

# 原料「幾丁聚醣」中去乙醯化程度之檢驗研究

洪甄敏 吳白玟 林汝青 高雅敏 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

## 摘要

幾丁聚醣(chitosan)，又稱為甲殼素，經幾丁質部分去乙醯化作用形成D-葡萄糖胺(D-glucosamine)及N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)之直鏈共聚物。本研究配合行政管理之施行，以雙指示劑滴定法建立原料「幾丁聚醣」中去乙醯化程度(degree of deacetylation, DDA)之檢驗方法。檢體於105°C乾燥24小時後以0.1 M鹽酸溶解，於60°C水浴振盪約2小時，藉由酚酞與甲基橙-苯胺藍作為指示劑，以0.1 M鹽酸將檢液由藍綠色滴定至紫紅色達滴定終點。確效結果顯示，同日間5種不同DDA之標準品及1種食品級原料的檢測值與標示值之百分比及變異係數分別介於96.0-105.0%及0.3-0.9%；異日間的檢測值與標示值之百分比及變異係數分別介於97.-105.0%及0.4-0.9%。另取標示DDA分別為76及94%之兩種幾丁聚醣標準品以1:1等重量比例混合做為回收率試驗基質，其同日間及異日間回收率分別為100.2及100.1%，變異係數為0.3及0.2%，顯示具有良好之回收率、精密度與準確度。另檢驗1件已知配方且有幾丁聚醣去乙醯化程度標示之膠囊食品，其DDA之平均檢測值與原料COA標示值之百分比為108.1%，變異係數為1.6%，顯示本方法對此膠囊食品亦具有良好之準確度與精密度。

**關鍵詞：**幾丁聚醣、去乙醯化程度、雙指示劑滴定

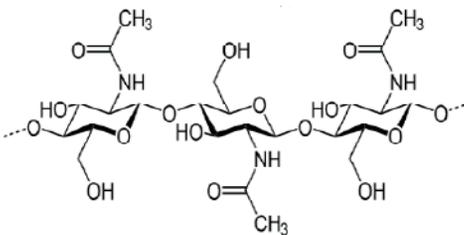
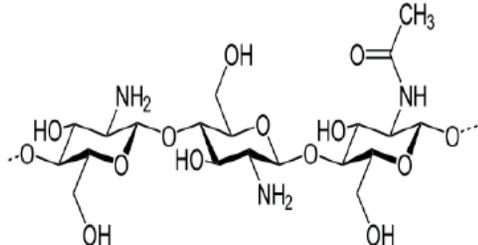
## 前言

幾丁聚醣(chitosan)，又稱為甲殼素，由幾丁質經鹼液或酵素進行脫乙醯基反應而製成，將結構中的乙醯基(-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O)移除並形成胺基(-NH<sub>2</sub>)，為D-葡萄糖胺(D-glucosamine)和N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)以β (1→4)鍵結之直線長鏈結構(表一)<sup>(1)</sup>。由於其具抗菌、生物相容性、生物可降解性及生物可利用性等特點，故廣泛使用於農業、生物藥劑、生物科技與食品工業上<sup>(2)</sup>。亦有文獻指出幾丁聚醣具有多項生理調節的機能，包括改善消化吸收的機能、減少脂肪及膽固醇的攝取等，且在

動物試驗中，餵食的幾丁質會和食物中的脂肪類物質結合，阻止脂肪在腸胃中的消化吸收，可降低血中膽固醇，因此常被做為減重保健食品<sup>(3)</sup>。

各國以去乙醯化程度來區分工業級與食品級幾丁聚醣，食品級幾丁聚醣之定義在歐美為去乙醯化程度介於70-95%<sup>(4,5)</sup>，日本訂為80%以上<sup>(6)</sup>，中國大陸訂為85%以上<sup>(7)</sup>。我國於108年3月19日公告「由蝦、蟹殼或黑麴菌絲體所製取之食品原料幾丁聚醣(chitosan)之使用限制及其標示」，訂定使用由蝦、蟹殼或黑麴菌絲體製取之幾丁聚醣作為原料之食品，其容器或外包装應以中文顯著標示「有服用慢性病藥物

