

凯氏定氮法测定土鳖虫多肽片的总氮量^Δ

罗美兰*,丁志军,廖银根,甘慧群(江西省皮肤病专科医院药剂科,南昌 330001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2365-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.22

摘要 目的:建立土鳖虫多肽片的总氮量的测定方法并制订该制剂含氮量的限度。方法:采用凯氏定氮法。将供试品消化(420℃,60 min)、蒸馏后,用硫酸滴定液滴定,测定土鳖虫多肽片的总氮量。结果:平均回收率为98.89%(RSD=0.78%),重复性试验RSD为0.88%;3批样品总氮量均值为5.09%。结论:建立的方法结果可靠、重复性好,可作为该制剂的质量控制方法;拟定该制剂每片含总氮量不得少于17.12 mg。

关键词 土鳖虫多肽片;凯氏定氮法;总氮量

Determination of Total Nitrogen Content in Woodlouse Polypeptide Tablets by Kjeldahl Method

LUO Mei-lan, DING Zhi-jun, LIAO Yin-gen, GAN Hui-qun (Dept. of Pharmacy, Jiangxi Provincial Skin Specialty Hospital, Nanchang 330001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for determination of total nitrogen content in Woodlouse polypeptide tablets and to develop the limit of nitrogen content in the preparation. METHODS: After digesting the samples (420 °C, 60 min) and distilling, Kjeldahl method was used to determine total nitrogen content in Woodlouse polypeptide tablets. RESULTS: The mean recovery was 98.89% (RSD=0.78%), and RSD of repeatability test was 0.88%; average total nitrogen content of 3 batches of samples was 5.09%. CONCLUSIONS: The method is reliable and reproducible, and can be used for the quality control of Woodlouse polypeptide tablets. Total nitrogen content per tablet is no less than 17.12 mg.

KEY WORDS Woodlouse polypeptide tablets; Kjeldahl method; Total nitrogen content

积计算,结果主成分和有关物质的RSD分别为0.11%、0.01%。

2.10 回收率试验

精密称取二氟泼尼酯原料药适量,用流动相配制浓度浓度为每1 ml含5 mg的溶液,作为供试品贮备液;取对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成5 mg/ml的溶液,作为对照品贮备液;精密量取供试品贮备液0.8、1.0、1.2 ml各3份,分别置于9个10 ml量瓶中,精密量取对照品贮备液1.0 ml,分别置于上述量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为回收率供试溶液;精密量取对照品贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。分别精密量取供试溶液和对照品溶液各15 μl注入色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算回收率,详见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests (n=9)

| 水平 | 加入量,mg | 测得量,mg | 回收率,% | 平均回收率,% | RSD,% |
|----|--------|--------|--------|---------|-------|
| 低 | 4.09 | 4.13 | 100.98 | 100.2 | 0.56 |
| | 4.09 | 4.10 | 100.24 | | |
| | 4.09 | 4.11 | 100.49 | | |
| 中 | 5.11 | 5.10 | 99.80 | | |
| | 5.11 | 5.16 | 100.98 | | |
| | 5.11 | 5.11 | 100.00 | | |
| 高 | 6.13 | 6.10 | 99.51 | | |
| | 6.13 | 6.10 | 99.51 | | |
| | 6.13 | 6.13 | 100.00 | | |

Δ 基金项目:江西省科技计划资助项目(No.20111BBG70005-5)

* 副主任药师。研究方向:医院制剂及新制剂研发。电话:0791-85210774。E-mail:1433658399@qq.com

2.11 样品中有关物质的检测

取3批样品,按“2.1”项下条件和“2.2”项下方法测定,结果3批样品中有关物质含量分别为0.29%、0.23%、0.19%。

3 讨论

3.1 流动相选择

国内外均未见二氟泼尼酯有关物质检测的文献报道。笔者前期试验时曾采用不同的流动相[甲醇-水(70:30)、甲醇-水(30:70)、甲醇-水(40:60)、甲醇-水(60:40)]考察二氟泼尼酯与各破坏产物的分离情况。结果发现甲醇的比例对二氟泼尼酯与破坏产物的分离度有较大的影响,只有当甲醇-水比例为50:50时峰形较佳,分离度好,并且保留时间合适。

