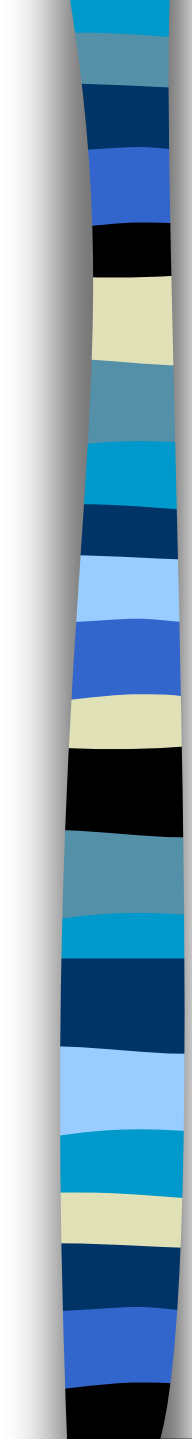


含量测定方法应用指导原则

袁雯玮

- 
- 药品的含量或效价是评定药品质量的主要指标之一，因此对于测定方法选择，除要求方法准确、简便外，测定结果还要有良好的重复性。



常用含量测定方法：

■ 容量法

■ 紫外-可见分光光度法

■ 高效液相色谱法

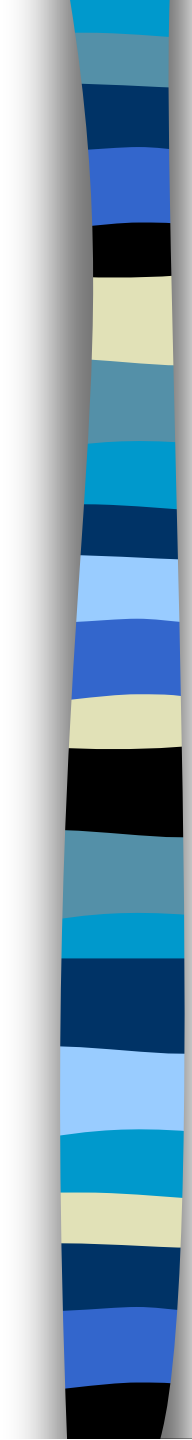
■ 微生物检定法

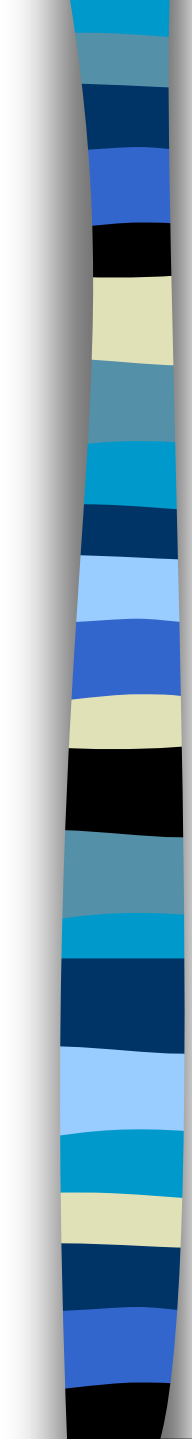


■ 一. 方法应用指导原则

■ 1. 容量分析方法

■ 容量分析方法具有准确、精密等优点，因此在原料药的含量测定中仍广泛采用。

- 
- 1.1 所选用的容量分析方法, 一般应测定药物中对生理作用有效的部分.
 - 1.2 对于纯度较高且稳定的原料药, 其含量测定首选容量分析法。为弥补容量分析方法专属性不足, 必要时应增加有关的检查项目。
 - 1.3 供试品的取用量应满足滴定精度的要求, 一般消耗滴定液约20ml, 非水滴定法约8ml。

- 
- 1.4 滴定终点的判断要明确，如选用指示剂，终点的颜色应按电位滴定曲线确定。
 - 1.5 为了排除因加入其他试剂而混入的杂质对测定结果的影响，可采用空白试验校正。
 - 1.6 用高氯酸滴定法测定有机碱的氢卤酸盐的含量，应避免使用醋酸汞。
 - 1.7 每1ml滴定液相当于待测物质的换算因子，采用四位有效数字。

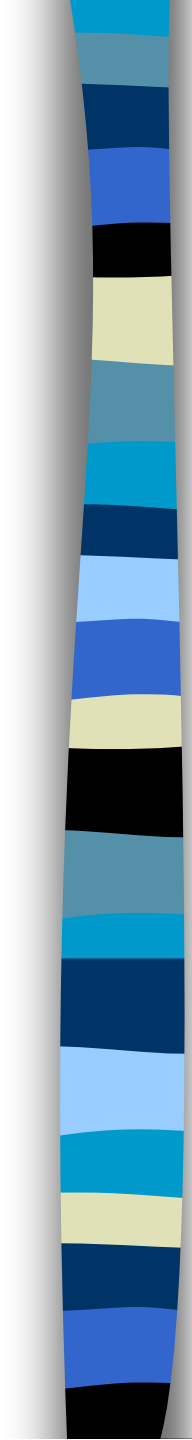
1. 8.容量分析法应用举例

- 在测定常量组分时，容量分析法具有精密度好和操作简便、快速的优点，因而是化学原料药含量测定的首选方法。
- 药典中常用的有中和法、非水滴定法、银量法、络合量法、碘量法、和重氮化法。
- 比较少用的有汞量法、四苯硼钠法、溴量法、高锰酸钾法、碘酸钾法、溴酸钾法、高碘酸钾法、和铈量法等；因此，可根据药品分子中所具有的基团及化学性质，分别选用。



在方法叙述中要强调：

- A、供试品的取用量应满足滴定精度的要求（消耗滴定液约20ml）。
- B、滴定终点的判断要明确，如选用指示剂法，除应考虑指示剂变色敏锐（文中给出所变颜色）外，也应兼顾市场要有供应。

- 
- C、为了排除因加入其他试剂而混入杂质对测定结果的影响，以及便于回滴定法的计算，可采用“并将滴定的结果用空白试验校正”的办法。
 - D、最后给出每1ml滴定液相当于待测物质质量的换算因子，采用四位有效数字



- 中和法

- 有酸量法和碱量法，各自有直接滴定和回滴定，为药典中常用的方法；附录中的“氮测定法”，也属此法。

- 举例如下：

- 例1 取本品约0.6g，精密称定，加中性乙醇（对酚酞指示液显中性）50ml溶解后，加酚酞指示液数滴，用氢氧化钠滴定液（0.1mol/L）滴定。每1ml相当于28.54mg的 $C_{13}H_{19}NO_4S$ 。
(丙磺舒)



■ 非水滴定法

- 在水以外的溶剂中进行滴定的容量分析方法称为非水滴定法，在药典的含量测定中，主要是非水溶液的酸、碱滴定；
- 高氯酸的非水滴定，因其具有适应广（适用于有机弱碱及其盐类），方法简便和测定结果精密等优点，在化学原料药的含量测定中最为常用。
- 为减少对环境的污染，在氢卤酸盐的非水滴定中，应尽量避免使用醋酸汞试液。该法已收载于附录，但在正文中仍应详细叙述方法，尤其是指示剂及其变色情况。



- 举例如下：

- 例1 取本品约0.15g，精密称定，加冰醋酸10ml溶解后，加结晶紫指示液1滴，用高氯酸滴定液（0.1mol/L）滴定至溶液显蓝绿色，并将滴定的结果用空白试验校正。每1ml高氯酸滴定液（0.1mol/L）相当于19.54mg的 $C_{16}H_{19}ClN_2C_4H_4O_4$ 。

- (马来酸氯苯那敏)



■ 银量法

■ 有直接滴定和回滴定法；由于指示滴定终点的方法不同，介质条件也不一致，均应明确叙述。

■ 举例如下，

■ 例1 取本品约0.12g，精密称定，加水50ml使溶解，再加糊精溶液（1→50）5ml、荧光黄指示液8滴与碳酸钙0.10g，摇匀，用硝酸银滴定液（0.1mol/L）滴定。每1ml硝酸银滴定液（0.1mol/L）相当于5.349mg的 NH_4Cl 。

■ （氯化铵）

络合量法

药典中常用的氨羧络合剂为乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L），主要用于含Mg、Ca、Al、Zn、或Bi药物的含量测定。方法中的重点在于供试液的pH值与指示剂的选用，以及滴定终点时指示剂的颜色变化。

举例如下。

例1 取本品约0.25精密称定，加水30ml溶解后，加氨-氯化铵缓冲液（pH10.0）10ml与络黑T指示剂少许，用乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）滴定至溶液由紫红色转变为纯蓝色。每1ml乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）相当于6.018mg的MgSO₄。

（硫酸镁）

■ 碘量法

- 在药典中，碘滴定液和溴滴定液的浓度单位（mol/L）是以前基本单位分别为 $1/2I_2$ 和 $1/2Br_2$ 来表示的，因此在计算其每1ml滴定液相当于待测物质量的换算因子时，应特别注意。

- 举例如下：

- 例1 取本品约0.1g，精密称定，加乙醇10ml，摇匀，用碘滴定液滴定至溶液显持续的微黄色，并将滴定的结果用空白试验校正。每1ml碘滴定液（0.05mol/L）相当于**6.211mg**的 $C_3H_8OS_2$ 。

（二巯丙醇）



2. 高效液相色谱法

- 本法可用于鉴别、杂质检查、溶出度、释放度、含量均匀度及含量测定等。

- ### 2.1 色谱条件

- 根据待测物质的性质、其存在的基质等，选择不同的色谱条件，实现定性与定量分析的目的。
- 色谱条件主要包括：固定相的种类，流动相的组成，检测器的种类与参数等。

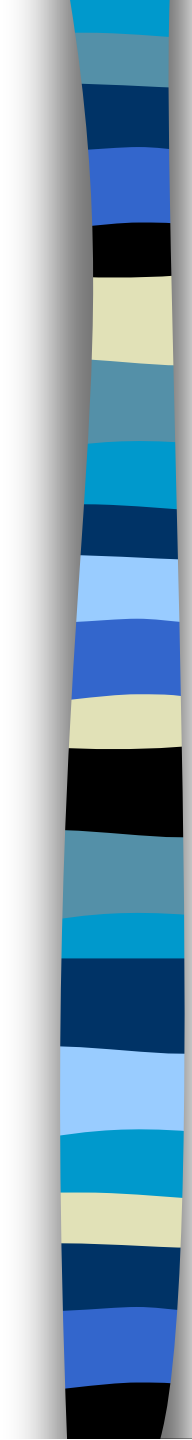


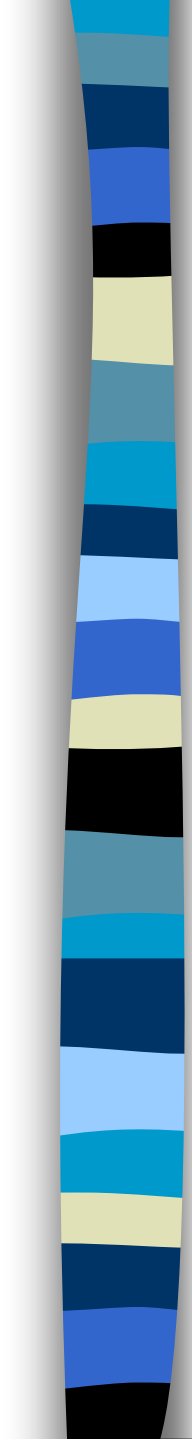
■ 2.1.1 固定相

■ 最常用的固定相为化学键合硅胶。

■ 反相色谱系统使用非极性固定相，以十八烷基硅烷键合硅胶最为常用，辛烷基硅烷键合硅胶、氰基硅烷键合硅胶、氨基硅烷键合硅胶或苯基硅烷键合硅胶等也常有使用；

■ 正相色谱系统使用极性固定相，以硅胶最为常用。

- 
- 离子交换色谱常用离子交换键合硅胶作为固定相；
 - 分子排阻色谱常用凝胶或高分子多孔微球作为固定相；
 - 对映异构体分析常用手性键合硅胶作为固定相。
 - 注意建立色谱条件时，应对不同牌号的同类色谱柱进行考察，以确保系统具有较好的粗放度。



■ 2.1.2 流动相

- 反相色谱的流动相首选甲醇—水系统（采用紫外末端波长检测时，首选乙腈—水系统），如经试用不适合时，再选用其他溶剂系统。
- 应尽可能少用含有缓冲液的流动相，必须使用时，应尽可能选用含较低浓度缓冲液的流动相。
- 采用梯度洗脱系统时，应注明洗脱程序，并在“色谱条件与系统适用性试验”项下规定待测物质的保留时间。



■ 2.1.3 检测器

■ 首选紫外检测器。

■ 无紫外吸收的物质可选用示差折光检测器或蒸发光散射检测器。

■ 亦可根据待测物质的性质选用荧光检测器或电化学检测器等其他检测器。



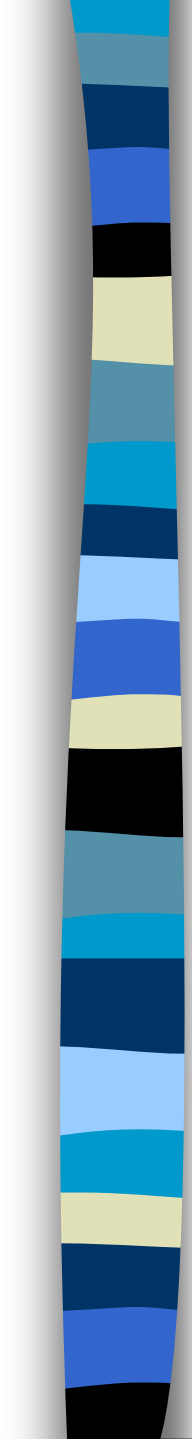
■ 2.2 系统适用性试验

- 为确保建立的高效液相色谱系统具有专属性、准确性与重现性，需进行系统适用性试验，一般通过理论板数、分离度、重复性与拖尾因子等四个指标进行评价。
- 其中，应格外关注分离度，并在“色谱条件与系统适用性试验”项下对其作出具体规定。



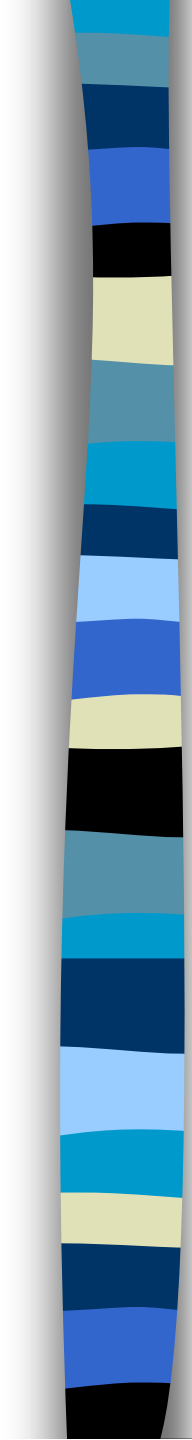
■ 2.2.1 理论板数

- 用于评价色谱柱的效能。当色谱柱长度一定时，塔板数 n 越大，柱效能越高。
- 由于不同物质在同一色谱柱上的分配系数不同，采用理论板数作为衡量柱效能的指标时，应指明测定物质，一般为待测组分或内标物质的理论板数。

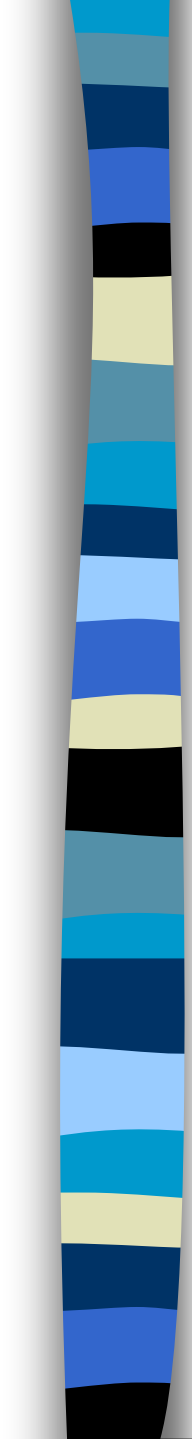


■ 2.2.2 分离度

- 用于评价待测组分与相邻共存物或难分离物质之间的分离程度，是衡量色谱系统专属性的关键指标。
- 可以通过测定待测物质与已知杂质的分离度，也可以通过测定待测组分与某一添加的指标性成分（内标物质或其它难分离物质）的分离度，对建立的色谱系统进行评价与控制。



