

文章编号:1001-6880(2016)11-1771-06

三种方法测定鲨鱼硫酸软骨素钠含量的比较

焦广飞*

福建海天蓝生物制品有限公司,龙岩 364000

摘要:利用酶解高效液相色谱法、高效液相色谱法及氯化十六烷基吡啶电位滴定法对鲨鱼硫酸软骨素钠含量进行检测,并对检测结果进行对比分析,结果显示,酶解高效液相色谱法不适用于鲨鱼硫酸软骨素钠含量的测定;而氯化十六烷基吡啶电位滴定法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量稍高于高效液相色谱法;相比之下,高效液相色谱法较适用于检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量。

关键词:酶解高效液相色谱法;高效液相色谱法;氯化十六烷基吡啶电位滴定法;鲨鱼硫酸软骨素钠

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.015

Comparison of Three Methods for Determination of Chondroitin Sulfate Sodium Shark

JIAO Guang-fei*

Fujian Hai Tian Lan Bio-products Co., Ltd. Longyan 364000, China

Abstract: The content of chondroitin sulfate sodium shark (CS) was separately evaluated by enzymatic-high performance liquid chromatography (E-HPLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and cetylpyridinium chloride (CPC)-titration methods. After comparing and analyzing the detection results, it was found that E-HPLC method was not suitable for determining chondroitin sulfate sodium shark. Moreover, the content determined by CPC-titration method was higher than that of HPLC method. By contrast, HPLC was more suitable for determining of chondroitin sulfate sodium shark.

Key words: enzymatic-high performance liquid chromatography; high performance liquid chromatography; cetylpyridinium chloride-titration; chondroitin sulfate sodium shark

鲨鱼硫酸软骨素是一种从鲨鱼软骨中提取的一种混合酸性粘多糖,它主要由D-葡萄糖醛酸(GlcA)和N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)通过 β 1-3及 β 1-4糖苷键交替链接而成的线性阴离子多糖组成,一般以钠盐的形式存在,它不仅含有硫酸软骨素A和硫酸软骨素C,而且还含有禽类所不具有的硫酸软骨素D和硫酸软骨素E。鲨鱼硫酸软骨素不仅具有治疗骨关节炎、风湿性关节炎、防止动脉硬化和神经血管性青光眼的疗效,还具有抗癌活性,促进神经突触生长及防止老年记忆力衰退等作用。已广泛应用于食品、保健品、化妆品和医药等行业。

硫酸软骨素钠含量检测方法有很多:如酶解高效液相色谱法、高效液相色谱法,电位滴定法及咔唑法等。但大多数方法是针对猪、牛等家畜来源的硫酸软骨素。对鲨鱼来源的硫酸软骨素钠含量检测报

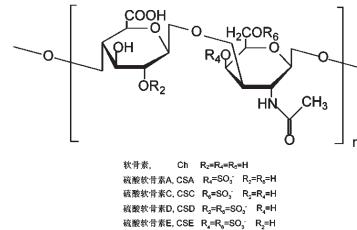


图 1 硫酸软骨素的结构

Fig. 1 Chemical structure of chondroitin sulfate

道不多,JI D^[1] 和 Im AR^[2] 利用酶解高效液相色谱法检测鲨鱼硫酸软骨素含量,但标准品都是利用牛来源的硫酸软骨素,没有采用鲨鱼来源的硫酸软骨素作为对照品,也没有对样品鲨鱼软骨素钠实际含量做比较,没有做对比性实验研究。傅应华^[3] 利用咔唑法对鲨鱼硫酸软骨素含量进行检测研究,江叔奇^[4] 分析比较咔唑法和 Elson-Morgan 法检测鲨鱼硫酸软骨素含量,但这些方法应用并不广泛。Tyler T^[5] 仅比较分析电位滴定和 HPLC 检测鲨鱼软骨素

含量，并对这两种检测方法提出了改进。本实验分别采用酶解高效液相色谱法、CPC 电位滴定法及高效液相色谱法测定鲨鱼硫酸软骨素钠含量，并对上述三种方法进行比较分析，为选择适合鲨鱼来源的硫酸软骨素钠含量的检测方法提供依据。