3.2 相关质量标准研讨

本品为化学药3.1类新药,国内外药典及相关其他质量标准均未收录,因此笔者将仿制二氟泼尼酯原料药与国外市售药在相同液相色谱条件下进行比对。结果除国外市售药的色谱图中发现有辅料峰(山梨酸)外,其余二者基本一致,说明本法能很好地控制其质量。因此笔者认为本法建立的液相色谱条件可作为该产品的有关物质检测条件。

参考文献

- [1] Yasueda S, Kimura M, Ohtori A, *et al.* Analysis of an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate, in aqueous humor by combination of semi-micro HPLC and column switching method[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2003, 30 (6):1 735.

(收稿日期:2012-08-29 修回日期:2013-01-06)

土鳖虫多肽片是我院临床使用十几年的验方制剂,由土鳖虫经现代工艺提取精制而成,具有破血逐瘀、续筋接骨、消肿止痛之功效,临床主要用于带状疱疹和水痘等病毒感染性皮肤病的治疗,疗效确切。土鳖虫中的主要有效成分有蛋白质、多肽以及游离氨基酸^[1-3],目前尚未见测定土鳖虫及其制剂中这类有效成分含量的相关文献报道,故笔者拟采用凯氏定氮法^[4]来测定其总氮量,以总氮量为指标控制该制剂的质量。

1 材料

500 ml凯氏烧瓶、消化炉、凯氏定氮仪(福斯赛诺分析仪器有限公司)。

土鳖虫多肽片(自制,批号111204、111205、111206、120301、120302,片重为0.42 g,每片相当于生药材1.5 g);硫酸钾、无水硫酸钠、硫酸铜、浓硫酸、硫酸铵和锌粒等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 消化

为了使所取样品更具有代表性,参照2010年版《中国药典》(一部)附录IXL氮测定法中的第一法(常量法)^[4]进行消化:取供试品适量,精密称定,置于干燥的500 ml凯氏烧瓶中,依次加入硫酸钾(或无水硫酸钠)10 g和硫酸铜粉末0.5 g,再沿瓶壁缓缓加入浓硫酸20 ml;置于消化炉中420 ℃消化60 min后,放冷,备用。

2.2 蒸馏

取2%硼酸溶液50 ml,置于500 ml锥形瓶中,加甲基红-溴甲酚绿混合指示液10滴,将冷凝管的下端插入硼酸溶液的液面下;另取上述消化好的样品,沿凯氏烧瓶壁缓缓加水80 ml,振荡使混合,放冷后,将其接在凯氏定氮仪上,注入40%氢氧化钠溶液80 ml,加热蒸馏5 min,将冷凝管尖端提出液面,用水淋洗尖端后,取出,备用。

2.3 滴定

馏出液用硫酸滴定液(0.05 mol/L)滴定至溶液由蓝绿色变为灰紫色,即为滴定终点。并将滴定的结果用空白试验(不加样品,只加试剂,重复上述操作)校正。每1 ml硫酸滴定液(0.05 mol/L)相当于1.401 mg的氮。

2.4 计算

根据文献^[9]方法计算总氮量:总氮量(mg/g)=[(V₁-V₂)× $\frac{c}{0.05}$ ×1.401]/m。

V₁:滴定时供消耗硫酸滴定液的体积(ml);V₂:空白试验中消耗硫酸滴定液的体积(ml);c:硫酸滴定液的浓度(mol/L);m:供试品取样量(g)。

2.5 线性关系考察

精密称取硫酸铵适量,加水溶解并稀释制成每1 ml中含72.86 mg硫酸铵的溶液。分别精密量取0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25 ml,置于5 ml量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,转移至500 ml凯氏烧瓶中,依法操作消化、蒸馏后,滴定,记录消耗滴定液的体积,并计算含量,结果见表1。

将硫酸铵质量浓度(x)对消耗滴定液(y)体积进行回归,得方程:y=0.835 3x-1.295(r=0.999 7),表明样品取样量在1.25~2.25 ml(硫酸铵检测质量浓度为18.215~32.787 mg/ml)时,二者具有较好的线性相关性。

