

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.05.08

一种测定右旋糖酐原料含量的方法研究

王光娥

(广西南宁市桃源兽药厂, 南宁 530104)

[收稿日期] 2021-09-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 05-0063-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立了右旋糖酐原料含量的检测方法, 采用蒽酮-硫酸比色法进行检测。结果显示, 在 0.0161-0.0642 mg/mL 的浓度范围内线性良好, 其线性方程为 $A = 14.15C + 0.0009$, 相关系数 $r = 0.9997$, 平均回收率达 100.5%。供试液 2 h 内基本稳定。为右旋糖酐原料的含量检测提供了一种可行的检测方法, 为进一步控制右旋糖酐原料质量增加了一种简单有效可控的检测项目, 为修订右旋糖酐原料的国家标准提供参考。

[关键词] 右旋糖酐; 含量检测; 比色法

A Method for Determination of Dextran Raw Material

WANG Guang-e

(Guangxi Nanning Taoyuan Veterinay Drugs Factory, Nanning 530104, China)

Abstract: A method for the determination of dextran in raw materials was established, and anthrone-sulfuric acid colorimetric method was used. The results showed good linearity in the range of 0.0161-0.0642 mg/mL. The linear equation was $A = 14.15C + 0.0009$, the correlation coefficient $r = 0.9997$, and the average recovery was 100.5%. The test solution was basically stable within 2 h. It provides a feasible method for the content determination of dextran raw material, adds a simple, effective and controllable detection item for the further control of the quality of dextran raw material, and provides a reference for the revision of the national standard of dextran raw material.

Key words: dextran; content detection; colorimetry

右旋糖酐系蔗糖经肠膜状明串珠菌 *L. - M - 1226* (*Leuconostoc mesenteroides*) 发酵后生成的高分子葡萄糖聚合物, 经处理精制而得^[1]。是一种血容量补充药, 也是生产右旋糖酐铁的一种主要原料, 目前收载的原料品种有右旋糖酐 20、右旋糖酐 40、右旋糖酐 70 等, 《中国药典》^[2] 和《中国兽药典》^[1] 均未

收载相关右旋糖酐原料的含量测定方法, 右旋糖酐原料除分子量与分子量分布系数要符合规定之外, 其糖酐含量也是影响右旋糖酐原料质量的一个重要因素, 目前国内文献尚未见右旋糖酐原料含量检测的相关报道。只有《英国药典》收载的右旋糖酐铁注射液^[3]项下有右旋糖酐含量的检测。参照《英

国药典》收录的右旋糖酐铁注射液项下右旋糖酐含量的检测方法,采用的是蒽酮-硫酸比色法,利用紫外可见分光光度计进行检测。文献中有蒽酮-硫酸比色法测定多糖的研究^{[4]-[10]},其原理是将多糖氧化成葡萄糖^[4],而右旋糖酐是一种高分子葡萄糖聚合物,可利用 D-无水葡萄糖作为对照品,建立标准曲线,求曲线方程,用线性方程式计算供试品中葡萄糖含量,并将结果与 0.94 相乘^[3]而得出右旋糖酐的含量。利用蒽酮-硫酸比色法对右旋糖酐含量检测进行了相关实验研究,建立了较为准确、可靠的一种右旋糖酐原料的含量检测方法,已申请发明专利,并获得了受理通知书。为右旋糖酐铁生产企业严把原料质量关提供了一项可行的质量控制方法,为修订右旋糖酐原料的国家标准提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司 SP-1920);数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司 HH-4)。

1.2 试剂与材料 国家药品标准物质 D-无水葡萄糖化学对照品(中国食品药品检定研究院 110833-201707,含量 99.9%);浓硫酸(重庆万盛川东化工有限公司 20190101);蒽酮(上海五联化工厂出品);右旋糖酐 20 样品(四川新开元制药有限公司、山东金洋药业有限公司等)。

1.3 试验方法 取右旋糖酐原料 0.2 g,精密称定,置 500 mL 量瓶中,加水振摇使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 10 mL,置 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀;精密量取 3 mL 于试管中,放入冰水中冷却至 0℃。加入 6 mL 预冷至 0℃的 0.2% W/V 蒽酮硫酸溶液混匀,立刻将试管浸入沸腾的水浴锅中加热 12 分钟,取出,冷却后在 625 nm^[3]下测吸光度。另精密称取 D-无水葡萄糖对照品约 20 mg,加水稀释至 50 mL,摇匀后,再分别精密量取 0、1、2、3、4 mL 稀释至 25 mL,然后各取 3 mL 于试管中,自“放入冰水中冷却至 0℃”起同法操作,以葡萄糖浓度与吸光度来建立线性方程。用线性方程式计算供试品中葡萄糖含量,并将结果与 0.94

相乘^[3],即得供试品中右旋糖酐含量。

1.4 检测波长的确认 精密称取 D-无水葡萄糖对照品与糖酐 20 样品,分别加水稀释,使对照品与样品的浓度均在 0.04 mg/mL 左右,摇匀。分别精密量取 3 mL 于试管中,放入冰水中冷却至 0℃。加入 6 mL 预冷至 0℃的 0.2% W/V 蒽酮硫酸溶液混匀,立刻将试管浸入沸腾的水浴锅中加热 12 分钟,取出,冷却后,在 500 nm ~ 700 nm 波长范围内^[3]进行光谱扫描,确定最大吸收值的测定波长。

1.5 线性范围与相关系数 精密称取 D-无水葡萄糖对照品约 20 mg,加水稀释至 50 mL,摇匀后,再分别精密量取 0、1、2、3、4 mL 加水稀释至 25 mL。然后各取 3 mL 于试管中,放入冰水中冷却至 0℃。加入 6 mL 预冷至 0℃的 0.2% W/V 蒽酮硫酸溶液混匀,立刻将试管浸入沸腾的水浴锅中加热 12 min,取出,冷却后,在 625 nm 下测定吸光度。按对照品的取样量、含量、稀释倍数计算出各对照品的浓度值(mg/mL),从低浓度到高浓度依次检测,以浓度为横坐标,测得的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,求线性方程和相关系数。

1.6 样品含量测定 精密称取右旋糖酐 20 约 0.2 g,加水稀释至 500 mL,按 1.3 项方法操作,在 625 nm 处测定吸收值,代入线性方程,计算出葡萄糖含量,并将结果与 0.94 相乘^[3],即得供试品中右旋糖酐含量。

1.7 加样回收实验 精密称取已知右旋糖酐含量的样品四份,各平行做三份样品,加水溶解再取各平行样下溶液,加已知浓度的 D-无水葡萄糖对照品溶液进行回收率试验:精确称取右旋糖酐 20 原料约 0.2 g,用水稀释至 500 mL,取此溶液 10 mL 再稀释至 100 mL。另取此溶液 10 mL,分别加入上述定容至 50 mL(0.4016 mg/mL)的 D-无水葡萄糖对照品溶液 1、2、4、6 mL,再加水稀释至 100 mL。各取 3 mL 稀释后的溶液于试管中,放入冰水中冷却至 0℃。分别加入 6 mL 预冷至 0℃的 0.2% W/V 蒽酮硫酸溶液混匀,立刻将试管浸入沸腾的水浴锅中加热 12 min,取出,冷却后在 625 nm^[3]下测吸光度,另用 3 mL 水代替稀释后的药液重复测

定,做空白对照。加入对照品溶液的浓度即按对照品的取样量、含量、稀释倍数计算出来的各浓度值 (mg/mL),样品的浓度为实际测得的浓度值,并取三份平行样的平均值和加入对照品的量来求回收率与回收率的批间 *RSD* 值。

1.8 重复性实验 取不同生产企业生产的右旋糖酐 20 原料共六批次,各批次做 2 份平行样,依 1.3 试验方法进行检测,求相对偏差。

1.9 稳定性实验 取供试溶液在冷却后检测,在分别放置 0.5、1、1.5、2.0 h 时,再次取供试液进行上机检测,验证供试溶液放置时间的稳定性。

2 结果与分析

2.1 检测波长 精密取 D - 无水葡萄糖对照品 (110833 - 201707, 含量 99.9%) 0.0011 g,加水稀释至 25 mL (即 0.044 mg/mL),摇匀;精密称取糖酐 20 样品约 0.0043 g,加水稀释至 100 mL (即约 0.043 mg/mL),摇匀。依法处理样品,在 500 nm - 700 nm 波长范围内进行光谱扫描,结果对照品和样品均在 625 ± 1 nm 内有最大吸收,与英国标准用的波长一致,故确认检测波长为 625 nm。见图 1、图 2。

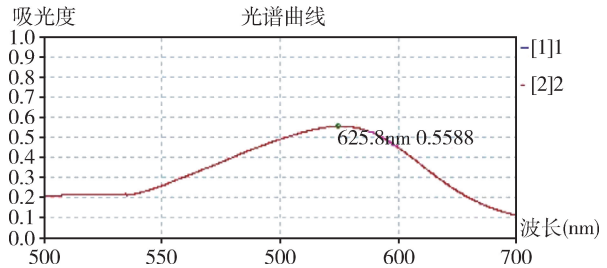


图 1 对照品的光谱曲线图

Fig 1 Spectral curve of reference substance

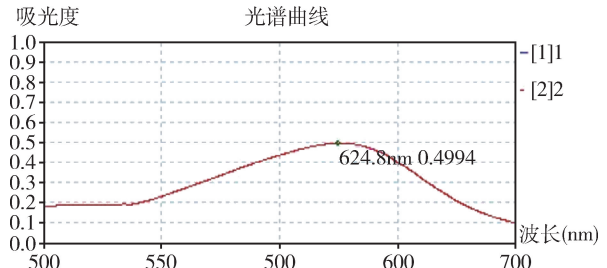


图 2 样品的光谱曲线图

Fig 2 Spectral curve of the sample

2.2 标准曲线 浓度在 0.0161 - 0.0642 mg/mL 范围内,在 625 nm 处检测,测定的吸光度与浓度呈线性相关,其线性方程为 $A = 14.15C + 0.0009$,相关系数 $r = 0.9997$ 。

检测结果见表 1。

表 1 D - 无水葡萄糖对照品溶液各不同浓度测得的吸光度

Tab 1 Absorbance measured at different concentrations of D - anhydrous glucose reference solution					
取样量	0 mL	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
浓度/(mg · mL ⁻¹)	0	0.0161	0.0321	0.0482	0.0642
吸光度 (A)	0.000	0.226	0.456	0.693	0.902

将以上数据以 D - 无水葡萄糖浓度为 X 轴,吸光度为 Y 轴进行回归分析,其回归曲线,见图 3。

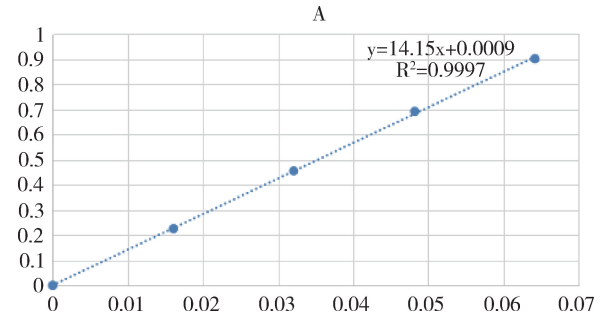


图 3 D - 无水葡萄糖对照品的标准曲线图

Fig 3 Standard curve of D - anhydrous glucose reference

2.3 样品含量测定 取样品 (右旋糖酐 20 原料) 约 0.2 g 三份,精密称定,按 1.6 项方法操作,样品含量为 97.2% (*RSD* = 0.08%)。结果见表 2。

表 2 样品检测结果

Tab 2 Sample test results					
取样量 /g	吸光度 A	浓度 /(mg · mL ⁻¹)	含量/%	平均值	<i>RSD</i> /%
0.2062	0.605	0.0427	97.31	97.2% (0.0423 mg/mL)	0.08
0.2021	0.592	0.0418	97.15		
0.2050	0.601	0.0424	97.23		

2.4 回收率实验 取已知右旋糖酐含量 (97.2%) 的原料样品,加入 D - 无水葡萄糖对照品溶液,即浓度分别为 0.0040 mg/mL, 0.0080 mg/mL, 0.0161 mg/mL, 0.0241 mg/mL, 按 1.7 项下方法操

作,将测得的浓度与已知浓度(原料 + 对照品)用 XLS 工作表计算相应回收率,其结果在 100.1% ~ 100.9%,平均回收率为 100.5%,回收率的批间 RSD 值为 0.35%。检测结果见表 3。

表 3 加样回收试验结果

Tab 3 Experimental results of sample addition and recycling

样品标识	加入对照品溶液的浓度 mg/mL	吸光度 A	测得 浓度/(mg · mL ⁻¹)	平均浓度 /(mg · mL ⁻¹)	回收率/%	平均回收 率/%
I :样品右旋 糖酐 20 原料	/	/	/	0.0423		
II : I +1 mL 对照品溶液	0.0040	0.655	0.0462	0.0463	100.1	100.5
		0.656	0.0463			
		0.657	0.0464			
III : I +2 mL 对照品溶液	0.0080	0.719	0.0507	0.0503	100.7	
		0.706	0.0498			
		0.715	0.0505			
IV : I +4 mL 对照品溶液	0.0161	0.832	0.0587	0.0584	100.4	
		0.824	0.0582			
		0.828	0.0584			
V : I +6 mL 对照品溶液	0.0241	0.951	0.0671	0.0666	100.9	
		0.933	0.0659			
		0.946	0.0668			

以在样品中添加的对照品浓度(单位为 mg/mL)为 X 轴;以实际测得的浓度(单位为 mg/mL)为 Y 轴进行回归分析,其回归曲线见图 4。

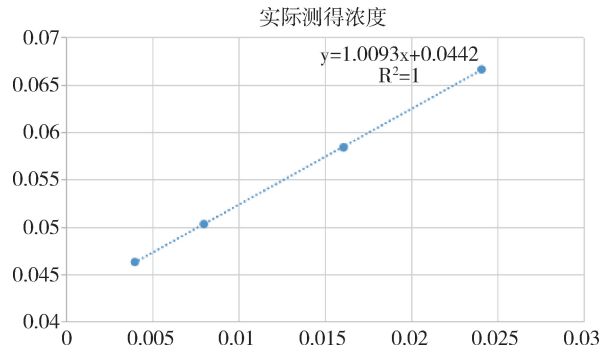


图 4 样品中添加对照品浓度与实际测得的浓度回收曲线图

Fig 4 Recovery curve of the concentration of standard substance added to the sample and the actual measured concentration

2.5 重复性实验 各样品检测结果的相对偏差在 0.04% ~ 0.31%,均小于 0.5%,符合《兽药检验操

作规范》^[12]要求,证明检测结果可靠,其含量均在 95% 以上。测试结果见表 4。

表 4 样品重复性试验结果

Tab 4 Sample repeatability test results

样品批号	各平行样含量/%	平均含量/%	相对偏差/%
102190616	96.46 97.04	96.8	0.30
102190708	96.77 96.69	96.7	0.04
YM - 2020401	96.72 96.79	96.8	0.04
YM - 2020405	96.84 96.32	96.6	0.27
A021190106R	96.59 97.19	96.9	0.31
A021190107R	96.44 96.70	96.6	0.13

2.6 稳定性实验 溶液放置 2 h 后含量下降约 0.7%,测试溶液基本稳定,但建议冷却后及时测定。测试结果见表 5。

表 5 稳定性试验结果
Tab 5 Stability test results

放置时间	取样量 /g	吸光度 /A	浓度 /(mg·mL ⁻¹)	含量 /%	平均含量/%	相对偏差/%
0 h	0.2058	0.605	0.0427	97.50	97.3	0.17
	0.2041	0.598	0.0422	97.17		
	0.2023	0.593	0.0418	97.22		
	0.2058	0.604	0.0426	97.34		
0.5 h	0.2041	0.598	0.0422	97.17	97.2	0.08
	0.2023	0.593	0.0418	97.22		
	0.2058	0.604	0.0426	97.34		
	0.2041	0.597	0.0421	97.01	97.1	0.17
1 h	0.2023	0.592	0.0418	97.05		
	0.2058	0.604	0.0426	97.34		
	0.2041	0.594	0.0419	96.52	97.0	0.42
1.5 h	0.2023	0.593	0.0418	97.22		
	0.2058	0.601	0.0424	96.85		
	0.2041	0.592	0.0418	96.20	96.6	0.34
2 h	0.2023	0.590	0.0416	96.72		

3 讨论与结论

3.1 0.2% W/V 蒽酮硫酸溶液的配制 蒽酮试剂见光易分解,所用试剂最好现用现配。先将硫酸与水混匀(硫酸:水=19:1 v/v)放入冰浴中冷却,再将称好的蒽酮加入,搅拌使溶解完全即可。否则,容易出现颜色偏深现象或者放置时间略长,颜色明显加深。

3.2 沸水浴方法的选择 因用分光光度法测定,随着沸水浴时间的延长,测定液颜色会随之加深,直接影响最终检测结果。假如按每个样都加热至沸腾后开始计时,容易造成人为因素引起误差。直接设置水浴锅为 100℃,保持沸腾状态,从放入试管即开始计时到取出为止,检测结果平行性好,精密度高。

3.3 沸水浴时间的选择 分别选择了 5、10、12、15 min 进行对照实验,结果平均回收率为 87.9%、92.83%、100.5%、103.7%。故选择了沸水浴时间为 12 min,平行性好,回收率最接近 100%。

