

药物分析

第四章

药物的含量测定与分析方法的验证



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

分析化学知识回顾

■ 滴定/容量分析法

- 酸碱滴定法
- 氧化还原滴定法
- 配位滴定法
- 沉淀滴定法/重量法

■ 光谱分析法

- 紫外-可见分光光度法
- 原子吸收分光光度法
- 核磁共振波谱法
- 红外吸收光谱法
- 荧光分析法
- 质谱法

■ 色谱分析法

- 经典液相色谱法
- 高效液相色谱法
- 气相色谱法
- 毛细管电泳法



定量分析方法

■ 绝对定量分析法

- 容量分析法/重量分析法
- 核磁共振波谱法

■ 相对定量分析法

- 紫外-可见分光光度法
- 原子吸收分光光度法
- 荧光分析法
- 质谱法
- （高效）液相色谱/气相色谱法
- 毛细管电泳法



药物的含量测定

1 药物含量

评价质量的重要指标

2 测定方法

滴定/光谱/色谱分析

3 剂型特点

原料——准确重现
制剂——专属灵敏

4 方法效力

鉴别/检查/含量测定
准确/重现/专属/耐用



本章学习要求

掌握

1. 含量测定方法的特点与适用范围
2. 色谱系统适用性试验的内容与相关计算
3. 定量分析方法的相关计算
4. 定量分析样品的制备方法

熟悉

1. 分析方法验证的主要内容及其应用与要求
2. 样品前处理方法的特点与适用范围

了解

- 分析仪器的校正和检定



第一节

定量分析方法的分类



- 一、容量分析法
- 二、光谱分析法
- 三、色谱分析法



一、容量分析法



容量 分析法

- 也称滴定法: 将已知浓度滴定液滴加至被测药物溶液中, 至滴定终点, 根据滴定液的浓度、体积和滴定度, 计算含量



（一）特点与适用范围

- （1）方法简便易行
- （2）方法耐用性高
- （3）测定结果准确
- （4）方法专属性差
 - 适用于原料药含量测定



(二) 有关计算

1. 滴定度及其计算

2. 含量表示与计算

(1) 直接滴定法

(2) 间接滴定法

- 生成物滴定法
- 剩余量滴定法

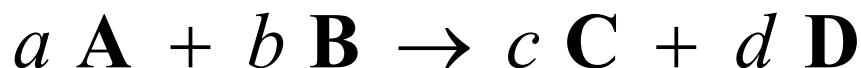


(二) 有关计算

1. 滴定度 (titer) :

- 每1ml规定浓度的滴定液所相当的被测药物的质量, mg

$$\frac{W_A}{aM_A} = \frac{W_B}{bM_B}$$



$$W_A = \frac{W_B}{bM_B} \times aM_A = n_B \times \frac{a}{b} \times M_A = m_B \times V_B \times \frac{a}{b} \times M_A$$

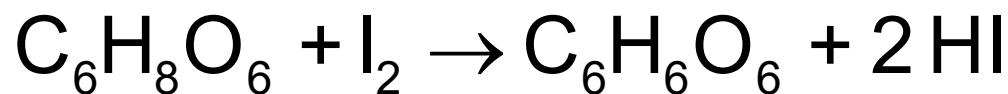


$$W_A = T \times V_B$$

$$T(\text{mg/ml}) = m \times \frac{a}{b} \times M$$



例1：碘量法测定维生素C含量



$$T = 0.05 \times \frac{1}{1} \times 176.13 = 8.806 \text{ (mg/ml)}$$

- 每1ml碘滴定液（0.05mol/L）相当于8.806mg的 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$



例2：溴量法测定盐酸去氧肾上腺素

- 盐酸去氧肾上腺素 ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$) $M=203.67$
- 溴滴定液的摩尔浓度为 0.05mol/L (以 Br_2 为单元)
- 去氧肾上腺素与溴的化学反应式如下:



- 滴定度

$$T = 0.05 \times \frac{1}{3} \times 203.67 = 3.395 (\text{mg/ml})$$

- 每 1ml 溴滴定液 (0.05mol/L) 相当于 3.395mg 的
 $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$



2. 含量测定

(1) 直接滴定法

(2) 生成物滴定法

(3) 剩余量滴定法



(1) 直接滴定法

1

含量 (%)

$$= \frac{V \times T}{W} \times 100$$

2

$F =$

实际摩尔浓度
规定摩尔浓度

$$\text{含量 (\%)} = \frac{V \times T'}{W} \times 100 \left(= \frac{V' \times T}{W} \times 100 \right) = \frac{V \times T \times F}{W} \times 100$$

- 注意：掌握滴定反应的原理，药物与滴定剂反应的摩尔比正确计算滴定度和百分含量



(2) 间接滴定法

1) 生成物滴定法

- 药物与A作用生成B， 用滴定液滴定B

2) 剩余量滴定法

- 加入定过量滴定液A， 用滴定液B滴定剩余的A



1

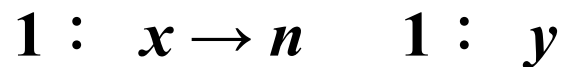
生成物

滴定法

- 百分含量计算方法与直接滴定法相同

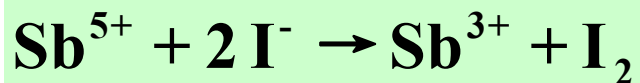
$$\text{含量}(\%) = \frac{V \times T'}{W} \times 100 \left(= \frac{V' \times T}{W} \times 100 \right) = \frac{V \times T \times F}{W} \times 100$$

- 注意：药物与滴定剂A → B摩尔比的转换

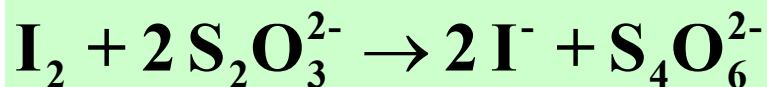


示例：葡萄糖酸锑钠（Sb=121.76）含量测定

- 本品约0.3g，加水100ml、盐酸15ml与碘化钾试液10ml，暗处放置10分钟，用硫代硫酸钠滴定液（0.1mol/L）滴定



$$n=1$$



$$y=2$$

$$T = m \times \frac{1}{y \times n} \times M = 0.1 \times \frac{1}{2 \times 1} \times 121.76 = 6.088 \text{ (mg/ml)}$$



- 每1ml硫代硫酸钠滴定液（0.1mol/L）相当于6.088mg锑（Sb）



2

剩余量

滴定法

$$\text{含量 (\%)} = \frac{(V_A \times F_A - V_B \times F_B) \times T_A}{W} \times 100$$



其中: $V_A \times F_A = V_B^O \times F_B$

$$\text{含量 (\%)} = \frac{(V_B^O - V_B^S) \times F_B \times T_A}{W} \times 100$$

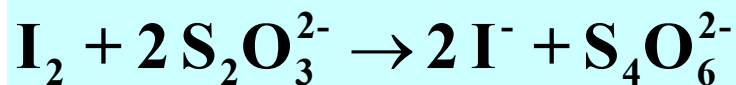
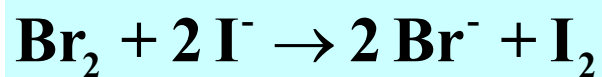
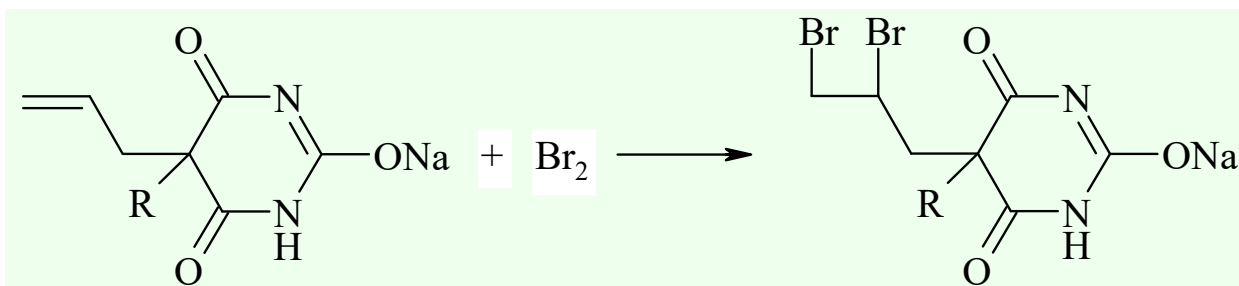
- 注意: 浓度校正因子 F 为滴定液B的 F_B
滴定度 T 为滴定液A的 T_A



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

示例：司可巴比妥钠 ($m=260.27$) 含量测定

- 本品0.1g，加水10ml溶解，精密加溴滴定液（0.05mol/L）25ml，再加盐酸5ml，放置15分钟，加碘化钾试液10ml，用硫代硫酸钠滴定液（0.1mol/L）滴定，滴定结果用空白试验校正



示例: 司可巴比妥钠 ($m=260.27$) 含量测定

- $W=0.1022\text{g}$
- 硫代硫酸钠滴定液 $F=1.038$
- 供试品消耗硫代硫酸钠滴定液 15.73ml
- 空白 23.21ml

$$T = m \times \frac{1}{y \times n} \times M = 0.1 \times \frac{1}{2 \times 1} \times 260.27 = 13.01 \text{ (mg/ml)}$$

$$\begin{aligned} \text{司可巴比妥含量 (\%)} &= \frac{(V^0 - V^S)_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times F_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times T_{\text{Br}_2}}{W} \times 100 \\ &= \frac{(23.21 - 15.73) \times 1.038 \times 13.01}{0.1022 \times 1000} \times 100\% = 98.8 \end{aligned}$$



示例：司可巴比妥钠含量测定

- 为实现等量替换， 滴定液A与滴定液B经各自 F 校正后的消耗体积（ $V'=V\times F$ ） 应是相当的， 因此：
 - 溴滴定液0.05mol/L， 硫代硫酸钠滴定液0.1mol/L；
两者浓度比为1：2
 - 因为溴（ Br_2 ）等摩尔转化为碘（ I_2 ）， 而碘（ I_2 ）与硫代硫酸钠（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ）反应的摩尔比为1：2， 所以溴滴定液与硫代硫酸钠滴定液的浓度比也是1：2



二、光谱分析法

定义

利用物质的光谱进行定性、定量和结构分析的方法——光谱分析法

分类

- UV-Vis
- IR
- AA
- Fluor
- FP
(flame photometry)





人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

(一) 紫外-可见分光光度法



- 基于对紫外光区和可见光区单色光辐射的吸收特性建立的光谱分析方法

原理: $A = \lg \frac{1}{T} = Ecl$ (朗伯-比尔定律)



1. 特点与适用范围

- (1) 方法简便易行
- (2) 方法灵敏度高
- (3) 结果准确度较高
- (4) 方法专属性较差
- 制剂含量测定与定量检查



2. 仪器校正和检定

- (1) 波长
- (2) 吸光度的准确度
- (3) 杂散光的检查

3. 对溶剂的要求

4. 含量测定法

- (1) 对照品比较法
- (2) 吸收系数法
- (3) 计算光谱法
- (4) 比色法



(1) 对照品比较法

1

溶液浓度 (c_X)

$$= \frac{C_R \times A_X}{A_R}$$

2

原料药：含量 (%)

$$= \frac{C_R \times A_X \times D}{A_R \times W} \times 100$$

3

制剂：标示量 (%)

$$= \frac{C_R \times A_X \times D \times \overline{W}}{A_R \times W \times B} \times 100$$

- 式中： D 为稀释体积 (ml)； B 为标示量 (规格)



示例：氟康唑片溶出度检查

- 规格：100mg
 - 盐酸溶液（9→1000）1000ml为溶出介质，45分钟取样，滤过；取续滤液，在261nm波长处测定吸光度；氟康唑对照品，用溶出介质制成每1ml中含0.1mg的溶液，同法测定，计算每片的溶出量

$$\text{标示量 (\%)} = \frac{A_X \times c_R \times D}{A_R \times B} \times 100$$

式中： $c_R=0.1 \text{ mg}$ ； $D=1000 \text{ ml}$ ； $B=100 \text{ mg}$



(2) 吸收系数法

1

溶液浓度 (g/ml)

$$= \frac{A_X}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100}$$

2

原料药：含量 (%)

$$= \frac{A_X \times D}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times W} \times 100$$

3

制剂：标示量 (%)

$$= \frac{A_X \times D \times \overline{W}}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times W \times B} \times 100$$

式中： $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为百分吸收系数

——浓度为1g/100ml时的吸光度



示例：盐酸氯丙嗪注射液含量测定

- 规格：1ml：25mg
 - 精密量取适量（ V ml，相当于盐酸氯丙嗪50mg），置200ml量瓶中，用盐酸溶液（9→1000）稀释至刻度，摇匀；精密量取2ml，置100ml量瓶中，用盐酸溶液稀释至刻度，摇匀，在254nm的波长处测定吸光度，按吸收系数（ $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ）为915计算

$$\text{标示量 (\%)} = \frac{A_x \times D \times \bar{V}}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times V \times B} \times 100$$

式中： $D = 10\,000\text{ ml}$ ； $\bar{V} = 1\text{ ml}$ ； $B = 0.025\text{ g}$



(3) 计算光谱法

- 对照品和供试品的测试条件应尽可能一致
- 计算分光光度法一般不宜用作含量测定

(4) 比色法

- 比色法——为避免干扰或提高灵敏度，向体系中加入适当的显色剂，使产物最大吸收波长移至可见光区后测定的方法
- 适用范围：紫外光区无强吸收或有干扰药物的测定

(二) 荧光分光光度法



Fluor

- 物质受UV或Vis照射后能发射出比激发光波长更长的荧光； 激发光停止照射，荧光随之消失； 激发和发射光谱用于定性，荧光强度用于定量



1. 特点

- (1) 方法灵敏度高
- (2) 荧光自熄灭
- (3) 易受干扰
- (4) 线性范围窄

$$(R_X - R_{Xb}) / (R_r - R_{rb}) = 0.5 \sim 2$$



2. 消除干扰

- (1) 溶剂：空白对照
- (2) 溶液：稀、净、充氮、pH
- (3) 玻璃器皿：无机清洁液
- (4) 温度

3. 测定法——对照品比较法

$$c_X = \frac{R_X - R_{Xb}}{R_r - R_{rb}} \times c_R$$



三、色谱分析法

特点与应用

特点

- (1) 高灵敏度: $\text{ng} \sim \mu\text{g}/\text{ml}$
- (2) 高专属性: 选择性检测
- (3) 高效能与高速度
 - 复方制剂含量测定的首选方法

分类

依据分离原理

- 吸附; 分配; 离子交换;
- 分子排阻; 临界点色谱

依据分离方式

- 液相色谱 (PC、TLC、LC); 气相色谱; 高效液相色谱法; 超临界流体色谱法; (毛细管) 电泳法





人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

(一) 高效液相色谱法



HPLC

- 不得更改: 固定相种类、流动相组分、检测器类型
- 可以改变: 色谱柱尺寸、载体粒度; 流动相各组分比例、流速; 柱温; 进样量; 检测器的灵敏度



1. 色谱条件 (RP-HPLC)

(1) 色谱柱

- ODS; 3~10 μ m
- 3.9~4.6mm
- 柱温 $\geq$ 60 $^{\circ}$ C

(2) 流动相

- 甲醇/乙腈-水
- 有机相 $\leq$ 5%
- pH2~8

(3) 检测器

- UV (DAD/PDA) ; Flu; ELSD; RID; ECD; MS



2. 系统适用性试验

- (1) 色谱柱理论板数 (n)
- (2) 分离度 (R)
- (3) 灵敏度
- (4) 拖尾因子 (T)
- (5) 重复性

3. 测定法——对照品比较法

- (1) 内标法
- (2) 外标法



2. 系统适用性试验

(1) 色谱柱理论板数

$$n=16 \left(t_R/W \right)^2; \quad n=5.54 \left(t_R/W_{h/2} \right)^2$$

(2) 分离度

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}; \quad R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{1.70(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})} \geq 1.5$$

(3) 灵敏度

- 定量 (LOQ) , $S/N \geq 10$; 定性 (LOD) , $S/N \geq 3$

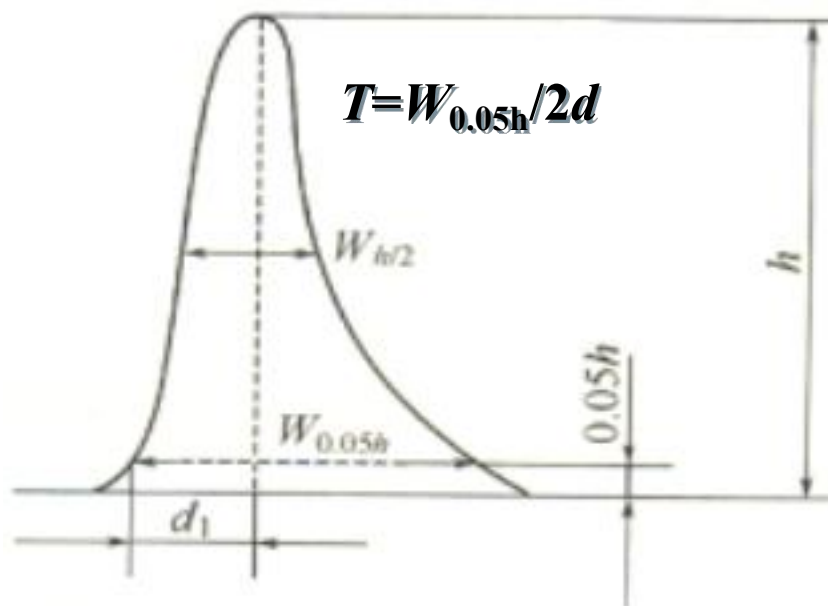


(4) 拖尾因子

- 以峰高定量时， T 值应在0.95~1.05之间

(5) 重复性

- 峰面积 $RSD \leq 2.0\%$ ($n=5$)



3. 测定法与计算

- 示例：氨酚待因片（I）的含量测定

- 处方：对乙酰氨基酚500mg；磷酸可待因8.4mg/1000片
 - 20片，精密称定，研细，精密称取适量，250ml量瓶，加水溶解并稀释至刻度，滤过，取续滤液10μl进样；另精密称取磷酸可待因与对乙酰氨基酚对照品适量，加水溶解并定量稀释制成每1ml中约含磷酸可待因 0.03mg和对乙酰氨基酚2mg的溶液，同法测定

- 含量（毫克/片） =
$$\frac{c_R \times \frac{A_X}{A_R} \times D \times \overline{W}}{W}$$





人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

(二) 气相色谱法



- 色谱柱：常用毛细管柱——熔融石英或玻璃
- 内径：0.25mm、0.32mm、0.53mm；柱长5~60m，内壁或载体涂渍或交联固定液，厚0.1~5.0 μ m
- 固定液：甲基聚硅氧烷、苯基甲基聚硅氧烷、聚乙二醇



检测器： FID

进样方式：

(1) 溶液直接进样/自动进样：

- 不超过数微升
- 毛细管柱分流

(2) 顶空进样

- 供试液于密闭小瓶中， 加热至待测组分达到液-气平衡，
吸取顶空气（1ml）进样



系统适用性试验

- 同HPLC法

测定法

(1) / (2) 同HPLC

(3) 标准溶液加入法

- 对照品溶液适量，精密加入到供试品溶液中，测定含量，扣除加入的对照品溶液含量，即得

$$\frac{A_{is}}{A_x} = \frac{c_x + \Delta c_x}{c_x}$$

$$c_x = \frac{\Delta c_x}{(A_{is} / A_x) - 1}$$



第二节

药物分析方法的验证



需验证的项目

- 鉴别试验
- 杂质检查
- 含量测定
- 防腐剂
- 溶出度、释放度

验证的内容

- 准确度
- 精密度
 - 重复性
 - 中间精密度
 - 重现性
- 专属性
- 检测限
- 定量限
- 线性
- 范围
- 耐用性



一、分析方法验证的内容

(一) 准确度

(二) 精密度

(三) 专属性

(四) 检测限

(五) 定量限

(六) 线性

(七) 范围

(八) 耐用性



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

(一) 准确度

1. 定义

- 准确度系指用该方法测定的结果与真实值或参考值接近的程度
- 一般用回收率（%）表示



2. 验证方法

(1) 含量测定

1) 基质无（原料药）/可模拟（制剂）

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测得量}}{\text{加入量}} \times 100$$

2) 基质不可模拟（制剂、中药）

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测得量} - \text{本底值}}{\text{加入量}} \times 100$$

(2) 杂质检查——方法同2)



2. 验证方法（其他方法）

- 可与已知准确度的另一方法的测定结果比较
——药典标准方法 / 经过验证的方法
- 也可由所测定的精密度、线性和专属性推算
——原料药含量HPLC测定法



3. 数据要求

- 9个测定结果 ($n=9$)
3水平 $\times$ 3样品
- 化药:
 - 1) 80、100、120%
 - 2) 1 : 0.8、1 : 1、1 : 1.2
- 中药: 1 : 0.5、1 : 1、1 : 1.5



3. 数据要求

样品中被测成分的含量水平与回收率限度要求的关系

含量水平	限度 (%)	含量水平	限度 (%)
100 %	98~101	0.01 %	85~110
10 %	95~102	10 µg/g (ppm)	80~115
1 %	92~105	1 µg/g (ppm)	75~120
0.1%	90~108	10 µg/kg (ppb)	70~125

(二) 精密度

1. 定义

- 同一均匀供试品多次取样测定所得结果之间的接近程度
- 相对标准偏差（%， **RSD**）； 置信区间（ $\bar{X} \pm ?S$ ）

2. 分类

- 重复性：同一实验室 / 相同环境（仪器、人员、批次）
- 中间精密度：同一实验室 / 不同环境
- 重现性（法定方法）：不同实验室 / 不同环境



3. 验证方法

- 重复性——相同条件连续测定所得结果的精密度
- 中间精密度——不同仪器、人员、分析批（时间）
- 重现性——不同实验室
- 操作法：同准确度，通常： $3（水平） \times 3（样品） = 9$
（数据）



4. 应用——定量分析

主成分含量测定

- 化药原料药/制剂——80%~120%（样品， $n=9$ ）
- 中药材（饮片）/制剂——100%（样品， $n=6$ ）
50%~150%（样品， $n=9$ ）

杂质定量测定

- 实际样品（100%水平， $n=6$ ）
- 标准添加（50%~150%限度水平， $n=9$ ）



5. 数据要求

样品中被测成分的含量水平与精密度可接受限度要求的关系

含量水平	重复性 (<i>RSD</i> %)	重现性 (<i>RSD</i> %)	含量水平	重复性 (<i>RSD</i> %)	重现性 (<i>RSD</i> %)
100%	1	2	0.01%	4	8
10%	1.5	3	10μg/g	6	11
1%	2	4	1μg/g	8	16
0.1%	3	6	10μg/kg	15	32

(三) 专属性

定义
与应用

- 在其他成分（杂质、降解产物、辅料等）可能存在下，方法能正确测定出被测物的特性鉴别、杂质检查和含量测定方法



鉴别反应

- 空白
- 结构相似物
- 或有关物质呈负反应

含量与杂质测定

——含杂质或降解产物的试样中各峰能获得分离



（四）检测限

- 检测限（limit of detection, *LOD*）——是指试样中被测物能被检测出的最低浓度或量
- *LOD*是一种限度检验效能指标，反映方法的灵敏度

1 直观法

目视法评价的方法: 化学反应 / TLC
——鉴别的显色法; 杂质检查的TLC

2 信噪比法

显示信号与噪声水平的方法: HPLC
—— $S/N=3$ (2) 时的相应浓度或量

3 标准偏差/ 标准曲线

其他分析方法: UV-Vis法

$LOD = 3.3\delta / S$ δ 空白响应偏差

S 标准曲线斜率

（五）定量限

- 定量限（limit of quantitation, LOQ ）——是指试样中被测物能被定量测定的最低浓度或量
- LOQ 是一种定量检验效能指标，反映方法的灵敏度

（1）测定结果具有一定准确度和精密度（验证要求）

（2）杂质/降解产物用定量方法研究：应确定 LOQ

（3）测定方法与 LOD 相同——系数不同，如 $S/N=10$



（六）线性

- 线性——在设计的“范围”内，响应值（ y ）与被测物浓度（ x ）直接呈正比关系的程度 $y = ax + b$
- 系列（ $n \geq 5$ ）水平（浓度）标准；线性回归（或经数学转换）
- 定量基础：含量测定；杂质/组分/溶出度等定量性检查



(1) 范围系指方法适用的高低限浓度或量的区间

(2) 在试验研究开始前确定验证的范围和方法

(3) 在范围内应能达到一定精密度、准确度和线性



(七) 范围

- 原料药/制剂含量测定：80%~120%
- 特殊元素含量测定：下限-20%~上限+20%
- 制剂含量均匀度检查：70%~130%
- 溶出度/释放度的溶出量测定：下限-20%~上限+20%
- 杂质测定：限度 $\pm 20\%$ （如果杂质检查与含量测定同时进行，杂质限度-20%~含量上限+20%）
- 校正因子测定：范围一般应根据其应用对象的测定范围确定



（八）耐用性

- 耐用性系指在测定条件有小的变动时，测定结果不受影响的承受程度；体现测定条件的允许变动范围
- **一般因素**：溶液的稳定性、样品提取的次数与时间等
- **HPLC法典型因素**：流动相的组成和pH及流速、不同厂牌或不同批号的同类型色谱柱、柱温等
- **GC法典型因素**：不同厂牌或批号的色谱柱、固定相、不同类型的担体、柱温、进样口和检测器温度等



二、分析验证的设计

验证内容选择的一般原则：

- **非定量分析方法** 如鉴别、杂质的限度检查法
——验证“专属性”，“检测限”和“耐用性”
- **常量定量分析方法** 如原料药或制剂的含量测定及含量均匀度、溶出度或释放度的测定方法
——除“检测限”和“定量限”外，其余均验证
- **微量定量分析方法** 如杂质的定量测定方法
——除“检测限”视情况而定外，其余均验证



验证内容		分析项目			
		鉴别 试验	元素或杂质检查		含量测定及 溶出量测定
			限度	定量	
准确度		—	—	+	+
精密度	重复性	—	—	+	+
	中间精密度	—	—	+	+
专属性		+	+	+	+
检测限		+/-	+	-/+	—
定量限		—	—	+	—
线性		—	—	+	+
范围		—	—	+	+
耐用性		+	+	+	+

三、分析方法验证示例

——ChP2015收载的阿司匹林质量标准中的典型分析项目及片剂的定量测定项目为例：

（一）阿司匹林化学鉴别

1. 专属性

- 通过空白溶剂试验考察专属性，空白试验应显阴性反应

2. 检测限

- 通过减少供试品取量试验确定方法检测限

3. 耐用性

- 通过改变供试品和试剂溶液的浓度与用量、加热温度及反应时间等条件验证



(二) 阿司匹林特殊杂质检查

- 游离水杨酸/有关物质检查方法: **RP-HPLC**
- 验证内容:
 - 准确度✓
 - 精密度✓
 - 专属性✓☆
 - 检测限 ?
 - 定量限✓
 - 线性 ✓
 - 范围 ✓
 - 耐用性✓



(三) 阿司匹林含量测定

酸碱滴定法

- 方法建立:

- 滴定曲线

- 验证内容:

- 准确度✓

- 专属性✓ (×无意义)

- 定量限 ×

- 范围 ✓

- 终点指示

- 精密度✓

- 检测限 ×

- 线性 ✓

- 耐用性✓



(四) 阿司匹林片含量测定

HPLC法

- 验证内容:

- 准确度√

- 专属性√

- 定量限 ×

- 范围 √

- 精密度√

- 检测限 ×

- 线性 √

- 耐用性√



（五）阿司匹林片溶出量测定

- 同片剂含量测定（HPLC），在含量测定的基础上补充验证内容：
 - 准确度 ×
 - 精密度 ×
 - 专属性（溶出基质） ✓
 - 检测限 ×
 - 定量限 ×
 - 线性（L-20%~120%） ?
 - 范围（L-20%~120%） ?
 - 耐用性（稳定性/基质） ✓



第三节

分析样品的制备



- 一、分析目的与样品制备
- 二、样品基质与样品制备
- 三、样品制备的常用方法



一、分析目的与样品制备

分析目的

- 鉴别试验
- 杂质检查
- 元素检查
- 含量测定
- 稳定性试验

分析方法

- 化学法
- 光谱法
- 色谱法
- 其他

样品制备

- 直接溶解
- 提取分离
- 化学降解
- 化学衍生化
- 有机破坏



- (一) 鉴别试验
- (二) 检查
- (三) 定量测定
- (四) 稳定性试验



(一) 鉴别试验

1. 化学反应

- 利用特征基团或元素的特性反应
- ——如显色，产生气体或沉淀等
- **具有特征基团:** 盐酸普鲁卡因（芳伯胺）
 - 直接溶于稀盐酸
 - 采用重氮化-偶合显色法鉴别芳香第一胺
- **具有潜在特征基团:** 阿司匹林（乙酰化酚羟基）
 - 加水煮沸水解
 - 与三氯化铁试液显紫堇色



2. 光谱法

- **紫外-可见光谱法：**双氯芬酸钠及其肠溶片
——直接溶解（滤过），在276nm处有最大吸收
- **红外光谱法：**布洛芬及其片剂
——原料药：直接绘制IR图谱
——片剂：取片粉，加丙酮溶解、滤过，取滤液挥干，并真空干燥后测定



3. 色谱法

- **TLC:** 庆大霉素
——直接溶解（滤过）
- **HPLC:** 庆大霉素
——C组分测定项下记录的谱图



（二） 检查

1. 目标化合物稳定

- **无机杂质：**适当溶媒溶解/有机破坏

——如， 氯化物/重金属（一般杂质）的检查

- **特征元素：**化学分解或有机破坏

——如， 有机药物分子结构中卤族元素的定量检查

2. 目标化合物不稳定

- **有机杂质：**不进行处理操作， 避免杂质增加

——如， 有关物质检查



(三) 定量测定

1. 含量测定 滴定法/HPLC法

——直接溶解

- 测定特征元素

——有机破坏（氧瓶燃烧法）

- 色谱分析法

——化学改性（化学衍生化）

2. 溶出量测定 UV法/HPLC法

——滤过



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

(四) 稳定性试验

- 稳定性指示方法 (HPLC方法专属性)

1. 热分解法 60~105°C, 分解5%~10%
2. 酸分解法 1~0.01mol/L HCl, 室温
3. 碱分解法 1~0.01mol/L NaOH, 室温
4. 氧化分解法 3%~30% H₂O₂, 室温
5. 光分解法 日光/4500Lx光源, 室温



