**《壳聚糖含量测定 高效液相色谱法》国家标准**

**编制说明**

（征求意见稿）

**一、任务来源**

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《国标委综合[2018]41号》，项目编号“20180923-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2020年完成。本标准起草工作组由中国科学院海岸带研究所等单位共同组成。

**二、标准制定目的及意义**

壳聚糖是甲壳素脱乙酰基产物，其化学名称为聚葡萄糖胺(1,4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖，是除纤维素外，自然界含量最大的天然有机高分子化合物。它是甲壳素在碱性条件下脱乙酰度而来，壳聚糖在自然界中广泛存在于昆虫壳、虾蟹壳、软体动物的骨骼以及真菌的细胞壁中。其中，海洋节肢动物的虾蟹外壳是目前最容易获取并且也是量最大的资源。壳聚糖是重要的生物活性物质，具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤、抗凝血、减肥降脂和增强免疫力等功能，并且安全无毒，具有良好的生物相容性，可降解和成膜性等，可作为医药保健品、保健食品的重要原料。因此，建立准确的定量分析方法，对保障产品质量的稳定性和可控性都至关重要。

但目前我国仍缺乏专门检测壳聚糖含量及纯度的技术标准，亟待建立相关标准满足市场需求，推动壳聚糖在医药和食品工业等领域的应用，服务于壳聚糖产业国际贸易。目前，测定壳聚糖含量的方法有：酸水解比色法、滴定法、氮测定法和分光光度法、色谱法、高效毛细管电泳法、光谱法和核磁共振法等。

酸水解比色法操作比较繁琐, 且不适合微量样品的分析。滴定法可分为酸碱滴定法和水解滴定法，酸碱滴定法以甲基橙作指示剂，方法简单，但由于是胶体溶液, 终点时指示剂变色不明显，且终点时易产生沉淀，干扰测定；水解滴定法样品需水解20 min, 滴定要求高，操作麻烦，且不适合微量样品的分析。氮测定法操作繁琐，且需根据脱乙酰度(%)计算，否则会带来很大误差。

分光光度法用茜素红或溴甲酚绿与壳聚糖在一定酸度条件下的显色反应测定壳聚糖的含量，且具有较高的选择性和灵敏度，可用于不同复杂样品中微量的壳聚糖含量测定。但由于产品中色素会吸附比色杯，故其测定的线性范围只有0 - 0.2 mg/mL。另外，Britton-Robinson缓冲溶液体系也可复杂样品中微量壳聚糖的含量的测定最近，线性范围为0.015 - 0.15 mg/mL。随后，茚三酮显色法和活性艳红比色法可实现微量壳聚糖含量的检测，方法操作简单，结果可靠。但测定的线性范围分别是0.004 - 0.04 mg/mL 和0 - 0.08mg/mL。由此可见，线性范围是分光光度法最大局限。

高效毛细管电泳法具有快速，高效，简便，高分辨率及样品、溶剂消耗少等优点在最近十几年内成为分离和分析生物活性物质的有力工具之一，已经被广泛应用于糖类化合物。而对于高分子壳聚糖的高效毛细管电泳分析目前仅有少量文献报道。将壳聚糖进行酸水解，然后对水解后的氨基葡萄糖用高效毛细管电泳法和激光诱导荧光检测器进行测定，这仍然是一种间接的测定方法，并且操作较为复杂，受水解条件影响较大。

光谱法包括红外光谱和拉曼光谱。红外光谱，利用壳聚糖的红外光谱中集团的特征吸收峰可以进行脱乙酰度的测定。该方法的优点是无需对壳聚糖样品进行前处理，可直接将干燥粉末样品与溴化钾研成细末，压片后在红外光谱仪上扫描，得到红外光谱图，然后用特征谱带如酰胺Ⅰ或者酰胺Ⅱ与某个特定谱带的吸收峰的比值，对一系列已知的脱乙酰度作图，得到一条标准曲线，从而可测定未知壳聚糖样品的脱乙酰度。但采用红外光谱法测定壳聚糖脱乙酰度时，由于供试品水分造成的影响，误差较大。拉曼光谱能快速检测且不需要纯化样品，也不需要将壳聚糖溶解在任何溶剂中。但其缺点是散射强度容易受光学系统参数等因素的影响，其他物质的引入会对分析的结果产生一定的影响。

