.325 6	6.252 3
10	30.342 4	6.473 3
平均值	32.463 5	6.387 3
标准偏差 δ	1.062 6	0.181 4
δ/S	0.316	0.009
仪器检出限(3.3 δ/S)(mg/L)	0.948	0.027
仪器定量限(10 δ/S)(mg/L)	3.160	0.090
方法检出限/%	0.191	0.005
方法定量限/%	0.632	0.018

3 结论

通过对色谱柱和流动相的筛选,以及色谱柱温、流动相流速、配比和检测波长等条件的优化,得出最佳高效液相色谱条件为:Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱,进样体积 10.0 μ L,流速 1.00 mL/min,测定波长 250 nm,柱温 40 $^{\circ}$ C,流动相:A 为乙腈,B 为 0.025 mol/L 乙酸铵溶液。梯度洗脱程序:0~10 min 时,A 为 20%;10~20 min 时,A 由 20%升至 80%;20~25 min 时,A 由 80%升至 90%;25~27 min 时,A 由 90%降至 20%,保持 5 min。硫酸软骨素和透明质酸在 100~500 mg/L 范围内线性关系均为良好,该法重复性好,定量结果准确,稳定性好回收率高,方法性试验验证了同时测定软骨酶解物中硫酸软骨素和透明质酸含量方法的成功建立。此外,

前处理方法较为简单,样品易批量检测,操作较为安全,在实际生产中可以满足快速检测的要求。

参考文献

- [1] 孙蓓,王龙刚. 畜禽骨的综合利用现状及发展前景[J]. 中国调味品,2011,36(4):1-4.
- [2] Gold G E, Mc Cauley T R, Gray M L, et al. Special focus session - What's new in cartilage? [J]. Radiographics, 2003, 23(5): 1227-1242.
- [3] Zhao T, Song X, Tan X, et al. Development of a rapid method for simultaneous separation of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparin by capillary electrophoresis [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 141: 197-203.
- [4] Talmoudi N, Ghariani N, Sadok S. Glycosaminoglycans from Co-products of <<Scylliorhinus canicula>>: extraction and purification in reference to the European pharmacopoeia requirement [J]. Biological Procedures Online, 2020, 22(1).
- [5] Reginster J-Y, Dudler J, Blicharski T, et al. Pharmaceutical-grade chondroitin sulfate is as effective as celecoxib and superior to placebo in symptomatic knee osteoarthritis: the chondroitin versus celecoxib versus placebo trial (concept) [J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2017, 76(9): 1537-1543.
- [6] Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 61(10): 1271-1280.
- [7] 张天民,凌沛学.硫酸软骨素的过去、现在和将来[J].食品与药品,2010,12(1):1-3.
- [8] Whitmore E K, Martin D, Guvench O. Constructing 3-dimensional atomic-resolution models of nonsulfated glycosaminoglycans with arbitrary lengths using conformations from molecular dynamics [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(20): 1-41.
- [9] Malavaki C J, Asimakopoulou A P, Lamari F N, et al. Capillary electrophoresis for the quality control of chondroitin sulfates in raw materials and formulations [J]. Analytical Biochemistry, 2008, 374(1): 213-220.
- [10] Mirzayeva T, Copikova J, Kvasnicka F, et al. Screening of the chemical composition and identification of hyaluronic acid in food supplements by fractionation and fourier-transform infrared spectroscopy [J]. Polymers, 2021, 13(22): 4002.
- [11] Schiraldi C, Cimini D, De Rosa M. Production of chondroitin sulfate and chondroitin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4): 1209-1220.

