

用比色法测定牛磺酸滴眼剂的含量

江西国药厂 周艳军 戴寿昌* 童敏*

牛磺酸(Taurine: $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$)又名牛胆碱、牛胆素、为天然牛黄、人工牛黄及牛胆汁的药用有效成分之一。国内于一九八一年由长春市春城制药厂首先成功合成牛磺酸^[1]。本品在含量测定方面多采用经典的酸碱滴定法,但牛磺酸滴眼液内加有硼酸—硼砂缓冲液,致使滴定终点极不明显,误差较大。本实验根据牛磺酸系氨基酸类化合物能与茚三酮试剂反应生成紫色复合物,在575nm波长处有最大吸收峰,其吸收度与牛磺酸浓度之间服从比尔定律,因此可用以测定牛磺酸的含量。本法操作简便、迅速,仪器设备简单。回收率可达98.70%。

实验部分

一、仪器和药品

72型分光光度计(上海分析仪器厂)

牛磺酸精品(含量99.43%)春城制药厂产;茚三酮(AR)、冰醋酸(AR)、结晶乙酸钠(CP)、乙二醇甲醚(CP)、氰化钾(AR)、无水乙醇(CP)。5%牛磺酸眼药水本厂药研所制剂室提供。

二、试剂的配制

1. 显色剂的配制

(1) KCN(0.01M)取10%KCN溶液加水稀释到浓度为0.065%即可。

表 1

波 长 (nm)	520	530	540	550	560	570	575	580	590	600	610
吸 收 度	0.250	0.295	0.350	0.392	0.429	0.449	0.452	0.451	0.440	0.406	0.361

表中吸收度均为三次测定的平均值。

*为江西中医学院八一级实习生。

(2) 取1.25g苯骈戊三酮溶于25ml乙二醇甲醚使成5%(w/v)溶液,将2.5ml 0.01M KCN溶液与乙二醇甲醚稀释到125ml,再与前液混合置试剂瓶中待用,正常情况下为浅黄色或微带青光^[2]。

2. 2N 醋酸钠-醋酸缓冲液的配制

称取272g结晶乙酸钠($\text{NaAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)溶于300ml左右的水中,再加25ml冰醋酸,最后加新煮沸放冷蒸馏水到1000ml混匀。经测定此液pH为5.4。

3. 标准溶液的配制

精确称取105℃干燥至恒重的牛磺酸精品250.00mg,溶于100ml量瓶中,加水到刻度摇匀,从中精密吸取8ml于200ml量瓶中加水到刻度即得浓度为0.1mg/ml的牛磺酸标准溶液。

三、比色法最佳条件的选择

1. 最佳吸收波长的选择 精确吸取牛磺酸标准液2.0ml于比色管中,加入蒸馏水2.0ml,缓冲液3.0ml,茚三酮显色剂4.0ml,置100℃水浴加热15',取出冷却到室温后加60%乙醇到25ml置0.5cm厚的比色皿中,用72型分光光度计观察自520nm-610nm不同波长下吸收度的变化(表1),在575nm处吸收度最大。

2. 显色剂最佳用量的选择 操作同上, 加入不同用量的显色剂, 结果见表 2。
表 2

KCN-茛三酮-乙二醇甲醛(ml)	1.0	2.0	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
吸 收 度	0.175	0.391	0.445	0.478	0.547	0.549	0.550

表中吸收度均为三次测定的平均值。

可见用量在 4.0—5.0ml 时吸收度最大并在同一水平, 故选 4.0ml 为宜。

3. pH5.4 的缓冲液用量的选择 操作同上, 加入不同量的缓冲液, 结果见表 3。

表 3

缓冲液用量 (ml)	1.0	2.0	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
吸 收 度	0.493	0.549	0.590	0.542	0.541	0.531	0.530

注: 表中吸收度为三次测定结果的平均数。

可见 3.0ml 用量时吸收度最大, 故选 3.0ml 为宜。

5. 加热时间的影响 操作同上, 结果见表 5

4. 加热温度的选择 操作同上, 茛三酮显色剂 4.0ml, 缓冲液 3.0ml 置不同温度的恒温水浴中加热 15', 观察其吸收度, 结果见表 4。

表 5

时间(分)	5	10	15	20	25	30
吸 收 度	0.176	0.297	0.365	0.400	0.386	0.397

表中吸收度为三次测定的均值

可见随加热时间延长吸收度增加, 本实验在 15'—20' 吸收度变化不大, 故选 15' 为宜。

表 4

温度(℃)	60	70	80	90	100
吸 收 度	0	0.022	0.079	0.129	0.437

表中吸收度为三次测定的均值

可见 100℃ 沸水浴加热吸收度最大且高于控制。

6. 放置时间对显色液吸收度的影响 将加入 60% 乙醇后的显色液放置不同时间后进行测定, 同时用空白校正。其结果见表 6

表 6

放置时间(分)	10'	20'	30'	40'	50'	60'	70'	80'	90'	150'
吸 收 度	0.547	0.547	0.547	0.547	0.547	0.546	0.547	0.546	0.549	0.550

可见显色液加入 60% 乙醇稀释后, 150 分钟内都稳定, 可从容进行测定。

充分混匀, 置 100℃ 水浴加热 15', 取出冷却到室温, 用 60% 乙醇加到 25ml, 置 0.5cm 厚的比色皿中, 在 575nm 波长处测定吸收度, 见表 7。

四、标准曲线的制作及回归处理

精密吸取标准溶液(0.1mg/ml) 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0ml 入比色管中, 加新煮沸过蒸馏水到 4.0ml 然后分别加 pH 5.4 缓冲液 3.0ml, 茛三酮显色剂 4.0ml,

按回归处理: $\hat{y} = 0.0627857x - 0.14943$

相关系数: $(r) = 0.9964$

五、牛磺酸滴眼液的含量测定

表7

x	牛磺酸标准液(ml)	0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
y	吸 收 度	0	0.107	0.231	0.360	0.433	0.635	0.725	0.858

1. 处方 牛磺酸50g、硼酸15g、硼砂3g、尼泊金乙酯0.25g、蒸馏水加到1000ml即得5%滴眼液。

2. 样品测定 取5%的滴眼液0.5ml于250ml量瓶中加水到刻度摇匀备用。分别精取上述溶液2.0ml于三支比色管中,按上述

表8

吸 收 度	百 分 含 量	平 均 值 (%)
0.365	102.5	
0.360	100.00	102.00
0.370	103.50	

表10

实验次数(n)	1	2	3	4	5	6	7
吸 收 度	0.361	0.362	0.370	0.365	0.364	0.365	0.367
5%牛磺酸滴眼液含量(%)	101.72	101.92	103.5	102.51	102.31	102.51	102.9

实验的准确值有95%的可能性在102.10~102.86%间。

5. 比色法与酸碱滴定法的对照误差

同一牛磺酸滴眼液用酸碱滴定法及比色测定法进行对照,两种方法分别都重复五次结果见表11。

用统计方法试比较两种测定方法的偏差: $\mu_x = \mu_y$,即二法结果基本一致。

表11

实验次数(n)	酸 碱 滴 定 法 (%)	比 色 测 定 法 (%)
1	100.28	101.92
2	103.68	102.51
3	103.21	103.50
4	101.73	102.51
5	103.81	102.31
平 均 值	$\bar{x} = 102.54$	$\bar{y} = 102.55$
方 差	$\hat{\delta}_x^2 = 0.00022813$	$\hat{\delta}_y^2 = 0.000034005$

标准曲线的制作法操作。其百分含量如表8。

3. 回收率测定 按处方配制模拟样品,按上述方法操作。结果见表9。

表9

牛磺酸浓度(%)	吸 收 度	牛磺酸测得含量(%)	回 收 率 (%)	均 值 (%)
0.01012	0.361	0.01017	100.49	
0.00992	0.338	0.00972	97.96	98.7
0.01003	0.342	0.00980	97.67	

4. 比色法的测定误差 按上述实验方法,用同一滴眼液重复七次实验,测定结果见表10,按统计方法估计误差。

讨 论

(1) 比色测定必须在无氨环境中进行,一切试剂均需放在草酸保护的干燥器内,以免受空气中的氨污染^[2]。

(2) 茛三酮与牛磺酸所生成的显色液在150分钟内都稳定,比文献报道的时间要长^[3]。实验可以从容地进行。

(3) KCN-茛三酮-乙二醇甲醚溶液配制后必须隔一晚才能使用,配制后一星期内稳定,超过时间反应不灵敏^[2]。

(4) 本试剂pH 5.4时,对牛磺酸含量的测定灵敏度最高。

参 考 文 献

- [1] 张树巨等,中成药研究,11:39,1981
- [2] 蔡武城袁厚积主编:《生物物质常用化学分析法》科学出版社,1982年
- [3] 刘片青等,抗生素6(2):28-31,1981