МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение сахаров спектрофотометрическим методом	**ОФС.1.2.3.0019.15** **Вводится впервые**

Для определения сахаров используют спектрофотометрический метод. Его проводят, осуществляя измерение оптической плотности окрашенных растворов, образуемых при взаимодействии сахаров с антроновым или орциновым реактивами и пикриновой кислотой.

Метод определения с антроновым реактивом

Метод основан на расщеплении сложных углеводов до моносахаров в сильнокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием гидроксиметилфурфурола, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета. Интенсивность образовавшейся окраски прямо пропорциональна содержанию сахаров в реакционной среде.

Пропорциональная зависимость интенсивности окраски от содержания сахаров в испытуемом растворе соблюдается в области концентраций моносахаров 0,02 – 0,10 мг/мл.

Методика. В пробирку помещают 3,0 мл раствора испытуемого препарата (пробоподготовка и, если необходимо, методика гидролиза полисахаров до моносахаров должны быть описаны в фармакопейной статье), охлаждают в бане со льдом до 0 °С, осторожно при охлаждении приливают 6,0 мл 0,2 % антронового реактива, перемешивают и немедленно нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 – 15 мин (точное время должно быть указано в фармакопейной статье), охлаждают и измеряют

оптические плотности испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. В охлажденную на бане со льдом пробирку с 3,0 мл воды приливают 6,0 мл 0,2 % антронового реактива. Далее проводят анализ аналогично раствору испытуемого препарата.

Приготовление стандартного раствора. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г стандартного образца глюкозы, растворяют в воде или насыщенном растворе бензойной кислоты в воде, доводят этим же раствором до метки и перемешивают. Отбирают 2,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит 0,02 мг/мл глюкозы. Далее проводят анализ аналогично раствору испытуемого препарата.

Вместо использования одного стандартного раствора, если указано в фармакопейной статье, строят калибровочный график, используя разведенные растворы стандартного образца глюкозы с концентрацией от 0,01 до 0,05 мг/мл.

Калибровочный график строят при каждом анализе.

Содержание сахаров в 1 мл раствора испытуемого препарата находят по калибровочной кривой зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания стандартного образца глюкозы в 1 мл растворителя.

При анализе декстранов учитывают, что 1 г глюкозы соответствует 0,94 г декстранов.

Примечание. Приготовление 0,2 % антронового реактива. 0,20 г антрона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют серную кислоту, свободную от азота, или смесь серная кислота, свободная от азота, – вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в темное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч.

Срок годности при хранении в темном месте при температуре 6 – 8 °С не более 7 сут.

При использовании антронового реактива для анализа глюкозы или декстранов проводят определение чувствительности реактива к глюкозе.

Осторожно прибавляют 6 мл антронового реактива (в смеси серная кислота, свободная от азота, – вода, 19:1) к 3 мл раствора *D*-глюкозы (5 мкг/мл), нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Раствор, содержащий глюкозу, должен быть темнее раствора сравнения без глюкозы. Раствор сравнения темно-зеленого цвета.

Метод определения с пикриновой кислотой

Метод основан на цветной реакции моносахаров с пикриновой кислотой, протекающей с образованием пикраминовой кислоты в результате восстановления сахаром группы NO_2 до NH_2. Интенсивность образовавшейся окраски пропорциональна количеству определяемого сахара (0,1 – 0,8 мг/мл) в испытуемом растворе препарата. Пробоподготовка должна быть описана в фармакопейной статье.

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 3,0 мл натрия карбоната раствора 20 % и 1 – 5 мл раствора испытуемого образца (точное количество должно быть указано в фармакопейной статье). Колбу погружают на 10 мин на кипящую водяную баню, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца глюкозы на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны, указанной в фармакопейной статье (в области от 440 до 460 нм), в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. Вместо раствора испытуемого образца используют воду, добавляя те же реактивы и проводя те же операции, что и с раствором испытуемого образца препарата.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. Около 0,05 г (точная навеска) глюкозы, предварительно высушенной при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью

250 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

1 мл раствора стандартного образца содержит около 0,2 мг глюкозы.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

2. Приготовление пикриновой кислоты раствора 1 %. 1 г кислоты пикриновой помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 90 мл воды на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора при хранении в склянках с притертой пробкой в защищенном от света месте 1 мес.

Метод определения с орциновым реактивом

При нагревании пентоз (или их фосфорных производных) в присутствии кислот от них отщепляется вода и образуется фурфурол; в присутствии орцина и железа(III) хлорида при этом развивается зеленое окрашивание.

Чувствительность метода определения значительно выше с рибозой, чем с дезоксирибозой и гексозами.

В пробирку помещают 2,0 мл разведенного в воде препарата с содержанием рибозы около 2,5 – 25,0 мкг/мл, прибавляют 2,0 мл железа(III) хлорида раствора 0,05 % в хлористоводородной кислоте концентрированной, смесь встряхивают, прибавляют 0,2 мл орцина раствора 10 % в этаноле. Пробирку со смесью помещают в кипящую водяную баню на 20 мин, затем охлаждают в ледяной воде. По достижении комнатной температуры измеряют оптическую плотность раствора испытуемого образца препарата на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. Вместо раствора испытуемого образца используют воду, добавляя те же реактивы и проводя те же операции, что и с раствором испытуемого образца препарата.

Содержание сахаров (пентоз) в 1 мл испытуемого раствора препарата находят по калибровочной кривой зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания рибозы в мкг/мл воды.

Построение калибровочного графика. Перед определением разводят стандартный раствор рибозы в 10 раз водой (рабочий раствор). В 6 пробирок вносят 0,10, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 и 1,0 мл рабочего раствора, в каждую пробирку прибавляют воду до 2,0 мл и далее проводят те же операции, что и с испытуемым раствором.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца рибозы. 25,0 мг стандартного образца рибозы (с содержанием не менее 99,0 %) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление железа(III) хлорида раствора 0,05 %. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,050 г $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, растворяют в хлористоводородной кислоте концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

3. Приготовление орцина раствора 10 % в этаноле. 10,0 г орцина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в этаноле, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным и защищают от света.