除另有规定外，定量分析时，待测组分与相邻共存物之间的分离度应大于**1.5**；或经过验证，待测组分与指标性成分之间的分离度应大于某一规定值。



■ 2.2.3 重复性

- 用于评价连续进样后，色谱系统响应值的重复性能。
- 采用外标法时，通常取对照品溶液，连续进样**5**次，除另有规定外，其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于**2.0%**；
- 采用内标法时，通常配制相当于**80%**、**100%**和**120%**的对照品溶液，加入规定量的内标溶液，配成**3**种浓度，分别至少进样**2**次，计算平均校正因子，其相对标准偏差应不大于**2.0%**。



■ 2.2.4 拖尾因子 (T)

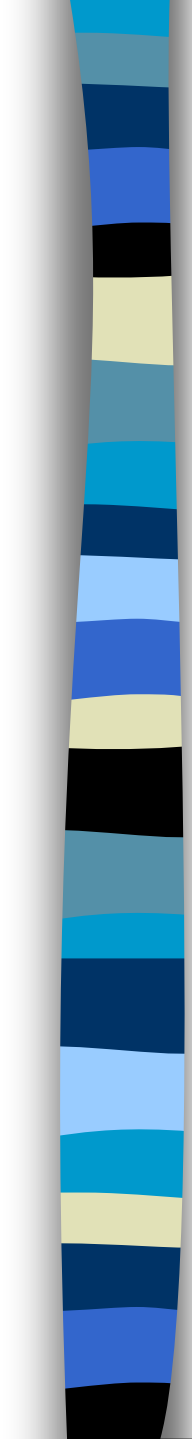
- 用于评价色谱峰的对称性。除另有规定外，采用峰高法定量时，T应在**0.95~1.05**之间。采用峰面积法定量时，T值偏离过大，也会影响小峰的检测和定量的准确度。



■ 2.3 定量方法

- 如满足定量精密度的要求，可选用外标法；
- 选用内标法时，内标物质应选择易得并对测定方法无干扰的物质。
- 采用蒸发光散射检测器时，应采用标准曲线法。



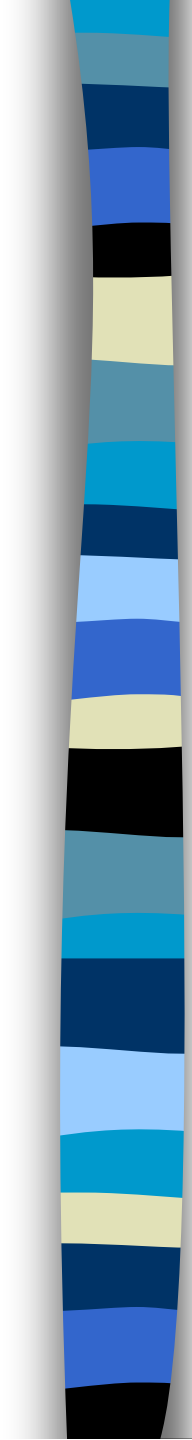
- 
- 用于杂质检查时，
 - 首选杂质对照品法，
 - 提倡采用加校正因子的自身对照法
 - 也可采用不加校正因子的自身对照法，
 - 避免采用峰面积归一化法。

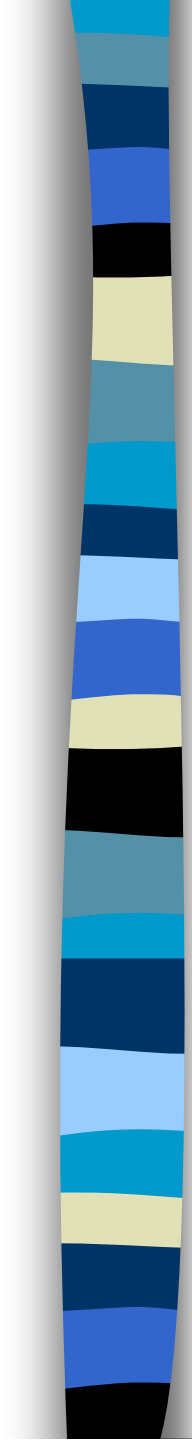


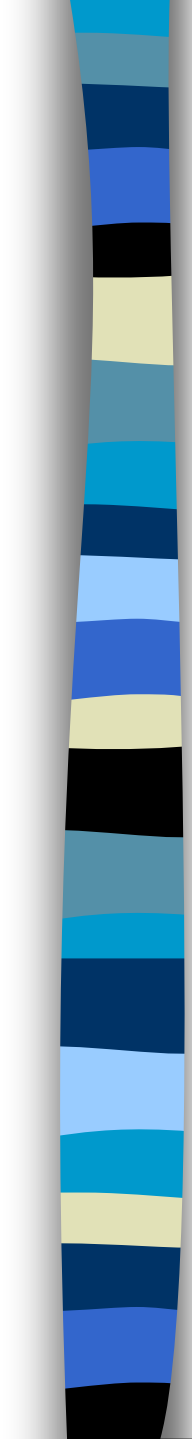
- **2.4 应用**

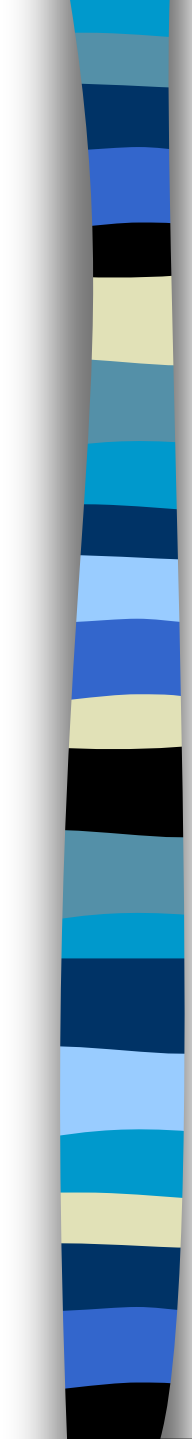
- **2.4.1** 用于鉴别，主要以与对照品的保留时间是否一致作为鉴别依据。

- **2.4.2** 用于杂质检查，主要检查原料药和制剂中可能引入的杂质或降解产物。

- 
- **2.4.3** 用于溶出度、释放度和含量均匀度的测定，主要用于因杂质或辅料干扰，常规方法难以分离或分离手段繁杂或其他方法的检测灵敏度达不到要求的品种。

- 
- 2.4.4 用于原料药的含量测定，主要用于以下情况：
 - **2.4.4.1** 多组分原料药的含量测定或组分测定；
 - **2.4.4.2** 纯度不高且杂质存在干扰，常规方法难以分离或分离手段繁杂的原料药的含量测定。

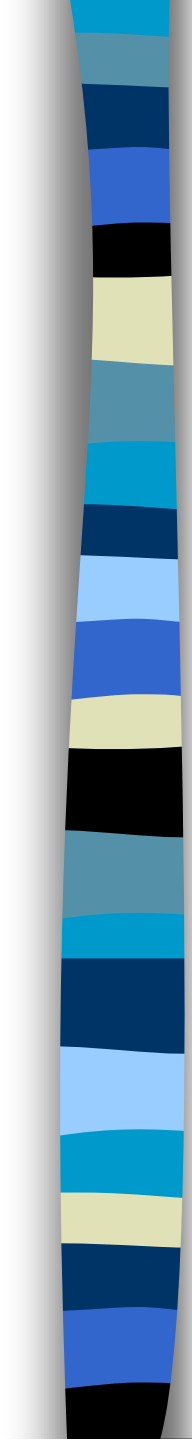
- 
- **2.4.5** 用于制剂的含量测定，主要用于以下情况：
 - **2.4.5.1** 所含杂质或辅料干扰含量测定、须经繁杂分离后才能测定的制剂；
 - **2.4.5.2** 各成分间相互干扰的复方制剂。
 -

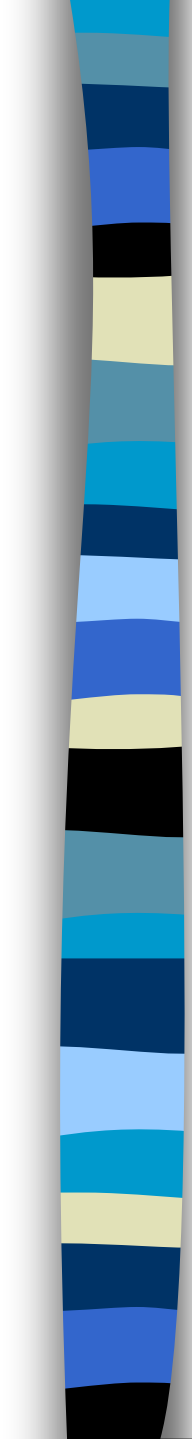
- 
- **2.4.6** 贮藏期间可能分解的制剂的含量测定。
 - **2.4.7** 用于原料及制剂的稳定性研究和考察。

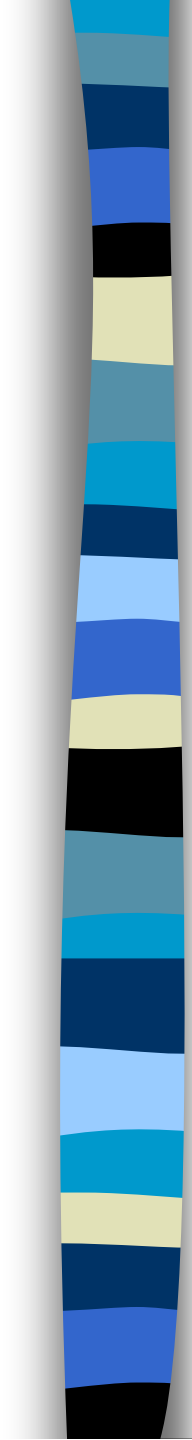


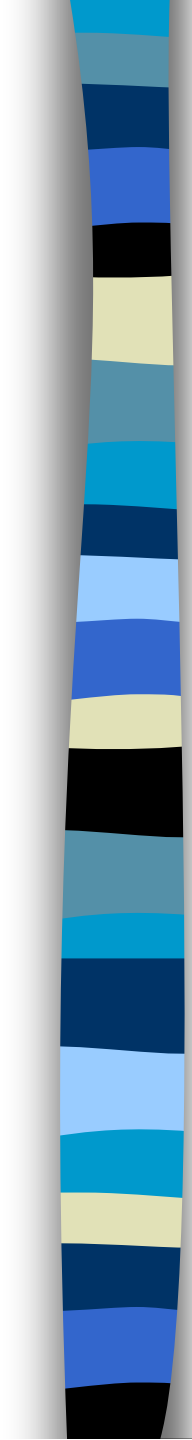
■ 2.5 高效液相色谱法应用举例

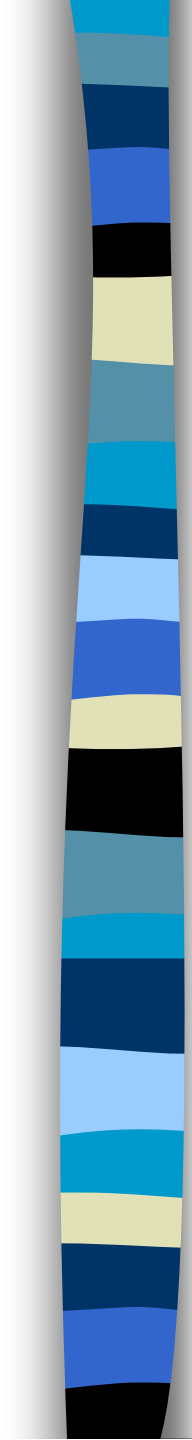
- 在原料药的含量测定中，高效液相色谱法主要用于抗生素或生化药品，
- 所含杂质干扰测定，而常规方法又难以分离或分离手段繁杂的化学品种，
- 多组分抗生素的组分测定。

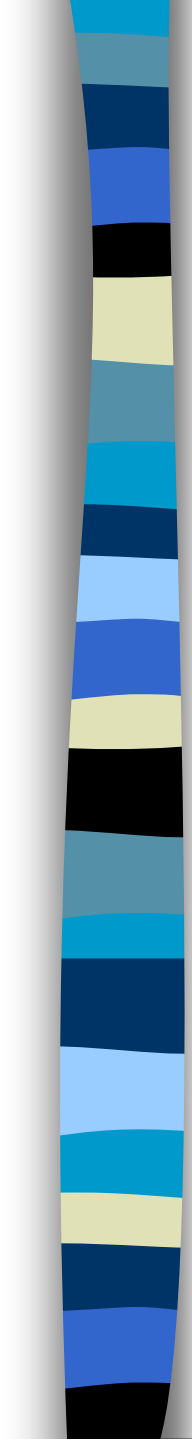
- 
- 方法中所用的对照品，必须具有纯度高、易于制备和性质稳定等条件，
 - 由于定量环或自动进样器的使用，一般均采用外标法，
 - 如采用内标法（例8）内标物质应选择易得、化学稳定性好,并不得对测定方法产生干扰的物质。

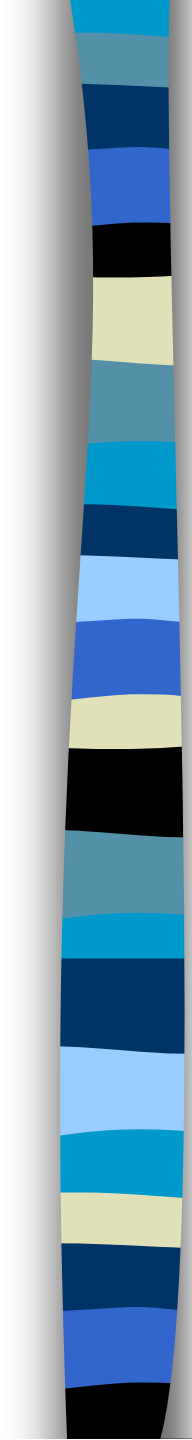
- 
- 采用蒸发光散射检测器时，应采用不少于三个浓度的对照品溶液进行测定，以对照品溶液的对数值与相应的峰面积对数值计算回归方程，由回归方程计算出供试品含量（例5）。

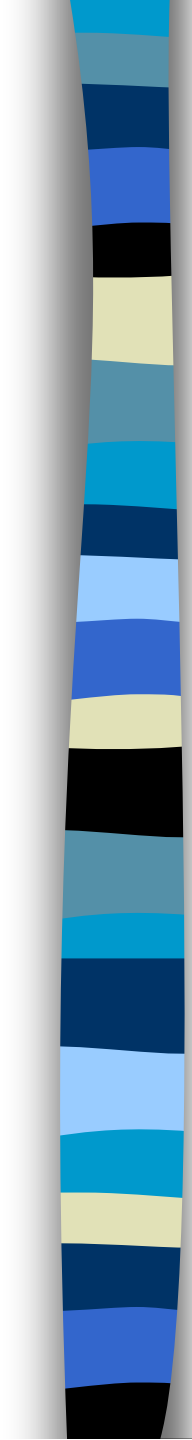
- 
- 例5. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。
 - 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以0.2mol/L三氟醋酸溶液-甲醇（95：5）为流动相；用蒸发光散射检测器检测（参考条件：漂移管温度110℃，载气流量为每分钟3.0L）。分别称取卡那霉素对照品与卡那霉素B对照品适量，用水溶解并制成每1ml中各约含80μg的混合溶液，取20μl注入液相色谱仪，卡那霉素峰与卡那霉素B峰的分度应不小于5.0；计算5次进样结果，卡那霉素峰面积的相对标准偏差不得过2.0%。

