多种β-葡萄糖醛酸酶的性能比较及其相应水解产物的后处理过程研究
评估β-葡萄糖醛酸酶和样品净化方法

概述

鸦片在缓解疼痛中的使用与日俱增，而对其使用的监测也变得十分重要。鸦片及其代谢物的检测通常用免疫测定和 GC-MS 分析，这些均涉及到样品的处理及净化。本研究旨在建立及验证一种更有效更精准的尿液中鸦片的检测方法，其涉及到β-葡萄糖醛酸酶的水解，蛋白沉淀及样品净化，LC-MS/MS 分析。比较了四种β-葡萄糖醛酸酶及三种蛋白沉淀以确定用于阿片样物质检测的最佳酶和平板。。

材料与方法

1. 四种β-葡萄糖醛酸酶包括：IMCSzyme®，红鲍β-葡萄糖醛酸酶（BG100™，Kura Biotech），EBG（Kura Biotech，大肠杆菌重组β-葡萄糖醛酸酶），笠螺β-葡萄糖醛酸酶（*P. vulgata*，Sigma-Aldrich）。四种酶所使用的缓冲液、孵育温度及浓度见表 1。
2. 四种β-葡萄糖醛酸酶在表 1 中的条件下水解，并加入 200 µL 阳性对照，包括：1 µg/mL 吗啡-3-β-D-葡萄糖苷酸（M3G），吗啡-6-β-D-葡萄糖苷酸（M6G），可待因-6-β-D-葡萄糖苷酸（C6G），氢吗啡酮-3-β-D-葡萄糖苷酸（H3G），氧吗啡酮-3-β-D-葡萄糖苷酸（O3G），丁丙诺啡-葡萄糖苷酸（BG），非丁丙诺啡-葡萄糖苷酸（NBG）及内标溶液，孵育 1 小时。
3. 样本准备中使用到 Supelco 96 孔蛋白沉淀板（Sigma-Aldrich），Impact™ 蛋白沉淀板（Phenomenex），Isolute PLD +蛋白沉淀板（Biotage AB）。对于样品提取，水解后将 100 µL 尿液加入到蛋白沉淀板中，加入 300 µL 乙腈，抽真空并收集液体，用流动相 A（10 mM 甲酸铵）稀释 5 倍。
4. 样本分析使用 Agilent HPLC, Kinetex 2.6 µm Phenyl-Hexyl 100 Å, 50 × 4.6 mm LC 柱，30℃，流速为 0.7 mL/min。LC 方法见表 2。
5. LC 与 5500 QTrap（ABSciex）偶联，电喷雾电离源以正模式操作，帘幕气体为 20psi，离子喷射电压为 5000V，离子源温度为 700，中等碰撞气体。将每种化合物的信号相对于内标芬太尼-d5 标准化，并计算浓度准备校准曲线。
6. 通过本实验方法对已经使用标准 GC-MS 分析法检测阿片类药物为阳性的 62 份患者尿液样本以及使用传统的 LC-MS / MS 方法测试为阳性的 22 份患者样本进行分析。

表 1. 水解条件

β-葡萄糖醛酸酶	缓冲液/pH	温度	酶浓度（kU/mL）
IMCSzyme®	专用缓冲液/ pH 6.8	55℃	10
BG100™	0.2 M 柠檬酸钠/ pH 4.8	68℃	20
EBG	0.2 M 磷酸钾缓冲液/ pH 6.8	46℃	10.5
P. vulgata	0.2 M 醋酸盐缓冲液/ pH 5.0	65℃	10

表 2. LC 方法

%流动相 A（10 mM 甲酸铵）	%流动相 B（含有 0.1%甲酸的甲醇）	时间（分钟）
80	20	0
60	40	0.7
0	100	4.5
0	100	6.0
80	20	8.0

结果

实验表明IMCSzyme®对C6G及H3G的水解效率明显高于其它三种酶。

Supelco蛋白沉淀板的回收率最高（88-103%），基质效应影响最小。

使用改良的LC-MS/MS方法检测62个患者尿液样品显示96.6%的GC-MS峰被检测出，而且也检测出一些额外的峰，这说明前期检测的阴性样本其实是阳性的。用传统LC-MS/MS方法检测的22个患者尿液样本，用改良的LC-MS/MS方法确认了93.3％的峰值。

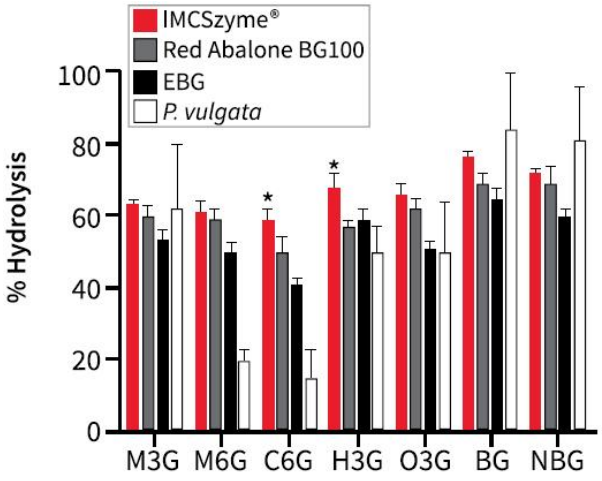


图 1. 水解效率比较。样本为 7 中鸦片葡萄糖苷酸，孵育 1 小时。底物浓度为 1 µg/mL。结果为平均值±SD。*p < 0.05。

结论

此项研究表明，与其它三种β-葡萄糖醛酸酶相比，IMCSzyme®对鸦片的水解效率最高，而使用量是红鲍β-葡萄糖醛酸酶的一半。改良的LC-MS/MS方法及IMCSzyme®、Supelco沉淀板联合使用可获得最佳的尿液中鸦片检测结果。这种方法减少了样品的处理时间并提高了灵敏度。

此项研究为IMCS总结于技术研究报告“Development and Validation of a Novel LC-MS/MS Opioid Confirmation Assay: Evaluation of β-glucuronidase Enzymes and Sample Cleanup Methods”（2016, Journal of Analytical Toxicology. 40:5, 323-329）。