

[文章编号] 1007-7405(2008)01-0052-05

·综述·

硫酸软骨素测定方法的研究进展

徐传屯^{1,2,3}, 关瑞章^{1,2,3}, 郑江^{1,2,3}

(1 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021; 3 集美大学水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021)

[摘要] 硫酸软骨素的测定方法按其测定指标主要分为软骨素二糖、氨基己糖、葡萄糖醛酸、硫酸基和阴性基团 5 类。比较这 5 种指标认为: 软骨素二糖是硫酸软骨素的组成单位, 与硫酸软骨素含量的相关性最高; 氨基己糖和葡萄糖醛酸是组成软骨素二糖的单糖, 与硫酸软骨素含量的相关性较高; 硫酸基受软骨素二糖硫酸化程度影响大, 与硫酸软骨素含量相关性低; 阳离子染料对硫酸软骨素分子上阴性基团的选择专一性不强, 阴性基团与硫酸软骨素含量的相关性很低。从准确度看, 以软骨素二糖为测定指标的高效液相色谱法准确度最高, 适于质量控制和微量分析; 分别以氨基己糖和葡萄糖醛酸为测定基础的 Elson-Morgan 法和吡嗪法准确度相对较高, 适于一般分析; 而以硫酸基和阴性基团为基础的方法准确度相对偏低。

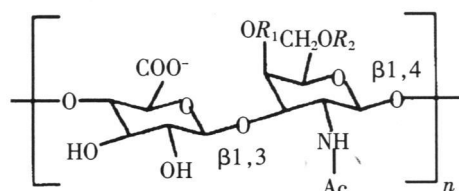
[关键词] 硫酸软骨素; 软骨素二糖; 氨基己糖; 葡萄糖醛酸; 硫酸基; 含量测定
[中图分类号] Q538 [文献标志码] A

0 引言

硫酸软骨素 CS (Chondroitin Sulfate) 是广泛存在于高等动物结缔组织中的酸性粘多糖, 是动物蛋白聚糖的代表物质。因 CS 药用效果良好且毒副作用小, 在欧美等西方国家, 常被用于防治关节炎^[1,2]、高血脂^[3]、肿瘤、心绞痛、偏头痛^[4]、抗动脉粥样硬化^[5]等疾病。

在分子结构上, CS 由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-氨基己糖以 1,3 糖苷键连接形成重复二糖, 二糖单位之间以 β -1,4 糖苷键连接形成糖链, 氨基己糖糖环的 4 位 C 或 6 位 C 可硫酸化 (如图 1), 硫酸化后分别形成硫酸软骨素 A (CS-A) 和硫酸软骨素 C (CS-C)。不同动物软骨中 CS 硫酸化差异较大, 经不同工艺提取而得的产品差异更大。在分子量大小上, CS 具有高度的分散性, 同一提取产品的分子间分子量差异可达 10 倍以上。CS 这些特点都在不同程度上影响了各种测定方法的准确性, 也会进一步影响到实际生产中 CS 产量的确定。因此, 如何快速而准确地测定 CS 的含量成为研究者们研究目标。

自 1933 年 Elson-Morgan 法^[6]面世后, 出现了许多 CS 的测定方法, 各种方法都以 CS 某一化学成分作为测定指标, 进而换算为 CS 的含量。但 CS 分子上各种成分与 CS 二糖单位之间的相关性高低不一, 且各种方法的可操作性、耗时、准确度等也各不相同, 为此, 本文将逐一比较 CS 各种测定方法



CS-A: $R_1=SO_3H, R_2=H$; CS-C: $R_1=H, R_2=SO_3H$

图 1 硫酸软骨素的结构

Fig.1 Structure of chondroitin sulfate

[收稿日期] 2007-07-10

[修回日期] 2007-09-29

[基金项目] 福建省科技厅重点项目 (2002N024); 厦门市科技计划项目 (3502Z20031048)

[作者简介] 徐传屯 (1982-) 男, 硕士生, 主要从事水产养殖生态与病害防治方向研究; 关瑞章 (1953-) 男, 教授, 博导, 主要从事渔业水体生态与病害防治方向研究。E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

