

药物分析

第十章

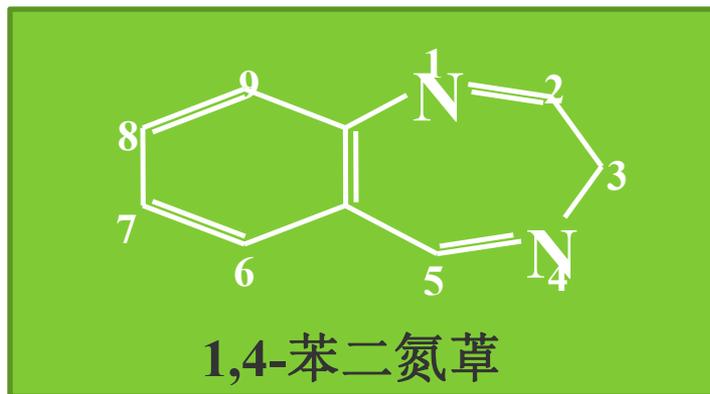
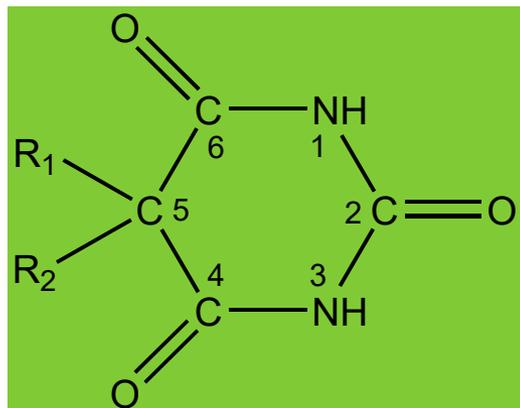
巴比妥及苯二氮草类镇静 催眠药物的分析



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

- 巴比妥类和苯二氮草类药物均为临床上广泛应用的镇静催眠药
- 结构独特，分析具有代表性



- 易被滥用须监测，临床也多见抢救，常常需要快速鉴别与分析



第一节

巴比妥类药物的分析



一
巴比妥类药物的结构与性质

二
鉴别实验

三
特殊杂质检查

巴比妥类药物的分析

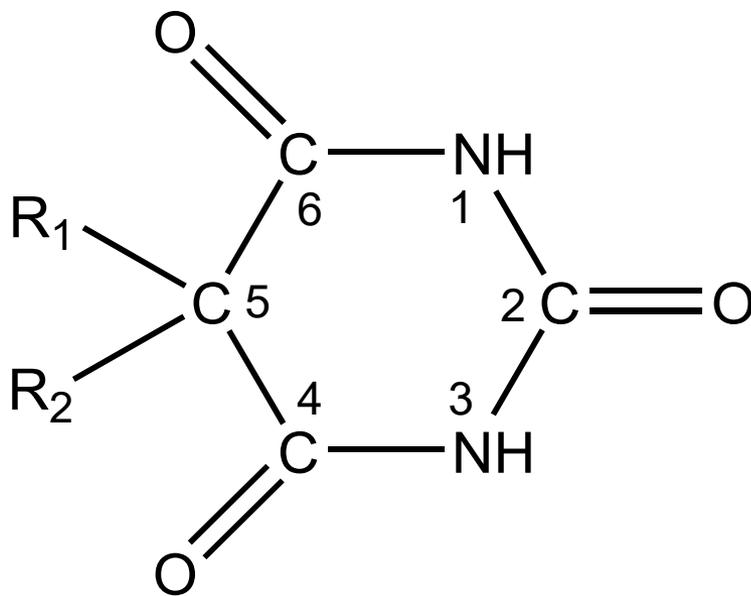
四
含量测定

五
体内药物分析

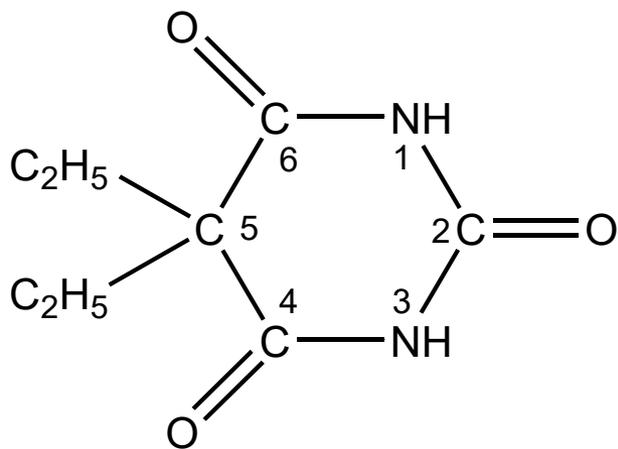


一、巴比妥类药物的结构与性质

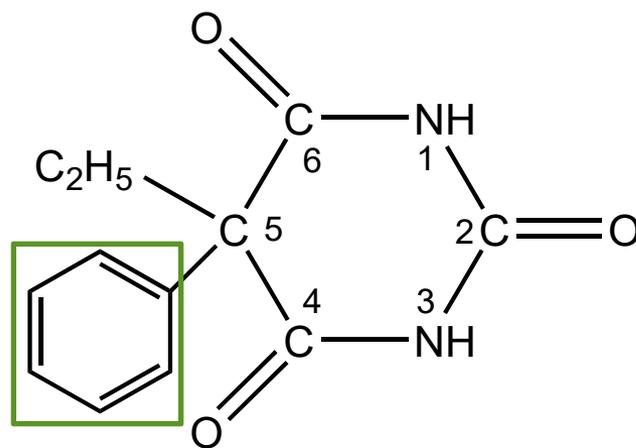
巴比妥类药物的基本结构通式



5,5-取代的巴比妥类药物

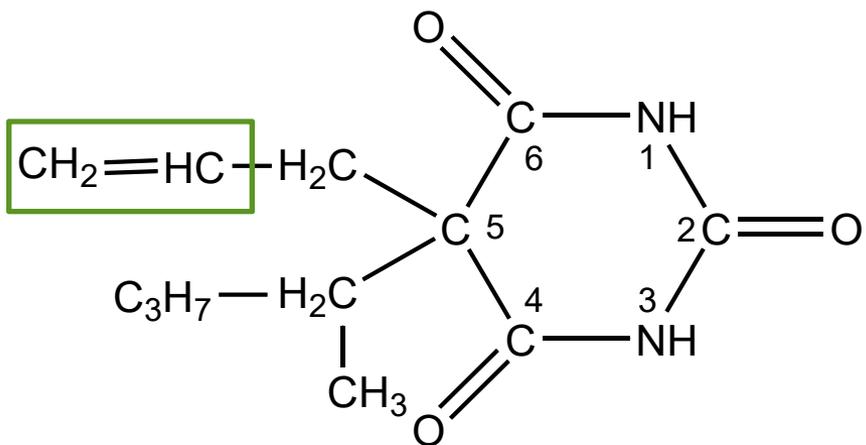


巴比妥

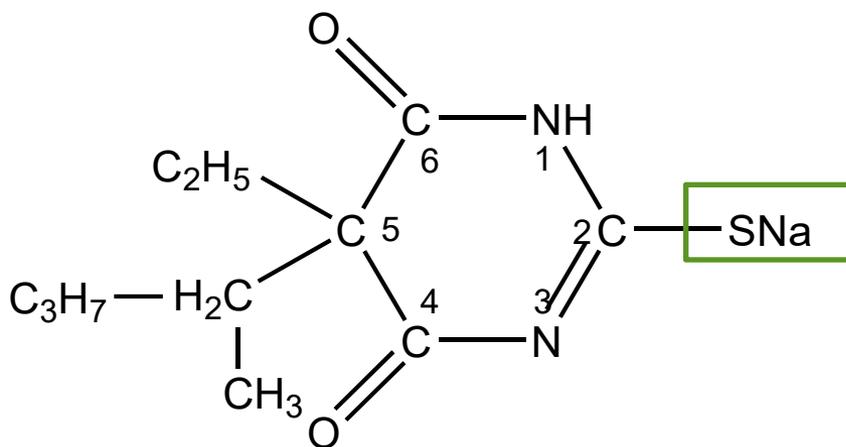


苯巴比妥





司可巴比妥



硫喷妥钠

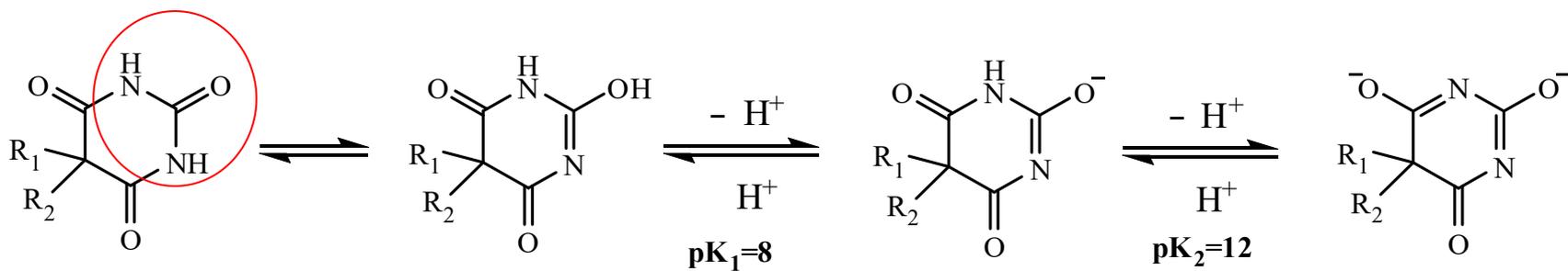
巴比妥类药物的主要理化性质

- 巴比妥类药物通常为白色结晶或结晶性粉末，具有一定的熔点
- 在空气中稳定，加热多能升华
- 该类药物一般微溶或极微溶于水，易溶于乙醇等有机溶剂；其钠盐则易溶于水，而难溶于有机溶剂
- 六元环结构比较稳定，遇酸、氧化剂、还原剂时，一般情况下环不会破裂，但与碱液共沸时则水解开环，并产生氨气

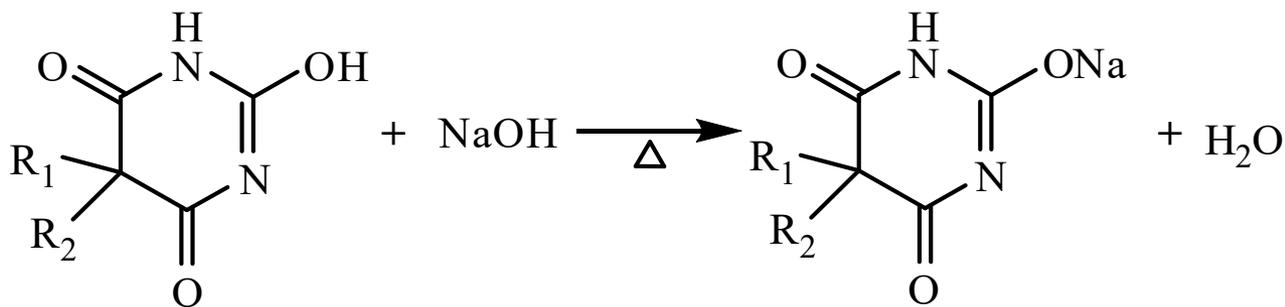


1.弱酸性

- 巴比妥类药物分子结构中都有1,3-丙二酰脲基团，能发生酮式和烯醇式的互变异构，在水溶液中可以发生二级电离。

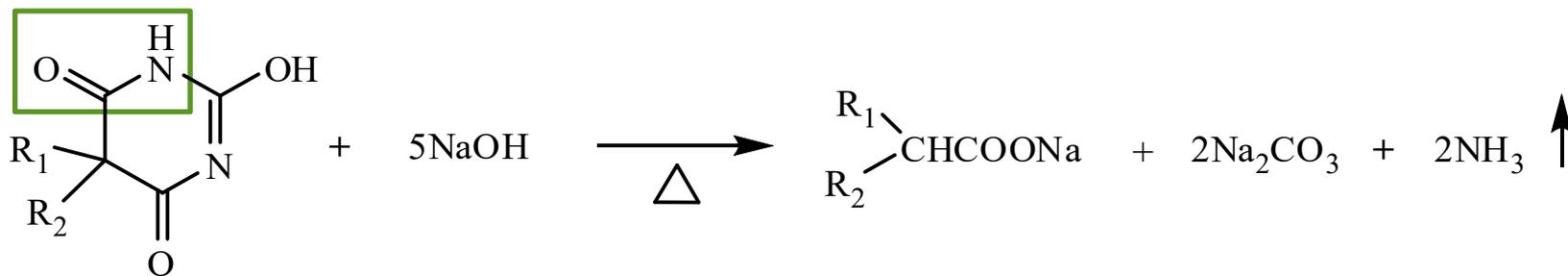


- 由于本类药物具有弱酸性 ($pK_a 7.3 \sim 8.4$)，故可与强碱反应生成水溶性的盐类，一般为钠盐



2.水解反应

- 巴比妥类药物的分子结构中含有丙二酰脲结构，与碱液共沸即水解，释放出氨气，可使红色石蕊试纸变蓝。

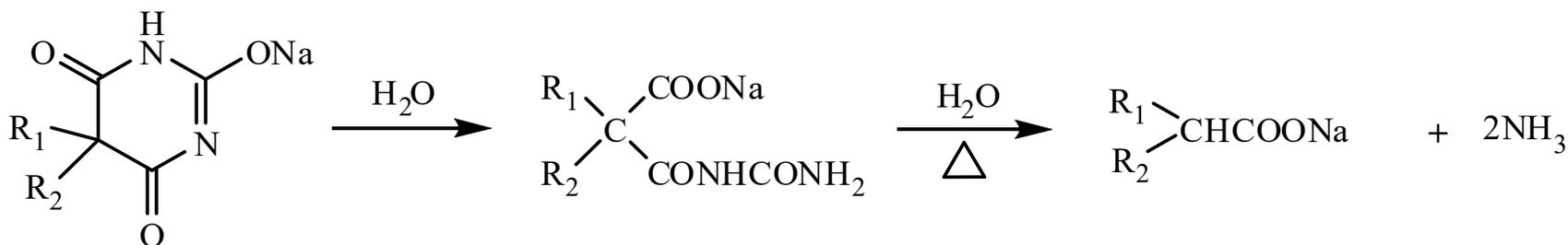


- 此反应被用于鉴别异戊巴比妥和巴比妥

➤ 示例 JP15巴比妥的鉴别：取巴比妥0.2g，加氢氧化钠试液10ml，加热煮沸，则产生具氨臭的气体，可使红色石蕊试纸变蓝。



- 本类药物的钠盐，在吸湿的情况下也能发生水解。一般情况下，在室温和pH10以下水解较慢；pH11以上随着碱度的增加水解速度加快。



3.与金属离子的反应

- 巴比妥类药物分子结构中含有丙二酰脲（-CONHCONHCO-）基团，在合适pH的溶液中，可与某些重金属离子，如 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 等反应呈色或产生有色沉淀

(1) 与银盐的反应

(3) 与钴盐的反应

(2) 与铜盐的反应

(4) 与汞盐的反应

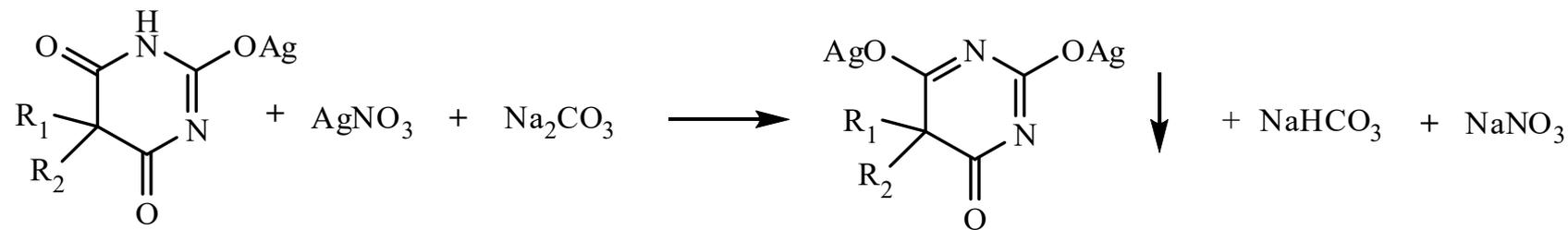
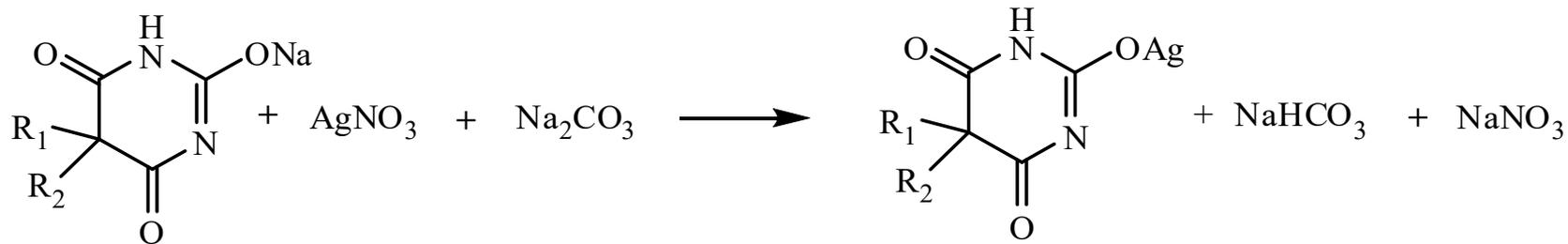


