# 多种β-葡萄糖醛酸酶对鸦片类代谢产物不同水解条件下水解效率的比较

## 概述

β-葡萄糖醛酸酶对于不同的检测其水解效率也不尽相同。此研究实验通过对大蜗牛（*Helix pomatia*）β-葡萄糖醛酸酶（Sigma），红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶（Kura Biotec®）和 IMCSzyme®的重组β-葡萄糖醛酸酶（IMCS）在酶浓度，孵育时间和孵育温度的比较及优化，说明水解条件对酶的使用及药物检测的影响及重要性。

## 材料与方法

1. 在测试 15 个患者样本之前，先对每一种酶的水解条件进行优化，包括：酶的使用浓度（5000-25000 U/mL），孵育时间（30，60，90 分钟），孵育温度（50℃，55℃，68℃）。
2. 条件优化后，在三天内分批测试患者样品一式三份。
3. 每批次样本检测做一次五点标准曲线和 2 个质控 QC 样本。
4. 样本分析使用 Waters TQ-S 质谱和阳离子电喷雾模式。
5. 流动相 A 为 5 mM 甲酸铵（pH3.0），流动相 B 为含有 0.1%甲酸的乙腈。
6. 柱子为 Waters XSelect HSS C18 2.5 µm, 2.1x150 mm XP 和 Phenomenex C18 SecurityGuard ULTRA Cartridge。

## 结果

1. 水解条件优化实验显示， 大蜗牛（*Helix pomatia*）和红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶的孵育时间、IMCSzyme®的孵育温度均影响回收率。 大蜗牛（*Helix pomatia*）和红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶最佳水解时间为 90 分钟，IMCSzyme®仅为 30 分钟。大蜗牛（*Helix pomatia*）β-葡萄糖醛酸酶最佳使用浓度为 5000 U/mL，最佳孵育温度为 50℃；红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶最佳使用浓度为 25000 U/mL，最佳孵育温度为 68℃；IMCSzyme®最佳使用浓度为 14667 U/mL，最佳孵育温度为 55℃。
2. 在每种酶的最佳水解条件下，比较了可待因-6β-D-葡萄糖苷酸的回收率。使用大蜗牛（*Helix pomatia*）β-葡萄糖醛酸酶其回收率仅为 50%，红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme®则可达到 100%。
3. 15 个病人样本的检测中，可待因、去甲可待因、吗啡、氢吗啡酮、氧吗啡酮的水解效率差异显著。使用红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme®时回收率有所提高。
4. 每批次样本的所有分析物的变异系数百分比（CV%）≤ 11%，$R^2 \geq 0.995$。
5. 质控 QC 样本值均在已知值的 20%内（除了吗啡检测）。
6. 大蜗牛（*Helix pomatia*）β-葡萄糖醛酸酶水解时吗啡的偏差为 40%，使用红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme®则小于 2%。
7. 使用红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme®时，检测氢吗啡酮、氧吗啡酮的偏差小于 10%。
8. 红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme®的相关性见图 1。
9. 对于海洛因的暴露问题，实验中比较了两名患者三种酶的吗啡/可待因的比值（表 1）。如表 1 所示，对样本 1 和 2，大蜗牛（*Helix pomatia*）β-葡萄糖醛酸酶时，吗啡/可待因的比值比红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme®高 4 和 7 倍。因为 6-乙酰吗啡的半衰期很短，吗啡/可待因的比值对区分海洛因暴露和可待因暴露中有重要作用。

## 结论

水解条件的优化对于酶使用及药物检测十分重要。当条件不是最佳时，可能导致水解不完全进而出现假阴性结果。如果检测中没有全部检测到分析物，研究人员则应对所使用的酶进行各种条件的优化。在此建议下，实验人员将会获得更加可信的结果。

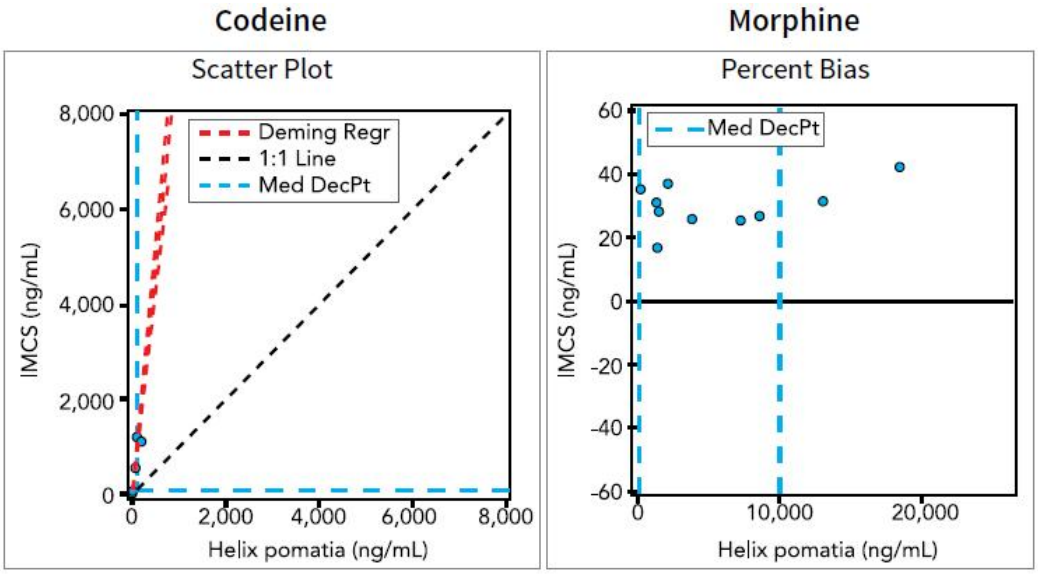



图 1. 红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme®的相关性。

可待因斜率为 9.5，其它分析物的斜率为 0.9-1.4。吗啡偏差为 40%，红鲍（*Haliotis rufescens*）β-葡萄糖醛酸酶和 IMCSzyme® 的偏差＜ 2%。

**表1. 吗啡与可待因的比值**

| | 样本1 | 样本2 |
|---|---|---|
| 大蜗牛 | 91.4 | 1.7 |
| 红鲍 | 24.2 | 0.24 |
| IMCSzyme® | 24.0 | 0.24 |
| 6-MAM是否为阳性 | 是 | 否 |

此项研究为IMCS总结于技术研究报告“Hydrolyze Your Way to Compliance- A Call for Pain Management Certified reference Material”（于2016年美国MSACL会议上由Heather Hochrein发表）。

This information was summarized by IMCS from the technical poster “Hydrolyze Your Way to Compliance- A Call for Pain Management Certified reference Material” presented by Heather Hochrein - UC San Diego Health at MSACL 2016.

IMCSzyme® is a registered trademark of IMCS, LLC