

新型滥用药物丁丙诺啡分析方法研究进展

张忠辉¹, 王瑞花², 于忠山²

(1. 中国人民公安大学, 北京 100038; 2. 公安部物证鉴定中心, 北京 100038)

【摘要】 本文介绍了丁丙诺啡的提取及检测现状, 比较了液-液提取、固相萃取、酶消化、衍生化等前处理方法的优劣和 TLC、GC、GC/MS 以及 LC、LC/MS 等不同分析方法的应用情况。

【关键词】 法医毒物分析; 丁丙诺啡; 分析方法

【文献标识码】 A

【文章编号】 1001-5728(2010)01-0036-04

The development of research on determination methods of buprenorphine (ZHANG Zhonghui¹, WANG Ruihua², YU Zhongshan²/1. *Chinese people's public security university, Beijing 100038, China*; 2. *Institute of forensic science, Ministry of public security, Beijing 100038, China*)

【Abstract】 Buprenorphine, one kind of new drugs, is abused in recent years. In this review, some determination and extraction methods for buprenorphine are introduced. The relative merits of liquid-liquid extraction, solid phase extraction, hydrolysis and derivatization methods are compared. The analytical methods such as TLC, GC, GC/MS and LC, LC/MS are discussed.

【Key words】 forensic drug analysis; buprenorphine; analytical methods

丁丙诺啡(Buprenorphine, Bup)最早由20世纪60年代英国药物学家合成,属于生物碱蒂巴因的衍生物。丁丙诺啡是阿片受体激动-拮抗剂,主要用于镇痛,1978年起开始作为阿片类依赖治疗的药物^[1]。我国在1988年批准其作为镇痛药用于临床。与传统的吗啡、美沙酮等药物相比,丁丙诺啡具有很大的优势,因此被广泛用于临床镇痛和阿片类毒品依赖的脱瘾药。但丁丙诺啡仍有一定的依赖潜力,长期使用可产生耐受性和成瘾,使其由戒毒药品转化为滥用药品。

近年来,使用丁丙诺啡替代吸食(注射)海洛因

的吸毒人员不断增多。据报导^[2]我国某省会城市约70%的吸毒人员使用过盐酸丁丙诺啡。因而丁丙诺啡已成为近年来司法鉴定中比较常见的检测药物之一。国内外关于丁丙诺啡的提取和分析检测研究已经取得了一定的进展,对指导临床安全用药以及法医毒物分析的研究具有重要的意义。

1 理化性质

丁丙诺啡的分子式为 C₂₉H₄₁NO₄, 化学名称为 N-环丙基甲基-7α[1-(S)-1-羟基-1,2,3 三甲基]-6,14-桥乙烷-6,7,8,14-四氢东罂粟碱,其化学结构与吗啡相似(图1)。由于在第6和7位碳原子分别有甲氧基和异己醇基,这两个基团有增强阿片受体的激动作用,因此丁丙诺啡有激动-拮抗的双重特性。丁丙

【作者简介】 张忠辉,男,硕士研究生,研究方向:毒物毒品检验。E-mail:charm888@163.com

- [22] Stephans S E, Whittingham T S, Douglas A J, et al. Substrates of energy metabolism attenuate methamphetamine-induced neurotoxicity in striatum [J]. *J Neurochem*, 1998, 71(2): 613-621.
- [23] Burrows K B, Nixdorf W L, Yamamoto B K. Central administration of methamphetamine synergizes with metabolic inhibition to deplete striatal monoamines [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292(3): 853-860.
- [24] Albers D S, Sonsalla P K. Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: phar-

- macological profile of protective and nonprotective agents [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 275(3): 1104-1114.
- [25] Numachi Y, Ohara A, Yamashita M, et al. Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: Role of the dopamine and serotonin transporters [J]. *Euro J Pharm*, 2007, 572(2-3): 120-128.
- [26] Cadet J L, Jayanthi S, Deng X. Methamphetamine-induced neuronal apoptosis involves the activation of multiple death pathways [J]. *Neurotox Res*, 2005, 8(3-4): 199-206.

(收稿日期: 2008-12-22)

诺啡的辛醇水溶液的分配系数是 1217^[3], 这表明丁丙诺啡具有很高的亲脂性, 易被机体吸收并快速分布。

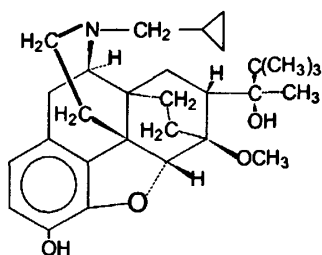


图1 丁丙诺啡的化学结构

Fig 1 Chemical structure of buprenorphine

2 提取净化方法的研究

目前国内外研究主要集中在对血、尿、肝、头发等体液和组织中提取丁丙诺啡方法的研究。常见有液-液萃取、固相萃取、酶消化、衍生化等。

2.1 液-液萃取法

刘冬娴等^[4]和贺江南等^[5]研究了血浆和肝组织中丁丙诺啡液液萃取方法。乙醇除蛋白, pH7 条件下用三氯甲烷提取, BSTFA 衍生化, GC/MS 分析, 血浆回收率可达 85.8%, 肝中回收率达 82.51%。Giovanni 等人^[6]用三氯甲烷: 异丙醇(9:1) 提取尿液、血清、唾液、头发等检材中的丁丙诺啡。检材先用 β -葡萄糖苷酸酶水解, pH8 条件下用三氯甲烷: 异丙醇(9:1) 提取, 80℃ 下 BSTFA 衍生化 10min, 经 GC/MS 分析。Liu 等^[7]用乙酸乙酯在提取血中丁丙诺啡和丁丙诺啡丙酸盐, 回收率 84% 以上。Pirmay 等^[8]用 Tox tubes A (内装二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、庚醇、异丙醇混合液) 提取大鼠血浆中的丁丙诺啡和氟硝安定, 丁丙诺啡平均回收率为 89%。George 等^[9]用氯仿: 异丙醇(9:1), 在 pH9 条件下提取尿液中的丁丙诺啡, 绝对回收率 59%。Favretto 等^[10]比较了氯丁烷/异丙醇(9/1, v/v) 和二氯甲烷/异丙醇/正庚烷(25/10/65, v/v) 萃取效率, 发现两者的提取回收率较高, 均在 85% 以上。

2.2 固相萃取法

固相萃取(SPE)是 70 年代中期出现的技术, 至今已发展成为多领域样品预处理的标准模式, 是目前样品处理中较为简捷、高效、灵活的一种手段。贺江南等^[5]用 401 有机担体制作固相萃取柱, 三氯甲烷做洗脱液, BSTFA 衍生化后检测, 回收率可达 86.35%。Mercolini 等^[11]用 C8 柱提取体液中的丁丙诺啡, 回收率达到 96% 以上。Liu 等^[12]使用 Oasis

HLB 柱(20mm × 2.1mm, 3.5 μ m), 利用在线固相萃取技术提取检测尿液中的丁丙诺啡, 回收率 93.6% ~ 102.2%。Yue 等^[13]使用 Oasis MCX 96 孔柱(60mg, 60 μ m), 5% 的氨水甲醇溶液作为洗脱液, 检测脑中丁丙诺啡含量在 20ng/g、200ng/g、2000ng/g 时回收率分别为 51.30%、69.06%、63.36%; 血浆在 33ng/mL、333ng/mL、3333ng/mL 时回收率分别为 74.64%、80.15%、84.61%。Murphy 等^[14]使用 Strata-X-C 柱(60mg/3mL), 1mL 血浆中加入 50 μ L 磷酸, 震荡 10s, 过经 2mL 甲醇和 2mL 水预处理的固相柱, 真空下用 2mL 0.1% 的磷酸冲洗, 干燥 3min, 2mL 5% 的氨水甲醇溶液洗脱, 方法在 3.0ng/mL、15ng/mL、30ng/mL 的相对回收率分别是 116.9%、82.3%、82.3%。Favretto 等^[10]用 Bond Elut C18 (200mg/3mL) 柱, 血液和尿液先经 β -葡萄糖苷酸酶 65℃ 消化 1h, 2mL 尿液添加 100mg 碳酸铵; 血液用冰乙醇除蛋白。处理后的血、尿试样分别通过经 3mL 甲醇和 3mL 0.01mol/L 的碳酸铵缓冲液预处理的固相柱, 3mL 碳酸铵缓冲液冲洗, 真空干燥 5min, 1mL 甲醇洗脱 2 次;。尿液回收率在 80% 以上, 血液回收率较低在 70% ~ 80%。

2.3 试样的水解

丁丙诺啡进入体内后经肝脏中 CYP₃A₄ 的 N-脱烷基作用, 产生的主要产物是诺丁丙诺啡, 丁丙诺啡和诺丁丙诺啡与葡萄糖醛酸结合产生丁丙诺啡葡萄糖苷酸和诺丁丙诺啡葡萄糖苷酸。因此, 水解使检材中丁丙诺啡和诺丁丙诺啡呈游离状态极为重要。主要有酸水解、碱水解、酶解等。Feng 等人^[15]研究了丁丙诺啡葡萄糖苷酸的水解法, 发现酶解效果最好, 酸水解和碱水解的效果较差, 不适合用来处理丁丙诺啡葡萄糖苷酸。Fox 等^[16]用 *Patella vulgate* β -葡萄糖苷酸酶处理尿液, 与不经处理的尿液比较发现, 丁丙诺啡和诺丁丙诺啡含量变化范围很大, 丁丙诺啡含量从 0 ~ 67%, 平均为 6.4%, 诺丁丙诺啡含量从 0 ~ 100%, 平均为 34%。因此, 经过酶解处理后可提高丁丙诺啡和诺丁丙诺啡的检出含量。

2.4 衍生化

丁丙诺啡的分子量大, 沸点较高, 给 GC-MS 分析带来许多困难。因此, 考虑用衍生化后技术改变性质再进行 GC-MS 分析。Wu 等^[17]比较了丁丙诺啡的几种衍生化方法, 包括甲基化、乙酰化、三氟乙酰化、五氟丙酰化、七氟丁酰化及三甲基硅烷基化。发现丁丙诺啡经过乙酸酐衍生化效果最好。刘冬娴等人^[18]使用 BSTFA-TMCS 衍生化试剂, 微波炉 560W 衍生

3min条件下进行衍生化于涉毒案件中丁丙诺啡的检验,效果最佳。柴育芳等人^[19]研究了BSTFA的最佳衍生化条件,结论是:以吡啶为溶剂,油浴80℃温度下反应30min,整个衍生化过程应在氮气保护下进行。

3 检测方法

随着分析技术的发展,对丁丙诺啡的检测方法亦在不断更新,目前较多使用的是HPLC和HPLC-MS法。

3.1 TLC法

刘冬娴等^[20]利用三氯甲烷:苯:乙二胺(9:9:2, v/v/v)作为展开剂,254nm紫外光和碘化铯钾为显色剂对丁丙诺啡检测。结果显示,在254nm紫外光下发蓝紫色荧光,碘化铯钾试剂显色为淡黄色斑点,Rf值为0.54。这种方法在血浆、尿、水中的检出限分别为0.7μg/mL、0.7μg/mL和0.6μg/mL。该法作现场物证筛选较好,方法简单易行。

3.2 GC法以及GC-MS法

刘冬娴等^[18]用HP-5(15m×0.53mm,0.25μm)毛细管柱,NPD检测器,线性范围为0.2μg/mL~80μg/mL,检出限10ng/mL,该方法灵敏度高,稳定性好,操作简单,可用于涉毒案件中丁丙诺啡的检验。George等^[9]建立了GC-MS法检测丁丙诺啡,使用HP-5MS毛细管柱(30m×0.25mm,0.25μm),选择离子扫描,以特征离子碎片m/z=468(诺丁丙诺啡),m/z=450(丁丙诺啡)测得检测限为1.0ng/mL。这种方法灵敏度高,可重复性好,适合用于丁丙诺啡的药理特征研究以及检测分析。Pirmay等^[8]用氟硝安定做内标,选用30m×0.25mm色谱柱,内涂0.25μm苯基甲基聚硅氧烷,EI离子源,四极杆质量分析器,选择离子扫描。该方法检测血浆中丁丙诺啡的线性范围为0.125ng/μL~25ng/μL,诺丁丙诺啡为0.125ng/μL~12.5ng/μL,氟硝安定为0.125~5ng/μL。三种物质的最小定量限为0.125ng/μL,非常适合用于丁丙诺啡药动力学的研究。Giovanni等^[6]检测尿液、血清、唾液、头发中丁丙诺啡,12m×0.2mm色谱柱,内涂0.33μm聚甲基硅氧烷,EI源,选择离子扫描,m/z=450,454。检测限1ng/mL。

3.4 HPLC法和HPLC-MS法

Liu等^[7]用液相色谱-荧光检测法检测动物血液中的丁丙诺啡,硅胶柱(250mm×4.6mm,5μm),线性范围2ng/mL~1500ng/mL,定量限为2.0ng/mL。Mostafavi等^[21]使用RP-HPLC分析丁丙诺啡/纳洛酮片剂中盐酸丁丙诺啡和盐酸纳洛酮的含量,Perfectsil Target ODS3色谱柱(150mm×4.6mm,5μm),

柱温35℃,210nm紫外检测,丁丙诺啡线性范围为0.22μg/mL~220μg/mL,纳洛酮0.1μg/mL~100μg/mL。刘冬娴^[22]用奋乃静做内标以HPLC-MS法检测,选用Thermo Hypersil-HyPURITY C18(150mm×2.1mm,5μm)色谱柱,电喷雾电离源(ESI),选择离子检测(SIM),m/z=468(丁丙诺啡),404(奋乃静)。方法的线性范围为0.2μg/L~100.0μg/L,检出限为0.1μg/L,丁丙诺啡和内标物得到了完全分离,检材中内源性杂质对分析几乎无干扰。Yue等^[13]用Symmetry Shield RP C8色谱柱(4.6m×50mm,3.5μm),丁丙诺啡-D4和诺丁丙诺啡-D3做内标HPLC-MS法分析,大气压离子喷射源,四极杆质量分析器,选择离子扫描。该方法在血浆中的线性范围为7ng/mL~8333ng/mL,最小定量限为7ng/mL,在脑组织中的线性范围为5ng/g~5000ng/g,最小定量限是5ng/g。Liu等^[12]用丁丙诺啡-D4做内标,利用在线SPE-LC-ESI-MS/MS技术检测尿中的丁丙诺啡,线性范围0.5ng/mL~100ng/mL,检测限为0.2ng/mL。Favretto等^[10]的研究中选用Luna CN(150mm×2.1mm,5μm)色谱柱,LCQ(Thermo Finnigan)离子阱质谱仪,ESI离子源,电压4.5kV。该方法显示了很高的灵敏度,在血液和尿液中的线性范围0.1ng/mL~10ng/mL,定量限为0.1ng/mL,检测限0.05ng/mL;在头发中线性范围10pg/mg~160pg/mg,定量限10pg/mg,检测限4pg/mg。

4 结语

从本文给出的信息看,国外对丁丙诺啡的检测方法进行了大量研究,检测水平已经达到痕量。国内虽亦有不少研究,但高水平的检测方法研究以及在实际案件中的应用还需进一步探索。因而,建立丁丙诺啡的系统检验方法已经成为国内毒化工作者亟待解决的实际问题。

参考文献

- [1] Ling W, Wesson D R. Clinical efficacy of buprenorphine: comparisons to methadone and placebo [J]. Drug Alcohol Depend, 2003, 70(2): 49-57.
- [2] 孙欣, 潘俊昌, 赵冬梅. 新型滥用药物盐酸丁丙诺啡 [J]. 广东公安科技, 2005, 81(4): 18-19.
- [3] Roy S D, Roos E, Sharma K. Transdermal delivery of buprenorphine through cadaver skin [J]. J Pharm Sci, 1994, 83(2): 126-130.
- [4] 刘冬娴, 贺江南. 血浆中丁丙诺啡提取方法研究 [J]. 光谱实验室, 2007, 24(2): 274-277.

- [5] 贺江南, 刘冬娴. 肝中丁丙诺啡提取方法研究 [J]. 湖南科技学院学报, 2007, 4(28):107-109.
- [6] Giovanni ND, Fucci N, Scarlata S, et al. Buprenorphine detection in biological samples [J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(12):1377-1379.
- [7] Liu SY, Liu KS, Kuei CH, et al. Simultaneous determination of buprenorphine and its prodrug, buprenorphine propionate, by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to pharmacokinetic studies in rabbits [J]. J Chromatogr B, 2005, 818: 233-239.
- [8] Pirnay S, Bouchonnet S, Hervé F, et al. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of buprenorphine, flunitrazepam and their metabolites in rat plasma: application to the pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2004, 807: 335-342.
- [9] George S, George C, Chauhan M. The development and application of a rapid gas chromatography-mass spectrometry method to monitor buprenorphine withdrawal protocols [J]. Forensic Sci Int, 2004, 143: 121-125.
- [10] Favretto D, Frison G, Vogliardi S, et al. Potentials of ion trap collisional spectrometry for liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry determination of buprenorphine and nor-buprenorphine in urine, blood and hair samples [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20: 1257-1265.
- [11] Mercolini L, Mandrioli R, Conti M, et al. Simultaneous determination of methadone, buprenorphine and norbuprenorphine in biological fluids for therapeutic drug monitoring purposes [J]. J Chromatogr B, Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 847(2): 95-102.
- [12] Liu AC, Lin TY, Su LW, et al. Online solid-phase extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of buprenorphine and three metabolites in human urine [J]. Talanta, 2008, 75:198-204.
- [13] Yue H, Borenstein MR, Jansen SA, et al. Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in rat brain tissue and plasma [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005, 52:314-322.
- [14] Murphy CM, Huestis MA. Liquid chromatographic/electrospray ionization, tandem mass spectrometric analysis for the quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine-3-b-D-glucuronide and norbuprenorphine-3-b-D-glucuronide in human plasma [J]. J Mass Spectrom, 2005, 40:70-74.
- [15] Feng S, Elsohly M A, Duckworth D T. Hydrolysis of conjugated metabolites of buprenorphine. I. The quantitative enzymatic hydrolysis of buprenorphine-3-beta-D-glucuronide in human urine [J]. J Anal Toxicol, 2001, 25(7): 589-593.
- [16] Fox E J, Tetlow V A, Allen K R. Quantitative analysis of buprenorphine and norbuprenorphine in urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Anal Toxicol, 2006, 30(4): 238-244.
- [17] Wu C H, Yang S C, Wang Y S, et al. Evaluation of various derivatization approaches for gas chromatography-mass spectrometry analysis of buprenorphine and norbuprenorphine [J]. J Chromatogr A, 2008, 1182(1): 93-112.
- [18] 刘冬娴, 贺江南. 微波照射衍生化气相色谱法检测丁丙诺啡 [J]. 光谱实验室, 2007, 24(5): 987-990.
- [19] 柴育芳, 苏少明, 王瑞花, 等. 衍生化 GC-MS 法分析丁丙诺啡 [J]. 分析测试学报, 2005, 24:94-99.
- [20] 刘冬娴, 贺江南. 薄层色谱法检测丁丙诺啡 [J]. 中国法医学杂志, 2007, 22(4):242-243.
- [21] Mostafavi A, Abedi G, Jamshidi A, et al. Development and validation of a HPLC method for the determination of buprenorphine hydrochloride, naloxone hydrochloride and noroxymorphone in a tablet formulation [J]. Talanta, 2009, 77:1415-1419.
- [22] 刘冬娴. 尿液中丁丙诺啡的液相色谱-质谱分析 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 34(4): 485-489.

(收稿日期:2009-02-23)

(上接第29页)

- [4] 王海燕, 胡涛, 付风华, 等. 单克隆抗体 2E6 对大鼠脑缺血组织 AChE 的特异性标示 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(1):108-109.
- [5] 田美玲, 陆璐, 徐慧君. 体外培养胆碱能神经元的乙酰胆碱酯酶组化染色 [J]. 南通医学院学报, 1996, 16(1):149-150.
- [6] 张冬云, 樊可同. 热休克蛋白 70 家族及其功能 [J]. 广州医学院学报, 1995, 23(4):94-94.
- [7] 肖红, 王泉云, 廖刃, 等. 氯胺酮-咪唑安定对感染性休克大鼠血清肿瘤坏死因子- α 及心肌热休克蛋白 70 表达的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2001, 17(9):491-493.
- [8] 赵连旭, 徐小虎, 祝家镇, 等. 热休克蛋白 70 对大鼠脑干损伤诊断的免疫组织化学研究 [J]. 法医学杂志, 1998, 14(3):135-137.
- [9] Craig EA. The heat shock response [J]. CRC crit rev biochem, 1985, 18(5): 239-280.
- [10] Lindsberg PJ, Frerichs KU, Siren AL, et al. Heat-shock protein and C-fos expression in focal micro-vascular brain damage [J]. Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16:82-91.

(收稿日期:2008-12-21)