酸水解对鸦片类代谢产物的降解和转换

摘要

鸦片类代谢物通常采用酸水解的方法进行分析，尤其是可待因-6-β-D-葡萄糖苷酸和吗啡6-β-D-葡萄糖苷酸[1]。

前期有研究比较了酸水解及酶水解在氧可酮和氢可酮检测方面的差异。酸水解的样本出现八例氧可酮或氢可酮假阴性结果，一例氧吗啡酮假阳性结果。

使用强酸高温水解会导致反甲基化效应，使氧可酮转变成氧吗啡酮，氢可酮转变成氢吗啡酮。

本研究报道了一种水解方法可显著改善酸水解出现的负效应，包括可待因到吗啡的转变，去甲可待因到去甲吗啡的转变，去甲氧可酮到脱氧吗啡酮的转变，去甲氢可酮到去甲氢吗啡酮的转变。

概述

为了更简便地监测鸦片及鸦片类药物在体内的代谢，患者样本通常需要通过浓酸或酶对代谢产生的葡萄糖苷酸进行水解以释放目标待测物，再通过质谱进行分析。过去研究认为对于鸦片类代谢物，酸水解比酶水解的效率更高。但是酸水解会产生很多负效应，如高温、浓酸会使海洛因代谢物 6-单乙酰吗啡降解[2]。在我们的前期研究中，我们发现酸水解会降解氧可酮和氢可酮，进而导致回收率降低及假阴性结果，同时可产生氧可酮转变成氧吗啡酮，氢可酮转变成氢吗啡酮的后果[3]。鉴于此，在本研究中，我们分析了降解及转变的百分比。酸水解所产生的负效应应被重视。

材料与方法

1. 在水中分别填加 5000 ng/mL 的氧可酮，氢可酮，去甲氧可酮，去甲氢可酮，可待因，去甲可待因。
2. 在上述 0.5 mL 溶液中加入等体积的水解酸，95℃加热 90 分钟。
3. 加入 0.1 M 醋酸钠和氢氧化铵。
4. 360 µL 的样本溶液加入 40 µL 内标（溶解于 50%甲醇中）。
5. 每个样本制备三份。
6. 校准物及质控样品为购买的标准品，并溶解于水中。校准物及质控样品不需加热，酸水解后立即进行中和反应。
7. 每个待测物制备四点校正曲线。校正曲线准确性为目标值±20%，校正系数（R^2）大于 0.98，吗啡的 R^2 为 0.94。
8. 每个内标的相对标准偏差小于 15%（氧吗啡酮-d_3，氢吗啡酮-d_3，去甲氢可酮-d_3，吗啡-d_3）。
9. 分析设备：AB SciEx 4500 三重四极杆质谱，Shimadzu LC-20 AD 液相色谱，Phenomenex Kinetex 2.6 µm biphenyl, 100 Å, 50 x 3 mm column。流动相 A 为含有 0.1%甲酸的水，流动相 B 为含有 0.1%甲酸的甲醇，线性梯度，温度为 40℃，流速为 0.7 mL/min，上样 5 µL。

结果

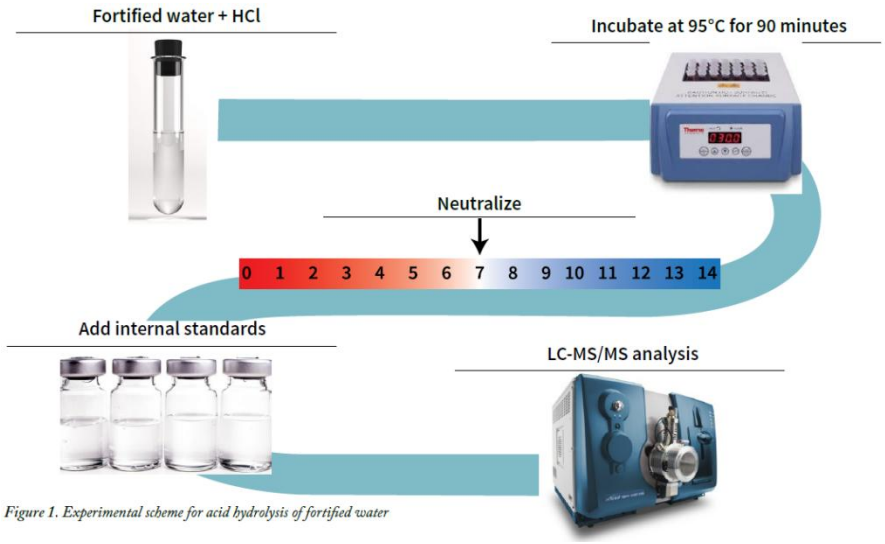


图 1. 酸水解流程图。

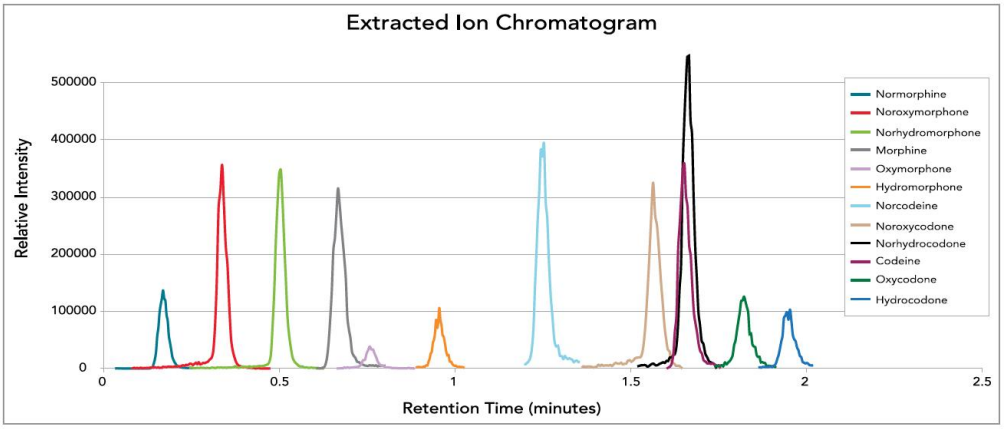


图 1. 12 种鸦片及鸦片类似物分离的离子图谱。

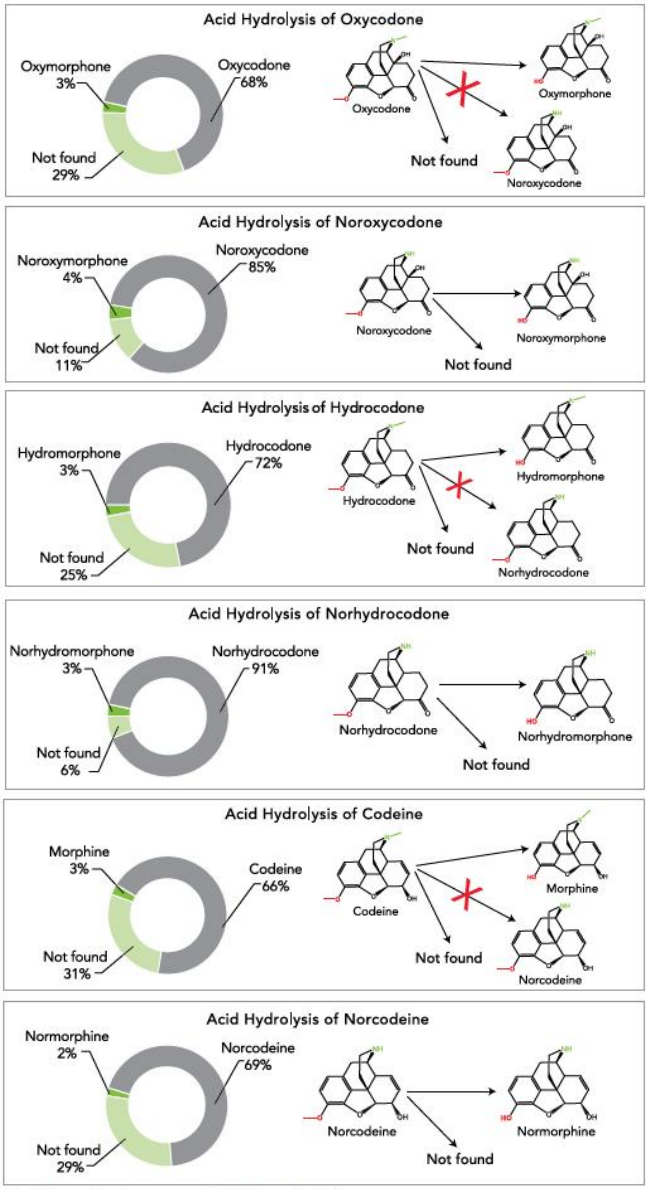


Figure 3. Average calculated amounts recovered after 90 minutes of hydrolysis

图 1. 90 分钟酸水解后检测的平均值。

表 1. 酸水解检测值。

酸水解复合物（5000 ng/mL）	检测出的物质	检测值（ng/mL）	回收率	降解率
氧可酮	氧可酮	3423±410	68±8 %	32±8 %
	氧吗啡酮	161±34	3.2±0.7 %	
去甲氧可酮	去甲氧可酮	4227±373	85±7 %	15±7 %
	去甲氧吗啡酮	192±36	3.8±0.7 %	
氢可酮	氢可酮	3596±405	72±8 %	28±8 %
	氢吗啡酮	150±11	3.0±0.2 %	
去甲氢可酮	去甲氢可酮	4532±121	91±2 %	9±2 %
	去甲氢吗啡酮	143±30	2.9±0.6 %	
可待因	可待因	3302±261	66±5 %	34±5 %
	吗啡	135±33	2.7±0.7 %	

去甲可待因	去甲可待因	3458±221	69±4 %	31±4 %
	去甲吗啡	111±9	2.0±0.2	

酸水解导致9%的去甲氢可酮和34%的可待因发生降解。待测物的转变为2-4%。每种待测物的检测浓度极低，说明酸水解产生很大的负效应，且未被LC-MS/MS检测到。实验中未发生氧可酮到去甲氧可酮的转变，氢可酮到去甲氢可酮的转变，氧吗啡酮到去甲氧吗啡酮的转变，氢吗啡酮到去甲氢吗啡酮的转变，说明N-甲基不易被切去。

结论

高温下的酸水解使3-羟基基团的甲基脱离，进而导致氧可酮转变成氧吗啡酮，可待因到吗啡的转变，去甲可待因到去甲吗啡的转变，去甲氧可酮到脱氧吗啡酮的转变，去甲氢可酮到去甲氢吗啡酮的转变。而且在90分钟水解过程中大部分的鸦片或鸦片类似物发生降解。这些负效应可导致假阴性或假阳性结果。而采用β-葡萄糖醛酸酶对这些代谢物的水解会提高检测的准确性[3]。

参考文献

1. Wang, P., Stone, J. A., Chen, K. H., Gross, S. F., Haller, C. A., & Wu, A. H. (2006). Incomplete Recovery of Prescription Opioids in Urine using Enzymatic Hydrolysis of Glucuronide Metabolites. Journal of Analytical Toxicology, 30(8), 570-575. doi:10.1093/jat/30.8.570

2. Yuan, C., Heideloff, C., Kozak, M., & Wang, S. (2011, October 8). Simultaneous quantification of 19 drugs/metabolites in urine important for pain management by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 50(1), 95-103. doi:10.1515/cclm.2011.739

3. Sitasuwan, P., Melendez, C., Marinova, M., Mastrianni, K., Darragh, A., Ryan, E., & Lee, L. A. (2016). Degradation of Opioids and Opiates During Acid Hydrolysis Leads to Reduced Recovery Compared to Enzymatic Hydrolysis. Journal of Analytical Toxicology, 40, 601-607. doi:10.1093/jat/bkw085