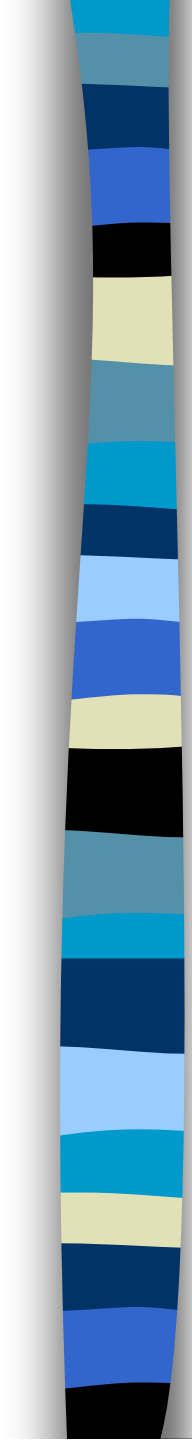
- 
- **测定法** 取卡那霉素对照品适量，精密称定，用水溶解并制成每1ml中约含卡那霉素0.10、0.15和0.2mg的溶液。精密量取各20μl，注入液相色谱仪，记录色谱图，以对照品溶液浓度的对数值与相应的峰面积对数值计算回归方程，相关系数（r）应不小于0.99；另取本品适量，精密称定，用水溶解并定量稀释制成每1ml中约含卡那霉素0.15mg的溶液，同法测定，由回归方程计算供试品中 $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ 的含量。
（硫酸卡那霉素）

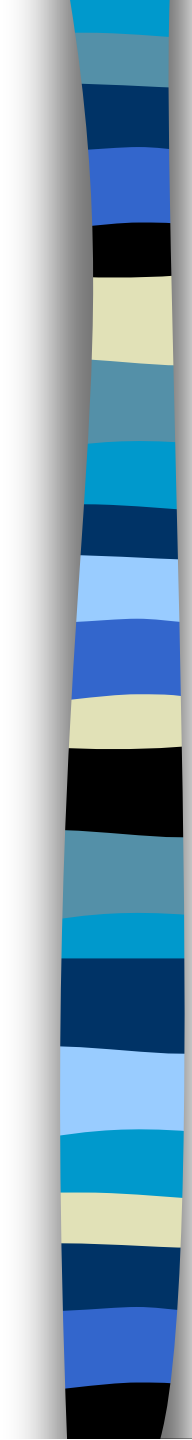
- 
- 所用填充剂以十八烷基硅烷键合硅胶最为常用，辛基硅烷键合硅胶、硅胶等也有使用。
 - 流动相应首选甲醇-水系统，如经试用不合适，可改选用其他填充剂和流动相，可根据需要采用等度或梯度洗脱。

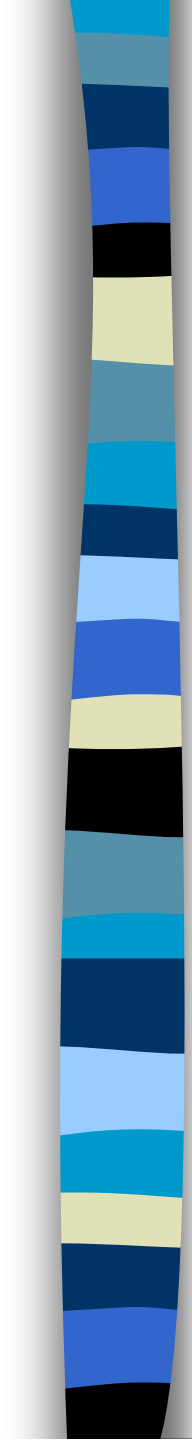
- 
- 最常用的检测器为紫外检测器，其他常见检测器有二极管阵列检测（**DAD**）、蒸发光散射检测器、荧光检测器、质谱检测器、电化学检测器等。

- 
- 制定的方法应有“色谱条件和系统适用性试验”要求。
 - “色谱条件和系统适用性试验”项下所订的理论板数和分离度数值均系指符合检测的最低要求。
 - 应根据被测样品的性质，制备分离度试验用溶液，
 - 如：通过加热或光照得到含有异构体或降解物的混合溶液（例1、2、3），

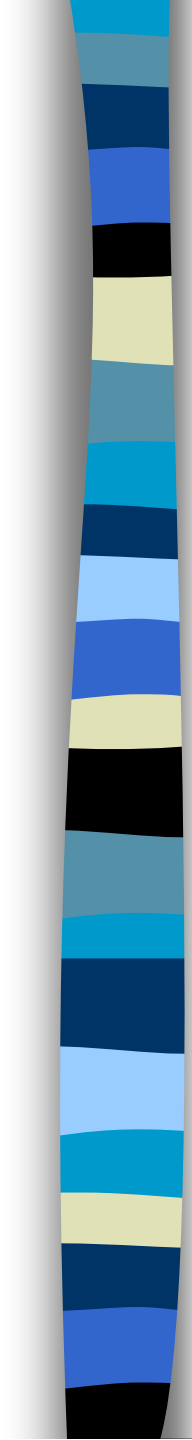
- 
- 或在样品中加入杂质对照品的混合溶液（例4、5、6）。
 - 或在样品中加入结构相似的同系物的混合溶液（例7），
 - 或样品与内标物质的混合溶液（例8）。

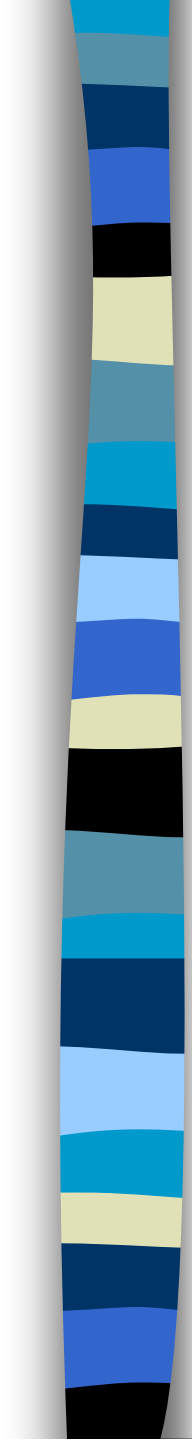
- 
- 通过**加热或光照**得到含有异构体或降解物的混合溶液（例1、2、3），
 - 例1. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。
 - 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以pH3.4醋酸盐缓冲液（取0.1mol/L醋酸钠溶液50ml，加0.1mol/L醋酸溶液至1000ml）-乙腈（10：1）为流动相；检测波长为254nm。

- 
- 取头孢呋辛对照品适量，加水溶解并稀释成每1ml中含100 μg的溶液。取上述溶液适量，在60℃水浴中加热10分钟，冷却，使部分头孢呋辛转变为去氨基甲酰头孢呋辛，取20 μl注入液相色谱仪，记录色谱图，头孢呋辛峰与去氨基甲酰头孢呋辛峰的分离度应不小于2.0。

- 
- 测定法 取本品约50mg，精密称定，置100ml量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取20 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图；另取头孢呋辛对照品适量，同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中 $C_{16}H_{16}N_4O_8S$ 的含量。

- （头孢呋辛钠）

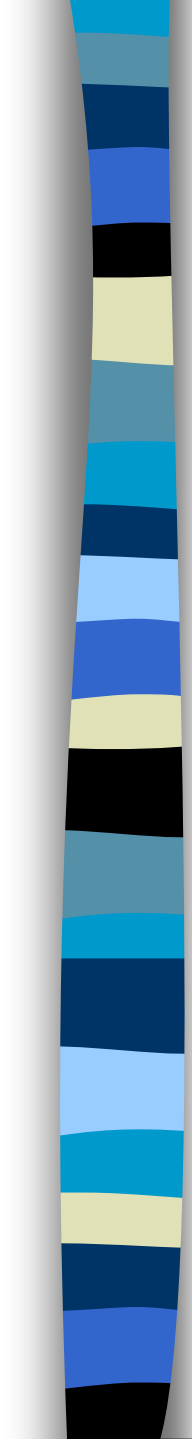
- 
- 例2. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。
 - 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以0.02mol/L正辛胺溶液-乙腈（73：27），并用磷酸调节pH值至6.5为流动相；检测波长为254nm。称取经紫外光照射24小时的本品适量，加流动相溶解并稀释制成每1ml中含0.22mg的溶液，取20 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图，头孢曲松峰和头孢曲松反式异构体峰间的分离度应不小于6.0。

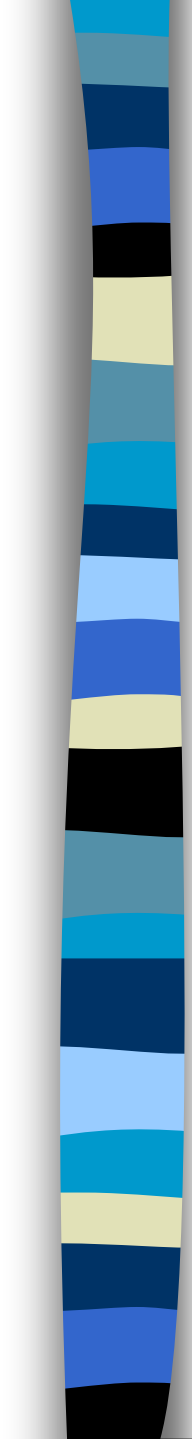
- 
- **测定法** 取本品约22mg，精密称定，置100ml量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取20 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图；另取头孢曲松对照品适量，同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中 $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$ 的含量。

(头孢曲松钠)

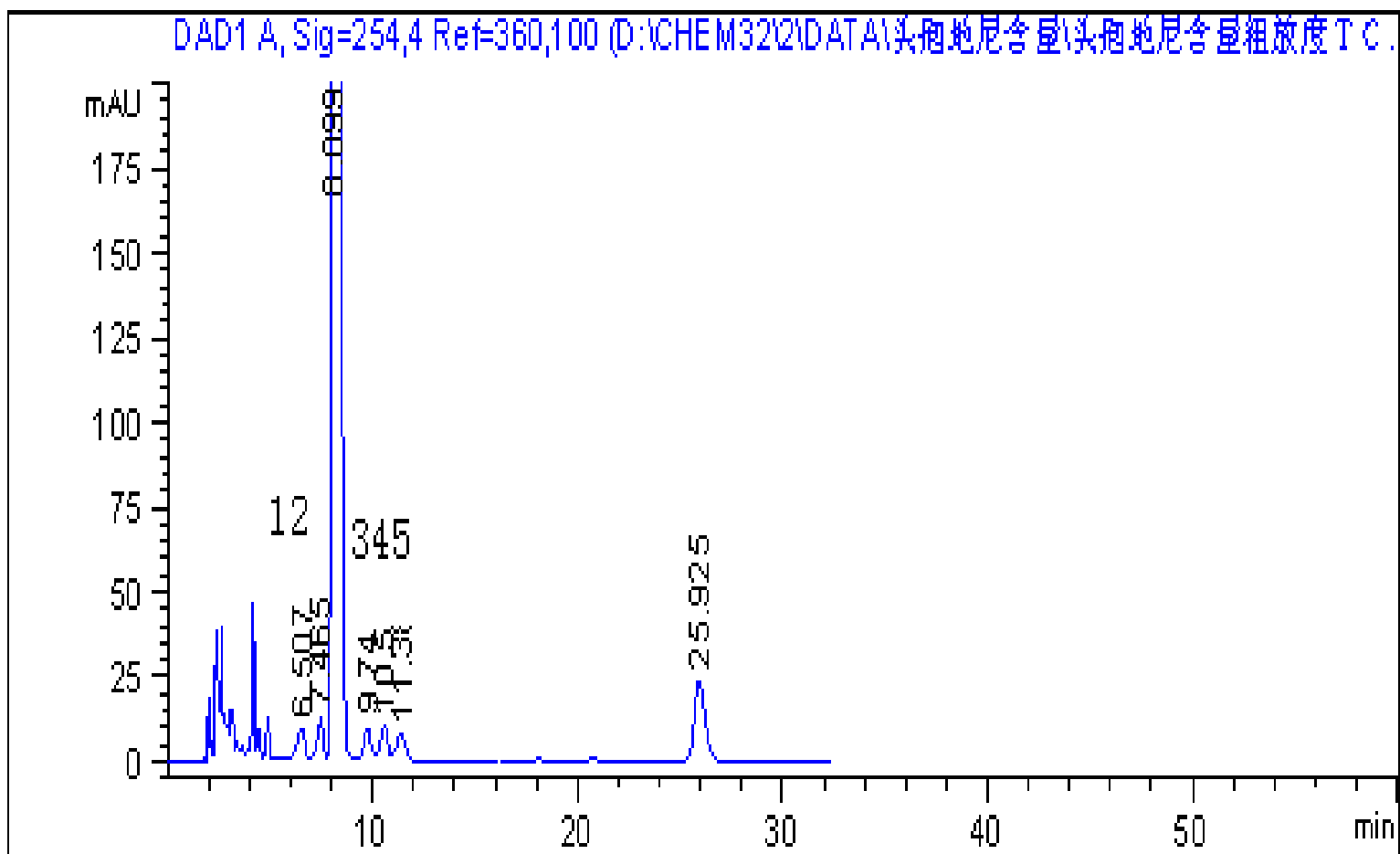
例3. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。

- 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以**0.25%**四甲基氢氧化铵溶液（用磷酸调节pH值至**5.5**）-乙腈-甲醇（**900：60：40**），每**1000ml**中加入**0.1mol/L**乙二胺四醋酸二钠溶液**0.4ml**为流动相，检测波长为**254nm**。取头孢地尼对照品约**20mg**置**100ml**量瓶中，加**0.1mol/L**磷酸盐缓冲液**2ml**溶解后，加流动相稀释至刻度，摇匀，

- 
- 在水浴中加热不少于**30分钟**，放冷至室温，得每**1ml**中约含**0.2mg**头孢地尼与其降解杂质的混合溶液（其中相对保留时间**0.9**与**1.2**处杂质的含量各约为**2%**），取**20 μ l**注入液相色谱仪，记录色谱图，主成分头孢地尼峰保留时间约为**8分钟**，**E-异构体**峰保留时间约为头孢地尼峰保留时间的**3.5倍**，理论板数按头孢地尼峰计算不低于**2000**，**头孢地尼峰**与其相对保留时间**0.9**和**1.2**处杂质峰的分离度均应不小于**1.2**。

- 
- **测定法** 取本品约**20mg**，精密称定，置**100ml**棕色量瓶中，加**0.1mol/L**磷酸盐缓冲液**2ml**溶解后用流动相稀释至刻度，摇匀，精密量取**20μl**注入液相色谱仪，记录色谱图；另取头孢地尼对照品适量，同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中**C₁₄H₁₃N₅O₅S₂**的含量。

■ (头孢地尼)



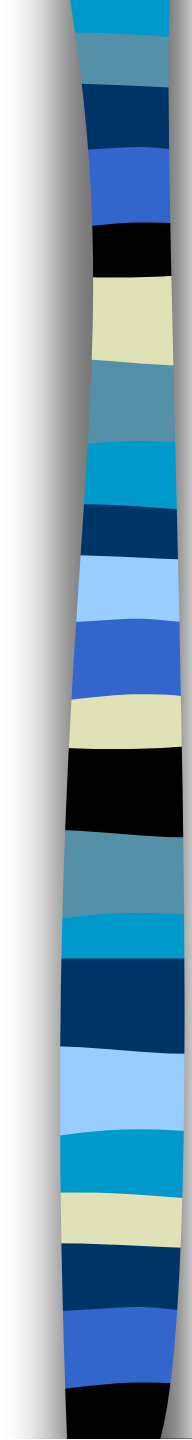
头孢地尼分离度色谱图

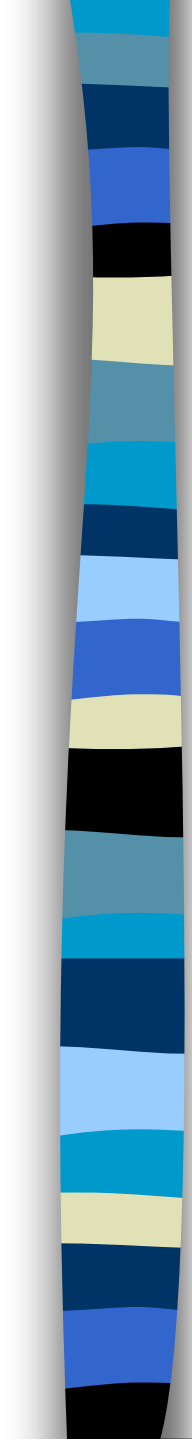


- 或在样品中加入杂质对照品的混合溶液
(例4、5.6)

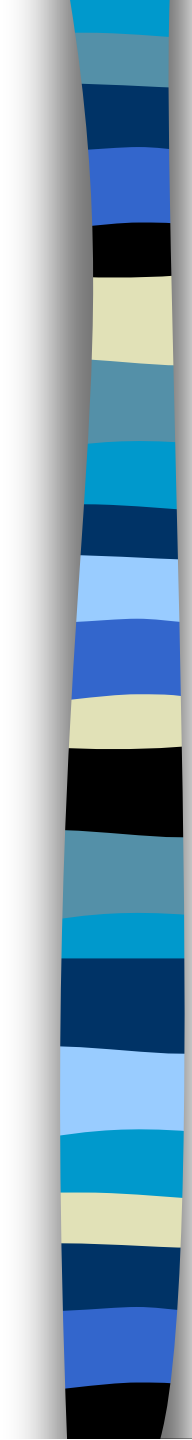
- 例4. 照高效液相色谱法(附录VD)测定。

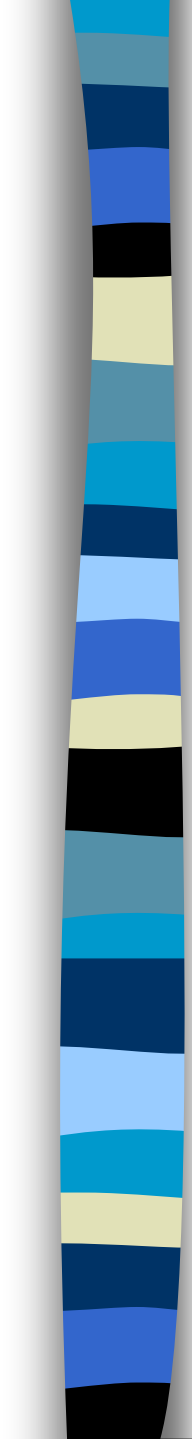
- 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以三乙胺醋酸溶液(取三乙胺14ml与冰醋酸5.7ml,加水稀释至100ml,摇匀)-乙腈-水(1.2:180:820),并用冰醋酸调节pH值至 3.0 ± 0.2 为流动相;检测波长为254nm。

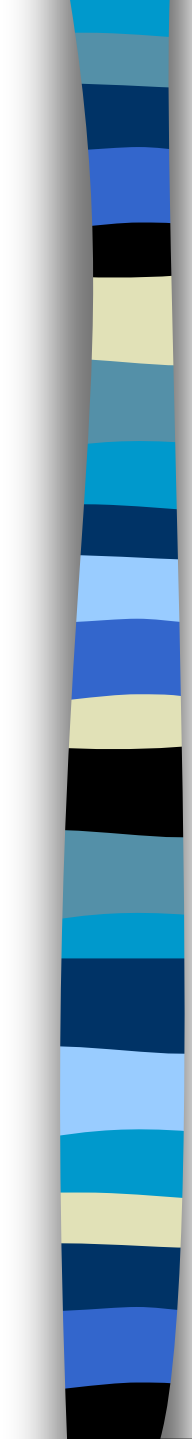
- 
- 取**头孢哌酮对照品**、**头孢哌酮杂质A对照品**（先以乙腈溶解）及**头孢哌酮S异构体对照品**适量，用少量磷酸盐缓冲液（取**0.2mol/L磷酸二氢钠溶液39.0ml**与**0.2mol/L磷酸氢二钠溶液61.0ml**，混匀，用磷酸调节pH值至**7.0**）溶解，再加流动相稀释制成每**1ml**中各含**0.2mg**的混合溶液，取**20μl**注入液相色谱仪，按**头孢哌酮杂质A、头孢哌酮和头孢哌酮S异构体**的顺序出峰，各峰间的分离度均应符合要求。

- 
- **测定法** 取本品约50mg，精密称定，置100ml量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取20 μl注入液相色谱仪，记录色谱图；另取头孢哌酮对照品，先加上述磷酸盐缓冲液适量助溶后，再用流动相定量稀释成每1ml中含0.5mg的溶液，同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中 $C_{25}H_{27}N_9O_8S_2$ 的含量。

(头孢哌酮)

- 
- **例6. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。**
 - **色谱条件与系统适用性试验** 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以磷酸二氢钾溶液（取磷酸二氢钾**6.8g**，加水溶解并稀释至**1000ml**，用磷酸调节pH值至**3.4**）-乙腈（**92：8**）为流动相；流速为每分钟**1ml**；检测波长为**254nm**。

- 
- 同时精密称取**头孢克洛对照品及头孢克洛 δ -3异构体对照品**适量，加流动相溶解并制成每1ml中分别含头孢克洛及头孢克洛 δ -3异构体约**0.2mg**的混合溶液，取20 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图，**头孢克洛峰与头孢克洛 δ -3异构体峰**的分离度应符合要求。理论板数按头孢克洛峰计算不低于**1500**。

- 
- **测定法** 取本品约**20mg**，精密称定，置**100ml**量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取**20μl**注入液相色谱仪，记录色谱图；另取头孢克洛对照品适量，同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中 $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$ 的含量。

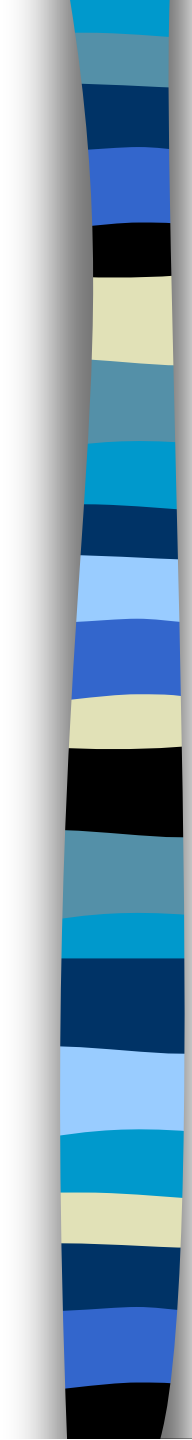
■ (头孢克洛)



- 或在样品中加入结构相似的同系物的混合溶液（例7）

- 例7. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。

- 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以乙腈-水（36：64）为流动相；检测波长为254nm。分别取醋酸可的松对照品与醋酸氢化可的松对照品适量，用乙腈溶解并稀释制成每1ml中各含10 μ g的溶液，进行测试，醋酸可的松峰与醋酸氢化可的松峰的分离度应大于4.0。

- 
- **测定法** 取本品适量，精密称定，用乙腈溶解并定量稀释制成每1ml中约含0.5mg的溶液，精密量取10 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图；另取醋酸可的松对照品适量，精密称定，同法测定，按外标法以峰面积计算，即得。

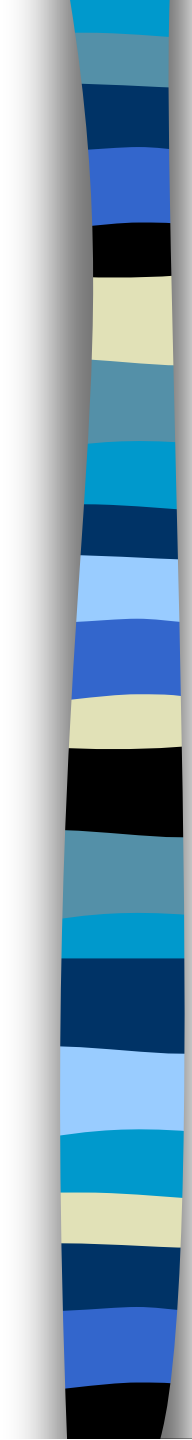
- （醋酸可的松）

或样品与**内标物质**的混合溶液（例8）。

例8. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。避光操作

色谱条件与系统适用性试验 用硅胶为填充剂；以石油醚（60~90℃）-正戊醇（2000：2.5）为流动相；检测波长为254nm。维生素K₁的**顺、反式异构体峰之间及顺式异构体峰与内标物质峰之间的分离度**应符合要求。

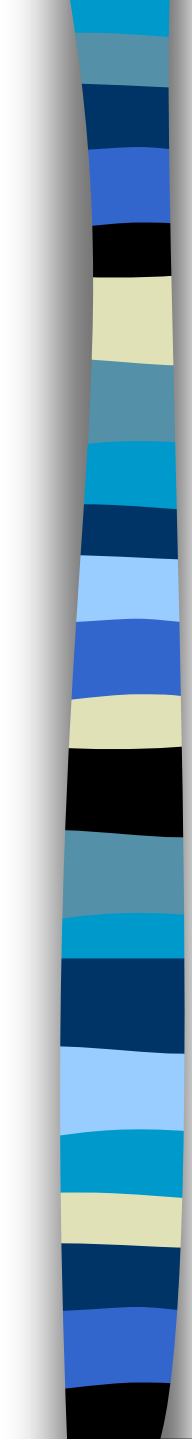
内标溶液的制备 取苯甲酸胆甾酯约37.5mg，置25ml量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

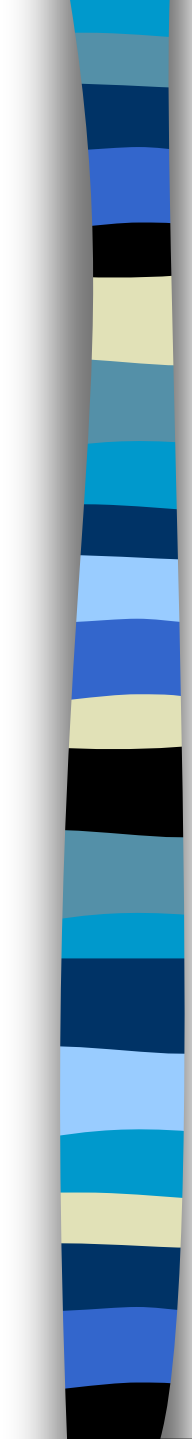
- 
- **测定法** 取本品约**20mg**，精密称定，置**50ml**量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取该溶液**5ml**与内标溶液**1ml**，置**10ml**量瓶中，以流动相稀释至刻度，摇匀，取**10 μ l**注入液相色谱仪，记录色谱图；另取维生素K₁对照品适量，精密称定，同法测定。按内标法以顺、反异构体峰面积的和计算，即得。

■ (维生素K)

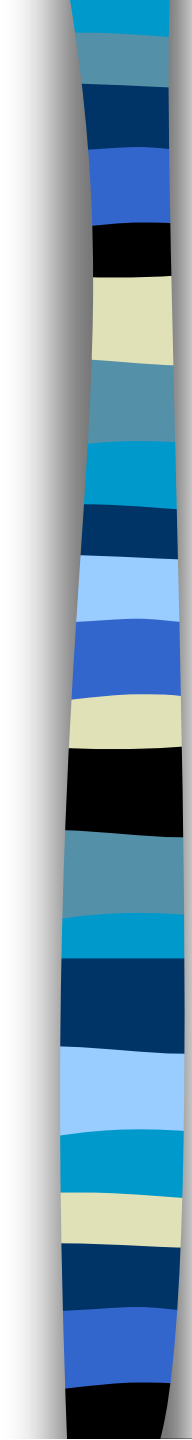
• 组分测定

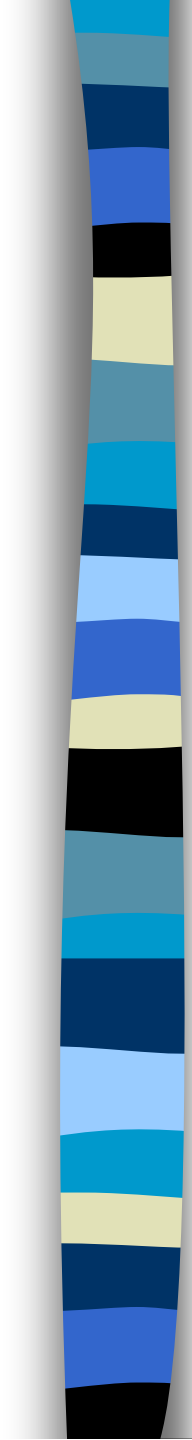
- 例2. 吉他霉素组分 照高效液相色谱法（附录VD）测定。
- 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以0.1mol/L醋酸铵溶液-甲醇-乙腈（40：55：5）为流动相；柱温60℃；检测波长为231nm。理论板数按吉他霉素A₅组分峰计算不低于3000，A₅组分峰与相邻杂质峰的分离度应大于1.0。

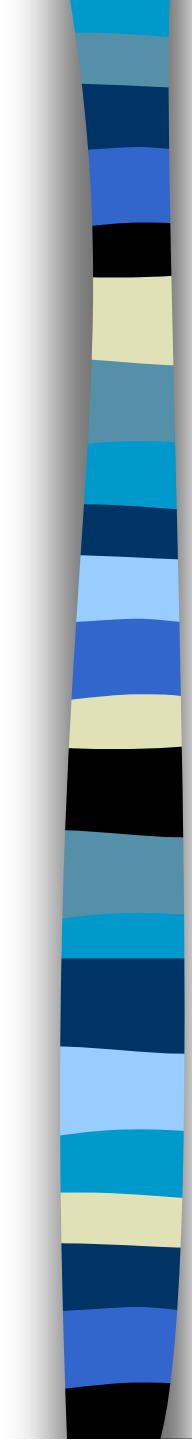
- 
- **测定法** 取本品适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成每1ml中约含吉他霉素2mg的溶液，作为供试品溶液；精密量取10 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图；另取吉他霉素对照品，加流动相溶解并定量稀释制成每1ml中约含吉他霉素2mg的溶液，作为对照品溶液（1）；取5ml，置25ml量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液（2）。取对照品溶液（1）、（2），同法测定。

- 
- 吉他霉素主组分出峰顺序依次为 A_9 、 A_8 、 A_7 、 A_6 、 A_5 、 A_4 、 A_1 、 A_3 、 A_{13} 。按外标法以吉他霉素 A_5 的峰面积计算，吉他霉素 A_5 应为35%~70%， A_4 应为5%~25%， A_1 、 A_{13} 均应为3%~15%；吉他霉素主组分 A_9 、 A_8 、 A_7 、 A_6 、 A_5 、 A_4 、 A_1 、 A_3 、 A_{13} 之和不得少于85%。

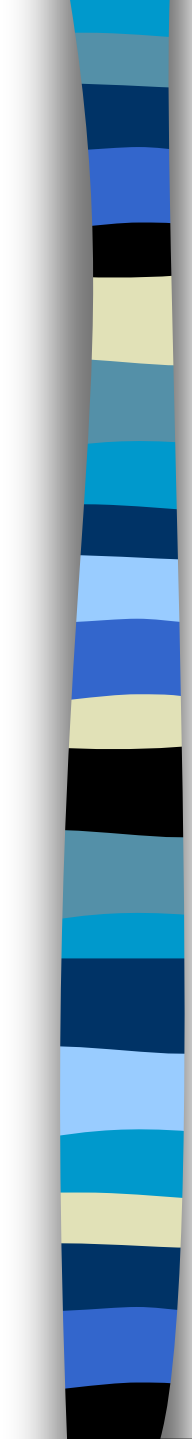
（吉他霉素）

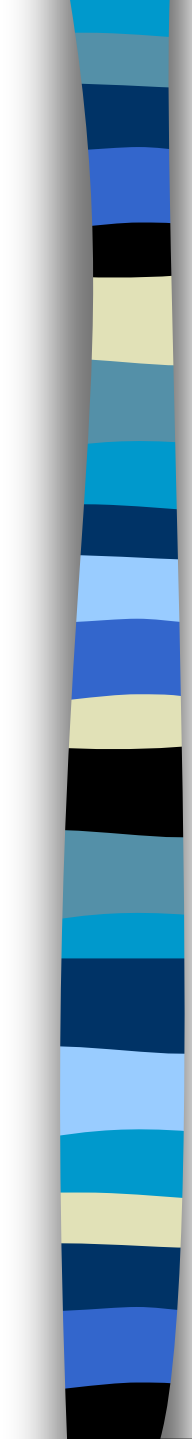
- 
- 例3. 红霉素A组分 照高效液相色谱法（附录VD）测定。
 - 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以0.2mol/L磷酸铵缓冲液（取磷酸二氢铵1.15g，加水50ml溶解，用三乙胺调节pH值至6.5）-0.2mol/L四甲基氢氧化铵溶液（取25%四甲基氢氧化铵14.6ml，加水100ml，用磷酸调节pH值至6.5，再加水稀释至200ml）-乙腈-水（5：20：30：45）为流动相；检测波长为215nm。

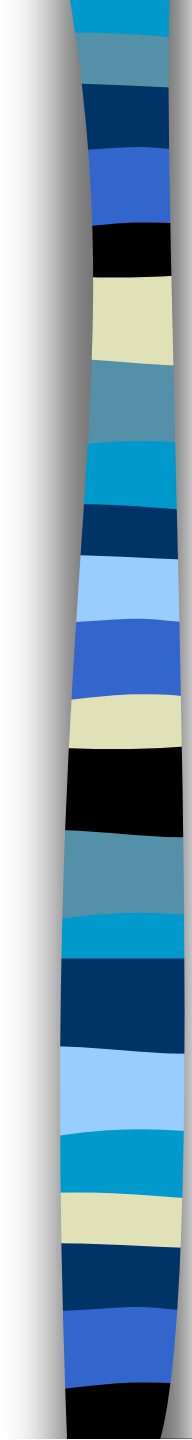
- 
- 取红霉素标准品10mg，置10ml量瓶中，加甲醇5ml溶解后，用磷酸盐缓冲液〔取磷酸盐缓冲液（pH 7.0）20ml，用磷酸溶液调节pH值至3.5〕稀释至刻度，室温放置30分钟以上，取20 μ l注入液相色谱仪。按红霉素C峰、红霉素A峰、红霉素B峰和红霉素烯醇醚峰的顺序出峰，红霉素A峰与红霉素烯醇醚峰（保留时间约为红霉素A峰保留时间的3.5倍）的分离度应大于14.0，红霉素A峰的拖尾因子应小于2.5。

- 
- **测定法** 取本品和红霉素标准品各约**0.1g**，精密称定，分别加甲醇**5ml**溶解，用磷酸盐缓冲液（**pH 7.0**）-甲醇（**15：1**）定量稀释制成每**1ml**中约含**4mg**的溶液，分别作为供试品溶液和标准品溶液；精密量取供试品溶液与标准品溶液各**20μl**，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算供试品中红霉素**A**的含量。按无水物计算，不得少于**88.0%**。

■ （红霉素）

- 
- **例4. 小诺霉素组分 照高效液相色谱法（附录VD）测定。**
 - **色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（pH值范围为0.8~8.0）；以0.2mol/L三氟醋酸-甲醇（94：6）为流动相；流速为每分钟0.6ml；用蒸发光散射检测器检测（参考条件：漂移管温度110℃，载气流速为每分钟2.8L）。**

- 
- 分别称取庆大霉素C_{1a}对照品与小诺霉素标准品适量，用水制成每1ml中各含0.2mg的溶液，取20μl注入液相色谱仪，记录色谱图，庆大霉素C_{1a}峰和小诺霉素峰之间的分离度应符合要求。连续进样5次测试，小诺霉素峰面积的相对标准偏差应不大于2.0%。

- 
- 测定法 取小诺霉素标准品适量，精密称定，分别用水溶解并定量制成每1ml中约含小诺霉素0.2mg、0.5mg和1.0mg的溶液为标准品溶液（1）、（2）、（3）。
 - 精密量取上述三种溶液各20 μ l，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，以标准品溶液浓度的对数值与相应的峰面积对数值计算回归方程，相关系数（r）应不小于0.99；另取本品适量，精密称定，用水溶解并定量稀释制成每1ml中约含0.4mg的溶液，同法测定，用回归方程计算供试品中C₂₀H₄₁N₅O₇的含量，应不低于85.0%。

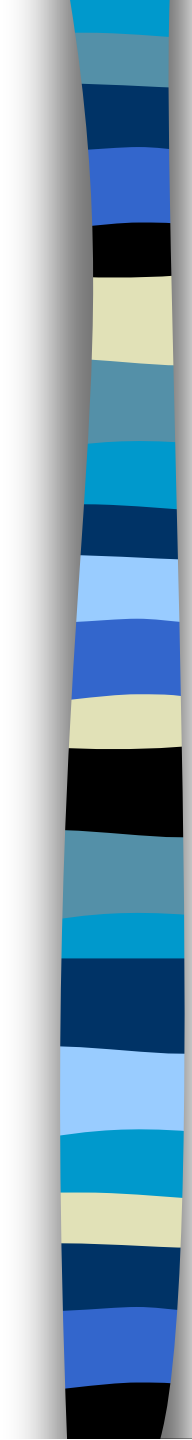
■ （硫酸小诺霉素）



■ 3 紫外-可见分光光度法

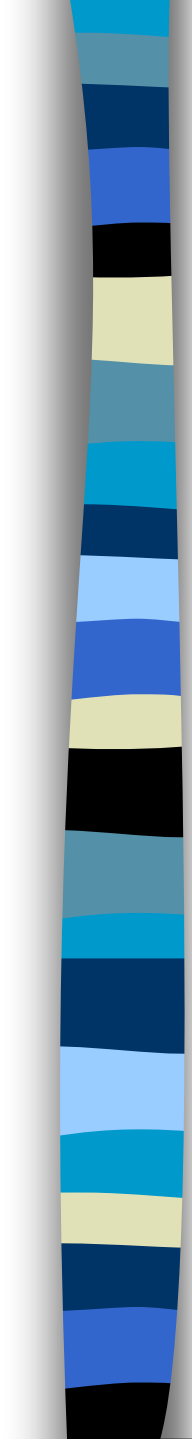
■ 3.1 主要用于制剂的含量测定、含量均匀度或溶出度检查，并尽可能采用吸收系数法。新吸收系数应经充分验证后方可采用，若已为药典收载，则可直接引用，应注意所溶剂必须一致。

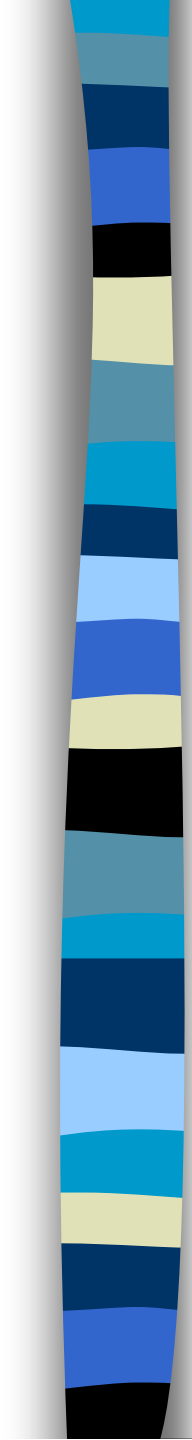
■ 3.2 原料药含量测定如采用紫外-可见分光光度法，应采用测定精度较高的对照品比较法。



- 3.3 计算分光光度法应慎用，作为法定方法原则上不宜采用，含量测定一般不得采用此法。

- 3.4 用于鉴别时，可规定除末端吸收以外的最大吸收波长，不同波长处的吸光度比值，有时也辅以最小吸收波长或肩峰。吸光度比值或杂质最大吸收波长处的吸光度限值也可用于药品的纯度检查。

- 
- 3.5 采用UV法应尽可能少使用有机溶剂，尤其应避免使用有毒溶剂；
 - UV法用于不同项目测定时，应尽可能采用相同的溶剂，以方便吸收系数的使用。

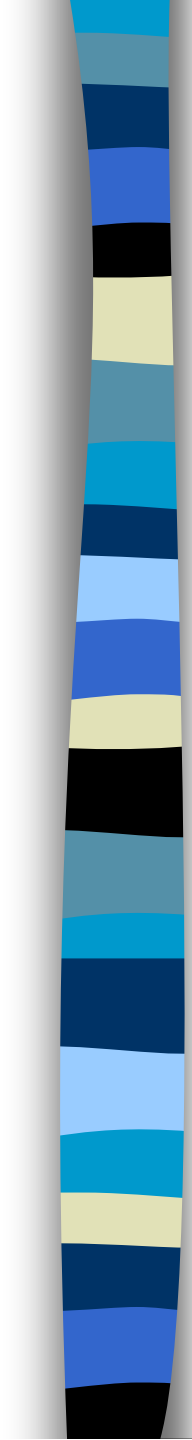


- 3.6 为提高UV法的准确度，应避免溶剂、辅料或杂质的干扰。溶剂的选用应注意其纯度和使用的截止波长。

- 仪器的狭缝宽度，如另有规定外系指2nm，但若所测吸收谱带的半高宽小于20nm，则应适当减小狭缝宽度。

- 当溶液的pH值对吸光度有影响（当制剂的辅料对pH值有影响）时，应见供试品溶液和对照品溶液的pH值调成一致。

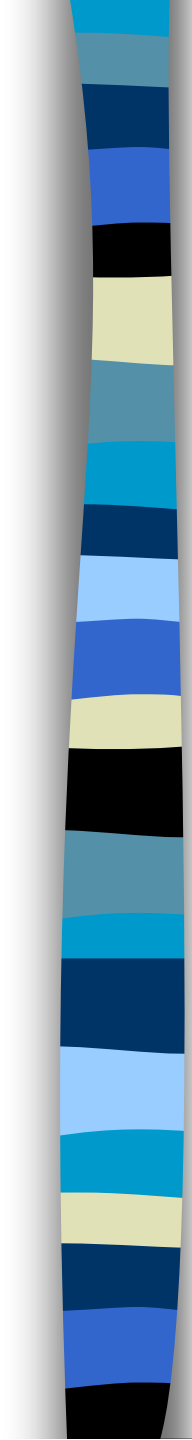


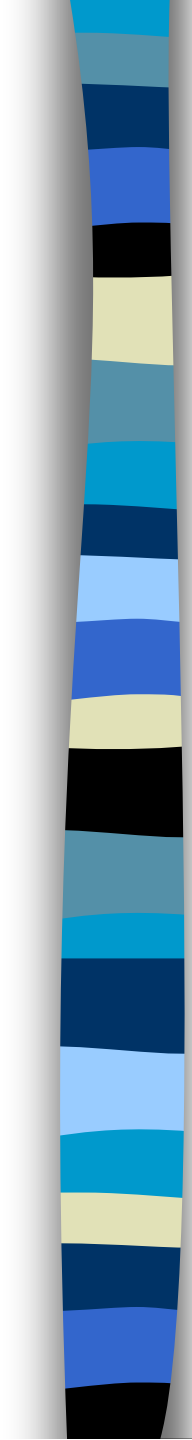
- 
- 用于测定的吸收谱带的吸收强度应足够大，其吸收系数通常应大于100，吸光度数值以在0.3~0.7为宜，过大或过小均可导致测定误差的增加。
 - 3.8 采用比色法测定时，应注意加入显色剂后影响深浅的各种因素，并注意操作过程的一致性，当吸光度与浓度的关系偏离线性时应采用标准曲线法。

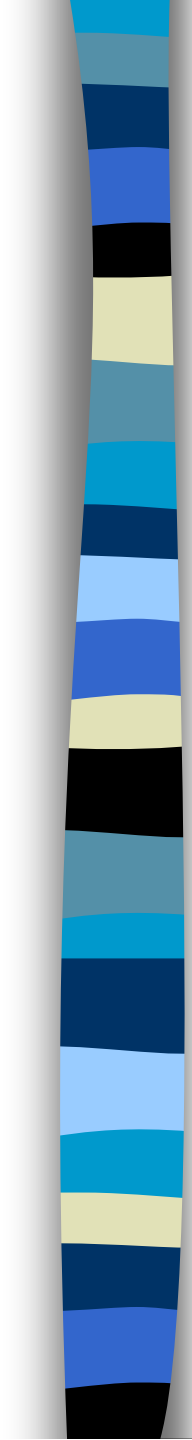


■ 3.9 紫外-可见光分光光度法应用

- 常用对照品比较法、吸收系数和比色法进行含量测定。
- 用分光光度计测定溶液的吸光度时，由于操作等原因，在不同实验室或不同仪器之间，对同一供试液测得的吸光度往往有较大的偏差，其相对标准偏差约为0.5~1.5%。因此，对于原料药的含量测定，紫外-可见光分光光度法，尤其是“吸收系数法”，不应是首选的方法；
- 必要时，可考虑用与对照品同时测定进行比较，以改善由于仪器而引入的误差，但所用对照品应具有纯度高、杂质干扰少、制备方便和稳定性好等条件。

- 
- 比色法用于原料药的含量测定时，有与对照品比较法和吸收系数法相类似的缺陷，且其对操作条件的要求更为严格；
 - 但因其显色具有专属性，且受杂质的干扰较少，因此在不能直接应用紫外-可见分光光度法时，可考虑选用本法（例4）。

- 
- 在方法叙述中，有关供试液的制备，除必须给出溶剂名称外，一般采用“定量稀释制成每1ml中约含xx μ g的溶液”，而不规定供试量与容器及其稀释方法（例1和2），
 - 其浓度应能满足测得的吸光度介于0.3~0.7；个别品种，因其情况特殊，也可详尽叙述（例3）。

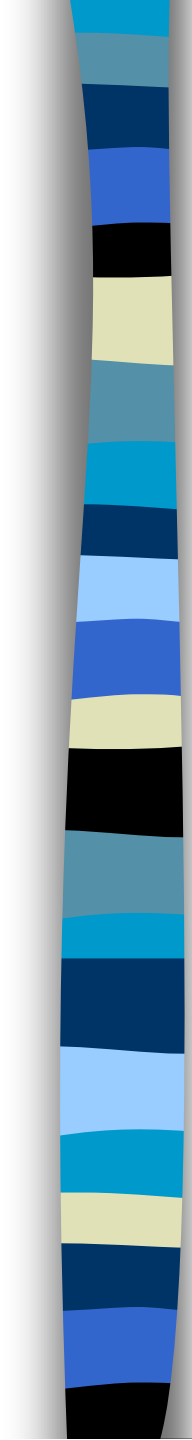
- 
- 测定波长必须明确给出；采用比色法测定时，由于各试剂的加入量、加入次序、反应温度和显色时间等多方面因素均可直接影响测定的结果，因此方法应详尽叙述（例4）；
 - 采用吸收系数法时，还应给出 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 值，采用三位有效数字。 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 值小于100，一般不宜采用。



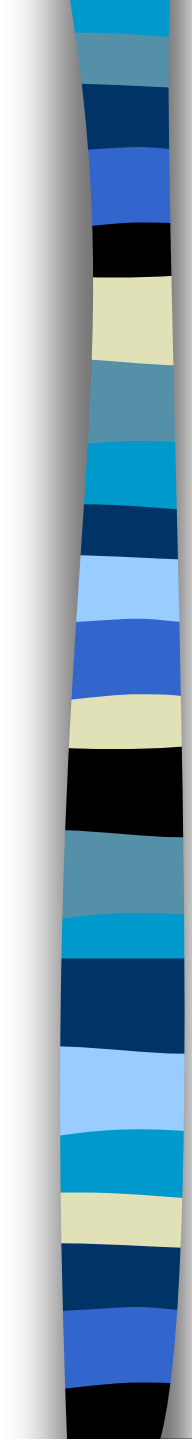
- 举例如下：

- 例1 取本品，精密称定，加乙醇溶解并定量稀释制成每1ml中约含10 μg的溶液，照紫外-可见光分光光度法（附录xx），在285nm波长处测定吸光度；另取卡马西平对照品，同时测定，计算，即得。

- (卡马西平)

- 
- 例2 取本品，精密称定，加盐酸溶液（9→1000）溶解并定量稀释制成每1ml中约含5 μg的溶液，照紫外-可见分光光度法（附录xx），在325nm的波长处测定吸收度，按 $C_5H_4N_4S$ 的吸收系数（ $E_{1cm}^{1\%}$ ）为1265计算，即得。

■ (巯嘌呤)

- 
- 例3 避光操作。取本品约75mg，精密称定，置烧杯中，加冰醋酸1ml与水75ml，加热溶解后，加水稀释，放冷，移置500ml量瓶中，再加水稀释至刻度，摇匀；精密量取10ml，置100ml量瓶中，加1.4%醋酸钠溶液7ml，并用水稀释至刻度，摇匀，照紫外-可见光分光光度法（附录xx），在444nm的波长处测定吸光度，按 $C_{17}H_{20}N_4O_6$ 的吸收系数（ $E_{1cm}^{1\%}$ ）为323计算，即得。
(维生素B2)

例4. 取本品适量，精密称定，加无醛乙醇溶解并定量稀释制成每1ml中约含35 μ g的溶液，精密量取10ml，置25ml量瓶中，加氯化三苯四氮唑试液2ml，在氮气流下，迅速加入氢氧化四甲基铵试液2ml，通氮气后，密塞，摇匀，于30 $^{\circ}$ C水浴中放置1小时，迅速冷却，用无醛乙醇稀释至刻度，摇匀，照紫外-可见分光光度法（附录××），在485nm的波长处测定吸光度；另取醋酸去氧皮质酮对照品适量，精密称定，同法测定，计算，即得。

（醋酸去氧皮质酮）



- **4. 抗生素微生物检定法**

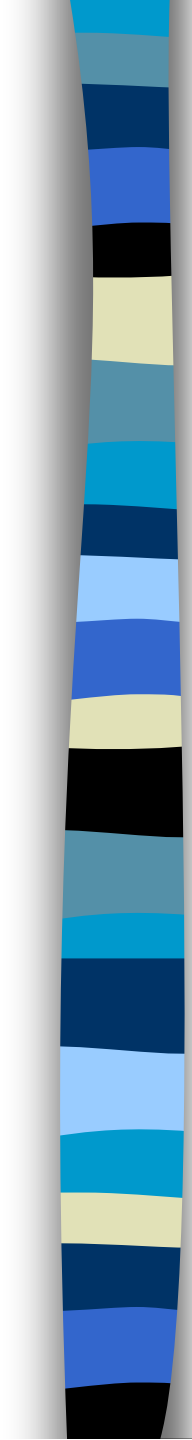
- 本法可用于抗生素药物的效价（含量）测定。系在适宜条件下，通过检测抗生素对微生物的抑制作用，计算抗生素的活性（效价）的方法。

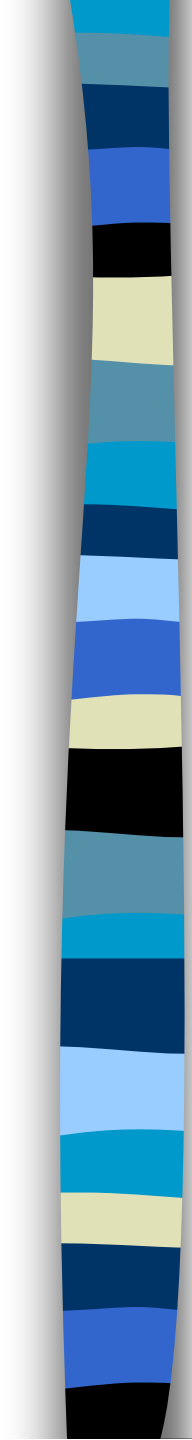
- 依试验设计原理不同，可分为管碟法和浊度法



4.1. 管碟法

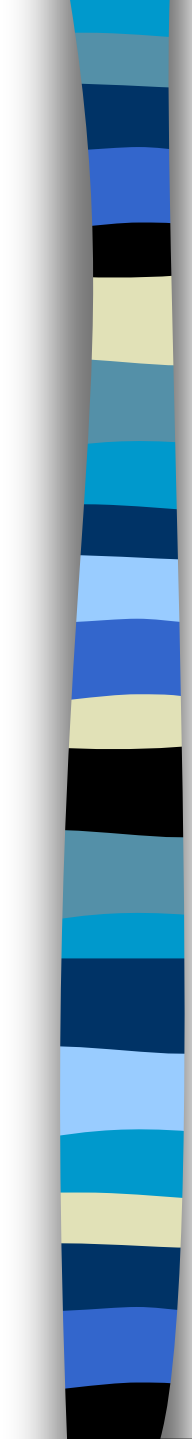
- 是利用抗生素在摊布含特定试验菌的固体培养基内成球面形扩散，形成含一定浓度抗生素的球形区，抑制了试验菌的繁殖而呈现出透明抑菌圈。
- 此法系根据抗生素在一定浓度范围内，对数剂量与抑菌圈直径（面积）呈直线关系而设计，通过检测抗生素对微生物的抑制作用，比较标准品与供试品产生抑菌圈的大小，计算供试品的效价。

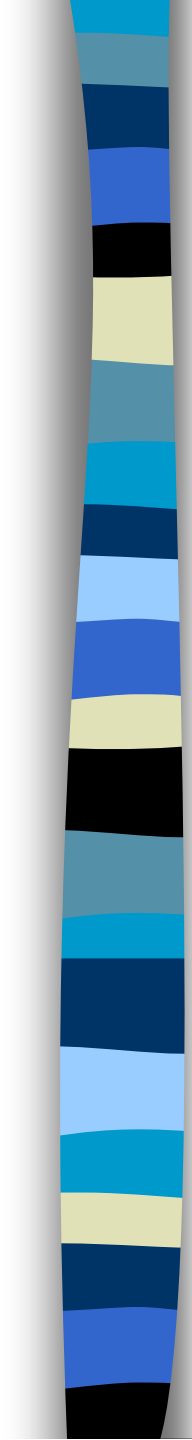
- 
- **4.2.** 浊度法是将一定量的抗生素加至含有试验菌的液体培养基内，混匀后，经培养，测定培养基的浊度值，比较标准品与供试品对试验菌生长抑制的程度，计算出供试品的效价。
 - **4.3.** 根据抗生素药品的抗菌谱，选择合适的试验菌与培养基，首选药典附录 X I 中已列出的试验菌与培养基，如经试验用不合适时，再改选其他的试验菌和培养基。



- **4.4** 多组分抗生素在选择试验菌时，应选择对各组分敏感性相近的菌种作为试验菌。

- **4.5** 管碟法应根据对数剂量与抑菌圈直径（面积）的关系，规定抗生素的浓度范围，并在此范围内得到的抑菌圈直径能符合药典附录X I 项下的要求。

- 
- **4.6** 浊度法应规定抗生素的浓度范围，在此范围内符合剂量反应的线性要求。采用标准曲线法时，以线性浓度中间值作为中间浓度，至少选**5**个剂量浓度，剂量比通常为**1: 1.25**。

- 
- 4.7 用本方法测定含量时，均应对结果进行可靠性测验和可信限率计算，一般可信限率不得大于**5%**。
 - 4.8 抗生素效价以“单位（ μ ）或微克（mg）”表示。

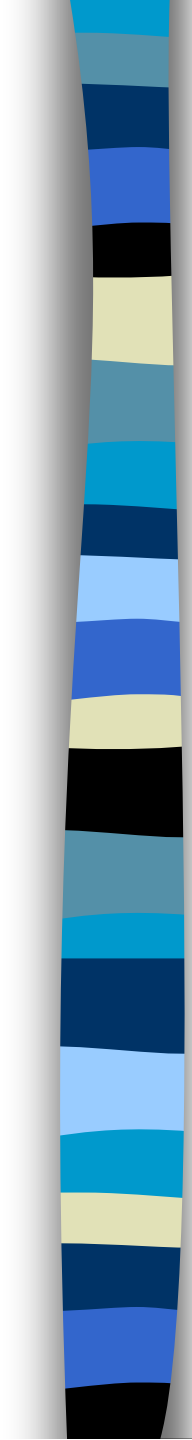
■ 4.9 微生物检定法应用

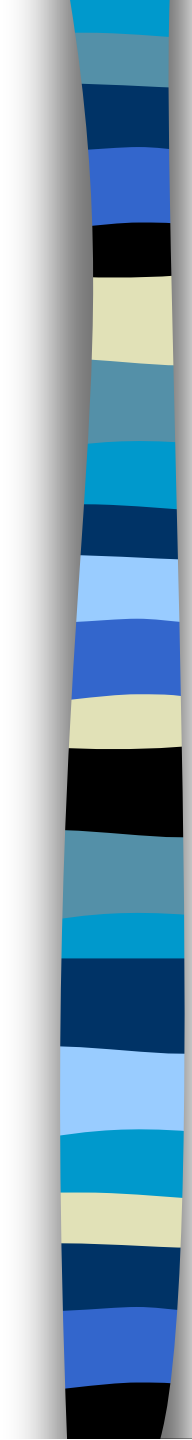
- 例1. 精密称取本品适量，加乙醇（按琥乙红霉素每10mg加乙醇4ml）溶解后，用磷酸盐缓冲液（pH7.8）制成每1ml中约含500单位的溶液，室温放置16小时或40℃放置6小时，使水解完全；另取红霉素标准品约25mg，精密称定，加乙醇12.5ml使溶解后，用磷酸盐缓冲液（pH7.8）制成每1ml中含500单位的溶液，照抗生素微生物检定法红霉素项下（附录XI A）测定。1000红霉素单位相当于1mg的 $C_{37}H_{67}NO_{13}$ 。
 - （琥乙红霉素）

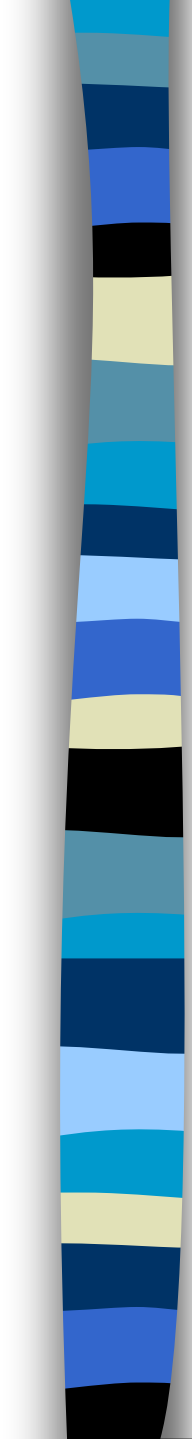


■ 二.制剂的含量测定

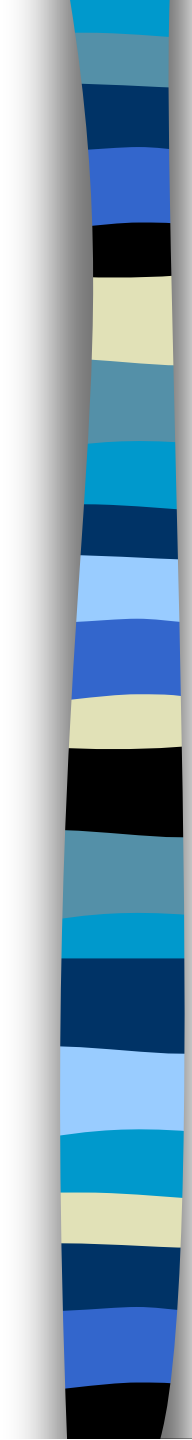
- 在制剂的质量标准中，除个别品种外，均应制订含量测定方法，制剂的含量测定，首先应考虑测定方法的专属性，还应考虑操作简便，检测灵敏，适用于不同剂型等。
- 制剂含量测定结果最后是以标示量的百分数表示，但对制剂内容物中的有效成分纯度，尽可能在质量标准中做出规定，对于不加辅料的注射用粉针剂，必须有纯度的规定，以确保使用原料的纯度符合要求（例2）。

- 
- **例2.** 本品为头孢呋辛钠的无菌粉末。按无水物计算，含头孢呋辛（ $C_{16}H_{16}N_4O_8S$ ）不得少于**86.0%**；按平均装量计算，含头孢呋辛（ $C_{16}H_{16}N_4O_8S$ ）应为标示量的**90.0%~110.0%**。
 - **【含量测定】** 取装量差异项下的内容物，混合均匀，照头孢呋辛钠项下的方法测定，即得。
 - （注射用头孢呋辛钠）

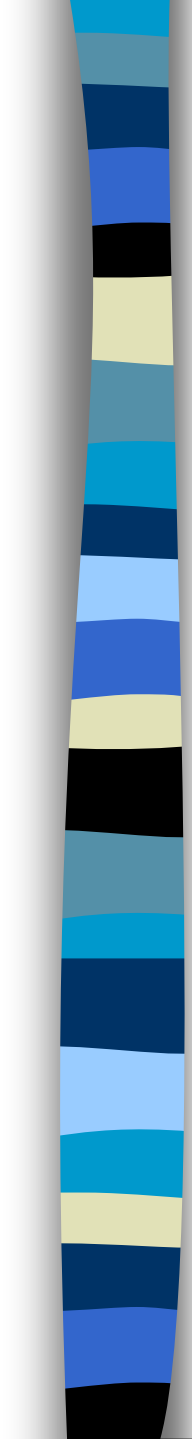
- 
- 1. 同原料药的测定方法，当其原料药的含量测定方法可不受制剂辅料的干扰，且较为简便时，制剂应首先选用与原料药相同的测定方法。文字叙述可在精密取样溶解（或稀释）之后，引用原料药方法（例1、2、3）。

- 
- 例1. 取本品**10片**，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于头孢克洛**100mg**），加流动相溶解并定量稀释制成每**1ml**中约含头孢克洛**0.2mg**的溶液（必要时可超声处理），摇匀，滤过，取续滤液，照头孢克洛项下的方法测定，即得。

- （头孢克洛片）

- 
- **例3.** 精密量取本品适量（约相当于磺胺醋酸钠**0.6g**），照磺胺醋酸钠含量测定项下的方法测定。每**1ml**亚硝酸钠滴定液（**0.1mol/L**）相当于**25.42mg**的 $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。

- （磺胺醋酸钠滴眼液）

- 
- 抗生素类药原料药纯度均以有效成分表示，与制剂规格中计算基准一致，而某些化学药品的原料药纯度表示与制剂规格中计算基准不一致时，应在最后给出换算因子。
 - 如氢化可的松琥珀酸钠规定为按干燥品计算含 $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NaO}_8$ 应为 **97.0%-102.0%**，而注射用氢化可的松琥珀酸钠规定为含氢化可的松琥珀酸钠按氢化可的松 ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$) 计算，氢化可的松琥珀酸钠与氢化可的松的换算因子为 **0.748**（例4）。

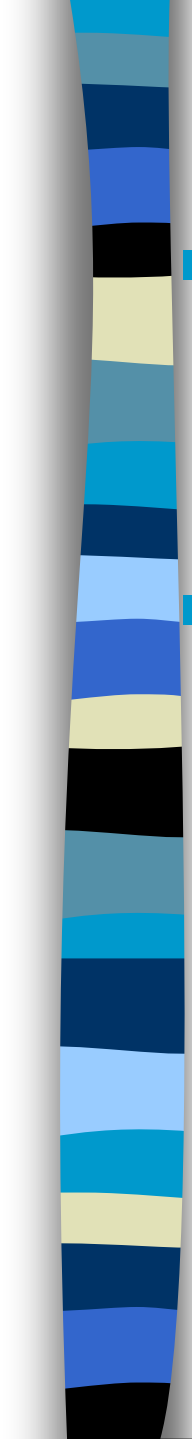
■ 例4. 本品为氢化可的松琥珀酸钠与磷酸盐缓冲液制成的无菌冻干品。含氢化可的松琥珀酸钠按氢化可的松 ($C_{21}H_{30}O_5$) 计算, 应为标示量的90.0%~110.0%。

■ 【含量测定】 照高效液相色谱法(附录VD)测定。

■ 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以甲醇-磷酸盐缓冲液(8mmol/L磷酸二氢钾溶液, 用8mmol/L磷酸氢二钾溶液调节pH值为5.00.1, 临用前新配)(43:57)为流动相, 检测波长为242nm。理论板数按氢化可的松琥珀酸钠峰计算不低于3000, 氢化可的松琥珀酸钠峰与氢化可的松峰的分离度应符合要求。

■ 测定法 取本品装量差异检查项下混合均匀的内容物适量，精密称定，加流动相溶解并稀释制成每1ml中约含0.04mg氢化可的松琥珀酸钠的溶液，精密量取20 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图，出峰顺序依次为17-氢化可的松琥珀酸钠、21-氢化可的松琥珀酸钠和游离氢化可的松；另取氢化可的松琥珀酸钠与氢化可的松对照品适量，精密称定，分别加流动相溶解并定量稀释制成每1ml中约含0.4mg和0.1mg的溶液，精密量取上述两种溶液各5ml，置同一50ml量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，同法测定。按外标法以峰面积计算，17-氢化可的松琥珀酸钠峰和21-氢化可的松琥珀酸钠峰面积总和，作为氢化可的松琥珀酸钠的峰面积计算，并乘以0.748，折合为氢化可的松的量与游离氢化可的松的量合并计算。

■ (注射用氢化可的松琥珀酸钠)



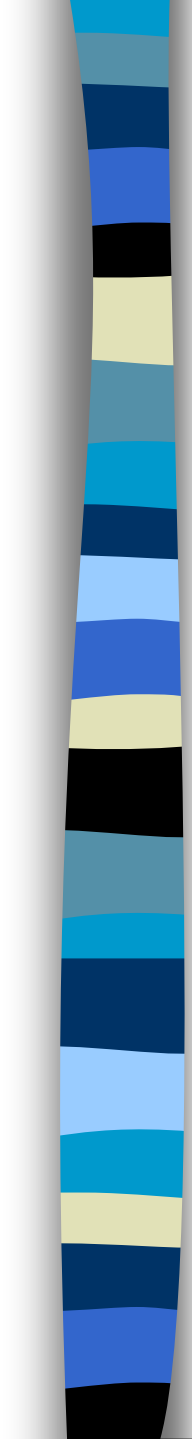
- 由于受剂型的限制或因制剂处方中共有辅料或附加剂，对制剂含量测定方法产生干扰时，应增加预处理方法。（例5、6）

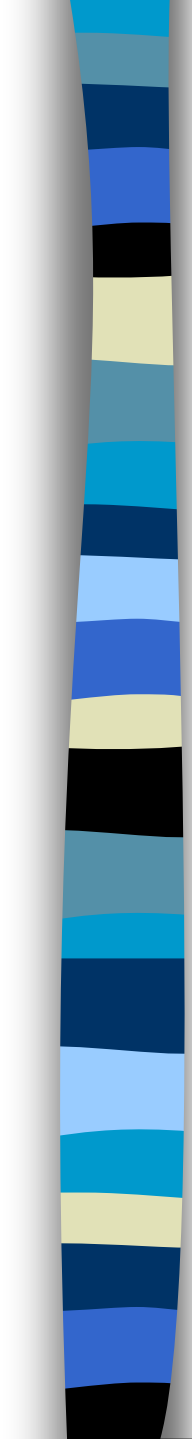
- 例5. 取本品约**2g**，精密称定，置分液漏斗中，加乙醚**25ml**，振摇使基质溶解，用**0.1mol/L**盐酸溶液提取**3**次，每次**10ml**，合并提取液，置**50ml**量瓶中，加水稀释至刻度，作为供试品溶液；另取盐酸金霉素对照品约**20mg**，精密称定，置**100ml**量瓶中，加**0.01mol/L**盐酸溶液使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。照盐酸金霉素项下的方法测定，即得。

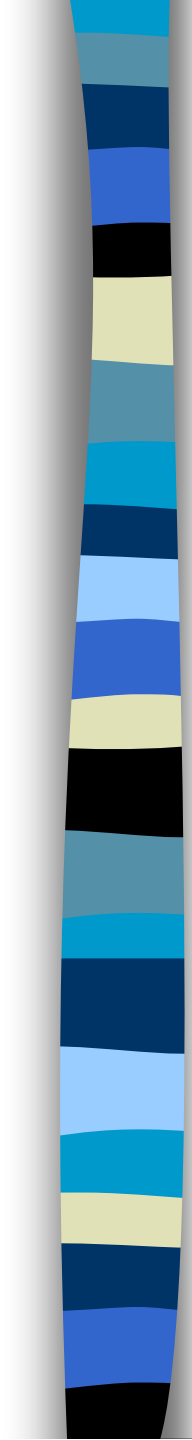
- （盐酸金霉素眼膏）

- **例6. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。**
- **色谱条件与系统适用性试验** 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-水（**66：34**）为流动相，检测波长为**240nm**，理论板数按醋酸地塞米松峰计算不低于**3500**。
- **测定法** 取本品适量（约相当于醋酸地塞米松**0.5mg**），精密称定，精密加甲醇**50ml**，用匀浆机以每分钟**9500**转搅拌**30**秒，置冰浴中放置**1**小时，经有机相滤膜（**0.45μm**）滤过，弃去初滤液**5ml**，精密量取续滤液**20μl**，注入液相色谱仪，记录色谱图；另取醋酸地塞米松对照品适量，精密称定，用甲醇溶解并定量稀释制成每**1ml**中约含**10μg**的溶液，同法测定，按外标法以峰面积计算，即得。

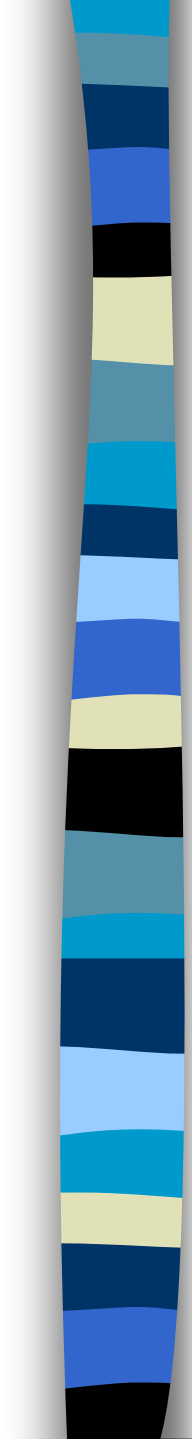
■ （醋酸地塞米松乳膏）

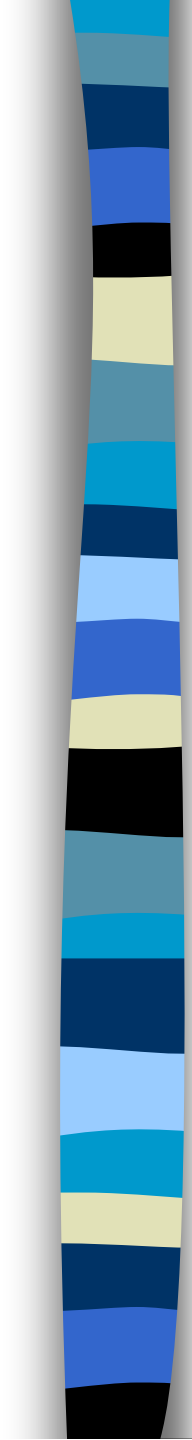
- 
- **2. 紫外-可见分光光度法** 因紫外-可见分光光度法具有操作简便、检测灵敏和适应性广的优点，可适用于各种制剂的含量测定；并可同时应用于含量均匀度和溶出度的测定，测定中，常用的为吸收系数（ $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ）法（例7）。
 - 当主药的分子结构中含有共轭体系、芳香环等发色基团，可在紫外区或可见区产生吸收，可考虑直接用吸收系数法或对照品比较法测定；

- 
- 为提高检测结果的准确度，在选用方法时，应充分考虑到辅料、共存物质和降解产物等对测定结果的干扰，可以选用共存物无干扰的测定波长进行测定，
 - 如盐酸氯丙嗪在**254nm**和**306nm**均有最大吸收，为了避免抗氧化剂维生素C在**254nm**的波长处的干扰，盐酸氯丙嗪注射液选用了**306nm**作为测定波长（例7）；

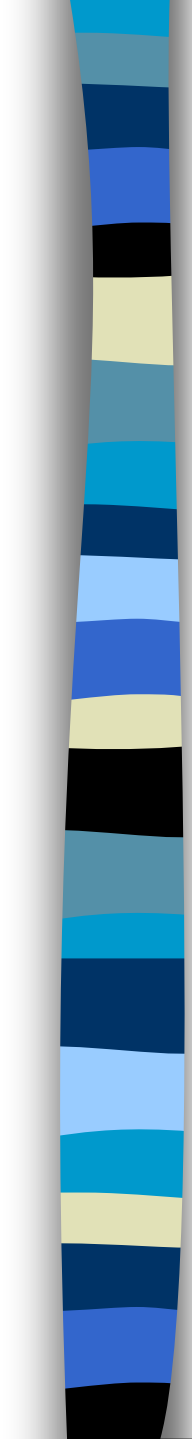
- 
- 例7. 避光操作。精密量取本品适量（约相当于盐酸氯丙嗪**50mg**），置**250ml**量瓶中，加盐酸溶液（**9→1000**）至刻度，摇匀，照紫外-可见分光光度法（附录××），在**306nm**的波长处测定吸光度，按 $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ 的吸收系数（ $E_{1cm}^{1\%}$ ）为**115**计算，即得。

- （盐酸氯丙嗪注射液）

- 
- 当主药本身在紫外-可见光区没有强吸收或制剂中的主药含量很小，为提高灵敏度，可加入适当的显色剂，采用比色法测定（例8）；

- 
- **例8.** 精密量取本品适量（约相当于马来酸麦角新碱**1.5mg**），至**25ml**量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，精密量取**1ml**，置具塞刻度试管中，精密加**1%**酒石酸溶液**1ml**与对二甲氨基苯甲醛试液**4ml**，摇匀，静置**5**分钟，照紫外-可见分光光度法（附录××），在**550nm**的波长处测定吸光度；另取马来酸麦角新碱对照品约**15mg**，精密称定，置**250ml**量瓶中，加**1%**酒石酸溶液适量使溶解并稀释至刻度，摇匀，同法测定，计算，即得。

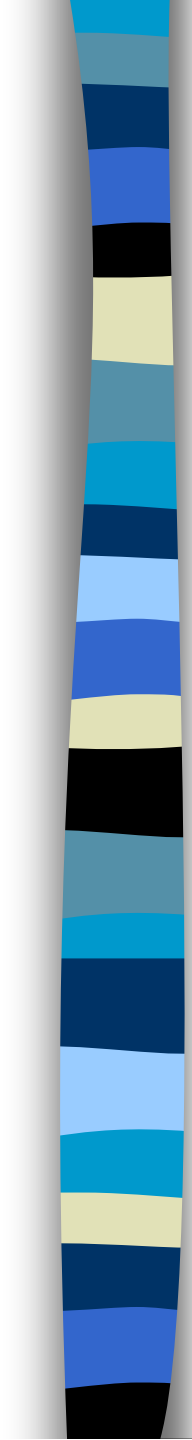
- （马来酸麦角新碱注射液）

- 
- 计算分光光度法由于影响因素多，不宜用于含量测定，



■ 3. 气相色谱法与高效液相色谱法

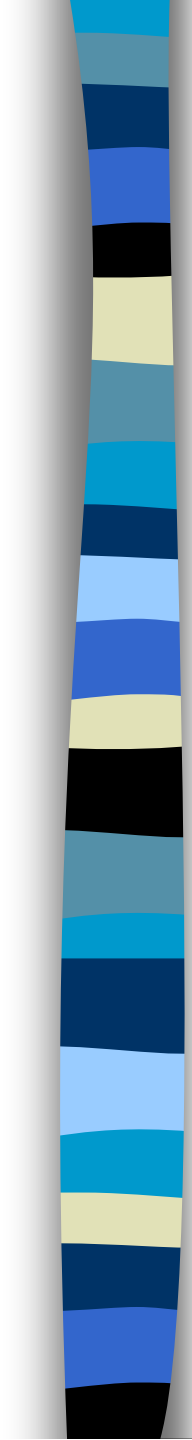
- 单方或复方制剂，或主药为多组分的制剂，或需先经过复杂的分离除去杂质和赋形剂的干扰才能进行测定的品种，可选用气相色谱法（例9）或高效液相色谱法（例10、11、12）。

- 
- **例9.** 精密量取本品**2ml**，置棕色具塞锥形瓶中，照维生素E含量测定项下的方法，精密加内标溶液**50ml**，密塞，摇匀，取**1~3 μ l**注入气相色谱仪，并依法测定校正因子，计算，即得。

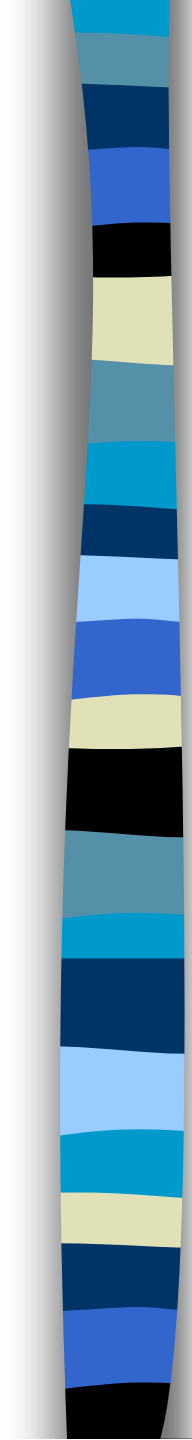
- （维生素E注射液）

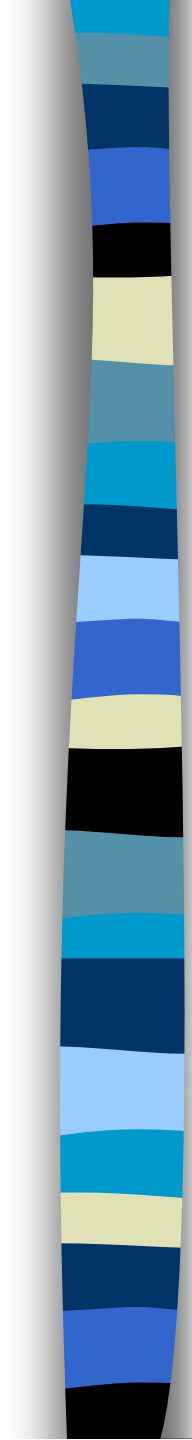
例10. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。

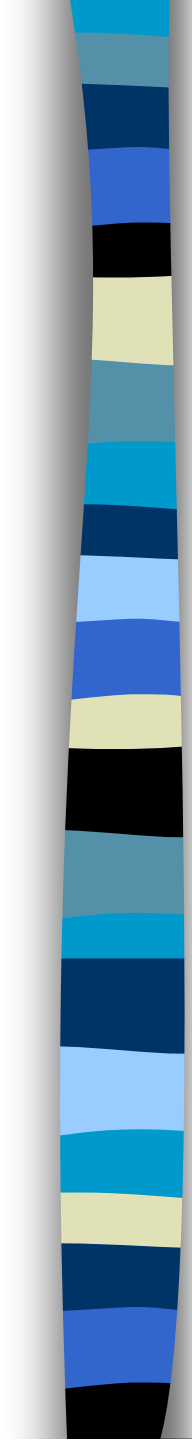
色谱条件与系统适用性试验 用氰基键合硅胶为填充剂，以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液（稀磷酸调pH值至2.2）-乙腈（44：56）为流动相；检测波长为254nm。分别取利福平对照品、醌式利福平对照品、异烟肼对照品、吡嗪酰胺对照品适量，用流动相溶解并稀释制成每1ml中含利福平与醌式利福平各60 μ g，异烟肼20 μ g，吡嗪酰胺62.5 μ g的溶液。取20 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图。吡嗪酰胺、异烟肼、醌式利福平、利福平依次流出，理论板数按吡嗪酰胺峰计算不小于1500，各峰之间的分离度均应符合要求。

- 
- 测定法 取本品10片，除去薄膜衣，精密称定，研细，精密称取细粉适量（约相当于利福平60mg），置100ml量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液5ml，置50ml量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀。精密量取20 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图；另取利福平对照品、异烟肼对照品和吡嗪酰胺对照品适量，精密称定，用流动相溶解并定量稀释制成与供试品溶液浓度相同的溶液，同法测定。按外标法以峰面积计算，即得。

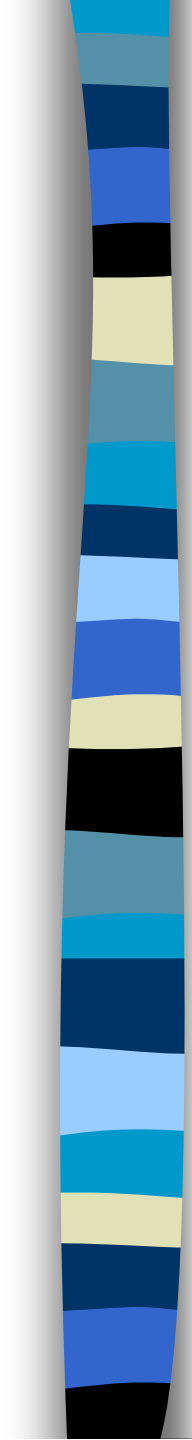
■ （异福酰胺片）

- 
- 例11. 照高效液相色谱法（附录VD）测定。
 - 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以0.005mol/L氢氧化四丁基铵溶液（取40%氢氧化四丁基铵溶液6.6ml，加水1800ml后，用1mol/L磷酸溶液调节pH值至4.0，再用水稀释至2000ml）-乙腈（750：250）为流动相；检测波长为220nm。

- 
- 取头孢哌酮对照品和舒巴坦对照品适量，用少量磷酸盐缓冲液（取0.2mol/L磷酸二氢钠溶液39.0ml与0.2mol/L磷酸氢二钠溶液61.0m，混匀，用磷酸调节pH值至7.0）溶解，再加流动相稀释制成每1ml中各含1mg的溶液，在60℃水浴中加热30分钟，即得相对保留时间约为0.9的头孢哌酮降解物峰，取10 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图，理论板数按头孢哌酮峰计算不低于3000，头孢哌酮降解物峰与舒巴坦峰之间，头孢哌酮峰与相邻色谱峰之间的分离度均应符合要求。

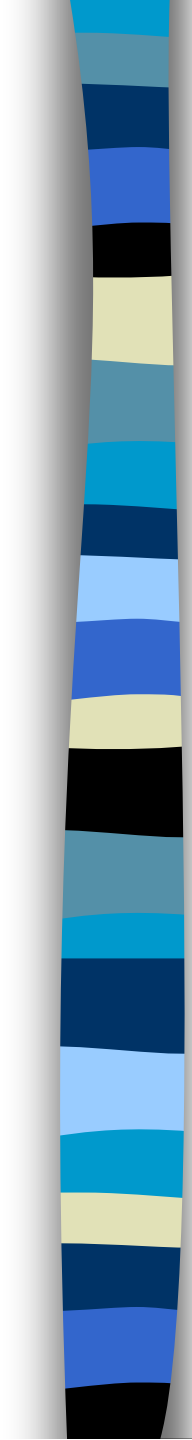
- 
- 测定法 取装量差异项下的内容物，混和均匀，精密称取适量（约相当于头孢哌酮100mg），置200ml量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，立即精密量取10μl，注入液相色谱仪，记录色谱图；另分别精密称取头孢哌酮对照品及舒巴坦对照品各约25mg，置50ml量瓶中，加上述磷酸盐缓冲液2ml溶解，再加流动相稀释至刻度，摇匀，同法测定。按外标法以峰面积计算出供试品中 $C_{25}H_{27}N_9O_8S_2$ 和 $C_8H_{11}NO_5S$ 的含量。

- （注射用头孢哌酮舒巴坦钠）



■ 例12. 照高效液相色谱法（中国药典1995年版二部附录VD）测定。

■ 色谱条件与系统适用性试验 用氨丙基键合球形硅胶为填充剂，柱温25℃；乙腈-磷酸盐缓冲液（pH6.5）（2：1）作为流动相；荧光检测器，激发光波长350nm，发射光波长435nm。柱后衍生条件同有关物质。理论板数按伏格列波糖峰计算应不低于4800。伏格列波糖峰与乳糖峰的分离度应不小于4。对照品溶液重复进样6次，其相对标准差应小于2.0%。



- **测定法** 取伏格列波糖对照品适量，精密称定，加流动相溶解并稀释制成每1ml中约含0.04mg的溶液，精密量取50 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图；另取本品30片，精密称定、研细，精密称取适量（约相当于伏格列波糖2mg），置50ml量瓶中，加流动相适量，振摇使伏格列波糖溶解，用流动相稀释至刻度，摇匀，放置，取上清液，经0.45 μ m滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液，同法测定，按外标法以峰面积计算，即得。

- （伏格列波糖片进口药品标准X980432）



■ 4. 荧光分光光度法

- 荧光光度法的灵敏度高于紫外-可见分光光度法，当制剂中的主药含量很小，且主药的分子结构具有荧光特性，可用荧光分光光度法（例13）；
- 主药本身荧光较弱，加入一定的荧光试剂可加强主药荧光强度的，也可用荧光分光光度法。

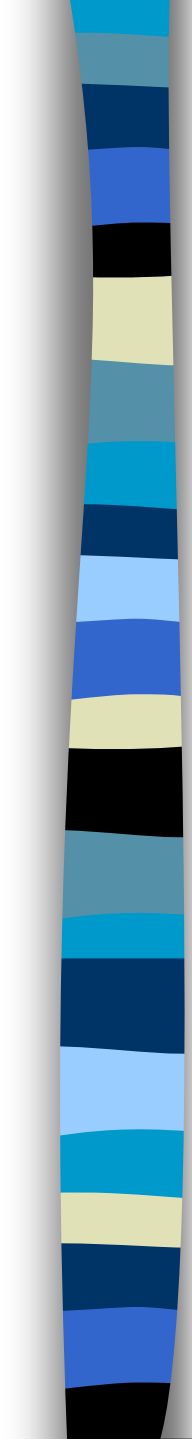
- 例13. 避光操作。取本品20片，如为糖衣片应除去包衣，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于利血平0.5mg），置100ml棕色量瓶中，加热水10ml，摇匀后，加三氯甲烷10ml，振摇，用乙醇定量稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液，用乙醇定量稀释成每1ml约含利血平2 μ g的溶液，作为供试品溶液；另精密称取利血平对照品10mg，置100ml棕色量瓶中，加三氯甲烷10ml溶解后，再用乙醇稀释至刻度，摇匀；精密量取2ml，置100ml棕色量瓶中，用乙醇稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。精密量取对照品溶液与供试品溶液各5ml，分别置具塞试管中，加五氧化二钒试液2.0ml，激烈振摇后，在30 $^{\circ}$ C放置1小时，照荧光分析法（附录 $\times\times$ ），在激发光波长400nm、发射光波长500nm处测定荧光强度，计算，即得。

■ （利血平片）

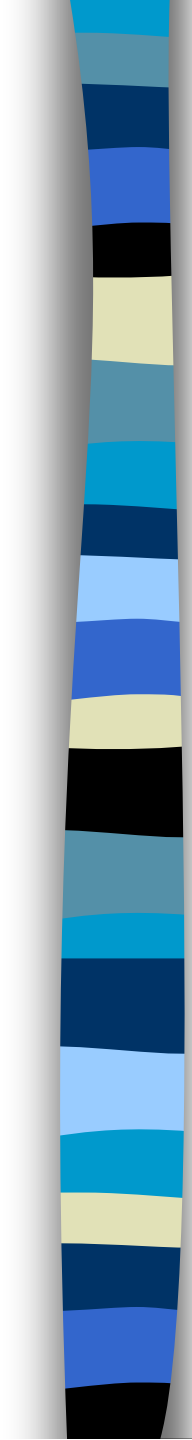


■ 5. 关于取样量的描述

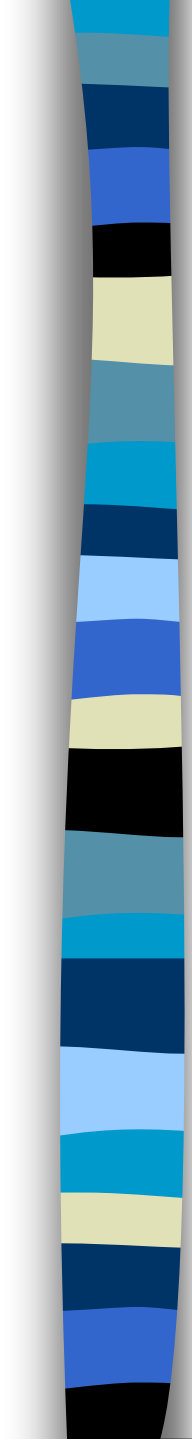
- 保证制剂含量测定中供试品的代表性，使平均含量的变异降至较小的范围，规定片剂、栓剂或滴丸剂的取样量为**20**片（或粒），
- 抗生素、生化药品及个别价格昂贵的片剂，在足够两份测定取量时，可改用**10**片（或粒）。
- 如因主药含量低微，取**20**片不够两份测定时，应根据两份测定取量与该制剂的“规格”推算供试品的取样片（或粒）数，并以**5**的倍数计，规格不同时，应分别注明（例**14**）。

- 
- 例14. 取本品**15片**（**50mg**规格）或**25片**（**25mg**规格），除去包衣后，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于盐酸丙卡巴肼**0.25g**），照盐酸丙卡巴肼含量测定项下的方法，自“加水**50ml**溶解后”起，依法测定。每**1ml**硝酸银滴定液（**0.1mol/L**）相当于**25.78mg**的 $C_{12}H_{19}N_3O \cdot HCl$ 。

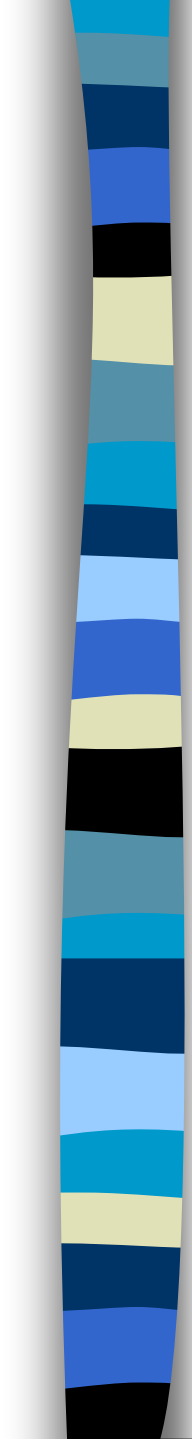
- （盐酸丙卡巴肼肠溶片）

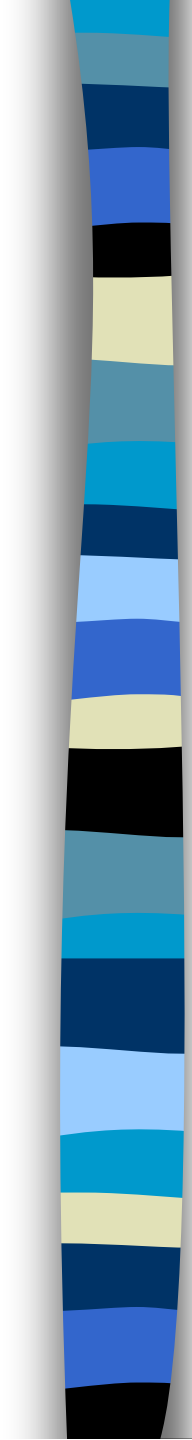


- 包衣片的取样量同前述，但应在“除去包衣后再“精密称定”，若包衣不影响测定，并可制成溶液，也可取包衣片**10片**（个别例外）置量瓶中溶解后进行（例1、例15）。

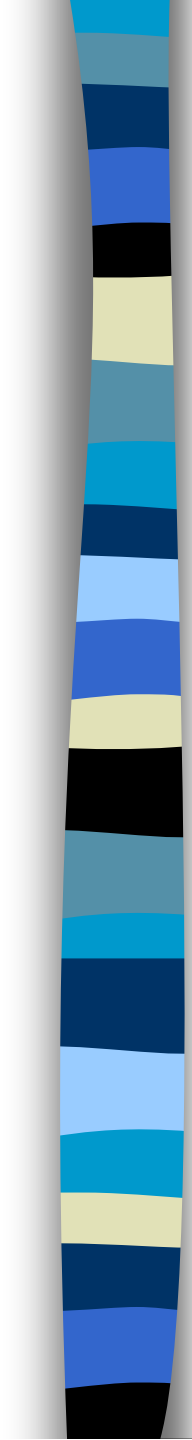
- 
- **例15.** 取本品**10片**，置**100ml**量瓶中，加水**50ml**，振摇使盐酸普鲁卡因胺溶解，加水稀释至刻度，摇匀，静置，精密量取上清液**20ml**，照永停滴定法（附录××），用亚硝酸钠滴定液（**0.1 mol/L**）滴定。每**1ml**亚硝酸钠滴定液（**0.1 mol/L**）相当于**27.18mg**的 $C_{13}H_{21}N_3O \cdot HCl$ 。

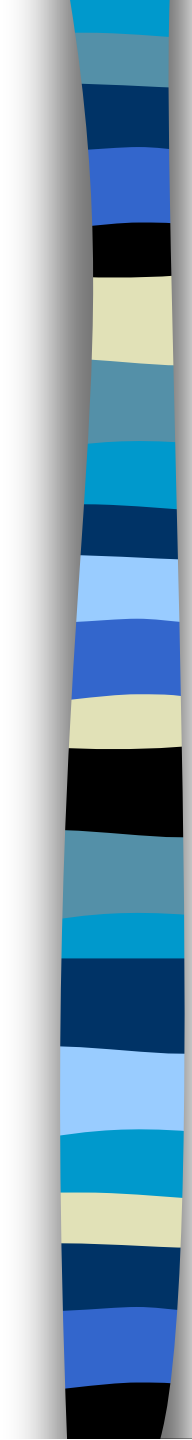
- (盐酸普鲁卡因胺片)

- 
- 注射用无菌制剂、胶囊或软胶囊，则按装量差异项下的规定取样，并规定“取装量差异项下的内容物”（例2和例16），

- 
- **例16.** 取装量差异项下的内容物，混和均匀，精密称取适量（约相当于头孢克洛**100mg**），加流动相溶解并定量稀释制成每**1ml**中约含头孢克洛**0.2mg**的溶液（必要时可超声处理），摇匀，滤过，取续滤液，照头孢克洛项下的方法测定，即得。

- （头孢克洛胶囊）

- 
- 注射液或其他液体制剂，则为“精密量取本品适量”，对于粘稠的液体，要强调用内容量移液管，并洗出移液管内壁的附着液（例17）。

- 
- 例17. 用**内容量移液管**精密量取本品适量，加正己烷溶解并定量稀释制成每1ml中约含0.25mg的溶液；精密量取上述溶液与内标溶液各5ml，置50ml棕色量瓶中，加正己烷至刻度，摇匀，作为供试品溶液。照维生素D测定法测定（附录××第一法），即得。

- （维生素D3注射液）



再见!