二、样品基质与样品制备

(一) 化学原料药

(二) 药物制剂

1. 化学药物制剂

2. 中药制剂

3. 生物制剂

(三) 生物样品



(一) 化学原料药

- 无基质干扰
——直接分析



(二) 药物制剂

1. 化学药物制剂 处方中干扰组分的排除

——第十八章 制剂分析概论

2. 中药制剂 指标成分的提取与分离浓缩

——第十九章 中药及其制剂分析概论

3. 生物制品 样品制备方法不尽相同

——第二十章 生物制品分析概论



(三) 生物样品

- 痕量分析：生物基质干扰

- 提取分离、浓缩
- 有机破坏， 如：酸消解法

——第五章 体内药物分析



三、样品制备的常用方法

- (一) 直接溶解法
- (二) 提取分离法
- (三) 萃取浓集法
- (四) 化学分解法
- (五) 化学衍生化法
- (六) 有机破坏法



(一) 直接溶解法



特点

- 适用于具有特征基团的化学原料药或其简单制剂的鉴别、检查与含量测定



1. 溶剂溶解法

- 将试验样品直接溶解于适当的溶剂

2. 固体分散法

- 将固体试样分散于固体或液体稀释剂
——红外光谱法



（二）提取分离法



特点

- 适用于复杂基质中药物的鉴别与含量测定时的样品制备



1. 方法

- 用与水混溶的极性有机溶剂将被测物质与试验样品基质分离的过程

2. 应用

- 如：糖浆剂、软膏剂、栓剂等辅料干扰严重的药物制剂或中药材及其简单制剂



(三) 萃取浓集法



特点

- 适用于复杂基质中微量或痕量物质含量测定时的样品制备



1. 方法

- 用与水不互溶的有机溶剂萃取被测物质：

（1） 溶剂萃取法

（2） 固相萃取法

2. 应用

- 如：中药复方制剂或生物样品中微量或痕量组分的定量分析

（四）化学分解法



特点

- 适用于结合不牢固（可分解）的含金属或含卤素有机药物



1. 回流水解法

- 酸/碱溶液回流， 结合元素转化为无机态
 - 酸： 十一烯酸锌（金属）
 - 碱： 三氯叔丁醇（卤素）

2. 锌粉还原法

- 氢氧化钠溶液-Zn回流
- 碘他拉酸等含碘有机药物（碘与芳环连接）



（五）化学衍生化法



特点

- 适用于无（游离/潜在）可检测基团或特征元素的药物分析时的样品制备



1. 方法

- 通过适当的化学反应，在药物分子中引入具有特征属性官能团的结构改造过程

2. 应用

- 如：氨基己烯酸中4-氨基丁酸（杂质D）的检查：EP8.0以9-芴甲基氯甲酸酯（Fmoc-Cl）为衍生化试剂，采用柱前衍生化法测定



(六) 有机破坏法



特点

- 适用于结合牢固的含金属、卤素、氮、硫、磷等元素有机药物分析时样品制备



1. 酸破坏法（湿法）

- 硫酸为分解剂； 氧化剂（硝酸/高氯酸）辅助分解
- 适用于含氮药物

2. 碱破坏法（干法/高温）

- 无水碳酸钠、氢氧化钙等辅助灰化
- 用于含卤素药物鉴别



1. 酸破坏法——凯氏定氮法

仪器装置

- 分解剂（消解剂）与辅助剂：硫酸-硫酸钾-硫酸铜

操作法

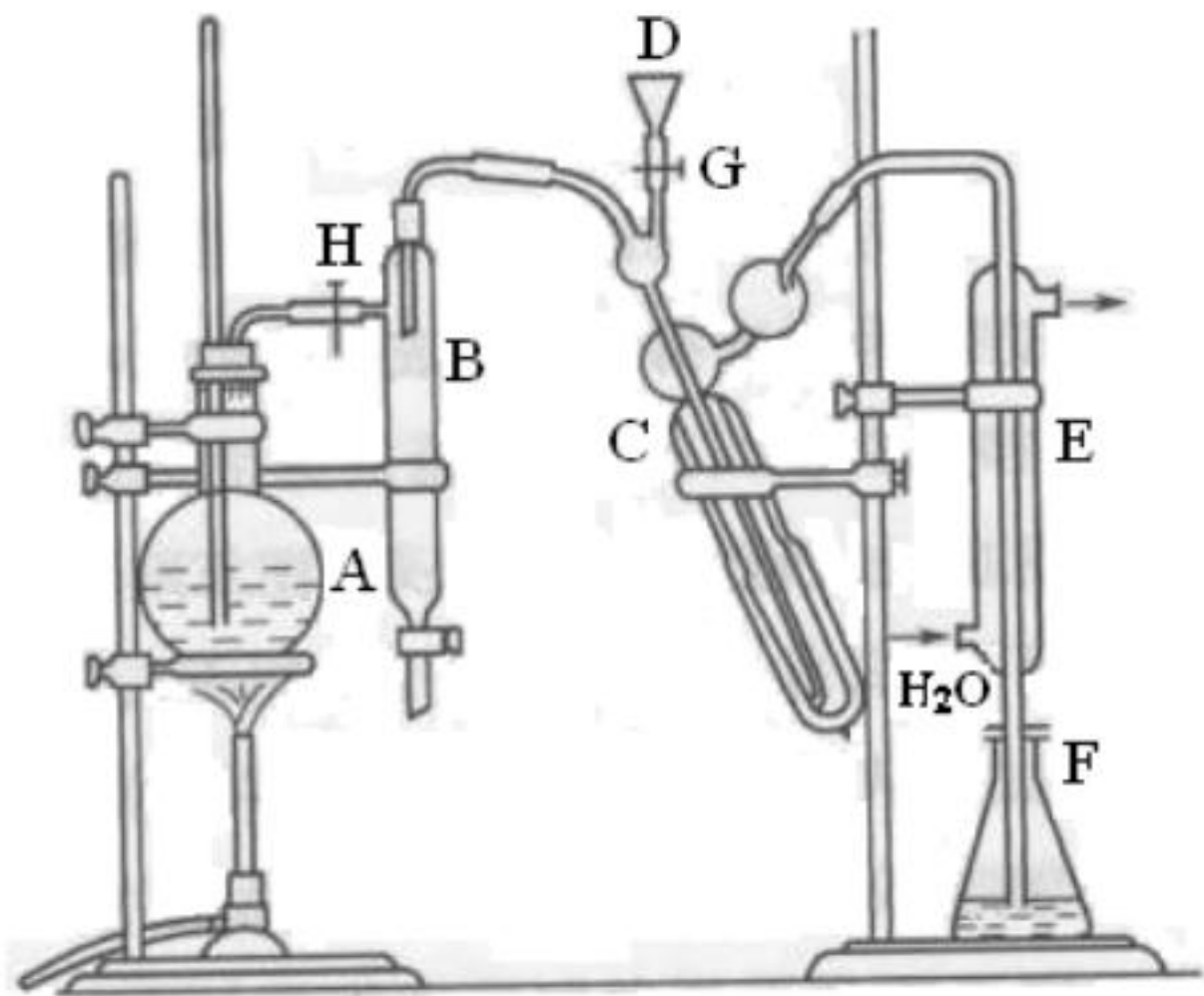
- 供试品：常量法含氮25~30mg； 半微量法：1.0~2.0mg
- 消解：溶液成澄明的绿色， 继续加热30分钟
- 蒸馏：40%氢氧化钠碱化， 水蒸气蒸馏
- 吸收与滴定：2%硼酸溶液吸收， 硫酸滴定液（0.05mol/L）滴定， 甲基红-溴甲酚绿指示剂（灰紫色）



应用范围

- 含有氨基或酰氨（胺）结构





示例：扑米酮的含量测定

- 本品约0.2g，精密称定，照氮测定法测定；每1ml硫酸滴定液（0.05mol/L）相当于10.91mg的扑米酮（ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ）
- 讨论：
 - 关键步骤：消解
 - 试剂作用：
 - ✓ 硫酸-消解剂；
 - ✓ 硫酸钾-提高沸点；
 - ✓ 硫酸铜-催化剂；
 - ✓ 硼酸-固氮（ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_3\text{BO}_3$ ）



2. 碱破坏法

原理与操作法

- 含待测元素的有机药物与分解剂混合后经高温炽灼灰化，待测元素转化为可溶性无机盐

适用范围

- 主要用于含卤素或含硫药物的鉴别
- 亦用于含磷药物含量测定



示例——ChP2015乙胺嘧啶氯元素的鉴别

- 本品0.1g，加无水碳酸钠0.5g，混合，炽灼，残渣用水浸渍，滤过，滤液中滴加硝酸至遇石蕊试纸显红色，显氯化物鉴别（1）的反应



3. 氧瓶燃烧法

原理

- 含待测元素的有机药物在充满氧气的燃烧瓶中燃烧
 - 有机结构: 彻底分解为 CO_2 和 H_2O
 - 待测元素: 转化为不同价态的氧化物或无氧酸
 - 在适当的吸收液中多以酸根离子形式存在

