使用 IMCSzyme® 在 15 分钟内完成对浓度为 30,000 ng/mL 的 6-葡萄糖醛酸代可待因的高效水解

概述

用酶对葡萄糖醛酸苷进行水解是许多实验室使用 LC-MS/MS 进行尿样中药物检测的常用方法。使用串联质谱对葡萄糖醛酸苷直接监测存在以下不足：标准品成本较高且缺乏经认证的参考资料。酶水解法在鸦片类药物中的应用一直是历史性的挑战，其中以可待因-6-β-D-葡萄糖醛酸为最，即使酶解 2 小时以上其产出率依然很低。尽管在美国滥用物质和精神健康服务管理局（SAMHSA）的指南中规定可待因截止检出浓度是 2,000 ng/mL，但在实际患者尿液样本中检测到的药物及其葡萄糖醛酸化代谢物的组合浓度可能高达 100,000 ng/mL。本研究对一种生物工程改良的 β-葡萄糖醛酸酶 —— IMCSzyme®进行了测试，当尿样中可待因及其代谢物浓度为 30,000 ng/mL 时，使用IMCSzyme® 可在15分钟内完成水解且回收率可达到 80% 。

材料和方法

实验中所用标准品购自 Cerilliant，DPX™ WAX tips 购自 DPX Labs, LLC（Columbia，SC），生物工程改良的 β-葡萄糖醛酸酶购自 IMCS, LLC。

在 30 µL 尿样加入 270 µL 水解液（快速水解缓冲液、IMCSzyme®、水、内标物） 振荡（Vortemp 振荡器）水解。实验中酶的用量范围为 30 µL ~ 80 µL（表 1）。将样品在 55°C下 孵育 15 或 30 分钟；水解后的样品使用 DPX™ WAX tips 提取，用含 1% 甲酸的乙腈溶液洗脱；将洗脱液氮气吹干后用 100 µL 5% 现配甲醇溶回融。样品分析所用仪器为： Thermo TSQ + Agilent 1260；色谱柱：EC-C18 柱 （3.0 × 50 mm， 2.7 µm，柱温 50°C ）。质谱参数：电压， 4000 V，气压，60 psi。

表 1　水解反应中各试剂添加量

IMCSzyme® (µL)	水 (µL)	尿样 (µL)	快速水解缓冲液(µL)	内标(50% 甲醇溶液)(µL)	总体积(µL)
30	120	30	90	30	300
40	110				
50	100				
60	90				
70	80				
80	70				

结果

向空白尿样加入原药（非轭合物）以生成标准和质控曲线。实验值与预期值的线性相关系数 R^2 均大于 0.99（图1）。为检测完全水解所需的最小酶用量，首先向空白尿样加入 500 ng/mL 吗啡-6-β-D- 葡萄糖醛酸、500 ng/mL 羟吗啡酮-3-β-D-葡萄糖醛酸、500 ng/mL 二氢吗啡酮-3-β-D-葡萄糖醛酸和 30,000 ng/mL 可待因-6-β-D-葡萄糖醛酸，然后分别加入 30 ~ 80 µL 的 IMCSzyme® 并在于 55°C 振荡水解 15 和 30 分钟。使用标准曲线计算水解后的化合物（见表 2 和表 3）。比较 30,000 ng/mL 可待因-6-β-D- 葡萄糖醛酸的水解效果，当孵育时间为 15 分钟时，至少需要 60 µL IMCSzyme® 才能达到水解率优于 80%的效果（表 2），当孵育时间为 30 分钟时，仅需 30 µL IMCSzyme® 其水解率就可超过 90%。

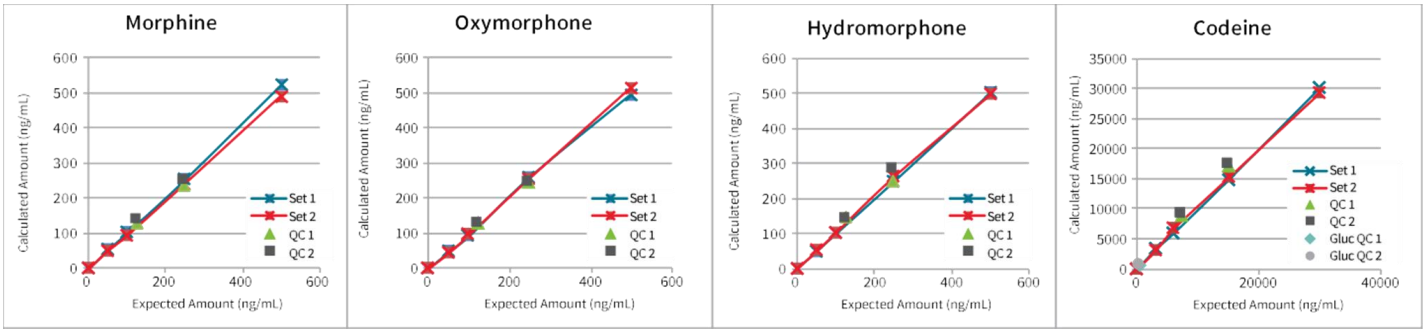


图1 标准曲线和质控曲线（ 在空白尿样中加入吗啡 50 ~ 500 ng/mL、氧化吗啡酮 50 ~ 500 ng/mL、氢吗啡酮 50 ~ 500 ng/mL、可待因 3000~30000 ng/mL，使用 IMCSzyme® 水解）

表2 使用不同量的酶孵育 15 分钟后的吗啡、氧化吗啡酮、氢吗啡酮和可待因的浓度（误差为 ± 1 个标准差）

IMCSzyme® 用量 (mL)	吗啡 (ng/mL)	氧化吗啡酮 (ng/mL)	氢吗啡酮 (ng/mL)	可待因 (ng/mL)
30	430 ± 25.2	368 ± 11.8	403 ± 18.2	17,994 ± 1,664
40	475 ± 21.6	427 ± 14.0	461 ± 11.9	21,132 ± 2,091
50	493 ± 23.0	447 ± 8.9	495 ± 20.5	24,167 ± 960
60	508 ± 28.6	471 ± 16.3	489 ± 1.8	25,306 ± 1639
70	517 ± 35.0	448 ± 23.5	502 ± 21.3	28,134 ± 2504
80	527 ± 25.5	448 ± 9.9	505 ± 14.5	27,373 ± 1477
期望浓度	500	500	500	30,000

表3 使用不同量的酶孵育 30 分钟后的吗啡、氧化吗啡酮、氢吗啡酮和可待因的浓度（误差为 ± 1 个标准差）

IMCSzyme® 用量 (mL)	吗啡 (ng/mL)	氧化吗啡酮 (ng/mL)	氢吗啡酮 (ng/mL)	可待因 (ng/mL)
30	512 ± 6.8	468 ± 14.6	491 ± 21.4	27,734 ± 918
40	541 ± 15.3	481 ± 16.1	532 ± 37.8	29,615 ± 669
50	538 ± 11.1	480 ± 36.7	523 ± 11.9	28,476 ± 1068
60	534 ± 15.0	466 ± 11.7	510 ± 5.4	32,942 ± 3100
70	528 ± 3.0	464 ± 11.6	495 ± 9.4	31,123 ± 1203
80	555 ± 16.8	468 ± 17.4	492 ± 9.8	29,712 ± 664
期望浓度	500	500	500	30,000

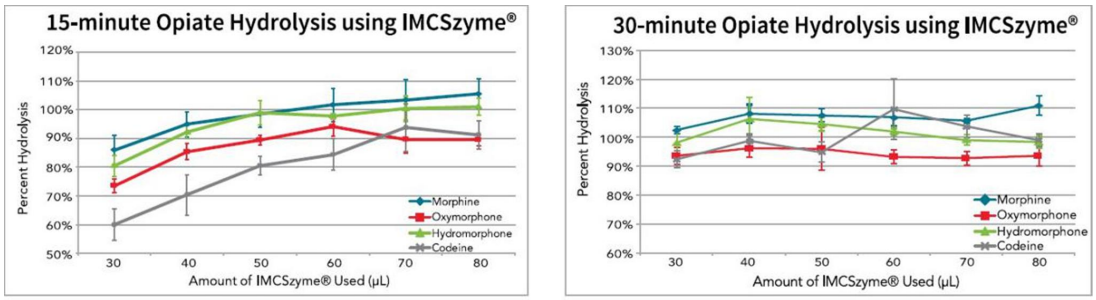


图2 鸦片类药物回收率，使用 IMCSzyme® 水解 15 分钟（左）和 水解 30 分钟（右）（ 空白尿样加入 500 ng/mL 吗啡-6-β-D- 葡萄糖醛酸、500 ng/mL 羟吗啡酮-3-β-D-葡萄糖醛酸、500 ng/mL 二氢吗啡酮-3-β-D-葡萄糖醛酸和 30,000 ng/mL 可待因-6-β-D-葡萄糖醛酸）

结论

在 30 µL 尿样中加入 30 µL IMCSzyme® 孵育 30 分钟水解效率优于 90%。实验证明，对于可待因-6-β-D-葡萄糖醛酸浓度为 30,000 ng/mL 的样品，将酶用量增加到 60 µL 时，实现 80% 以上的回收率，水解时间可缩短至 15 分钟。水解时间从 30 分钟缩短至 15 分钟，让整个水解过程更易实现全自动处理，这是保证准确性的同时实现高通量、高浓度的葡萄糖醛酸苷的检测的关键环节。