

HPLC 法测定丁丙诺啡纳洛酮舌下片中两种主药的量

臧可昕^{1*}, 马克², 苏慕君¹, 刘亚梅², 杨昕²

1 天津药物研究院, 天津 300193;

2 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300193

摘要 目的: 建立梯度洗脱 HPLC 法同时测定丁丙诺啡纳洛酮舌下片中两种主药的量。方法: 采用梯度洗脱, 用 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以甲醇-乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (48:32:20) (用磷酸调 pH 4.0) 为流动相 A, 甲醇-乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (6:4:90) (用磷酸调 pH 4.0) 为流动相 B; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 230 nm。结果: 纳洛酮在 5.0~30.0 μg/mL 线性关系良好 ($r=0.9998$), 回收率为 99.68% (RSD=0.92%); 丁丙诺啡在 20.0~120.0 μg/mL 线性关系良好 ($r=0.9999$), 回收率为 99.74% (RSD=0.53%)。结论: 采用梯度洗脱 HPLC 法同时测定丁丙诺啡纳洛酮舌下片中两主药的量, 方法简便、灵敏、专属, 重现性好, 该方法可以监控药品质量。

关键词 梯度洗脱; HPLC; 丁丙诺啡纳洛酮舌下片

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 06-0428-04

Determination of content of buprenorphine hydrochloride and naloxone hydrochloride sublingual tablets by gradient HPLC

ZANG Ke-xin¹, MA Ke², SU Mu-jun¹, LIU Ya-mei², YANG Xin²

1 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;

2 TIPR Pharmaceutical Responsible Co., Tianjin 300193, China

Abstract **Objective:** To establish a gradient elution HPLC method for determination of the contents of buprenorphine hydrochloride and naloxone hydrochloride sublingual tablets at the same time. **Methods:** The column was Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Mobile phase A was methanol:acetonitrile:0.02mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer (48: 32: 20) (pH 4.0); Mobile phase B was methanol:acetonitrile: 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer (6: 4: 90) (pH 4.0). Flow rate was 1.0 mL/min. Detection wavelength was 314 nm. **Results:** The calibration curve was linear in the range of buprenorphine 5.0-30.0 μg/mL ($r=0.9998$), coefficient of recovery was 99.68% (RSD = 0.92%). The calibration curve was linear in the range of naloxone 20.0-120.0 μg/mL ($r=0.9999$), coefficient of recovery was 99.74% (RSD = 0.53%). **Conclusion:** The method is simple, sensitive, specific, reproducible, accurate and suitable for examination of the contents of buprenorphine hydrochloride and naloxone hydrochloride sublingual tablets at the same time. The Methods could be used to monitor drug quality.

Key words gradient elution; HPLC; buprenorphine hydrochloride and naloxone hydrochloride sublingual tablets

盐酸丁丙诺啡是阿片类受体拮抗剂, 用于术后镇痛^[1]、癌症镇痛^[2], 对高龄患者使用安全^[3]。1978年, 丁丙诺啡作为美沙酮的选择性替代物用于阿片类依赖药物的治疗^[4]。2001年, 我国将丁丙诺啡舌下片列为二类精神药品, 可用于家庭脱毒治疗^[5], 维持治疗可预防复吸^[6]。丁丙诺啡具依赖性、成瘾性, 社会上滥用情况相当严重^[7], 许多吸毒者将丁丙诺啡舌下片溶于水中注射。丁丙诺啡滥用可出现

睡眠障碍、肌肉及腹部痉挛、疼痛^[8], 若与巴比妥类、苯二氮䓬类药物合并滥用会引起呼吸抑制、昏迷甚至死亡^[9]。

盐酸纳洛酮是半合成阿片类受体拮抗剂, 口服生物利用度低, 经非胃肠道给药消除快, 常用剂型是注射剂。

盐酸丁丙诺啡与盐酸纳洛酮组成复方舌下片, 用于治疗阿片类药物依赖性。该品中盐酸纳洛酮经

舌下吸收,很快消除,对丁丙诺啡的脱毒作用没有影响。但是,如果将复方制剂溶于水中注射,纳洛酮会优先且完全地与阿片受体结合,吸毒者不会产生欣快感,反而会立即引起强烈的戒断症状^[10]。目前,在我国丁丙诺啡纳洛酮舌下片(buprenorphine hydrochloride and naloxone hydrochloride sublingual tablets, BNT)尚未上市。采用HPLC法同时测定BNT中丁丙诺啡、纳洛酮的量,国内外文献均未见报道。经预试验,丁丙诺啡、纳洛酮极性差异大,等度色谱不能同时检测,本实验选用梯度洗脱HPLC同时测定丁丙诺啡、纳洛酮的量,为BNT的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

