无锡微色谱生物科技有限公司
WuXi MicroSep Biological Science Co.,Ltd

《利用 IMCSzyme® 精确分析尿样中的大麻代谢产物 THCA》摘要

概述

大麻是一种常见的毒品，其活性成分为四氢大麻醇（tetrahydrocannabinol THC），该成分可快速氧化成 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid（THCA），THCA 在生物体内可形成葡萄糖醛酸苷。为对代谢产物进行 LC-MS/MS 精确定量分析，需将葡萄糖醛酸苷水解。本研究比较分析了 IMCSzyme® 与其它 β-葡萄糖醛酸酶对 THCA-葡萄糖醛酸苷的水解效率。

材料和方法

药物标准品（Cerilliant）和自然提取酶（含 β-葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶，Perkin Elmer）由 LabSource, LLC 惠赠。新型 β-葡萄糖醛酸酶（IMCSzyme® ）为 IMCS 公司的产品。尿液样本 50～200 µL，水解液 150 µL（包括缓冲液，酶，内标），震动混匀。IMCSzyme® 的孵育温度为室温至 55 ℃、孵育时间为 0~15 分钟，自然提取酶的孵育温度为 60 ℃、孵育时间为 60 分钟。水解完成后加乙腈萃取，稀释后进行 LC-MS/MS 分析。

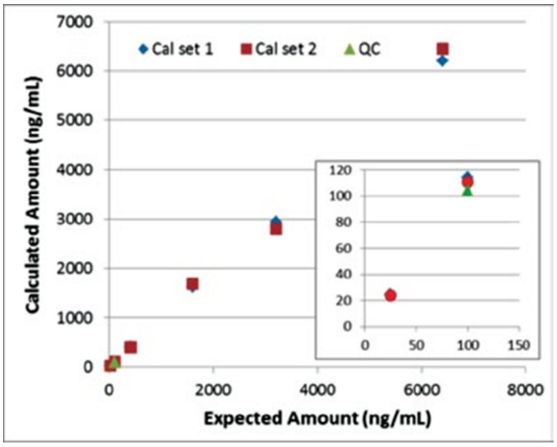


图1 IMCSzyme® 水解 THCA 的标准曲线（25-6400 ng/mL）

注：计算值与预期值的校正系数大于0.99。内图为放大的前两个数据点。

水解前　　水解后 5 分钟

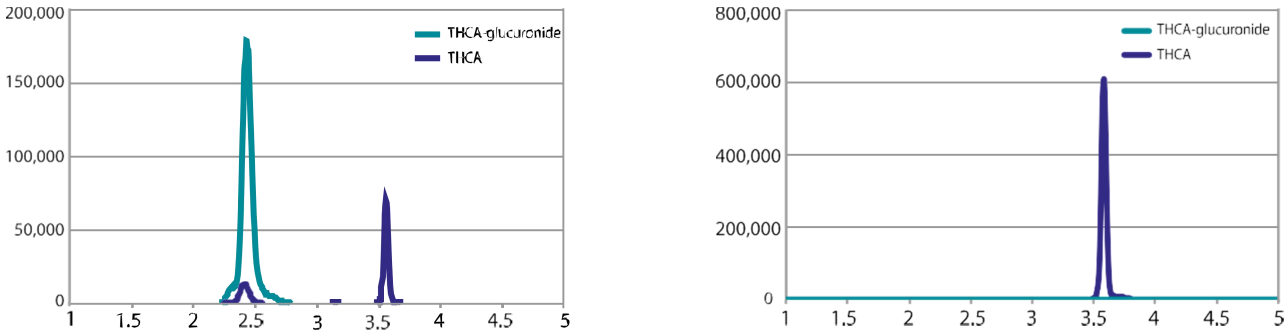


图2 空白尿液中 THCA-葡萄糖醛酸苷（1000 ng/mL）及 THCA 加入 IMCSzyme® 后的图谱

注：左图中 THCA 检测结果表明，尽管立即加入乙腈(ACN)以沉淀蛋白质，但由于分析物存在固有的不稳定性以及酶的快速水解，仍有部分 THCA-葡萄糖醛酸苷已水解为 THCA。在 65 ℃ 下孵育 5 分钟后，葡萄糖醛酸苷峰几乎消失，完全转化为其母体化合物 THCA (右图)。对于当样品量较大时，从添加酶、缓冲液和内标物到添加 ACN，存在固有的 10～15分钟r的延迟。在添加 ACN 之前，对于在室温下孵育 15 分钟的样品，也观察到类似的水解结果。

结果

为了精确定量，首先在空白尿液中填加 THCA 用于建立标准曲线，实际结果与预期浓度的相关性 R^2 > 0.99（图1）。质控样品为填加 100 ppb THCA-葡萄糖醛酸苷的空白尿液（图1内图）。通过监测水解前（图 2 左图）及水解后（图2 右图）的 THCA 和THCA-葡萄糖醛酸苷的浓度检测回收率。对 88 个 确认为 THCA 阳性患者的尿液样本（n=88）进行检测分析，结果表明，使用两种酶的检测结果一致（R^2 > 0.99）（图3）。

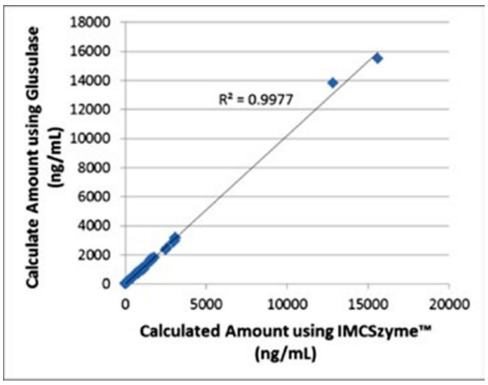


图3 IMCSzyme® 与自然提取酶对 88 个阳性样本的水解比较分析

结论

使用IMCSzyme® 进行水解可以不影响准确性的同时使水解时间大幅度降低。

Technical summary from study performed by Andrew Lee at IMCS, LLC.