2.6 精密度试验

表1 线性关系考察结果(n=8)

| 项目 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 取样量,ml | 0.50 | 0.75 | 1.00 | 1.25 | 1.50 | 1.75 | 2.00 | 2.25 |
| 硫酸铵取量,mg | 36.43 | 54.64 | 72.86 | 91.07 | 109.29 | 127.50 | 145.72 | 163.93 |
| 硫酸铵质量浓度,mg/ml | 7.286 | 10.929 | 14.572 | 18.215 | 21.858 | 25.501 | 29.144 | 32.787 |
| 滴定液体积,ml | 5.03 | 9.97 | 12.92 | 13.96 | 16.85 | 20.05 | 23.14 | 26.03 |

取硫酸铵约1.6 g,精密称定,依法操作消化、蒸馏后,转移至1 000 ml量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,精密吸取100 ml,共5份,依法测定,记录滴定体积,结果其RSD=0.16%(n=5)。

2.7 重复性试验

取土鳖虫多肽片(批号:111204)20片,精密称定,研细,取约0.70 g,精密称定,共6份,依法操作消化、蒸馏后测定,结果平均含氮量为5.11%,RSD=0.88%。

2.8 加样回收率试验

取土鳖虫多肽片(批号:111204)20片,精密称定,研细,取约0.35 g,精密称定,共6份,分别置于干燥的500 ml凯氏烧瓶中,再依次精密加硫酸铵0.08 g,依法操作,测定含氮总量,计算回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

| 样品编号 | 样品中的含氮量,mg | 氮的加入量,mg | 氮的测得量,mg | 回收率,% | 平均回收率,% | RSD,% |
|------|------------|----------|----------|-------|---------|-------|
| 1 | 17.906 1 | 17.832 1 | 35.606 6 | 99.26 | 98.89 | 0.78 |
| 2 | 17.839 8 | 17.840 4 | 35.249 4 | 97.59 | | |
| 3 | 17.783 7 | 17.839 5 | 35.500 9 | 99.31 | | |
| 4 | 17.870 4 | 17.837 7 | 35.607 7 | 99.44 | | |
| 5 | 17.793 9 | 17.840 2 | 35.333 5 | 98.32 | | |
| 6 | 17.865 3 | 17.838 6 | 35.604 0 | 99.44 | | |

注:空白试验消耗滴定液体积0.10 ml

note: the titrant volume consumed in blank test was 0.10 ml

2.9 样品中总氮量测定及限度的制订

取5批土鳖虫多肽片各20片,精密称定,研细,分别取约0.70 g,精密称定,按上述方法进行含量测定(平行测定2份),结果见表3。

表3 5批样品中总氮量的测定结果

Tab 3 Content determination of total nitrogen content in 5 batches of samples

| 指标 | 批号 | | | | |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 111204 | 111205 | 111206 | 120301 | 120302 |
| 总氮量,% | 5.12 | 5.11 | 5.09 | 5.07 | 5.10 |
| | 5.10 | 5.10 | 5.09 | 5.08 | 5.09 |
| 均值,% | 5.11 | 5.105 | 5.09 | 5.075 | 5.095 |

根据5批样品测定结果,结合大生产的实际操作等各种因素,暂拟定本品每片含总氮量不得少于17.12 mg($m_{\text{氮}}=0.42 \times 5.095\% \times 80\% \times 1\ 000$)。

3 讨论

目前国内测定中药中的总氮量多用凯氏定氮法,该方法的测定结果较稳定、准确,因而被国内外广泛采用。含氮有机物在硫酸及催化剂的作用下,经强烈分解后有机氮转化为硫酸铵,所以最理想的回收试验物质为硫酸铵。但是目前国内无硫酸铵基准物和化学对照品,所以硫酸铵的定量方法以《中国药典》所记载的方法为最宜。本文中使用的硫酸铵只按照称质量来定量,存在一定的不准确性,但精密度试验和回收率

HPLC法测定泊沙康唑滴眼液的含量^Δ

吴伟*,何梅凤#,郭泽莉,钟建文(中山大学中山眼科中心,广州 510060)

中图分类号 R927.2;R988.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2367-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.23

摘要 目的:建立测定泊沙康唑滴眼液含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-水(60:40),流速为1.0 ml/min,检测波长为262 nm,柱温为25℃。结果:泊沙康唑检测质量浓度线性范围为8.181~81.81 μg/ml($r=0.9999$),平均回收率为99.4%,RSD=0.77%($n=9$)。结论:本方法简便、快速,结果准确,可用于泊沙康唑滴眼液的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;泊沙康唑;滴眼液;含量测定

Content Determination of Posaconazole Eye Drops by HPLC

WU Wei, HE Mei-feng, GUO Ze-li, ZHONG Jian-wen (Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of Posaconazole eye drops. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile - water (60:40) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 262 nm and column temperature was 25℃. RESULTS: The calibration curve of posaconazole was linear within the concentration range of 8.181-81.81 μg/ml ($r=0.9999$) with an average recovery of 99.4% (RSD=0.77%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and it can be used for the quality control of Posaconazole eye drops.

KEY WORDS HPLC; Posaconazole; Eye drops; Content determination

泊沙康唑(Posaconazole)是新一代三唑类抗真菌药,具有广谱抗真菌作用,用于难治性疾病或对目前常用抗真菌药耐药的某些严重真菌感染的治疗^[1],在眼科的应用研究已取得一定进展^[2-3]。但现有剂型只有口服混悬剂,而眼局部感染的全身用药安全性需要引起关注。另外,有文献^[4]报道,由于血眼屏障,某些角膜炎病例口服某些三唑类抗真菌药在角膜难以达到有效浓度。Klont RR^[5]认为,局部滴眼对全身给药治疗是一种有益的补充。Sponsel WE等^[6]首先报告了1例对两性霉素B和那他霉素耐药的茄病镰刀菌角膜炎患者用泊沙康唑口服和滴眼联合治疗后获得良好效果。鉴于目前尚未有泊沙康唑眼局部用药剂型上市,而作为眼科最常用剂型,滴眼液在有效、安全、方便和经济等方面具有优势。为此,本课题组制备了泊沙康唑滴眼液,并进行了相关研究,建立了测定其含量的

高效液相色谱(HPLC)分析方法。结果表明建立的方法操作简便、快速、结果准确,可有效地控制该产品的质量。

1 材料

Agilent 1100 HPLC仪,包括G1314A紫外检测器、G1316A柱温箱、G1329A带温控自动进样器、G1311A四元泵、G1322A真空脱气机、1100化学工作站(美国Agilent公司);UV-2450紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);电子分析天平(德国Sartorius公司)。

泊沙康唑对照品(湖北兴银河化工有限公司,批号:cmw-pos-20111018,纯度:99%);泊沙康唑滴眼液(自制,批号:130107、130115、130201,规格:100 mg:10 ml);乙腈为色谱纯,水为注射用水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

试验表明结果是可靠的。用凯氏定氮法检测其他样品总氮时,同样要控制好消化时间,时间过短(不足40 min),则样品未完全消化,致使结果偏低;时间过长(超过90 min),结果也会偏低,这可能是因为少部分氮随水蒸汽一起逸出引起的。

蒸馏过程中,加入氢氧化钠是否足量,常常影响整个测定的顺利进行。当氢氧化钠足量时,溶液呈黑色(氧化铜);当氢氧化钠不足时,溶液呈淡蓝色,所以溶液颜色变化是判断氢氧化钠是否足量的标志。

参考文献

- [1] 尹鲁生.中药土鳖虫中氨基酸的分析[J].中药通报,1987,20(6):46.
- [2] 石钺.药用土鳖虫的化学成分及药理作用[J].中草药,1997,28(A10):134.
- [3] 王凤霞,吉爱国.药用土鳖虫化学成分及药理作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2009,30(1):61.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录53.
- [5] 中国食品药品检定研究院.中国药品检验标准操作规范[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:181-183.

Δ基金项目:广东省医院药学研究基金资助项目(No.2012A18)

*副主任药师。研究方向:药品质量控制。电话:020-87331543。

E-mail:zocww@163.com

#通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:020-87330540。E-mail:zochmf@163.com

(收稿日期:2012-09-06 修回日期:2013-04-07)