3.4 适用性 因右旋糖酐 20、右旋糖酐 40、右旋糖酐 70 只是重均分子量的不同,均系蔗糖经肠膜

状明串珠菌 L. - M - 1226 号菌(*Leuconostoc mesenteroides*)发酵后生成的高分子葡萄糖聚合物,经处理精制而得。故对各种右旋糖酐原料的含量检测均适用。

3.5 质量控制指标 因使用不同供应商生产的右旋糖酐原料生产出来的右旋糖酐铁产品存在质量差异。经抽取不同厂家提供的不同批次的右旋糖酐样品进行含量检测发现,有的含量在 85% 左右,有的含量达 98% 以上。而使用含量高的右旋糖酐原料生产出来的产品质量会更好。故认为糖酐含量也是影响右旋糖酐原料质量的一个重要因素。目前右旋糖酐的质量标准方法项下尚无糖酐含量的检测项,为了进一步提高右旋糖酐铁的产品质量,企业可增加右旋糖酐原料的糖酐含量检测项,严把原料质量关,建议控制右旋糖酐原料含量在 95% 以上。

试验参照了《英国药典》收载的右旋糖酐铁注射液项下的糖酐含量检测方法,在其基础上进行了步骤细化和实验条件改进,并用在了右旋糖酐原料的含量检测上,线性良好,回收率高,精密度高,具有创新性,可用于右旋糖酐原料的质量控制。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 Edition [S].

[2] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版[S]. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015 Edition [S].

[3] 英国药典委员会. 英国药典(兽医)2019 版[S]. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia (Veterinary) 2019 edition [S].

[4] 杨辉. 蒽酮—硫酸比色法测定玉竹多糖含量的研究. 安徽医药[J],2006,10(8): 587. Yang H. Study on the determination of polysaccharides in Polygonatum polygonatum by anthrone - sulfuric acid colorimetric method. Journal of anhui medicine, 2006,10 (8) : 587.

[5] 唐丽琴,李 矗,刘 圣,等. 蒽酮—硫酸比色法测定麦冬多糖的含量[J]. 安徽医药, 2003,7(1): 39 - 40. Tang L Q, Li Ch, Liu Sh, et al. Determination of polysaccha-

- rides in ophiopogon japonicus by anthrone – sulfuric acid colorimetry [J]. *Anhui medicine*, 2003, 7 (1): 39 – 40.
- [6] 李玉龙. 香菇多糖氯化钠注射液中香菇多糖含量测定的研究 [J]. *中国现代医生*, 2012, 50(30): 108 – 109, 113.
- Li Y L. Determination of lentinan content in Lentinan sodium chloride injection [J]. *Modern Chinese Doctors*, 2012, 50 (30): 108 – 109, 113.
- [7] 魏 星. LG 胶囊中灵芝多糖的含量测定 [J]. *光明中医*, 2013, 28(12): 2526 – 2527.
- Wei X. Determination of polysaccharide content of Ganoderma lucidum in LG capsule [J]. *Guangming Traditional Chinese Medicine*, 2013, 28(12): 2526 – 2527.
- [8] 周 晶, 刘景文, 符敬伟, 等. 马齿苋中多糖的提取与含量测定 [J], *中草药*, 2001, 32(2): 124 – 125.
- Zhou J, Liu J W, Fu J W, *et al.* Extraction and content determination of polysaccharide from Caprock SPP [J]. *Chinese Traditional and Herbal Medicine*, 2001, 32(2): 124 – 125.
- [9] 肖美凤, 吴 萍, 陈 慧, 等. 三叶海棠叶中水溶性总糖含量的测定 [J], *湖南中医药大学学报*, 2013, 33(5): 62 – 64.
- Xiao M F, Wu P, Chen H, *et al.* Determination of Water – soluble Total sugar content in The leaves of *Malus chinensis* [J]. *Journal of Hunan University of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 33(5): 62 – 64.
- [10] 杨淑萍. 紫外分光光度法检测黄芪多糖含量 [J], *现代畜牧科技*, 2019(8): 7 – 9.
- Yang Sh P. Determination of Astragalus polysaccharide content by ultraviolet spectrophotometry [J]. *Modern Animal Science and Technology*, 2019 (8): 7 – 9.
- [11] 中国兽医药品监测监察所. 《兽药检验操作规范》二 00 五年三月. 紫外分光光度法 [S].
- Chinese Institute of Veterinary Drug Monitoring and Supervision. *Ultraviolet spectrophotometry* [S].

(编辑: 陈 希)