1 材料与仪器

硫酸软骨素 ABC 酶 (Sigma)、乙腈 (色谱级)、甲醇 (色谱级)、戊烷磺酸钠 (国药)、盐酸、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷、三水合乙酸钠等均为国产分析纯，水为去离子水。

鲨鱼软骨素钠标准品含量 99.5% (上海源叶生物科技有限公司 批号：X13A6D1)，硫酸软骨素钠 (海洋) 标准品含量 100% (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 简写：EDQM，货号：Y0000593)、鲨鱼硫酸软骨素钠样品 (本公司车间生产)。

AZURA 高效液相色谱仪由 AZURA 二元小型高压梯度泵、UVD 2.1L 紫外-可见检测器、Smartene 手动进样器、Clarity V. 5.0 色谱工作站组成 (德国诺尔)；Agilent 1260 色谱仪由 G1312B 二元泵、G1392B 自动进样器、G4212B 二极管阵列检测器、Chemstation 色谱工作站组成 (安捷伦)；ME204 万分之天平 (梅特勒)、HH.S21-4 电热恒温水浴锅 (上海博讯)、TGL-16B 高速台离心机 (上海安亭)、Mettler-Toledo 自动电位滴定仪 T50 和 DP5 光度电极。色谱柱：强阴离子交换柱 Hypersil SAX (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、NUCLEODUR C₁₈ Pyramid (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

2 实验方法

2.1 酶解高效液相色谱法

参考 2015 版年《中国药典》中硫酸软骨素钠含量检测方法^[6]。取样品约 0.1 g，精密称定，置 10 mL 的容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，0.45 μm 滤膜滤过，精密量取 100 μL，置具塞试管中，加三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (取三羟甲基氨基甲烷 6.06 g 与三水乙酸钠 8.17 g，加水 900 mL 溶解，用稀盐酸调节 pH 值至 8.0，用水稀释至 1000 mL) 800 μL，充分混匀，再加入硫酸软骨素 ABC 酶液 (取硫酸软骨素 ABC 酶适量，按标示单位用上述缓冲液稀释成每 100 μL 含 0.1 单位的溶液) 100 μL，摇匀，置于 37 °C 水浴中反应 1 h，取出，100 °C 加热 5 min，用

冷水冷却。以 10000 rpm 离心 20 min，取上清液，0.45 μm 滤膜滤过，作为供试品溶液。精密量取 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。另取鲨鱼硫酸软骨素钠对照品适量，精密称定，同法测定，按外标法以软骨素二糖、6-硫酸软骨素二糖、4-硫酸软骨素二糖和 2,6-硫酸软骨素二糖的峰面积之和计算，即得。

2.2 高效液相色谱法

参考国标 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^[7]。将粉末状样品在 105 °C 下干燥 4 h。称取 25.0 mg 样品于 50 mL 烧杯中，加入 5.0 mL 乙腈，振荡分散均匀，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，摇匀。用 0.22 μm 滤膜过滤，作为供试品溶液。精密量取 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。另取鲨鱼硫酸软骨素钠对照品适量，精密称定，同法测定，按外标法以硫酸软骨素峰面积计算，即得。

2.3 CPC 电位滴定法

参考欧洲药典中硫酸软骨素钠含量检测方法^[8]。各取 5.0 mL 标准溶液 (1.0 mg/mL 硫酸软骨素标准品水溶液) 和样品溶液 (待测硫酸软骨素样品 1.0 mg/mL) 分别放入滴定容器中，用 1.0 mg/mL 的氯化十六烷基吡啶滴定标准液滴定，用光电探头在 660 nm 下，检测滴定浊度终点。通过消耗标准滴定液的体积，计算出硫酸软骨素钠的含量。

2.4 三种方法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量

分别应用上述 3 种方法检测 6 个批次的鲨鱼硫酸软骨素钠含量，每个批次设 3 个生物学重复。检测结果用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。

