利用纯化的β-葡萄糖醛酸苷酶和芳基硫酸酯酶准确定量人尿液中的代谢物

Pongkwan (Nikki) Sitasuwan*, Margarita Marinova, L. Andrew Lee

Integrated Micro-Chromatography Systems, LLC.; Irmo, South Carolina

摘要

已知人体内有多种代谢物会发生葡萄糖醛酸化和硫酸化。在串联质谱分析中，同时监测苷元及其葡萄糖醛酸化和硫酸化代谢物会额外产生六个需要监测的质荷比通道，这可能限制可监测代谢物的总数。此外，结合型标准品非常昂贵且往往不可获得。本文报道了使用纯化的 β-葡萄糖醛酸苷酶（IMCSzyme®）和重组芳基硫酸酯酶，在中性 pH 条件下有效裂解葡萄糖醛酸苷和硫酸酯，且未检测到 CYP 活性或酯酶活性。初步研究探索了在纯化酶裂解葡萄糖醛酸苷和硫酸酯前后，利用串联质谱检测尿液中的皮质类固醇代谢物。在皮质类固醇中，据报道葡萄糖醛酸化别四氢皮质醇（aTHF）是酶法去结合难以处理的底物。我们证明其可在10分钟内快速水解，而据报道使用粗制蜗牛酶孵育 4 小时不足以回收较高水平的 aTHF 葡萄糖醛酸苷 [1, 2] 。

引言

代谢物的研究和定量可以为健康状态和人类疾病提供见解。本海报以皮质醇代谢为例。皮质醇在数量上是肾上腺皮质产生的主要糖皮质激素产物。肾上腺类固醇排泄不足见于艾迪生病，导致低血压；而生成过多见于库欣综合征，导致高血压 [3] 。血清和尿液中皮质醇的定量测量广泛通过免疫分析法进行，但其局限性在于交叉反应性和低灵敏度。近年来，气相色谱或液相色谱与串联质谱联用技术（分别简称为GC-MS/MS和LC-MS/MS）已被证明可提高特异性和灵敏度 [3] 。这有助于可靠地测量皮质醇，

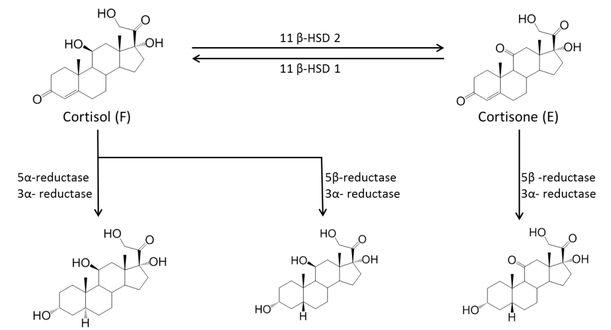


图1. 皮质醇及其代谢物的结构。参与皮质醇转化为可的松的酶

并使单个皮质醇代谢物的检测成为可能。

皮质醇的代谢如图1所示。在肾脏和结肠中，11β-羟基类固醇脱氢酶2型（11β-HSD2）将皮质醇（F）灭活为可的松（E），而在肝脏和脂肪组织中，F 由 E 经 11β-羟基类固醇脱氢酶1型（11β-HSD1）再生 [4] 。此外，A 环还原酶（5α、5β和3α还原酶）将皮质醇和可的松转化为其四氢代谢物：别四氢皮质醇（aTHF）、四氢皮质醇（THF）和四氢可的松（THE）。医学诊断通常基于代谢物比值。然而，这些化合物大多数以结合形式排泄于尿液中，有报道提及在MS分析前使用β-葡萄糖醛酸苷酶和芳基硫酸酯酶进行去结合 [2, 5-7] 。

大多数商业酶来源于蜗牛、帽贝或鲍鱼等生物，已知这些粗制溶液中含多种不同的干扰代谢物 [8-11] 。因此，选择基团修饰的 β-葡萄糖醛酸苷酶和重组芳基硫酸酯酶来绘制对葡萄糖醛酸化和硫酸化敏感的代谢物图谱。由于结合型分析物无商品化标准品，水解过程通过尿液中 aTHF 的平台水平进行追踪。

