

液相色谱法测定保健食品中硫酸软骨素的含量

陈彩云*, 蔡伟江, 陈宏壁, 林贤邦
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立一种快速、简便测定保健食品中硫酸软骨素的液相色谱方法, 并进行方法学研究。 **方法** 样品经过前处理, 以乙腈和0.005 mol/L 戊烷磺酸钠溶液为流动相, 等度洗脱, 经 Diamonsil C₁₈ 柱分离, 于192 nm 波长检测。 **结果** 用本方法进行检测, 能很好地分离硫酸软骨素, 在浓度 0.008 mg/mL~0.04 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, 方法的相关系数可达 1.000, 平均回收率在 98.5%~100.0%之间, 相对标准偏差为 0.6%。 **结论** 采用该方法能测定保健食品中硫酸软骨素, 耗时短、操作简便、准确、重现性好, 分离效果明显, 可在实验室推广。 **关键词:** 高效液相色谱法; 保健食品; 硫酸软骨素; 含量测定

Determination of chondroitin sulfate in health food by high performance liquid chromatography

CHEN Cai-Yun*, CAI Wei-Jiang, CHEN Hong-Bi, LIN Xian-Bang
(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To investigate a quick and simple method for determination of chondroitin sulfate in health foods by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were treated using 0.005 mol/L pentane solution of sodium-acetonitrile as mobile phase with isocratic elution, separated on diamonsil C₁₈ column, and detected at 192 nm wavelength. **Results** Chondroitin sulfate could be separated well by this method. It had a good linear relationship within 0.008~0.04 mg/mL ($r=1.000$), the average recoveries was 98.5%~100.0%, and the RSD was 0.6%. **Conclusion** The method can be used for determination of chondroitin sulfate in health foods, it is quick, simple and accurate, and has a good reproducibility and clear separation, which can be popularized in the laboratory.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; health foods; chondroitin sulfate; determination

1 引言

硫酸软骨素是共价连接在蛋白质上形成蛋白聚糖的一类糖胺聚糖。硫酸软骨素存在于从线虫到人除植物外的所有生物中, 发挥着许多重要的生理功能。虽然多糖的主链结构并不复杂, 但就硫酸化程度、硫酸基和两种差向异构糖醛酸在链内的分布来说, 呈现高度的不均一性。硫酸软骨素的精细结构决定着功

能的特异性和与多种蛋白质分子的相互作用。硫酸软骨素是一种天然酸性黏多糖, 主要是从猪、牛或鲨鱼等软骨提取, 作为药品或保健品, 主要用于治疗神经性头痛、心绞痛、冠心病, 以及骨关节疾病的治疗等^[1]。硫酸软骨素的测定方法主要有: 分光光度法^[2,3], 间接离子吸收法^[4]和液相色谱法, 而色谱法分别有离子色谱法^[5]和反相色谱法^[6-10], 分光光度法测定其含量时, 样品需水解、显色, 实验时间长, 过程复杂, 结

*通讯作者: 陈彩云, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 504990659@qq.com

*Corresponding author: CHEN Cai-Yun, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 504990659@qq.com

果不够理想;间接离子吸收法是利用硫酸软骨素完全水解释放出等摩尔的硫酸根,钡离子过量定量,用离子吸收法直接测定过量的钡含量,求算总硫酸根与游离硫酸根,得出有机硫酸根,间接换算出硫酸软骨素的含量,该方法重复性差,操作较繁琐,费时;离子色谱法,该方法准确率和回收率都较高,但操作繁琐、费时,干扰因素多,重复性差,出峰拖尾严重;反相色谱法是利用组分峰面积或峰高与对照品进行比较,缺点是分辨率较差,杂质容易产生干扰。但每种方法各有其优点和缺点,而本文主要针对保健食品,以简便、便宜、快速、精确、安全、稳定、重复性好为目的,通过优化其前处理的方法,采用高效液相色谱法进行分离,达到短时间的检测效果。

从以上对各种方法的总结我们可以发现,不同方法有其自身的优缺点,在实际测定中应该根据实际条件和对结果的要求不同选择不同的方法。不同来源,不同生产工艺的硫酸软骨素在含量和结构方面都不相同,而目前文献报道的硫酸软骨素的产率和纯度差别很大,随着全球市场硫酸软骨素需求量的增大,硫酸软骨素在保健品和临床中的应用越来越广泛,不同的产品硫酸软骨素含量也有差别,也需要对产品进行含量鉴定,所以硫酸软骨素含量测定方法不论在生产过程还是产品的质量控制在过程中的作用也越来越重要。因此研究简便、便宜、快速、精确、安全、稳定、重复性好的方法依然是未来发展的趋势。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(安捷伦 1260, 紫外检测器);超声波清洗器(EQ-500, 昆山市超声仪器有限公司);Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0μm, Dikma)。

硫酸软骨素标准品(来源: USP; 批号: H1K241; 含量: 100%); 乙腈(色谱纯, CNW); 戊烷磺酸钠(离子对试剂, 国药集团化学试剂有限公司); 蒸馏水; 胶原软骨素钙片(汤臣倍健股份有限公司)。

2.2 仪器条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0μm, Dikma); 流动相: 乙腈+0.005 mol/L 戊烷磺酸钠溶液=5:95(v:v), 等度洗脱; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测器: 紫外检测器 192 nm^[11]; 运行时间: 5 min。

2.3 测定方法

2.3.1 标准系列溶液的配制

精密称取经 105 °C 干燥至恒重的硫酸软骨素标准品 10 mg, 置 50 mL 的棕色容量瓶中, 加入 5 mL 的乙腈再加入适量的蒸馏水, 超声 10 min, 冷却至室温, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 作为标准储备液。分别精密吸取硫酸软骨素标准贮备液 1、2、3、4、5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 即得五个浓度的硫酸软骨素标准使用液, 分别为 0.008、0.016、0.024、0.032、0.04 mg/mL 的工作标准液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。以浓度 C(mg/mL)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

2.3.2 供试品溶液配制

取本品 20 片, 研细, 精密称取 0.1 g 研磨均匀的样品, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加入 5 mL 的乙腈再加入适量的蒸馏水, 超声 10 min 使溶解, 冷却, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液。

3 结果与讨论

3.1 色谱行为

采用高效液相色谱法能快速检测保健品中硫酸软骨素, 不会因为其他因素而影响检测。采用 0.005 mol/L 戊烷磺酸钠溶液和乙腈按比例等度进行洗脱, 5 min 就能把样品中硫酸软骨素流出, 流动相的比例也能让硫酸软骨素不受其他杂质峰的影响, 达到准确的分离和定量。见图 1 和图 2。

按处方取一定的辅料, 按照供试品溶液的制备方法制成空白辅料溶液和空白溶剂, 按上述测定法进样, 结果显示空白溶剂、空白辅料对样品检测均无干扰, 见图 3 和图 4。

3.2 线性实验

线性实验结果如表 1 所示, 相关系数 r^2 为 1.0000, 所以用该方法测定硫酸软骨素的含量, 在浓度为 0.008 mg/mL~0.04 mg/mL 之间呈现良好的线性。

3.3 定量限和检出限

分析方法的检出限(detection limit, DL)和定量限(quantitation limit, QL)由信噪比(S/N)计算。DL 定义为 S/N=3 时对应的待分析物浓度, QL 定义为 S/N=10 时对应的分析物浓度。

