

响。初步观察表明：当pH = 6.5时，内标和药物有较高的回收率；当pH < 6时，苯巴比妥、苯妥英的回收率升高，卡马西平下降；当pH > 7.4时，苯巴比妥，苯妥英回收率下降，卡马西平回收率稍有上升。结果与卓海通等<sup>(3)</sup>报道基本一致。因此，我们选择在pH = 6.5的磷酸盐缓冲液中进行提取。

本文在采用乙腈沉淀和pH = 6.5的条件下，考察了常用的提取溶剂CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，CHCl<sub>3</sub>，乙醚、醋酸乙酯等的提取效果，确定了氯仿-乙醚（2：1）二元溶剂为提取液。从而兼顾了提高提取率，克服血清内源性组分干扰，减少乳化，便于操作、缩短蒸干时程等诸项要求、结果满意。

## 二、色谱条件选择

1. 流动相：许多文献<sup>(1-5)</sup>报道都采用乙腈和磷酸盐缓冲液（pH 3 ~ 8）作为流动相组分。我们认为：这种组成除分析成本高外，盐类的使用还对管路和柱的清洗提出了较高的要求，因而大大延长了非分析占机时间。经实验，我们采用的甲醇-水（47/53 v/v）流动相既克服了上述缺点，又获得了理想的分析效果。

2. 色谱柱：Tjaded等<sup>(6)</sup>认为甲基硅烷键合相对巴比妥类药物的分离效果优于C<sub>8</sub>或C<sub>18</sub>柱。据此，我们考察了C<sub>3</sub>、C<sub>18</sub>、TMS对三种药物及内标的分离效果，以TMS、柱的分离效果和分析时间最为满意。

3. 检测波长：国外报道的检测波长大都在195~210nm (12/14)<sup>(1)</sup>。我们对210、220、230、240、254nm几个波长进行了考察，结果表明230nm以下处，基线不够

平稳，血清空白值较大；254nm处检出灵敏度较低。因而选择240nm做为检测波长。

三、样品稳定性考察表明：药物血清I、II、III、IV在-15℃保存24小时各药平均回收率分别是：PB 99.63 ± 4.12%，PHT 102.82 ± 3.98%，CBZ 96.82 ± 2.29%；48小时、72小时测定结果，回收率下降。因此取样后应置于-15℃冰箱内，并于24小时内完成测定。

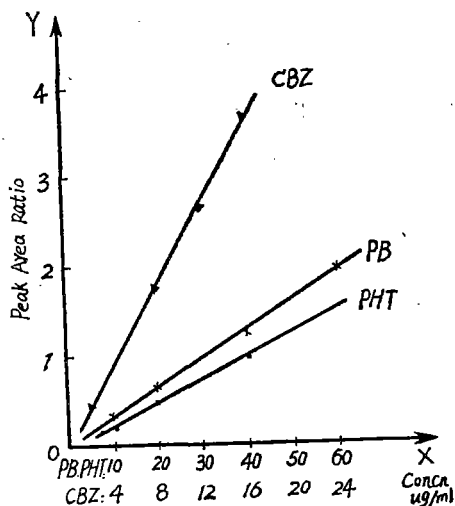


图1 线性关系回线

## 参考文献

1. 于宝成：国外药学（合成药、生化药、制剂分册）1988；5：296
2. 吴莱文等：中华医学检验杂志 1985；8：90
3. 卓海通等：南京军区药专业委员会第一次会议论文摘要汇编 P7
4. Adam RF. et al: clin chem 1976；22:25
5. Kabra PM. et al: clin chem 1977；23：1284
6. Tjaded UR et al: J chromatogr 1977；143：183

# 羟乙基淀粉及其注射液的分光光度测定法

总后卫生部药品仪器检验所 刘志邦

羟乙基淀粉属多糖类化合物，其注射液有增加并维持血液胶体渗透压、增加血浆容

量、维持血压等作用。临床上用于治疗出血性休克、创伤性休克及烧伤休克等。原料药

品没有含量测定方法,其注射液的含量测定,我国地方标准大都采用重量法<sup>(1,2)</sup>,专属性差,且费时、费事。国外很早就报道用蒽酮显色反应对多糖进行定性定量测定<sup>(3)</sup>,国内的教科书记载了用蒽酮比色法测定糖的含量<sup>(4)</sup>,并应用于复方制剂中羟乙基淀粉的含量测定<sup>(5)</sup>。因蒽酮比色法测定羟乙基淀粉注射液含量的影响因素较多,经试验觉得文献<sup>(5)</sup>的试验条件还可进一步完善,故对其实验条件重新作了探索,并将方法作了适当改进,现报告如下。

**一、药品试剂与仪器**

药品:羟乙基淀粉,四川乐山制药厂

试剂:蒽酮,化学纯,北京化工厂

硫酸,分析纯,北京化工厂

仪器:岛津UV-240紫外分光光度计。

岛津UV-260紫外分光光度计。

日立EPU-ZA紫外分光光度计。

**二、实验条件选择**

1. 吸收光谱图:按测定方法项下操

作,用岛津UV-240紫外分光光度计从400~700nm扫描,其最大吸收波长为626±1nm,见图1。

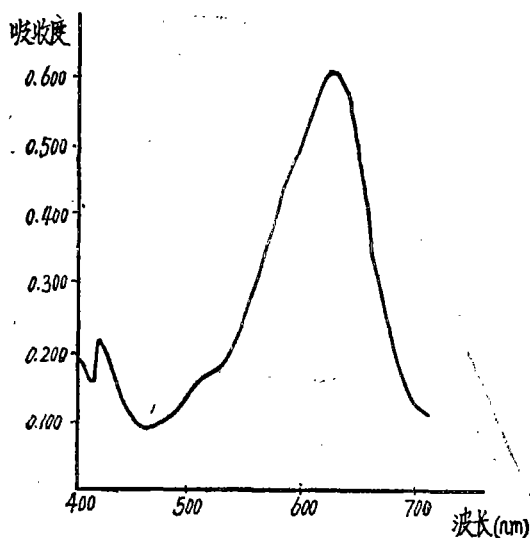


图1 吸收光谱图

2. 浓度与吸收度的关系:取不同量的羟乙基淀粉溶液,按测定方法项下操作,在626±1nm波长处测定吸收度,结果见表1。

表1 不同浓度测得的吸收度

吸收度*	浓度 (μg/ml)					
	3.75	5.00	6.25	7.50	8.75	10.00
	0.231	0.305	0.388	0.453	0.531	0.608

\* 所列数据均为四次测定结果的平均值

对表1数据进行一元线性回归,得回归方程:

$$A = 0.00541 + 0.06018 C. \text{ 相关系数 } r = 0.9997.$$

可见羟乙基淀粉水溶液与蒽酮试剂呈色

后,浓度在3.75~10.00mg/ml范围内,与吸收度定良好的线性关系。

3. 试剂的加入量:按测定方法项下操作,加入不同量试剂进行试验,结果如表2。

表2 试剂的加入量对测定结果的影响

管号	样品 (ml)	水 (ml)	试剂 (ml)	总量 (ml)	现象	光密度
0	0	2	6	8	淡黄色澄明液体	0
1	0.8	3.2	4	8	白色混浊溶液	无法测定
2	0.8	2.2	5	8	黄色有轻微乳光的溶液	0.329
3	0.8	1.2	6	8	黄色澄明溶液	0.615
4	0.9	2.1	6	9	黄色有轻微乳光的溶液	0.432
5	0.9	1.1	7	9	黄色澄明溶液	0.612

从表2看出,管2、管4因有轻微乳光,光密度值偏低;管3、管5光密度值较高且接近,但管3试剂用量少,故采用第3管。

表3 试剂存放时间对测定结果的影响

光 密 度	存 放 时 间					
	立 即	2 小 时	4 小 时	6 小 时	8 小 时	24 小 时
	0.607	0.603	0.599	0.594	0.589	0.544