材料与方法

Helix pomatia β-葡萄糖醛酸苷酶 HP-2 型（含芳基硫酸酯酶活性）购自 Millipore Sigma。纯化的基因修饰 β-葡萄糖醛酸苷酶（IMCSzyme®）和重组芳基硫酸酯酶由 Integrated Micro-Chromatography Systems, LLC 提供。无类固醇合成尿液、皮质醇、皮质醇-D4 购自 Cerilliant。可的松、别四氢皮质醇、四氢皮质醇和四氢可的松购自 Toronto Research Chemicals。RP 吸头购自 DPX 。甲酸和甲醇为 LC 级，购自 Fisher Scientific。

在获得书面知情同意的情况下，从志愿者处获取五份过夜尿液样本。选择 aTHF 含量最高的尿液样本用于确定最佳孵育时间。水解反应使用 100 µL 尿液、50 µL 缓冲液（IMCS 酶用快速水解缓冲液，H. pomatia 用 pH 4.5 的 1 M 乙酸钠缓冲液）、10 µL 内标（1 µg/mL 皮质醇-D4 的甲醇溶液）以及以下酶量之一：20 µL H. pomatia 粗提液、15 µL IMCSzyme、20 µL IMCS 芳基硫酸酯酶、后两者的混合物。孵育温度为 55 °C，时间从 0 到 4 小时不等。孵育温度和酶量基于先前对其他底物的内部研究。对于五份不同尿液样本，酶量固定为 15 µL IMCSzyme、20 µL IMCS 芳基硫酸酯酶，孵育时间固定为 10 分钟。所有水解后的尿液样本用 DPX RP 吸头萃取，用甲醇洗脱。洗脱液干燥后用 20% 甲醇复溶。分析使用 Thermo TSQ Endura 三重四极杆系统，配备 Thermo Vanquish UPLC 和 Phenomenex Kinetex 2.6 µm 苯基-己基100 Å LC色谱柱（50 x 4.6 mm）。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水，流动相 B 为甲醇。流速为 0.6 mL/min，起始 20% B 保持 0.5 min，1.5 min 时 45% B，7.5 min 时 55% B，8 min 时 95% B 保持 0.8 min，然后 9 min 时回到 20% B 并重新平衡 2 分钟。MRM transitions 见表 1。

表1 多反应监控变体

Compound	Retention Time (min)	RT Window (min)	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
Cortisol-D4	6.47	0.8	Negative	411.183	335.151	16	87
Cortisol-D4	6.47	0.8	Negative	411.183	286.097	36	87
Cortisol-D4	6.47	0.8	Negative	411.183	301.183	33	87
Cortisol	6.49	0.8	Negative	407.183	331.151	16	87
Cortisol	6.49	0.8	Negative	407.183	282.111	38	87
Cortisol	6.49	0.8	Negative	407.183	297.111	31	87
Cortisone	6.51	0.8	Negative	405.183	329.169	13	77
Cortisone	6.51	0.8	Negative	405.183	359.169	10	77
Cortisone	6.51	0.8	Negative	405.183	301.169	20	77
Allo-Tetrahydro Cortisol	7.32	0.8	Negative	411.183	301.151	37	88
Allo-Tetrahydro Cortisol	7.32	0.8	Negative	411.183	335.222	17	88
Allo-Tetrahydro Cortisol	7.32	0.8	Negative	411.183	365.222	11	88
Tetrahydro Cortisol	7.71	0.8	Negative	411.213	301.151	38	90
Tetrahydro Cortisol	7.71	0.8	Negative	411.213	335.222	18	90
Tetrahydro Cortisol	7.71	0.8	Negative	411.213	365.222	11	90
Tetrahydro Cortisone	8.64	0.8	Negative	409.183	333.151	18	89
Tetrahydro Cortisone	8.64	0.8	Negative	409.183	305.151	24	89
Tetrahydro Cortisone	8.64	0.8	Negative	409.183	363.151	11	89