核磁共振，固体核磁法对壳聚糖供试品进行表征，实现固体条件下13C核磁共振信号的高分辨观察。该技术的实现使得对难溶或交联的高分子化学结构的研究成为可能。核磁共振结果用作参考数据时，可以获得良好的精确度但是仪器昂贵，测试费用高。

本项目根据壳聚糖化学结构特征识别，并结合壳聚糖含量定量测定方法，制定壳聚糖含量测定方法的技术标准一部，为实现壳聚糖产品的质量控制提供参考依据，对于推动壳聚糖产业发展具有重要的理论和现实意义。

**三、标准制定原则和依据**

1、以科学为依据

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。

2、以保证产品安全、保护人民健康为原则

我国壳聚糖产业日趋发展壮大，涉及到的行业也涵盖了制药、食品、化工、生物等各学科。本标准的制定充分考虑确保产品质量全、及有效地促进和满足国内外市场贸易需求，以保证产品安全、保护人民健康。

**四、主要工作过程**

 1、组成标准起草工作组

根据该标准起草任务和要求，2016年12月，由中国标准化研究院主持召开了《壳聚糖含量测试技术-液相色谱法》等四项标准的起草小组工作会。会上，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度。会议决定由中国科学院海岸带研究所为主要承担单位负责该标准的制定工作。

2、开展相关调研情况

从 2017年中旬开始，起草小组历时两个多月时间，开展了国内外相关壳聚糖生产、鉴定、含量测定方法等法律法规及标准情况调研工作。在调研中，主要查阅了ISI Web of Knowledge平台、中国知网、壳聚糖研究和生产企业内部相关标准和资料。

3、标准起草过程

本标准的草案的编制工作从 2017年中旬就已经开始，由中国科学院海岸带研究所具体承担。本标准制定严格按 GB/T1.1《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写规则》，GB/T1.2《标准化工作导则第 2 部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》要求进行。

从接到标准的编制任务开始，参与编写的人员就开始收集国内外有壳聚糖含量检测的相关资料，认真分析各种检测方法的利弊和准确性。多次通过邮件、电话和实地考察的方式和国内大型壳聚糖生产企业技术部门联系，了解壳聚糖含量检测方法遇到的问题和困难，比如企业需要检测方法易于操作等需求。通过对市面上随机的壳聚糖样品和企业提供的壳聚糖样品进行检测，积累了大量的实验数据。在大量检测数据的基础上完成了本标准中各项技术指标的初步定值工作。最后围绕草案的具体细节问题进行充分讨论，完成了《虾青素旋光异构体的组成类型及含量测定-液相色谱法》的初稿。2018 年12月中旬在烟台海岸带研究所组织国内壳聚糖研究相关专家和壳聚糖生产企业的代表召开了三次工作组讨论会议，对标准草案逐条逐句地进行了讨论和完善，初步形成了标准征求意见稿。

**五、主要技术内容**

1、原理

壳聚糖原料乙酰化得到甲壳素，分别降解壳聚糖原料和合成后得到的甲壳素，得到含有氨基葡萄糖盐酸盐的样品溶液，采用高效液相色谱法检测氨基葡萄糖盐酸盐含量，分别计算壳聚糖纯度（X）和甲壳素纯度（Y），Y与X比值得到比例系数，通过比例系数计算壳聚糖含量。

2、壳聚糖脱乙酰度测定

准确称取壳聚糖样品0.2g于小烧杯中，加入30ml标定的盐酸溶液，并置于恒温磁力搅拌器上搅拌至溶解，加入2~3滴甲基橙-亚甲基蓝指示剂，用标定的氢氧化钠溶液滴定样品溶液中过量的盐酸，当指示剂颜色由紫色变为淡绿色，停止滴定，记录消耗的氢氧化钠溶液体积，计算壳聚糖的脱乙酰度。脱乙酰度测定结果如下表1所示。

表1壳聚糖的脱乙酰度

|  |  |
| --- | --- |
| 标示脱乙酰度  % | 实际测定脱乙酰度  % |
| 0 | 0.40 |
| 80.00 | 82.42 |
| 85.00 | 86.60 |
| 88.43 | 87.66 |
| 95.00 | 94.73 |
| 96.05 | 98.34 |

