利用新型改良β-葡萄糖醛酸酶对尿样中鸦片类代谢物的快速水解

摘要

- 目前，滥用鸦片及鸦片类似物导致的致死率一直在上升。
- β-葡萄糖醛酸酶对可待因-6-β-D-葡萄糖苷酸的水解一直都是难题。
- 3000 U 活性的 IMCSzyme（每 30 µL 尿液使用 60 µL）在 15 分钟即可水解大于 80% 的可待因-6-β-D-葡萄糖苷酸（30000 ng/mL）。

引言

鸦片及鸦片类似物普遍用来治疗疼痛，但却易成瘾，其滥用程度在 15 年中显著增长，过度滥用鸦片导致的致死率从 2000 年翻三倍[1]。因此对其检测及定量变得十分重要。在尿液中检测药物的最简便方法即是使用β-葡萄糖醛酸酶对药物复合物进行水解，然后进行 LC-MS/MS 分析。美国物质滥用和精神健康服务管理局（SAMSHA）发布的标准里提到，可待因在尿液中的临界浓度为2000 ng/mL，但在实际患者尿液样本中检测可达到100000 ng/mL[2]。在本研究中，我们关注于怎样使水解时间缩短，且样本量减少，提高水解效率，并检测了以下四种高浓度鸦片待测物：可待因，吗啡，氧吗啡酮和氢吗啡酮。

材料与方法

1. 正常尿液中加入 30000 ng/mL 的 C6G 和 500 ng/mL 的吗啡-6-β-D-葡萄糖苷酸（M6G），氧吗啡酮-3-β-D-葡萄糖苷酸（O3G），氢吗啡酮-3-β-D-葡萄糖苷酸（H3G）。
2. 30 µL 上述溶液中加入 270 µL 水解复合物（见表 1），每个条件重复 3 孔。每个反应的酶用量范围为 5 µL - 80 µL。于 55℃分别孵育 15,30,60 分钟。
3. 水解后用 DPX WAX 枪头进行纯化，用含有 1%甲酸的乙腈洗脱，并经氮气吹干，复溶于 100 µL 含有 5%甲醇的水中。
4. LC-MS/MS 上样分析。

结果

60 µL IMCSzyme 水解仅 15 分钟后即可检测 100%吗啡，94%氧吗啡酮，98%氢吗啡酮和 84%可待因。30 µL IMCSzyme 在 30 分钟可水解 90%以上的葡萄糖苷酸。当孵育时间为 60 分钟，至少需使用 15 µL IMCSzyme 即可水解超过 90%的 M6G，O3G，H3G，水解超过 80%的高浓度 C6G，使用 25 µL IMCSzyme 可 100%水解四种复合物。

结论

对尿液中药物的检测，使用 IMCSzyme 可减少样本使用量，并节省时间。即使检测高浓度的鸦片代谢物，60 µL IMCSzyme 也能在 60 分钟对药物完全水解。

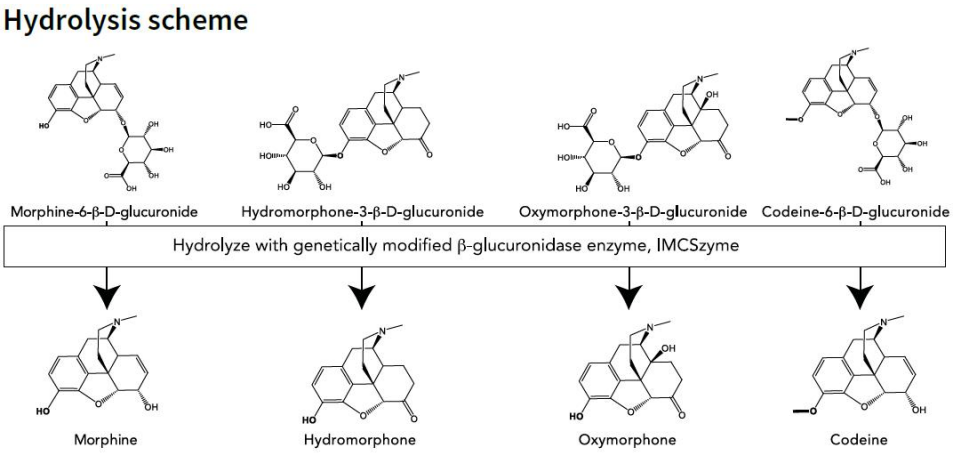


Figure 1. Codeine-6-β-D-glucuronide (C6G) is a drug metabolite that is particularly hard to hydrolyze and generally has poor yield even with incubation time over 2 hours.[3]

图 1. C6G 是一种很难被水解的化合物，即使水解 2 小时以上其检测浓度也很低[3]。

表 1. 水解条件。

Table 1. Ratios for hydrolysis reaction.