结果

由于皮质醇-D4、四氢皮质醇和别四氢皮质醇具有相同的主要变体，因此在LC梯度上分离它们非常重要。图2显示了各分析物的提取色谱图及其相应的保留时间。

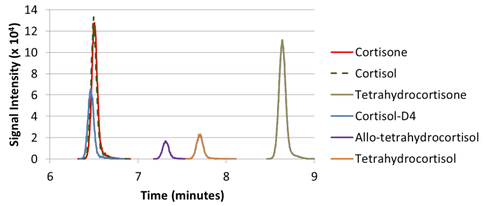


图2. 提取离子色谱图显示皮质醇、可的松、别四氢皮质醇、四氢皮质醇和四氢可的松在100 ng/mL时的分离。

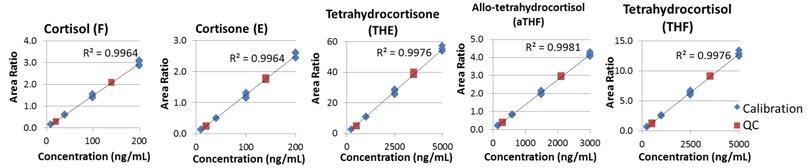


图3. 使用IMCSzyme和IMCS芳基硫酸酯酶在无类固醇尿液中皮质醇及其代谢物的校准和质量控制曲线。所有五种分析物的Pearson相关系数平方均大于0.99。质量控制样品的相对标准偏差在20%以内。

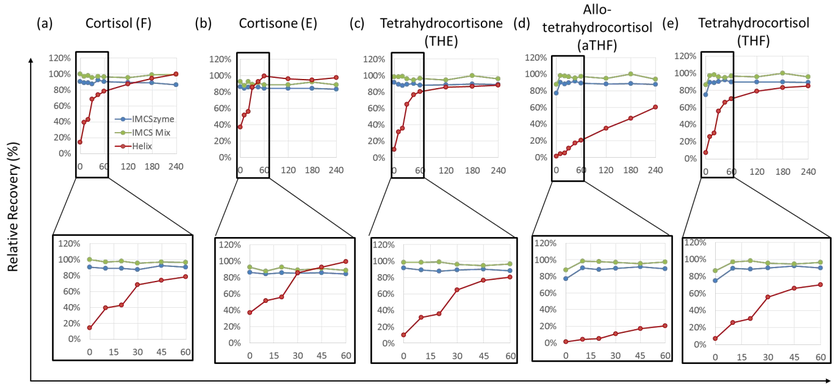


图4. 含最高量aTHF的人尿液样本的水解，用于确定水解效率与孵育时间的关系。水解百分比以最大量计为100%；(a) 皮质醇，(b) 可的松，(c) 四氢可的松，(d) 别四氢皮质醇，(e) 四氢皮质醇。使用两种酶（IMCSzyme和IMCS芳基硫酸酯酶，即IMCS Mix）孵育10分钟后达到完全水解，表现为平台回收率。

水解时间通过使用固定量的不同酶及其组合在 55 °C 下孵育尿液样本长达 4 小时来确定。筛选了五份尿液样本以确定 aTHF 浓度最高的一份，据报道 aTHF 最难被酶水解 [2] 。含 IMCSzyme 的样本无需在升高温度下孵育即显示 F、E、THE 的最大回收率（图4a、b、c），而 aTHF 和 THF 需要在升高温度下孵育 10 分钟（图4d、e）。相比之下，同一尿液样本用 H. pomatia 粗提液水解后，aTHF 水平仍显著低于用 IMCSzyme 处理时测得的水平（图4d）。IMCSzyme 水解样本加与不加 IMCS 芳基硫酸酯酶之间的差异百分比约为 5-10%，表明尿液中大多数皮质醇代谢物是葡萄糖醛酸化的，而 5-10% 是硫酸化的（图4a-e）。

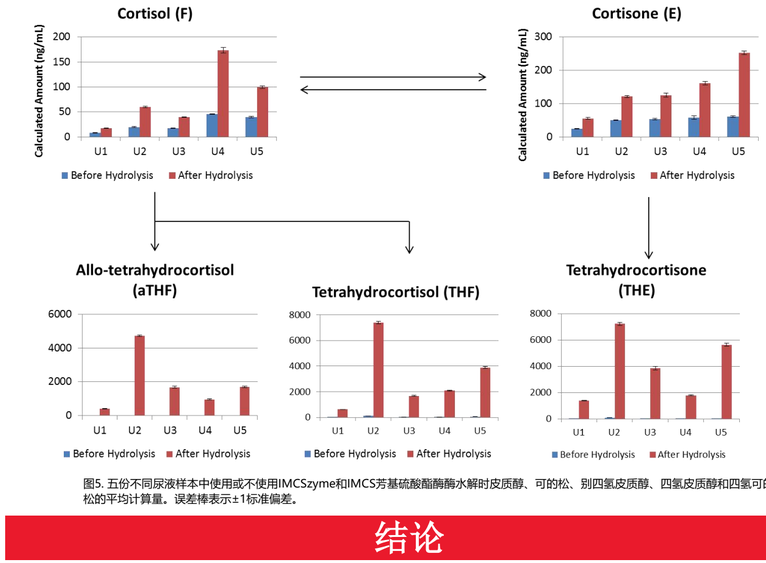


图5. 五份不同尿液样本中使用或不使用IMCSzyme和IMCS芳基硫酸酯酶酶水解时皮质醇、可的松、别四氢皮质醇、四氢皮质醇和四氢可的松的平均计算量。误差棒表示±1标准偏差。