3 实验结果

3.1 E-HPLC 法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量

色谱条件：AZURA 高效液相色谱仪，采用 Hypersil SAX (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，以水 (用稀盐酸调节 pH 值至 3.5) 为流动相 A；以 2 mol/L 氯化钠溶液 (用稀盐酸调节 pH 值至 3.5) 为流动相 B；流速为每分钟 1.0 mL；检测波长为 232 nm，进样量为 20 μL，色谱图见图 2。

系统适用性试验：本试验检测 6 批硫酸软骨素钠，理论塔板数均大于 2500，相邻峰分离度均大于 1.5，拖尾因子在 0.900 ~ 1.389 之间，标准品重复进样 6 针，峰面积相对标准偏差 < 2.0%，呈现较好的

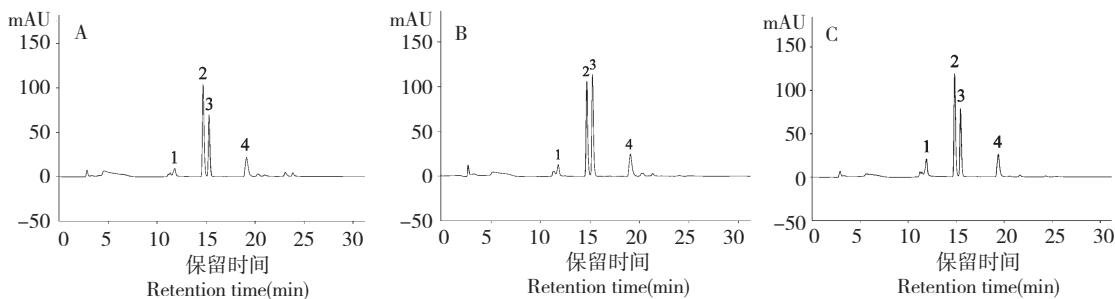


图2 EDQM 对照品(A)、源叶对照品(B)及样品(C)的 E-HPLC 色谱图

Fig. 2 E-HPLC chromatograms of EDQM CS reference standard (A), Yuanye CS reference standard (B) and CS sample (C)

注:1. 软骨素二糖;2. 6-硫酸软骨素二糖;3. 4-硫酸软骨素二糖;4. 2,6-硫酸软骨素二糖

Note: 1. \triangle Di-OS;2. \triangle Di-6S;3. \triangle Di-4S;4. \triangle Di-2,6diS

系统适用性。

3.2 HPLC 法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量

色谱条件:Agilent 1260 色谱仪,采用 Nucleodur C18 Pyramid(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱,以乙腈和戊烷磺酸钠溶液(10 + 90)为流动相;流速为每分钟 0.8 mL,DAD 检测波长为 192 nm,进样量为 10

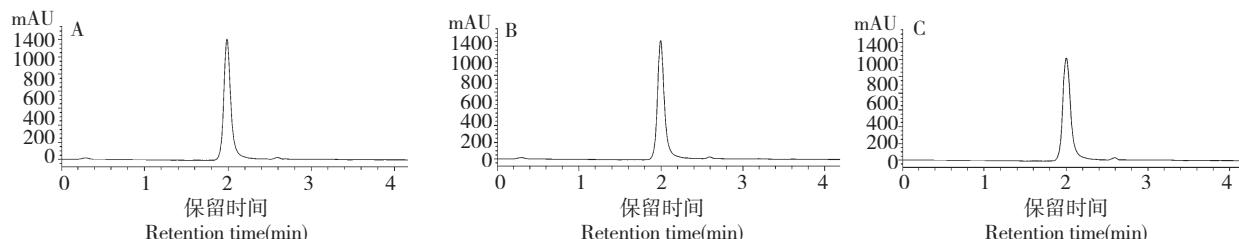


图3 EDQM 对照品(A)、源叶对照品(B)及样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of EDQM CS reference standard (A), Yuanye CS reference standard (B) and CS sample (C)