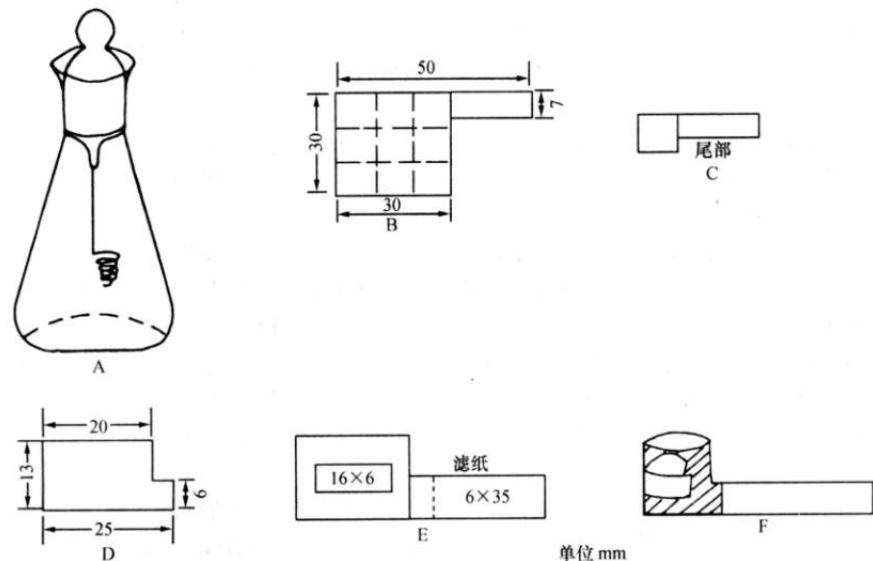
适用范围

- 含卤素或含硫药物的鉴别与定量测定



装置

- 铂丝： $\phi 1\text{mm}$ ；2/3瓶高
- 氧瓶：硬质玻璃（石英玻璃）
 - 10~20mg 500ml
 - 200mg 1000~2000ml



样品制备



燃烧产物与吸收液

- 氟—— HF ：水
- 氯—— HCl ：水-氢氧化钠
- 溴—— $\text{Br}_2 + \text{HBr}$ ：水-氢氧化钠-二氧化硫
- 碘—— I_2 (+ HIO)：水-氢氧化钠（二氧化硫）
- 硫—— SO_3 (+ SO_2)：水-过氧化氢
- 磷—— $\text{P}_2\text{O}_5 \rightarrow \text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$, (HPO_3)_n：水-硝酸（煮沸）



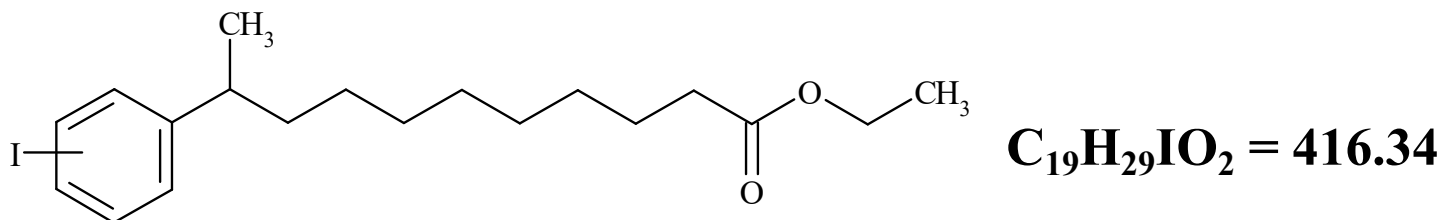
示例——碘苯酯的含量测定

- 样品：20mg
- 吸收液：氢氧化钠试液2ml与水10ml
- 操作
 - 吸收液中加溴-醋酸10ml，加甲酸1ml，通空气3分钟
 - 加碘化钾2g，用硫代硫酸钠滴定液（0.02mol/L）滴定
- 摩尔比为1：6， $T=416.34 \times (1/6) \times 0.02=1.388$ （mg）



示例——碘苯酯的含量测定

- 摩尔比为1：6， $T=416.34 \times (1/6) \times 0.02=1.388$ (mg)



- 燃烧与吸收： $\text{I}_2 + 2 \text{NaOH} \rightarrow \text{NaIO} + \text{NaI} + \text{H}_2\text{O}$
 $3 \text{NaIO} \xrightarrow{\text{OH}^-} \text{NaIO}_3 + 2 \text{NaI}$
- 加溴-醋酸： $3 \text{Br}_2 + \text{I}^- + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{IO}_3^- + 6 \text{HBr}$
- 加碘化钾： $\text{IO}_3^- + 5 \text{I}^- + 6 \text{H}^+ \rightarrow 3 \text{I}_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$
- 碘滴定液滴定： $\text{I}_2 + 2 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \rightarrow 2 \text{NaI} + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$



含量测定

- 滴定法
 - 特点与应用
 - 滴定度及其计算
 - 含量计算
- 光谱法
 - 特点与应用
- 色谱法
 - 特点与应用
 - 系统适用性试验



方法验证

- 分析项目与验证方案
- 验证内容
 - 准确度与 精密度
 - 专属性
 - 检测限与定量限
 - 线性与范围
 - 耐用性



样品制备

- 样品制备依据
- 样品制备方法
 - 直接溶解
 - 分离与浓集
 - 化学分解
 - 化学衍生化
 - 有机破坏
 - ✓ 凯氏定氮法
 - ✓ 氧瓶燃烧法



Thank you very much!



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE