

药物分析

第十三章

莨菪烷类抗胆碱药物的分析



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

学习要求

掌握

- 莨菪烷类抗胆碱药物的结构特征、理化性质与分析方法之间的关系
- 莨菪烷类药物的鉴别和特殊杂质检查方法原理与应用

熟悉

- 含量测定的酸性染料比色法、非水滴定法和HPLC法
- 其他分析方法在莨菪烷类药物分析中的应用



第一节

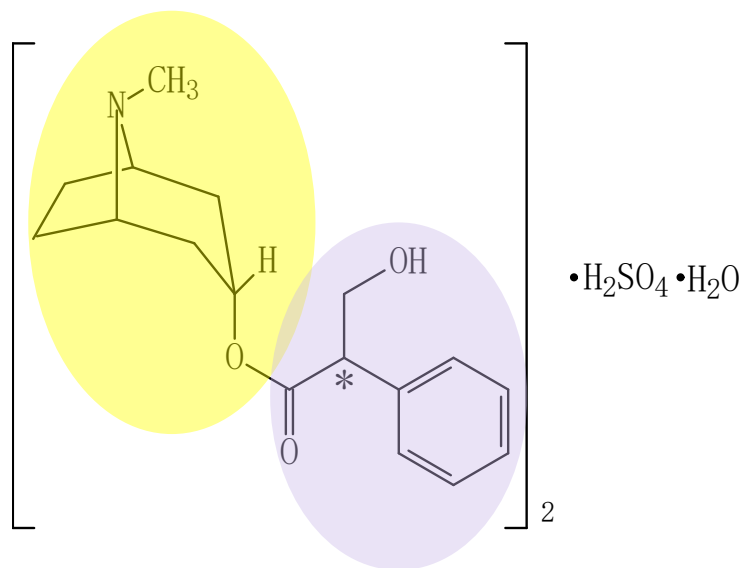
苄砆烷类药物的结构和性质



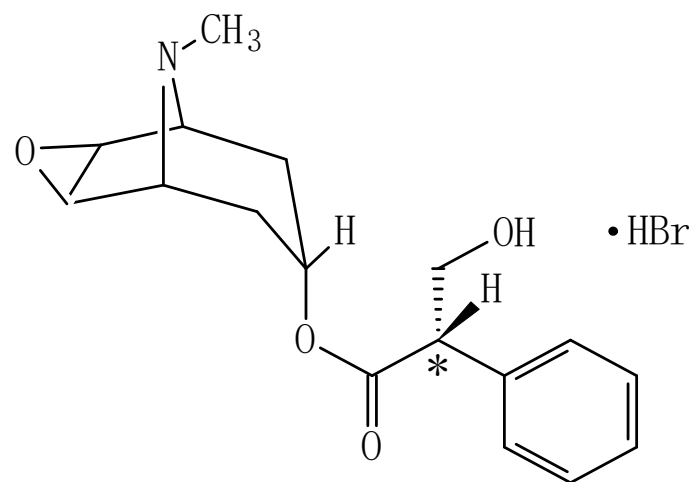
- 颠茄生物碱的来源：从茄科植物，如颠茄、莨菪和曼陀罗等中提取的生物碱，由莨菪醇与不同有机酸所成的酯。
- 作用：具有对M受体阻断作用



(一) 典型药物的结构

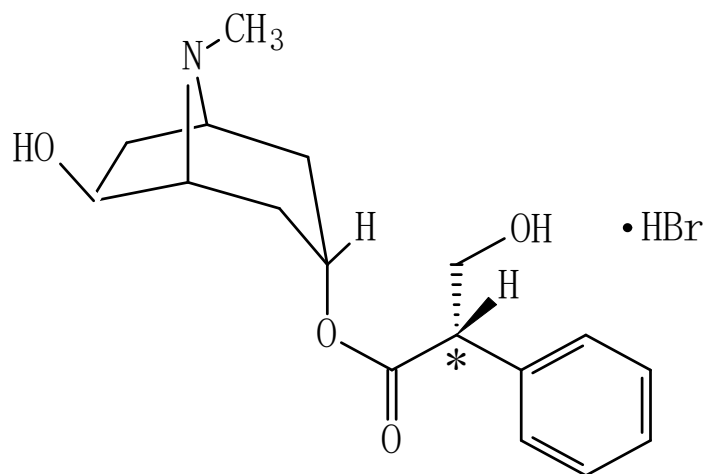


硫酸阿托品
(atropine sulfate)

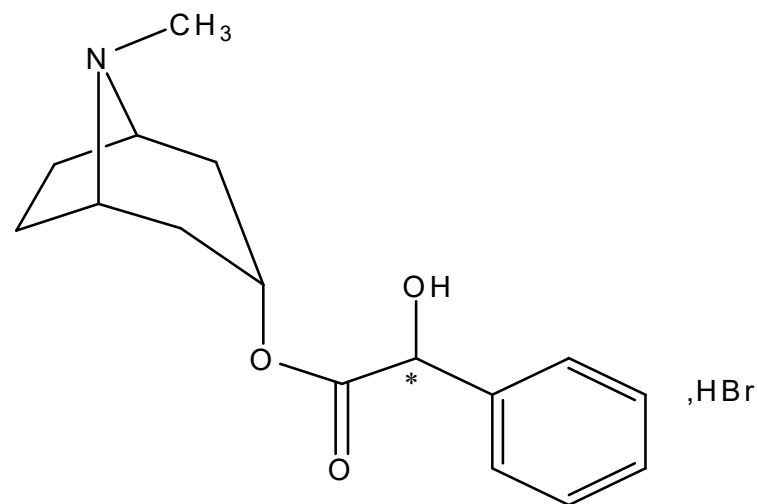


氢溴酸东莨菪碱
(Scopolamine hydrobromide)

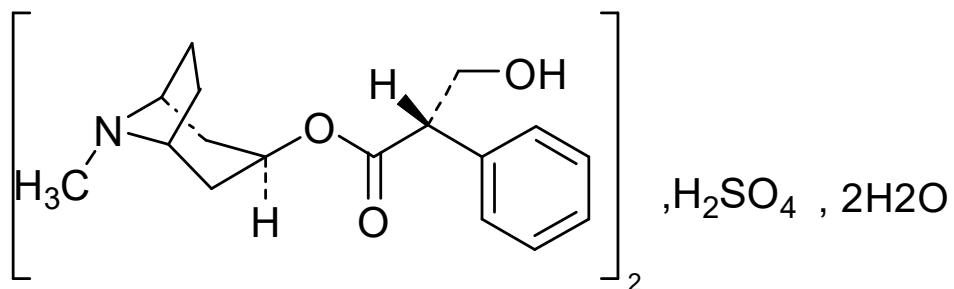




氢溴酸山莨菪碱
(Anisodamine hydrobromide)

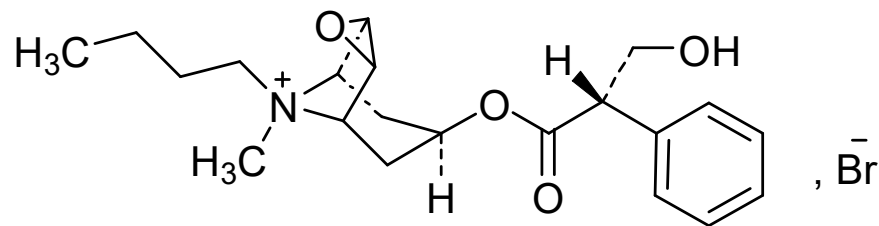


氢溴酸后马托品
(Hormatropine hydrobromide)



硫酸莨菪碱

Hyoscyamine Sulfate

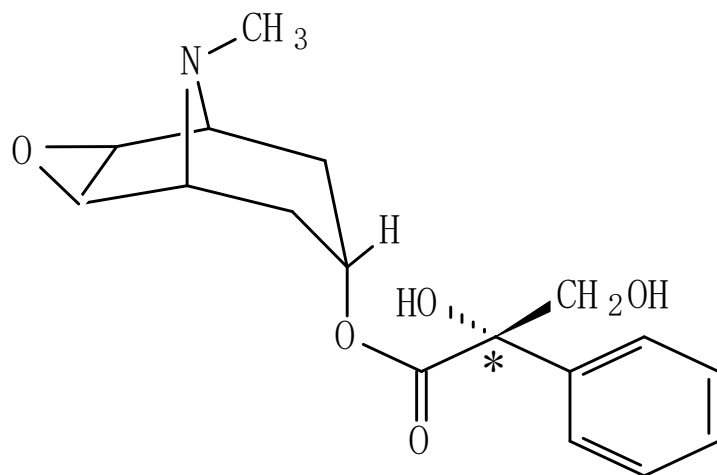


丁溴东莨菪碱

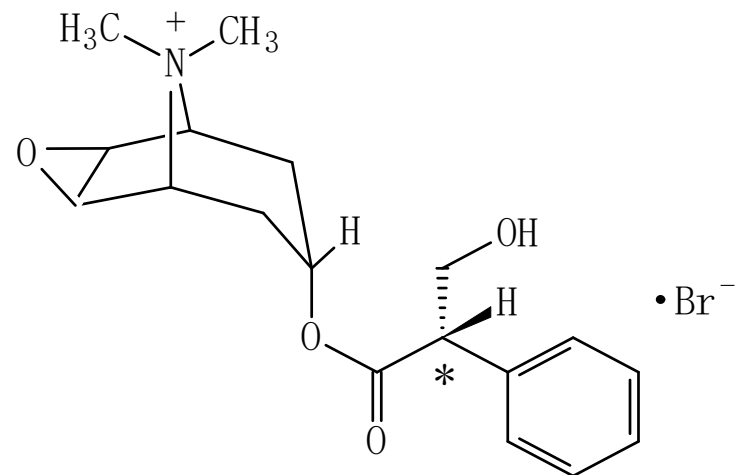
Scopolamine Butylbromide



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



樟柳碱
(Anisodine)



