《硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法》

国家标准编制说明

一、工作简况

1、任务来源

根据国家标准化管理委员会文件国标委发［2023］64 号“国家标准化管理委员会关于下达 2023 年国家标准复审修订计划的通知”的要求，由农业农村部提出并归口，计划号为 20233488-T-326。

2、立项背景及国内外研究现状

硫酸软骨素（Chondroitin Sulfate，CS）是一种提取自动物软骨或气管的、含有硫酸基的糖胺聚糖，其常见来源包括牛、猪、禽类或鲨鱼。其化学结构由重复的二糖单元构成，该单元由 D-葡萄糖醛酸与 N-乙酰-D-半乳糖胺通过β-(1→3)和β-(1→4)糖苷键交替连接而成；其分子链上 N-乙酰半乳糖胺残基的 C4 位或 C6 位羟基常发生硫酸化修饰，形成主要的 4-硫酸酯（CSA，或称软骨素-4-硫酸盐）和 6-硫酸酯（CSC，或称软骨素-6-硫酸盐）异构体，其硫酸化类型、程度及分子链长度共同决定了其生物活性与功能特异性。

根据《中国药典》、《美国药典（USP）》及《欧洲药典（EP）》的规范，硫酸软骨素主要从陆生动物（如猪、牛、禽类）或海洋动物（如鲨鱼）的软骨中提取纯化而得。作为一种重要的细胞外基质成分，它广泛分布于软骨、肌腱、韧带、血管壁及皮肤等结缔组织中，具有维持组织水合与弹性、润滑关节、抑制特定炎症通路及促进软骨基质合成等关键生理功能，因此在骨关节健康领域被广泛研究与应用。

硫酸软骨素的生物活性与其分子量、硫酸化程度及纯度密切相关。研究表明，其治疗骨关节炎的机制包括抑制基质金属蛋白酶、减少炎症因子释放，并促进软骨细胞外基质合成。因此，在初加工过程中，需严格控制其含量及杂质水平，以确保产品的药效和安全性。

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》的立项背景主要源于 21 世纪初中国硫酸软骨素产业快速发展的规范化需求。随着中国成为全球主要的硫酸软骨素生产国和出口国，传统检测方法如分光光度法和沉淀滴定法已无法满足日益严格的国际质量要求，这些方法存在操作复杂、特异性差等缺陷。为突破国际贸易技术壁垒、提升产品质量可控性，同时响应国家加强保健食品原料监管的政策导向，在科研机构技术积累

和行业共识的基础上，制定了这一采用高效液相色谱法（HPLC）的国家标准。该标准的实施不仅填补了国内检测方法空白，推动产业标准化转型，也为后续《中国药典》相关标准的制定奠定了基础，体现了中国在规范新兴产业、提升国际竞争力方面的战略布局。

原标准基于反相色谱（RP-HPLC）分离原理，结合紫外末端吸收检测，虽具备操作简便、分析通量高及设备普及率广等优势，但其固有的分离机制导致氯离子共洗脱干扰难以克服，且对强极性的硫酸软骨素分子保留能力不足。

针对这些技术瓶颈，本次标准制修订通过建立亲水相互作用色谱-蒸发光散射检测（HILIC-ELSD）分析方法，实现了检测技术的重大创新。该方法采用 HILIC 分离模式，硫酸软骨素保留显著增强，且与氨基葡萄糖色谱峰达到完全分离，从而彻底解决了氯离子共洗脱的干扰问题。蒸发光散射检测器的非选择性检测机制有效规避了紫外末端吸收的基质干扰，结合系统优化的色谱条件，显著改善了硫酸软骨素的色谱保留特性和峰形质量。这一分析方法成功克服了原有方法在抗干扰能力、极性分子保留及检测特异性等方面的技术瓶颈，能够全面适应不同生产工艺和原料来源的硫酸软骨素产品质量控制要求，大幅提升了检测方法的专属性、灵敏度和可靠性，为行业质量管控提供了先进的技术支撑。

3、硫酸软骨素产业和标准现状

（一）产业现状

根据行业权威数据分析，全球硫酸软骨素市场规模在 2024 年已达约 12.5 亿美元，2025 至 2031 年期间的复合年增长率（CAGR）预计稳定在 3.6%。中国在这一全球产业链中占据核心地位，其产量占全球总供应量的 80%以上，这一优势地位得益于其成熟的动物软骨原料供应链和规模化生产工艺。未来，随着全球老龄化趋势加剧和关节健康需求增长，硫酸软骨素市场将保持稳定增长，其中高纯度医药级产品、宠物保健及功能性食品等新兴应用领域有望成为新的增长点。中国厂商在巩固原料供应优势的同时，正逐步向高端化、高附加值产品转型，以进一步提升国际竞争力。

（二）标准现状

当前，国内外标准体系呈现从传统方法向高特异性、高准确性方法过渡的格局。国内检测主要依据《中国药典》（现行版）和推荐性国家标准 GB/T 20365-2006。国际上，美国药典（USP）、欧洲药典（EP） 均已将酶解-高效液相色谱法作为硫酸软骨素物种来源的鉴定方法。《中国药典》已将酶解-高效液相色谱法作为硫酸软骨素的定量方法。

除色谱法外，浊度滴定法因其操作简便、成本低廉而被熟知，但存在根本性缺陷：首先，其基于电荷结合产生沉淀的原理缺乏特异性，无法有效区分硫酸软骨素与其他带负电的多糖（如透明质酸、硫酸角质素）或大分子蛋白，样品中杂质极易引发假阳性结果，导致测定值系统性偏高，准确性无法保证；其次，该方法依赖操作者肉眼观察浊度或沉淀变化来确定终点，主观性强，致使方法的重现性与精密度差，不同实验室间的结果可比性低；值得注意的是，《中国药典》2020 年版及后续版次已不再收录此法，这从标准层面印证了其在现代法定质量控制中的局限性。

国家标准 GB/T 20365-2006 液相色谱法在分析硫酸软骨素时也存在局限：由于硫酸软骨素强极性和水溶性在反相色谱模式下保留很弱，主峰常在死时间附近出峰。这导致目标峰极易与样品中众多未保留的极性杂质和小分子成分共流出，最终使定量结果出现系统性偏高。

而被视为权威方案的酶解-液相色谱法，无论是作为鉴定方法还是定量方法均有显著局限。作为鉴定方法，其准确性建立在与已知来源对照品色谱图谱的精确比对之上。由于不同生物来源（如牛、猪、鲨鱼）的硫酸软骨素在二糖组成与硫酸化模式上存在固有的显著差异，而各药典标准图谱多基于特定陆地动物来源建立，因此，该方法无法准确鉴定成分未知或混合来源的样品。例如，《中国药典》规定的二糖比例范围主要适用于牛、猪来源，而鲨鱼来源的图谱与之迥异，混合样品的谱图则更为复杂难辨。

作为定量方法，其核心瓶颈在于，样品的微观异质性导致其对同一酶解条件的响应不同，酶解效率无法达到一致且完全。因此，对于混合或来源不明的样品，由差异酶解产生的二糖总量无法通过固定系数准确换算为总含量，会影响测定结果的准确性与可靠性。

此外，该方法前处理步骤繁琐、耗时且成本较高，酶制剂活性的波动也引入了额外风险。在色谱分析中，为分离多种二糖异构体常需使用含不挥发性盐的流动相，易导致基线漂移，干扰定量准确性。

本方法建立了一种基于高效液相色谱-蒸发光散射检测法（HPLC-ELSD）的硫酸软骨素含量测定方法。该方法作为一种通用型分析技术，其核心优势在于能够直接对完整的硫酸软骨素多糖分子进行测定，无需依赖酶解步骤，从而显著简化了前处理流程。由于检测信号不依赖于样品的分子结构细节，本方法有效避免了因硫酸软骨素来源差异导致的酶解效率波动问题，在混合来源样品的含量测定中表现出优于酶解法的准确性与可靠性，同时显著提升了分析效率和方法的稳健性。

4、主要工作过程

（一）起草（草案、论证）阶段

国家标准制修订项目立项后，2024 年 1 月召开了国家标准《硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法》工作会。主要由从事标准制修订及具有丰富技术经验的仪器分析专业研究人员组成，工作组制定了初步的标准编制工作计划。

（二）工作计划和标准制定原则的确定

按照工作任务要求，标准编制工作组制定了标准起草工作计划和任务分工。在充分研究与讨论的基础上，制定了标准制定原则:

（1）先进性：其准确度、精密度和灵敏度达到较高水平。

（2）适用性：要适应我国硫酸软骨素原料产业发展的要求，满足现代化的需要。

（3）可操作：符合我国目前仪器设备和试剂、材料的供应条件。

（4）实用性：符合检测从业人员的技术水平，能被国内大多数分析验室所使用，并达到所规定的要求。为质量控制部门、有关企业、研究院所等服务。

（三）国内外相关标准和文献的检索

目前，在可查询的国内外有关硫酸软骨素（CS）多糖直接检测的文献中（详情见表 1），主流分析技术集中于高效液相色谱（HPLC）与二极管阵列检测器（DAD）或蒸发光散射检测器（ELSD）的联用。然而，这两种技术路线的效果存在显著差异。

（1） HPLC-DAD 与反相 C18 色谱柱的局限性

采用 HPLC-DAD 结合常规反相 C_{18} 色谱柱的方案面临一个根本性的技术瓶颈。硫酸软骨素是一种强极性的线性多糖链，富含羧基与硫酸基，使其在水相环境中显示出极强的亲水性。而反相 C_{18} 色谱柱的分离机理是基于溶质与固定相之间的疏水相互作用，其固定相表面为非极性的十八烷基键合硅胶。

由于硫酸软骨素分子几乎不具备疏水特性，其在 C_{18} 柱上无法产生有效的保留。这使其可能与样品基质中同样具有极性的杂质（如盐分、单糖、游离氨基酸等）发生共洗脱。此现象不仅无法实现准确定量，更严重的是，样品中所有在死时间出峰的极性杂质都会产生共干扰，导致测定结果特异性差、准确性低。

（2）HPLC-ELSD 与 HILIC 色谱柱的协同优势

相比之下，采用 HPLC-ELSD 技术平台，并配合亲水相互作用色谱（HILIC）柱，被证实是针对硫酸软骨素分析的更优解决方案。该组合从分离与检测两个层面解决了上述问题：

a. HILIC 色谱柱的固定相通常为未键合的裸硅胶或键合有酰胺、氨基等极性官能团。其分离机理是基于目标物在极性固定相和高比例有机相流动相之间的分配与静电相互作用。硫酸软骨素的强极性与亲水性使其在 HILIC 模式下能够与固定相产生强烈作用，从而实现有效保留和良好分离。这能够将其与复杂的样品基质分离开，从根本上排除了极性杂质的干扰。

b.蒸发光散射检测器（ELSD）作为一款质量型通用检测器，其响应不依赖于目标物的光学特性。硫酸软骨素在紫外波段仅存在末端吸收，响应弱且易受干扰。而 ELSD 通过将色谱流出液雾化、蒸发并检测剩余不挥发颗粒的光散射信号，能够对无紫外吸收或紫外吸收弱的硫酸软骨素多糖分子产生灵敏且稳定的响应。

表 1 文献报道的硫酸软骨素多糖检测方法

序号	样品前处理	色谱柱	检测器	流动相	仪器条件	CS 保留时间	氨糖保留时间	参考文献
1	供试品溶液 称取约 12.50 mg 氨糖软骨素粉末于 25 mL 量瓶中，加入 10% 乙腈，超声 30 min 使溶解并稀释至刻度，摇匀，用 0.45 μm 滤膜过滤即得。	Waters Xselect HSS T3（5 μm，4.6 mm×250 mm）	HPLC-ELSD	乙腈 - 水 - 三乙胺（10：90：0.1）	流速为 0.5 mL·min^{-1}，柱温为 30℃；漂移管温度为 90℃；载气流速为 3.0 L·min^{-1}	3.0 min	4.8 min	HPLC-ELSD 法测定氨糖软骨素中硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖的含量
2	将 5 mg 样品溶解在 10 mL 水中，通过水超声提取 20 min；提取液使用微孔滤膜按 10 000 r/min 离心，摇匀，滤过，取续滤液。	为 Nncleodur C18(用极性小分子封尾，250 mm×4.6 mm，5 μm）	HPLC-DAD	乙腈+戊烷磺酸钠 2+98（V/V）	流速 0.8 mL/min，柱温 35℃，检测波长 192 nm 时，进样量 10 μL。	1.988min	/	HPLC 测定氨糖软骨素奶粉中硫酸软骨素
3	取本品 20片用研钵研碎精密称取粉末适量置 25 mL 量瓶中 加乙腈 2.5 mL 分散再加水超声使溶解并定容，摇匀，制成含硫酸软骨素约 1.0 mg/mL 的溶液 经 0.45 μｍ微孔滤滤过取续滤液即得。	Extend-C18 柱(4.6ｍｍ×250ｍｍ，5μｍ）	HPLC-ELSD	乙腈-水-三乙胺水溶液（10：90：0. 1）	流速：0.6 mL/min；柱温：30℃；进样量：5μＬ；ＥＬＳＤ漂移管温度：40℃ 雾化气压 3.5bar	无	无	ＨＰＬＣ-ＥＬＳＤ法测定复方盐酸氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的含量
4	取粉碎均匀的样品 1 g (精确至 0. 000 1 g) 于 50 ml 容量瓶中，加入 40 ml 水，超声提取 20 min，取出冷却至室温，再用水定容至刻度。用水稀释到适当体积(视样品含量而定) ,用 0. 45 μm 微孔滤膜过滤，滤液供 HPLC 分析。	CAPCELL PAK CR(4. 6 mm × 150 mm，5 μm)	HPLC-DAD	25 mmol /L 乙酸铵 + 乙腈(加 0. 1% 甲酸) (25 + 75，V /V) ;	检测波长 200 nm；流量 1. 0 ml /min；柱温 30 ℃ 。	/	5.44min	HPLC 法测定保健食品中盐酸氨基葡萄糖含量的研究
5	取 5. 0 ml 乙腈于 50 ml, 容量瓶中,加水定容,摇匀即可;精密称取 105 ℃下干燥 4h 的胶囊内容物 50.0 mg 于烧杯中,加入 5. 0ml,乙	Kromasil C18 柱 (4.6x250 mm,5 μm)	HPLC-DAD	乙腈-10 mmol/L 戊烷磺酸钠水溶液 (10:90),	检测波长 192 nm，流速 0.8 mL/min；进样量 10 μＬ。	2.0 min	/	HPLC 法测定软骨素复合胶囊中硫酸软骨素的含量

	腈,振荡使其分散均匀,再加入纯化水,用超声波使其溶解,转移至 50 ml 容量瓶中,加水定容至刻度并摇匀,测定前用滤膜过滤。							
6	取样品 20 片，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于硫酸软骨素钠 25 mg），置于 50 ml 量瓶中，加乙腈 5 ml，加水 25 ml，超声（功率：250 W，频率：45 kHz）约 10 min 使硫酸软骨素钠溶解，加水稀释至刻度，摇匀，滤过；精密量取续滤液 10 ml，置于 200 ml 量瓶中，加水稀释至刻度，作为供试品溶液。	JADE-PAK ODS-AQ（250 mm×4.6 mm，5 μm）	HPLC-DAD	0.008 mol/L 磷酸二氢铵溶液（pH = 3.6）	流速：0.5 ml/min；紫外检测器，检测波长：194 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μl。	7.5min	/	HPLC 法测定复方吡拉西坦脑蛋白水解物片中硫酸软骨素钠的含量
7	取本品适量，除去薄膜衣研细，精密称取 100 mg，置于 50 m 量瓶中，加入 5 mL 乙腈超声 1min，加水至接近刻度，超声 10min，水定容至刻度，摇匀，离心，即得。	Waters Xbridge Amide 色谱柱(酰胺柱,4.6 mmx150 mm，3.5 μm);	HPLC-ELSD	乙腈-50 mmol/L 乙酸铵(含 0.6%三乙胺)(75:25)	体积流量 0.8mL/min;柱温 40℃；蒸发光散射检测器，漂移管温度 105 ℃;载气 N，体积流量 2.5 mL/min;进样量 2.5μl。	14.4min	6.7min	HPLC-EISD 法同时测定银怡片中 2 种成分
8	取样品 20 片，去掉糖衣，研细，精密称取约 10 片量，置 250 mL 量瓶中，加乙腈-水(1:1)适量，超声 30 min，放冷，加乙腈水(1:1)稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液,即得。	InertSustain C18(4.6 mmx250 mm,5 μm);	HPLC-UV	乙腈-5 mmol/L 戊烷磺酸钠水溶液(pH 3.5)，梯度洗脱	柱温:30℃;检测波长:230 nm;进样量为 20 μL。	3.0 min	/	HPLC 法同时测定复方硫酸软骨素片中 3 个活性成分的含量
9	样品 50.0 mg 于 50 mL 具塞离心管中, 加入 10.0 mL 乙腈, 涡旋混合 1 min 后再加入 10 mL 水, 超声提取 10 min, 将溶液转移至 50 mL 容量瓶，加水定容	Waters Atlantis T3 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)	HPLC-DAD	乙腈-95%戊烷磺酸钠水溶液，等度洗脱	流速 0.6 mL/min; 检测波长 192 nm; 柱温 35 ℃; 进样量 10 μL;	2.4 min	/	高效液相色谱法测定动物软骨提取物中硫酸软骨素含量

	后涡旋混匀，经 4500 r/min 离心 5 min，过 0.22 μm 滤膜，供高效液相色谱仪检测。							

（四）标准方法的建立

标准制修订工作组按照计划任务书的要求，结合制定标准的要求，研究建立标准方法的实验方案，并进行方法前处理条件的选择、仪器条件的确定和方法精密度的测定等试验。

（五）标准草案的形成

2024 年 1 月-2024 年 12 月，标准制修订工作组针对不同来源硫酸软骨素原料进行调研，获取了大量相关信息与数据。样品采集后，建立硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定方法，包括线性范围、相关系数、加标回收率、精密度等。

（六）方法验证

2025 年 10 月至 11 月，委托南京海关工业产品检测中心、长春海关技术中心、石家庄海关技术中心、青岛元信检测技术有限公司、梅里埃检测技术（青岛）有限公司共 5 家具备验证条件的实验室开展方法验证。对相关实验数据和验证结论进行整理。

（七）标准讨论稿和标准编制说明的形成及公开征求意见稿.

专家对《硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法》标准草案的名称、范围、检验方法内容、附录等章节逐一进行了修改，根据修改意见形成了《硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法》标准讨论稿及其编制说明。根据前期讨论意见进一步修改标准文本及编制说明，形成了标准公开征求意见稿。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

1、国家标准编制原则

本标准以科学技术和实验数据为依据，结合产品实际生产情况，经过科学研究而制定。本标准的制定充分考虑硫酸软骨素原料的行业发展，有效规范行业，促进相关行业提高产品质量，增强企业的市场竞争力，确保标准的科学性、先进性、可操作性，为确保食品的消费安全、保障消费者的饮食营养健康奠定基础。

方法的制定是依据 GB 5009.295-2023《食品安全国家标准化学分析方法验证通则》GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》和 GB/T27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》。本标准格式依据 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》的要求和规定编写。

2、主要内容及其确定依据

（一）标准名称

本标准主要解决软骨素初级产品中的硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量测定的技术问题，标准名称为：《硫酸软骨素和氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法》。翻译为“Determination method for chondroitin sulfate and glucosamine—Liquid chromatography method”。

（二）前言

明确了本标准制修订的主要技术内容、归口单位及主要起草单位、起草人等。

（三）范围

本文件规定了用液相色谱法测定软骨素初级产品中硫酸软骨素和氨基葡萄糖的测定。

本文件适用于从牛、猪、禽类和鲨鱼等动物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。

（四）引用文件

描述了本标准中涉及引用的标准等相关文件。

（五）方法原理

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进行测定，外标法定量。

（六）标准方法的实验技术论证

1 仪器条件的优化

1.1 色谱条件

1.1.1 色谱柱的选择

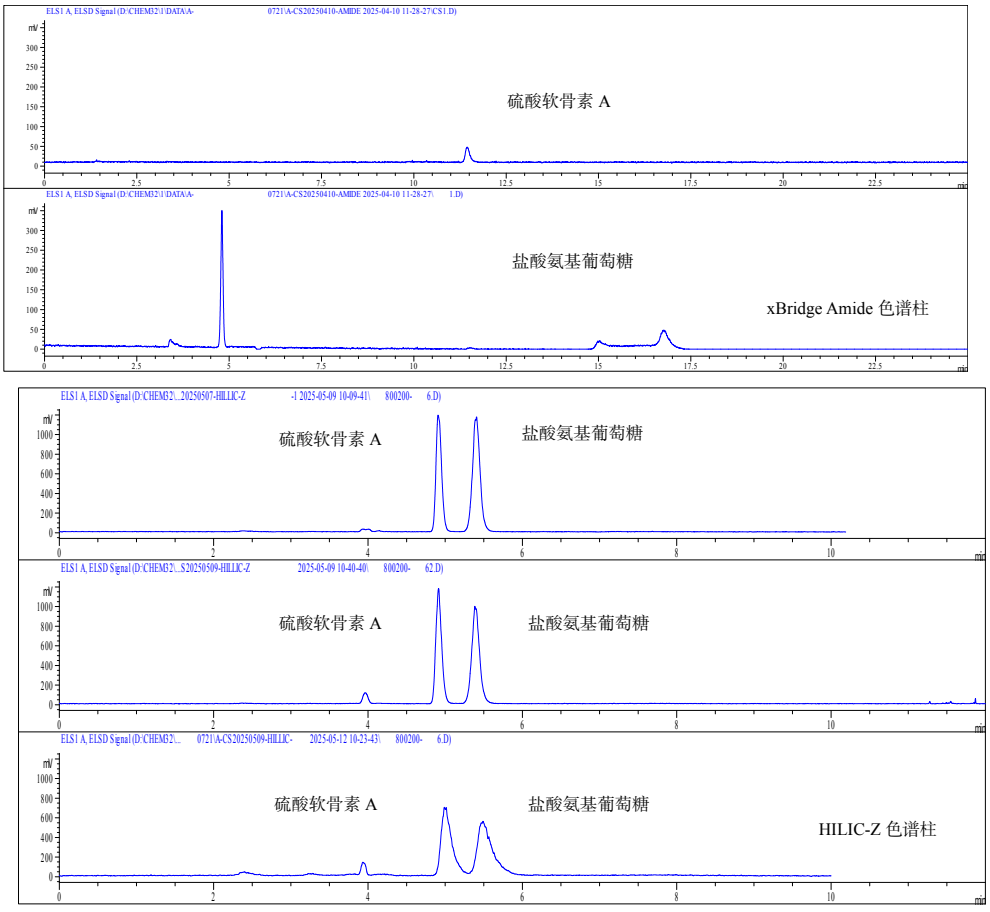
针对硫酸软骨素在反相 C18 色谱体系中因强极性导致的保留弱、易与弱保留杂质共流出这一分析难点，以及该成分自身紫外吸收弱的传统检测困境，本方法采用蒸发光散射检测器（ELSD）作为核心检测手段。ELSD 不依赖于化合物的紫外发色团，可有效克服单纯依赖二极管阵列检测器（DAD）在末端吸收区灵敏度低、基线不稳且易受共流出杂质干扰的缺陷，从而实现对该成分的专属性与高灵敏度检测。

在色谱柱筛选方面，本方法系统考察了三种亲水作用色谱柱：Amide (3.5 μm，4.6 × 250 mm)、HILIC-Z (4 μm，4.6 × 150 mm) 以及 HILIC (2.7 μm，4.6 × 50 mm)。进样样品为硫酸软骨素 A (500 mg/L) 与盐酸氨基葡萄糖 (100 mg/L) 的混合溶液。

实验结果表明，xBridge Amide 色谱柱对硫酸软骨素 A 和盐酸氨基葡萄糖的分析体系不具备适用性。硫酸软骨素 A 在该酰胺固定相上呈现显著偏低的色谱峰响应，表明其与固定相之间存在较强的特异性吸附，导致洗脱效率降低，无法满足定量分析的基本要求；同时，盐酸氨基葡萄糖在该条件下出现 3 个色谱峰，反映出固定相对目标物的保留机制较为复杂，可能诱发或未能有效分离其异构化形态，导致方法专属性不足，系统适用性无法满足相关药典与法规要求。综上，该色谱柱的固定相特性与待测物的化学结构不相匹配，其保留行为不利于获得稳定、可靠的分离结果，依据色谱方法选择原则及方法验证指导原则，当前体系不适用于本方法的定量分析。

HILIC-Z 柱在初始阶段表现出良好分离效果，但随着使用次数的增加，柱效明显下降，峰面积与峰形重复性变差，再生后仍无法恢复，推测是强极性目标物与固定相表面活性位点的不可逆吸附或导致键合相层结构发生改变，影响了色谱柱的长期耐用性。

相比之下，HILIC 色谱柱（2.7 μm 核壳填料）在本体系中表现最为稳定。该色谱柱不仅在多次进样中保持较好的柱效与峰形重现性，还具有良好的可再生性——经适当冲洗与平衡后，色谱性能（包括理论塔板数、分离度及保留时间）均可恢复至初始水平，说明其固定相结构稳定，耐受性强（见图 1）。



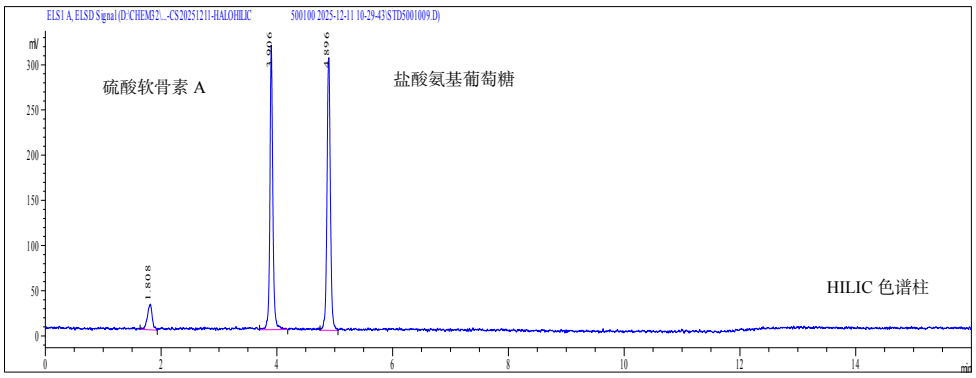


图 1 目标物在不同色谱柱下出峰效果

1.1.2 进样量的优化

为确定最佳进样体积，本研究系统考察了 1 μL、2 μL、5 μL 及 10 μL 四个进样体积下硫酸软骨素（CS，500 mg/L）与盐酸氨基葡萄糖（GAH，100 mg/L）的色谱行为。结果显示（表 2），两种目标物的峰面积随进样体积增加呈良好关系，在 10 μL 时响应最高，可最大限度提高检测灵敏度。系统适用性方面，CS 的拖尾因子由 1 μL 时的 1.57 改善至 10 μL 时的 1.17，峰形趋于对称；GAH 的拖尾因子始终维持在 1.00–1.12 之间，符合色谱峰形要求。虽然 10 μL 时理论塔板数略有下降，但仍远高于常规要求，且分离度满足完全分离的要求。

