

中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—201×

壳聚糖含量测定 高效液相色谱法

Determination of chitosan content—High performance liquid chromatography

201×-××-××发布

201×-××-××实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

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：中国科学院烟台海岸带研究所、中国科学院海洋研究所、山东陆海蓝圣生物科技股份有限公司、山东卫康生物医药科技有限公司、青岛科技大学、中国标准化研究院、中国科学院过程工程研究所。

本标准主要起草人：郭占勇、董方、秦松、苗芹、秦荣基、崔玉琳、李鹏程、杨锡洪、李进国、邢荣娥、马爱进、陈军、黄永东。

壳聚糖含量测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱法测定壳聚糖含量的方法。
本标准适用于壳聚糖含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

壳聚糖 chitosan

甲壳素脱去 *N*-乙酰基 55% 以上的物质。

4 原理

壳聚糖乙酰化制备成甲壳素后进行酸水解,高效液相色谱法检测水解液中氨基葡萄糖盐酸盐的浓度,外标法定量计算得到样品中壳聚糖的含量。

5 试剂或材料

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 乙腈-水溶液

量取 800 mL 乙腈和 200 mL 水,混合均匀。

5.7 氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液

称取氨基葡萄糖盐酸盐标准品 1.0 g,加水溶解并定容至 100 mL 容量瓶中,配制成质量浓度为 10 mg/mL 的储备溶液。分别量取储备溶液适量,稀释定容至 10 mL 容量瓶中,得到一系列质量浓度为 1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL、2.5 mg/mL、3.0 mg/mL、3.5 mg/mL 的氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液。

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:氨基柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm)。
- 6.3 有机相微孔滤膜:0.45 μm。
- 6.4 电子分析天平:感量为 0.1 mg、0.01 g。
- 6.5 电热恒温鼓风干燥箱。
- 6.6 粉碎机。
- 6.7 60 目筛子。
- 6.8 恒温磁力搅拌器。
- 6.9 集热式磁力恒温搅拌器。
- 6.10 旋转蒸发仪。

7 测定步骤

7.1 样品预处理

称取壳聚糖样品 1 kg,用粉碎机粉碎,过 60 目筛子,“四分法”采样至 50 g,置于 60 ℃电热恒温鼓风干燥箱中干燥至恒重。

7.2 样品中氨基葡萄糖的含量(ω₁)测定

称取壳聚糖样品 1.0 g,加 10 mL 水溶解,过滤,滤液中滴加 0.1 mL 盐酸,过 0.45 μm 有机相微孔滤膜,进样检测。

氨基葡萄糖含量按式(1)计算:

$$\omega_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times M_{r1}}{m_1 \times M_{r2}} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ω₁ ——样品中的氨基葡萄糖含量,%;
- ρ₁ ——由标准曲线查得的氨基葡萄糖盐酸盐的质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);
- V₁ ——溶液体积,单位为毫升(mL);
- M_{r1}——氨基葡萄糖的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol);
- m₁ ——样品质量,单位为毫克(mg);
- M_{r2}——氨基葡萄糖盐酸盐的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

7.3 酸水解溶液制备

7.3.1 乙酰化处理

壳聚糖样品 1.0 g,加入 100 mL 甲醇、1.5 mL 乙酸酐,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,浓缩液干燥得壳聚糖乙酰化样品。

7.3.2 酸水解

称取上述(7.3.1)壳聚糖乙酰化样品 50 mg,加入 3.0 mL 盐酸和 0.5 mL 水,置于集热式磁力恒温搅拌器中梯度升温酸水解,55 ℃反应 1.5 h,75 ℃反应 1.5 h,100 ℃反应 4 h。反应结束后,去除剩余盐酸,加水溶解,得酸水解溶液。

7.4 测定

7.4.1 色谱条件

色谱条件如下:

- a) 检测器:蒸发光散射检测器(检测条件:雾化温度 30 ℃,蒸发温度 60 ℃,氮气流速 1.5 L/min);
- b) 色谱柱:氨基柱 (250 mm ×4.6 mm,5 μm);
- c) 流动相:乙腈-水(80:20,体积分数);
- d) 流速:1.0 mL/min;
- e) 进样量:20 μL;
- f) 柱温:30 ℃。

7.4.2 色谱测定

分别取氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液、酸水解溶液适量,过 0.45 μm 有机相微孔滤膜,按照色谱分析条件,进样测定。氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液的液相色谱图参见附录 A。

8 结果计算

壳聚糖含量按式(2)计算:

$$\omega = \frac{\rho \times V \times M_{r3}}{m \times M_{r2}} \times 100 - \omega_1 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- ω ——壳聚糖含量,%;
- ρ ——由标准曲线查得的氨基葡萄糖盐酸盐的质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);
- V ——酸水解溶液体积,单位为毫升(mL);
- M_{r3} ——甲壳素摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol);
- m ——壳聚糖乙酰化样品质量,单位为毫克(mg);
- M_{r2} ——氨基葡萄糖盐酸盐摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol);
- ω_1 ——样品中氨基葡萄糖的含量,%。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

9 重复性

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 1.5%。

10 检出限和定量限

本方法检出限为 0.30 mg/mL,定量限为 0.45 mg/mL。

附录 A
(资料性附录)

氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液的液相色谱图

氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液的液相色谱图如图 A.1 所示。

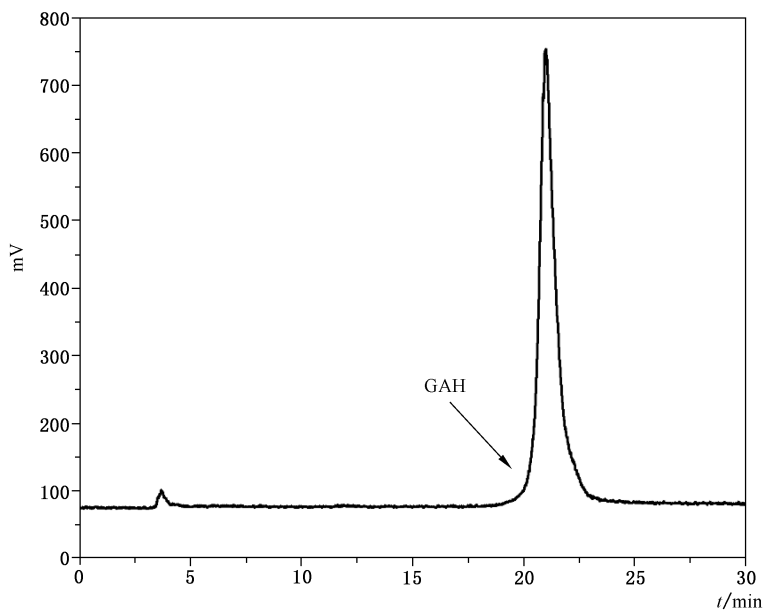


图 A.1 氨基葡萄糖盐酸盐标准品溶液的液相色谱图