甲溴东莨菪碱
(Methscopolamin Bromide)

2. 碱性

- 阿托品和东莨菪碱结构中，五元脂环含有叔胺氮原子，较强的碱性，易于酸成盐，如阿托品 pK_{b1} 为4.35

3. 旋光性

- 氢溴酸东莨菪碱含有不对称碳原子，左旋体比旋度为 -24° 至 -27° 。阿托品虽然含有不对称碳原子，但外消旋化，无旋光性



第二节 鉴别反应



鉴别 反应

- 1 托烷生物碱的鉴别反应（Vitaili反应）
- 2 与硫酸-重铬酸钾的反应
- 3 与生物碱显色剂和沉淀剂的反应
- 4 光谱鉴别法
- 5 色谱法



一、托烷生物碱的鉴别反应（Vitaili反应）

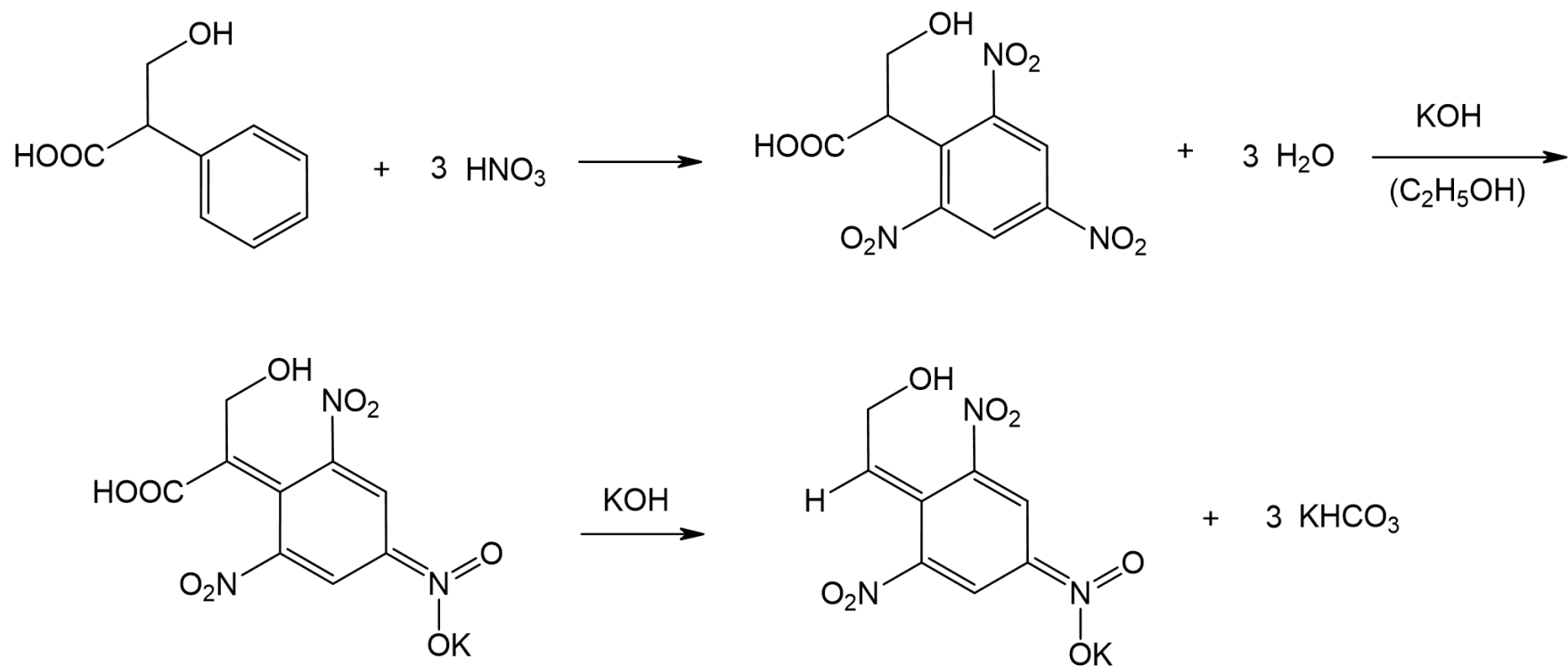


生成具有**共轭结构**的阴离子
而显**深紫色**

与发烟硝酸共热，得到黄色三硝基衍生物，放冷，加醇制氢氧化钾少许，即**脱羧**

阿托品、莨菪碱等托烷类生物碱
水解后生成莨菪酸，均可发生
Vitaili反应



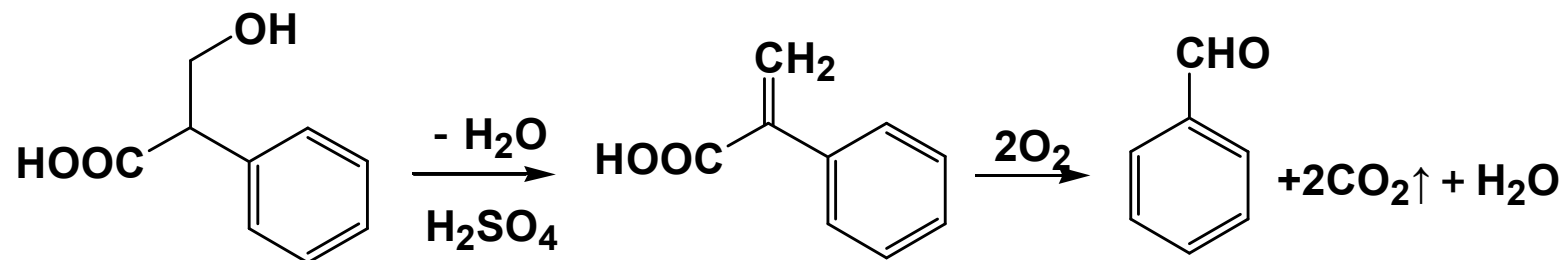


例1

- 氢溴酸山莨菪碱的鉴别：取本品约10mg，加发烟硝酸5滴，置水浴上蒸干，得黄色残渣，放冷，加乙醇2~3滴湿润，加固体氢氧化钾一小粒，即显深紫色。



二、与硫酸-重铬酸钾的反应



三、与生物碱显色剂和沉淀剂的反应

阿托品+氯化汞醇试液→黄色沉淀

东莨菪碱+氯化汞醇→白色复盐沉淀



取本品约10mg，加水1ml溶解后，置分液漏斗中

加氨试液使成碱性后，加三氯甲烷5ml，摇匀

即生成白色沉淀
(与阿托品及后马托品的区别)

分取三氯甲烷液，置水浴上蒸干，残渣中加二氯化汞的乙醇溶液1.5ml

氢溴酸东莨菪碱的鉴别



常用的生物碱沉淀试剂及反应

生物碱沉淀试剂	反应条件及结果
碘化铋钾试液（Dragendorff试剂）	橙红或棕红色沉淀
碘化钾碘试液（Wagnen试剂）	棕色或棕褐色沉淀
碘化汞钾试液（Mayen试剂）	在酸性或碱性溶剂中生成白色或淡黄色沉淀
三硝基苯酚试液（Hager试剂或苦味酸试液）	结晶性沉淀并有特定熔点
硅钨酸试液（Bertrend试剂）	白色、淡黄色或黄棕色沉淀
磷钨酸试液（Scheibler试剂）	酸性或中性溶液中，淡黄色沉淀



四、光谱鉴别法

UV

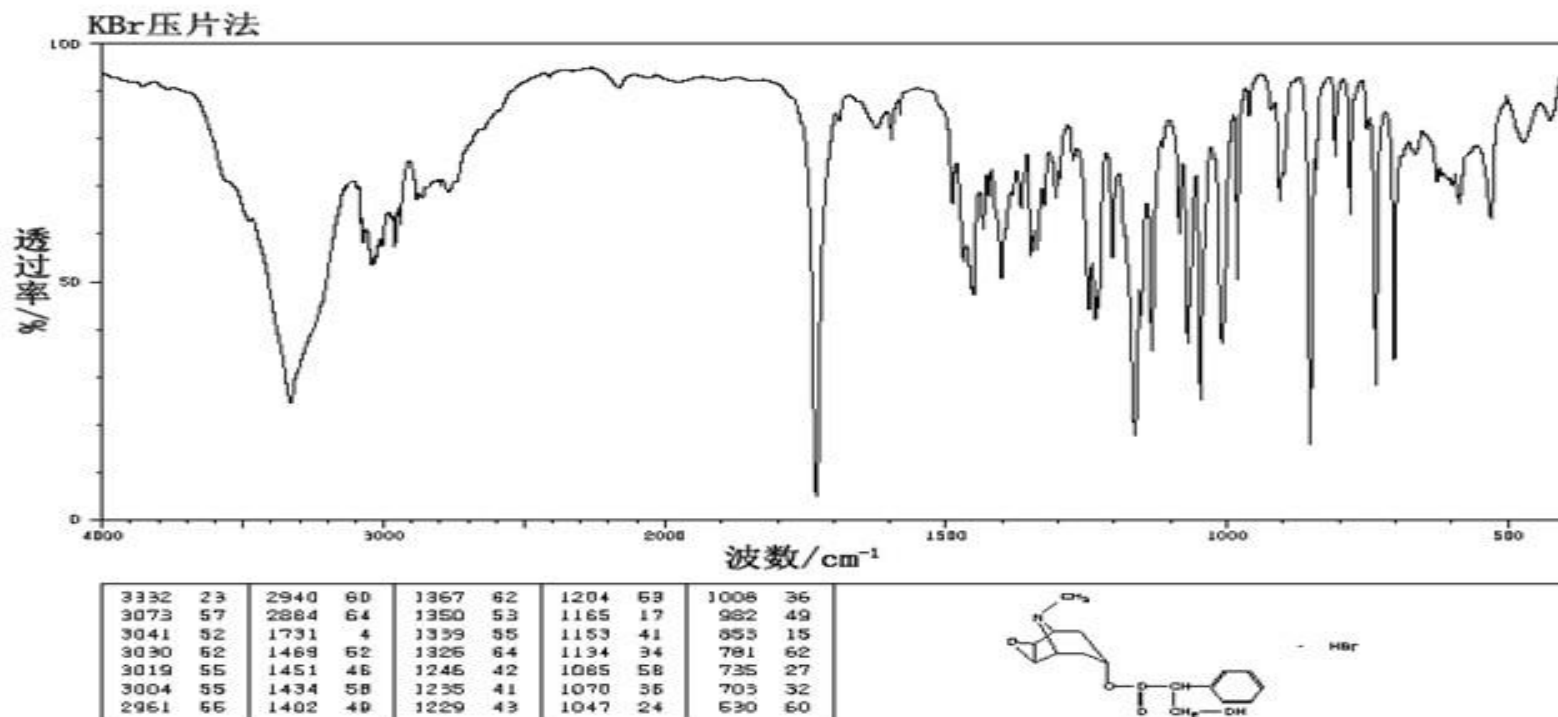
通过比较 $\lambda_{\max}$ 、 $\lambda_{\min}$ 或吸收光谱的一致性进行鉴别，也可比较其吸光度或吸收系数的比值来鉴别

IR

绝大多数生物碱原料药都采用
IR法鉴别



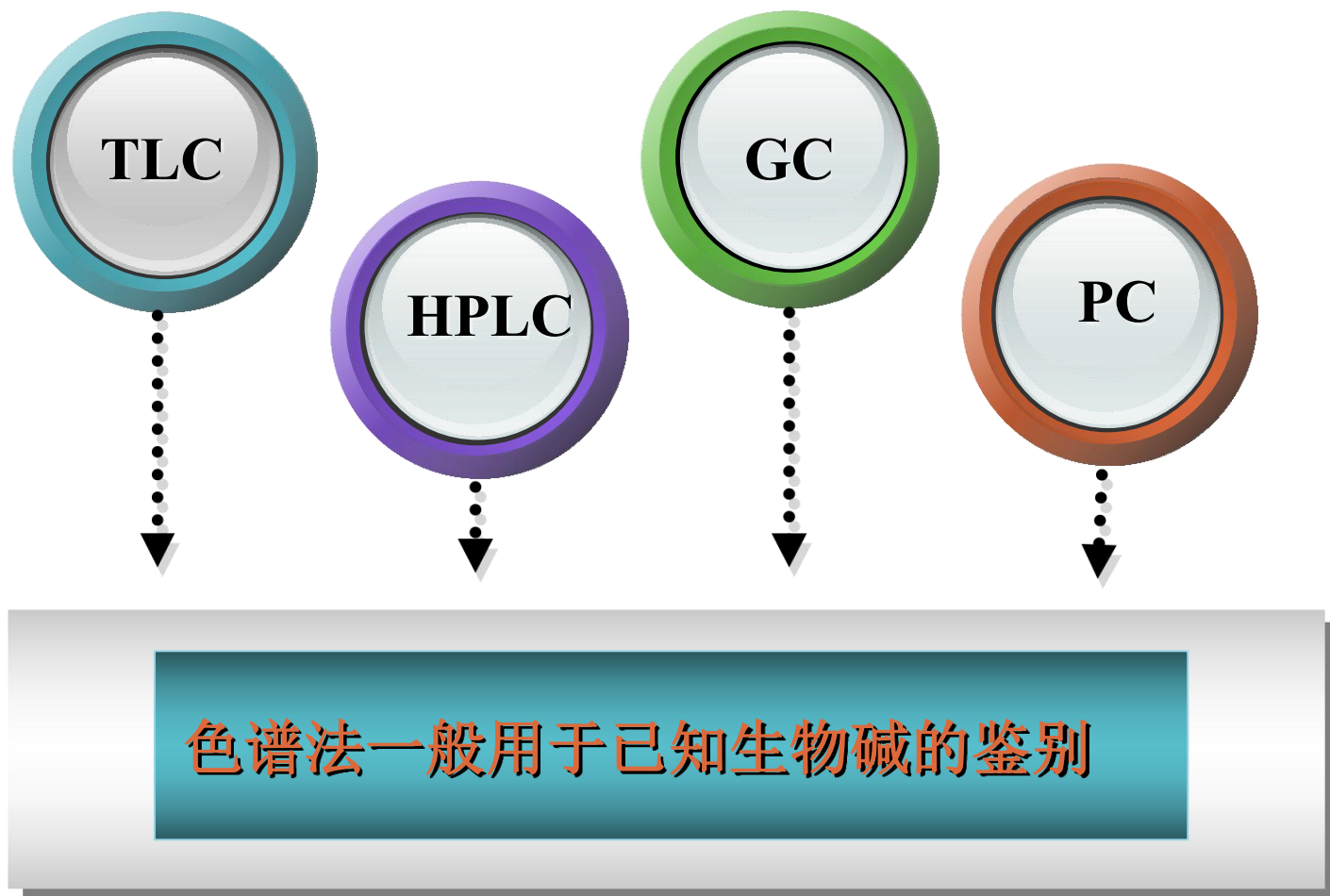
人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



氢溴酸东莨菪碱红外光谱

The infrared spectrum of Scopolamine Hydrobromide

五、色谱法



例4

- **Ch.P氢溴酸山莨菪碱注射液TLC鉴别：**取本品1ml，置水浴上蒸干。取残渣与消旋山莨菪碱对照品，分别加甲醇制成10mg /ml的溶液。照薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各10 μ l，分别点于同一氧化铝（中性，活度II~III级）薄层板上，以三氯甲烷-无水乙醇（95：5）为展开剂，展开，晾干，喷以稀碘化铋钾试液-碘化钾碘试液（1：1）。供试品溶液所显主斑点位置和颜色，应与对照品溶液的主斑点相同。



第三节

特殊杂质与检查

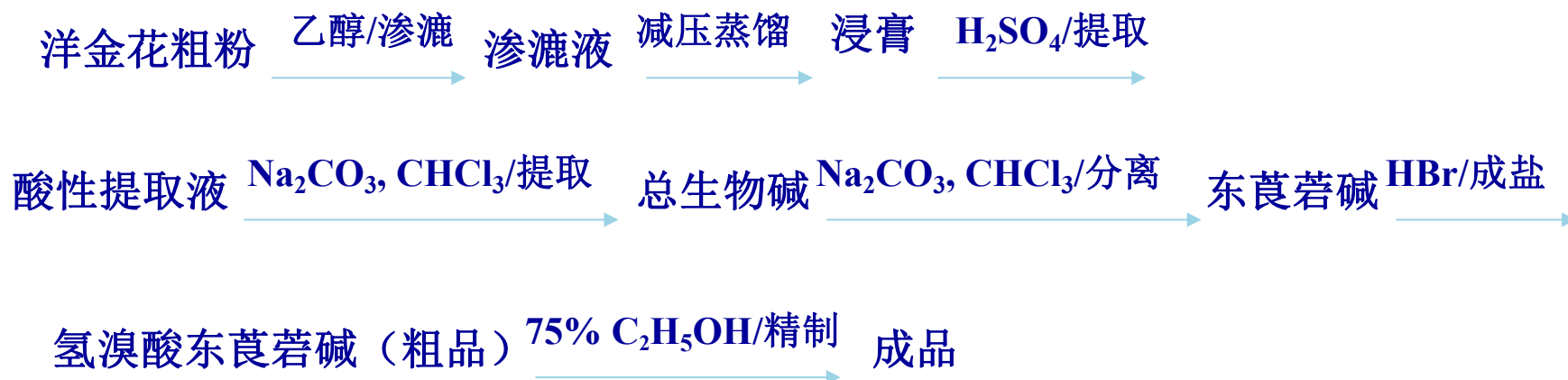


氢溴酸东莨菪碱中特殊杂质检查

- 氢溴酸东莨菪碱来源:

- 茄科植物颠茄、白曼陀罗、莨菪中等提取（我国，白曼陀罗的干燥品：洋金花中提取东莨菪碱，制成氢溴酸盐）

- 制备方法：渗漉法



酸度

取本品0.50g，加水
10ml溶解后，依法测
定（ChP2015版第四
部 0631），pH应为
4.0～5.5。—强酸弱碱

特殊杂质与检查

易氧
化物

取本品0.15g，加水5ml
溶解后，在15～20℃
加高锰酸钾滴定液
（0.02mol/L）0.05ml
10分钟内红色不得完
全消失。—阿扑东莨
菪碱、其他含有不饱
和双键的有机物质

其他生
物碱

取本品0.10g，加水2ml溶
解后，分成两等份：一份
中加氨试液2～3滴，不得
发生浑浊；另一份中加氢
氧化钾试液数滴，只许发
生瞬即消失的类白色浑浊。
—阿扑阿托品、颠茄碱



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

第四节 含量测定



- 方法要求：专属、灵敏
- 莨菪烷类抗胆碱药物的药理活性均较强，临床使用剂量较小（如硫酸阿托品片规格0.3mg、氢溴酸东莨菪碱片规格0.3mg等），所以需要采用专属灵敏的方法对它们进行含量及均匀度等的测定



补充-含量均匀度

除另有规定外，取供试品 10 个，照各品种项下规定的方法，分别测定每一个单剂以标示量为 100 的相对含量 x_i ，

求其均值 $\bar{X}$ 和标准差 $S \left[S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}} \right]$ 以及标示量与

均值之差的绝对值 $A (A = |100 - \bar{X}|)$ 。

若 $A + 2.2S \leq L$ ，则供试品的含量均匀度符合规定；

若 $A + S > L$ ，则不符合规定；

若 $A + 2.2S > L$ ，且 $A + S \leq L$ ，则应另取供试品 20 个复试。

根据初、复试结果，计算 30 个单剂的均值 $\bar{X}$ 、标准差 S 和标示量与均值之差的绝对值 A 。再按下述公式计算并判定。



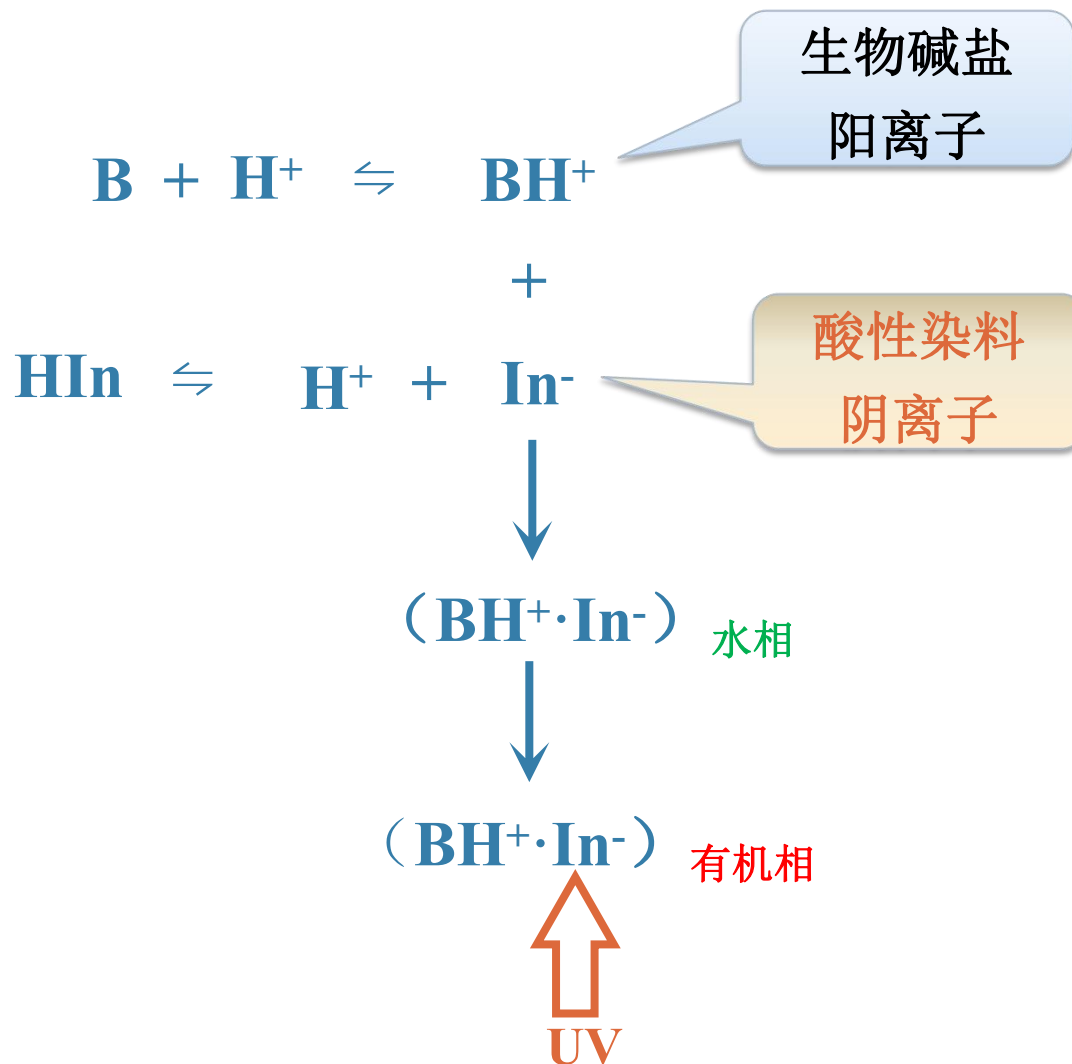
当 $A \leq 0.25L$ 时，若 $A^2 + S^2 \leq 0.25L^2$ ，则供试品的含量均匀度符合规定；若 $A^2 + S^2 > 0.25L^2$ 则不符合规定。

当 $A > 0.25L$ 时，若 $A + 1.7S \leq L$ ，则供试品的含量均匀度符合规定；若 $A + 1.7S > L$ ，则不符合规定。

上述公式中 L 为规定值。除另有规定外， $L = 15.0$ ；单剂量包装的口服混悬液、内充非均相溶液的软胶囊、胶囊型或泡囊型粉雾剂、单剂量包装的眼用、耳用、鼻用混悬剂、固体或半固体制剂 $L = 20.0$ ；透皮贴剂、栓剂 $L = 25.0$ 。



一、酸性染料比色法的基本原理



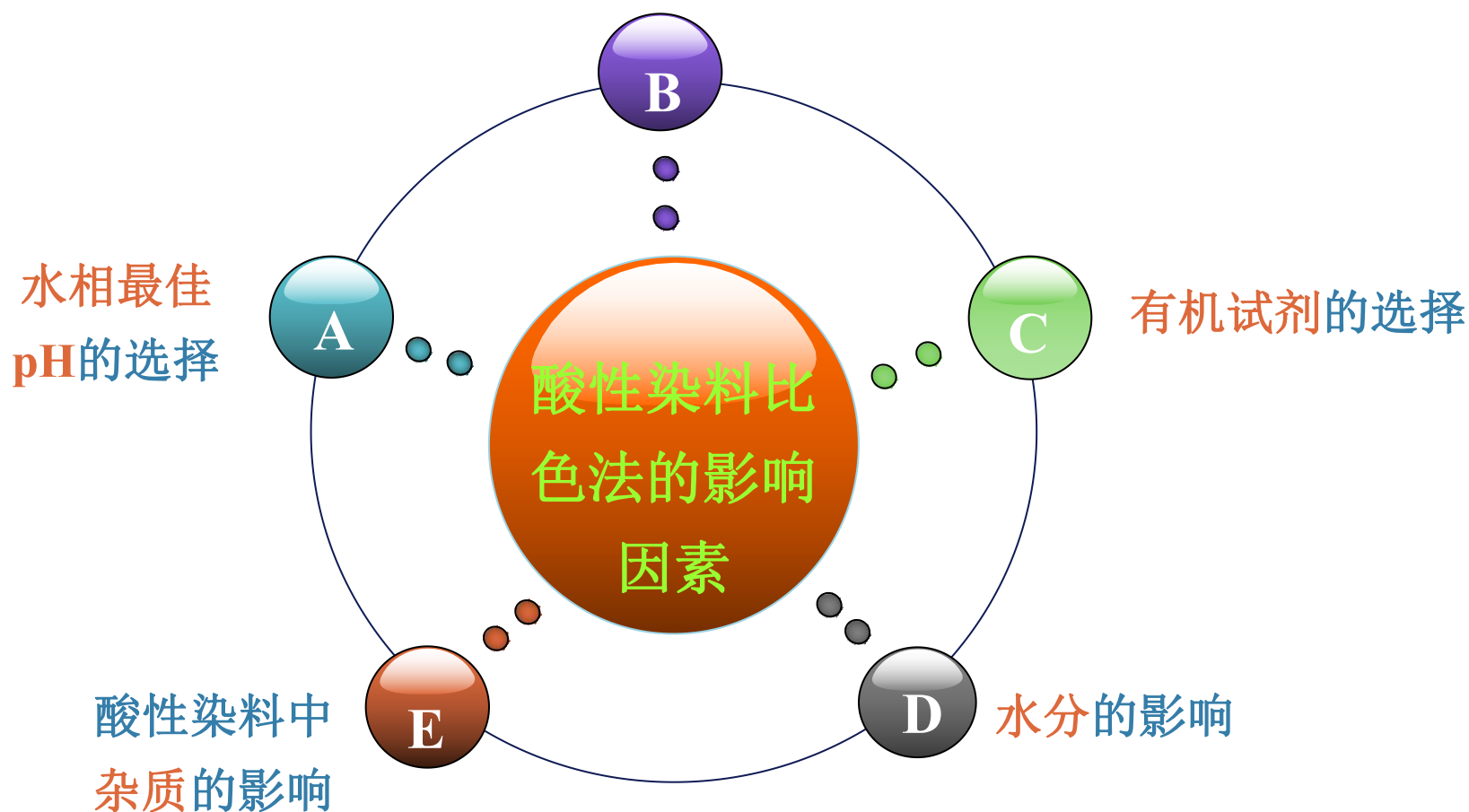
应用示例（13-13）

硫酸阿托品片的含量测定

- 精密量取对照品溶液和供试品溶液各2ml，分别置预先精密加入三氯甲烷10ml的分液漏斗中，各加溴甲酚绿溶液4ml，振摇提取后，静置使分层；分取三氯甲烷液，照紫外-可见分光光度法，在420nm波长处分别测定吸光度，计算，即得。



酸性染料的选择及其浓度



- 水相最佳pH：使得BH⁺和In⁻最多
- 酸性染料及其浓度：定量结合；对离子对的溶解性好；有较高的吸收度；足够量即可
- 有机溶剂的选择：提取效率高，三氯甲烷最理想
- 水分的影响：影响结果，脱水剂或滤纸除去水分
- 酸性染料中的有色杂质：有机溶剂萃取除去



- 溶液制备：取本品20片，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于硫酸阿托品2.5mg），置50ml容量瓶中，加水振摇使溶解并稀释至刻度，滤过，取续滤液，作为供试品溶液。另取硫酸阿托品对照品约25mg，精密称定，置25ml容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取5ml，置100ml容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。



- 测定法 精密量取对照品溶液和供试品溶液各2ml，分别置预先精密加入三氯甲烷10ml的分液漏斗中，各加溴甲酚绿2.0ml，振摇提取两分钟后，静置分层，分取澄清的三氯甲烷液，在420nm波长处分别测定吸光度，计算，并将结果与1.027相乘，即得本品 $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ 相当标示量的百分含量。

$$\text{百分标示量} = \frac{A_x / A_s \cdot C_s \times 50 \times 1.027 \times \overline{W}}{m \times \text{标示量}} \times 100\%$$

- 式中 A_x 、 A_s 分别为供试品和对照品溶液的吸光度； C_s 为对照品溶液的浓度mg/ml； m 为样品质量； $\overline{W}$ 为平均片重。1.027为硫酸阿托品 $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ 与硫酸阿托品对照品（无水硫酸阿托品） $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4$ 的质量换算系数。50为供试品溶液的稀释倍数。

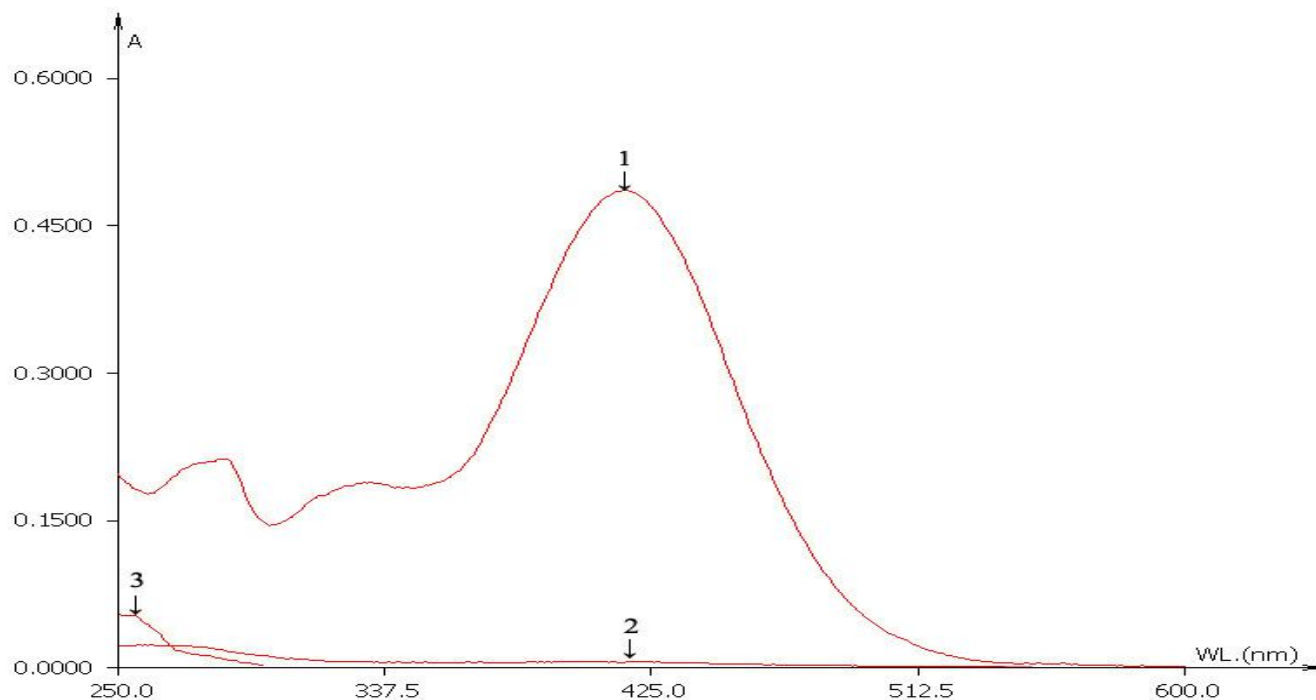
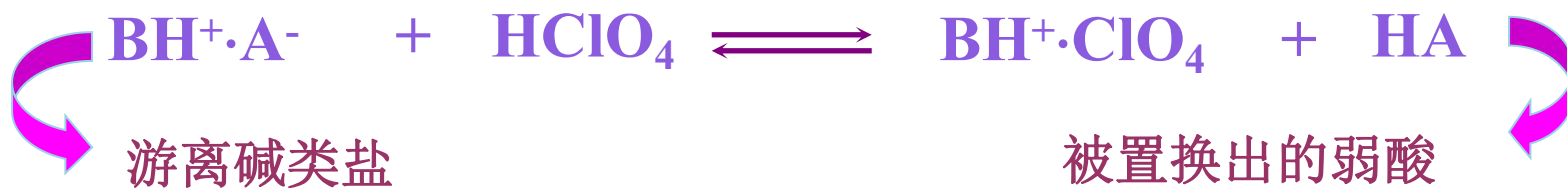


Fig. 13-2 The UV-spectra of atropine sulfate with BTB ions

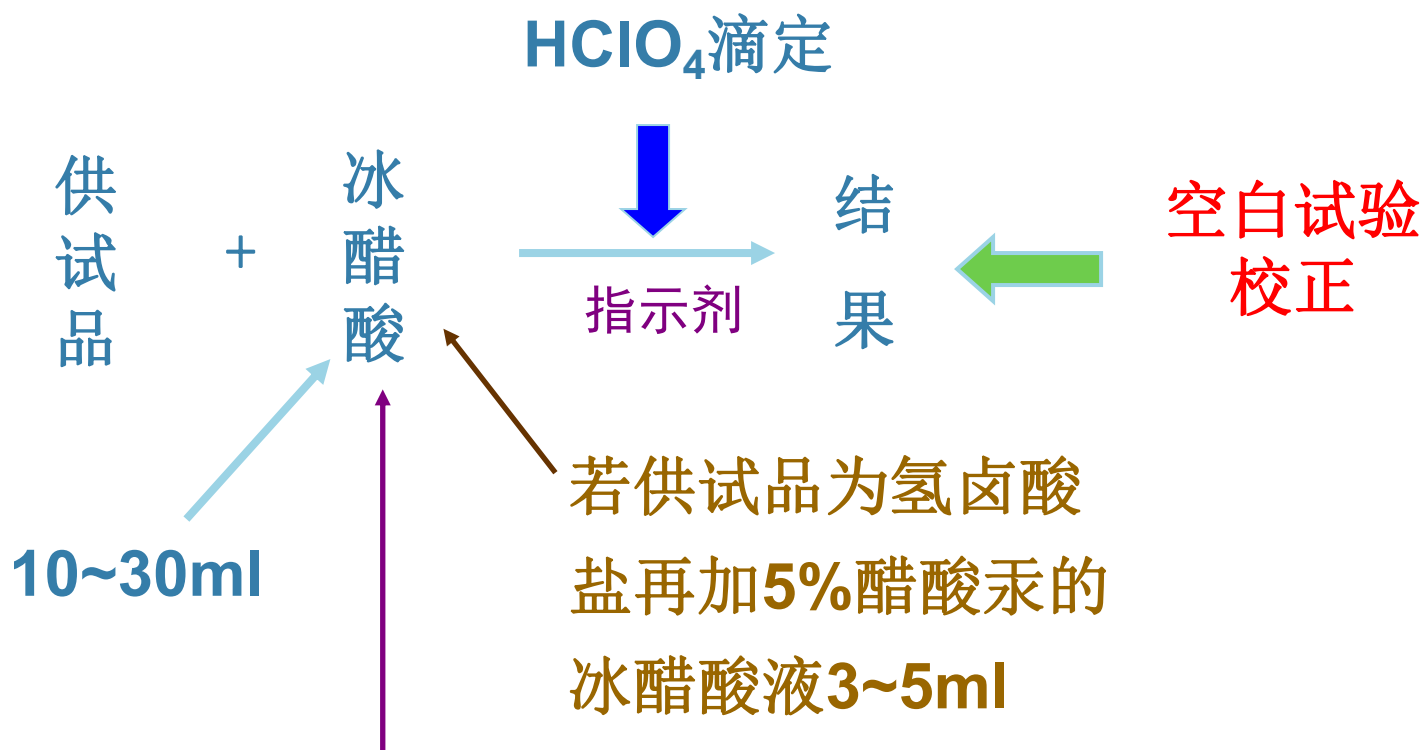
- 1.离子对 2.染料空白（对照品平行测定，空白吸收可被扣除）
3.阿托品（水溶液在420nm附近无吸收）

一、非水溶液滴定法

溶剂种类	使用范围	常用溶剂
酸性	有机弱碱	冰醋酸
碱性	有机弱酸	二甲基甲酰胺
两性	酸/碱	甲醇
惰性	酸/碱	甲苯、三氯甲烷、丙酮

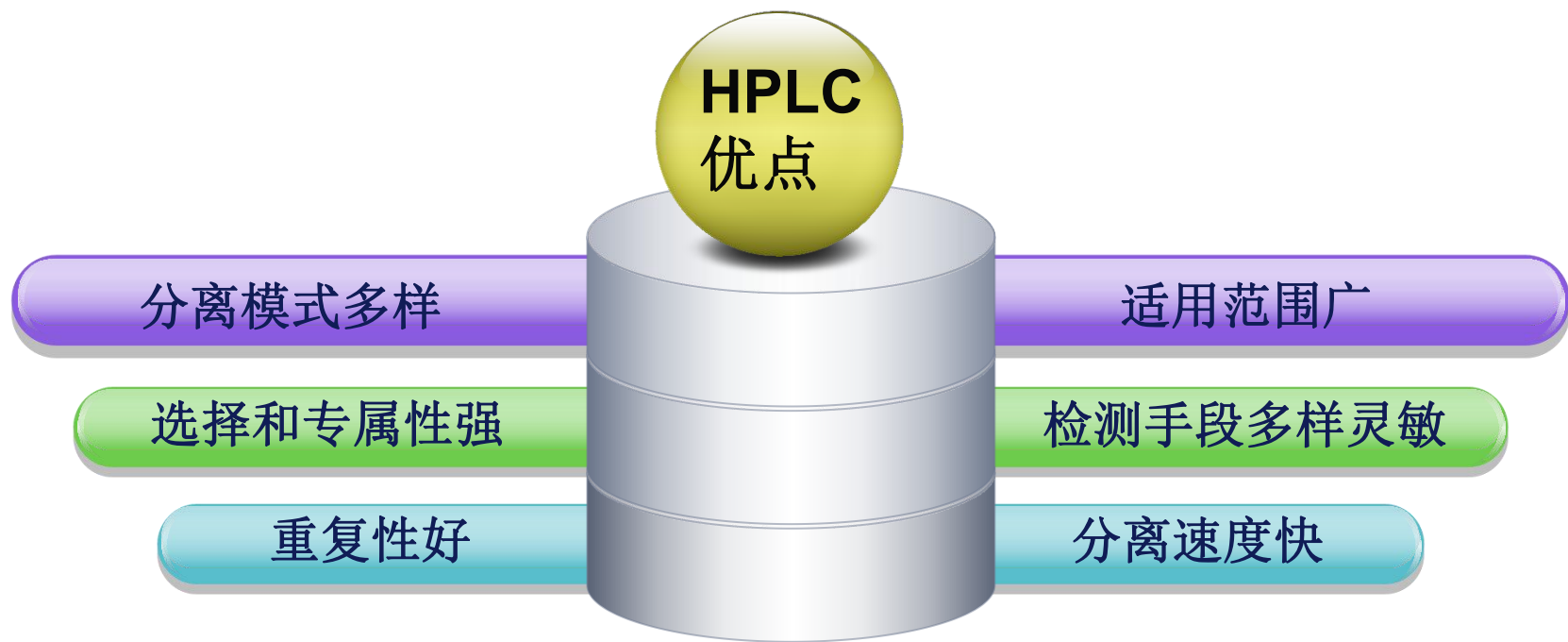


当HA酸性较强时，反应不能定量完成，必须除去或降低HA的酸性，使反应顺利地完



碱性溶液 $pK_b > 10$ ，冰醋酸中滴定突跃不明显，需加入醋酐，使碱性增强，突跃更明显





- 各国药典中采用HPLC法对茛菪类生物碱的含量和有关物质进行直接分析测定的比例不断增加。

- 在反相液相色谱条件下呈离子状态的药物，如有机碱类、有机酸类等

色谱保留常常较弱，从而影响到它们的含量或有关物质HPLC测定的专属性和准确度。

调整流动相的pH，抑制它们的解离，以改变色谱保留行为。但并不都能获得满意的结果。

采用离子对高效液相色谱法，可以改善它们的色谱保留行为，并实现准确测定。



离子对色谱法

- 在反相液相色谱条件下呈离子状态的药物，如有机碱类、有机酸类等。
- 分析碱性物质时常用的离子对试剂为烷基磺酸盐阴离子对试剂。如戊烷磺酸钠、庚烷磺酸钠、十二烷基磺酸钠等。另外，高氯酸、三氯醋酸、磷酸、十二烷基硫酸钠等也可与多种碱性样品形成离子对。
- 分析酸性物质时常用季铵盐阳离子对试剂。如四丁基溴化铵、四丁基氢氧化铵等。



- 影响离子对形成的条件，均影响被测组分的保留。如反离子的种类、性质与浓度，流动相的组成、pH及离子强度等，均应选择恰当，以利于离子对在色谱柱上的保留与分离。离子对试剂非极性部分越大，形成的离子对分配系数越大，反相色谱保留则越强。

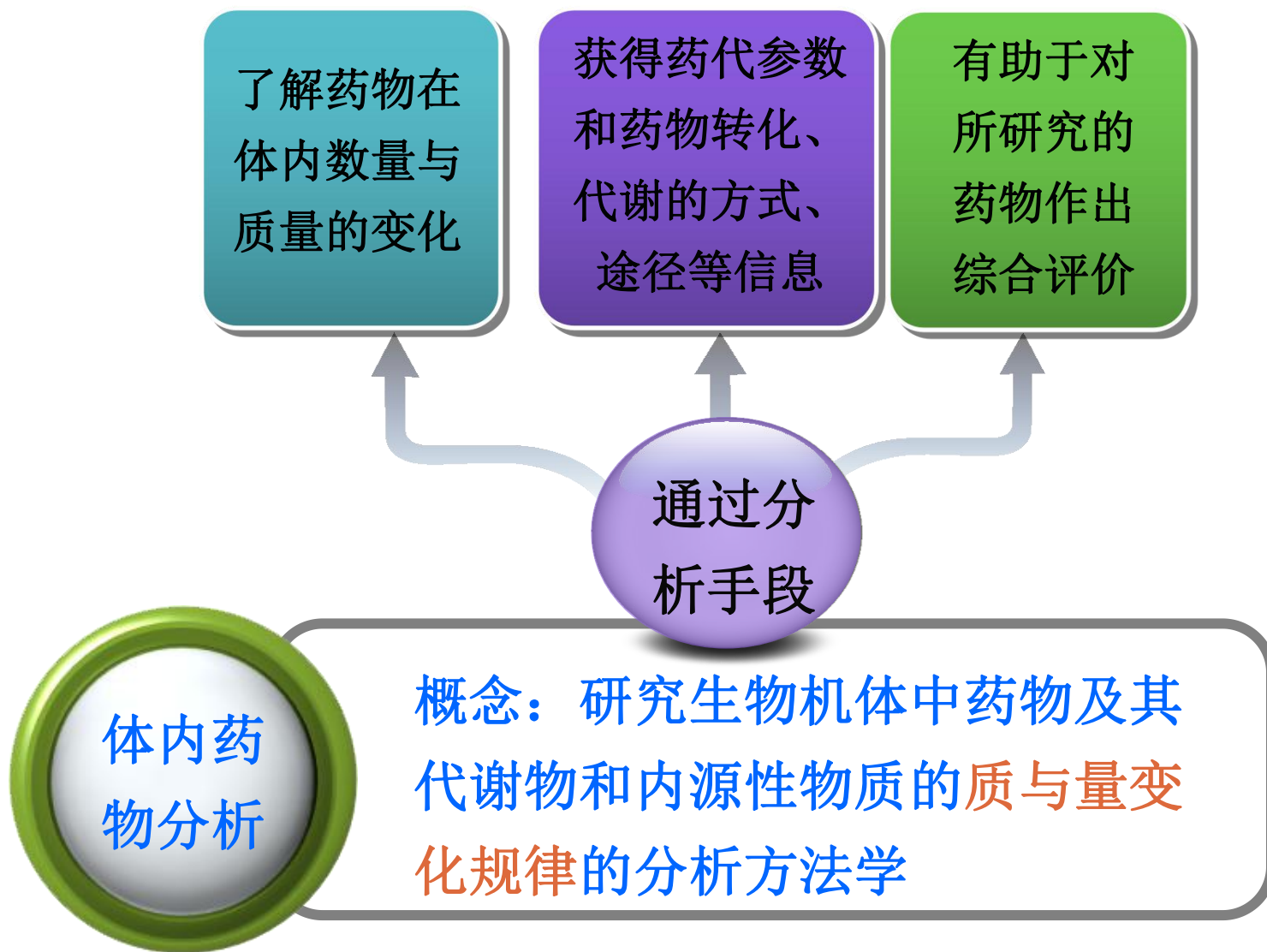


- 离子对色谱法常用ODS柱，流动相由甲醇-水或乙腈-水溶液等组成，水相由具有适宜pH的缓冲溶液所构成，同时含有3~10mmol/L适宜的离子对试剂。
- 萜萜烷类药物HPLC分析测定时，常采用烷基磺酸盐作为离子对试剂，流动相一般呈酸性，以利于碱性药物的质子化。

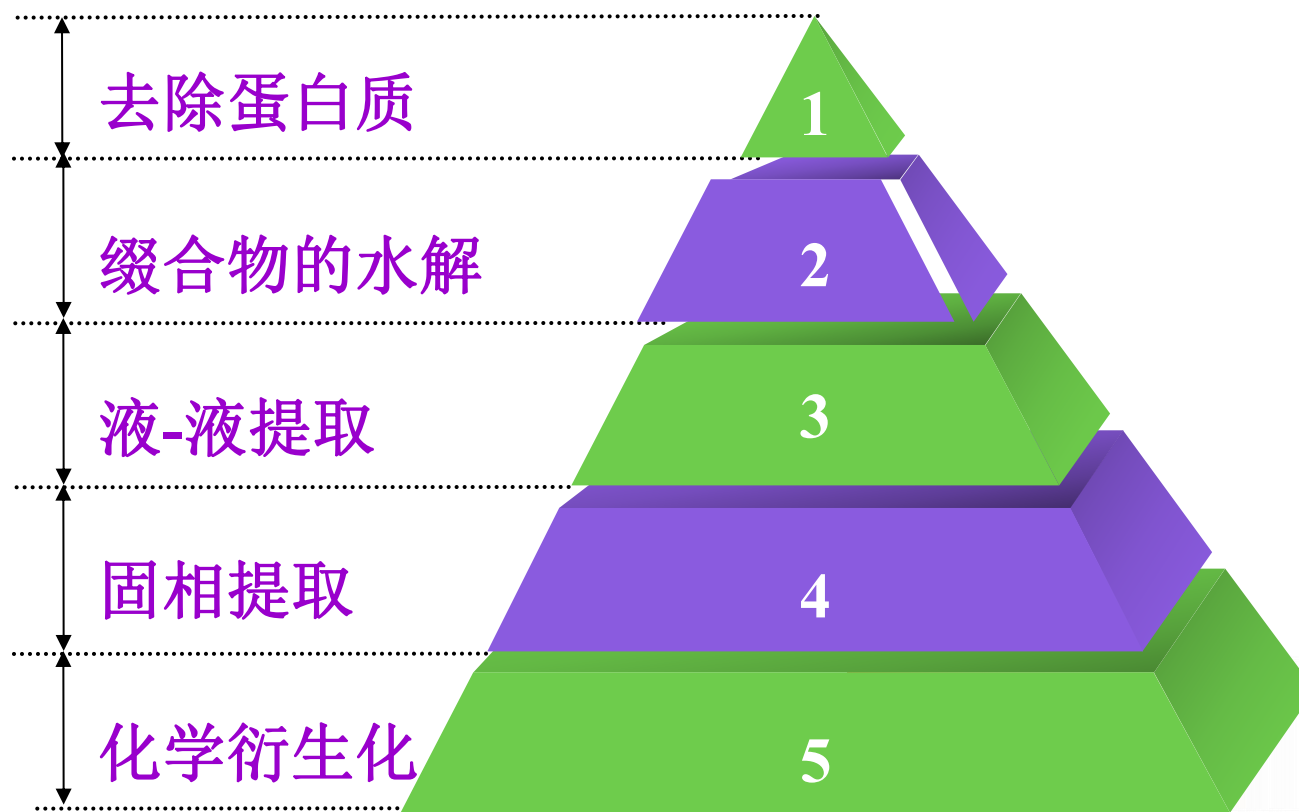


第五节 体内药物分析





- 生物样品组成复杂，干扰杂质多，一般需经分离、纯化，排除干扰后才能进行测定



存在问题

有些药物的生物样品即使经预处理和富集，采用HPLC-UV测定时仍有干扰；而且对于小剂量或生物利用度低的药物，采用UV检测，甚至荧光检测时，灵敏度也不能满足要求

解决办法

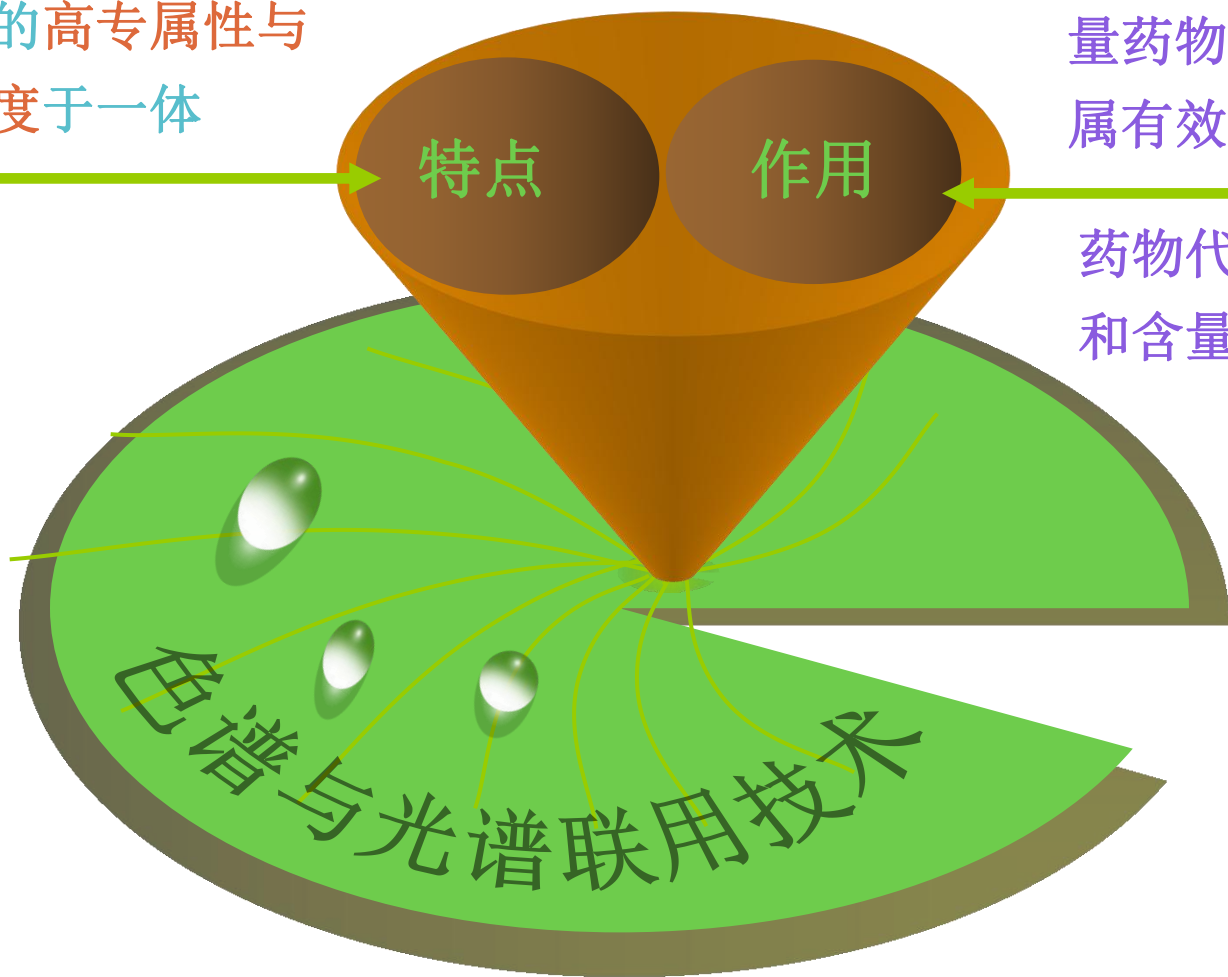
现代色谱和光谱的联用技术集色谱的高分离效能和光谱的高专属性与高灵敏度于一体，尤其是液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS），对于绝大多数有机碱性药物的检测限能达10pg/ml



集色谱的高分离效能
和光谱的高专属性与
高灵敏度于一体

复杂生物样品中微
量药物定量测定专
属有效的方法

药物代谢物定性鉴定
和含量测定常用的方法



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

例

人血浆和皮下脂肪组织
中东莨菪碱的测定

介绍莨菪烷类药物的
液-质联用测定法

介绍生物样品在体
取样的微透析技术

实验步骤如下



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

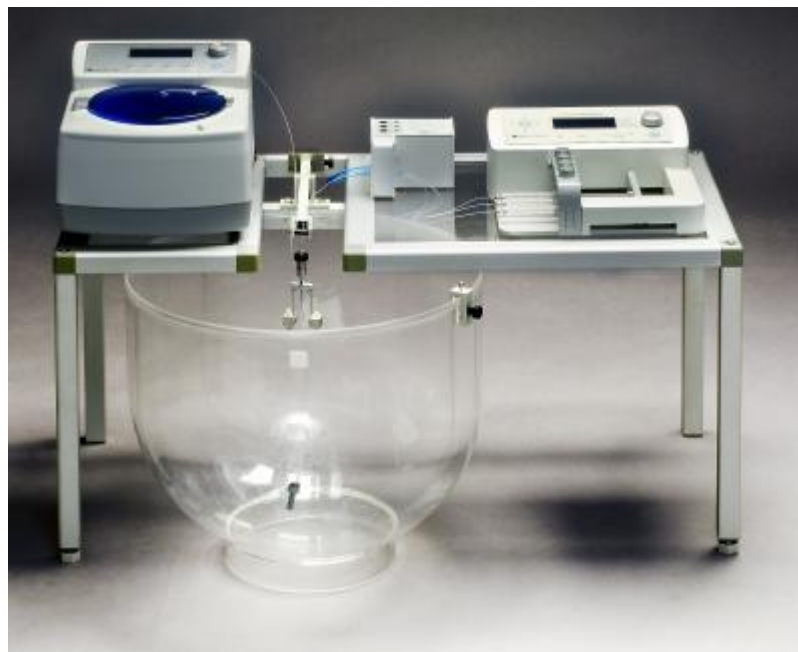
血浆中东莨菪碱的测定



皮下脂肪中东莨菪碱的测定



探针



微透析设备

微透析探针包埋在皮下脂肪组织的间隙内，每间隔20分钟获取一次微透析样品



High-performance liquid chromatography-Mass spectrometry

HPLC/MS

单级质谱

HPLC-tandem Mass spectrometry

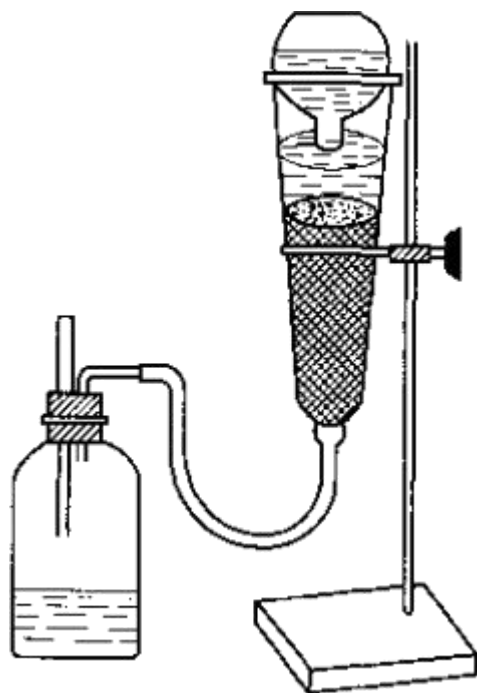
HPLC-MS/MS

多级质谱

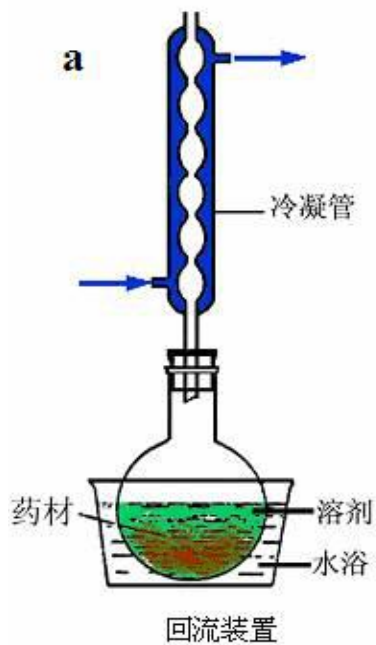


人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

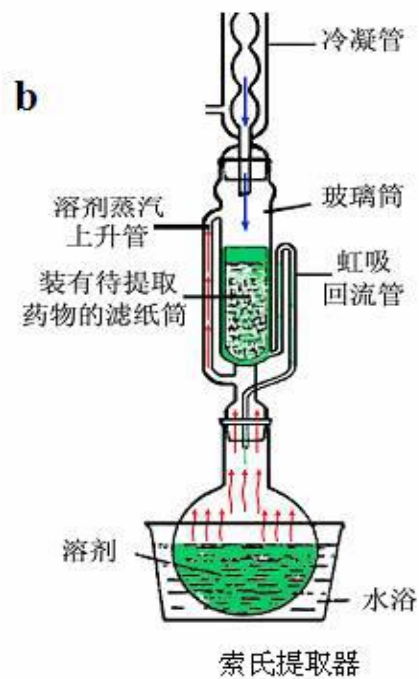




渗漉



热回流



索氏提取

Thank you very much!



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE