

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение азота в органических соединениях методом Къельдаля	ОФС.1.2.3.0011.15 Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0052-07
---	---

Метод основан на минерализации лекарственного средства под воздействием серной кислоты концентрированной при нагревании в присутствии катализаторов. В качестве катализаторов возможно использование смеси калия сульфата, меди сульфата и/или селена и/или титана диоксида. При этом азот превращается в аммония сульфат. При прибавлении натрия гидроксида выделяется аммиак, который перегоняют с паром в приемник, содержащий кислоту для его поглощения: борную – в методе прямого титрования (1 и 2); серную или хлористоводородную – в методе обратного титрования (3). В методах 1 и 2 поглощенный аммиак титруют раствором хлористоводородной или серной кислоты, в методе 3 избыток кислоты оттитровывают раствором натрия гидроксида. По результатам титрования рассчитывают содержание азота.

Различают следующие варианты метода:

- 1) метод Къельдаля,
- 2) микрометод Къельдаля,
- 3) метод Къельдаля (обратное титрование).

Прибор для определения азота (рисунок) состоит из парообразователя – круглодонной колбы (1) вместимостью 3 л с предохранительной трубкой (2), сменных колб Къельдаля с длинным горлом (3) для конденсации водяных паров и защиты от потери вещества, воронки (4) с зажимом или краном (5) для прибавления натрия гидроксида, брызгоуловителя (6), прямого

холодильника (7) и сменных конических колб-приемников (8). Стеклянная посуда должна быть термостойкой. Работу на приборе осуществляют в вытяжном шкафу.

Вместо описанного прибора могут быть использованы установки для автоматического определения азота по Кьельдалю, определение проводят потенциометрически.

1. Метод Кьельдаля

В колбу Кьельдаля (3) вместимостью 200 – 300 мл (другие объемы от 50 до 500 мл должны быть указаны в фармакопейной статье) помещают точную навеску (указывают в фармакопейной статье) или точный объем образца лекарственного средства (0,5 – 10,0 мл) с содержанием азота около 14 – 35 мг (если требуется пробоподготовка, она должна быть описана в фармакопейной статье), три стеклянных шарика для пенящихся веществ и 1 г растертой смеси калия сульфата и меди сульфата, взятых в соотношении 10 : 1 (другой состав смеси катализаторов должен быть указан в фармакопейной статье). Для трудносжигаемых веществ дополнительно в колбу (3) прибавляют 0,05 г металлического селена и/или 1 мл концентрированного раствора водорода пероксида. Прибавляют 7 мл серной кислоты концентрированной и осторожно вращают колбу для стекания кислоты со стенок и ее перемешивания с содержимым колбы. Постепенно нагревают колбу (3), закрытую стеклянной воронкой, на электронагревательном приборе и далее кипятят содержимое в течение нескольких часов до получения раствора светло-зеленого цвета. На стенках колбы не должно оставаться обугленного вещества. Кипячение продолжают еще 30 мин или более до просветления раствора. Если при кипячении происходит сильное пенообразование, то рекомендуется снять колбу Кьельдаля с нагревательного прибора и дать пене осесть, затем снова продолжают нагревание, не допуская попадания пены в горло колбы. После охлаждения колбы Кьельдаля в нее осторожно прибавляют 20 мл воды, вращая колбу для перемешивания содержимого, вновь охлаждают и присоединяют колбу к

собранному прибору для определения азота (рисунок), заранее промытому путем пропускания через него пара. В парообразователь наливают воду, не менее половины объема, подкисленную 0,5 М или 0,05 М раствором серной кислоты по индикатору метиловому красному (2 – 3 капли) до слабо-розового цвета, для связывания аммиака, который может попасть из воздуха. Для обеспечения равномерного кипения воды в парообразователь помещают стеклянные шарики. В приемник перед началом отгонки наливают 20 мл борной кислоты раствора 4 % и прибавляют 0,25 мл (5 капель) смешанного индикатора. Нижний конец внутренней трубки холодильника должен быть опущен в раствор, находящийся в приемнике. После сборки прибора в холодильник пускают воду и доводят до кипения воду в парообразователе. Затем в колбу (3) из воронки медленно по каплям прибавляют 40 мл натрия гидроксида раствора 30 %, следя за тем, чтобы раствор в колбе (3) энергично перемешивался поступающим паром. Для обеспечения большей герметичности прибора в воронке следует оставлять некоторый избыток натрия гидроксида раствора 30 %. Собирают около 100 мл отгона (или количество, указанное в фармакопейной статье). Во время отгонки колбу Кьельдаля нагревают так, чтобы объем жидкости в ней оставался постоянным. По окончании отгонки приемник опускают таким образом, чтобы трубка холодильника находилась над поверхностью жидкости, находящейся в приемнике. Трубку холодильника промывают снаружи водой, продолжая подачу пара в колбу (3) в течение 1 – 2 мин; промывную воду собирают в тот же приемник. После этого прекращают нагревание парообразователя и немедленно отсоединяют колбу Кьельдаля от прибора. По окончании отгонки дистиллят титруют хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М или серной кислоты раствором 0,05 М (должно быть указано в фармакопейной статье) до перехода окраски смешанного индикатора из зеленой в красно-фиолетовую.

Проводят контрольный опыт таким же образом и с теми же реактивами, но без испытуемого образца; полученный результат используют для внесения

поправки при расчете содержания азота.

1 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М или серной кислоты раствора 0,05 М соответствует 1,401 мг азота.

2. Микрометод Кьельдаля

В колбу Кьельдаля вместимостью от 50 до 250 мл помещают точную навеску или указанный в фармакопейной статье объем образца лекарственного средства с содержанием азота 1,4 – 3,5 мг. Остальные операции проводят, как указано выше в методе 1, используя описанную ранее смесь катализаторов или (например, в лекарственных средствах, выделенных из природных источников или полученных биотехнологическими методами) 0,25 г смеси калия сульфата, меди сульфата и натрия селената в соотношении 20:5:8,5; в этом случае вместо 7 мл прибавляют 4 мл серной кислоты концентрированной (для лучшего смачивания испытуемого образца).

Минерализацию проводят до тех пор, пока раствор не станет прозрачным. После этого нагревание продолжают еще 30 мин. В конце минерализации прибавляют 1 – 3 капли концентрированного раствора водорода пероксида и продолжают нагревание в течение 10 мин до обесцвечивания раствора.

Титрование выделенного аммиака проводят хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М или серной кислоты раствором 0,005 М.

1 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М или серной кислоты раствора 0,005 М соответствует 0,1401 мг азота.

Если навеска содержит более чем 3,5 мг азота, допускается использовать хлористоводородной кислоты раствор 0,02 М или серной кислоты раствор 0,01 М (при этом на титрование должно расходоваться не менее 15 мл титранта). Если масса взятой навески безводного вещества превышает 100 мг, необходимо пропорционально увеличивать объемы серной кислоты концентрированной и раствора натрия гидроксида.

3. Метод Кьельдаля (обратное титрование)

А. После минерализации образца лекарственного средства (методы 1

или 2) в приемник помещают точно отмеренное количество (от 10,0 до 25,0 мл) взятой в избытке хлористоводородной или серной кислоты (объем и молярная концентрация раствора кислоты зависят от содержания азота в препарате; указывают в фармакопейной статье).

По окончании отгонки аммиака содержимое приемника титруют натрия гидроксида раствором 0,1 М (или 0,01 М, что должно быть указано в фармакопейной статье) в присутствии смешанного индикатора (если не указано иначе в фармакопейной статье) до перехода окраски из красно-фиолетовой в зеленую.

Проводят контрольный опыт таким же образом и с теми же реактивами, но без испытуемого образца или с использованием 0,050 г глюкозы, о чем должно быть указано в фармакопейной статье.

Содержание азота в лекарственном средстве в процентах (X_1) или в мг/мл (X_2) вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{(V_0 - V_1) \cdot K \cdot T \cdot 10^{-3} \cdot 100}{a}$$
$$X_2 = \frac{(V_0 - V_1) \cdot K \cdot T}{V}$$

где: V_0 – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование контрольного раствора, мл;

V_1 – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл;

K – поправочный коэффициент к титру раствора натрия гидроксида;

T – 1,401 мг/мл – титр 0,1М раствора гидроксида натрия по азоту;

a – навеска образца лекарственного средства, г;

V – объем раствора, взятый для анализа, мл.

Б. Данный метод применяют преимущественно в препаратах крови. В колбу Кьельдаля с помощью калиброванной пипетки вносят 0,5 – 1,0 мл испытуемого раствора, содержащего 8 – 32 мг азота (или 50 – 200 мг белка), затем вносят растертую смесь (около 1 г) калия сульфата и меди сульфата (3:1) и от 2 до 4 мл серной кислоты концентрированной в

зависимости от содержания белка. Содержимое колбы кипятят. Для ускорения сжигания несколько раз прибавляют по 5 капель концентрированного раствора водорода пероксида и продолжают кипятить, пока раствор не станет голубым или бесцветным. По окончании сжигания смесь охлаждают. В парообразователь наливают воду, нагревают до кипения и проверяют аппарат на герметичность. Присоединяют колбу Кьельдаля к прибору для определения азота или количественно переносят содержимое колбы в реакционный сосуд прибора, используя 30 мл воды. Отгон собирают в приемник, куда предварительно наливают от 10,0 до 25,0 мл серной кислоты раствора 0,05 М в зависимости от содержания белка. Приемник присоединяют так, чтобы нижний конец трубки холодильника был опущен в раствор. Воду в парообразователе нагревают до кипения. В колбу Кьельдаля или в реакционный сосуд прибора с минерализатом через воронку прибавляют около 20 мл натрия гидроксида раствора 15 М до появления коричневой окраски минерализата. После этого быстро и герметично закрывают зажим воронки и отгоняют аммиак в течение 5 мин. Затем опускают приемник с серной кислоты раствором 0,05 М так, чтобы нижний конец трубки холодильника не касался поверхности жидкости, и продолжают перегонку еще 5 мин. Отгон титруют натрия гидроксида раствором 0,1 М до перехода сиреневой окраски в зеленую (индикатор – 0,05 мл смешанного индикатора). Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М соответствует 1,401 мг азота.

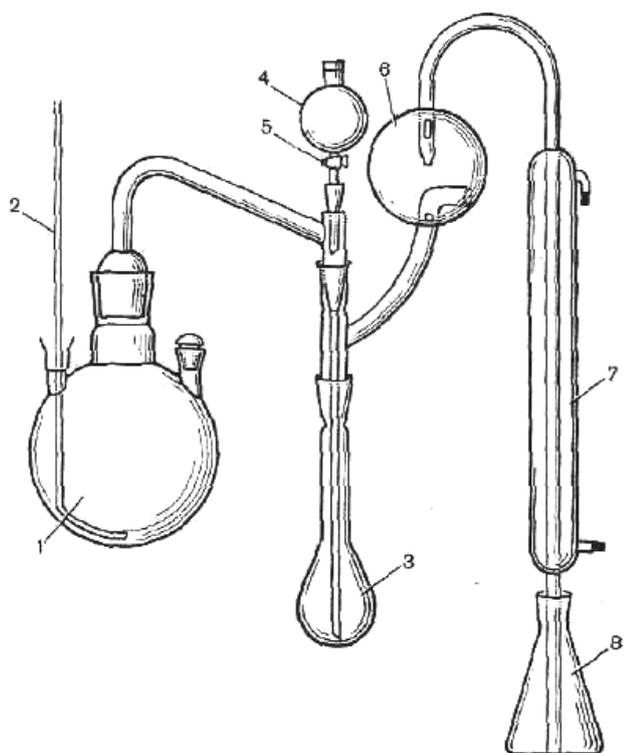


Рисунок – Прибор для определения азота.

1 – парообразователь; 2 – предохранительная трубка; 3 – колба Къельдаля; 4 – воронка; 5 – кран или зажим; 6 – брызгоуловитель; 7 – холодильник; 8 – колба-приемник