表一、幾丁質與幾丁聚醣之化學結構

英文名	Chitin	Chitosan
鍵結	$\beta$ (1→4) linked <i>N</i> -acetylglucosamine	$\beta$ (1→4) linked <i>N</i> -acetylglucosamine and glucosamine
結構		

(Jennings *et al.*, 2015)<sup>(1)</sup>

者，應諮詢醫師後，方可使用」及「不建議孕婦、授乳者及嬰幼兒食用」之警語字樣<sup>(8)</sup>。

測定幾丁聚醣去乙醯化程度的方式主要分為三大類，一為測定游離胺基，利用滴定法測定，包括酸鹼滴定(指示劑滴定)、膠體滴定、電導滴定，此方法操作簡便快速，且再現性好、準確度高；二為破壞法，利用酸或酵素將幾丁聚醣水解成葡萄糖胺與*N*-乙醯葡萄糖胺的單體型態，再由HPLC分析，此方法前處理條件較複雜，需確保幾丁聚醣完全水解，且總分析時間長；三為核磁共振光譜測定法，此方法以少量樣品即可檢測，分析後樣品不被破壞，但儀器花費高、檢測時間長，無法作為例行性分析<sup>(9)</sup>。故考量方法普遍性、使用儀器與試劑取得容易以及實驗操作容易，本研究採用滴定法作為測定原料「幾丁聚醣」中去乙醯化程度之開發基礎。

## 材料與方法

### 一、材料與試藥

#### (一)標準品與檢體來源

幾丁聚醣標準品5件(去乙醯化程度標示值分別為76、85、88、93、94%)，皆購自Sigma-Aldrich公司(Saint Louis, MO,

USA)。食品級幾丁聚醣原料1件(去乙醯化程度標示值為91.22%)，購自誠麗實業股份有限公司。含95%去乙醯化程度之幾丁聚醣膠囊產品1件。

#### (二)試藥與溶劑

鹽酸、氫氧化鈉、甲基橙及苯胺藍(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)；醋酸(VWR, Part of Avantor, Radnor, PA, USA)；乙醇(Echo Chemical, Miaoli, Taiwan)；酚酞(J.T.Baker Chemical, Phillipsburg, NJ, USA)。

### 二、儀器與設備

#### (一)恆溫烘箱(ULE500, Memmert, Germany)

#### (二)往復式振盪恆溫水槽(SB-301, 雙鷹企業有限公司, 台灣)

#### (三)漩渦混合器(Vortex genie-2, Scientific Industries, USA)

#### (四)滴定裝置(Class AS PTFE Stopcock Schellbach, Witeg Labortechnik GmbH, Switzerland)

#### (五)去離子水製造機(Millipore milli-Q, Millipore, USA)

### 三、試劑之調製

## (一) 0.1 M 鹽酸溶液

取鹽酸 8.33 mL，緩緩加入去離子水 900 mL，再加去離子水使成 1000 mL。

## (二) 0.1 M 氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉 4 g，加去離子水溶解使成 1000 mL。

## (三) 甲基橙指示劑

稱取甲基橙 5 mg，加去離子水溶解使成 5 mL。

## (四) 苯胺藍指示劑

稱取苯胺藍 0.4 g，加 2% 醋酸溶解使成 10 mL。

## (五) 甲基橙-苯胺藍指示劑

取甲基橙指示劑與苯胺藍指示劑以 1:2 (v:v) 比例混勻。

## (六) 酚酞指示劑

稱取酚酞 10 mg，加乙醇溶解使成 10 mL。

## 四、檢液之調製

將檢體(幾丁聚醣標準品、食品級幾丁聚醣原料、幾丁聚醣膠囊產品)於 105°C 烘箱乾燥 24 小時後，置於真空乾燥器冷卻至室溫，均質混勻後，取約 0.2 g，精確稱定，置於血清瓶中，加入 0.1 M 鹽酸溶液 30 mL，旋渦混合，於 60°C 往復式振盪恆溫水槽振盪處理至完全溶解(約 2 小時)，冷卻後供作檢液。

## 五、測定(雙指示劑滴定法)

滴定過程中之顏色變化如圖一所示，以塑膠滴管滴取酚酞指示劑 1 至 2 滴(0.1 至 0.2 mL) 於檢液中，旋渦混合，以 0.1 M 氫氧化鈉溶液滴定至深紅色，再以 0.1 M 鹽酸溶液滴定至無色，並以 0.1 M 氫氧化鈉調整至微紅色，並加甲基橙-苯胺藍指示劑溶液 4 至 6 滴(0.4 至 0.6 mL) 於檢液中，檢液呈藍綠色，最終以 0.1 M 鹽酸溶液緩慢滴定至紫紅色(達到滴定終點)，過程中需劇烈搖晃使之混勻，記錄 0.1 M 鹽酸溶液滴定體積，並依下列計算式求出檢體中胺基質

量分數，進而求出去乙醯化程度：

$$\text{檢體中胺基的質量分數 } W_{\text{NH}_2}(\%) = \frac{C_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}} \times 10^{-3} \times 16.02}{M}$$

$C_{\text{HCl}}$ ：鹽酸溶液之濃度(M)

$V_{\text{HCl}}$ ：溶解檢體之鹽酸溶液體積(mL)

M：幾丁聚醣之取樣重量(g)

$10^{-3}$ ：單位換算係數

16.02：胺基之莫耳質量(g/mol)

$$\text{檢體中去乙醯化程度 DDA}(\%) = \frac{203.2 \times W_{\text{NH}_2}}{16.02 + 42.04 \times W_{\text{NH}_2}} \times 100$$

203.2：N-乙醯葡萄糖胺單體之分子量

42.04：胺基乙醯基( $\text{C}_2\text{H}_3\text{ONH}$ )脫去乙醯基( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ )形成胺基( $\text{NH}_2$ )之分子量差異

## 六、滴定方法之評估

將檢體以多種滴定法：包括 PVSK(potassium polyvinylsulfate)滴定法、電位滴定法與甲基橙、甲基橙-苯胺藍及酚酞/甲基橙-苯胺藍之指示劑滴定法進行測試(表二)，探討不同滴定法之檢測值與標示值之百分比，選擇最佳結果進行後續試驗。

## 七、前處理條件之評估

(一) 不同溶劑下往復式振盪處理對去乙醯化程度檢測值之影響

將檢體混勻後，取約 0.2 g，精確稱定，取不同溶劑(0.1 M 鹽酸、0.2 M 鹽酸、0.22 M 甲酸、0.17 M 醋酸)各 30 mL 於室溫下以往復式振盪處理至完全溶解(約 2 小時)，供作檢液，續以雙指示劑滴定法檢測，計算其檢測值與標示值之百分比，以探討溶劑對去乙醯化程度檢測值之影響。

(二) 檢體中的水分對去乙醯化程度檢測值之影響

將檢體於 105°C 烘箱乾燥 24 小時後置於真

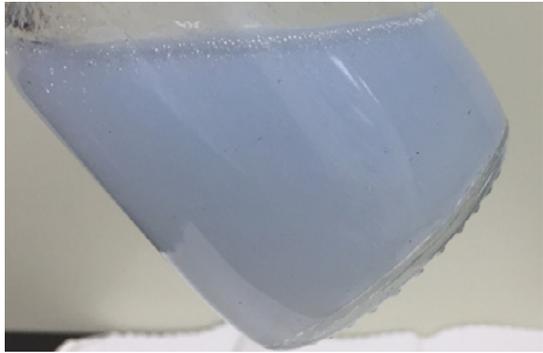
1. 振盪後冷卻，呈透明



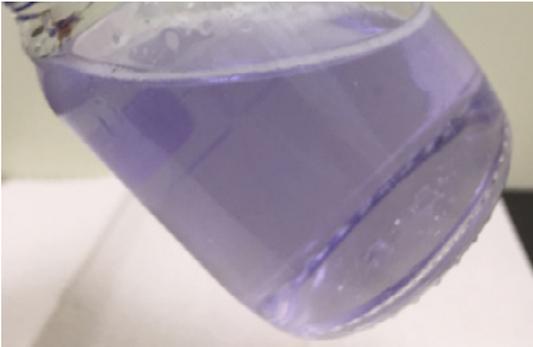
2. 加入酚酞指示劑溶液以氫氧化鈉溶液調整至深紅色



3. 以鹽酸溶液滴定至無色，並以氫氧化鈉調整至微紅色 4. 加入甲基橙-苯胺藍指示劑溶液，呈藍綠色



5. 以鹽酸溶液滴定至紫紅色



圖一、雙指示劑滴定法測定幾丁聚醣去乙酰化程度之顏色變化

空乾燥器冷卻至室溫，均質混勻。分別取未乾燥與乾燥檢體各約0.2 g，精確稱定，添加0.1 M鹽酸溶液30 mL，旋渦混合，於室溫下以往復式振盪處理至完全溶解(約2小時)，供作檢液，續以雙指示劑滴定法

檢測，計算其檢測值與標示值之百分比，以探討檢體中的水分對去乙酰化程度檢測值之影響。

(三)不同溫度下，往復式振盪處理對去乙酰化程度檢測值之影響

表二、以滴定方法測定幾丁聚醣去乙醯化程度之比較

滴定方法	PVSK <sup>(10)</sup> 滴定	電位滴定 <sup>(11)</sup>	指示劑滴定		
			甲基橙 <sup>(12)</sup>	甲基橙-苯胺藍 <sup>(7)</sup>	酚酞/甲基橙-苯胺藍 <sup>(13)</sup>
指示劑	甲苯胺藍	—	甲基橙	甲基橙-苯胺藍	酚酞/甲基橙-苯胺藍
溶劑	5%甲酸	0.1 M 鹽酸	0.1 M 鹽酸	0.1 M 鹽酸	0.1M 鹽酸
溶解條件	室溫攪拌	連續振盪60 min	室溫攪拌	室溫攪拌	室溫攪拌
指示劑滴數	2-3	—	5-6	2-3	酚酞：1-2/甲基橙-苯胺藍：4-6
滴定溶劑	PVSK	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M HCl
顏色變化	藍→紫紅	—	紅→橙	紫紅→藍綠	無色→淡紅/藍綠→紫紅
試驗結果 <sup>a</sup>	75%	79%	186%	183%	83%
滴定終點判斷	不易	—	不易	不易	容易
限制	—	試驗時間較長	—	—	—

<sup>a</sup>幾丁聚醣未經乾燥處理，且試驗結果以「檢測值與標示值之百分比(%)」表示(n=2)

將乾燥之檢體混勻後，取約0.2 g，精確稱定，添加0.1 M 鹽酸溶液30 mL，旋渦混合，分別於室溫與60°C以復式振盪處理至完全溶解(約2小時)，供作檢液，續以雙指示劑滴定法檢測，計算其檢測值與標示值之百分比，以探討振盪溫度對去乙醯化程度檢測值之影響。

## 八、確效試驗

### (一) 檢測值與標示值之百分比

取5種不同去乙醯化程度之標準品、1種食品級原料及1種膠囊產品依第五節及第七節流程進行分析，各進行6重複之同日間試驗與12重複之異日間試驗，將檢測值與標示值進行比對，依下列計算式求出檢測值與標示值之百分比，比較兩者之接近程度，並計算其變異係數。

$$\text{檢測值與標示值之百分比(\%)} = \frac{\text{檢測值}}{\text{標示值}} \times 100$$

### (二) 食品中幾丁聚醣去乙醯化程度之回收率及重複性試驗

取標示去乙醯化程度為76與94%之兩種標準品以1:1等重量比例混合而成做為添加

回收試驗之基質，依第五節及第七節流程進行分析，並依下列計算式計算其回收率。

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{檢測值}}{\text{標示值}} \times 100$$