30 µL Urine		Master Mix <QS to 270 µl with water>			Total Volume
		IMCSzyme (µL)	Rapid Hydrolysis Buffer	Internal Standards in 50% MeOH	
	+	5	90 µL	30 µL	= 300 µL
		10			
		15			
		20			
		25			
		30			
		40			
		50			
		60			
		70			
		80			

30,000 ng/mL C6G
500 ng/mL M6G
500 ng/mL O3G
500 ng/mL H3G

60 minute hydrolysis

15 and 30 minute hydrolysis

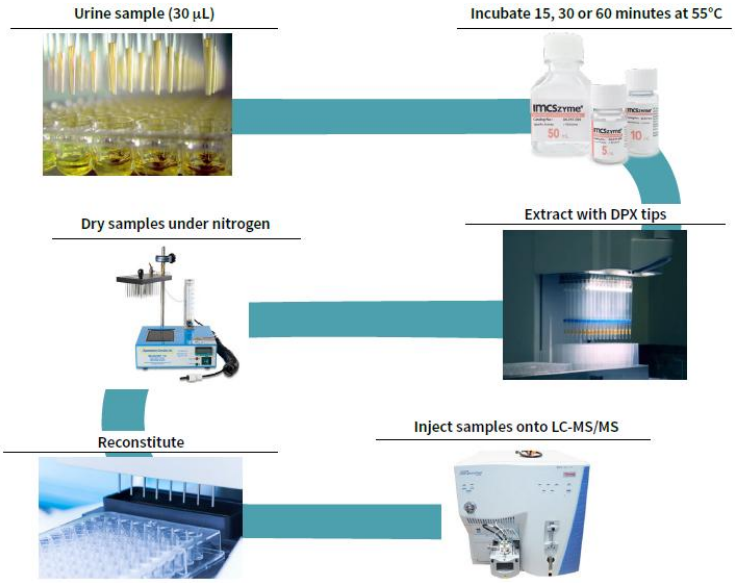


Figure 2. Schematic representation of hydrolysis and sample preparation procedures

图 2. 样品制备及水解流程图。

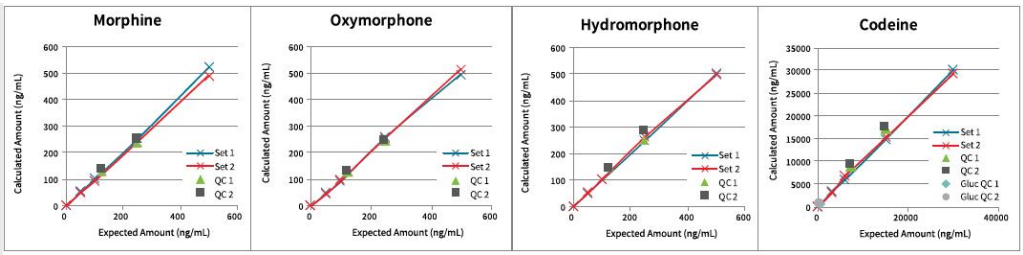


图 3. 校正曲线。吗啡（50-500 ng/mL），氧吗啡酮（50-500 ng/mL），氢吗啡酮（50-500 ng/mL），可待因（3000-30000 ng/mL）。计算值与期望值的校正系数大于 0.99。

