利用快速水解葡萄糖醛酸技术可提高苯二氮卓类药物的免疫检测灵敏度

概述

苯二氮卓类（BZDs）药物广泛用于睡眠障碍、抑郁症、压力过大、肌肉痉挛、癫痫等疾病的治疗，还可用于全身麻醉和戒酒。 临床和法医毒理实验室通常利用免疫分析法快速筛查尿液中的BZDs。 该检测方法对尿样中葡萄糖醛酸代谢物的灵敏度低，且BDZs需要达到一定浓度以满足较低的临界值。 研究表明，酶催化水解葡萄糖醛酸可提高检测的灵敏度和特异性，减少假阴性结果。 据报道，一种生物工程改良的β-葡萄糖醛酸酶IMCSzyme®可在室温下快速水解 BZDs 葡萄糖醛酸缀合物，用于LC-MS/MS分析。 本实验利用这种快速水解技术，提高了尿液中 BZDs 免疫检测的灵敏度，减少假阴性结果。

引言

苯二氮卓类（BZDs）药物广泛用于睡眠障碍、抑郁症、压力过大、肌肉痉挛、癫痫等疾病的治疗[1]，还可用于全身麻醉和戒酒。 因此检测尿液中的代谢物以确保患者按方案治疗尤为重要。免疫分析法是一种快速、定性筛查尿液中 BZDs 的方法，可通过商业途径购买[2]，但也存在一定的局限性，其一是在免疫测定中使用的抗体对某些 BZD 葡萄糖醛酸缀合物的交叉反应程度较低，增加假阴性结果。

为提高免疫检测灵敏度，通常用β-葡萄糖醛酸酶对尿液样品进行预处理，使 BZD药物解离出葡萄糖醛酸。 在检测劳拉西泮时，用酶预处理可提高灵敏度 [3-7]，但实验较繁琐。近期研究表明， EMIT™ （酶扩大免疫测定技术）检测BZDs药物的的假阴性率达到35.5％[3]。 另一项研究表明，在已通过LC-MS/MS确认的近300个含有BZDs药物的真实样品中，加入水解步骤，再利用三种不同的免疫试剂盒（KIMS™，CEDIA™和 HSCEDIA™）检测，其中，高灵敏度试剂盒（HS-CEDIA）漏掉了22％的 BZD 阳性样品[4]。 以上研究结果表明，当前免疫测定试剂盒中使用的水解方法不够理想。

近日，某疼痛监测实验室报告称，一种生物工程改良的β-葡萄糖醛酸酶（IMCSzyme），在室温下可以使尿液中母体 BZDs 快速解离出葡萄糖醛酸，加快LC-MS/MS分析过程[8]。 此方法是在尿液 BZDs 免疫检测之前，加入 IMCSzyme 水解且无需加热，减少了预处理时间。 这种快速水解技术从LC-MS/MS至免疫筛选过程都适用，可突破样品处理的时间瓶颈，减少初筛时假阴性的数量。

材料和方法

7-氨基氯硝西泮，α-羟基阿普唑仑，阿普唑仑，氯硝西泮，地西泮，劳拉西泮，咪达唑仑，去甲西泮，奥沙西泮，替马西泮，劳拉西泮葡萄糖醛酸，奥沙西泮葡萄糖醛酸，替马西泮葡萄糖醛酸，7-氨基氯硝西泮-d4，氯硝西泮-d4，地西泮-d5，咪达唑仑-d4，奥沙西泮-d5和替马西泮-d5均购自 Cerilliant Corporation。 IMCSzyme β-葡萄糖醛酸酶购自 Integrated MicroChromatography Systems，LLC。BZD 免疫检测试剂盒购自 Neogen Corporation。该试剂盒（内含 β-葡萄糖醛酸酶标准品，称为酶S）操作按说明书进行。

免疫检测酶的预处理步骤稍加调整。将酶S和 IMCSzyme 分别用相应的水解缓冲液稀释至100 和 1000 U/mL。分别取十二个患者尿样 20 µL与20 µL稀释的酶/缓冲液混合，在室温（20°C）下水解 10 分钟（说明书建议 37°C水解 15 分钟）。

准备 10 µL校准液（一式两份），其中包含0 ng/mL（阴性对照）或 200 ng/mL BZDs（参考临界值），添加至酶标板中。无药尿样（奥沙西泮加标至 200 ng/mL）和未水解尿样稀释10倍，水解尿样稀释5倍。取 10 µL稀释后样品一式两份加入酶标板中。每孔中加入 100 µL药物缀合物，室温孵育 45 分钟。清洗酶标板，加入 100 µL底物孵育 30 分钟，再加入 100 µL终止液终止反应。在酶标仪（SpectroMax M2）450 nm波长处测量吸光度。LC-MS / MS 检测 BZD 浓度。以0、50、100、200、500 和 1,000 ng/mL 的 BZDs 加标尿样绘制标准曲线。分别以8:2:5的比例制备酶、水解缓冲液和内标（200 ppb溶于50％甲醇）工作液。取 75 µL工作液与 50 µL尿样混合，55°C水解30分钟。使用 DPX WAX 枪头式分散固相微萃取柱萃取。将萃取柱用30％甲醇平衡，并用 MilliQ 水洗涤。将水解后的样品吸打3次，使分析物与树脂结合。用 MilliQ 水洗涤萃取柱，将分析物在 1％甲酸-乙腈中洗脱。吹干洗脱液，并在 200 µL 5％甲醇中复溶。

仪器：Thermo TSQ Vantage三重四极杆质谱仪-Agilent 1260 高效液相色谱。色谱柱：Agilent Poroshell EC-C18（3.0 x 50 mm，2.7 µm），柱温 50°C。流动相A：0.1％甲酸-水溶液，流动相B：0.1％甲酸-乙腈溶液。 进样量：5 µL。样品保留时间：6 分钟。 质谱参数：电喷雾电压，4000 V；气压，60 psi。

结果

因代谢产物和药物/ HRP结合物之间的竞争性结合，信号强度与样品中 BZDs 含量成反比。由于基质效应，添加 200 ng/mL奥沙西泮的无药尿样的吸光度高于临界值（图1）。以添加奥沙西泮的无药尿样的吸光度值为临界值，吸光度高于 0.994 的样品为阴性，低于 0.994 的样品为阳性。

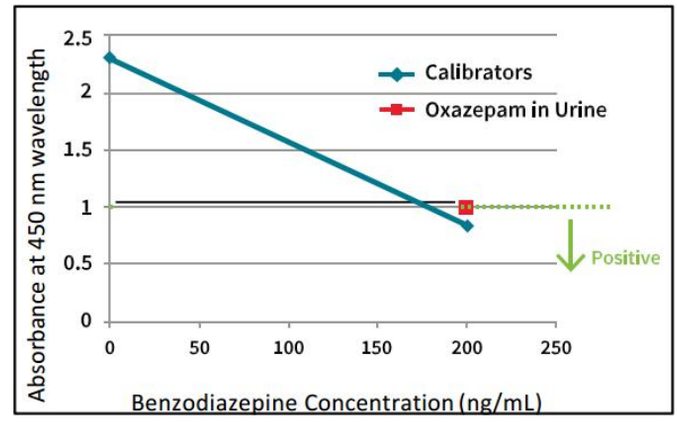


图1. ELISA 检测的 BZD s浓度与 450 nm波长吸光度关系图。◆为标准曲线。■为添加 200 ng/mL奥沙西泮的无药尿样。▬▬ 为临界值。

通过 ELISA 试剂盒筛选出12例患者尿样的酶预处理结果见图2。 12例样品中有7例未经酶解的样品呈阴性（表1）。经酶S水解后，免疫测定的灵敏度未提高。而 IMCSzyme 预处理得到4例真实的阴性结果和8例真实的阳性结果。 通过IMCSzyme的预处理可以增强整体吸光度信号，而酶S不能显著提高试剂盒的灵敏度。

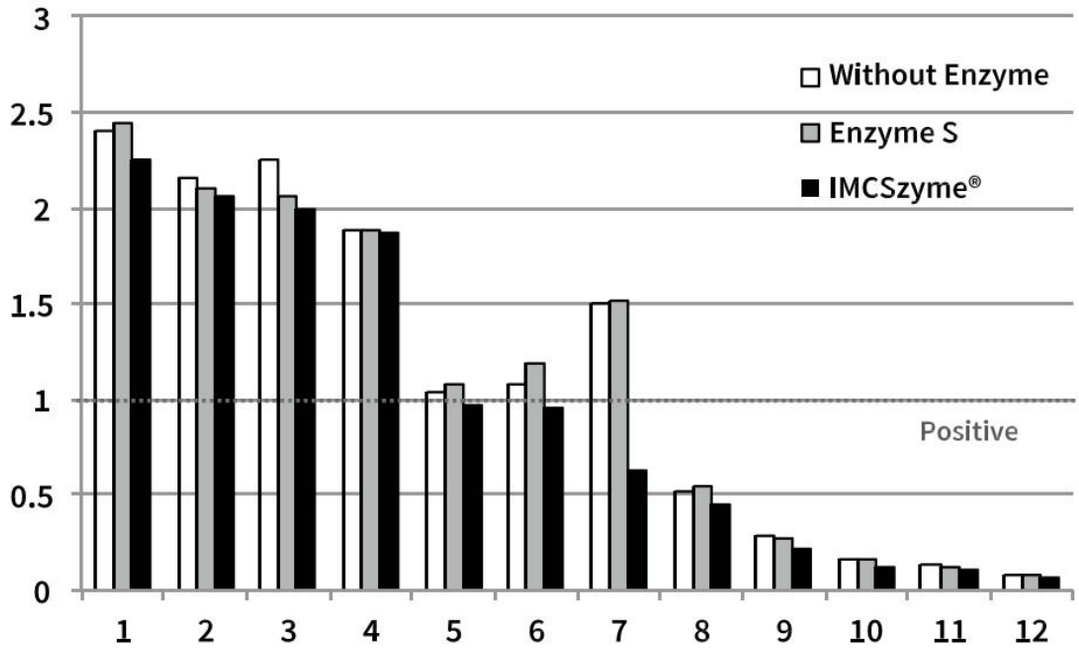


图2. 通过 ELISA 筛选出的12例患者尿样在450 nm波长的吸光度。 临界值（0.994）以下为 BZDs阳性。

表1. 通过 ELISA 试剂盒进行筛选，结果分别为不加酶，加酶 S，加IMCSzyme。高亮为假阴性结果。

样品编号	不加酶	Enzyme S	IMCSzyme®
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	+
6	-	-	+
7	-	-	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+

取10例患者样品，通过LC-MS/MS分析BZDs 度。 其中有8例确认为阳性，3例不含任何 BZDs，第4例阴性样品中含有少于200 ng/mL的BZD。 以上结果与IMCSzyme水解的ELISA结果相吻合。 如果不使用IMCSzyme预处理，则 #5，6和7样品的ELISA筛选为假阴性（表 2）。 样品 #5和6中7-氨基氯硝西泮浓度接近临界值，分别为209和378 ng/mL（表2）。 对于样品#5，ELISA 结果仅略低于临界值 0.994。样品＃7 含有1,179 ng/mL的劳拉西泮，因免疫检测对其葡糖醛酸缀合物不灵敏，所以 ELISA 筛选易产生假阴性结果。[4，9]

表2. 12 例真实患者尿样中阳性和阴性筛查结果与相应的LC-MS/MS含量检测结果比较。

样品编号	ELISA+IMCSzyme® 预处理	LC-MS/MS	
		化合物	浓度(ng/mL)
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	咪达唑仑	20
5	+¥	7-氨基氯硝西泮	209
6	+¥	7-氨基氯硝西泮	378
7	+¥	劳拉西泮	1,179
8	+	α-羟普唑仑	145
9	+	阿普唑仑	42
10	+	地西泮	14
		诺地西泮	107
		奥沙西泮	1,105
		替马西泮	296
11	+	地西泮	25
		诺地西泮	132
		奥沙西泮	1,525
		替马西泮	1,097
12	+	地西泮	27
		诺地西泮	772
		奥沙西泮	66,769
		替马西泮	3,664

¥：未经酶预处理或酶 S 处理的免疫筛查为假阴性结果

结论

该研究表明，在进行尿液中BZDs免疫检测之前，使用β-葡萄糖醛酸酶进行预处理尤为重要。预处理可提高检测灵敏度并减少假阴性的比率。ELISA 试剂盒说明书建议使用酶S于37°C孵育15分钟，而使用 IMCSzyme β-葡萄糖醛酸酶于室温孵育10分钟即可，减少了孵育时间且无需加热。结合 ELISA 筛查 12 例患者尿样时，没有假阴性结果。未来可与其他商业试剂盒联合使用，进一步检测更多的真实患者样品。

参考文献

1. Hutchinson, M.A., P.F. Smith, and C.L. Darlington, The behavioural and neuronal effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. Prog Neurobiol, 1996. 49(1): p. 73-97.
2. Bertol, E., et al., Cross-reactivities and structure–reactivity relationships of six benzodiazepines to EMIT® immunoassay. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. 84: p. 168-172.
3. Dixon, R.B., D. Floyd, and A. Dasgupta, Limitations of EMIT Benzodiazepine Immunoassay for Monitoring Compliance of Patients With Benzodiazepine Therapy Even After Hydrolyzing Glucuronide Metabolites in Urine to Increase Cross-Reactivity: Comparison of Immunoassay Results With LC-MS/MS Values. Therapeutic Drug Monitoring, 2015. 37(1): p. 137-139.
4. Darragh, A., et al., KIMS, CEDIA, and HS-CEDIA immunoassays are inadequately sensitive for detection of benzodiazepines in urine from patients treated for chronic pain. Pain Physician, 2014. 17(4): p. 359-66.
5. Simonsson, P., A. Lidén, and S. Lindberg, Effect of beta-glucuronidase on urinary benzodiazepine concentrations determined by fluorescence polarization immunoassay. Clinical Chemistry, 1995. 41(6): p. 920-3.
6. Boussairi, A., et al., Urine Benzodiazepines Screening of Involuntarily Drugged and Robbed or Raped Patients. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 1996. 34(6): p. 721-724.
7. Beck, O., et al., Detection of benzodiazepine intake in therapeutic doses by immunoanalysis of urine: two techniques evaluated and modified for improved performance. Clinical Chemistry, 1992. 38(2): p. 271-5.
8. Morris, A.A., et al., Rapid enzymatic hydrolysis using a novel recombinant beta-glucuronidase in benzodiazepine urinalysis. J Anal Toxicol, 2014. 38(8): p. 610-4.
9. Klette, K.L., et al., Urine Benzodiazepine Screening using Roche Online® KIMS Immunoassay with β-Glucuronidase Hydrolysis and Confirmation by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 2005. 29(3): p.193-200.