岛津10A高效液相色谱仪(日本岛津公司);AUTO SCIENCE AS3120超声清洗仪(天津特纳科学仪器厂);ANKE TGL-16C离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂

BNT(天津药物研究院制剂中心自制);盐酸丁丙诺啡(天津药物研究院药业有限责任公司);盐酸纳洛酮(甘肃普安制药有限公司);盐酸丁丙诺啡对照品(中国药品生物制品鉴定所);盐酸纳洛酮对照品(中国药品生物制品鉴定所);甲醇(色谱纯,天津康科德科技有限公司);乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司);磷酸二氢钾(分析纯,天津市天河化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

Diamonsil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为甲醇-乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(48:32:20)(用磷酸调pH 4.0),流动相B为甲醇-乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(6:4:90)(用磷酸调pH 4.0);体积流量1.0 mL/min,线性梯度洗脱;检测波长为230 nm;柱温30℃;进样量20 μL。理论板数按纳洛酮峰计算大于5 000。梯度洗脱程序见表1。

2.2 专属性试验

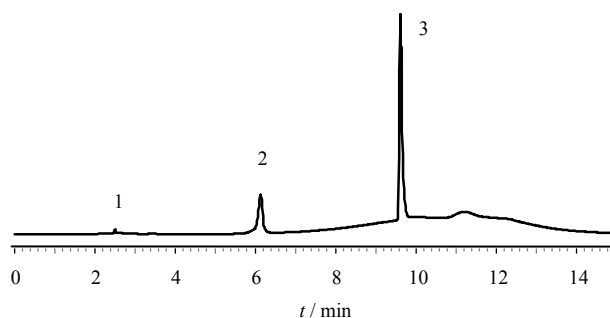
分别称取处方混合辅料、盐酸纳洛酮、盐酸丁丙诺啡、BNT适量,加50%甲醇溶解制成质量浓度分别为2.00、0.02、0.08、2.10 mg/mL的溶液,进样,记录色谱图,结果表明处方混合辅料(2.5 min)、

盐酸纳洛酮(6.1 min)与盐酸丁丙诺啡(9.8 min)有明确归属,能达到基线分离(图1)。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Procedure of gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	10	90
2	10	90
5	90	10
10	90	10
11	10	90
15	10	90



1-辅料; 2-纳洛酮; 3-丁丙诺啡
1- auxiliary material; 2- naloxone; 3- buprenorphine

图1 BNT专属性试验色谱图

Fig. 1 Specificity test chromatograms of BNT

2.3 破坏性试验

取“2.2.9”项下供试品溶液6份,分别用盐酸、盐酸80℃加热30 min、氢氧化钠、氢氧化钠80℃加热30 min、6% H₂O₂、6% H₂O₂ 80℃加热30 min进行破坏。结果表明,纳洛酮对碱最不稳定,其次为氧化和酸;丁丙诺啡对酸最不稳定,其次为碱和氧化。各降解产物与主峰均分离良好(图2)。

2.4 精密度试验

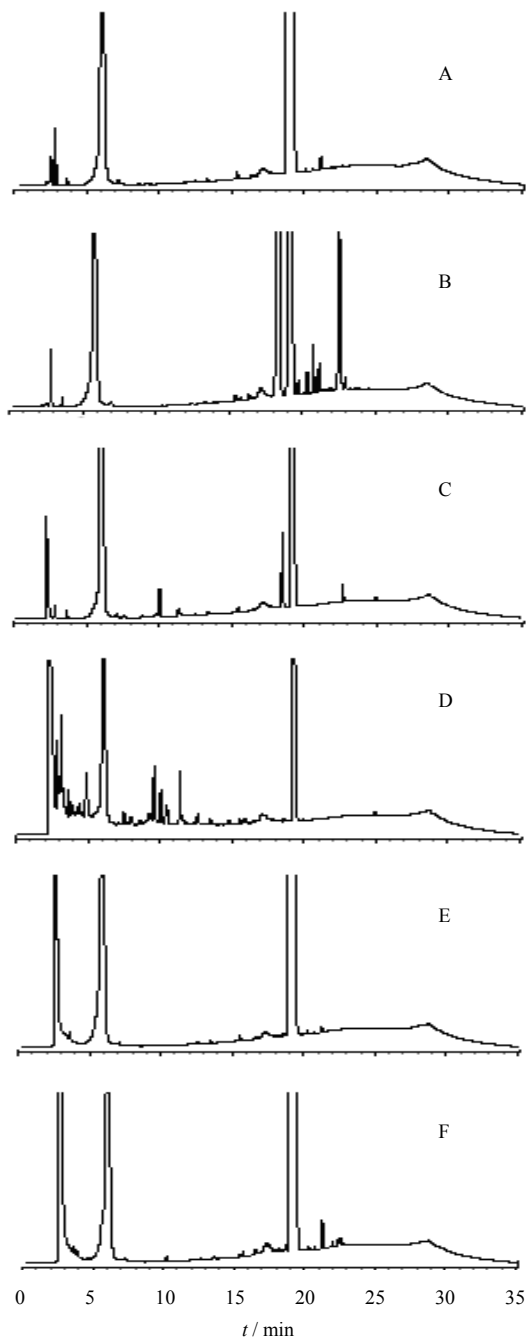
取“2.2.9”项下同一份供试品溶液(01批),连续进样6次,以纳洛酮、丁丙诺啡峰面积计算,RSD分别为0.52%、0.37%。

2.5 重复性试验

取纳洛酮对照品、丁丙诺啡对照品,平行称量,分别制成12份不同浓度的混合对照品溶液,进样,分别以纳洛酮、丁丙诺啡质量分数计算,RSD分别为0.96%、0.62%。

2.6 线性关系考察

精密称取纳洛酮对照品、丁丙诺啡对照品,制成不同质量浓度的混合对照品溶液。混合对照品溶



A-酸破坏; B-酸加热破坏; C-碱破坏; D-碱加热破坏; E-氧化破坏; F-氧化加热破坏
A- acid destroyed test; B- acid heating destroyed test; C- alkali destroyed test; D- alkali heating destroyed test; E- oxidative destroyed test; F- oxidative heating destroyed test

图 2 BNT 破坏性试验色谱图
Fig. 2 Destroyed test chromatograms of BNT

液中纳洛酮质量浓度为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$; 丁丙诺啡质量浓度为 20.0、40.0、60.0、80.0、100.0、120.0 $\mu\text{g/mL}$ 。分别进样, 以峰面积 (A) 对浓度 (C) 进行线性回归, 回归方程为: $A_{\text{纳洛酮}} =$

$20\ 286C_{\text{纳洛酮}} - 7\ 890.3$ ($r = 0.999\ 8$), $A_{\text{丁丙诺啡}} = 150\ 400C_{\text{丁丙诺啡}} + 3\ 124.8$ ($r = 0.999\ 9$), 纳洛酮在 5.0~30.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 丁丙诺啡在 20.0~120.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.7 回收率

分别称取丁丙诺啡、纳洛酮、处方混合辅料, 制成不同浓度纳洛酮供试品溶液、不同浓度丁丙诺啡供试品溶液。分别进样, 以峰面积计算纳洛酮及丁丙诺啡的回收率。纳洛酮平均回收率为 99.68% ($\text{RSD}=0.92\%$); 丁丙诺啡平均回收率为 99.74% ($\text{RSD}=0.53\%$)。

2.8 溶液稳定性试验

取“2.2.9”项下 01 批供试品溶液, 分别于 0、1、2、3、4、5 h 测定, 面积归一化结果分别为, 纳洛酮 99.24%、99.53%、99.77%、99.08%、99.29%、98.92%, RSD 为 0.31%; 纳洛酮 100.2%、100.5%、100.1%、99.98%、100.6%、99.72%, RSD 为 0.33%。表明 BNT 溶液在 5 h 内稳定。

2.9 RNT 测定。

取 BNT 研细粉适量 (相当于纳洛酮 1 mg、丁丙诺啡 4 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加 50%甲醇适量, 振摇使溶解, 加水稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

精密称取盐酸纳洛酮对照品 (105℃干燥 2 h)、盐酸丁丙诺啡对照品适量, 以 50%甲醇为溶媒制成含 20 $\mu\text{g/mL}$ 纳洛酮、80 $\mu\text{g/mL}$ 丁丙诺啡的混合溶液, 作为对照品溶液。

按上述方法, 测定自制 3 批次样品中纳洛酮、丁丙诺啡的量, 按外标法以峰面积计算, 结果见表 2。

表 2 BNT 的量测定结果

Table 2 Contents of BNT

批号	质量分数/%	
	纳洛酮	丁丙诺啡
1	99.38	100.3
2	99.98	99.59
3	99.96	99.53

3 讨论

3.1 检测波长的选择

丁丙诺啡最大吸收波长约 288 nm, 纳洛酮最大吸收波长约 230 nm。在 288 nm 处, 丁丙诺啡与纳洛酮的吸收强度比为 3.2; 在 230 nm 处, 丁丙诺啡与纳洛

酮的吸收强度比为 1.5。BNT 中丁丙诺啡的量是纳洛酮的 4 倍。综合分析比较,选择吸收波长为 230 nm。

3.2 提取溶媒的选择

BNT 中含丁丙诺啡 2 mg, 纳洛酮 0.5 mg, 提取难度大, 分别考察不同溶剂的提取效果。结果表明, 水、流动相提取溶液粘稠, 不易过滤, 而甲醇水混合液提取后溶液澄清, 提取完全, 溶液相对稳定。最终确定采用 50 % 甲醇溶液作为 BNT 的提取溶媒。

3.3 梯度洗脱的选择

丁丙诺啡、纳洛酮合成起始原料均为蒂巴因, 它们母核由菲核和哌啶环稠合而成。BNT 中两种主药结构相近, 可在同一色谱条件下同时检出。经预实验, 选用“甲醇-乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液”流动相体系。试验结果见表 3。

表 3 BNT HPLC 方法预试
Table 3 Trial test of BNT HPLC method

醇相：水相	Rt 纳洛酮	Rt 丁丙诺啡
1：9	18.9 min	>90 min
2：8	5.8 min	>90 min
5：5	<2 min	7.6 min

预试结果表明, 丁丙诺啡、纳洛酮极性差异大。等度色谱不能同时检测, 选用梯度洗脱 HPLC 同时测定丁丙诺啡、纳洛酮的量。

3.4 应用

采用丁丙诺啡、纳洛酮单方制剂的检测方法与上述方法比较, 分别测定 3 批 BNT 的量, 结果表明, 两种方法测定的丁丙诺啡的量结果一致, 两种方法测定的纳洛酮的量结果一致。

采用梯度洗脱 HPLC 法同时测定丁丙诺啡纳洛酮舌下片中两主药的量, 方法简便、灵敏、专属, 重现性好。该方法可以监控药品质量。

参考文献

[1] 陈艳青, 梁维斌. 国产丁丙诺啡在术后自控镇痛中的运用[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(6): 963-964.

[2] 王杰军, 李 睿. 盐酸丁丙诺啡舌下片用于癌症镇痛的多中心临床观察[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(18): 1047-1050.

[3] 黄 雯. 85 岁以上超高龄骨折患者小剂量丁丙诺啡自控镇痛的临床观察[J]. 河北医学, 2006, 12(10): 1003-1004.

[4] Ling W, Wesson D R. Clinical efficacy of buprenorphine: comparisons to methadone and placebo [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2003, 70: 49-57.

[5] 杜心涛, 阮奕满. 丁丙诺啡舌下片在家庭脱毒中疗效观察[J]. 中国临床医药研究杂志, 2007, 172: 17-18.

[6] 黄威巍, 徐荣海. 盐酸丁丙诺啡对海洛因依赖者脱毒后预防复吸的研究: 248 例盐酸丁丙诺啡维持治疗临床研究[J]. 中国药物依赖性杂志, 2006, 15(4): 284-287.

[7] 刘冬娴, 王德长. 丁丙诺啡(“1+1”)滥用情况调查[J]. 中国实用医药, 2008, 3(25): 8-10.

[8] Santosh K. Narcotic withdrawal features in buprenorphine and heroin dependence [J]. *Analgesia*, 1995, 1(4-6): 354.

[9] Lintzeris N. National clinical guidelines and procedures for the use of buprenorphine in the treatment of heroin dependence [J]. *Commonwealth Australia*, 2001, 55-56.

[10] 张晓军, 韩学文. 丁丙诺啡复方制剂治疗阿片类依赖研究进展[J]. 中国药物依赖性杂志, 2006, 15(5): 348-352.