在系统适用性参数均符合药典及相关指导原则规定的前提下，色谱峰的对称性成为选择进样体积的重要影响因素。10 μL 进样时，两组分色谱峰接近理想对称，有利于提高积分重现性与定量结果的可靠性。因此，本方法最终确定 10 μL 为推荐进样体积，在保证系统适用性符合要求的基础上，实现了对待测物的高灵敏度与稳定检测。

表 2 目标物在不同进样量下的色谱响应、柱效及峰形信息统计表

目标物	进样体积/ μL	峰面积	拖尾因子	分离度	理论塔板数
硫酸软骨素	1	89.7	1.57	/	36451
	2	245.7	1.22	/	48620
	5	1059.8	1.24	/	48631
	10	2713.9	1.17	/	42326
盐酸氨基葡萄糖	1	69.3	1.00	10.1	66772
	2	209.8	1.07	11.1	76285
	5	1066.5	1.12	11.7	89066
	10	3357.1	1.01	10.5	66358

1.1.3 洗脱程序的优化

在洗脱程序优化研究中，为建立更佳的色谱条件，系统比较了等度洗脱与梯度洗脱两种模式。流动相由 25 mmol/L 甲酸铵的 0.1%甲酸水溶液（A 相）和乙腈（B 相）组成。等度

洗脱采用固定比例 A：B=20：80 和 A：B=40：60；梯度洗脱程序详见表 3。通过对分离度、理论塔板数与峰面积（表 4）等关键色谱参数的综合评估，梯度洗脱方法展现出显著优势。等度洗脱程序下目标物色谱图及梯度洗脱程序下目标物色谱图见图 2、图 3。

研究过程中测试了流动相配比为 A：B=40：60 和 A：B=20：80 这两种极端条件。实验结果表明，这两种条件均未能有效优化目标物的综合色谱行为。相比之下，梯度洗脱在分离效能方面展现出显著改善，将目标峰间的分离度提升至 11.24，较等度洗脱条件实现了更完全的基线分离，符合《中国药典》对色谱系统适用性的要求。

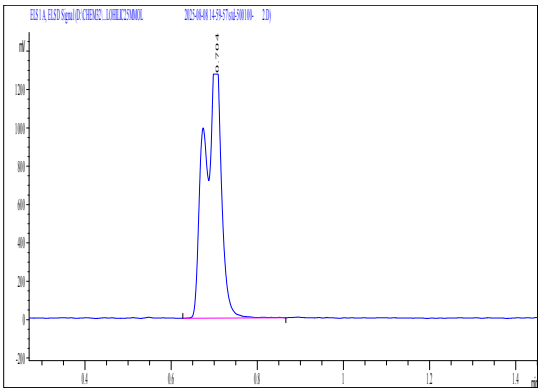
梯度洗脱在柱效方面表现突出，显著提高了理论塔板数。例如，盐酸氨基葡萄糖的理论塔板数从等度洗脱（A:B=80:20）条件下的 2916 大幅增加至 88557，表明色谱峰形更为尖锐，柱效得到显著提升。在检测灵敏度方面，梯度洗脱条件下各成分的峰面积均呈现增加趋势，显示该方法具有更高的响应强度，有利于微量成分的准确定量。

此外，梯度洗脱通过动态调节洗脱强度，有效增强了方法对复杂基质中目标物与相关杂质的区分能力，提升了分析的专属性与可靠性。在本方法采用的 HILIC 色谱模式下，梯度洗脱程序中设置的 A：B=50：50 洗脱阶段（表 3，6.00-11.00 min）能够有效洗脱强保留在色谱柱上的极性杂质，从而减少杂质干扰、降低背景响应，并有助于保护色谱柱。

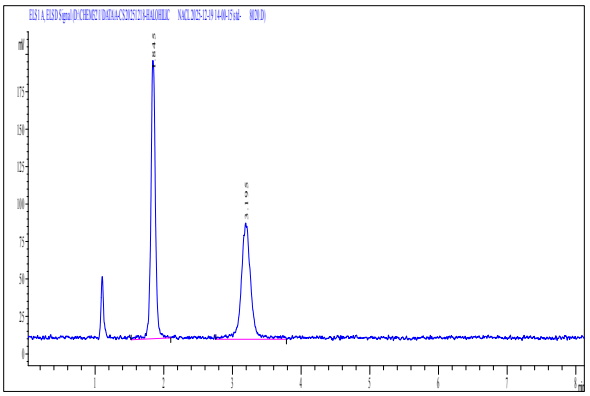
综上，梯度洗脱程序在分离能力、柱效及检测灵敏度等核心指标上均优于等度洗脱，能更好地满足含量测定对准确性、专属性和精密度的要求，因此被确定为最终的优选洗脱程序。

表 3 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.00	10	90
1.00	10	90
6.00	50	50
11.00	50	50
11.10	10	90
16.00	10	90

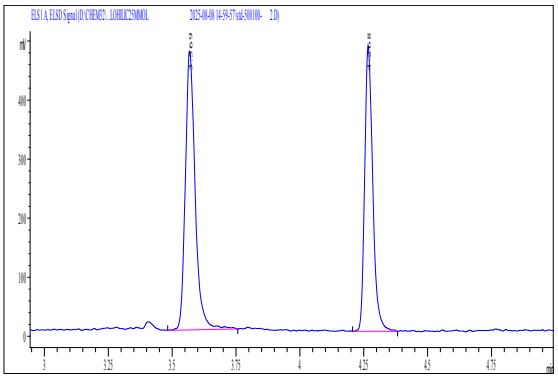


等度洗脱程序（A：B=40：60）目标物色谱图



等度洗脱程序（A：B=20：80）目标物色谱图

图 2 等度洗脱程序下目标物色谱图



梯度洗脱程序目标物色谱图

图 3 梯度洗脱程序下目标物色谱图

表 4 目标物不同洗脱程序下的色谱响应、柱效及峰形信息统计表

化合物	洗脱程序	保留时间/min	分离度	峰面积	理论塔板数	拖尾因子
硫酸软骨素	等度洗脱 80：20	1.845	/	851.9	4503	1.05
盐酸氨基葡萄糖		3.195	8.9	764.2	2916	0.79
硫酸软骨素	等度洗脱 60：40	0.675	/	1309.7	3530	0.91
盐酸氨基葡萄糖		0.704	0.6	2331.8	4381	1.44
硫酸软骨素	梯度洗脱	3.569	/	1267.3	45011	1.07
盐酸氨基葡萄糖		4.268	11.2	1072.7	88557	1.06

1.1.4 柱温的优化

在流动相与梯度洗脱程序确定的条件下，选取 30℃、35℃及 40℃三个温度水平进行考察，以目标化合物硫酸软骨素与盐酸氨基葡萄糖的峰面积作为关键响应指标进行评价。

优化结果显示（图 4，表 5），柱温对两种目标物的色谱响应影响趋势不同。硫酸软骨

素的峰面积随柱温升高呈递增趋势，表明适当升温有利于其色谱峰响应。而盐酸氨基葡萄糖的峰面积在 35℃时保持稳定，在 40℃时显著降低，提示过高温度可能导致其响应下降。

综合考虑两个目标物的峰面积响应、分析灵敏度与信号稳定性，35℃条件下，硫酸软骨素响应值较 30℃提升约 12.5%，同时盐酸氨基葡萄糖响应未见衰减，两者在此温度下达到最佳平衡。因此，本方法最终确定柱温为 35℃。

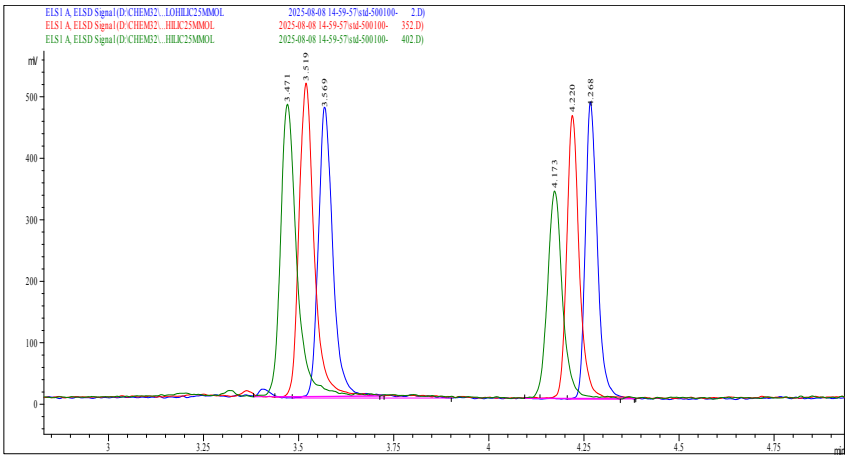


图 4 不同柱温下目标物的出峰情况

表 5 目标物在不同柱温下的色谱响应、柱效及峰形统计表

化合物	温度/℃	峰面积
硫酸软骨素	30	1267.3
	35	1425.4
	40	1453.5
盐酸氨基葡萄糖	30	1072.7
	35	1063.5
	40	941.1

1.1.5 流动相水相浓度的优化

在本方法建立的亲水作用色谱-蒸发光散射检测分析体系中，对流动相水相组成进行了系统优化，重点考察了甲酸铵浓度（0、10、25、50 mmol/L）的影响。所有条件下，水相中均添加 0.1% (v/v) 甲酸，旨在协同改善硫酸软骨素与盐酸氨基葡萄糖的色谱行为。

甲酸的引入基于其多重关键作用：首先，其提供的酸性环境能确保硫酸软骨素分子中羧基以及盐酸氨基葡萄糖中氨基的充分质子化，以此精准调控二者在 HILIC 固定相表面富水层与流动相之间的分配平衡，是实现其有效保留与分离的基础；其次，甲酸能有效质子化色谱柱硅胶基质表面残留的活性硅羟基，屏蔽其与分析物（尤其是碱性氨基糖）之间的非特异性吸附，从而显著改善峰形对称性与柱效；此外，甲酸与甲酸铵共同构成一个挥发性缓冲体

系，该体系不仅能缓冲样品基质可能引入的酸碱干扰，确保方法重现性，其高挥发性特性更与 ELSD 检测器完全兼容，可避免盐沉积，保障检测灵敏度与基线稳定性。

由图 5，表 6 结果表明，当水相为纯水（0 mmol/L）时，两目标物于 3.763 min 处共流出，无法分离。随着甲酸铵浓度增加，离子强度提升，色谱选择性显著改善。分离度在 10 mmol/L 时已达 7.95，在 25 与 50 mmol/L 时均大于 10，表明在此范围内均可实现完全基线分离。

在峰形与柱效方面，25 mmol/L 条件表现优异：硫酸软骨素的拖尾因子改善至 1.282，理论塔板数提升至 49019；盐酸氨基葡萄糖的拖尾因子为 1.223，理论塔板数达 67125，峰形对称性良好。与 50 mmol/L 条件相比，二者在关键峰形参数上已处于同一优良水平，且响应值完全满足定量检测的灵敏度要求。

此外，在 50 mmol/L 条件下于 3.425 min 出现未知杂峰，提示较高盐浓度可能引起额外的保留行为变化或系统干扰。综合考量分离效能、峰形、响应强度及方法稳健性，最终选定含 0.1%甲酸的 25 mmol/L 甲酸铵溶液作为最优水相条件。该条件在确保目标物完全分离与良好峰形的前提下，避免了高盐浓度可能带来的系统风险，实现了分析可靠性、灵敏度与操作稳健性的最佳平衡。

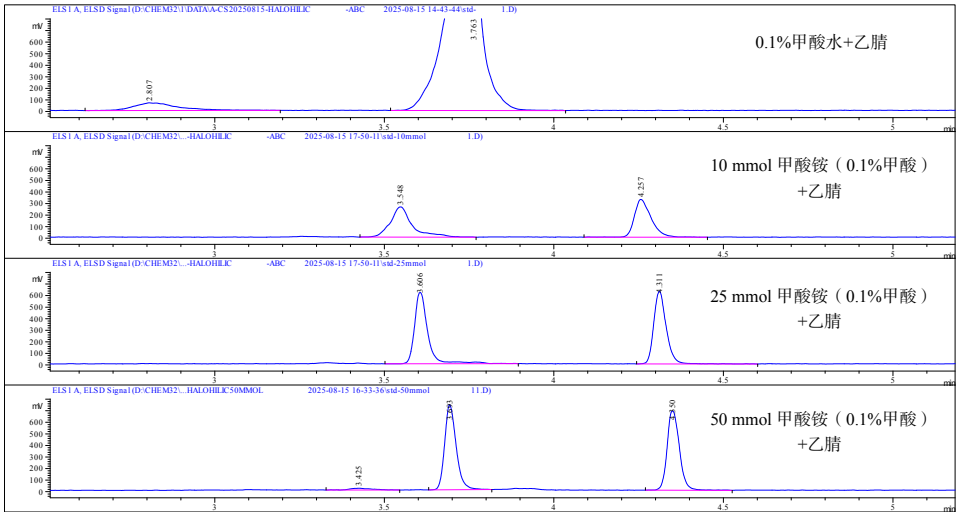


图 5 不同流动相水相浓度下的目标物出峰情况

表 6 目标物在不同流动相水相浓度下的色谱响应、柱效及峰形统计表（n=3）

化合物	甲酸铵浓度/（mmol/L）	保留时间/min	分离度	峰面积	理论塔板数	拖尾因子
硫酸软骨素	水	3.763	/	10705.2	5083	0.752
	10	3.548	/	1180.7	21717	1.448

	25	3.606	/	1677.0	49019	1.276
	50	3.693	/	1737.9	27128	1.282
盐酸氨基葡萄糖	水	/	/	/	/	/
	10	4.257	7.95	1122.6	36412	1.431
	25	4.311	11.16	1611.0	67125	1.223
	50	4.350	10.74	1732.1	44857	1.190

1.2 检测器条件

1.2.1 雾化室温度的优化

本方法对蒸发光散射检测器（ELSD）的雾化室温度进行了系统优化，旨在提升目标化合物的检测灵敏度并改善色谱行为。实验在 60℃、70℃、80℃及 90℃四个温度水平下，分别考察了硫酸软骨素与盐酸氨基葡萄糖的峰面积、拖尾因子的变化。

结果表明（表 7），雾化室温度对两化合物的响应强度、峰形均有显著影响。在 60℃至 90℃范围内，两化合物的响应强度均在 70℃时达到最佳，表明该温度下电离效率最高。在峰形对称性方面，硫酸软骨素在 60℃时拖尾因子最优，而盐酸氨基葡萄糖则在 70℃时峰形最为对称。

综合各项指标，70℃条件下两目标物均表现出较高的响应强度，同时具备良好的峰形与柱效，在检测灵敏度、色谱分离效能及系统稳定性之间取得了最佳平衡。该温度既可确保待测组分充分雾化与检测，又能避免温度过高引起的柱效下降或背景噪音增加。因此，本方法确定选择 70℃作为 ELSD 雾化室的最佳工作温度。

表 7 目标物在不同雾化室温度下的色谱响应及峰形统计表（n=3）

化合物	雾化室温度/℃	峰面积	拖尾因子
硫酸软骨素	60	1496.8	1.253
	70	1628.8	1.323
	80	1625.3	1.333
	90	1510.9	1.395
盐酸氨基葡萄糖	60	1080.2	1.278
	70	1152.5	1.231
	80	1146.4	1.287
	90	1131.8	1.327

1.2.2 漂移管温度的优化

本研究通过系统优化蒸发光散射检测器（ELSD）的漂移管温度，以确立同时适用于硫酸软骨素与盐酸氨基葡萄糖检测的最佳工作参数。实验在 80℃至 120℃范围内以 10℃为间

隔设置五个温度水平，对两化合物的色谱响应及峰形对称性进行了系统评估。

结果表明，漂移管温度对两目标化合物的色谱行为具有显著影响。硫酸软骨素的响应值随温度升高呈逐步下降趋势，在 80℃时达到最高；峰形在 80℃时符合定量分析要求。盐酸氨基葡萄糖的响应受温度影响更为明显，响应值在 80℃时最高，并随温度升高显著降低；峰形在 80℃及 90℃条件下均表现良好。

综合各项色谱指标，80℃条件下两化合物均获得最高检测响应，且两者的峰形均满足分析要求。此外，相对较低的漂移管温度有助于降低背景噪声、减少因溶剂蒸发引起的信号波动，并可延长检测器使用寿命，有利于分析方法长期稳定运行。因此，本研究最终确定 ELSD 漂移管温度为 80℃。

表 8 目标物在不同漂移管温度下的色谱响应及峰形统计表（n=3）

化合物	漂移管温度/℃	峰面积	拖尾因子
硫酸软骨素	80	1262.4	1.308
	90	1254.7	1.393
	100	1247.3	1.366
	110	1241.9	1.318
	120	1239.5	1.326
盐酸氨基葡萄糖	80	1457.3	1.299
	90	1355.9	1.235
	100	1332.6	1.327
	110	1229.1	1.301
	120	1122.3	1.296

1.2.3 雾化气（N_2）流速的优化

本方法对蒸发光散射检测器（ELSD）的载气流速进行了方法优化，旨在平衡检测灵敏度与色谱分离效能。实验在 1.50 至 1.70 L/min 范围内选取四个水平，评估了硫酸软骨素和氨基葡萄糖的色谱响应及峰形。

数据分析表明（图 6，表 9），载气流速升高对两种化合物的检测灵敏度均产生明显抑制，其峰面积呈系统性下降。在 1.50 L/min 条件下，两目标物均呈现最高的色谱响应，且峰形满足定量分析要求。因此，为优先保证检测灵敏度并兼顾整体色谱性能，本方法确定 ELSD 的最佳载气流速为 1.50 L/min。

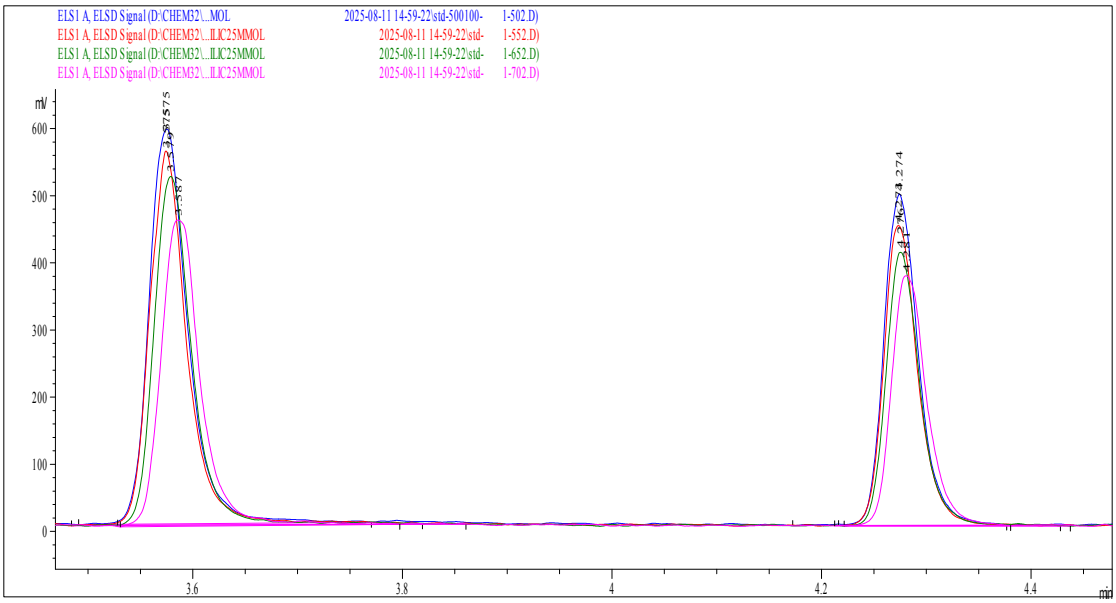


图 6 不同载气流速下的目标物出峰情况

表 9 目标物在不同气流速下的色谱响应及峰形统计表（n=3）

化合物	气流速/(mL/min)	峰面积	拖尾因子
硫酸软骨素	1.50	1534	1.302
	1.55	1419	1.354
	1.65	1321.2	1.302
	1.70	1208.8	1.346
盐酸氨基葡萄糖	1.50	1137.6	1.280
	1.55	1023.8	1.280
	1.65	935.9	1.317
	1.70	880.3	1.322

1.2.4 优化后的仪器条件

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 11。

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 11 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

3 方法学考察

3.1 方法适用性研究

根据《中华人民共和国药典》2025 年版通则 0512《色谱法》对系统适用性试验的规定，对本方法进行了系统适用性验证。采用混合对照品溶液（硫酸软骨素 A，500 mg/L）连续进样 6 针，对关键色谱参数进行考察，结果如下表（表 11）。

硫酸软骨素的保留时间相对标准偏差（RSD）为 0.06%，峰面积 RSD 为 1.93%，理论塔板数均大于 29000。盐酸氨基葡萄糖的保留时间 RSD 为 0.10%，峰面积 RSD 为 1.70%，理论塔板数均大于 34000。上述结果表明，方法保留时间精密度优异，重复性符合药典对定量分析的一般要求。两目标峰之间的分离度介于 10.07 至 10.73 之间，平均值大于 10，远高于药典规定的基线分离标准。硫酸软骨素的平均拖尾因子为 1.085，虽略高于通则 0512 推荐的理想范围,但在使用蒸发光散射检测器的 HILIC 方法中,因检测机理特性,拖尾因子在 0.8-1.5 范围内均可接受，且各针峰形稳定，不影响准确定量。

综上所述，本方法的色谱系统在理论塔板数、分离度、重复性等关键指标上均满足《中国药典》相关规定，系统适用性良好，可用于样品的准确分析与测定。

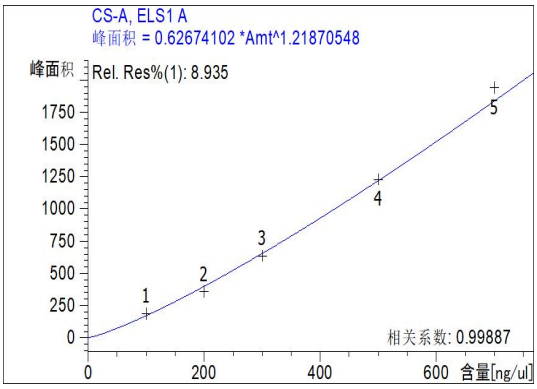
表 11 系统适应性数据信息表

化合物	保留时间 /min	峰面积	拖尾因子	分离度	理论塔板数（半峰宽法）
硫酸软骨素	3.897	1113.1	1.0979	/	30520
	3.899	1134.5	1.0519	/	29605
	3.898	1097.4	1.0604	/	31532
	3.899	1157.3	1.1489	/	29599
	3.901	1107.4	1.0906	/	30092
	3.904	1095.1	1.0621	/	31129
盐酸氨基葡萄糖	4.890	1267.3	1.0029	10.70	40661
	4.884	1275.2	1.0823	10.07	34247
	4.891	1237.2	0.9884	10.57	37855
	4.889	1257.4	1.0823	10.36	37829
	4.896	1248.9	0.9800	10.50	38485
	4.897	1229.8	1.0087	10.73	37435

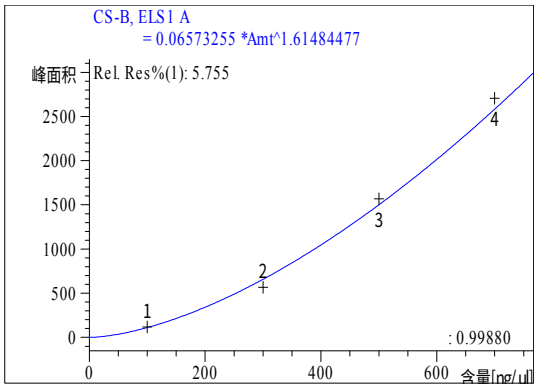
3.2 线性和线性范围

本方法采用系列浓度标准溶液建立了各目标化合物的定量校准曲线（表 7）。分别精密称取硫酸软骨素 A、硫酸软骨素 B、硫酸软骨素 C、多硫酸软骨素及盐酸氨基葡萄糖对照品，用乙腈：水（1：9）稀释，配制涵盖其预期定量范围的系列浓度标准工作溶液，按确立的色谱条件进样分析。

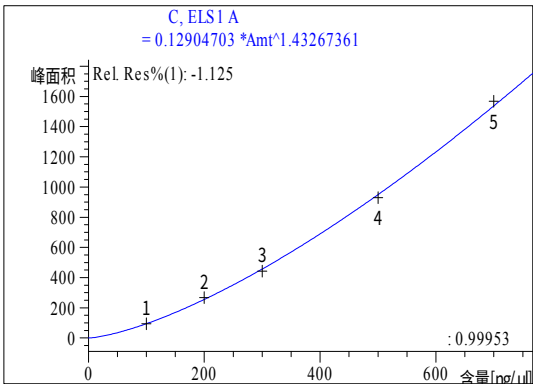
以各目标化合物的峰面积（y）对其质量浓度（x，mg/L）进行回归分析。结果表明（表 12），在实验浓度范围内，各成分的响应与其浓度之间呈现良好的幂函数关系，所有校准曲线的相关系数（r）均大于 0.999，表明线性关系良好，覆盖范围适当，可用于样品中相应成分的准确定量。



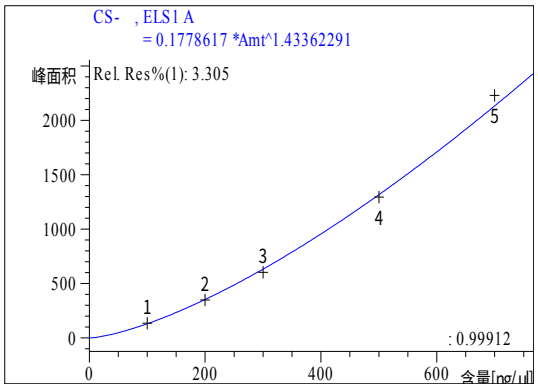
硫酸软骨素 A



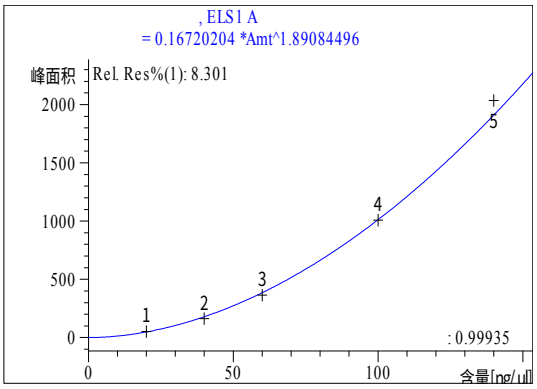
硫酸软骨素 B



硫酸软骨素 C



多硫酸软骨素



盐酸氨基葡萄糖

图 7 各目标物标准曲线

表 12 各目标化合物校准曲线、相关系数和线性范围信息

化合物	校准曲线	相关系数	线性范围（mg/L）
硫酸软骨素 A	$y=0.62674102x^{1.2187}$	0.9988	100.0-700.0
硫酸软骨素 B	$y=0.06573255x^{1.6148}$	0.9988	
硫酸软骨素 C	$y=0.12904703x^{1.4327}$	0.9995	
多硫酸软骨素	$y=0.1778617x^{1.4336}$	0.9991	
盐酸氨基葡萄糖	$y=0.16720204x^{1.8908}$	0.9993	20.0-140.0

3.3 不同来源硫酸软骨素峰面积响应差异分析

本方法采用浓度均为 500 mg/L 的硫酸软骨素 A、B、C 及多硫酸软骨素对照品溶液，在相同色谱条件下进行高效液相色谱-蒸发光散射检测器（HPLC-ELSD）分析，通过比较各目标化合物在等浓度下的峰面积响应值，评估其在 ELSD 检测器上的响应行为差异（图 8，表 14）。

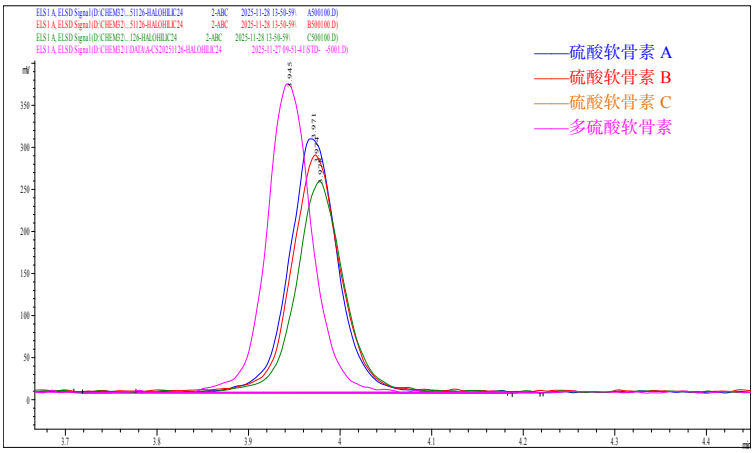


图 8 同一浓度下不同来源硫酸软骨素液相色谱图

表 14 不同来源硫酸软骨素峰面积响应数据

化合物名称	峰面积
硫酸软骨素 A	1158.3
硫酸软骨素 B	1126.2
硫酸软骨素 C	1007.1
多硫酸软骨素	1293.2

根据测定结果，以硫酸软骨素 A 的峰面积响应值为基准进行归一化处理，得到各样品相对响应比值分别为：硫酸软骨素 B 0.97，硫酸软骨素 C 0.87，多硫酸软骨素 1.12。

数据表明，在本研究建立的色谱条件下，不同结构类型的硫酸软骨素在 ELSD 检测器中呈现出特征性的响应差异。ELSD 作为一种通用型质量检测器，其响应机制符合《中国药典》通则 0511 等相关指导原则的描述，即响应信号主要取决于色谱洗脱组分中不挥发性溶质的质量浓度，及其形成的气溶胶颗粒的光散射效率，且通常呈现非线性关系。因此，观测到的峰面积差异直接反映了各组分在检测过程中产生光散射信号的“有效质量”不同。

具体而言，硫酸软骨素 B 的响应比值与 A 极为接近，表明二者在该分析体系中的质量-响应行为高度一致。这与文献报道相符，即硫酸软骨素 A 与其异构体 B（硫酸皮肤素）在分子量范围及整体理化性质上相近，因此在特定色谱条件下常表现出相似的洗脱与响应特性。硫酸软骨素 C 的响应比值相对较低，提示其在该条件下的有效散射质量或行为存在区别，此差异可能源于其特定的硫酸化模式或分子结构等固有性质对色谱保留或气溶胶形成效率的影响。多硫酸软骨素作为混合物，其响应值最高，可能归因于其样品中总的不挥发性溶质质量浓度较高，或平均分子量分布不同等因素，共同导致了更强的光散射信号。

上述响应差异客观证实，不同硫酸软骨素组分因其固有的化学结构差异，在 ELSD 检测中遵循不同的响应规律。因此，为满足药品质量控制中对分析方法专属性和准确性的根本要求，在进行准确定量分析时，必须遵循“标准品与待测物一致”的原则，即需使用与分析目标物完全对应的对照品，独立建立各自的校准曲线，以确保测定结果的可靠性。

3.4 回收率和精密度

本研究从日常检测收集的 25 批硫酸软骨素样品中，筛选出 14 批符合原料及初加工产品基质的样品作为检测对象。样品信息见表 15。

表 15 硫酸软骨素样品信息表

编号	样品名称	申报纯度	生物来源
1	鲨鱼软骨素	未知	鲨鱼
3	硫酸软骨素	未知	未知
4	软骨素粗粉（J）	未知	未知
6	软骨提取物	未知	未知
7	软骨提取物	未知	猪
10	硫酸软骨素	91%-93%之间	猪
11	软骨二型胶原蛋白	未知	猪、牛
12	硫酸软骨素	91.60%	猪
13	软骨素	未知	猪、牛、鸡、鸭
14	硫酸软骨素	未知	猪、鸭、鸡
16	硫酸软骨素钠	未知	未知
21	硫酸软骨素样品	≥90%	鲨鱼
22	硫酸软骨素样品	≥90%	牛
23	硫酸软骨素样品	≥90%	鱼
24	硫酸软骨素样品	≥90%	鸡牛混合
25	硫酸软骨素钠	未知	猪

本方法通过加标回收试验系统评估了方法的准确度与精密度。试验设计以样品来源与化学结构的客观差异为依据。文献表明，不同生物来源的硫酸软骨素在其主导的化学结构上存在显著区别：牛等陆生动物软骨提取物中以 4-硫酸化的硫酸软骨素 A 为主，而鲨鱼软骨中则富含 6-硫酸化的硫酸软骨素 C。为验证本方法对不同结构目标物定量的通用性与准确性，试验选取了 21 号（鲨鱼源）、22 号（牛源）和 24 号（鸡牛混合来源）三批代表性原料。针对其化学特征，分别采用结构匹配的定量对照品：对鲨鱼源样品以硫酸软骨素 C 为对照，对牛源样品以硫酸软骨素 A 为对照。对于组成复杂的混合来源样品，则采用多硫酸软骨素进行综合定量分析，以同步验证不同定量途径的可靠性。

试验设置了低、中、高三个添加浓度水平，每个水平进行 6 次平行测定，具体数据见表 16。

在准确度方面，所有加标回收实验结果均处于理想范围内。如表 16 所示，在 2.5%、5.0%、10.0%三个添加水平下，平均回收率结果介于 94.2%至 102.4%之间。所有回收率数据均在《中国药典》分析方法验证指导原则通常可接受的 80%-120%范围内，且绝大多数接近 100%，充分证明了该分析方法测定结果的准确性高，系统误差小。

在精密度方面，各添加水平下 6 次平行测定的相对标准偏差（RSD）均小于 2.0%（范围 0.67%~1.95%）。该结果远低于常规含量测定对精密度的接受标准，表明该方法在重复测定中具有出色的重现性与稳定性。

结论：综合来看，本方法对于不同动物来源的硫酸软骨素原料中特定组分（硫酸软骨素 A、C、多硫酸软骨素）及盐酸氨基葡萄糖的测定，在 2.5%至 10.0%的添加范围内，均展现出高准确度与高精密度，符合药品质量控制分析的要求，适用于相关样品的准确定量。

表 16 不同来源样品加标回收实验结果

样品名称及来源	添加目标物	添加水平/mg/L	样品序号	溶液浓度/（mg/L）	回收率/%	平均值/%	RSD/%
21 号硫酸软骨素原料（鲨鱼源）	硫酸软骨素 C	12.5	1	485.8	102.1	100	1.83
			2	490.8	99.4		
			3	496.4	100.1		
			4	499.2	101.7		
			5	489.9	99.6		
			6	529.5	97		
		25	1	557.5	102.7	102.4	1.89
			2	509.7	100		
			3	525.2	102.3		
			4	510.1	105.7		
			5	511.4	102.6		
			6	500.2	101.1		
		50	1	563.8	101.1	101.5	1.95
			2	581.3	102.3		
			3	553.2	100.1		
			4	561.2	99.5		
			5	559.9	105		
			6	548.5	101		
		样品空白	/	496.3	/	/	/
样品名称及来源	添加目标物	添加水平/mg/L	样品序号	溶液浓度/（mg/L）	回收率/%	平均值/%	RSD/%
22 号硫酸软骨素原料	硫酸软骨素 A	12.5	1	515.5	96.7	95.3	1.8
			2	520.6	93		
			3	500.0	93.3		