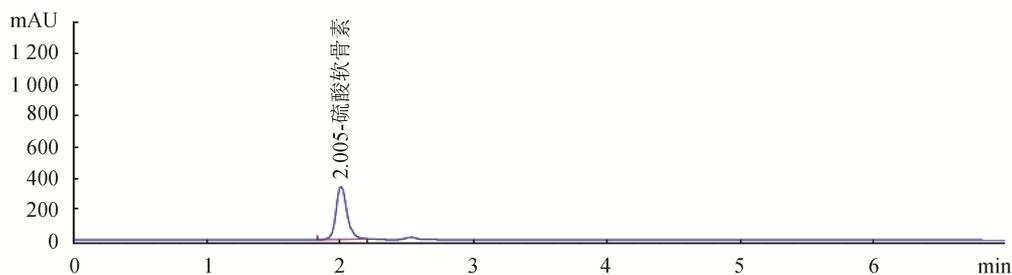


图 1 硫酸软骨素标准品的色谱图

Fig. 1 Chondroitin sulfate standard of chromatogram map

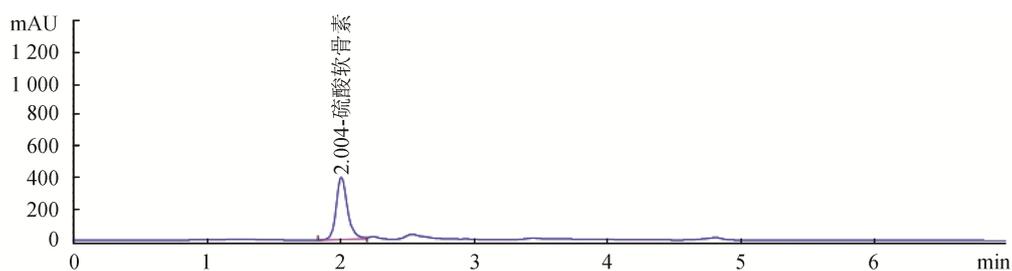


图 2 样品的色谱图

Fig. 2 The chromatogram map of the sample

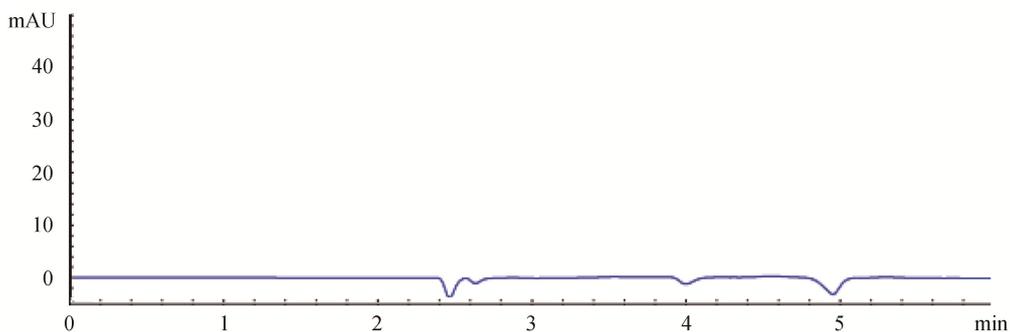


图 3 空白溶剂的色谱图

Fig. 3 The chromatogram map of the blank reagent

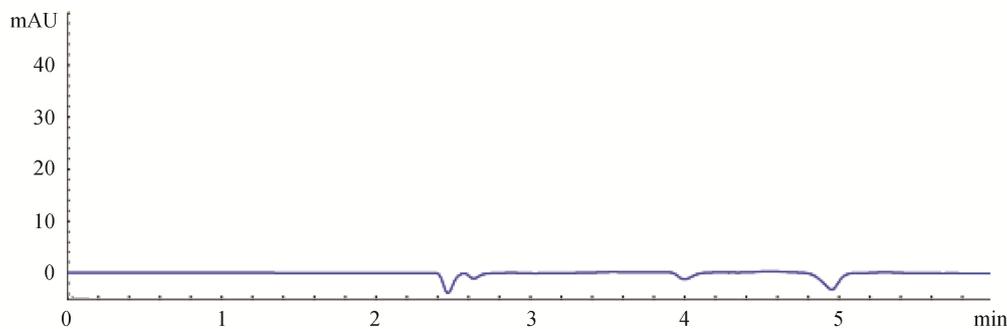


图 4 空白辅料的色谱图

Fig. 4 The chromatogram map of the excipients

表1 线性实验结果
Table 1 Linear experimental results

序号	浓度 C(mg/mL)	硫酸软骨素峰面积(A)
STD1	0.0080	477.70709
STD2	0.016	959.16284
STD3	0.024	1444.64282
STD4	0.032	1929.9469
STD5	0.040	2404.77222
线性方程	Y=60311X-4.2279	
相关系数(r^2)	1.0000	

