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

《利用新型重组 β-葡萄糖醛酸酶进行尿样中的鸦片类药品的水解及定量分析》摘要

概述

美国的一家药物监测实验室在 2014 年 SOFT （Society of Forensic Toxicologists）上做了有关对鸦片类药品代谢产品酶水解和酸水解方法比较的研究报告。该荐研究表明使用一种生物重组的 β-葡萄糖醛酸酶 —— IMCSzyme® 的水解效率更高；与常规水解方法相比，使用 IMCSzyme® 水解不会将 6-乙酰吗啡（6-AM）转变为吗啡；比市场上其它酶产品（如提取自蜗牛、帽贝、牛及鲍鱼的 β-葡萄糖醛酸酶）相比，其水解时间明显缩短。

材料和方法

标准品、IMCSzyme® β-葡萄糖醛酸酶分别购自 Cerilliant 公司和 IMCS 公司。在空白尿液中加入 25000 ng/mL 氧吗啡酮、氢吗啡酮、可待因、吗啡-3 和吗啡-6 的葡萄糖醛酸苷作为对照样品。随机选择患者的阳性样本进行检测。水解条件为，125 µL 尿液样本加入 3000 U IMCSzyme®，于 55℃及 65℃分别孵育 15、30、 45 和 60 分钟。水解后，样品经离心直接（无需其他制备过程）上样 LC/MS-MS。采用 TLX-4 multiplexed HPLC，Agilent 1200 Series Binary Pumps，Thermo Scientific TSQ Quantum Triple-stage Quadrupole Mass Spectrometer 进行检测，分析物在 Phenomenex® Kinetex C18 50 x 3 mm 分析柱上以 4.5 分钟梯度进行色谱分离。水解效率通过将所得分析物浓度除以测试化合物的目标浓度并乘以100 %来计算。

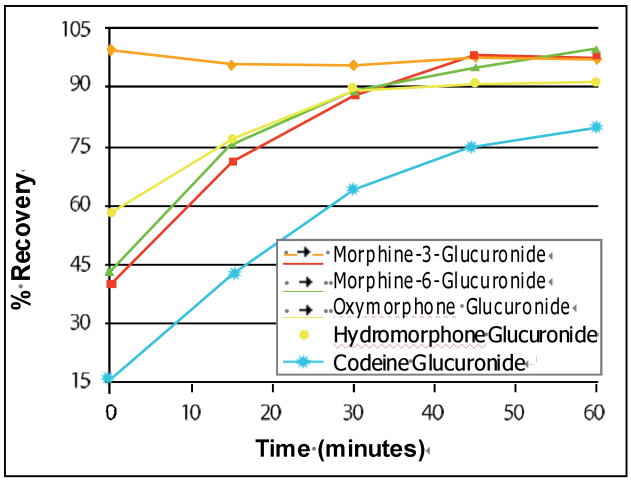


表1 水解时间分析

结果

与其他几种化合物的葡萄糖醛酸苷相比，吗啡-3-葡萄糖醛酸苷对酶更为敏感。这种差异活性与使用其他 β-葡萄糖醛酸酶[1]时观察到的结果一致。IMCSzyme® 能够在未经孵育的条件下（零水解时间）完全水解吗啡-3-葡萄糖醛酸苷（图 1）。而其它来源的 β-葡萄糖醛酸酶（如帽贝，鲍鱼及蜗牛）则分别需要 2、3 和 16 个小时才能完全水解[1-3]。

提高孵育温度和延长孵育时间都可提高对照样品中中各种化合物葡萄糖醛酸苷的回收率。总体而言，与酸水解相比，患者样品中所有目标分析物的酶水解百分比超过 77 % (表1)。

表1 水解效率比较

分析物	酸水解 目标范围（ng/mL）	IMCSzyme® 水解 目标范围（ng/mL）	%水解	± 标准偏差	系数（R^2）	P值 （95%置信区间）
吗啡	180-35474	165-40726	100.3	12.5	0.9846	0.724
可待因	134-48963	125-41580	81.7	24.4	0.8731	0.089
氧吗啡酮	180-25840	154-13648	78.4	10.4	0.9854	0.03
氢吗啡酮	134-24894	106-16838	77.3	11.9	0.9961	0.053

注：水解条件为 65 ℃ 、60 分钟
* %水解 = IMCSzyme® 水解目标浓度 / 酸水解目标浓度

结论

数据表明， IMCSzyme® 对鸦片类葡萄糖醛酸苷的水解效率低于传统的酸水解，但因其高纯度，IMCSzyme® 在水解过程中不会将海洛因代谢物（6-AM）转化为吗啡，且不需要高温（ > 90 ℃）及高腐蚀性溶解（8 M HCl）。在对照样品的检测中， > 90% 的吗啡、氧吗啡酮及氢吗啡酮能完全水解。研究者认为，由于患者样本的多变性会影响酶的使用效果，所以在患者尿液的检测中，氧吗啡酮及氢吗啡酮的回收率稍微降低。

参考文献

1. P. Wang, J. A. Stone, K. H. Chen, S. F. Gross, C. A. Haller and A.H. B. Wu. Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide me-tabolites. J. Anal. Toxicol. 30: 570-575 (2006).
2. B. Malik-Wolf, S. Vorce, J. Holler and T. Bosy. Evaluation of abalone b-glucuronidase substitution in current urine hydrolysis procedures. J. Anal. Toxicol. 1-6 doi:10.1093/jat/bku003 (2014).
3. R. W. Romberg and L. Lee. Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and b-glucuronidase. J. Anal. Toxicol . 19:157-162. (1995).

This information was summarized by IMCS from the technical poster “Opiate Hydrolyis Using a Novel Recombinant b-glucuronidase for Urine Analysis” presented by Ayodele A. Morris - Ameritox, Ltd. at SOFT 2014