3.3 CPC 电位滴定法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量

硫酸软骨素钠对照品标准滴定液消耗体积对应电位值滴定曲线(图4)。对应得一阶导数曲线(图5)。

标准品及样品重复滴定 6 针,所消耗标准滴定液的体积相对标准偏差均 < 0.25%,呈现较好的系统适用性。

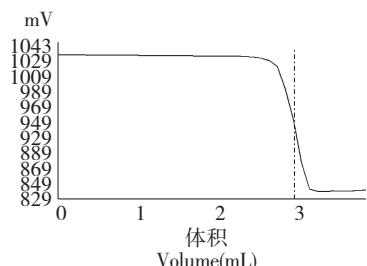


图4 滴定体积对电位值的曲线

Fig. 4 E-V curve of photometric titration

μ L, 色谱图见图 3。

系统适用性试验:本试验检测 6 批硫酸软骨素钠,理论塔板数均大于 2500,拖尾因子在 0.900 ~ 1.342 之间,标准品重复进样 6 针,峰面积相对标准偏差 < 2.0% ,呈现较好的系统适用性。

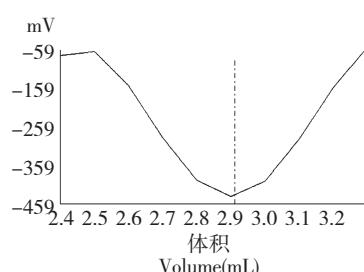


图5 滴定体积对一阶导数曲线

Fig. 5 dE/dV - V curve

3.4 三种检测方法结果比较分析

选取车间不同鲨鱼种类及部位来源的 6 批硫酸软骨素钠及 2 种鲨鱼硫酸软骨素钠标准品,每批设三个重复,分别按照三种检测方法进行含量测定,测定结果见表 1。

结果显示:对于酶解高效液相检测方法来说,不同的标准品检测出来的结果差异很大,而高效液相

表 1 鲨鱼硫酸软骨素钠含量的检测结果($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 1 Content determination results of CS using 3 methods ($n=3, \bar{x} \pm s$)

检测方法 Determination method	酶解高效液相色谱法 E-HPLC		高效液相色谱法 HPLC		CPC 电位滴定法 CPC-titration	
	源叶标准品 Yuanye RS	EDQM 标准品 EDQM RS	源叶标准品 Yuanye RS	EDQM 标准品 EDQM RS	源叶标准品 Yuanye RS	EDQM 标准品 EDQM RS
标准品 Reference standard (RS)						
Yuanye RS	—	119.53 ± 0.63	—	99.71 ± 0.49	—	100.53 ± 0.49
EDQM RS	83.30 ± 0.47	—	98.96 ± 0.38	—	101.3 ± 0.61	—
2015032701	85.21 ± 0.96	94.99 ± 0.75	90.86 ± 1.05	90.38 ± 1.04	93.63 ± 0.53	94.21 ± 0.42
2015052501	75.97 ± 0.75	90.32 ± 0.65	101.62 ± 0.45	101.08 ± 0.44	102.96 ± 0.80	103.54 ± 0.76
2015061101	76.62 ± 0.74	88.61 ± 0.86	99.80 ± 0.03	98.76 ± 0.03	100.57 ± 0.56	99.72 ± 0.68
2015070401	87.67 ± 0.83	92.37 ± 0.76	96.42 ± 0.47	95.17 ± 0.52	98.83 ± 0.49	97.37 ± 0.59
2015072101	88.59 ± 0.61	90.61 ± 0.59	98.95 ± 0.54	99.85 ± 1.31	101.92 ± 0.68	101.56 ± 0.73
2015073101	92.03 ± 0.59	93.15 ± 0.66	103.74 ± 0.69	102.56 ± 0.85	104.51 ± 0.89	103.94 ± 0.69

色谱法和电位滴定法均无明显差异。酶解高效液相色谱法检测的含量数据均低于高效液相色谱法和 CPC 电位滴定法,而 CPC 电位滴定法检测的硫酸软骨素钠含量稍高于高效液相色谱法。

3.5 统计分析

对表 1 中 6 批次鲨鱼硫酸软骨素钠含量的数据经 SPSS20.0 软件进行单因素方差分析,见表 2,结果表明:三种检测方法检测 6 批鲨鱼硫酸软骨素钠

含量,组间差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。为了进一步比较三种方法之间的差异性,用 SPSS 20.0 软件进行多重比较分析,见表 3,结果显示:高效液相色谱法、CPC 电位滴定法的检测结果相似度比较高($P > 0.05$),而酶解高效液相色谱法的检测结果与其他 2 种方法的结果差异性较大($P < 0.01$),CPC 电位滴定法的检测结果比高效液相色谱法平均高 1.96。

表 2 检测方法单因素方差分析

Table 2 Single factor analysis of variance

差异源 Source different	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
组间 Between groups	1033.340	2	516.670	22.615	0.000
组内 Within groups	753.916	33	22.846		
总计 Total	1787.256	35			

表 3 三种检测方法的多重比较

Table 3 Multiple comparisons of three methods

统计方法 Statistical methods	(I) 检测方法 Determination method	(J) 检测方法 Determination method	平均值差值(I-J) Mean difference	P 值 P-value
LSD	酶解高效液相色谱法 E - HPLC	高效液相色谱法 HPLC	-10.257 *	0.000
	CPC 电位滴定法 CPC - titration		-12.218 *	0.000
	电位滴定法 CPC - titration	高效液相色谱法 HPLC	1.962	0.322

* 均值差异的显著性水平为 0.05。

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

4 讨论与结论

通过对酶解高效液相色谱法、高效液相色谱

法、CPC 电位滴定法检测鲨鱼硫酸软骨素钠的含量情况发现,利用酶解高效液相色谱法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量数值普遍低于高效液相色谱法和电位

滴定法。而 CPC 电位滴定法检测的硫酸软骨素钠含量稍高于高效液相色谱法,平均高 2 左右。我们通过购买不同厂家的鲨鱼硫酸软骨素钠标准品,利用酶解高效液相色谱法互相检测含量发现,如果以上海源叶生物科技有限公司的鲨鱼硫酸软骨素钠标准品为对照品,检测 EDQM 的硫酸软骨素(海洋)标准品(含量 100%)含量为 83.30%。反之,如果 EDQM 的硫酸软骨素(海洋)标准品(含量 100%)为对照品,检测上海源叶生物科技有限公司的鲨鱼硫酸软骨素钠标准品(含量 99.5%)含量为 119.53%。酶解高效液相色谱法检测的原理是硫酸软骨素钠在硫酸软骨素 ABC 酶作用下,将硫酸软骨素钠酶解为硫酸软骨素的二糖单元,在一定的 HPLC 条件下测定,用硫酸软骨素钠标准品作为对照,按外标法以二糖的峰面积之和计算含量。酶解高效液相色谱法检测鲨鱼硫酸软骨素钠测得结果与实际结果相差很大。同样为鲨鱼来源的源叶标准品、EDQM 标准品及本公司生产的样品酶解液相色谱图明显不同(见图 2),通过硫酸软骨素 ABC 酶酶解鲨鱼硫酸软骨素钠样品二糖 HPTLC 研究发现,硫酸软骨素 ABC 酶不能完全降解鲨鱼硫酸软骨素钠(无数据),与硫酸软骨素 ABC 酶酶解吸盘圆鳍鱼多糖现象的相同^[9]。Silva C^[10]研究证明硫酸软骨素 ABC 酶是一种外切酶,硫酸软骨素 ABC 酶更倾向于水解分子量小的硫酸软骨素,而且水解硫酸软骨素 A 的效率比硫酸软骨素 C 的效率更高。而鲨鱼硫酸软骨素平均分子量在 64.2~60.0 kDa,相比家禽来源的软骨素分子量大 3~5 倍^[11,12]。与家禽来源的硫酸软骨素相比,鲨鱼硫酸软骨素不仅含有较多的硫酸软骨素 C,其次是硫酸软骨素 A,而且也含有一定量的硫酸软骨素 D^[13,14]和硫酸软骨素 E^[1,15],所以硫酸软骨素 ABC 酶酶解鲨鱼硫酸软骨素钠出现酶解不完全的现象,并且不同鲨鱼种类及部位提取的硫酸软骨素其内的 A、C、D、E 成分各有差异,这种差异的不同造成硫酸软骨素 ABC 酶不完全降解鲨鱼硫酸软骨素钠为二糖程度的不一致,从而导致检测结果的差异(见表 1)。另外欧洲市场上很多批次鲨鱼硫酸软骨素钠内含有 10%~16% 的硫酸角质素^[16,17],包括欧洲鲨鱼来源的硫酸软骨素钠标准品在内都含有一定量的硫酸角质素^[16],而家禽来源的硫酸软骨素内几乎不含有硫酸角质素^[16]。虽然有去除硫酸角质素的方法^[17],但在生产中很难完全去除,而硫酸软骨素 ABC 酶不能水解硫酸角质素^[18],这也是

利用酶解高效液相色谱法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量偏低的另一个原因。中国药典中酶解高效液相色谱法针对的是猪来源的硫酸软骨素钠,猪来源的硫酸软骨素平均分子量 13.7~18.7 kDa,比鲨鱼来源的硫酸软骨素钠分子量小很多,而且其内硫酸软骨素 A 占绝大部分,不含有硫酸软骨素 D^[11]和硫酸角质素^[16]。猪硫酸软骨素钠的这些特征可以很好地被硫酸软骨素 ABC 酶酶解彻底,所以中国药典上的酶解高效液相色谱法适合猪硫酸软骨素钠含量的检测。而该方法却不适用于鲨鱼硫酸软骨素钠含量的检测,但它可以作为硫酸软骨素钠的鉴定及判别硫酸软骨素钠来源的一种方法。

利用高效液相色谱法对两种标准品互相检测,如果以上海源叶生物科技有限公司的鲨鱼软骨素钠标准品为对照品,检测 EDQM 的硫酸软骨素(海洋)标准品(含量 100%)含量为 99.71%,反之如果 EDQM 的硫酸软骨素(海洋)标准品(含量 100%)为对照品,检测上海源叶生物科技有限公司的鲨鱼硫酸软骨素钠标准品(含量 99.5%)含量为 98.96%(见表 1)。高效液相色谱法检测鲨鱼硫酸软骨素钠与真实结果相差很小。高效液相色谱法检测鲨鱼硫酸软骨素钠原理为用乙腈将硫酸软骨素钠样品分散均匀,以水溶解,经液相色谱分离后,在波长 192 nm 测定,外标法定量。硫酸软骨素本身没有紫外吸收,当选用离子对溶液做流动相时,在 192 nm 处,有最大吸收峰,而蛋白质和核酸在该处无吸收峰,避免了蛋白质和核酸的影响。由于硫酸角质素是以半乳糖与 6-硫酸-N-乙酰氨基葡萄糖通过 β 1-4 糖苷键组成的二糖为主要重复双糖单位,双糖之间通过 β 1-3 糖苷键连接形成线形分子^[18],与硫酸软骨素结构相似,在 192 nm 也有吸收峰,硫酸软骨素内的硫酸角质素可以被检测到。

同样,利用 CPC 电位滴定法对两种标准品互相检测,如果以上海源叶生物科技有限公司的鲨鱼硫酸软骨素钠标准品为对照品,检测 EDQM 的硫酸软骨素钠(海洋)标准品(含量 100%)含量为 101.3%,反之如果 EDQM 的硫酸软骨素(海洋)标准品(含量 100%)为标准品,检测上海源叶生物科技有限公司的鲨鱼硫酸软骨素钠标准品(含量 99.5%)含量为 100.5%。CPC 电位滴定法测定硫酸软骨素钠含量原理为硫酸软骨素钠为聚阴离子,可与氯化十六烷基吡啶(CPC)作用生成难溶物,适宜条件下形成稳定的混悬液,与已知浓度的硫酸软

骨素钠溶液比较混悬液的透光度,可知检测硫酸软骨素钠的含量。同样电位滴定法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量稍微高于真实含量,原因在硫酸软骨素内的其他粘多糖如硫酸角质素、硫酸皮肤素等及一些大分子阴性聚合物如卡拉胶、蛋白质、表面活化剂都会参与反应,造成含量偏高^[4]。

通过对对比分析三种检测硫酸软骨素钠含量方法,笔者认为酶解高效液相色谱法不能有效地检测出鲨鱼硫酸软骨素钠的真实含量,酶解高效液相色谱法不适合对鲨鱼硫酸软骨素钠含量进行检测,但酶解高效液相色谱法可以作为硫酸软骨素钠的鉴定及判别硫酸软骨素钠来源的一种方法。CPC 电位滴定法检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量稍微高于真实含量;高效液相色谱法能较好的反映出鲨鱼硫酸软骨素钠的真实含量,可以作为检测鲨鱼硫酸软骨素钠含量的有效工具。

参考文献

- JI D, Roman M, Zhou J, et al. Determination of chondroitin sulfate content in raw materials and dietary supplements by High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection after enzymatic hydrolysis: Single-Laboratory Validation. *J AOAC Int*, 2007, 90:659-669.
- Im AR, Sim JS, Park Y, et al. Isolation and characterization of chondroitin sulfates from the byproducts of marine organisms. *Food Sci Biotechnol*, 2009, 8:872-877.
- Fu YH(傅应华). Determination of the content of shark chondroitin sulfate by carbazole method. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2007, 28:54-55.
- Jiang SQ(江叔奇), Liu YM(刘玉明), Qian TT(钱甜甜), et al. A comparative study on the two methods for the determination of the shark chondroitin sulfate. *Chin J Naut Med Hyperbar Med*(中华航海医学与高气压医学杂志), 2011, 18:105-108.
- Tyler T, Khandelwal B, Norden D, et al. Determination of chondroitin sulfate in raw materials by Liquid Chromatography. *J AOAC Int*, 2002, 85:567-571.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol II ,1340-1341.
- GB/T 20365-2006 Determination method for chondroitin sulfate and glucosamine hydrochloride-Liquid chromatography method. 2006.
- European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia-8th Edition. The Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe, 2013. 1876-1878.
- Panagos CG, Thomson D, Moss C, et al. Characterisation of hyaluronic acid and chondroitin/dermatan sulfate from the lump sucker fish, *C. lumpus*. *Carbohydr Polym*, 2014, 106:25-33.
- Silva C, Ramon NC, Reis RL, et al. Following the enzymatic digestion of chondroitin sulfate by a simple GPC analysis. *Anal Chim Acta*, 2015, 885:207-213.
- Volpi N. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. *J Pharm Sci*, 2007, 96:3168-3180.
- Maccari F, Galeotti F, Volpi N. Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes. *Carbohydr Polym*, 2015, 129:143-147.
- Shi YG, Meng YC, Li JR, et al. Chondroitin sulfate: extraction, purification, microbial and chemical synthesis. *J Chem Technol Biotechnol*, 2014, 89:1445-1465.
- Gargiulo V, Lanzetta R, Parrilli M, et al. Structural analysis of chondroitin sulfate from *Scyliorhinus canicula*: A useful source of this polysaccharide. *Glycobiology*, 2009, 19:1485-1491.
- Zhao T, Zhang JF, Liu XM, et al. Analysis of chondroitin sulfate from different sources of cartilage by electrophoretically mediated microanalysis. *RSC Adv*, 2015, 5:52314-52319.
- Pomin VH, Piquet AA, Pereira MS, et al. Residual keratan sulfate in chondroitin sulfate formulations for oral administration. *Carbohydr Polym*, 2012, 90:839-846.
- Galeotti F, Maccari F, Volpi N. Selective removal of keratan sulfate in chondroitin sulfate samples by sequential precipitation with ethanol. *Anal Biochem*, 2014, 448:113-115.
- Sisu E, Flangea C, Serb A, et al. Modern developments in mass spectrometry of chondroitin and dermatan sulfate glycosaminoglycans. *Amino Acids*, 2011, 41:235-256.