3.3.1 定量限

精密吸取浓度为 0.2328 mg/mL 的硫酸软骨素对照液 1~100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 即得浓度为 2.328 μ g/mL 的标准品溶液, 测得信噪比分别为 10, 以 $S/N=10$ 定方法的定量限为: $QL = 2.328 \mu\text{g/mL} * 50 \text{ mL} / 0.1 \text{ g} = 1.164 \text{ mg/g}$ 。

3.3.2 检出限

以 $S/N=3$ 定方法的检出限为, $DL = QL / 10 * 3 =$

$$1.164 / 10 * 3 \text{ mg/g} = 0.3492 \text{ mg/g}$$

3.4 稳定性实验

取同一批供试品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 其峰面积的 $RSD=0.62\%$, 说明硫酸软骨素供试品溶液在 24 h 内较稳定。

3.5 精密度实验

精密称取样品 6 份, 按 2.3.2 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其 $RSD(\%)$ 。6 个样品的平均含量是 6.01 g/100 g, 相对标准偏差(RSD)为 0.1%, 具有良好的精密度, 结果见表 2。

3.6 加标回收率实验

精密称取约 0.1 g 样品 9 份, 置于 50 mL 棕色容量中, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别精密加入硫酸软骨素标准使用液(浓度约为 0.816 mg/mL) 6.0 mL、7.5 mL、9.0 mL, 加入适量的蒸馏水, 超声 10 min 使溶解并定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 作为加标溶液, 按色谱条件进行检测, 结果见表 3。

表2 精密度实验结果
Table 2 The precision of experimental results

序号	称样量(g)	浓度(mg/mL)	含量(g/100g)	平均含量(g/100g)	RSD(%)
1	0.10261	0.123455	6.015	6.01	0.10%
2	0.10265	0.12326	6.003		
3	0.10258	0.123371	6.013		
4	0.10267	0.123376	6.008		
5	0.10269	0.123400	6.008		
6	0.10272	0.123424	6.007		

表3 加标回收率实验结果
Table 3 Standard addition recovery experiment results

序号	样品称样量(g)	样品浓度(mg/mL)	测得对照品量(mg)	加标量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.10701	0.226226	4.879999	4.896	99.673	99.39	0.6
2	0.10598	0.224018	4.831502	4.896	98.682		
3	0.10293	0.221664	4.897107	4.896	100.022		
4	0.11042	0.25409	6.068258	6.120	99.154		
5	0.10948	0.252117	6.026102	6.120	98.465		
6	0.10953	0.253581	6.096297	6.120	99.612		
7	0.10421	0.271596	7.316779	7.344	99.629		
8	0.10425	0.271731	7.321125	7.344	99.688		
9	0.10429	0.271628	7.313571	7.344	99.585		

从表 3 中可以看出, 在不同添加水平下, 保健食品中硫酸软骨素方法的回收率范围为 98.5%~100.0%, 平均回收率为 99.39%, 相对标准偏差(RSD)为 0.6%。