2、样品溶液中氨基葡萄糖盐酸盐含量测定

以峰面积积分值mAu为纵坐标Y，以氨基葡萄糖盐酸盐浓度Ce（mg/mL）为横坐标X作标准曲线，得线性方程为Y=12358.15X-2755.56，相关系数R2为0.9988。所得氨基葡萄糖盐酸盐线性方程如图1所示。从图中可以看出，当氨基葡萄糖盐酸盐在1.0~3.5 mg/mL浓度范围内时，标准曲线呈现较好的相关性。

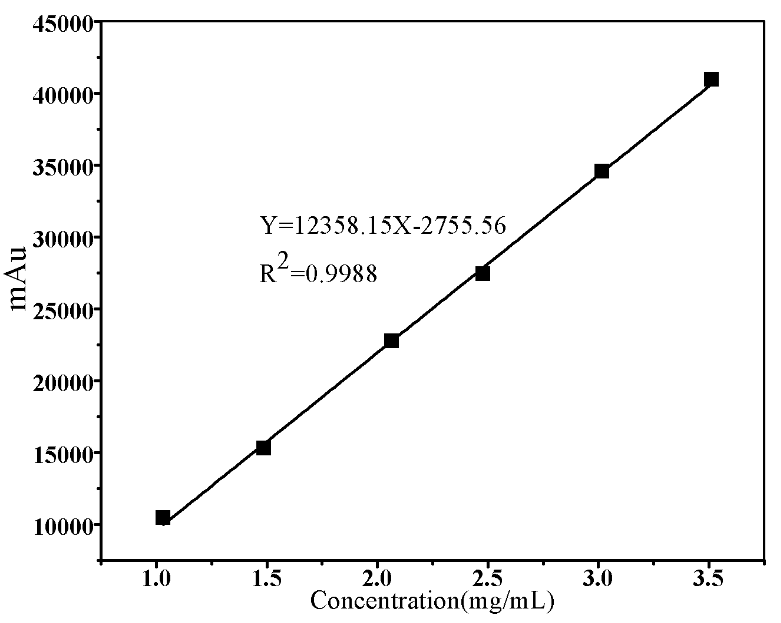


图1氨基葡萄糖盐酸盐标准曲线

3、壳聚糖含量测定

在相同条件测定标准溶液和样品溶液，如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准溶液中的某种组分峰的保留时间一致（变化范围在±2.5%），则认为该色谱峰为目标物质出峰。标准溶液测定色谱图如下图2所示，样品溶液测定色谱图如下图3所示。

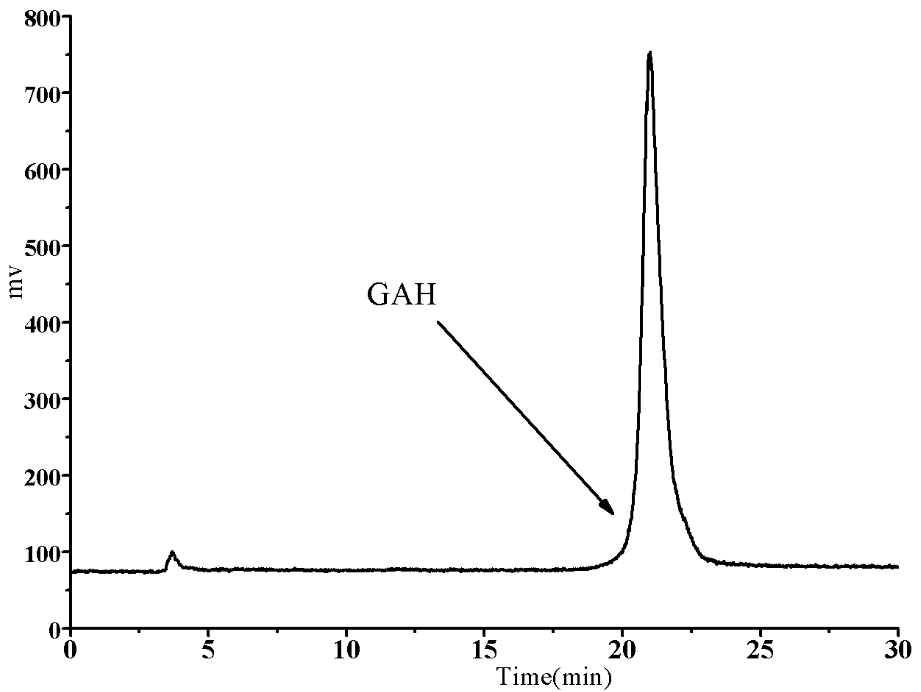


图2标准样品HPLC图

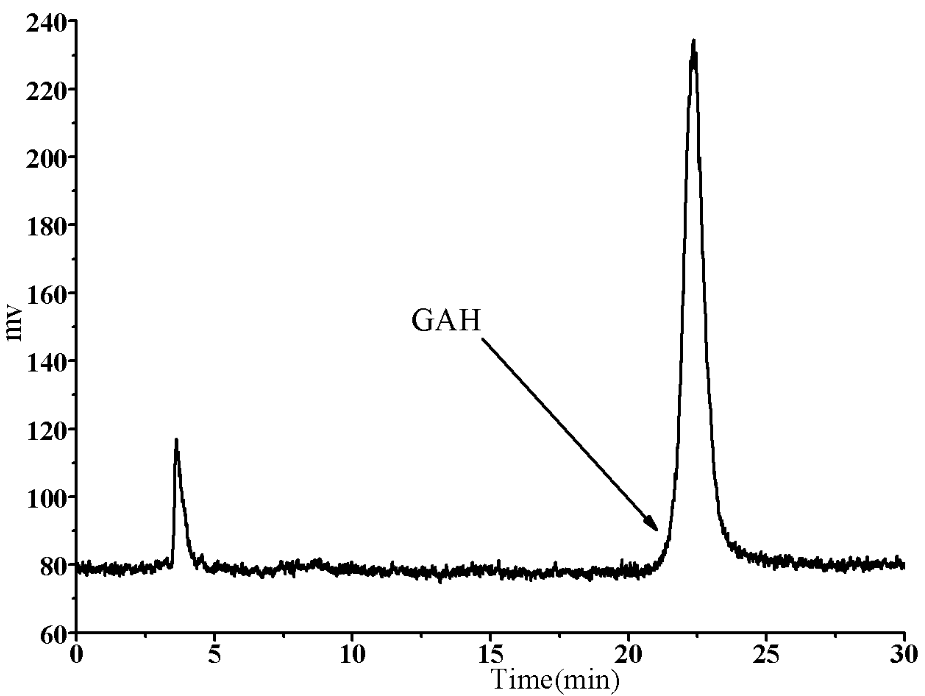


图3壳聚糖样品HPLC图

依据测定的氨基葡萄糖盐酸盐的浓度，分别计算壳聚糖的纯度（X）和甲壳素的纯度（Y），得到Y/X比例系数，实验结果如下表2所示。从表中可以看出脱乙酰度越大的壳聚糖，直接降解成单糖的比例越低，计算得到的壳聚糖含量值与实际值相差越大。将壳聚糖合成甲壳素后进行降解，降解成单糖接近完全，即直接降解壳聚糖得到的纯度（X）乘以相应比例系数后为壳聚糖的实际含量。

表2壳聚糖含量测定结果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 不同脱乙酰度  壳聚糖% | 壳聚糖（CTS）降解  百分比%（X） | 合成甲壳素（CT）后降解百分比%（Y） | 比例系数Y/X |
| 0 | 99.8 | 99.8 | 1 |
| 82.42 | 81.5 | 99.4 | 1.22 |
| 86.60 | 79.8 | 99.6 | 1.25 |
| 87.66 | 70.8 | 99.4 | 1.41 |
| 94.73 | 62.5 | 99.8 | 1.59 |
| 98.34 | 53.4 | 99.8 | 1.87 |

由于目前多数企业使用高脱乙酰度的壳聚糖，因此此系数重点适用于脱乙酰度80%以上的壳聚糖含量测定。此系数仅适用于高纯度壳聚糖含量检测。

**六、验证情况及结果分析**

在标准编制过程中，未收到重大分歧意见。

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准与现行法律、法规和其他标准没有冲突。

**八、标准属性建议**

本标准为推荐性国家标准。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

标准发布实施后，建议由标准编制单位组织有关生产、检验、设计等单位进行宣传贯彻。

**十、其他应予说明的事项**

无其他事项说明。