的优缺点, 为各研究单位和生产单位选择时提供参考。

1 测定硫酸软骨素的指标物质与方法

根据 CS 的分子结构特点, 研究出以 CS 某一化学成分为测定指标的多种方法, 这些指标包括软骨素二糖、氨基己糖、葡萄糖醛酸、硫酸基、阴性基团等 5 类。以软骨素二糖为指标的方法是通过高效液相色谱测定 CS 降解后产生的软骨素二糖, 以此确定 CS 的含量; 以氨基己糖、葡萄糖醛酸和硫酸基为测定指标的方法原理相似, 多是以强酸降解 CS 的糖链, 将其分子中的氨基己糖、葡萄糖醛酸或硫酸基等基团与成色物质结合, 测定溶液特征吸光值, 再根据各基团与软骨素二糖单位的分子量之比换算为 CS 含量; 而以阴性基团为基础的方法则利用阳性染料或乳化剂与 CS 分子中羧基和硫酸基等阴性基团反应, 致使 CS 溶液在特定波长处吸收值改变, 从而测定 CS 含量。

1.1 以软骨素二糖为指标

软骨素二糖的含量通常可采用高效液相色谱法^[7]、酶解—高效液相色谱法^[8]、反相离子对高效液相色谱法^[9]和反相高效液相色谱法测定^[10]。在超声波作用下^[7,9-10]或在软骨素酶作用下^[8]使 CS 降解成软骨素二糖单位, 记录软骨素二糖溶液经过色谱柱的洗脱曲线, 将样品的出峰时间和峰面积 (或峰高) 与标准品比较, 以此确定其含量 (软骨素二糖是 CS 的基本组成单位, 理论上其含量与 CS 相等)^[12]。

1.2 以氨基己糖为指标

测定氨基己糖的经典方法是 Elson-Morgan 法^[9], 该方法以盐酸氨基己糖作对照品, 利用盐酸水解 CS 释放出氨基己糖, 而氨基己糖在碱性条件下先与乙酰丙酮缩合, 其产物与对二甲氨基苯甲醛的醇溶液结合后显红色, 于特定波长处测定吸光值, 计算样品中氨基己糖含量, 再根据氨基己糖与软骨素二糖单位之间的分子量之比换算成 CS 含量。

1.3 以葡萄糖醛酸为指标

以葡萄糖醛酸为指标的 CS 测定方法包括吡啶法^[13]、间苯三酚分光光度法^[14]和 AHMT 分光光度法^[15]等。在酸性条件下降解 CS 生成与其软骨素二糖单位摩尔数相等的葡萄糖醛酸, 再加入吡啶、间苯三酚和 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1, 2, 4-三唑 (AHMT) 等色原物质与葡萄糖醛酸显色, 最后测定反应液特定波长处吸收值, 以葡萄糖醛酸^[13]或 CS 标准品^[14-15]为对照制作标准曲线, 转换为葡萄糖醛酸含量, 根据葡萄糖醛酸与软骨素二糖之间的分子量之比换算成 CS 含量。

1.4 以硫酸基为指标的测定方法

CS 中硫酸基的测定方法主要有离子色谱法^[16]和间接原子吸收法^[17]等。这两种方法首先以强酸降解 CS 生成游离硫酸基, 前者以离子色谱检测经分离的反应液中的硫酸基与软骨素二糖的分子量之比计算 CS 含量; 后者以已知过量的钡离子与降解 CS 产生的游离硫酸基反应, 再通过原子吸收光谱法测定过量的钡离子, 换算出 CS 样品中硫酸基含量, 然后计算 CS 含量。

1.5 以阴性基团为指标的方法

以阴性基团为测定指标的方法主要有碱性艳蓝 BO 分光光度法^[18]、吡啶橙分光光度法^[19]、维多利亚蓝 B 分光光度法^[20]、中性红分光光度法^[21]、天青 A 分光光度法^[22]和噻唑衍生物法^[23]等阳离子染料法以及比浊法^[24-25]。阳离子染料类方法利用 CS 分子上携带的羧基和硫酸基与碱性艳蓝 BQ 吡啶橙、维多利亚蓝 B、中性红、天青 A 和溴化 1-乙基-2-3-(1-乙萘酚 [1, 2] 噻唑-2-甲基丙基) 萘酚- [1, 2] 噻唑等阳离子染料通过静电力和疏水作用结合生成离子复合物, 导致染料本身在特征吸收峰处吸光值改变, 而吸光值改变程度与 CS 含量相关, 因此将测得的吸光值带入由 CS 标准品制作的标准曲线, 可计算样品 CS 含量。比浊法则利用乳化剂氯化十六烷基吡啶可与 CS 分子上阴性基团结合的特点形成乳浊液, 该乳浊液在其特征吸收波长处吸光值与 CS 含量相关, 由此测定 CS 含量。

2 各种测定指标物质及其方法的优缺点

2.1 测定指标物质的比较

目前, CS的含量测定方法均是以其分子上某一种特定化学成分为指标, 进而转化为 CS含量, 因此指标选择得恰当与否将直接影响方法本身的准确性.

在软骨素二糖、氨基己糖、葡萄糖醛酸、硫酸基和阴性基团等几类测定指标中, 硫酸基与 CS的相关性最低, 通过硫酸基的含量转化为 CS含量所带来的误差也最大. 而在其余 4种测定指标中, 软骨素二糖含量不需转化, 实验测得值与 CS含量最为接近, 软骨素二糖含量与 CS含量的相关性最高. 此外, 至今尚未见有 CS分子中氨基己糖或葡萄糖醛酸残缺的报道, 而这两种成分分子量也远高于硫酸基, 所以氨基己糖和葡萄糖醛酸与 CS含量的相关性也较高. 以阴性基团为测定指标的一类方法通过阳离子染料或乳化剂可与 CS分子上的羧基和硫酸基结合致使染料或溶液发生变化来测定 CS含量. 但各种阳离子染料和乳化剂对 CS分子上的阴性基团选择的专一性不强, 受溶液中其他阴离子和 CS分子大小的影响大. 因此以阴性基团为指标测定 CS含量的方法准确度难以得到保证.

总的来说, 在软骨素二糖、氨基己糖、葡萄糖醛酸、硫酸基和阴性基团等几类测定指标中, 以软骨素二糖与 CS含量的相关性最高, 氨基己糖和葡萄糖醛酸次之, 硫酸基和阴性基团最差.

2.2 方法的优缺点比较

CS测定方法的优缺点比较可从其准确度高、方法对仪器和试剂的要求是否高、操作是否烦琐以及耗时长短等方面进行考察. 为了更加清楚、直观地比较 CS各种测定方法的优缺点, 将各种方法的测定原理和优缺点列于表 1.

表 1 硫酸软骨素主要测定方法的原理和优缺点

Tab 1 The Principle advantage and shortcoming of main determination method of chondroitin sulfate

测定指标	原 理	方法名称	优 点	缺 点
软骨素二糖	超声溶解 ^[7,9-10] 或酶降解 ^[8] 的 CS溶液洗脱曲线的峰面积(高)与 CS标准品比较, 计算样品 CS含量	高效液相色谱法	准确度高, 操作简单, 耗时短	对仪器和试剂要求高, 测定需用高效液相色谱, 试剂均需分析纯或色谱纯
氨基己糖	降解 CS生成氨基己糖与显色剂反应, 测特征吸光值, 与氨基己糖标准品比较, 再换算为 CS含量	Elson-Morgan法	对仪器要求低、准确度高	操作烦琐、耗时长, 对试剂要求高, 所用试剂要求临时配制
葡萄糖醛酸	降解 CS生成的葡萄糖醛酸与显色剂反应, 测定特征吸光值, 与葡萄糖醛酸 ^[13] 或 CS ^[14-15] 标准品比较, 计算样品 CS含量	卟啉法 间苯三酚法 AHMT分光光度法	对仪器要求低、准确度高 对仪器、试剂要求低 对仪器、试剂要求较低, 耗时短	测定用试剂要求临时配制 准确度高 准确度较低
硫酸基	色谱法检测分离 CS降解产生的硫酸基, 再换算为 CS含量; 检测吸收 CS降解产生的 SO ₄ ²⁻ 过量的 Ba ²⁺ , 再换算为 CS含量	离子色谱法 间接原子吸收法	操作简单 操作相对简单、对试剂要求低	对仪器要求高, 试剂需分析纯或色谱纯、准确度低 对仪器要求高, 耗时较长, 准确度低
阴性基团	CS分子上阴性基团与阳离子染料 ^[18-23] 或乳化剂 ^[24-25] 的结合导致染料或乳化剂特定波长处吸收值变化, 测定该吸收值, 换算为 CS含量	碱性艳蓝 B法 维多利亚蓝 B法 天青 A分光光度法 噻唑衍生物法 比浊法	对仪器、试剂要求低, 操作简单, 耗时短 对仪器、试剂要求低	准确度低 操作较烦琐, 准确度低