## 九、統計分析

平均值、標準差及變異係數等數值以Microsoft Excel 2010軟體進行計算。

## 結果與討論

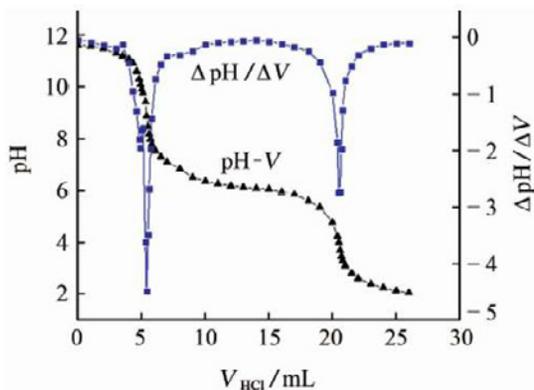
### 一、滴定方法之評估

考量方法普遍性、使用儀器與試劑取得容易以及實驗操作容易，本研究選擇滴定法作為幾丁聚醣去乙醯化程度之測定，經彙整並比較多種滴定法：包括PVSK滴定法<sup>(10)</sup>、電位滴定法<sup>(11)</sup>與甲基橙<sup>(12)</sup>、甲基橙-苯胺藍<sup>(7)</sup>及酚酞/甲基橙-苯胺藍<sup>(13)</sup>之指示劑滴定法，相關結果與優缺點比較等資訊彙整於表二。結果顯示，PVSK滴定法、電位滴定法、甲基橙滴定法、甲基橙-苯胺藍滴定法及酚酞/甲基橙-苯胺藍(雙指示劑)滴定法之檢測值與標示值之百分比分別為75、79、186、183及83%，其中，電

位滴定法的試驗時間較長，PVS<sub>K</sub>、甲基橙、甲基橙-苯胺藍這三種方法的滴定終點顏色不易判斷，而甲基橙滴定法、甲基橙-苯胺藍滴定法之檢測值與標示值之百分比偏高，係因部分酸液用於中和在幾丁聚醣生產過程中所吸附之殘餘鹼，而高估去乙醯化程度。雙指示劑滴定法過程的滴定體積與pH變化關係如圖二所示，先加入酚酞指示劑後以氫氧化鈉及鹽酸調整顏色至微紅色，此階段主要是在滴定過量的氫氧化鈉，後續再加入甲基橙-苯胺藍指示劑並以鹽酸滴定以調整至紫紅色(滴定終點)，主要目的是在滴定幾丁聚醣上的胺基，依據實驗結果顯示，此方法的檢測值與標示值之百分比為83%，檢測值相較於其他方法最接近標示值，且滴定終點顏色容易判斷，亦不受殘餘酸鹼液影響，故後續選用酚酞/甲基橙-苯胺藍的雙指示劑滴定法進行條件優化試驗。

## 二、前處理條件之評估

本研究續以酚酞/甲基橙-苯胺藍的雙指示劑滴定法為基礎，為優化檢測值與標示值之百分比，故參考相關文獻，研究比較在不同溶劑(0.1 M鹽酸、0.2 M鹽酸、0.22 M甲酸、0.17 M醋酸)<sup>(2,13)</sup>、乾燥(105°C, 24小時)<sup>(14)</sup>及振盪溫度



圖二、雙指示劑滴定法過程的滴定體積與pH變化關係圖

(王等人, 2014)<sup>(13)</sup>

(室溫、60°C)<sup>(2)</sup>條件下之檢測結果。

取5種不同去乙醯化程度之標準品、1種食品級原料進行溶解度試驗，結果如圖三，以0.1 M鹽酸為溶劑在各種標準品與食品級原料的檢測值與標示值之百分比介於90%至93%，檢測值與標示值最為接近，故後續選用0.1 M鹽酸作為溶劑。

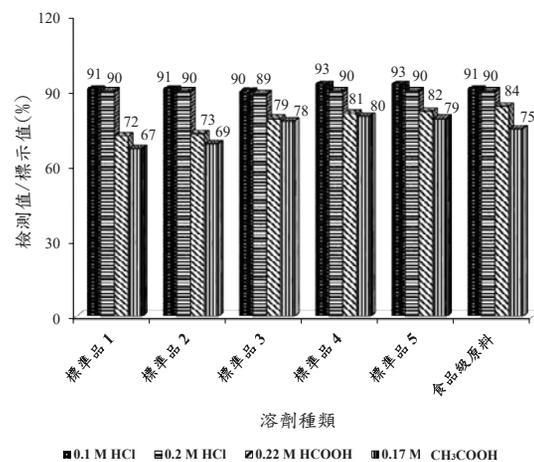
另取5種不同去乙醯化程度之標準品、1種食品級原料分別進行乾燥與振盪溫度試驗，結果如圖四(a)及四(b)，顯示經105°C乾燥24小時與於60°C振盪後的檢測值與標示值之百分比(%)較未乾燥與室溫振盪來的佳，故後續會先將幾丁聚醣乾燥後再於60°C下進行振盪。

綜整上述結果，前處理步驟為將幾丁聚醣於105°C乾燥24小時後以0.1 M鹽酸為溶劑，於60°C下進行振盪溶解，作為前處理流程，並以此流程執行後續確效試驗。

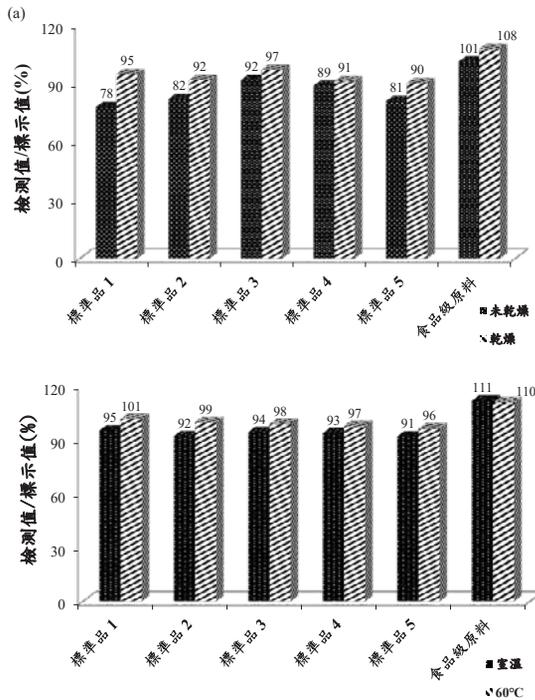
## 三、確效試驗結果

### (一)檢測值與標示值之百分比及精密度

以5種不同去乙醯化程度之標準品及1種食品級原料之檢測值與COA之標示值進行比對，標準品1至5(去乙醯化程度標示值分別為76、85、88、93及94%)及食品級



圖三、不同溶劑之前處理條件試驗結果(n=2)



圖四、2種試驗結果：經105°C乾燥24小時(a)及兩種溫度振盪處理(b)(n=2)

原料(去乙醯化程度標示值為91.22%)在同日間及異日間的檢測值與標示值之百分比分別介於96.7-105.0%及97.0-105.0%，其變異係數分別介於0.3-0.9%及0.4-0.9%(表三)，顯示本方法之檢測值與標示值具有

表四、去乙醯度之準確度及精密度之確效試驗結果

基質	預測之 DDA (%)	同日間 <sup>a</sup>		異日間 <sup>b</sup>	
		回收率 (%)	變異係數 (%)	回收率 (%)	變異係數 (%)
取DDA為76與94%之標準品以1:1等重量比例混合	85	100.2	0.3	100.1	0.2

<sup>a</sup> 6重複之平均實驗結果

<sup>b</sup> 12重複之平均實驗結果

良好近似值，且再現性高。

#### (二)準確度及精密度

以標示去乙醯化程度為76與94%之兩種標準品經1:1等重量比例混合之基質，進行添加回收試驗，依前述實驗步驟進行分析並計算其回收率，結果如表四，在同日間及異日間的回收率分別為100.2及100.1%，其變異係數分別為0.3及0.2%，與預期去乙醯化程度85%之檢測結果相近，顯示本方法具有良好之準確度及精密度。

## 四、市售產品調查

本研究所選擇之市售產品，主要係以產品名稱含幾丁聚醣或其原料成分標示含有幾丁聚

表三、去乙醯度之檢測值與標示值之百分比及精密度之確效試驗結果

基質	標示值 (%)	同日間 <sup>a</sup>			異日間 <sup>b</sup>		
		檢測值 (%)	檢測值與標示值之百分比(%)	變異係數 (%)	檢測值 (%)	檢測值與標示值之百分比(%)	變異係數 (%)
標準品 1	76	76.6	100.8	0.5	76.5	100.6	0.6
標準品 2	85	85.7	100.8	0.9	85.7	100.9	0.9
標準品 3	88	86.2	97.9	0.3	86.2	97.9	0.4
標準品 4	93	90.3	97.1	0.8	90.3	97.1	0.8
標準品 5	94	90.9	96.7	0.5	91.2	97.0	0.8
食品級原料	91.22	95.6	105.0	0.8	95.6	105.0	0.8

<sup>a</sup> 6重複之平均實驗結果

<sup>b</sup> 12重複之平均實驗結果

表五、市售產品之檢測結果

型態	標示值來源	標示值 (%)	同日間 <sup>a</sup>			異日間 <sup>b</sup>		
			檢測值 (%)	檢測值與標示 值之百分比(%)	變異係數 (%)	檢測值 (%)	檢測值與標示 值之百分比(%)	變異係數 (%)
膠囊	原料COA	95.00	101.2	106.6	0.7	104.1	108.1	0.6
	實驗室原料驗收時檢測值	96.46		105.0			106.4	

<sup>a</sup>6重複之平均實驗結果

<sup>b</sup>12重複之平均實驗結果

醣之膠囊與錠狀產品為主，但由於去乙醯化程度的計算公式中樣品重量是指幾丁聚醣原料重量，故產品需附有成分配方比才能進行計算，否則會低估去乙醯化程度，且也需附有幾丁聚醣原料之去乙醯化程度標示值，才能與檢測值進行比對。

以一件已知配方之幾丁聚醣膠囊產品，其原料去乙醯化程度為95%，原料驗收時檢測值為96.46%，將檢測值分別與原料標示值及原料驗收檢測值進行比較。檢測結果如表五，與原料標示值進行比較時，在同日間及異日間的檢測值與標示值之百分比分別為106.6及108.1%，與原料驗收檢測值比較時，在同日間及異日間的檢測值與標示值之百分比分別為105.0及106.4%，其變異係數分別為0.7及1.6%。不論是原料COA標示值或是其公司實驗室在原料驗收時檢測值，與此方法之檢測值相比較，檢測值與標示值之百分比皆位於100附近，顯示本方法之準確性良好。

## 結 論

本研究建立原料「幾丁聚醣」中去乙醯化程度之檢驗方法研究，該方法之準確度及精密度良好，顯示方法適用於幾丁聚醣原料，可作為監測保健食品原料端之品質參考。

## 參考文獻

- Jennings, J. A. and Bumgardner, J. D. 2017. Chitosan based biomaterials, 1<sup>st</sup> ed. pp. 117-133. Woodhead Publishing, Witney, Oxford, UK.
- Romanazzi, G., Gabler, F. M., Margosan, D., Mackey, B. E. and *et al.* 2009. Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology* 99: 1028-1036.
- 陳澄河。2003。蝦蟹殼傳奇。科學發展，369: 63-67。
- European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. 2017. European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> ed. pp. 2028-2029. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. Strasbourg, France.
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2017. The United States Pharmacopeia 40, The National Formulary 35. pp. 7601. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD, USA.
- 厚生勞動省。2003。キトサン食品。医薬品の範囲に関する基準，pp. 95-98，醫齒藥出版株式會社，東京。
- 中國國家標準化管理委員會。2013。食品安全國家標準食品添加劑脫乙醯甲殼素(殼聚醣)。中華人民共和國國家標準GB 29941-2013。
- 衛生福利部。2019。由蝦、蟹殼或黑

- 麴菌絲體所製取之食品原料幾丁聚醣 (Chitosan) 之使用限制及其標示。108.03.19 衛授食字第 1081300232 號公告訂定。 [<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=24983>]。
9. Elnashar, M. 2011. Biotechnology of Biopolymers. pp. 91-108. In Tech-open access publisher. Rijeka, Croatia.
  10. Omogbai, B. A. and Ikenebomeh, M. J. 2016. Sub-chronic toxicity of a characterized food grade chitosan from crab (*Callinectes sapidus*). NISEB J. 16(1): 34-44.
  11. Kumaria, S. and Rath, P. K. 2014. Extraction and characterization of chitin and chitosan from (*Labeo rohita*) fish scales. *Procedia Mater. Sci.* 6: 482-489.
  12. Hossain, M. S. and Iqbal, A. 2014. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 12(1): 153-160.
  13. 王超, 潘家保, 焦世寧, 蔡宏偉。2014。雙指示劑法測定殼聚醣的脫乙酰度。理化檢驗-化學分冊, 50: 892-894。
  14. Nouri, M., Khodaiyan, F., Razavi, S. H. and Mousavi, M. A. 2016. The effect of different chemical and physical processing on the physicochemical and functional characterization of chitosan extracted from shrimp waste species of indian white shrimp. *Prog. Rubber Plast. Re.* 32: 39-54.

# Method of Test for Degree of Deacetylation in Raw Material Chitosan

JEN-MIN HUNG, PAI-WEN WU, NU-CHING LIN, YA-MIN KAO,  
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

## ABSTRACT

Chitosan is a straight-chain copolymer composed of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine, and is obtained by the partial deacetylation of chitin. In this study, a titration method utilized double indicators was established to test the degree of deacetylation (DDA) in raw material. Sample each was dried in oven at 105°C for about 24 hours, and then dissolved in 0.1 M hydrochloric acid. The solution was incubated in 60°C water bath with reciprocal shaking for about 2 hours. Two indicators, phenolphthalein and methyl orange-aniline blue, were added into the solution, and the blue-green chitosan solution was titrated with 0.1 M hydrochloric acid until it turned purple-red. A method validation contained five chitosan standards with different DDAs and one raw-food material was conducted. The results showed that the detected values and the labeled values in intra-day study were between 96.7 and 105.0%, and the coefficients of variation were between 0.3 and 0.9%, respectively. For the inter-day study, the detected values to the labeled values were between 97.0 and 105.0%, and the coefficients of variation were between 0.4 and 0.9%, respectively. Two chitosan standards with DDAs 76% and 94% were blended at the ratio of 1:1 in weight for recovery study. The results showed, the recoveries in intra-day and inter-day were 100.2 and 100.1%, and the coefficients of variation were 0.3 and 0.2%, respectively. This method offered high recovery, precision and accuracy. One capsule sample with known ingredients and DDA was analyzed. The detected value to the labeled value was 108.1%, and the coefficient of variation was 1.6%. This results showed that this method was accurate and precise for capsule sample as well.

Key words: chitosan, degree of deacetylation, double indicators of titration