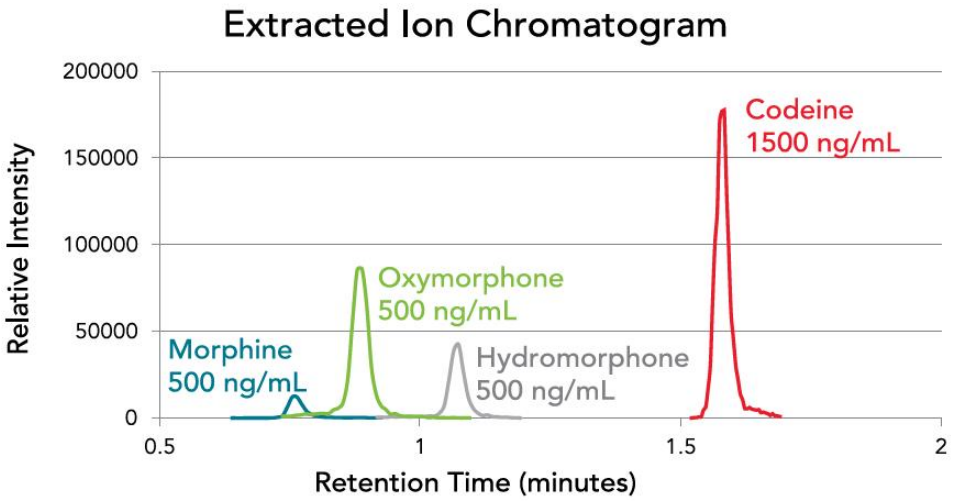


图 4. 分析图谱。提取离子色谱图显示吗啡，羟吗啡酮，氢吗啡酮和可待因的分离及浓度

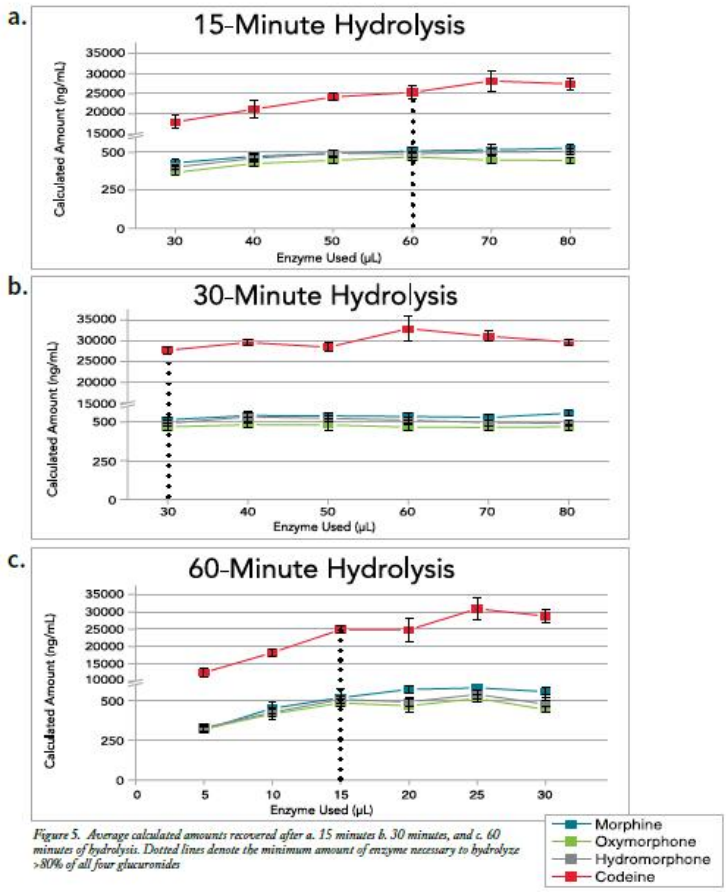


Figure 5. Average calculated amounts recovered after a. 15 minutes b. 30 minutes, and c. 60 minutes of hydrolysis. Dotted lines denote the minimum amount of enzyme necessary to hydrolyze >80% of all four glucuronides

图 5. 平均检测值。a. 15 分钟水解，b. 30 分钟水解，c. 60 分钟水解。虚线表示水解大于 80%复合物时所需要 IMCSzyme 的最小量。

表 2. IMCSzyme 水解的最佳反应条件。

Table 2. Summary table of ideal IMCSzyme amounts with hydrolysis incubation times

Urine Sample	Amount of IMCSzyme needed to achieve: • >90% recovery of 500 ng/mL of O3G, M6G, and H3G • >80% recovery of 30,000 ng/mL of C6G	Hydrolysis Incubation Time
30 µL	60 µL	15 minutes
	30 µL	30 minutes
	15 µL	60 minutes

参考文献

1. Rudd, R. A., Aleshire, N., Zibbell, J. E., & Gladden, R. M. (2016, January 01). Increases in Drug and Opioid Overdose Deaths — United States, 2000 – 2014. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 64(50-51), 1378-1382. doi:10.15585/mmwr.mm6450a3

2. SAMHSA. Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. In: 73 FR 71858, Section 3.4. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Rockville, MD, 2008.

3. 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