- [12] Li H, Zhang P, Luo J, et al. Chondroitin sulfate-linked prodrug nanoparticles target the golgi apparatus for cancer metastasis treatment [J]. *Acs Nano*, 2019, 13(8): 9386-9396.
- [13] 黄芳,邓欣,王玉芹,等.酸水解-柱前衍生化-高效液相色谱法测定面膜化妆品中透明质酸[J].*理化检验(化学分册)*, 2019,55(8):898-903.
- [14] 陆钊,杨亚楠.吡啶分光光度法测定猪硫酸软骨素含量[J].*安徽农业科学*,2008,36(33):14368-14371.
- [15] 田甲春.硫酸软骨素提取工艺的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2010.
- [16] Pospichal R, Nesmerak K, Rychlovsky P, et al. Determination of chondroitin sulfate by thiazine dyes using flow injection analysis with spectrophotometric detection [J]. *Analytical Letters*, 2007, 40(6): 1167-1175.
- [17] Brunelle S L. Determination of chondroitin sulfate content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with in detection after enzymatic hydrolysis: single-laboratory validation first action [J]. *Journal of Aoac International*, 2016, 99(1): 53-64.
- [18] Volpi N, Galeotti F, Yang B, et al. Analysis of glycosaminoglycan-derived, precolumn, 2-aminoacridone-labeled disaccharides with LC-fluorescence and LC-MS detection [J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(3): 541-558.
- [19] Schroeder A, Nazet U, Muschter D, et al. Impact of mechanical load on the expression profile of synovial fibroblasts from patients with and without osteoarthritis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3): 585.
- [20] Fayad S, Nehme R, Langmajerova M, et al. Hyaluronidase reaction kinetics evaluated by capillary electrophoresis with UV and high-resolution mass spectrometry (HRMS) detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 951: 140-150.
- [21] Chindaphan K, Wongravee K, Nhujak T, et al. Online preconcentration and determination of chondroitin sulfate, dermatan sulfate and hyaluronic acid in biological and cosmetic samples using capillary electrophoresis [J]. *Journal of Separation Science*, 2019, 42(17): 2867-2874.
- [22] Antonio Vazquez J, Fraguas J, Novoa-Carvallal R, et al. Isolation and chemical characterization of chondroitin sulfate from cartilage by-products of blackmouth catshark (*Galeus melastomus*) [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(10): 1-15.
- [23] Liu X, Li L, Zhao T, et al. Determination of chondroitin sulfate in tablets by Raman spectroscopy and near-infrared spectroscopy combined with chemometric methods [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(12): 4219-4227.
- [24] Liu X, Sun C, Zang H, et al. Capillary electrophoresis for simultaneous analysis of heparin, chondroitin sulfate and hyaluronic acid and its application in preparations and synovial fluid [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2012, 50(5): 373-379.
- [25] Wang K, Bai F, Zhou X, et al. Characterization of chondroitin sulfates isolated from large hybrid sturgeon cartilage and their gastroprotective activity against ethanol-induced gastric ulcers [J]. *Food Chemistry*, 2021, 363: 130436.
- [26] Kim S B, Ji C I, Woo J W, et al. Simplified purification of chondroitin sulphate from scapular cartilage of shortfin mako shark (*Isurus oxyrinchus*) [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2012, 47(1): 91-99.
- [27] 祝贺.高效液相色谱鉴别糖胺聚糖种类方法的建立及其应用[D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [28] 任丽萍,侯美曼,宋玉娟,等.硫酸软骨素注射剂质量状况评价与研究[J].*中国药学杂志*,2020,55(19):1634-1638.
- [29] 李益.以酸性缓冲体系作稳定剂的口服胰岛素微球的构建及对糖尿病大鼠的药效学[D].天津:天津大学,2017.
- [30] Biskup K, Stellmach C, Braicu E I, et al. Chondroitin sulfate disaccharides, a serum marker for primary serous epithelial ovarian cancer [J]. *Diagnostics*, 2021, 11(7): 1107-1143.
- [31] 张莉,赵鹏,何涛,等.高效凝胶色谱法同时测定眼用粘弹剂中透明质酸钠和硫酸软骨素钠的含量[J].*理化检验(化学分册)*,2018,54(3):260-263.
- [32] Gavva C, Patel K, Kudre T, et al. Glycosaminoglycans from fresh water fish processing discard - Isolation, structural characterization, and osteogenic activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 558-567.
- [33] Kim Y M, Lee S E, Park B S, et al. Proteomic analysis on acetate metabolism in *Citrobacter* sp. BL-4 [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2012, 8(1): 66-78.
- [34] 杨海霞,刘燕,刘彩霞,等.硫酸软骨素检测方法研究进展[J].*中国生化药物杂志*,2009,30(1):58-60.
- [35] 李敏,侯增淼,李晓颖,等.改良吡啶法测定重组人溶菌酶滴眼液中透明质酸钠的含量[J].*化学分析计量*,2019,28(1):95-98.
- [36] Frazier S B, Roodhouse K A, Hourcade D E, et al. The quantification of glycosaminoglycans: A comparison of HPLC, carbazole, and alcian blue methods [J]. *Open glycoscience*, 2008, 1: 31-39.