（牛源）			4	479.7	95.8		
			5	494.9	97		
			6	472.2	95.9		
		25	1	488.3	100.4	99.5	1.84
			2	488.3	101.1		
			3	493.7	99.6		
			4	498.8	95.9		
			5	498.0	99.9		
			6	497.2	100.3		
		50	1	523.9	101.2	101.2	0.93
			2	540.7	101.8		
			3	516.0	99.7		
			4	519.8	100.7		
			5	534.1	101.7		
			6	523.9	102.3		
		样品空白	/	487.6	/	/	/
样品名称及来源	添加目标物	添加水平/mg/L	样品序号	溶液浓度/（mg/L）	回收率/%	平均值/%	RSD/%
24 号硫酸软骨素原料（鸡牛混合源）	多硫酸软骨素	12.5	1	392.1	95.4	94.2	1.94
			2	402.9	97.3		
			3	387.3	93.4		
			4	388.7	93.2		
			5	375.1	93.3		
			6	394.7	92.5		
		25	1	404.1	100.3	101	0.7
			2	395.1	101.9		
			3	404.4	101.4		
			4	394.8	100.7		
			5	401.3	101.6		
			6	405.7	100.4		
		50	1	427.8	99.7	100	1.2
			2	429.0	98.4		
			3	418.5	100.7		
			4	415.0	100.3		
			5	414.1	101.9		
			6	422.8	99.3		
		样品空白	/	370.7	/	/	/
	盐酸氨基葡萄糖	25	1	25.6	99.2	100.7	0.92
			2	25.3	100.4		
			3	26.1	101.2		
			4	25.6	101.6		
			5	25.7	100.4		
			6	26.3	101.6		

		50	1	52.4	102	101.4	0.67
			2	52.5	101.8		
			3	50.4	100.4		
			4	50.4	101.2		
			5	50.0	100.8		
			6	51.8	102		
		样品空白	/	0.0	/	/	/

3.5 定量限

本方法检出限（LOD）与定量限（LOQ）的确认，依据《中国药典》通则“9101 药品质量标准分析方法验证指导原则”，采用其中规定的信噪比法进行测定。具体操作如下：通过连续稀释，配制一系列浓度接近或低于预期检出限的标准溶液进行分析。将目标物色谱峰的响应信号与同色谱图中基线噪声的强度进行比较，计算信噪比（S/N）。以满足信噪比 S/N ≥ 3 的最低浓度确定为方法的检出限；以满足信噪比 S/N ≥ 10 的最低浓度确定为方法的定量限。硫酸软骨素与氨基葡萄糖的检出限与定量限测定结果见表 13。

表 13 方法的检出限与定量限数据结果

化合物名称	检出限/%	信噪比	定量限/%	信噪比
硫酸软骨素 A	2.5	3.1	7.5	10.2
硫酸软骨素 B	2.5	3.4	7.5	10.5
硫酸软骨素 C	3.0	3.1	9.0	10.3
多硫酸软骨素	2.5	3.6	7.5	10.7
盐酸氨基葡萄糖	0.6	3.5	2.0	12.9

测定结果表明，所有目标化合物在确定的检出限浓度下，其信噪比（S/N）均介于 3.1 至 3.6 之间，满足《中国药典》通则 9101 中对“检出”的基本要求；在确定的定量限浓度下，其信噪比均介于 10.2 至 12.9 之间，满足对“定量”的精密度与准确度要求。以上数据充分证明，本方法对各目标组分的灵敏度符合《中国药典》对含量测定方法的有关规定，能够在所确认的浓度水平上实现可靠检出与准确定量。

三、试验验证的分析

1 实际样品测定

采用本方法对日常收集的 14 批硫酸软骨素样品进行分析，结果显示样品含量差异较大，分布在 25.4% 至 95.1% 之间（见表 17），这反映了不同来源或不同工艺原料的实际纯度范

围。所有样品三次平行测定的相对标准偏差（RSD）均低于 2.0%，表明本方法具有良好的重现性与精密度。值得注意的是，高纯度样品的 RSD 低至 0.06%，展现了方法在接近纯品水平测定时的高稳定性；而在中低含量区间，方法的 RSD 也维持在较低水平，证明其在不同浓度范围内均具备可靠的定量能力。结合前期加标回收试验数据，本方法在准确度与精密度上均满足分析要求，适用于日常多种来源硫酸软骨素样品的质量控制。

表 17 实际样品检测数据

样品号	含量/%			平均值/%	相对标准偏差/%
	1	2	3		
1	61.9	61.6	62.3	61.9	0.55
3	63.6	63.3	62.8	63.2	0.70
4	66.6	66.7	67.8	67.0	1.06
6	25.1	25.3	25.9	25.4	1.66
7	28.9	29.4	28.4	28.9	1.79
10	79.6	80.3	79.0	79.6	0.76
11	38.5	39.0	39.8	39.1	1.70
12	82.2	79.4	80.8	80.8	1.71
13	83.9	81.6	81.9	82.4	1.50
14	84.6	85.2	83.6	84.4	0.94
16	79.2	78.6	79.6	79.1	0.63
21	91.2	91.3	91.1	91.2	0.11
22	95.1	95.0	95.1	95.1	0.06
23	85.4	83.6	85.9	85.0	1.43
24	73.5	74.7	74.6	74.3	0.91
25	79.0	80.9	79.4	79.8	1.24

2 方法显著性差异实验

选取 25 号样品，将建立的 HPLC-ELSD 检测方法与《中国药典》硫酸软骨素钠项下酶解方法开展比对试验，每种方法分别进行 3 次平行测定。在 95% 置信水平下，采用独立样本双尾 t 检验对两组测定数据进行统计学分析，试验结果见表 18。由表可知，两种方法测得的硫酸软骨素含量水平相近；计算所得 t 值小于 95% 置信水平对应的 t 临界值（2.78），说明两种检测方法的测定结果无显著性差异。

表 18 本方法与酶解法比较

样品编号	化合物名称	方法	检测结果/%			结果平均值/（mg/kg）	T 值
			1	2	3		
25	硫酸软骨素	本方法	63.5	64.5	65.1	64.4	1.29

		酶解法	62.4	63.6	64.3	63.4	

3 实验室间验证

为验证本方法的精密度，分别对重复性与再现性进行了系统考察。重复性系指在相同实验室内，由同一操作人员使用同一仪器设备，依据既定分析方法，在短时间间隔内对同一均质样品进行六次独立测定（n=6），结果以相对标准偏差（RSD）表示。再现性则在五个不同实验室间进行考察，由各实验室分别独立完成对同一被测对象的测试，以评估方法在不同实验环境下的稳定性。相关精密度数据汇总于表 19。

此外，为验证方法在实际混合样品中的适用性，实验室自行制备了硫酸软骨素与盐酸氨基葡萄糖的混合模拟样品。具体方法为：准确称取已知硫酸软骨素含量为 74.3%的 24 号样品（经 105℃，4h 干燥后）20.08 克，加入高纯度盐酸氨基葡萄糖参比物质 5.004 克，经充分研磨与混合，制得混合样品，供后续方法学测定使用。

表 19 实验室间验证数据

样品名称	检出化合物	验证实验室检测结果/%					平均结果/%	相对标准偏差/%
		1	2	3	4	5		
21 号样品（鲨鱼源）	硫酸软骨素	95.0	95.3	96.3	96.0	95.9	95.7	0.56
22 号样品（牛源）	硫酸软骨素	89.3	91.2	89.6	90.9	90.2	90.2	0.90
混合样品（混合来源）	硫酸软骨素	58.1	58.9	57.0	58.4	59.0	58.3	1.38
	盐酸氨基葡萄糖	20.5	20.4	20.2	20.4	20.6	20.4	0.73

根据表 19 数据可知，五个实验室对 21 号（鲨鱼源）样品中硫酸软骨素的检测结果平均值为 95.7%，实验室间相对标准偏差（RSD）为 0.56%；对 22 号（牛源）样品的检测结果平均值为 90.2%，实验室间 RSD 为 0.90%。两项 RSD 均远低于《中国药典》对含量测定方法精密度的常规要求，表明该方法对于组成明确的样品，在不同实验室间具有高度的再现性与可比性。

对于自制的混合样品，盐酸氨基葡萄糖的平均含量为 20.4%，实验室间 RSD 为 0.73%，再现性良好。硫酸软骨素的平均含量为 58.3%，实验室间 RSD 为 1.38%。该值虽因基质复杂度增加而略高于前两者，但仍完全符合《中国药典》对含量测定方法精密度的可接受标准，证明该方法对于复杂基质样品同样具有可靠的适用性。

综上，实验室间验证数据表明，本方法的精密度良好，其重复性与再现性均满足《中国药典》相关要求，适用于对不同来源及基质样品中目标化合物进行准确、可靠的协同检测与质量控制。

四、与国际、国外同类标准水平的对比情况

本标准没有采用国际标准。

本标准制定过程中未查到同类国际、国外标准。

本标准制定过程中未测试国外的样品。

五、以国际标准为基础的起草情况

无。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及国内外相关专利和知识产权问题。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本制修订标准替代原标准 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》。

本标准作为推荐性国家标准上报。建议本标准批准发布6个月后实施，作好标准的宣贯和咨询解答工作。

十、其他应当说明的事项

经对照《公平竞争审查条例》逐一审查，该标准没有影响或限制公平竞争的条款，符合审查要求。本标准不存在版权风险。