(1) 与银盐的反应

丙二酰脲类的反应

- 在碳酸钠溶液中，生成钠盐而溶解，
- 再与硝酸银溶液反应，首先生成可溶性的一银盐，加入过量的硝酸银溶液，则生成难溶性的二银盐白色沉淀。





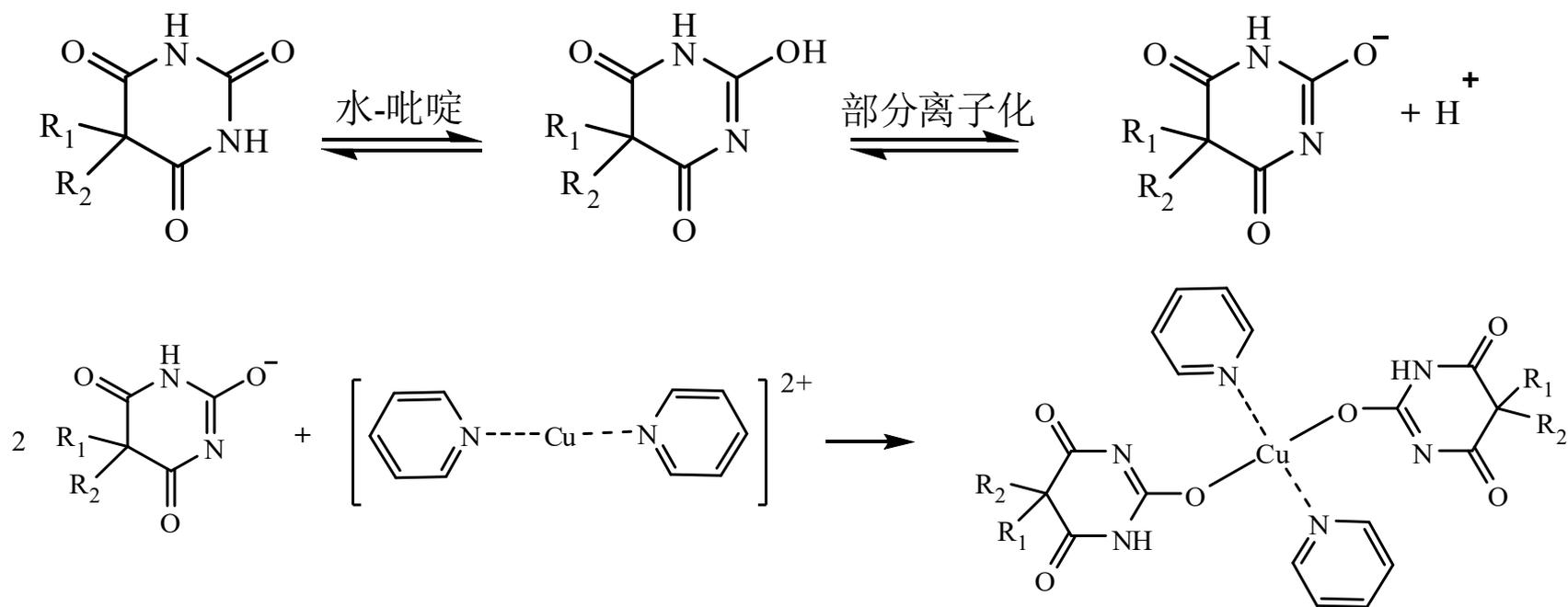
- 此反应可用于本类药物的鉴别和含量测定

(2) 与铜盐的反应

丙二酰脲类的反应

- 在吡啶溶液中生成的烯醇式异构体
- 与铜吡啶试液反应，形成稳定的配位化合物，即：产生类似双缩脲的呈色反应

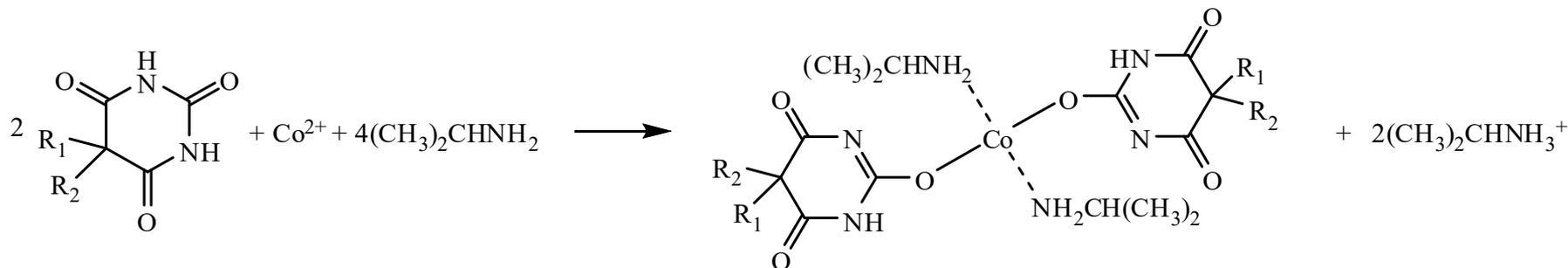




- 巴比妥类药物呈紫堇色或生成紫色沉淀
- 含硫巴比妥类药物则呈现绿色沉淀
- 可以用来区别巴比妥类和硫代巴比妥类药物。

(3) 与钴盐的反应

- 巴比妥类药物在碱性溶液中可与钴盐反应，生成紫堇色配位化合物

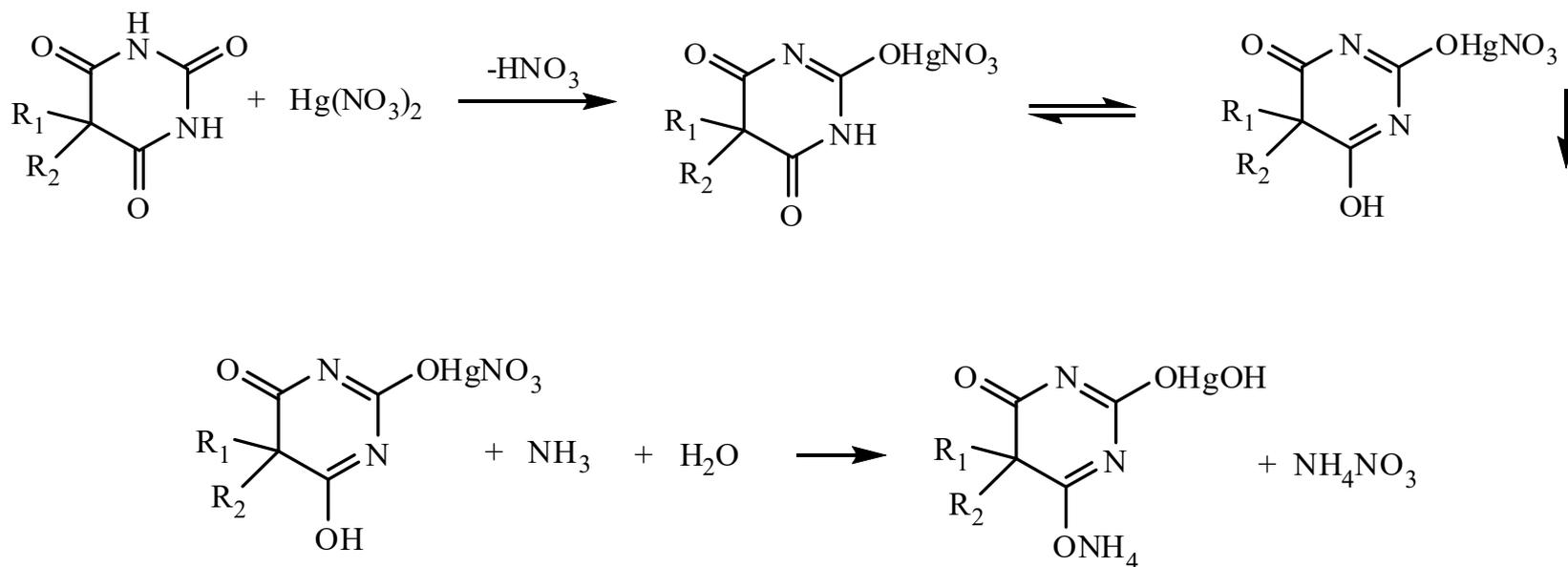


- 注意事项：反应在无水条件下比较灵敏，生成的有色产物也较稳定，因此，所用试剂应不含水分。



(4) 与汞盐的反应

- 巴比妥类药物与硝酸汞或氯化汞溶液反应，可生成白色汞盐沉淀，此沉淀能在氨试液中溶解



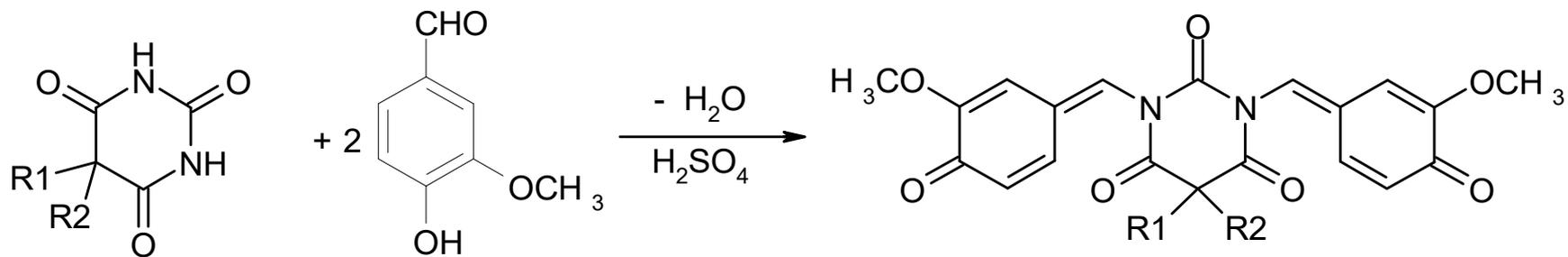
4.与香草醛的反应

- 巴比妥类药物分子结构中，丙二酰脲基团中的氢比较活泼，可与香草醛在浓硫酸存在下发生缩合反应，生成棕红色产物

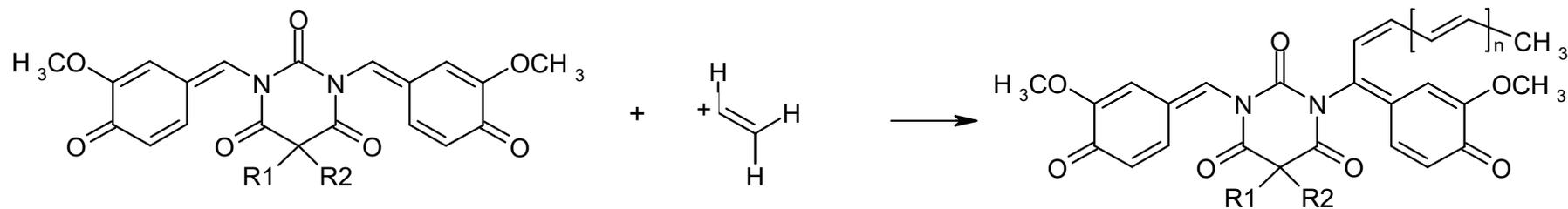
示例 BP2009戊巴比妥的鉴别：

- 取戊巴比妥10mg，加香草醛10mg，再加硫酸2ml，混合后，水浴加热2分钟，显棕红色。放冷，小心加入乙醇5ml，颜色先变为紫色，再变为蓝色。

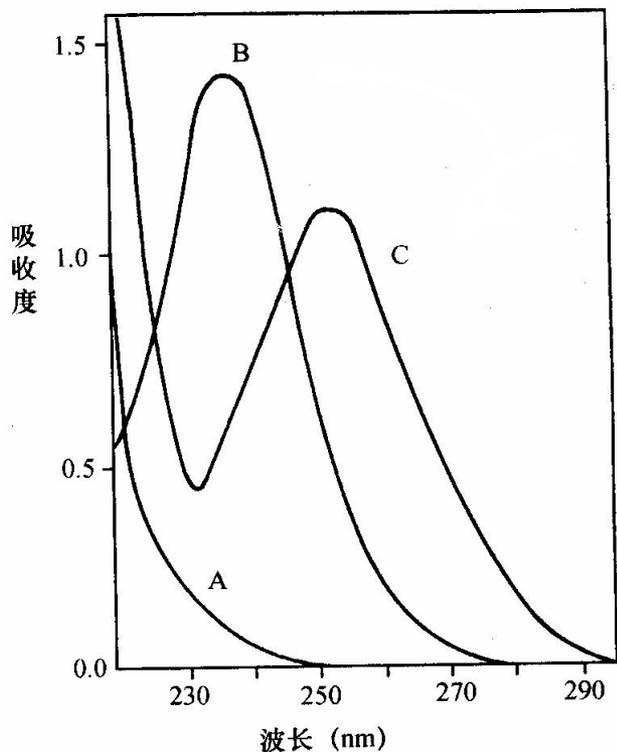




加入甲醇后:



5.紫外吸收光谱特征



A.0.05mol/LH₂SO₄溶液（未电离）；

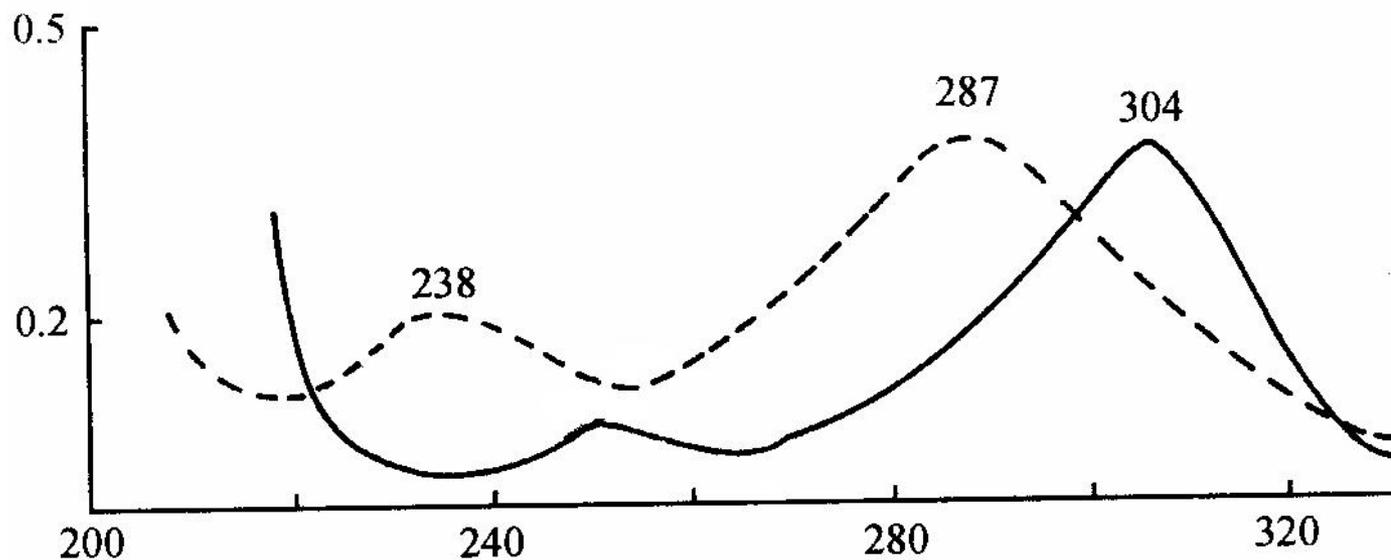
B.pH9.9缓冲溶液（一级电离）；

C.0.1mol/LNaOH溶液（二级电离）

巴比妥类药物的紫外吸收光谱（2.5 mg/100ml）

- 紫外吸收光谱特征和其电离的程度有关





磺喷妥的紫外吸收光谱

---:0.1mol/L HCl溶液;

—:0.1mol/L NaOH溶液



6. 薄层色谱行为特征

- 巴比妥类药物具有不同的分子结构，则其色谱行为亦不同，可用于鉴别，常用方法主要为薄层色谱法。

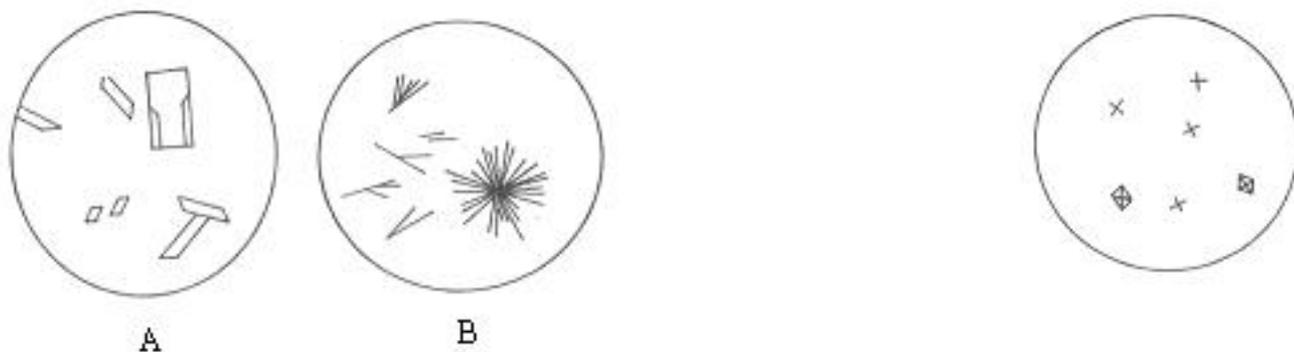
示例 BP2010中苯巴比妥的TLC鉴别：

- 取苯巴比妥供试品和对照品各适量，分别加乙醇制成每1ml中约含1mg的溶液作为供试品和对照品溶液，各量取10 μ l，分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上，以三氯甲烷-乙醇-浓氨水（80：15：5）混合液的下层溶液为展开剂，展开后，晾干，立即于254nm紫外光下检测。供试品溶液的主斑点位置和大小与对照品溶液的均一致。



7. 显微结晶

- 巴比妥类药物可根据其本身或与某种试剂的反应产物的特殊晶型，进行同类或不同类药物的鉴别



巴比妥与苯巴比妥的显微结晶示意图

巴比妥铜吡啶结晶示意图

A. 巴比妥结晶； B. 苯巴比妥结晶

二、鉴别试验

(一) 丙二酰脲反应

- 巴比妥类药物母核的反应



(二) 特征基团反应

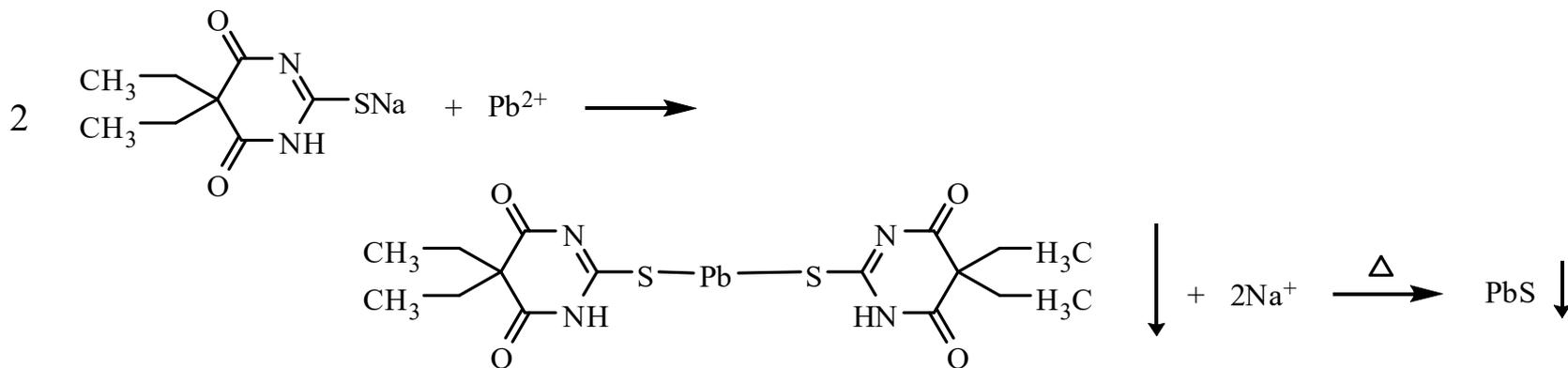
1. 硫元素的鉴别试验

- 硫代巴比妥类分子中含有硫元素，可在氢氧化钠溶液中与铅离子反应生成白色沉淀；加热后，沉淀转变为硫化铅。本试验可供硫代巴比妥类与巴比妥类的区别。



示例 ChP中注射用硫喷妥钠的鉴别

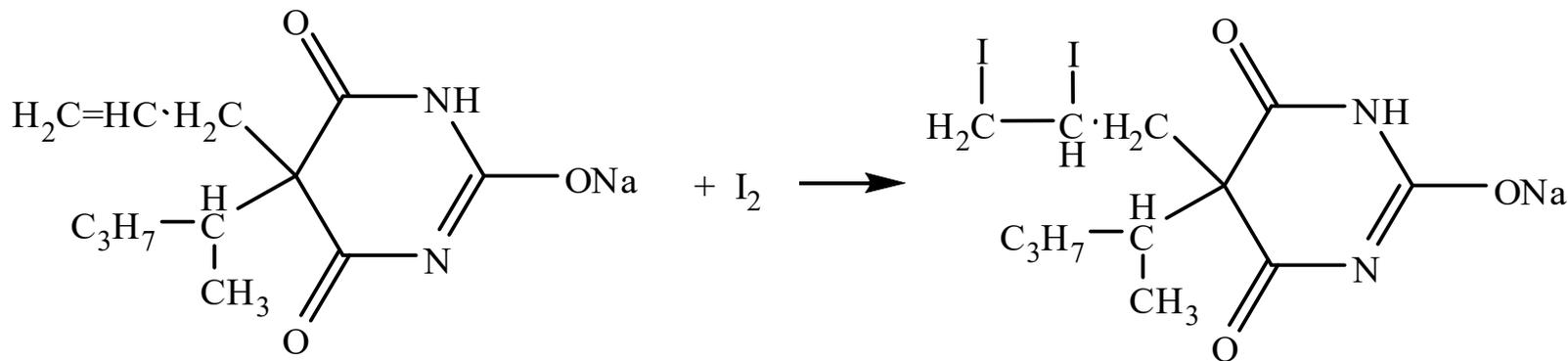
- 取本品约0.2g，加氢氧化钠试液5ml与醋酸铅试液2ml，生成白色沉淀；加热后，沉淀变为黑色。



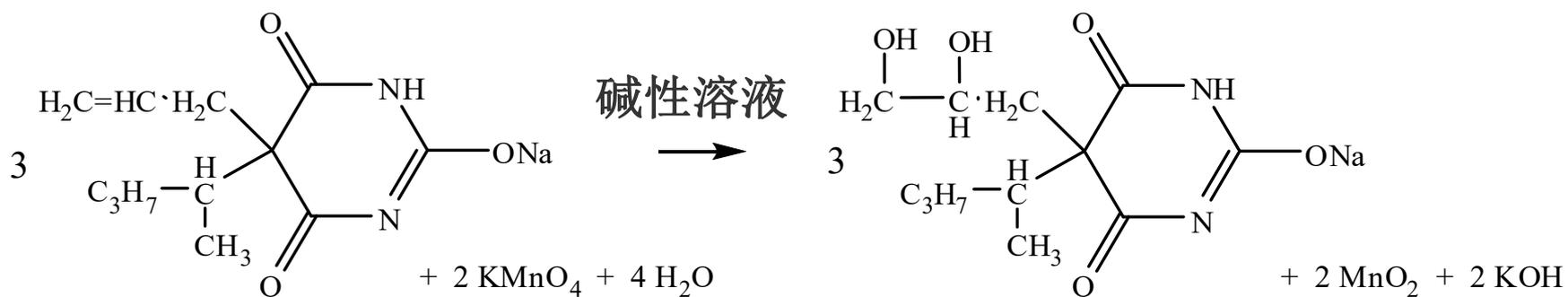
2. 司可巴比妥（不饱和取代基）的鉴别试验

(1) 与碘试液的反应

- 不饱和键可与碘、溴或高锰酸钾作用，发生加成反应或氧化反应，而使碘、溴或高锰酸钾褪色



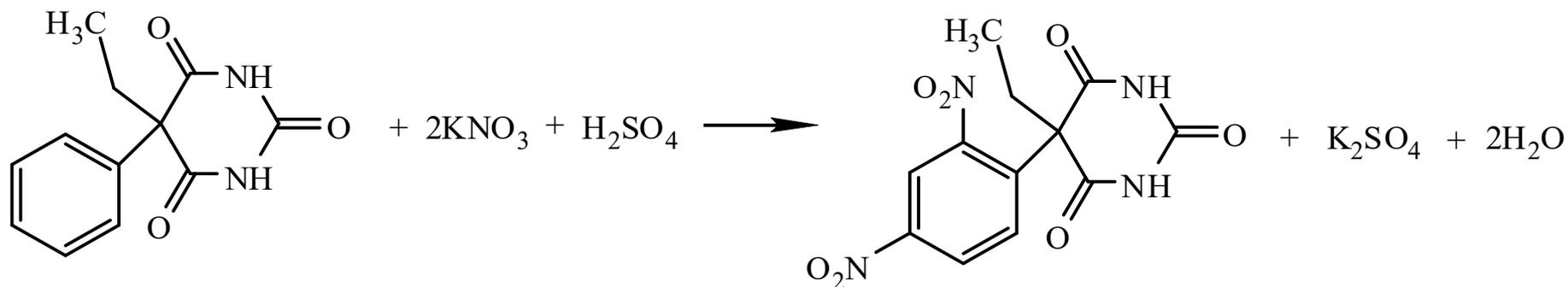
(2) 与高锰酸钾的反应



3. 苯巴比妥（芳环）的鉴别试验

(1) 硝化反应

- 苯巴比妥：与硝酸钾及硫酸共热，可发生硝基化反应，生成黄色硝基化合物



(2) 与硫酸-亚硝酸钠的反应

- 苯巴比妥：与硫酸-亚硝酸钠反应，生成橙黄色产物，并随即变为橙红色。
- 可区别 苯巴比妥和其他不含芳环巴比妥

示例 ChP2015中苯巴比妥的鉴别

- 取本品约10mg，加硫酸2滴与亚硝酸钠约5mg，混合，即显橙黄色，随即转橙红色。



(3) 与甲醛-硫酸的反应

- 苯巴比妥与甲醛-硫酸反应，生成玫瑰红色产物。巴比妥和其他无芳环取代的巴比妥类药物无此反应，可供区别

示例6 ChP2015中苯巴比妥的鉴别（2）

- 取本品约50mg，置试管中，加甲醛试液1ml，加热煮沸，冷却，沿管壁缓缓加硫酸0.5ml，使成两液层，置水浴中加热，接界面显玫瑰红色。



(三) 特征熔点

- 巴比妥类药物本身可直接用药典方法（通则0612）测定熔点；
- 其钠盐可利用它易溶于水，酸化后析出相应的游离巴比妥母体，将沉淀过滤干燥后，测定熔点；
- 也可以将本类药物制备成衍生物后，再测定衍生物的熔点。



示例 ChP2015中司可巴比妥钠的熔点鉴别法

- 取本品约1g，加水100ml溶解后，加稀醋酸5ml强力搅拌，再加水200ml，加热煮沸使溶解成澄清溶液（液面无油状物），放冷，静置后析出结晶，滤过；结晶在70°C干燥后，熔点约为97°C。



（四）吸收光谱特征

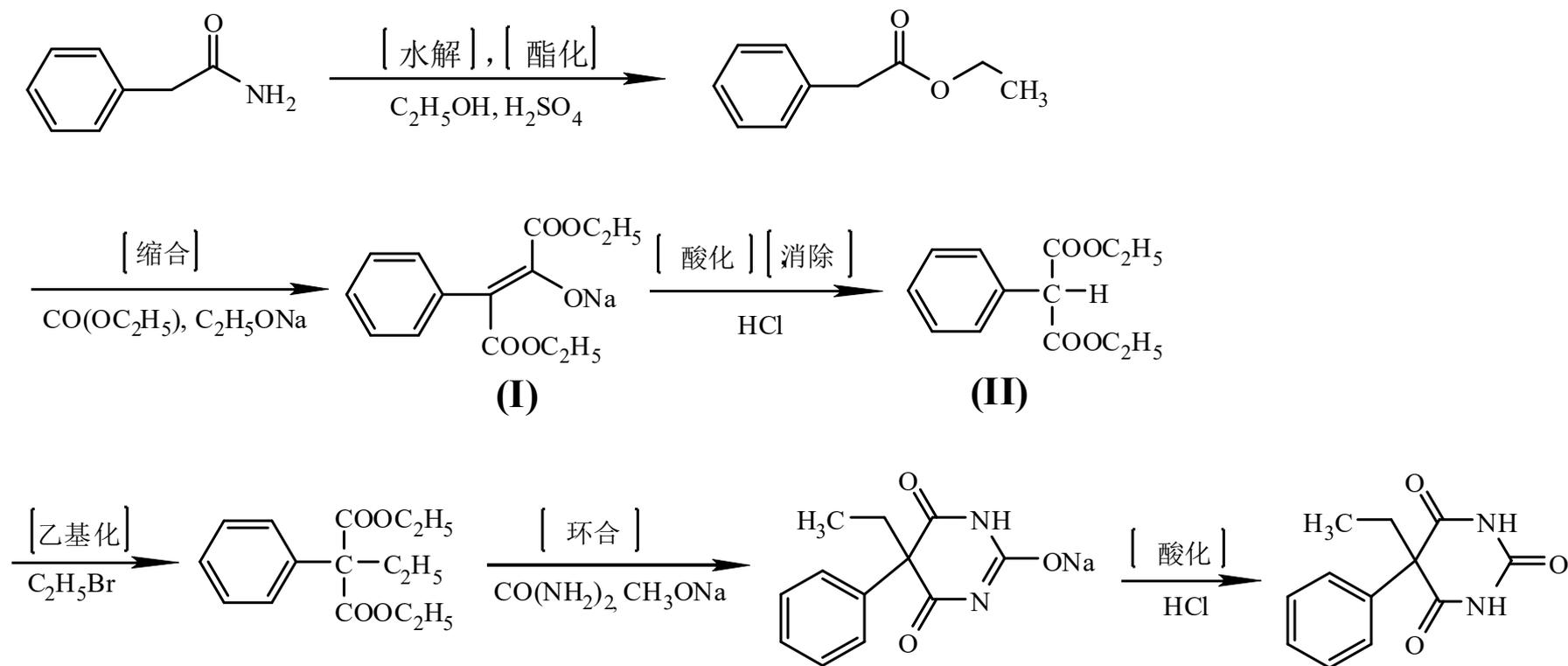
- 标准图谱对照法：
- 比较样品与对照品的红外光谱图是否一致
- **ChP2015**收载的巴比妥类药物，几乎都采用本法作为鉴别方法。



三、特殊杂质检查

(一) 苯巴比妥的特殊杂质检查

苯巴比妥的合成工艺



酸度

- 控制副产物苯基丙二酰脲
- 在一定量供试品水溶液中，加入甲基橙指示剂不得显红色



乙醇溶液的澄清度

- 控制中间体I杂质的量
- 利用杂质在乙醇溶液中溶解度小



有关物质

- HPLC法

- 苯巴比妥的特殊杂质检查

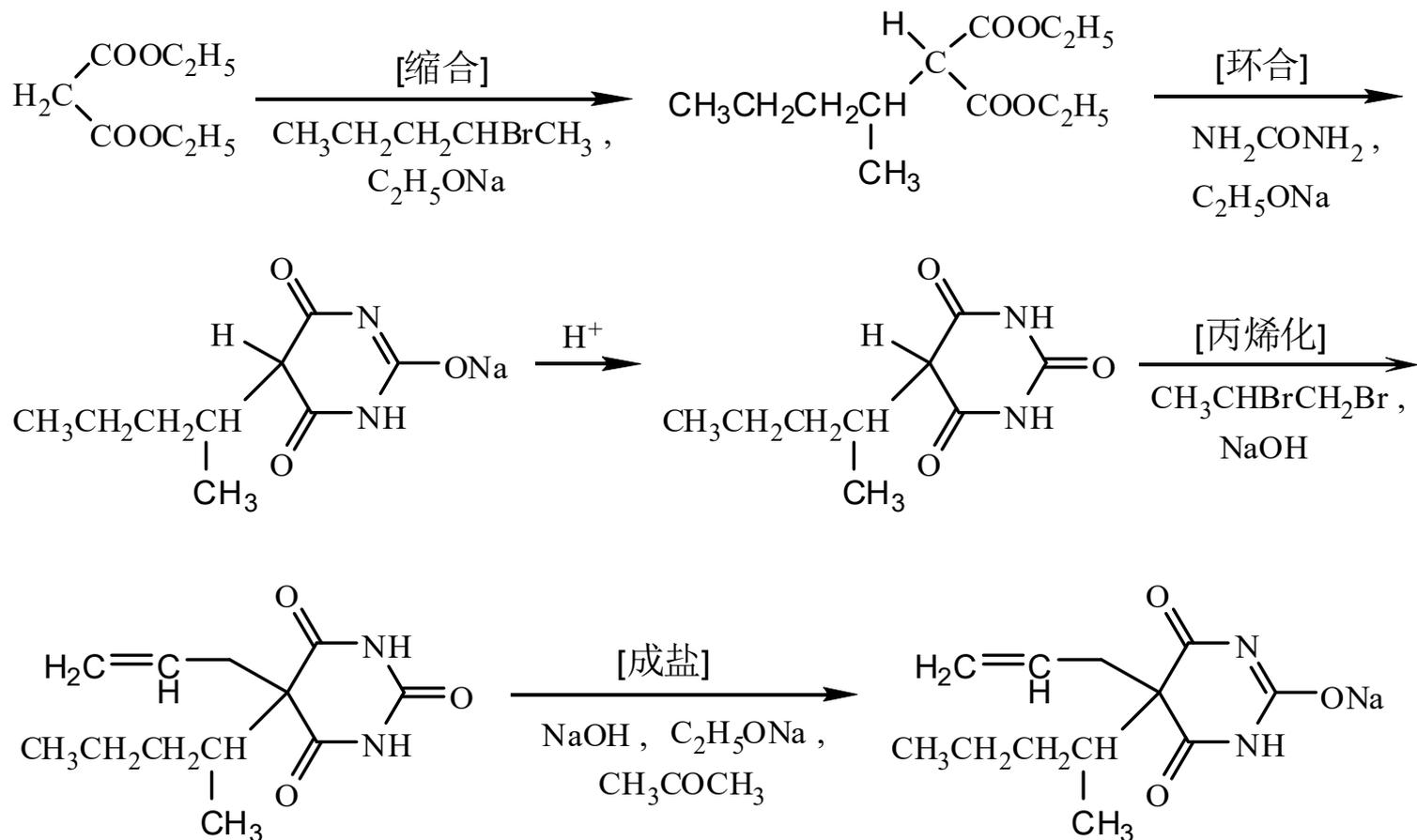
中性或碱性物质

- 控制杂质中间体I的副产物2-苯基丁酰胺、2-苯基顶酰胺或分解产物
- 杂质不溶于氢氧化钠试液但溶于乙醚，而苯巴比妥溶于氢氧化钠试液



(二) 司可巴比妥钠的特殊杂质检查

司可巴比妥钠的合成工艺



溶液的澄清度

- 检查水不溶性杂质

司可巴比妥钠的特殊杂质检查

中性或碱性物质

- 控制合成过程中的副产物，如酰脲、酰胺类物质
- 杂质不溶于氢氧化钠，而溶于乙醚



四、含量测定

(一) 银量法

- 滴定剂：硝酸银（1：1反应）
- 溶剂：甲醇+3%无水碳酸钠
- 终点指示：电位法指示（Ag电极为指示电极，玻璃电极为参比电极）



示例 ChP2015中异戊巴比妥的银量测定法

- 取本品约0.2g，精密称定，加甲醇40ml使溶解，再加新鲜配制的3%无水碳酸钠溶液15ml，照电位滴定法，用硝酸银滴定液（0.1mol/L）滴定，即得。每1ml硝酸银滴定液（0.1mol/L）相当于22.63mg的 $C_{11}H_{18}N_2O_3$ 。

注意事项

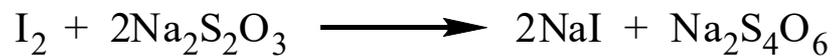
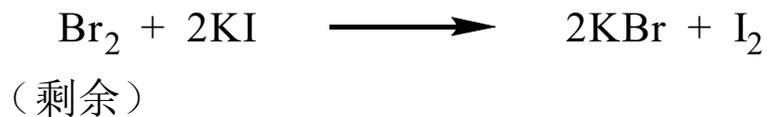
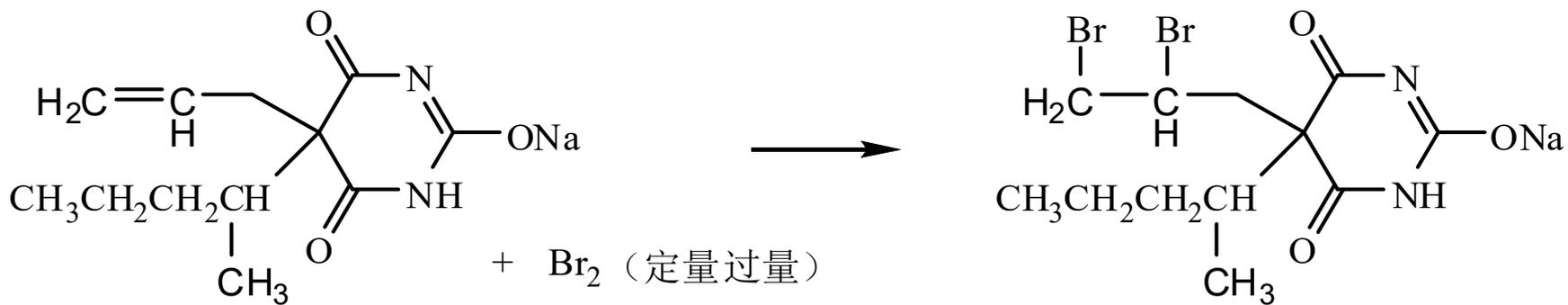
- ①无水碳酸钠应新鲜配制；
- ② $AgNO_3$ 滴定液应新鲜配制；
- ③银电极使用前应进行处理



(二) 溴量法

- 5位取代基中含有不饱和双键的巴比妥类药物，其不饱和键可与溴定量地发生加成反应，可采用溴量法进行含量测定
- 可用于司可巴比妥钠原料药及其胶囊的测定





示例 ChP2015中司可巴比妥钠的溴量测定法

- 取本品约0.1g，精密称定，置250ml碘瓶中，加水10ml，振摇使溶解，精密加入溴滴定液（0.05mol/L）25ml，再加盐酸5ml，立即密塞并振摇1分钟，在暗处静置15分钟后，注意微开瓶塞，加入碘化钾试液10ml，立即密塞，摇匀后，用硫代硫酸钠滴定液（0.1mol/L）滴定，至近终点时，加淀粉指示液，继续滴定至蓝色消失，并将滴定结果用空白试验校正，即得。每1ml溴滴定液（0.05mol/L）相当于13.01mg $C_{12}H_{17}N_2NaO_3$ 。



(三) 酸碱滴定法

- 巴比妥类药物呈弱酸性 ($pK_a 7.3 \sim 8.4$)，可作为一元酸以标准碱液直接滴定

1. 在水-乙醇混合溶剂中的滴定

- 溶剂：水-乙醇
- 滴定剂：NaOH
- 指示剂：麝香草酚酞

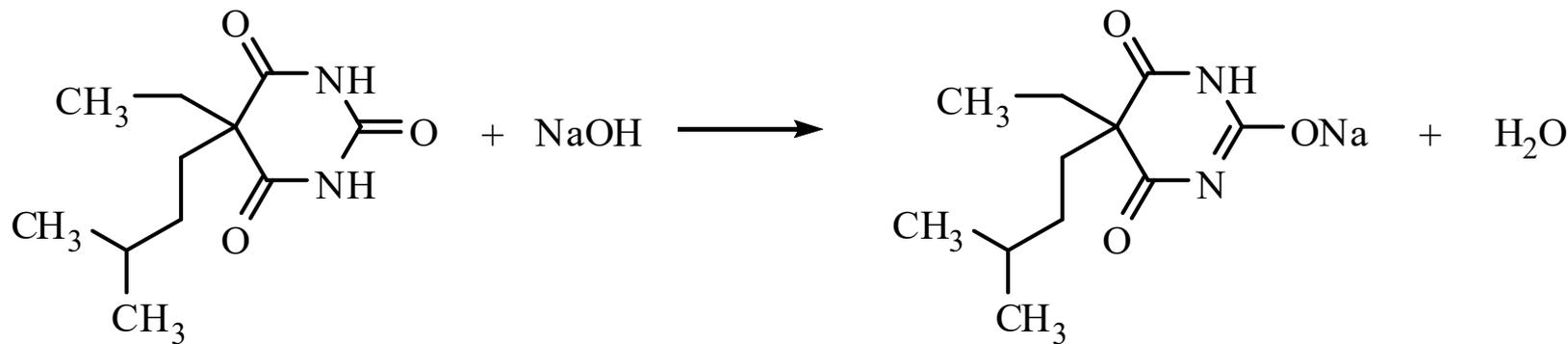


➤ 此法终点判断较困难



示例 异戊巴比妥 醇溶液的滴定测定法

- 取本品约0.5g，精密称定，加乙醇20ml溶解后，加麝香草酚酞指示剂6滴，用氢氧化钠滴定液（0.1mol/L）滴定，并将滴定结果用空白试验校正，即得。每1ml氢氧化钠滴定液（0.1mol/L）相当于22.63mg的 $C_{11}H_{18}N_2O_3$ 。



可采用电位法指示终点



2. 在胶束水溶液中的滴定

- 在有机表面活性剂的胶束水溶液进行滴定，用指示剂或电位法指示终点
- 表面活性剂能改变巴比妥类药物的离解平衡，使滴定终点变化明显
- 溶剂：表面活性剂（溴化十六烷基三甲基苄胺或氯化四癸基二甲基苄胺）水溶液
- 滴定剂：NaOH滴定液
- 指示剂：麝香草酚酞



3. 在非水溶液中的滴定

- 巴比妥类药物在非水溶剂中的酸性增强，用碱性标准溶液滴定时，终点较为明显
 - 溶剂：二甲基甲酰胺、甲醇、丙酮、三氯甲烷、无水乙醇、苯、吡啶、甲醇-苯（15：85）、乙醇-三氯甲烷（1：10）等
 - 滴定剂：甲醇钾（钠）的甲醇或乙醇溶液、氢氧化四丁基胺的氯苯溶液等
 - 指示剂：麝香草酚蓝，也可用玻璃-甘汞电极以电位法指示终点



(四) 紫外分光光度法

- 在酸性介质中几乎不电离，无明显的紫外吸收
- 在碱性介质中电离为具有紫外吸收特征的结构

药物	λ_{\max} (nm)	$E_{1cm}^{1\%}$	溶剂
巴比妥	240	538	pH9.4硼酸盐缓冲液
苯巴比妥	253	320	NaOH液 (0.1mol/L)
戊巴比妥	240	310	pH9.4硼酸盐缓冲液
异戊巴比妥	238	440	pH9.4硼酸盐缓冲液
司可巴比妥	240	330	pH9.4硼酸盐缓冲液
硫喷妥	305	930	pH9.4硼酸盐缓冲液



1. 直接测定的紫外分光光度法

- 将供试品溶解后，直接测定对照品溶液和供试品溶液的吸光度（ λ_{\max} 处），再计算药物的含量



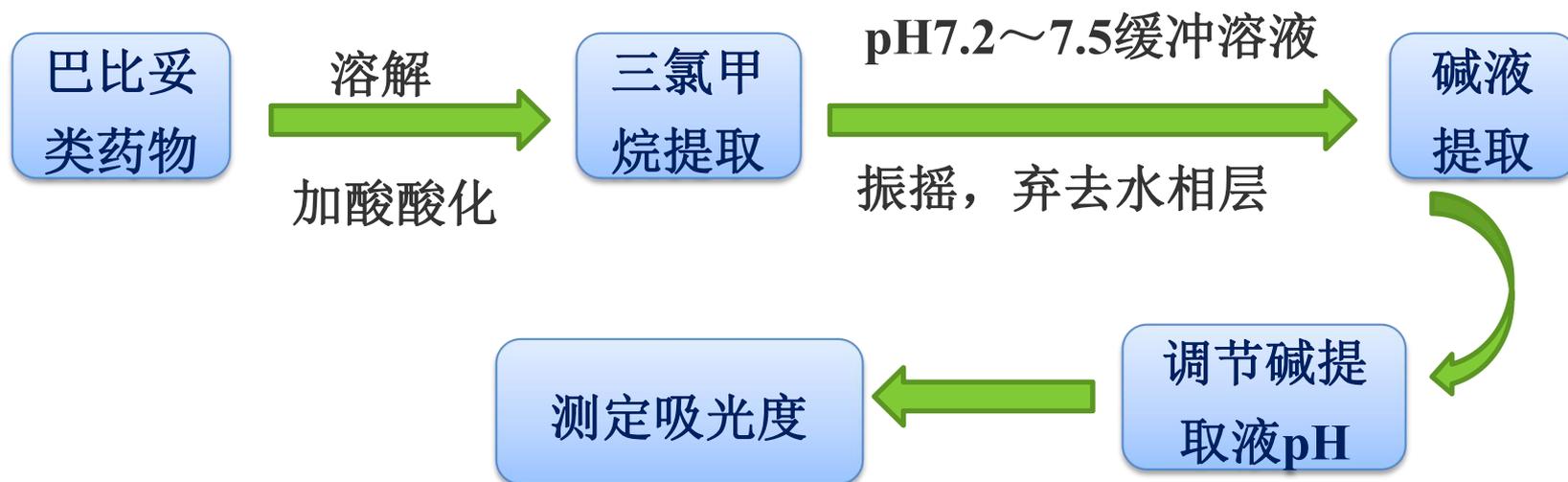
示例 ChP2015注射用硫喷妥钠的含量测定

- 取装量差异项下的内容物，混合均匀，精密称取适量（约相当于硫喷妥钠0.25g），置500 ml量瓶中，加水使硫喷妥钠溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取适量，用0.4%氢氧化钠溶液定量稀释制成每1ml中约含有5 μg的溶液，照紫外-可见分光光度法，在304 nm波长处测定吸光度；另取硫喷妥钠对照品，精密称定，加0.4%氢氧化钠溶液并定量稀释制成每1ml中约含有5μg的溶液，同法测定。根据每支的平均装量计算。每1ml硫喷妥相当于1.091mg的 $C_{11}H_{17}N_2NaS$ 。



2. 提取分离后的紫外分光光度法

- 巴比妥类药物具有弱酸性，在三氯甲烷等有机溶剂中易溶，而其钠盐在水中易溶



(五) 高效液相色谱法

- 适用于复方制剂中巴比妥类药物的分析

示例 ChP2015苯巴比妥片的含量采用HPLC测定

- 色谱条件与系统适用性实验 用辛烷基硅烷建和硅胶为填充剂；以乙腈-水（30：70）为流动相；检测波长为220nm。理论塔板数按苯巴比妥峰计算不低于2000，苯巴比妥与相邻色谱峰的分度应符合要求。



测定法

- 取本品20片，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于苯巴比妥30mg），置50ml容量瓶中，加流动相适量，超声处理20分钟使苯巴比妥溶解，放冷，用流动相稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取滤液1ml，置10ml量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，精密量取10 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图。另取苯巴比妥对照品，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成每1ml中约含苯巴比妥60 μ g的溶液，同法测定，按外标法以峰面积计算，即得。



五、巴比妥类药物的体内药物分析

(1) RPLC

(3) GC-MS

(2) HPCE

(4) LC-MS



第二节

苯二氮草类药物的分析



一
苯二氮草药物的
结构与性质

二
鉴别实验

三
特殊杂质检查

苯二氮
草药物
的分析

四
含量测定

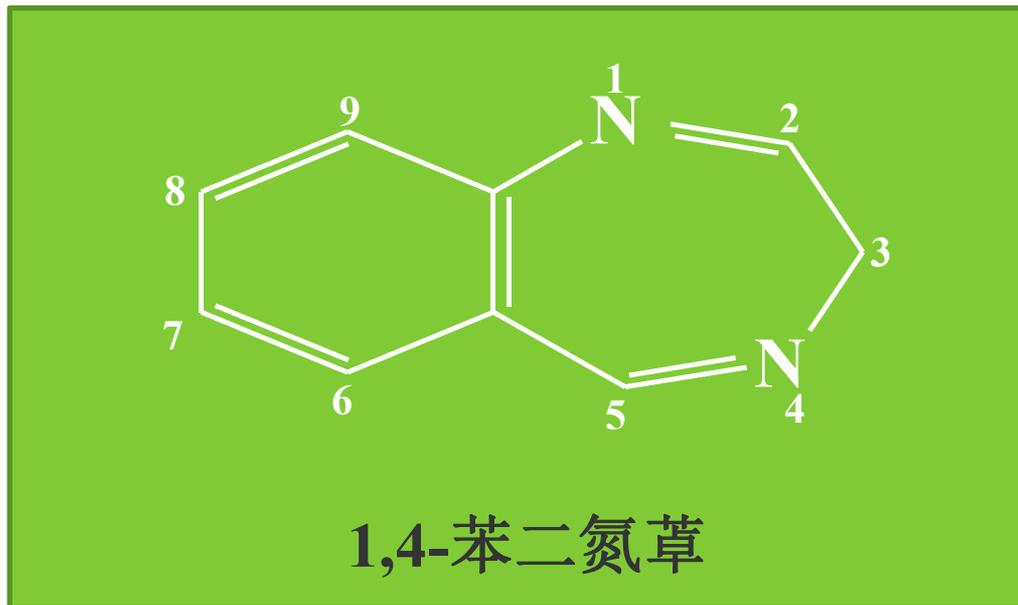
五
体内药物分析

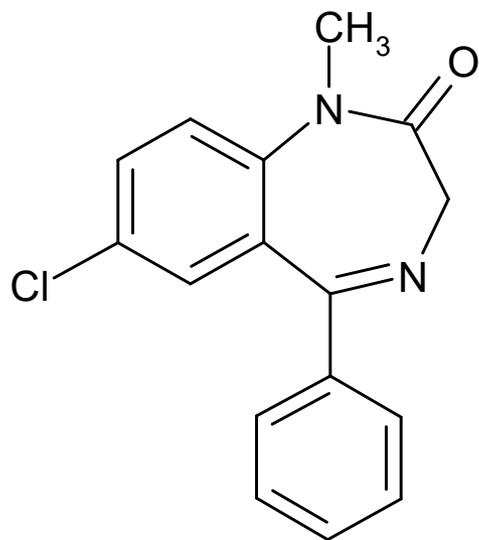


一、苯二氮䓬类药物的结构与性质

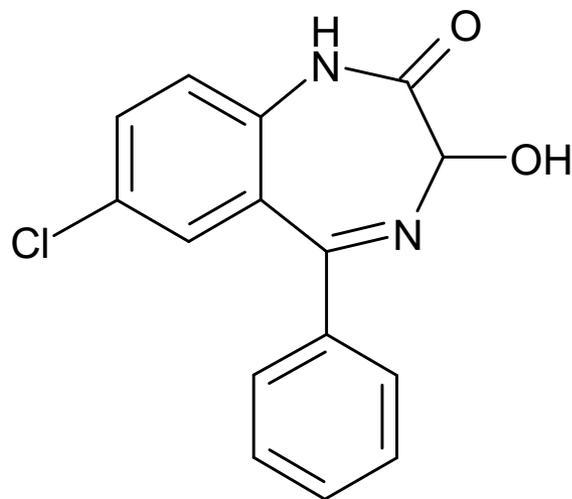
(一) 典型药物

- 苯环与七元含氮杂环稠合而成的有机药物

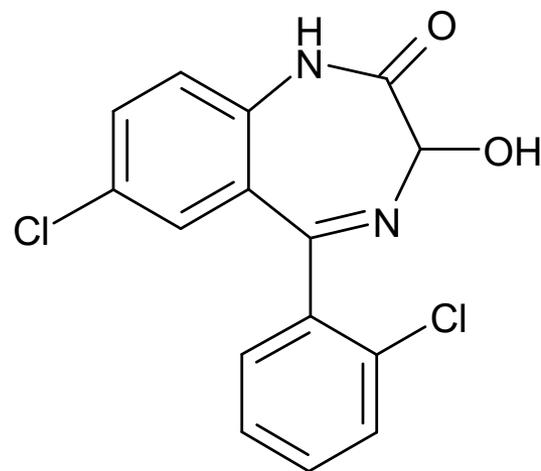




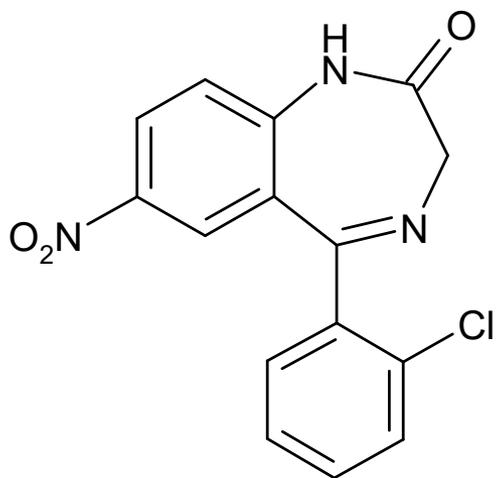
地西洋



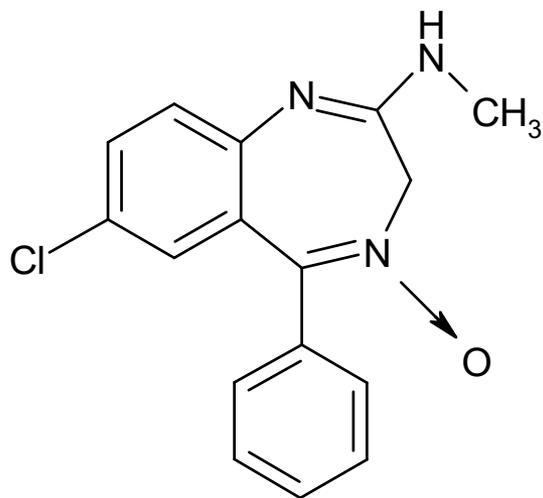
奥沙西洋



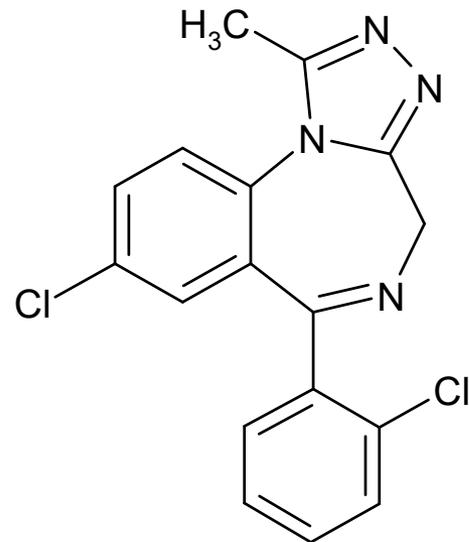
劳拉西洋



氯硝西洋



氯氮草



三唑仑

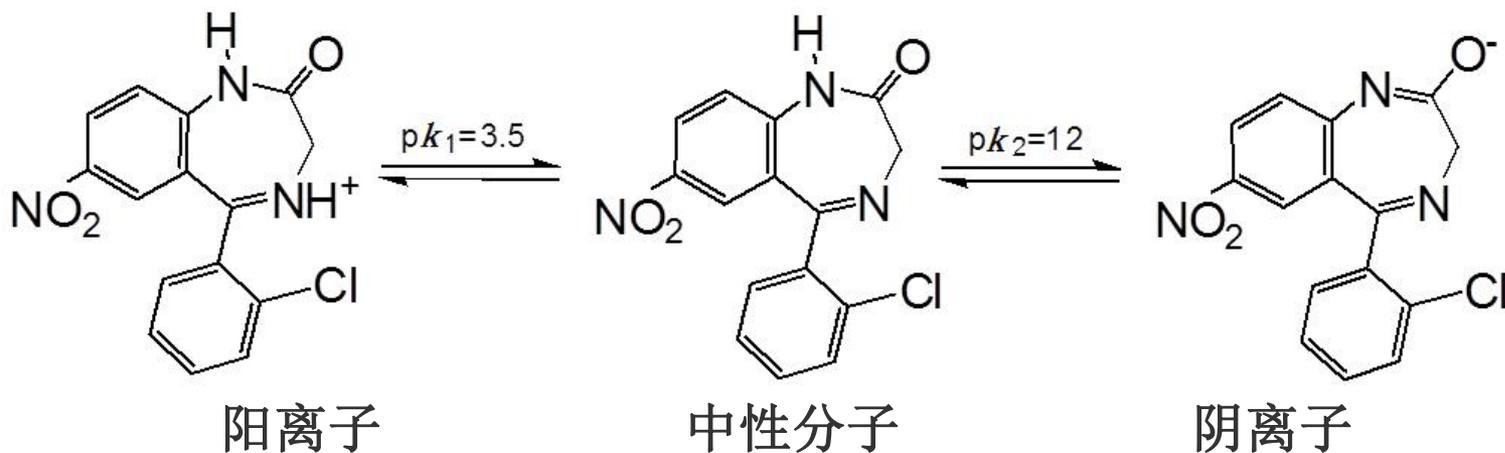
(二) 主要理化性质

- 苯二氮草类药物通常为白色或微黄色结晶或结晶性粉末；具有一定的熔点
- 该类药物一般不溶或极微溶于水，溶于丙酮或三氯甲烷等有机溶剂



1.弱碱性

- 药物结构中二氮草环为七元环，环上的氮原子具有碱性，苯基的取代使碱性降低
- 药物的 pK_a 值与其在不同pH时主要是以何种分子形式（质子化分子 H_2A^+ ；中性分子 HA ；去质子化分子 A^- ）存在有关



2.水解性

- 在强酸性溶液中，本类药物可水解，形成相应的二苯甲酮衍生物（主要有关物质）

3.UV吸收特性

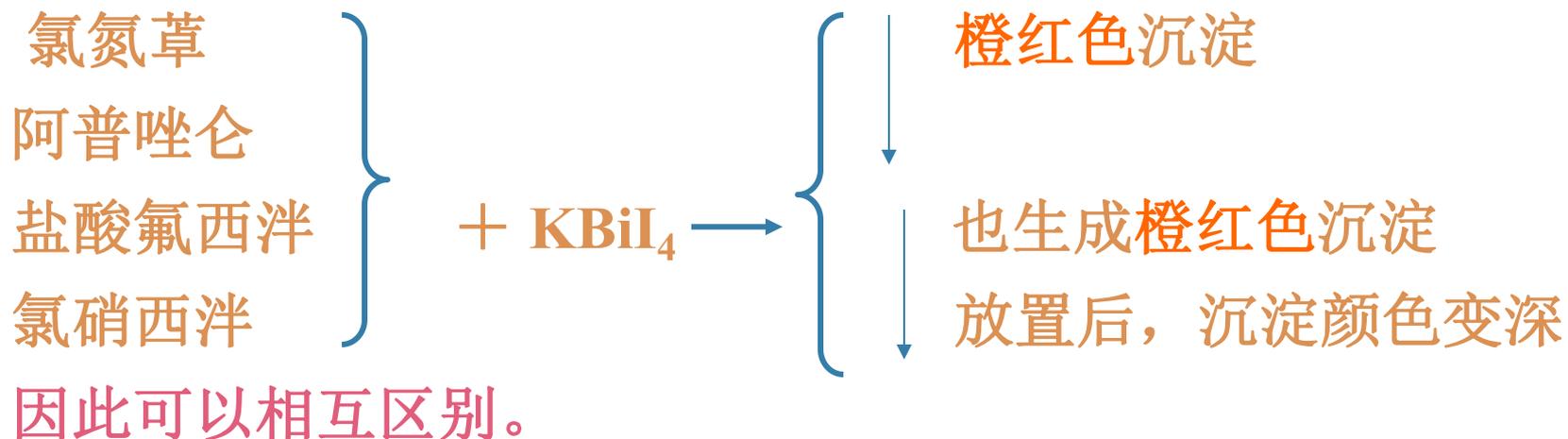
- 本类药物均含有较大共轭体系，其常见药物的紫外光谱数据见书表10-3。



二、鉴别试验

(一) 化学鉴别反应

1. 沉淀反应



- 阿普唑仑 + 遇硅钨酸 白色沉淀，药典中也用于鉴别。



2. 硫酸荧光反应

- 本类药物溶于硫酸后，在紫外光（365nm）下，显不同颜色的荧光



示例14 地西洋的硫酸-荧光反应鉴别

- 取地西洋约10mg，加硫酸3ml，振摇使溶解，在紫外光灯（365nm）下检视，显黄绿色荧光



(二) 特征基团反应

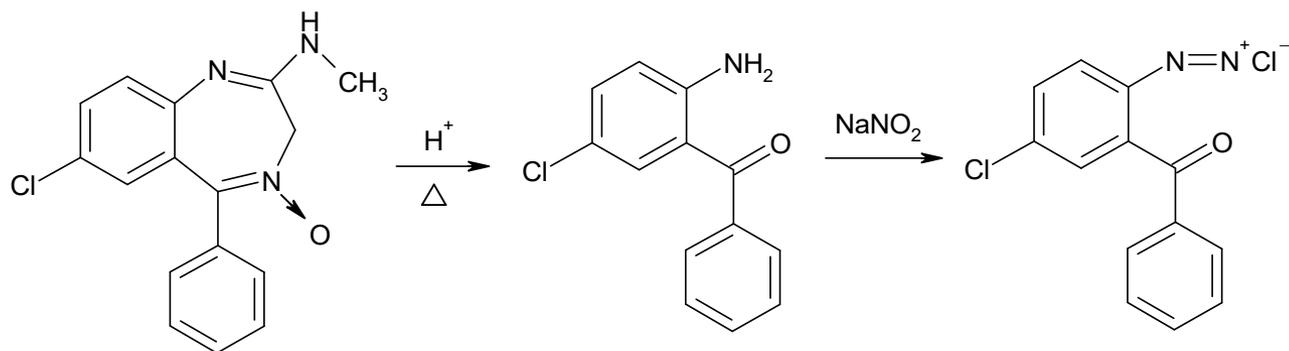
1. 氯化物的鉴别反应

- 本类药物大多为有机氯化物，用**氧瓶燃烧法**破坏，生成氯化氢，以5%氢氧化钠溶液吸收，加稀硝酸酸化，并缓缓煮沸2分钟，显氯化物反应

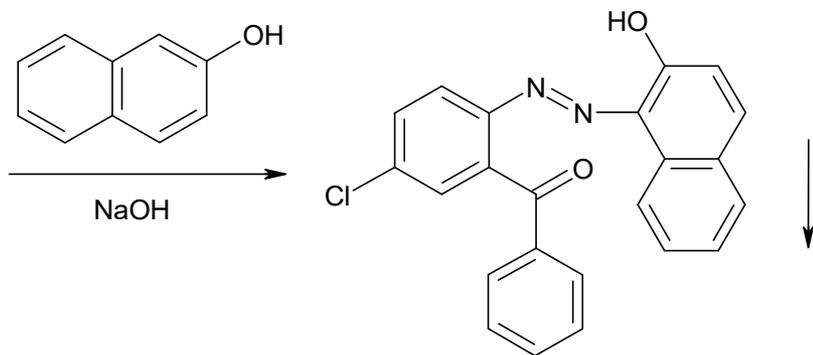


2. 芳伯胺的反应

- 本类药物如N1位上未取代者，与盐酸共热水解后，生成芳伯胺，可发生重氮化-偶合反应显色



氯氮草



(三) 吸收光谱特征

- 利用紫外最大吸收波长，以及最大吸收波长处的吸光度或吸光度比值进行鉴别
- 红外吸收光谱用于大多数1,4-苯二氮草类药物的指纹鉴别



（四）色谱法

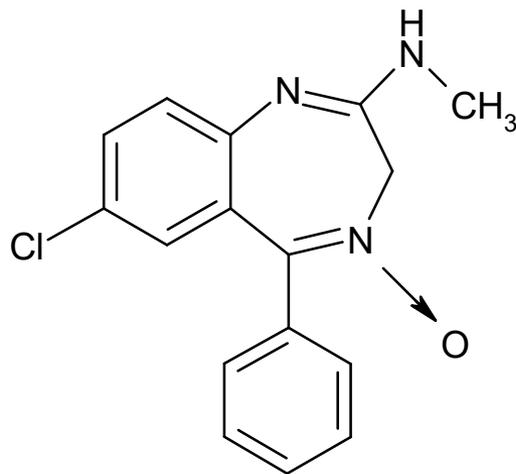
- 用于本类药物原料和制剂的专属鉴别



三、有关杂质检查

氯氮草

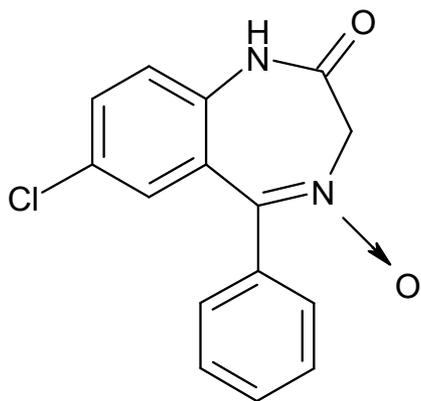
- 主要有关物质:



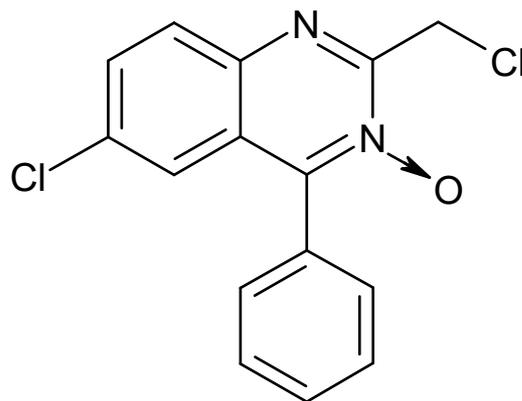
TLC检查-BP、USP

HPLC检查-ChP

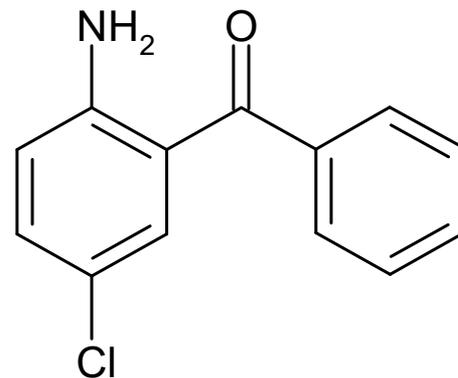




4-氧化-7-氯-5-苯基-
1,3-二氢-2H-1,4-苯二
氮草-2-酮



3-氧化-6-氯-2-
(氯甲基)-
4-苯基喹唑啉

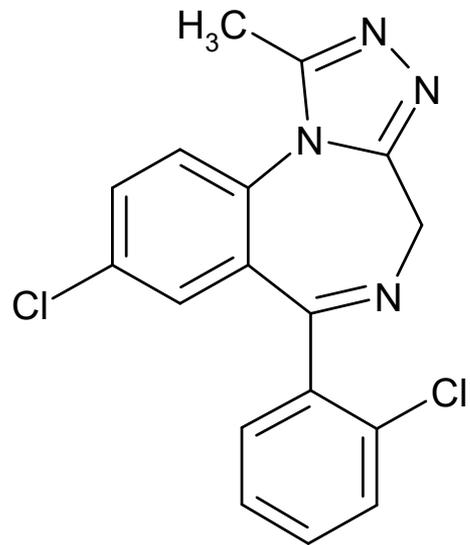


(2-氨基-5-氯苯基)
苯甲酮



三唑仑

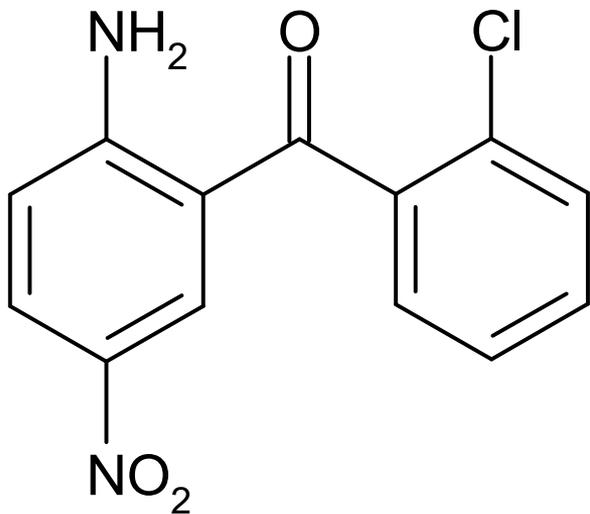
- 主要有关物质:



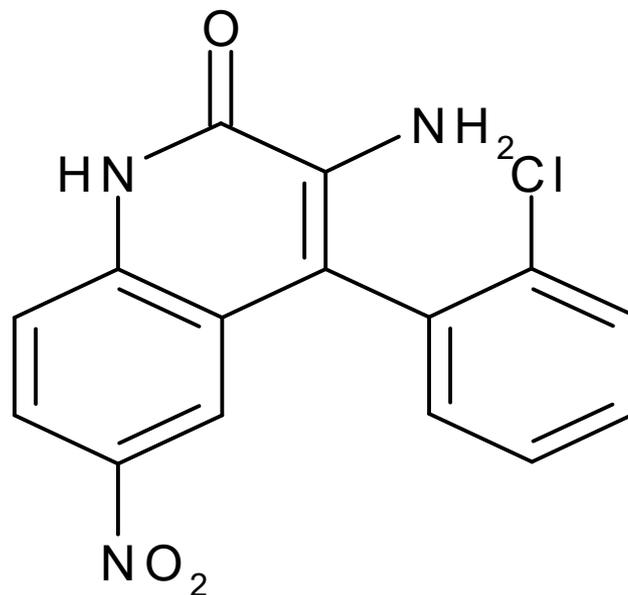
GC检查-USP

HPLC检查-ChP





(2-氨基-5-硝基苯基)
(2-氯苯基) 甲酮



3-氨基-4-(2-氯苯基)-6-
硝基喹啉-2(1H)-酮

四、含量测定

(一) 非水溶液滴定法

1. 非水碱量法

- 在水中碱性较弱，不能顺利地进行中和滴定。
- 在非水酸性溶剂中（如HAc中），则能显示出较强的碱性，高氯酸滴定液，滴定突跃增大，可以顺利地进行中和滴定。

药物碱性	非水酸性溶剂
pK_b 8~10	冰醋酸
pK_b 10~12	冰醋酸与醋酐的混合液
$pK_b > 12$	醋酐



2. 非水酸量法

- 奥沙西泮及劳拉西泮能在碱性介质中去质子化，具有一定的酸性，因此对这两种药物可采用氢氧化四丁基铵滴定液（0.1mol/L）非水酸量法进行含量测定。



(二) 紫外分光光度法

- 苯二氮草类药物中有多种药物的片剂和胶囊剂均采用本法测定含量；而本类药物的原料药仅奥沙西洋采用本法测定。



1. 对照品比较法

$$C_X = (A_X / A_R) C_R$$

- C_X 和 C_R 分别为供试品溶液和对照品溶液的浓度， A_X 和 A_R 分别为供试品和对照品溶液的吸光度

2. 吸收系数法

$$C = \frac{A}{E_{1cm}^{1\%} \cdot L}$$

$E_{1cm}^{1\%}$ 为百分吸收系数， L 为吸收池厚度



(三) 高效液相色谱法

- 大多采用反相高效液相色谱法，以不同配比的甲醇-水或甲醇（乙腈）-缓冲液等为流动相，进行测定



五、苯二氮草类药物的体内药物分析

(1) RPLC

(2) LC-MS/MS



Thank you very much!



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE