

T/JTAIT

吉林省检验检测技术协会团体标准

T/JTAIT XXXX—2024

硫酸软骨素结构鉴别及含量测定

Structural identification and content determination of chondroitin sulfate

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

吉林省检验检测技术协会 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。

本文件由吉林省检验检测技术协会提出并归口。

本文件起草单位：吉林省产品质量监督检验院。

本文件主要起草人：

硫酸软骨素结构鉴别及含量测定

1 范围

本文件规定了用红外光谱鉴别硫酸软骨素结构及液相色谱法测定硫酸软骨素含量测定的方法。

本文件适用于从牛、猪和鱼等动物软骨组织中提取的硫酸软骨素的鉴别及含量测定方法。

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，仅对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

GB/T 21186 傅立叶变换红外光谱仪

3 原理

利用硫酸软骨素分子中羟基、酰胺基、氨基、羧基及磺酸基等化学键的泛频振动或转动对近红外光的吸收特性鉴定硫酸软骨素，经鉴定的硫酸软骨素用乙腈分散均匀，以水溶解，经液相色谱分离后，在波长192 nm测定，外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 溴化钾：优级纯。

4.3 乙腈：色谱级。

4.4 戊烷磺酸钠：纯度 $\geq 99.5\%$ 。

4.5 硫酸软骨素标准品（CAS 号：9007-28-7）：纯度 $\geq 98\%$ ，结构式参见附录 A。

4.6 硫酸软骨素标准储备溶液:称取 25.0 mg 经 105℃干燥 4 h 的硫酸软骨素标准品于烧杯中,加入 5.00 mL 乙腈,振使其分散均匀,再加入水,用超声波使其溶解,转移至 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,硫酸软骨素浓度约为 0.50 mg/mL,避光 2℃~8℃保存 1 个月内使用。

4.7 硫酸软骨素标准系列工作溶液:准确吸取硫酸软骨素标准储备溶液 0.10 mL、0.20 mL、0.40 mL、1.00 mL、2.00 mL、4.00 mL 和 10.0 mL,用水定容至 10.0 mL,配制成质量浓度分别为 5.00mg/mL、10.0 mg/mL、20.0 mg/mL、50.0 mg/mL、100 mg/mL 和 200 mg/mL 的标准系列工作溶液。临用现配。

4.8 戊烷磺酸钠溶液:称取 1.74 g 戊烷磺酸钠溶液用 1000 mL 水溶解,该溶液的浓度为 10 mmol/L。

5 仪器和设备

5.1 高速台式离心机。

5.2 分析天平:感量为 0.001g 和 0.0001g。

5.3 天平:感量 0.1mg。

5.4 傅立叶红外光谱仪:符合 GB/T 21186 的要求。

5.5 超声波发生器。

5.6 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.7 有机微孔滤膜:0.22 μm。

6 硫酸软骨素的鉴别

6.1 样品前处理

将固体样品在105℃下干燥4 h,分别将试样和溴化钾研磨到粒度小于2 μm,称取2.0 mg试样与200 mg溴化钾粉末混合均匀,置于模具中,在油压机上压成透明薄片,待测定。

6.2 红外光谱条件

红外光谱扫描范围:4000cm⁻¹~400cm⁻¹;分辨率:4.0cm⁻¹;扫描速度扫描次数:15次。试样采集时扣除空气本底背景。

6.3 结果鉴定

将硫酸软骨素标准品作为阳性对照，当试样红外谱图中，同时存在羟基(-OH)、酰氨基(-C=ON-)、氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)及磺酸基(-SO₃H)特征振动峰时，判定具有硫酸软骨素的基本特征。当有其中一种特征峰未出现，则判定为非硫酸软骨素，不进行含量测定。

硫酸软骨素的红外光谱图官能团特征吸收峰范围见附录 A。

7 硫酸软骨素含量的测定

7.1 试样溶液的制备

称取干燥后的粉末状样品50.0 mg样品于50 mL烧杯中，加入10.0 mL乙腈，使其分散均匀，再加入水，超声波振荡提取10 min，转移至50 mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。试样溶液经0.22 μm有机滤膜过滤，待液相色谱测定。

7.2 色谱条件

流动相：乙腈+戊烷磺酸钠溶液(5+95)。

色谱柱：T3色谱柱，粒径3.5 μm，柱长150 mm，内径2.1 mm。

流速：0.6 mL/min。

检测波长：192 nm。

进样体积：10 μL。

7.3 色谱测定

7.3.1 标准曲线的制作

将标准工作溶液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准工作溶液的质量浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.3.2 试样溶液测定

分别将标准溶液(4.7)、试样溶液(7.1)注入液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中硫酸软骨素的质量浓度。试样标准溶液色谱图参见附录B。

7.4 分析结果的表述

硫酸软骨素的含量按式(1)计算：

$$W = \frac{C \times V}{m \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

W -试样中硫酸软骨素的百分含量,单位为(%) ;

C -从标准曲线上查得试样测定液中的硫酸软骨素的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V -提取液体积,单位为毫升(mL);

m -试样的质量,单位为毫克(mg);

1000-单位换算系数。

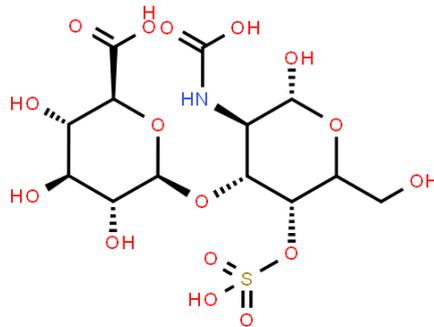
计算结果保留3位有效数字。

7.5 精密度

在重复性条件下,硫酸软骨素获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的0.5%。

附录 A
(资料性附录)

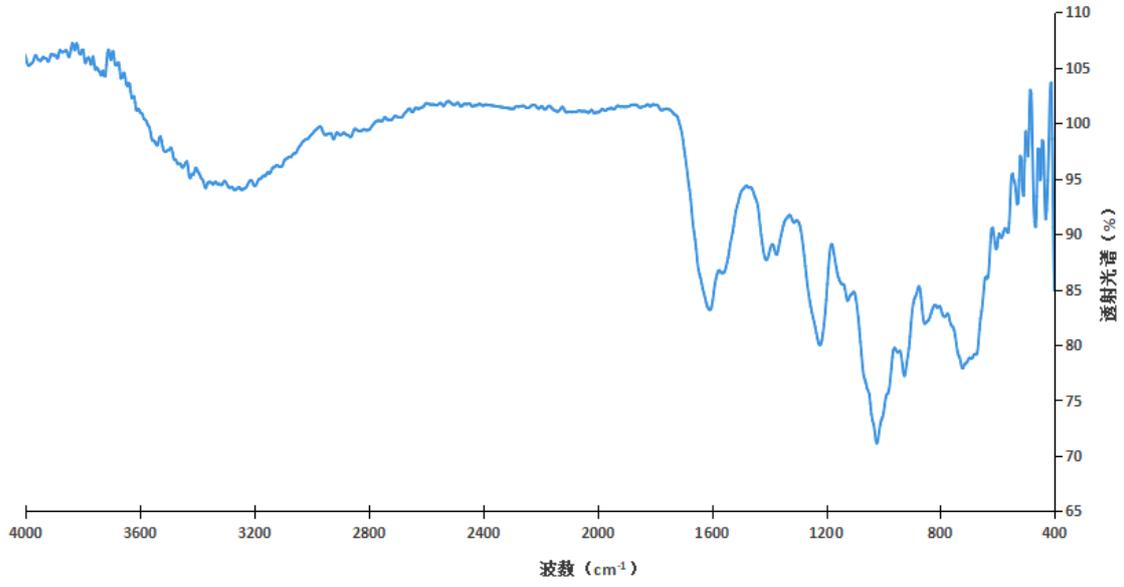
硫酸软骨素结构式见图A.1，官能团红外光谱特征吸收峰以及谱图见表A.1和图A.2。



图A.1 硫酸软骨素结构式

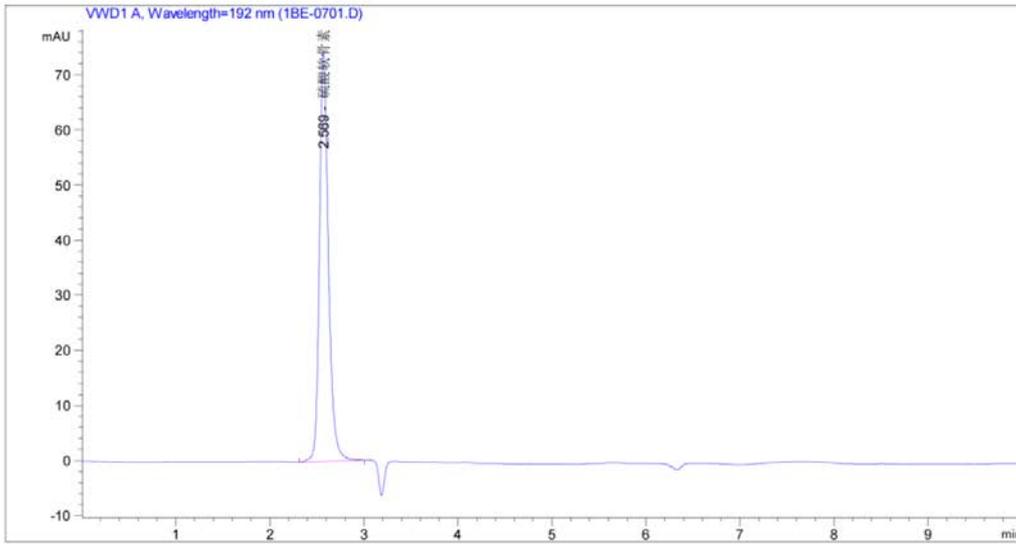
表 A.1 硫酸软骨素红外光谱分析

红外吸收波数/ cm^{-1}	振动方式	官能团
3600-3200	-OH 键伸缩振动	羟基
1260-1000	C-O 伸缩振动	
3500-3100	N-H 键伸缩振动	酰胺基
1700-1630	C=O 伸缩振动	
3500-3300	N-H 伸缩振动	氨基
900-650	N-H 弯曲振动	
1740-1650	C=O 伸缩振动	羧基
3400-3250	-OH 键伸缩振动	
950-900	O-H 键弯曲振动	
1320-1380	S=O 对称伸缩振动	硫酸基
1000-1200	S-O 伸缩振动峰	



图A.2 硫酸软骨素标准品官能团红外光谱特征吸收峰谱图

附录 B
(资料性附录)
标准溶液典型液相色谱图



⋮

图 B.1 标准溶液典型液相色谱图

图B.1 50.0 mg/L硫酸软骨素标准溶液液相色谱图

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。

本文件由吉林省产品质量监督检验院提出。

本文件由吉林省检验检测技术协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：