《利用新型重组 β-葡萄糖醛酸酶对尿样中的纳洛酮进行水解及 LC-MS/MS 分析》摘要

概述

纳洛酮是一种合成麻醉剂，可作为鸦片类拮抗剂抑制其过度使用。它常与丁丙诺啡（Suboxone®、Zubsolv®、Bunavail™ buccal film）共同配制，可在组合配方发生改变或非肠道给药时防止误用并产生戒断作用。疼痛药物监测实验室选用一种生物重组的 β-葡萄糖醛酸酶 —— IMCSzyme® 对体内代谢产生的纳洛酮代谢物进行水解（包括烯丙羟吗啡酮、脱氧吗啡酮及 6β-纳洛醇）。研究结果显示，在 65℃ 孵育 60 分钟的水解效率约为 70%，并可获取令人满意的精确度及可重复性。

材料和方法

在空白尿样中加入纳洛酮-3-葡萄糖醛酸苷 3000 ng/mL，完全水解后可释放1952 ng/mL 的纳洛酮。向每个样本中加入 ≥ 1631 U 的 IMCSzyme®。在三天内对每个样品做 10 次重复实验以评估其水解效率，水解条件是在 55℃ 及 65 ℃ 下分别孵育 0、15、30、45 及 60 分钟。使用 Suboxone® 处方药患者的阳性样品进行实验，证实了最佳水解条件为 65℃ 孵育 60 分钟。研究实验中用 Waters Acquity TQD UPLC®-MS/MS 系统进行分析，使用 BEH Phenyl 柱（ 1.7 µm, 2.1 x 50 mm, 100 Å column 进行分离，柱温 50℃，2.1 分钟的梯度色谱分离分析物，分析软件为 Waters MassLynx software。

结果

在浓度范围 5 ng/mL 至10000 ng/mL 内选 11 个点、每个点做 5 次重复实验以评估极限值和线性度。纳洛酮与 6β-纳洛酮的定量限与检出限为 5 ng/mL。选用 3 个浓度（ 75 、 750 、 7500 ng/mL）各进行 10 次重复以检测批内和批间的精密度与准确度。实验结果为：准确度 ± 12.61%、CV 小于 12.59% 。

表1 水解效率及校正系数

化合物名称	重复数	Day 1	Day 2	Day 3	当天
		1953 ng/mL			
纳洛酮-3-葡萄糖醛酸苷	1	1461.7	1416.6	1442.1	1359
	2	1354.6	1301.2	1367.9	1392.3
	3	1300.3	1426.7	1412	1402.6
	4	1276.1	1393.3	1428	
	5	1422.7	1430.1	1422.3	
	6	1376.8	1383.9	1427.8	
	7	1336	1376.1	1446.8	
	8	1284.4	1404.9	1261.6	
	9	1368.8	1400.3	1399.6	
	10	1408.7	1389.5	1417.5	
	平均值	1359	1392.3	1402.6	1384.6
	%CV	4.29%	2.49%	3.68%	1.34%
	%Target	69.60%	71.30%	71.83%	70.91%
校正系数	计算值/平均值	1.437	1.402	1.392	1.41
	%CV				1.35%

水解效率分析实验的方法与上述实验类似，在三天进行十次水解对照实验（3000 ng/mL 纳洛酮-3-葡萄糖醛酸苷 —— 目标浓度为 1953 ng/mL 的纳洛酮），数据见表1。由于实际的水解效率始终保持在 70% 左右，为了保证计算浓度与 100% 水解的浓度一致，使用了校正系数（ 1.41 ）用水解法对 36 例患者样品进行检测的结果显示：纳洛酮均呈现阳性（浓度范围为 8.1 ~ 9623.5 ng/mL ），期中 19 例呈 6β-纳洛酮阳性（浓度范围 < 5.0 ~ 186.6 ng/mL）。

结论

相对于其他代谢物而言，纳洛酮葡萄糖醛酸苷是尿液中最常见的代谢产物。而 IMCSzyme® 纳洛酮水解实验中酶的理想选择。Suboxone® 处方药患者样本分析结果表明，纳洛酮阳性检出率为 100% 。

参考文献

1. R. C. Baselt. Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 10th edition. Biomedical Publications, Seal Beach, CA, 2014.
2. W. B. Fang, Y. Chang, E. F. McCance-Katz, and D. E. Moody, Determination of naloxone and Nornaloxone (Noroxymorphone) by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization, J. Anal. Tox. 33, 2009, 409-417.
3. P. Heikman, M. Haddinen, M. Gergo, and I. Ojanpera, Urine Naloxone Concentration at Different Phases of Buprenorphine Maintenance Treatment., Drug Treatment and analysis, 6, 2014, 220-225.

This information was summarized by IMCS from the technical poster “Development of an LC/MS-MS Naloxone Hydrolysis Assay Using a Recombinant Beta-Glucuronidase for Urinalysis” by Gregory L McIntire - Ameritox, Ltd. at SOFT 2015