4 小 结

目前现有的检测硫酸软骨素含量的色谱方法还有离子色谱法^[5]、酶解-高效液相色谱法、化学发光高效液相色谱法、高效液相色谱-蒸发光散射检测法^[12]等。离子色谱法是根据硫酸软骨素中硫酸根与软骨素之间的关系, 将硫酸软骨素水解生成等摩尔的硫酸根, 用 Anion HC 色谱柱将硫酸根与其他干扰物质分离后, 以硼酸钠-葡萄糖酸钠淋洗液为流动相, 电导检测器检测, Plaas 等将硫酸软骨素用硫酸软骨素酶 ABC 或 AclI 消化水解, 产物用 2-氨基吡啶和硼酸二甲胺制得糖的衍生物; 然后在 0~500 nmol/L 三氟乙酸梯度洗脱下经 AS4A 离子交换柱分离。荧光法测定, 以硫酸软骨素的结构单元的一部分作为测定的基准物质, 原理上相同, 一般先将硫酸软骨素进行水解, 彻底分解为单体, 然后再进行衍生化显色反应。对仪器要求不高, 准确度较高。但操作繁琐、费时, 干扰因素多, 重复性差, 一些衍生物往往还具有一定的毒性。化学发光高效液相色谱法, 该法是将硫酸软骨素用硫酸软骨素酶 ABC 或 ACII 降解, 然后用酰胺-80-二氧化硅色谱柱反相色谱分离用 1 mmol/L 草酸盐和 3 mmol/L 过氧化氢洗脱, 电导检测器检测, 该方法特别适合用于临床生理检测。酶解-高效液相色谱法, 硫酸软骨素钠在硫酸软骨素 ABC 酶作用下酶解为三种不饱和的二糖, 用硫酸软骨素钠对照品作为对照, 按外标法以 3 种不饱和二糖的面积之和计算, 即得, 该法准确度, 精密度, 专属性都较好, 解决了蔗糖等还原糖对含量测定的干扰, 但其基线噪音高, 不稳定, 仪器平衡时间长, 常有色谱峰拖尾, 结果变异大, 难以控制, 而且硫酸软骨素相对分子量范围较广, 不易选择合适的对照品。对仪器和试剂要求高, 一些色谱方法需要专业的软骨素酶, 价格昂贵, 操作繁琐; 有些需要有毒试剂, 造成操作的不便, 在实际生产中应根据需要进行选择。高效液相色谱-蒸发光散射检测法, 该法能避免盐酸氨基葡萄糖对硫酸软骨素的干扰, 有良好的精密度、重复性和回收率, 但是蒸发光散射检测器价格昂贵。

综上所述, 硫酸软骨素的测定方法很多, 各有其优点和缺点, 适用的供试品也不同, 应根据实验目

的进行选择应用。目前对硫酸软骨素的含量测定研究日益深入^[13,14,15], 而随着色谱技术的发展以及广泛应用, 尤其是高效液相色谱法, 所以通过本实验的考察优化, 建立了高效液相色谱法测定保健食品中的硫酸软骨素, 用乙腈和 0.005 mol/L 戊烷磺酸钠溶液等度洗脱条件可以获得良好的分离效果, 一般的高效液相色谱法测定时由于紫外检测为短波长, 基线噪音比较高, 色谱峰容易拖尾, 本方法加入了戊烷磺酸钠离子对试剂可以改善峰型^[15], 提高分离效果且基线稳定, 专属性强, 经方法学表明该方法具有灵敏度高、精密性好、操作简便快速等优点, 在实际工作中大大提高了实验的效率, 缩短了实验的时间, 达到快速检测的要求。