从准确度来看, 以软骨素二糖为测定指标的色谱类方法最高, 在色谱类方法中又以高效液相色谱

法最高; 分别以氨基己糖、己糖醛酸为指标的 Elson-Morgan法和咔唑法准确度相对较高; 以硫酸基为指标的方法中, 离子色谱法测定对象单一, 对硫酸基测定的准确度较高, 但换算为 CS含量时, 误差很大; 以阴性基团为指标的方法受溶液中其它阴性基团和杂质影响, 其准确度普遍较低。

从各种方法对仪器和试剂的要求看, 以高效液相色谱类方法、离子色谱法和间接原子吸收法最高; 而 Elson-Morgan法、咔唑法以及利用阳离子染料测定的方法对实验仪器要求较低, 但 Elson-Morgan法对实验试剂要求较高。从操作上看, Elson-Morgan法和咔唑法等较色谱类方法和利用阳离子染料测定的方法烦琐, 其中 Elson-Morgan法最为烦琐, 咔唑法次之。从耗时长短看, 同样以 Elson-Morgan法最长, 咔唑法次之, 而色谱类方法和阳离子染料法均耗时短。

谢继青等^[26]、李萍等^[27]对 Elson-Morgan法进行优化后, 测定时按乙酰化同时计时, 而显色随加随计时, 结果精密度提高、重现性较好, 沸水浴中水解 30 min 50~70 °C保温 30 min 与部颁标准分析法^[28]的结果相近, 但测定时间比原方法缩短一半以上。苏玉永等^[29]优化了该法的测定条件, 结果表明在 520 nm波长处反应液有最大吸收, 沸水浴 20 min 加入 0.3 mL显色剂时吸收度最大。这都在一定程度上优化了 Elson-Morgan法和咔唑法, 缩短了分析时间。

3 结束语

以 CS分子中阴性基团和硫酸基为指标的方法虽在操作上较 Elson-Morgan法和咔唑法简单, 但测定对象都不够明确, 结果也不理想。Elson-Morgan法和咔唑法虽操作较烦琐, 但在未来较长的一段时间内, 这两种方法仍是测定氨基己糖和葡萄糖醛酸含量的较好选择。随着 CS研究的越来越深入, 精确度和准确度俱佳的高效液相色谱法有望成为研究和生产单位测定 CS含量的首选。

[参考文献]

- [1] SUGIURA N, WASAKI S, AOKI S, et al. Suppression of pannus like extenuation of synovial cells by ipil-derivatized chondroitin sulfate in vitro and in vivo studies using Escherichia coli induced arthritic rabbits [J]. *Int J Exp Pathol* 1995 76(5): 369
- [2] TAKANISHI G, BORSTIC A. Glucosamine and chondroitin in the treatment of osteoarthritis [J]. *Women's Health Primary Care* 2001 4(1): 61
- [3] MOURANO P A S, PEREIRA M S, PAVAO M S G, et al. Structure and anticoagulant activity of fucosylated chondroitin sulfate from echinodem [J]. *JBioChem* 1996 271(39): 23973
- [4] Japan Pharmaceutical Information Center. *Drugs in Japan (Ethical Drugs)* [M]. 9th ed. Tokyo: Yakugyo Jihō 1985 344
- [5] MAKSMENKO A V, GOLUBYKH V L, TISCHENKO E G. Catalase and chondroitin sulfate derivatives against thrombotic effect induced by reactive oxygen species in a rat artery [J]. *Metab Eng* 2003 5(3): 177-182
- [6] ELSON L A, MORGAN W T J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine [J]. *Biochem* 1933 27: 1824-1828
- [7] WAYNE K WAY, KATHLEEN G GIBSON, BREITE. Determination of chondroitin sulfate in nutritional supplements by liquid chromatography [J]. *J Lab Chrom & Rel Technol* 2000 23(18): 2851-2860
- [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 21(5): 59-61
- [9] 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): 7-9
- [10] 夏传俊, 孟菁, 杨耿. 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
- [11] LAUDER R, HUCKERBY T, NIEDUSZYNSKI J. A fingerprinting method for chondroitin/desamin sulfate determination of hyaluronan and oligosaccharides [J]. *Glycobiology* 2000 10(4): 393-401
- [12] 张惟杰. *糖复合物生化研究技术* [M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1994 47
- [13] BITTER T, MURHIM. A modified uronic acid reaction [J]. *Anal Biochem* 1962 4: 330-334

- [14] 高华, 刘坤, 于兹东. 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 21(5): 247-248
- [15] KUNIHRO KAMATA, MISAKO TAKAHASHI, KIYOSHI TERAJIMA, et al. Spectrophotometric determination of sodium chondroitin sulfate in eye drops after derivatization with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1, 2, 4-triazole [J]. Analyt 1995 120: 2750-2758
- [16] 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 29(5): 358-361
- [17] 茅力, 吕志宏, 陈景衡. 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 32(3): 183-184
- [18] 施文健, 祝信贤. 碱性艳蓝 B0分光光度法测定硫酸软骨素 [J]. 中国生化药物杂志, 2004 25(1): 28-30
- [19] 丁雅勤, 孙伟, 高瑞芳, 等. 吡啶橙分光光度法测定硫酸软骨素含量 [J]. 中国生化药物杂志, 2006 27(2): 68-70
- [20] 陈媛媛, 蒋治良, 李振中, 等. 维多利亚蓝 B分光光度法测定硫酸软骨素 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006 26(6): 1148-1150
- [21] 杜美菊, 凌翠霞, 丁秀云. 中性红光度法测定硫酸软骨素含量 [J]. 理化检验 化学分册, 2006 42(8): 662-663
- [22] 高贵珍, 焦庆才, 丁一磊. 天青 A分光光度法测定硫酸软骨素含量的研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2003 23(3): 600-602
- [23] HOMER K A, DENBOW L, BEIGHTON D. Spectrophotometric method for the assay of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan depolymerizing enzymes [J]. Anal Biochem 1993 214: 435-441
- [24] 刘坤, 高华, 于兹东. 硫酸软骨素快速测定方法的研究 [J]. 青岛大学学报, 2003 16(2): 39-41
- [25] 姬胜利, 崔慧斐, 谢清毅, 等. 硫酸软骨素钠的比浊法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2004 32(2): 63-64
- [26] 谢继青, 王凤山, 崔慧斐, 等. 硫酸软骨素含量测定操作条件的优化 [J]. 中国生化药物杂志, 2000 21(5): 243-244
- [27] 李萍, 黄玲珍, 伍卫阳. 硫酸软骨素含量快速测定方法 [J]. 广东化工, 2005 (8): 72-73
- [28] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准—生化药品 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1998 138-139
- [29] 苏玉永, 王虎, 李晓华. 比色法测定复方硫酸软骨素胶囊中硫酸软骨素的含量 [J]. 中国药学杂志, 2006 26(3): 351-352

Progress Research of the Determination Methods of Chondroitin Sulfate

XU Chuan-tut^{2,3}, GUAN Rui-zhang^{2,3}, ZHENG Jiang^{2,3}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety (Jimei University), Fujian Province, Xiamen 361021, China;

3. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The determination methods of chondroitin sulfate mainly include chondroitin disaccharide, glucosamine, glucuronic acid, sulfate ion and negative ionogen according to the determination indicators of these methods. Chondroitin disaccharide is the composition of chondroitin sulfate and it has the highest pertinence to chondroitin sulfate. Glucosamine and glucuronic acid are monosaccharides that compose chondroitin disaccharide and they have a higher pertinence to chondroitin sulfate. The content of sulfate ion is badly influenced by the sulfation of chondroitin sulfate and its pertinence to chondroitin sulfate is lower. The negative ion also has a lower pertinence to chondroitin sulfate for the positive ion dye can't linkage characteristic with chondroitin sulfate. As far as accuracy is concerned, HPLC which determines chondroitin disaccharide has the highest accuracy and it can apply to quality control and microanalysis. Elson-Morgan method and carbazole method have a higher accuracy and they can apply to generic analysis. Other methods have a lower accuracy.

Key words: chondroitin sulfate; chondroitin disaccharide; glucosamine; glucuronic acid; sulfate ion; content determination

(责任编辑 朱雪莲)