结论

样本水解步骤允许检测尿液中的总皮质醇代谢物，包括游离型和结合型。多篇报道指出 aTHF 与 THF 对 THE 的量比（(aTHF+THF)/THE）可作为监测 11β-HSD 活性的指标，并进一步研究其在人类疾病发病机制中的生物学相关性 [1, 2] 。如前所述，11β-HSD 同工酶参与生物活性 F 与非活性变体E之间的相互转化。完全水解结合型代谢物对于准确确定该比值至关重要。图 4 显示，使用 IMCSzyme 或 IMCS 混合物的比值为 1.71，而使用 H. pomatia粗提液仅为 0.98。比值计算可能极大影响对 11β-HSD 活性的解读，导致与疾病致病性的错误关联。在图 5 中，F 和 E 的测量值提高了 2-4 倍。THF 和 THE 提高了 60-400 倍。最后，aTHF 在水解前无法检测到，但水解后水平高达 4,700 ng/mL。样本水解带来的总代谢物检测消除了串联质谱分析对昂贵结合型标准品的需求。

参考文献

1. Raffaelli, A., Saba, A., Vignali, E., Marcocci, C., and Salvadori, P. (2006) Direct determination of the ratio of tetrahydrocortisol allo-tetrahydrocortisol to tetrahydrocortisone in urine by LC–MS–MS. *Journal of Chromatography B*, **830**, 278-285.
2. Cuzzola, A., Mazzini, F., and Petri, A. (2014) A comprehensive study for the validation of a LC–MS/MS method for the determination of free and total forms of urinary cortisol and its metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **94**, 203-209.
3. Turpeinen, U., and Hämäläinen, E. (2013) Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **27**, 795-801.
4. Tomlinson, J.W., Walker, E.A., Bujalska, I.J., Draper, N., Lavery, G.G., Cooper, M.S., Hewison, M., and Stewart, P.M. (2004) 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1: A Tissue-Specific Regulator of Glucocorticoid Response. *Endocrine Reviews*, **25**, 831-866.
5. Tsukada, T., Isoe, M., and Yoshino, M. (1986) Hydrolysis of conjugated steroids by beta-glucuronidase from Ampullaria and application to the determination of urinary 17-hydroxycorticosteroids. *Clin Chim Acta*, **160**, 245-253.
6. Ishida, T., Enoki, S., Inoue, Y., Hosoda, H., Tsukada, T., Shimabukuro, T., and Minowa, M. (1986) Hydrolysis of Urine 17-OS Conjugates by Ampullaria Hydrolases, and Effect of Pi Removal on Sulfatase Activity. *Japanese Journal of Clinical Chemistry*, **15**, 13-19.
7. Shibasaki, H., Tanabe, C., Furuta, T., and Kasuya, Y. (2001) Hydrolysis of conjugated steroids by the combined use of β-glucuronidase preparations from helix pomatia and ampullaria: determination of urinary cortisol and its metabolites. *Steroids*, **66**, 795-801.
8. Venturelli, E., Cavalleri, A., and Secreto, G. (1995) Methods for urinary testosterone analysis. *J Chromatogr B Biomed Appl*, **671**, 363-380.
9. Vanluchene, E., Eechaute, W., and Vandekerckhove, D. (1982) Conversion of free 3β-hydroxy-5-ene-steroids by incubation with Helix pomatia. *Journal of Steroid Biochemistry*, **16**, 701-703.
10. Hauser, B., Schulz, D., Boesch, C., and Deschner, T. (2008) Measuring urinary testosterone levels of the great apes—Problems with enzymatic hydrolysis using Helix pomatia juice. *General and Comparative Endocrinology*, **158**, 77-86.
11. Gomes, R.L., Meredith, W., Snape, C.E., and Sephton, M.A. (2009) Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **49**, 1133-1140.

**Contact: P. Nikki Sitasuwan — nikki@imcstips.com*

© 2017 IMCS, LLC. All rights reserved. IMCSzyme® is a registered trademark of Integrated Micro-Chromatography Systems, LLC