参考文献

- [1] 曹岳华, 彭国庆. 硫酸软骨素在医学上的应用概况[J]. 中南药学, 2010, 8(3): 222-225.
Cao YH, Peng GQ. Chondroitin sulfate in application of chondroitin sulfate in medicine [J]. Central South Pharmacy, 2010, 8(3): 222-225.
- [2] 高华, 刘坤. 间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 5: 247-248.
Gao H, Liu K. Study on the determination of chondroitin sulfate by benzene three phenol Spectrophotometry [J]. Chin J Biochem Pharm, 2000, 5: 247-248.
- [3] 姜玉红, 张翎. 硫酸软骨素含量测定的法定方法[J]. 食品与药品, 2009, 11(3): 68-70.
Jiang YH, Zang Y. Official methods for determination of chondroitin sulfate [J]. Food Drug, 2009, 11(3): 68-70.
- [4] 茅力, 吕志宏. 间接原子吸收法测定鲨鱼软骨粉中硫酸软骨素[J]. 中华预防医学杂志, 1998, 3: 183-184.
Mao L, Lv ZH. Determination of chondroitin sulfate in shark cartilage by indirect atomic absorption spectrometry [J]. Chin J Prev Med, 1998, 3: 183-184.
- [5] 茅力. 离子色谱法测定硫酸软骨素的含量[J]. 中国药科大学学报, 1998, 5: 35-361.
Mao L. Determination of chondroitin sulfate by Ion Chromatography [J]. J China Med Univ, 1998, 5: 35-361.
- [6] 夏传俊, 孟菁. 反相高效液相色谱法测定硫酸软骨素的含量[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2000, 23(4): 354-355.
Xia CJ, Meng Q. Determination of chondroitin sulfate by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography [J]. J Anhwei Normal Univ (Nat Sci Edit), 2000, 23(4): 354-355.
- [7] 牛增元, 张小吐, 刘钢, 等. 反相离子对高效液相色谱法测定

- 硫酸软骨素[J]. 化学分析计量, 2002, 11(4): 7-8.
- Niu ZY, Zhang XT, Liu G, *et al.* Determination of chondroitin sulfate by ion pair reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chem Anal Meterage, 2002, 11(4): 7-8.
- [8] 鲍伦军, 杨建成, 何振华, 等. 鱼翅中硫酸软骨素的酶解—高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2002, 5: 59-61.
- Bao LJ, Yang JC, He ZH, *et al.* Chondroitin sulfate in shark's fin enzymatic hydrolysis by high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2002, 5: 59-61.
- [9] 石瑞平, 周庆英. HPLC 法测定硫酸软骨素含量[J]. 山东医药工业, 2002, 21(2):15-16.
- Shi RP, Zhou QY. HPLC for determination of chondroitin sulfate [J]. Shangdong Pharm Ind, 2002, 21(2):15-16.
- [10] 潘自国, 陶礼萍. 硫酸软骨素的 RP - HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(9): 659-661.
- Pang ZG, Tao LP. Determination of chondroitin sulfate by RP-HPLC [J]. J Chin Med Ind, 2007, 38(9): 659-661.
- [11] GB/T 20365-2006 中硫酸软骨素的测定[S].
- GB/T 20365-2006 determination of chondroitin sulfate [S].
- [12] 林燕飞, 孙静芸. HPLC - ELSD 法测定复方氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(5): 388-390.
- Lin YF, Sun JY. HPLC - ELSD for Determine the content of compound film glucosamine chondroitin sulfate [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2006, 23(5): 388-390.
- [13] David JI, Roman M. Determination of chondroitin sulfate content in raw materials and dietary supplements by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection after renzymatic hydrolysis: single - laboratory validation [J]. J AOAC Int, 2007, 90(3): 659.
- [14] 于海洲, 范慧红. 硫酸软骨素含量测定方法研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(2) : 160-162.
- Yu HZ, Fan WH. Chondroitin sulfate content determination method is reviewed [J]. Chin J Biochem Drugs, 2011, 32(2) : 160-162.
- [15] 邢怀阳, 赵仁, 沈蔡月, 等. 高效液相色谱法测定复方盐酸氨基葡萄糖硫酸软骨素片中硫酸软骨素的含量[J]. 安徽医药, 2013, 17(12): 2037-2038.
- Xing HY, Zhao R, Shen CY, *et al.* Determination of glucosamine hydrochloride in compound chondroitin sulfate chondroitin sulfate tablets by high performance liquid chromatography [J]. Anhui Med, 2013, 17(12): 2037-2038.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



陈彩云, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 504990659@qq.com