ICS 65.020.30
B 40

中华人民共和国国家标准

GB/T 20365—20××

硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法

Determination method for chondroitin sulfate and glucosamine

—Liquid chromatography method

××-××-××发布　　××-××-××实施

中华人民共和国农业农村部
中国国家标准化管理委员会　发布

前　言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件代替 GB/T 20365-2006《硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法》，与 GB/T 20365-2006 相比，除编辑性改动外，主要技术变化如下:

——修改了检测器配置，将二极管阵列检测器（DAD）改为蒸发光散射检测器（ELSD）；

——修改了流动相体系，将乙腈-戊烷磺酸钠体系改为乙腈-甲酸铵（含 0.1%甲酸）流动相体系；

——修改了洗脱程序，将等度洗脱改为梯度洗脱；

——修改了使用的色谱柱类型，将 C_{18}（反相色谱柱）改为使用 HILIC（亲水相互作用色谱柱）进行分离。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人:：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2006年首次发布为 GB/T 20365-2006；

——本次为第一次修订。

硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法

1 范围

本文件规定了用液相色谱法测定硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的方法。

本文件适用于牛、猪和禽类（陆生来源）及鲨鱼（海洋来源）等软骨组织中提取的硫酸软骨素及其中的氨基葡萄糖的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

用乙腈将硫酸软骨素样品分散均匀，以水溶解，经液相色谱分离后，用蒸发光散射检测器（ELSD）进行测定，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 水：符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 甲酸铵：色谱纯。

5.4 甲酸：色谱纯。

5.5 25 mmol/L 甲酸铵溶液（含 0.1% 甲酸）：称取 1.575 g 甲酸铵（5.3）溶于 900 mL 水（5.1）中，加入 1 mL 甲酸（5.4），用水定容至 1000 mL，混匀。

5.6 乙腈水溶液（1：9，v/v）：用量筒或移液器准确量取 10 mL 乙腈和 90 mL 水，混匀。

5.7 硫酸软骨素[$H(C_{14}H_{19}NNa_2O_{14}S)_xOH$]标准品：陆生动物软骨组织来源的样品（包括混合样品）选择硫酸软骨素 A 标准品（CAS 号：39455-18-0），海洋来源的选择硫酸软骨素 C（CAS 号：12678-07-8）。硫酸软骨素化学结构式见附录 A。

5.8 氨基葡萄糖标准品：盐酸盐或硫酸盐，纯度≥ 98.0%。

5.9 硫酸软骨素标准储备液：分别称取 20.0 mg 经 105 ℃ 干燥 4 h 的硫酸软骨素标准品（5.7）于烧杯中，加入 1.0 mL 乙腈（5.2），使其分散均匀，再加入水，用超声波超声溶解，转移至 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，硫酸软骨素浓度约为 2.0 mg/mL。在 0 ℃ ~ 4 ℃冰箱中避光保存，有效期为 3 个月。

5.10氨基葡萄糖标准储备液：称取 20.0 mg 经 105 ℃ 干燥 4 h 的氨基葡萄糖标准品（5.8）于烧杯

中，加入 1.0 mL 乙腈，使其分散均匀，再加入水，用超声波超声溶解，转移至 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，氨基葡萄糖浓度约为 2.0 mg/mL。在 0 ℃ ~ 4 ℃冰箱中避光保存，有效期为 3 个月。

5.11混合标准工作液：移取适当体积的硫酸软骨素标准储备液（ 5.9 ）和氨基葡萄糖标准储备液（ 5.10 ）至容量瓶中，用乙腈水溶液（ 5.6 ）依次稀释至硫酸软骨素浓度为 100 mg/L，200 mg/L，300 mg/L，500 mg/L，700 mg/L 和氨基葡萄糖浓度为 20 mg/L，40 mg/L，60 mg/L，100 mg/L，140 mg/L 的混合标准工作液，可根据实际样品溶液的浓度适当调整标准工作液浓度。现用现配。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有蒸发光散射检测器（ ELSD ）。

6.2 分析天平：感量为 0.1 mg。

6.3 超声波发生器。

6.4 滤膜：聚四氟乙烯（ PTFE ），0.2 m。

7 分析步骤

7.1 样品溶液的制备

当样品是颗粒状态时，需要先将其在研钵中研细成粉末。

将粉末状样品在 105 ℃下干燥 4 h。称取 50.0 mg 样品于 50 mL 烧杯中，加人 10.0 mL 乙腈，使其分散均匀，再加入适量水，用超声波超声溶解，转移至 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。样液用 0.2 m 滤膜（ 6.4 ）过滤，供液相色谱仪分析。

7.2 仪器参考条件

由于测试结果取决于所使用仪器，因此不可能给出色谱分析的通用参数。下面给出的操作参数已被证明是可行的。

a) 流动相：A：25 mmol/L 甲酸铵溶液（含 0.1%甲酸），B：乙腈。梯度洗脱程序见表 1。

b) 色谱柱：HILIC，粒径 2.7 um，柱长 50 mm，内径 4.6 mm，或其他相当者。

c) 流速：1.0 mL/min；

d) 柱温：35℃；

e) 雾化室温度：80 ℃；

f) 漂移管温度：70 ℃；

g) 氮气流速：1.50 L/min；

h) 进样体积：10 L。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	10	90
1.00	10	90
6.00	50	50
11.00	50	50
11.10	10	90
16.00	10	90

7.3 校准曲线

将混合标准工作液按浓度从低到高依次注入高效液相色谱仪，测定硫酸软骨素和氨基葡萄糖相应的峰面积。以混合标准工作液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标绘制校准曲线。采用幂函数方程对数据进行拟合，得到回归方程。

7.4 试样的测定

将待测样液注入高效液相色谱仪中，根据保留时间定性，记录目标物的色谱峰面积，根据校准曲线得到待测样液中硫酸软骨素或氨基葡萄糖的浓度，待测样液中目标物的响应值应在仪器检测的校准曲线定量范围之内，超过定量范围时应根据测定浓度进行适当倍数的稀释后再进行分析。

7.5 空白实验

除不加试样外,均按上述步骤进行操作。

8 结果计算

被测物的含量按式（1）计算：

$$X_i = \frac{(\rho_i - \rho_0) \times V \times 1000}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots\cdots\

附 录 A
（资料性）
硫酸软骨素的化学结构式

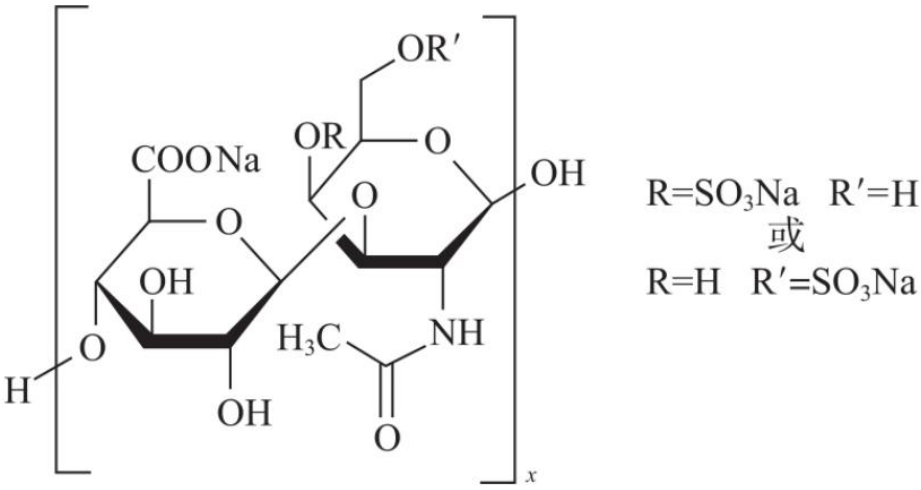
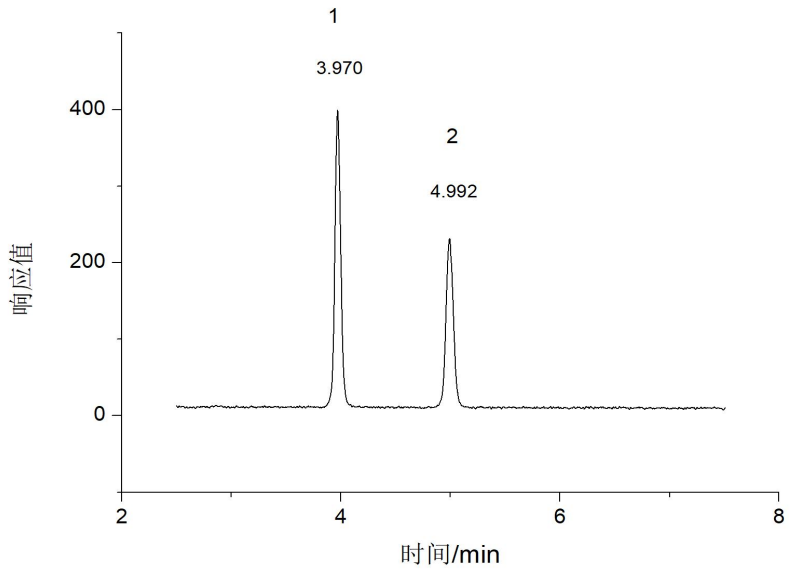


图 A.1 硫酸软骨素化学结构式

附 录 B
（资料性）
硫酸软骨素和氨基葡萄糖标准溶液的典型液相色谱图

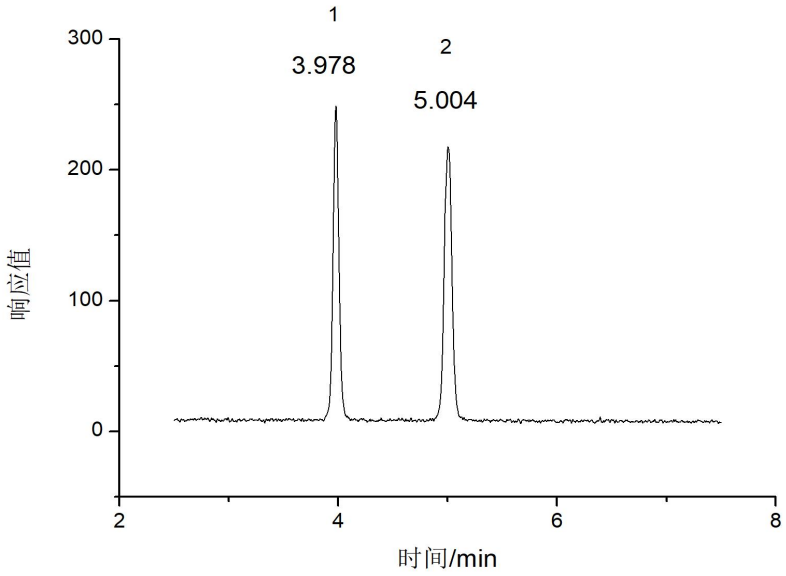
硫酸软骨素（浓度为 500 mg/L）和氨基葡萄糖（浓度为 100 mg/L）典型液相色谱图如图 B.1~B.2 所示。



标引序号说明：

1—硫酸软骨素（牛）　　2—氨基葡萄糖

图 B.1 硫酸软骨素和氨基葡萄糖标准溶液的蒸发光散射检测（ELSD）液相色谱图



标引序号说明：

1—硫酸软骨素（鲨鱼）　　2—氨基葡萄糖

图 B.2 硫酸软骨素（鲨鱼）和氨基葡萄糖标准溶液的蒸发光散射检测（ELSD）液相色谱图