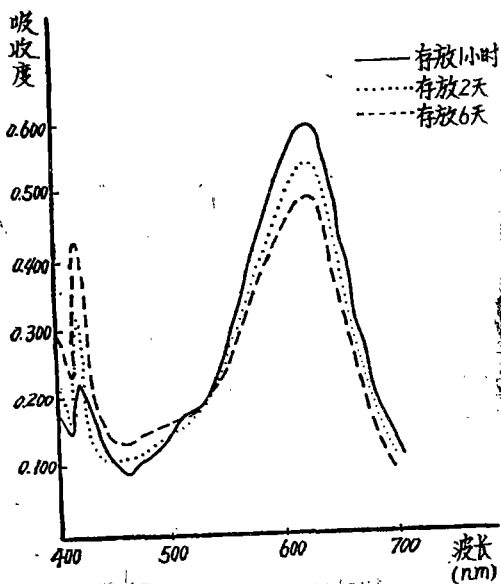


图2 试剂存放时间对吸收度的影响

从表3看出,试剂在8小时内基本稳定,故所配试剂应当天使用,最好临用时配制。

从图2可看出,随着试剂存放时间的延长,主峰(626nm)逐渐降低,而侧峰(424nm)逐渐升高。

5. 冷却条件:按测定方法项下操作,考察不同冷却条件对测定的影响,结果如表4。

表4 冷却条件对测定结果的影响

	室 温	自 来 水	冰 浴
光 密 度	0.585	0.615	0.617

从表4可看出,自来水与冰浴冷却较

4. 试剂的存放时间:按测定方法项下操作,考察试剂存放时间对测定的影响,结果如表3、图2。

好。考虑到二者相差甚微,而自来水冷却简单易行,故采用自来水冷却。

6. 反应时间:按测定方法项下操作,考察反应不同时间对测定的影响,结果反应3分钟,其光密度值最高,故认为在沸水浴中反应3分钟为最好。

以0管为空白,将反应1分钟、3分钟、9分钟、15分钟管从400~700nm扫描。结果如图3。

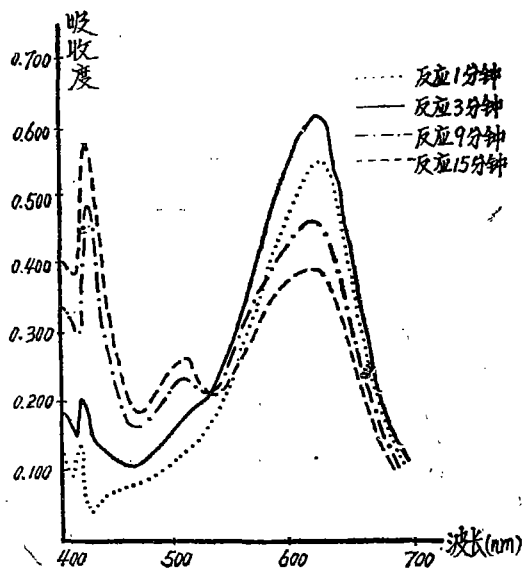


图3 反应时间对吸收度的影响

从图3可见,反应3分钟管,主峰(626nm)最高。随着反应时间的增长,主峰越来越低,而侧峰(510nm、424nm)越来越高。

7. 色泽稳定性:按测定方法项下操作,考察呈色液的稳定性,结果如表5。

表5 呈色液的稳定性

	立即	1小时	2小时	3小时	4小时	6小时	8小时
光密度	0.607	0.601	0.596	0.590	0.585	0.574	0.563

从表5可看出,呈色液的光密度,每小时约降低0.005,呈色液在3小时内基本稳定。

三、方法与结果

1. 测定方法

羟乙基淀粉的精制:

取羟乙基淀粉,加蒸馏水加热使溶解,用湿润的滤纸趁热过滤,放冷使成饱和溶液。取此饱和溶液缓缓加入无水乙醇中,边加边搅拌,即产生大量羟乙基淀粉沉淀。冰箱放置过夜,倾出上清液,沉淀置乳钵中,加入无水乙醇研磨使成细小颗粒,4号玻璃垂熔漏斗抽滤,用无水乙醇洗涤3次。如此精制两次。

羟乙基淀粉溶液的制备:

精密称取经105℃干燥至恒重的精制品约25mg,置250ml容量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度,使成0.1mg/ml溶液。

蒽酮试剂的配制:

称取蒽酮0.4g,溶于10ml水与190ml硫酸的混合液中,振摇使溶,放冷备用。

测定方法:

取上述羟乙基淀粉溶液0.8ml,置20ml具塞玻璃试管中,用蒸馏水加至2ml,摇匀,加入蒽酮试剂6ml,立即密塞摇匀,置沸水浴中准确煮沸3分钟,取出,放入自来水中冷却,并同时作空白试验。将空白与样品分置1Cm吸收池中,在626±1nm波长处测定吸收度。

2. 吸收系数 (E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>) 的测定<sup>(6.7)</sup>

取羟乙基淀粉溶液0.4ml和0.8ml,按测定方法项下操作,分别用三台不同型号的紫外分光光度计,在626±1nm波长处测定吸收度,计算百分吸收系数 (E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>) 结果见表6。

表6 不同仪器测得的吸收系数 (E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>)

仪器型号	5.0 μg/ml				10.0 μg/ml			
	1	2	3	4	1	2	3	4
岛津UV-240	604.0	612.0	604.0	622.0	598.0	606.0	606.0	620.0
岛津UV-260	594.0	608.0	594.0	612.0	593.0	603.0	599.0	618.0
日立EPU-2A	600.0	610.0	600.0	616.0	600.0	610.0	600.0	620.0
平均值	606.21, 标准差 8.6726, 变异系数 (%) 1.43。							

经统计分析,确定羟乙基淀粉水溶液与蒽酮试剂呈色后的 E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> 626nm 为 606

3. 回收率试验

表7 回收率试验结果

试验编号	投入量 μg/ml	测得量 μg/ml	回收率 (%)	平均值 (%)
1	3.75	3.80	101.35	100.75
2	5.00	5.03	100.60	
3	6.25	6.40	102.40	
4	7.50	7.48	99.73	
5	8.75	8.76	100.11	
6	10.00	10.03	100.30	

取不同浓度的羟乙基淀粉溶液,照测定方法项下操作,按公式  $E_{1\text{cm}}^{1\%}_{626\text{nm}} = 606$  计算,结果见表7。

\*: 所列数据为4次试验的平均值。

SD = 0.9730, CV = 0.97%。

#### 4. 样品测定

精密取样品适量,用蒸馏水稀释使成0.1mg/ml的溶液,照测定方法项下操作,在  $626 \pm 1 \text{ nm}$  波长处测定吸收度,按  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 606$  计算含量。同时按文献<sup>(1)</sup>及文献<sup>(8)</sup>进行重量法及旋光法测定,结果见表8:

表8 样品测定结果

生产厂	批号	重量法 (%)	旋光法 (%)	本法 (%)
A*	85202022	102.97	97.83	97.14
B	840327	98.57	98.02	97.76
B	660131	100.57	100.26	99.25

\*为塑料袋装注射液。

### 四、讨论

1. 本法的原理是糖与硫酸先脱水生成羟甲基呋喃醛,然后再与蒽酮缩合成蓝色化合物,其呈色强度与溶液中糖的浓度成正比,故可用于糖类的含量测定。因蒽酮试剂及蒽酮与糖缩合生成的化合物在硫酸中不甚稳定(参见图2、图4),故蒽酮试剂应临用时配制,而且应严格控制测定条件,以免影响结果的准确性。

2. 本法所选择的实验条件与上海市药品标准(80年)是不同的,主要表现在:  
1) 试剂的加入量:上海药品标准(80年)方法与表2的第4管相同,溶液有轻微乳光,虽样品加入量大,而光密度却只有0.432;本法采用第3号管,溶液澄明,虽样品加入量少,而光密度却为0.615。说明本法与上海法的结果是有差别的,其原因在于上海法加入水量较大。2) 测定波长:上海法为620nm,本法为626nm。3) 反应时间:上海为5分钟,本法为3分钟。4) 冷却条件:上海法未指明怎样冷却,本法为冷水,从表4可见,自然冷却与冷水冷却,结果是不同的。

3. 在样品测定结果的表8中,批号

85202022为塑料袋装,其重量法测定结果比本法测定结果偏高约5%,而本法与旋光法<sup>(8)</sup>测定结果却是一致的。作者认为,重量法测定结果偏高是塑料袋填充物溶出所致,这正是重量法专属性差的表现,确认本法与旋光法较好。

4. 上海市药品标准(80)要用羟乙基淀粉对照品,因我国目前尚无羟乙基淀粉标准品(或对照品),即使羟乙基淀粉原料一般单位也没有,故上海法不便于推广应用。作者用羟乙基淀粉原料经精制后,测出吸收系数( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ),省去羟乙基淀粉对照品,一般单位都可依法测定。

#### 参考文献

1. 天津市药品标准(1980)
2. 辽卫药字(1980)53号
3. Ind Eng Chem Anal Ed 18, 499, 1946
4. 北京大学生物系生物化学教研室编:生物化学实验指导人民教育出版社,1979年。
5. 上海市药品标准(1980)
6. 吕孝敢等:药物分析杂志,3(1):42, 1983
7. 钱树德等:同上,4(3):178,1984
8. 刘志邦:同上,7(4):247,1987