**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Определение сахаров спектрофотометрическим методом** |  | **ОФС.1.2.3.0019** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.3.0019.15** |

|  |
| --- |
|  |

Методы определения сахаров спектрофотометрическим методом основаны на измерении оптической плотности окрашенных растворов, образуемых при взаимодействии сахаров с антроновым реактивом (метод 1), орциновым реактивом (метод 2) и пикриновой кислотой (метод 3).

**Метод 1**

Метод основан на реакции гидролиза сложных углеводов до моносахаров в сильнокислой среде с их последующей дегидратацией. Образующийся гидроксиметилфурфурол вступает в реакцию комплексообразования с антроном, в результате наблюдается появление синевато-зелёного окрашивания. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию моносахаров в испытуемом растворе в области концентраций 0,02 – 0,10 мг/мл.

*Испытуемый раствор*. Готовят, как указано в фармакопейной статье.

*Раствор* *стандартного образца глюкозы*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца глюкозы, растворяют в воде или как указано в фармакопейной статье, доводят этим же растворителем до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл полученного раствора, доводят растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит 0,02 мг/мл глюкозы.

*Раствор сравнения.* В пробирку помещают 3 мл воды, охлаждают на ледяной бане, прибавляют 6 мл антронового реактива 0,2 %.

В пробирку помещают 3,0 мл испытуемого раствора, охлаждают на ледяной бане и осторожно прибавляют 6,0 мл антронового реактива 0,2 %, перемешивают и немедленно нагревают на водяной бане в течение времени, указанного в фармакопейной статье. Охлаждают и измеряют оптическую плотность испытуемого раствора в максимуме поглощения при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора фармакопейного стандартного образца глюкозы, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

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

Содержание сахаров в 1 мл испытуемого раствора определяют 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.

**Метод 2**

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

*Железа(III) хлорида раствор 0,05 %* *в хлористоводородной кислоте концентрированной.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,05 г (точная навеска) FeCl3·6H2O, растворяют в хлористоводородной кислоте концентрированной и доводят объём раствора водой до метки. Срок годности раствора 1 месяц.

*Орцина раствора 10 % в этаноле*. В мерную колбу из тёмного стекла вместимостью 100 мл помещают 10 г (точная навеска) орцина, растворяют в этаноле и доводят объём раствора тем же растворителем. Раствор используют свежеприготовленным.

*Испытуемый раствор*. Готовят, как указано в фармакопейной статье.

*Раствор стандартного образца рибозы*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца рибозы, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор сравнения.* К 2,0 мл железа(III) хлорида раствора 0,05 % в хлористоводородной кислоте концентрированной прибавляют 2 мл воды, смесь встряхивают и прибавляют 0,2 мл орцина раствора 10 % в этаноле. Пробирку нагревают на водяной бане в течение 20 мин, с последующим охлаждением в ледяной воде.

В пробирку помещают 2,0 мл испытуемого раствора с содержанием рибозы 2,5 – 25,0 мг/мл, прибавляют 2,0 мл железа(III) хлорида раствор 0,05 % в хлористоводородной кислоте концентрированной, смесь встряхивают и прибавляют 0,2 мл орцина раствора 10 % в этаноле. Пробирку нагревают на водяной бане в течение 20 мин, с последующим охлаждением в ледяной воде, и измеряют оптическую плотность испытуемого раствора в максимуме поглощения при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора фармакопейного стандартного образца рибозы, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

*Построение калибровочного графика.*В 6 пробирок вносят 0,10, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 и 1,0 мл раствора фармакопейного стандартного образца рибозы, прибавляют воду до 2,0 мл и проводят те же операции, что и с испытуемым раствором.

Содержание сахаров (пентоз) в 1 мл испытуемого раствора находят по калибровочному графику зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания рибозы в мг/мл.

**Метод 3**

Метод основан на цветной реакции моносахаров с пикриновой кислотой, протекающей с образованием пикраминовой кислоты в результате восстановления сахаром группы – NO2 до – NH2. Интенсивность образовавшейся окраски пропорциональна количеству определяемого сахара (0,1 – 0,8 мг/мл) в испытуемом растворе.

*Испытуемый раствор*. Готовят, как указано в фармакопейной статье.

*Раствор стандартного образца глюкозы*. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 0,05 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца глюкозы, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

Срок годности раствора 10 сут при хранении в прохладном, защищённом от света месте.

*Раствор сравнения.* К 1,0 мл пикриновой кислоты раствора 1 % прибавляют 3,0 мл натрия карбоната раствора 20 % и количество воды, равного количеству испытуемого раствора. Колбу нагревают на водяной бане в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора водой до метки.

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают точное количество испытуемого раствора указанного в фармакопейной статье, 1,0 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, и 3,0 мл натрия карбоната раствора 20 %. Колбу нагревают на водяной бане в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объём раствора водой до метки и измеряют оптическую плотность испытуемого раствора в максимуме поглощения при длине волны (от 440 до 460 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора фармакопейного стандартного образца глюкозы, приготовленного аналогично испытуемому раствору.