

氯霉素含量測定法的研究

(二) 快速重氮化法*

王 子 鴻

(國營東北制葯總廠中心化驗室)

关于用化学方法来測定氯霉素含量的文献,目前以使用比色法的为多^[1-3]。这些方法各不相同,有將硝基还原重氮化后,偶合成顏色的;有將其水解为氨基化合物之鹽酸鹽,再用碘酸鉀氧化成对硝基苯甲醛后,用 2,4-二硝基苯肼显色的;又有測定其与各种特殊試剂生成之顏色的。在容量法方面,有用金屬鈉处理氯霉素,使分子中之 Cl 成 NaCl 后,用銀量法滴定的^[9];另外,智利^[6,10]与苏联^[11]文献記載,可在硝基还原为氨基后,直接用亞硝酸鈉标准液滴定,但只应用了一般滴定法,并没有討論有关实验条件。因此在本文內,针对掌握这个測定方法的一些有关問題,如重氮化滴定速度、温度、溶液容积及还原速度等加以較詳尽的討論,这个方法的特点是不但操作过程較为簡單、迅速,而且相当准确,又不需要任何貴重仪器。

实 驗

(一) 重氮化滴定的速度問題

精密称取氯霉素約 0.3 克,如此理論上应消耗 0.05M 亞硝酸鈉規定液約 20 毫升,然后加入鋅粉 3 克,水 20 毫升及鹽酸(1:1)20 毫升,裝上迴流冷凝器在水浴上充分迴流約 1 小时,令其还原为氨基化合物,濾去鋅粉,并以水充分洗滌濾渣。为了保証有足够的酸度,須再加鹽酸 5 毫升,然后冷却至 10°C 以下,按照一般芳香族氨基化合物定量方法,用 0.05M 亞硝酸鈉緩緩滴定至終点,用淀粉碘化鉀試液为外指示剂。但所得結果,頗不滿意。在实验过程中,开始时每次滴加亞硝酸鈉約 2 毫升,滴完后攪拌,并以淀粉碘化鉀試液試之。嗣后每次滴加 1 毫升,但在消耗亞硝酸鈉規定液达理論量之 80% 左右时,反应速度即大大减低。滴加 NaNO₂ 量虽减少至每次仅只 0.2 毫升,但蘸取反应液滴加于指示剂上,已能使其立即呈現过度之深藍色,显然此时是因加入亞硝酸鈉过

* 1956 年 4 月 9 日收到。

量,以致有 HNO_2 气逸出而易产生一定誤差。但若將此溶液充分振搖后再試之,則所現之藍色又复褪去,因此滴定至終点,必須謹慎而緩慢,不似磺胺类藥物重氮化滴定时之易于掌握,一般約需二小时半以上,即使如此,仍不能得到穩定的終点。如在最后一滴亞硝酸鈉溶液加入后十分鐘內,仍能与指示剂呈現淺藍色者为終点,則同一样品所得結果,頗見悬殊(見表 1)。表 1 中平均偏差为 0.69,而与平均值的最大偏差,竟达 1.43%。实际上,如在十分鐘后再行檢查,則原来与指示剂能呈現淺藍色者,現已完全褪尽不复显色,此为終点未到的明証。

表 1

所用 0.05M NaNO_2 濃度 = 1.013 檢样編号: 試二号

次 数	檢 样 重 (克)	消 耗 NaNO_2 毫 升	氯 霉 素 含 量 %	与 平 均 值 之 偏 差
1	0.2991	18.05	98.76	-0.55
2	0.2870	16.66	99.48	+0.17
3	0.3075	18.77	99.91	+0.60
4	0.3112	18.85	99.10	-0.21
5	0.3201	19.14	97.88	-1.43
6	0.3132	19.19	100.3	+0.99
7	0.3079	18.45	98.07	-1.24
8	0.2974	18.21	100.2	+0.89
9	0.3056	18.55	99.32	+0.01
10	0.3129	19.13	100.1	+0.79
			平均值 99.31%	平均偏差 0.69

由上述結果看来,此种分析方法显然不能符合要求。一般芳香族第一胺的重氮化反应速度,与苯环上所存在的酸性基团的强弱有关,尤其以此酸性基团之位于氨基对位上者为甚。根据氯霉素的結構而論,“还原氯霉素”的酸性应当極弱,因此反应速度可能較为迟緩而不易完全。为了达到增加重氮化反应速度的目的,我們在开始滴定前,又增加了鹽酸 5 毫升及溴化鉀 2 克,然后再按照上述方法进行操,結果大为改善。每次加入亞硝酸鈉溶液 2 毫升,直至終点附近,以淀粉碘化鉀指示剂試之,始終未曾發現过量的藍色,可見反应速度确已大为加速。因此同一样品,所得数据亦頗接近,如在最后一滴 0.05M 亞硝酸鈉液加入后十分鐘內,仍能与指示剂呈現淺藍色者为終点,其結果見表 2 与表 3。

从表 2,表 3 看来,除表 2 中第十一次的 99.61% 为一未知原因的特殊較大偏差外,其余均在一般定量分析的精密度准許范围之內。至于含量超过 100% 的原因,恐系杂有少許分子量較小的硝基夾杂物之故。

表 2

所用 0.05M NaNO₂濃度 = 1.013 檢樣編號: 試二號

次 數	檢 樣 重 (克)	消 耗 NaNO ₂ 毫 升	氯 霉 素 含 量 %	与 平 均 值 之 偏 差
1	0.3035	18.58	100.2	+0.10
2	0.3019	18.47	100.1	0
3	0.3097	18.94	100.1	0
4	0.2563	15.69	100.2	+0.10
5	0.3071	18.78	99.95	-0.15
6	0.3108	18.99	99.97	-0.13
7	0.2886	17.65	100.1	0
8	0.3119	19.06	100.0	-0.10
9	0.2981	18.25	100.2	+0.10
10	0.3050	18.65	100.1	0
11	0.3321	20.21	99.61	-0.49
12	0.3529	21.56	99.98	-0.12
13	0.2912	17.80	100.1	0
			平均值 100.1%	平均偏差 0.099

表 3

所用 0.05M NaNO₂濃度 = 1.013 檢樣編號: 試四號

次 數	檢 樣 重 (克)	消 耗 NaNO ₂ 毫 升	氯 霉 素 含 量 %	与 平 均 值 之 偏 差
1	0.2538	15.41	99.36	-0.12
2	0.2719	15.78	99.44	-0.04
3	0.2841	16.50	99.49	+0.01
4	0.2681	16.32	99.61	+0.13
5	0.3051	18.55	99.50	+0.02
6	0.2977	18.11	99.58	+0.10
7	0.2694	16.36	99.39	-0.09
			平均值 99.48%	平均偏差 0.07

在有足够的酸度及溴化鉀存在下,可以使重氮化反应速度大大增加,然而終点是否必需十分鐘后观察,值得进一步加以考察。表 4 說明反应終点以五分鐘后仍能与指示剂呈現淺藍色較为合理,如少于三分鐘,則开始發生較大的偏差:

还原氯霉素既能以較迅速的速度进行重氮化反应,我們遂考虑如何应用快速重氮化滴定,以簡化分析手續。关于快速重氮化滴定的应用,已有專題討論^[12]。但此处应予注意的就是:还原氯霉素在溴化鉀存在下,虽能进行較快的重氮化反应,然和一般芳香族第一胺之有酸性基者相較仍有不及。快速滴定方法能否应用,值得考虑。为此我們按前

表 4

观察終点所需時間(分鐘)	10'	8'	6'	5'	4'	3'	2'	1'
試驗二号氯霉素含量%	100.1	99.95	100.1		99.99	99.92	99.67	99.25
56007 号氯霉素含量%	100.25	100.4	100.4	100.3	100.2	100.05	99.88	99.40
56034 号氯霉素含量%	100.6	100.7	100.8	100.7	100.7	100.5	99.98	99.63

述方法,进行快速滴定的实验。先将氯霉素的硝基还原为氨基,然后将其滤入于一300毫升的烧杯中,在溴化钾的存在下,将滴定管尖插入溶液深处(最好用一长嘴滴定管,即从活塞到管尖约长8—9厘米),利用一具磁性搅拌器在充分搅拌的情况下,将滴定管活塞开启至最大处,令0.05M NaNO₂液以较迅速的速度,于三十秒钟左右流入于烧杯的溶液中,在将近终点时(应该预先计算所需消耗的亚硝酸钠量,一般在距离终点约0.5毫升时停止加入),拔出滴定管,用水冲洗管尖,然后用0.05M亚硝酸钠液继续滴定至终点,此时所能目见的浅蓝色,如在四分钟后仍能与指示剂显色者,应认为正确的终点。在快速加入亚硝酸钠液完毕后,如立即以淀粉碘化钾试液试之,从未发现有过剩的亚硝酸存在,可见还原氯霉素之溶液,亦可应用快速重氮化滴定,而所得结果之相对偏差只在0.1%左右。

(二) 滴定时溶液温度的影响

由于还原氯霉素在进行重氮化反应时的速度较慢,所以采用上法进行滴定时,根据实验,溶液的温度必需保持在27°C以下,所得结果才能可靠;高于28°C时,应予冷却,尤其在夏天室温较高时应该注意。否则因重氮化较慢,亚硝酸有损失之虞,而使结果偏高。此点与磺胺类药物相异,因磺胺类药物在31°C以下进行快速重氮化滴定,偏差仍不显著。表5说明还原氯霉素在各种不同的温度下进行快速重氮化滴定的结果。

表 5

滴定时溶液最高温度°C	10以下	15	20	25	26	27	28	29	30	31
試驗五号氯霉素含量%	99.86	99.89	99.89	99.98	99.92	99.95	100.1	100.5	101.4	101.9
126号氯霉素含量%	100.1	100.2	100.1	100.1	100.2	100.2	100.2	100.7	101.5	102.3
129号氯霉素含量%	100.5	100.45	100.4	100.4	100.5	100.45	100.5	100.9	101.8	102.6

(三) 滴定时溶液体积的影响

根据上述操作过程,在滴定終了时溶液的总容积,一般应在120毫升左右。应该指出,如溶液体积过大,最后一滴过量的0.05M NaNO₂势将过份稀释,因而减低其与碘化

鉀淀粉試劑的顯色靈敏度，所得結果易于偏高。如使用 10 毫升濃鹽酸與一定量水，配成各種不同體積的溶液，作空白試驗，得出顯示終點所必需過量的 $0.05M$ $NaNO_2$ 毫升數列于表 6。

表 6

滴定終了時溶液總體積(毫升)		50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
顯示終點所需的 $0.05M$ $NaNO_2$ 毫升	一次	0.04	0.05	0.07	0.07	0.08	0.09	0.09	0.1	0.12	0.12
	二次	0.04	0.05	0.07	0.08	0.08	0.08	0.09	0.1	0.11	0.11
	三次	0.04	0.05	0.07	0.07	0.09	0.09	0.10	0.1	0.11	0.12

由此可見，如按照以前方法操作測定氯霉素含量，直至滴定終了，在顯示終點時所消耗的 $0.05M$ $NaNO_2$ 總毫升數，已較應該消耗的 $NaNO_2$ 毫升數多加約 0.1 毫升，例如原為含量 99.85% 的氯霉素，如用此不妥當的終點，可以使含量提高 100.4%，產生誤差竟達 0.55%。因此在滴定終了時應將過量的 $0.05M$ $NaNO_2$ 毫升數減去，並在標定亞硝酸鈉溶液時，同樣地減去空白以求得真正的規定度。如果此種 $0.05M$ $NaNO_2$ 專門供給測定氯霉素之用，則可在標定時，使滴定終了時的溶液體積亦在 120 毫升左右，可以將此誤差互相抵消。

(四) 還原的時間

為確定將硝基還原為氨基所需的足夠時間，進行了下列試驗。主要目的為考查將氯霉素、鋅粉以及鹽酸在水浴上迴流的足夠時間及適當溫度。結果見表 7。

表 7

實 驗 次 數	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
水 浴 的 溫 度 $^{\circ}C$	95以上	95以上	95以上	95以上	95以上	85—90	75—85	60—70	60—70	
還原時迴流的時間(分)	30	20	10	5	3	10	10	10	5	
氯 霉 素 含 量 %	試六號	100.2	100.1	99.95	100.1	99.26	100.2	100.2	99.54	97.61
	111號	99.93	99.89	99.97	99.83	98.91	99.85	99.90	99.12	96.92
	108號	100.5	100.5	100.4	100.5	99.34	100.4	100.4	99.63	97.48

表 7 說明水浴溫度在 $80^{\circ}C$ 以上，迴流十分鐘，或在沸水浴上迴流五分鐘，即已足夠將氯霉素全部還原為氨基物，表 7 中 5, 8, 9 三次之情況下所得結果不佳。又如將置有氯霉素、鋅粉、水及鹽酸的 250 毫升錐形瓶直接放在水浴上按照上法加熱還原，但并不裝上迴流冷凝器，則所得結果與表 7 幾乎完全一致。由此可見 0.3 克氯霉素的還原

速度实頗为迅速。

目前我們所用的样品,为国营东北制藥总厂所生产的合霉素(氯霉素混旋体),在分析达百余个样品的結果中,只發現有一个样品按照上述过程在水浴上放置十分鐘,不能还原完全,致使結果偏低,这可能是由于純度或其它杂质干扰所致。因此在測定含量开始加热还原时,应留意观察反应溶液,以确定鋅粉之間有無未反应的氯霉素細粒存在。不过即使在此种極少数的例外情况,二十至三十十分鐘的还原時間亦已足够。

結 論

根据以上实验結果,显然利用重氮化滴定法来測定氯霉素的含量,在目前的氯霉素化学分析方法中,較为优越,今將其分析方法归納如下:

精密称取檢样約 0.3 克于 250 毫升錐形瓶中,加鋅粉 2 克,水 20 毫升及 HCl (1:1) 20 毫升,然后置于水浴上加热十分鐘,水浴温度不应低于 85°C,待反应完全后,取下錐形瓶,并以冷水冲洗瓶外使冷却,同时用力旋搖錐形瓶,使残余鋅粉中所附着的气泡逸出。然后用脫脂棉少許將其過濾于一 300 毫升燒杯中,并以水 40 毫升分四次洗滌殘渣及濾器,洗液并入濾液中,加入 HCl 10 毫升及溴化鉀 2 克,混勻后在溶液温度不超过 27°C 时,利用一具磁性攪拌器在充分攪拌的情况下,用 0.05 M NaNO₂ 进行快速重氮化滴定,終点以反应溶液在五分鐘后仍能與指示剂呈現淺藍色者为准。每毫升 0.05 M NaNO₂ 与氯霉素或合霉素 0.01616 克相当。

上述方法的操作,一般在半小時內即可全部結束,平均偏差約在 ±0.15% 左右,最大偏差为 0.25%。

根据我們所分析的資料結果看来,合霉素(氯霉素混旋体)的含量,絕大部分均在 99.8—100.7% 之間。結合对熔点和熔距(1.5°C)的規定以控制杂质含量,估計可能發生的誤差很小。至于氯霉素膠囊或其制剂同样亦可应用本法。

参 考 文 献

- [1] Peppe, *Bull. Chim. Pharm.*, 1949, **81**, 411-413; *C.A.*, 1950, **44**, 3066d.
- [2] Haruta Negoro, *J. Pharm. Soc. Japan*, 1950, **70**, 699-700; *C.A.*, 1951, **45**, 4403g.
- [3] René Truhaut, *Ann. pharm. franc.*, 1951, **9**, 347-350; *C.A.*, 1952, **46**, 1711h.
- [4] Ramon Puga, *Rev. pharm.*, 1951, **93**, 240-250; *C.A.*, 1952, **46**, 5260h.
- [5] Ramon Puga, *Rev. pharm.*, 1951, **93**, 290-307; *C.A.*, 1952, **46**, 5260i.
- [6] Madrid, H. G., *Colegio farm.* (Chile), 1952, **9**, No. 118, 1-4; *C.A.*, 1953, **47**, 7949.
- [7] Arora, K. L. & Krishna Murti, C. R., *Current Sci.* (India), 1952, **21**, 52.
- [8] 李承楨、張 捷, *藥學學報*, 1955, **3**, 205—209.
- [9] Robles, G. G. & Leonides Unzueta, R., *Bol. Soc. quím. Perú*, 1952, **18**, 6—14.

- [10] Vallejo, S. R., *Rev. quim. farm.* (Chile), 1951, 8, No. 106, 5-23.
[11] 苏联帶來資料。
[12] 王子鴻, 藥學通報, 1954, 8, 330-332.

ESTIMATION OF CHLORAMPHENICOL BY DIAZOTIZATION METHOD

WANG TZE-HUNG

(Central Analytical Laboratory, National Northeastern Pharmaceutical Works, Mukden)

ABSTRACT

Application of rapid diazotization technique to the estimation of chloramphenicol after reduction is investigated and discussed. Reduction of chloramphenicol to the corresponding amino compound was complete within 10 minutes. The rate with which nitrous acid reacts with reduced chloramphenicol was found to be slow, but it was greatly-accelerated in the presence of potassium bromide. Since nitrous acid is volatile, during titration, the temperature should be kept under 27°C . A constant volume should be maintained at the end point, excessive dilution would give high result. Procedure recommended is as following:

Weigh out accurately about 0.3g of sample and place it in a 250ml conical flask. 2g of zinc dust and 20ml each of water and diluted hydrochloric acid (1:1) are added. It is then heated for ten minutes over water bath at a temperature not lower than 85°C . After completion of reaction, it is cooled externally with cold water, shaking vigorously to remove gas bubbles adhered on zinc dust. Filter the content into a 300ml beaker, wash with water and combine washings to the filtrate. After the addition of 10ml of hydrochloric acid and 2g of potassium bromide, the solution is then titrated at a temperature below 27°C against 0.05 *M* sodium nitrite solution with rapid titration technique. When the solution still gives a light blue colouration with starch-iodide indicator after 5 minutes standing, the end point is reached and the reading is taken. Each ml of 0.05 *M* sodium nitrite solution is equivalent to 0.01616g of chloramphenicol.

The results were found to be reproducible with a mean deviation of $\pm 0.15\%$. The determination can be completed within 30 minutes.

