GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

**壳聚糖含量测定 高效液相色谱法**

**Determination of chitosan content—High performance liquid chromatography**

（征求意见稿）



国家市场监督管理总局

中国国家标准化管理委员会

发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前言

本标准按照GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

壳聚糖含量测定 高效液相色谱法

**1 范围**

本标准规定了壳聚糖含量测定高效液相色谱法的原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤和结果计算。

本标准适用于壳聚糖含量的测定。

本方法检出限为0.30mg/mL，定量限为0.45mg/mL。

**2 规范性引用文件**

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20365 硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的测定

GB/T 601化学试剂标准滴定溶液的制备

GB/T 603化学试剂试验方法中所用制剂及制品的制备

**3 术语与定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**3.1**

壳聚糖 chitosan

几丁质脱去N-乙酰基55%以上的物质。

**4 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。

**5 试剂或材料**

除非另有规定，所有试剂均为分析纯。

5.1水：GB/T 6682一级。

5.2乙腈：色谱纯。

5.3盐酸：质量分数36%~38%。

5.4氮气：纯度≥99.9%。

5.5氨基葡萄糖盐酸盐：纯度≥99%。

5.6 甲壳素：纯度≥99%。

5.7乙腈-水溶液

精密量取800 mL乙腈和200 mL水，混合均匀。

5.8 0.1mol/L碳酸钠溶液

精密称取2.65g无水碳酸钠，加水溶解并转移至250ml容量瓶，定容至刻度，摇匀。

5.9盐酸溶液

精密量取4.2ml质量分数为36%~38%的盐酸，加水稀释定容至500ml容量瓶中，摇匀。

5.10氢氧化钠溶液

精密称取2g氢氧化钠，加水溶解并转移至500ml容量瓶，定容至刻度，摇匀。

5.11甲基橙指示剂

精密称取0.02g甲基橙，加水溶解并转移至100ml容量瓶，定容至刻度，摇匀。

5.12 亚甲基蓝指示剂

精密称取0.1g亚甲基蓝，溶于乙醇并转移至100ml容量瓶，定容至刻度，摇匀。

5.13甲基橙-亚甲基蓝指示剂

取甲基橙指示剂和亚甲基蓝指示剂各50ml，混合摇匀。

**6 仪器设备**

6.1 高效液相色谱仪：配有蒸发光散射检测器。

6.2 色谱柱：250 mm ×4.6 mm，5μm。

6.3 无菌注射器。

6.4 有机相微孔滤膜：0.45μm。

6.5 电子分析天平：感量：0.1 mg、0.001 mg。

6.6 集热式磁力恒温搅拌器。

6.7 恒温磁力搅拌器。

6.8旋转蒸发仪。

6.9冷冻干燥机。

**8 测定步骤**

**7.1 样品处理**

固体样品：用“四分法”缩分至约50g样品，混匀，备用。

液体样品：将试样冷冻干燥或烘干成固体，研磨成粉末，装入样品瓶中，混匀，备用。

**7.2 测定**

**7.2.1 色谱条件**

a) 检测器：蒸发光散射检测器（ELSD检测条件：T为60℃，高纯N2流速1.5L/min）；

b) 色谱柱：ZORBAXNH2( 250 mm ×4.6 mm，5μm)；

c) 流动相：乙腈-水（80:20，V/V）；

d) 流速：1.0 mL/min；

e) 进样量：20 μL；

f) 柱温：30℃。

**7.2.2 氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液配制**

精密称定氨基葡萄糖盐酸盐206.6 mg（精确到0.1 mg），置于小烧杯中，加少量水溶解并转移至50 mL容量瓶中，清洗转移三次，定容，摇匀，配制成浓度为4.132 mg/mL的氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液，4℃低温保存，备用。

**7.2.3 氨基葡萄糖盐酸盐标准曲线的绘制**

取氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液适量，精密量定，置于容量瓶中，加水定容，摇匀，配制成浓度为3.5122 mg/mL的氨基葡萄糖盐酸盐溶液，取适量此氨基葡萄糖盐酸盐溶液进一步稀释，依次得到一系列梯度浓度为3.0164、2.4792、2.066、1.4875、1.033、0.4958 mg/mL的氨基葡萄糖盐酸盐稀释溶液，按照色谱分析条件进样，HPLC测定其峰面积，并以纵坐标峰面积积分值Y对横坐标氨基葡萄糖盐酸盐浓度X作线性回归方程，得到氨基葡萄糖盐酸盐标准曲线。

**7.2.4 酸碱浓度的标定**

准确量取10mL盐酸溶液于小烧杯中，加入2~3滴甲基橙指示剂，用0.1 mol/L的碳酸钠溶液进行滴定，指示剂由红色变为黄色，停止滴定，记录消耗的碳酸钠溶液的体积，计算盐酸溶液的浓度。

准确量取10mL氢氧化钠溶液于小烧杯中，加入2~3滴甲基橙指示剂，用上述已标定浓度的盐酸溶液进行滴定，指示剂由黄色变为橙色，停止滴定，记录消耗的盐酸溶液体积，计算氢氧化钠溶液的溶度。

**7.2.5 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。

**7.2.6 甲壳素样品制备**

准确称取1.3 g壳聚糖样品置于250mL圆底烧瓶中，加入100mL甲醇溶液，1.5mL乙酸酐，置于恒温磁力搅拌器上室温搅拌反应24 h，反应结束后，用旋转蒸发仪减压浓缩回收甲醇，浓缩液置于冷冻干燥仪上干燥得甲壳素样品。按照此步骤，分别对不同脱乙酰度的壳聚糖进行乙酰化处理。

**7.2.7 甲壳素/壳聚糖降解与样品溶液的配制**

精密称取甲壳素/壳聚糖50 mg，置于50 mL圆底烧瓶中，分别加入3.0 mL盐酸和0.5 mL水，并置于集热式磁力恒温搅拌器中梯度升温降解，55℃反应1.5 h，75℃反应1.5 h，100 ℃反应3~4 h。反应结束后，去除剩余盐酸，加少量水溶解，并转移至50 mL容量瓶中，洗涤三次，定容，摇匀。按照上述方法，依次对不同脱乙酰度的壳聚糖进行降解得到一系列样品溶液，4℃低温保存，备用。

**7.2.8 样品溶液中氨基葡萄糖盐酸盐含量测定**

用无菌注射器取上述8.6降解样品溶液适量，过0.45 μm有机相微孔滤膜，按照色谱分析条件，进样分析，测定其峰面积积分值，计算降解样品溶液中氨基葡萄糖盐酸盐的含量。

**7.2.9 样品溶液中的单糖含量测定**

精密称取1.0g壳聚糖样品，加10mL水充分溶解，过滤，滤液中滴加1~2滴盐酸，过0.45 μm有机相微孔滤膜，按照色谱分析条件，进样分析，测定其峰面积积分值，计算样品溶液中单糖含量。

**7.2.10 标准曲线绘制**

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，求回归方程和相关系数。

**8 结果计算**

壳聚糖含量按公式（1）计算：

………………..……….…………（1）

*w3*——壳聚糖含量（%）；

*c1*——由标准曲线查得的氨基葡萄糖盐酸盐的浓度（mg/mL）；

50——样品溶液体积（mL）；

*Mi*——不同脱乙酰度壳聚糖分子量；

*M1*——氨基葡萄糖盐酸盐分子量；

*m1*——样品质量（mg）；

*w2*——壳聚糖样品含水量（%）；

*w1*——壳聚糖样品中的单糖含量（%）；

**9 重复性**

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的10%。