

# Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统 测定血清中的 1,5- 脱水葡萄糖醇含量

LCMSMS-331

**摘要：** 本文建立了一种应用岛津 Nexera MX System 超高效平行液相三重四极杆质谱联用系统测定人血清中的 1, 5-脱水葡萄糖醇含量的检测方法。该方法在“血清中 1, 5-脱水葡萄糖醇检测试剂盒”的基础上进行的方法开发及验证。样品经该试剂盒处理后，使用岛津 Nexera MX System 平行液相三重四极杆质谱联用系统在 2.5 min 内完成分析。1, 5-脱水葡萄糖醇在 1~50 mg/L 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.9999；使用试剂盒内标定浓度为 50 mg/L 的标准样品进行了批内和批间的精密度实验，实验结果表明批内和批间的精密度 RSD 分别小于 0.58% 和 0.64%；同时考察了进样器放置稳定性，结果表明样品在该条件下存放时稳定性良好。此方法快速、简单、选择性强且灵敏度高，可以为临床中人血清中 1, 5-脱水葡萄糖醇的检测提供很好的借鉴和参考。

**关键词：** Nexera MX System 平行液相 三重四极杆质谱仪 1, 5-脱水葡萄糖醇

1, 5-脱水葡萄糖醇 (1, 5-anhydroglucitol or 1, 5-AG) 是一种天然存在的吡喃环结构的六碳糖，是葡萄糖 C-1 位置上缺少一个羟基的还原型，它是人体主要多元醇之一，在体内广泛分布于各个器官、组织中。研究显示，1, 5-AG 对血糖的变化极其敏感，可以实时反映血糖的变化，因此 1, 5-AG 可以用作为一种短期血糖控制的标志。甚至当出现急性高血糖时，血清中的 1, 5-AG 水平可以反映 24 h 内血糖调节动力学的变化。此外 1, 5-AG 在血糖正常个体中含量十分稳定，无昼夜差异、不受食物影响，并且与糖尿病病程、体重和年龄等无关。近几年研究表明，定期的 1, 5-AG 测定可以为妊娠期糖尿病预防和治疗提供依据。同时有研究报道，无论是否患有

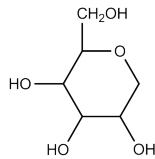
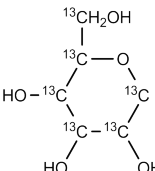
糖尿病，对于存在高风险的心血管疾病的人体，1, 5-AG 水平的测定有一定的作用。

本文使用岛津 Nexera MX System 超高效平行液相三重四极杆质谱联用系统，建立人血清中 1, 5-脱水葡萄糖醇含量测定方法，与常规液质联用方法相比，Nexera MX 系统在保证方法精密度与稳定性的基础上，充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间，提供较以往两倍的 LCMS 处理速度与分析能力，显著缩短分析时间，提高生物样品检测速率，实现 LCMS 数据采集速度最大化，适用于大样本分析的超高通量检测。

## 实验部分

### 1.1 化合物信息

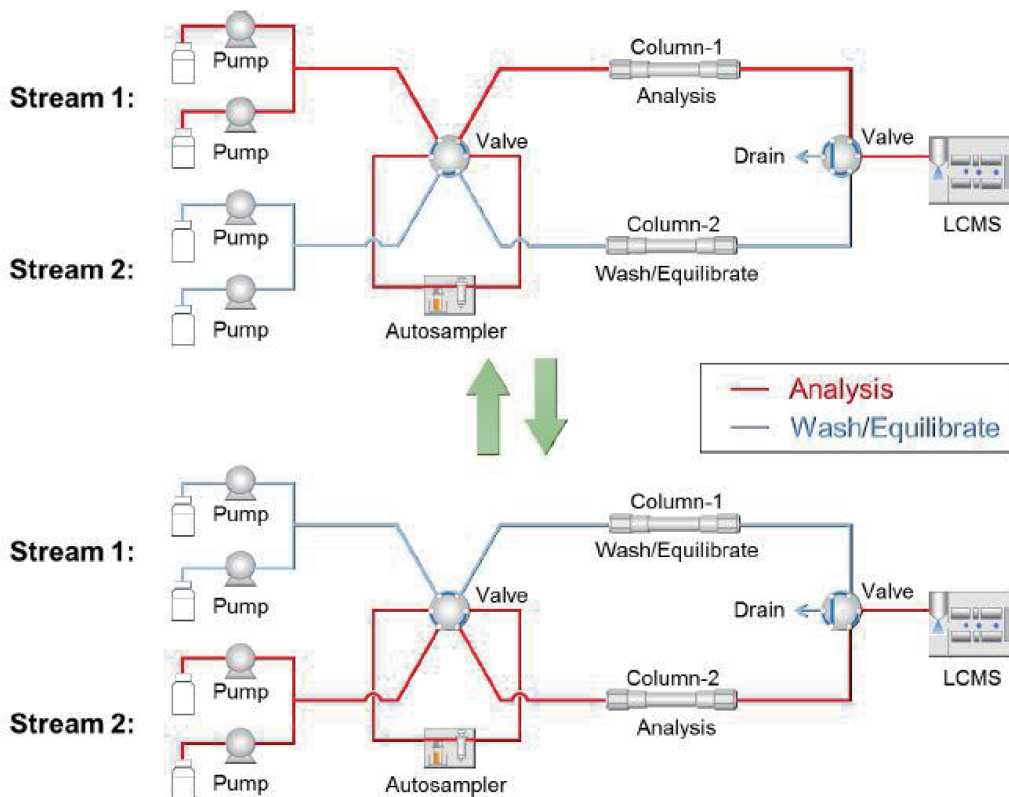
表1 化合物信息

化合物名称	CAS No.	分子式	分子量	结构式
1,5-脱水葡萄糖醇 (1,5-AG)	154-58-5	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	164.16	
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -1,5-脱水葡萄糖醇 ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -1,5-AG)	-	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	170.16	

### 1.2 仪器

本实验使用岛津 Nexera MX 超高效平行液相与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×4 输液泵, DGU-20A5R、DGU-20A3R 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

### 1.3 仪器结构及原理



### 1.4 分析条件

#### 液相条件

色谱柱: Shim-pack GISS-HP C18(2.1 mm I.D.  
×100 mm L., 3.0 μm)

流动相: A 相 - 水, B 相 - 乙腈

流速: 0.2 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 2 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 洗脱程序见表 2、表 3。(表 4 为常规液相梯度洗脱程序, B 相初始浓度为 10%, 两系统液相梯度曲线图见图 1、图 2。)

表2 分析流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	80
2.50	Controller	Stop	

表3 冲洗平衡流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Controller	Stop	

表4 常规液相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	80
2.50	Pumps	Pump B Conc.	80
2.51	Pumps	Pump B Conc.	10
5.00	Controller	Stop	

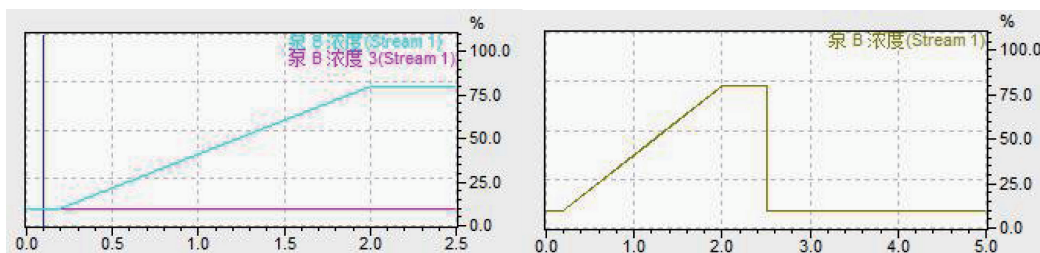


图1 MX系统液相梯度曲线图

图2 常规液相梯度曲线图

#### 质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子化模式: ESI(-)

离子源接口电压: -4.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 450°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 200 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 5

表5 MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1,5-AG	163.00	101.00	28.0	12.0	16.0
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -1,5-AG	169.00	105.00	28.0	12.0	16.0

#### 1.5 标准样品、质控品及样品制备

使用 1, 5-脱水葡萄糖醇检测试剂盒 (液相色谱 - 串联质谱法, 上海复星长征公司)。该试剂盒包含以下部分:

标准物质: 3 个水平的标准样品 (1.5 mL, 浓度分别为 1 mg/L、10 mg/L、50 mg/L)

质控品: 1 个水平的质控品 (1.5 mL, 浓度为 15 mg/L)

沉淀剂 (含内标): <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-1, 5-脱水葡萄糖醇 (4.8 mL, 浓度为 20 mg/L)

标准样品、质控品前处理方法: 取 50 μL 标准样品或质控品于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 20 μL 沉淀剂、180 μL 乙腈, 混匀, 涡旋混合 30 s, 高速离心 (20000 rpm) 3 min, 吸取 50 μL 上清液, 加入 50 μL 水, 混匀后供色谱进样分析。(经前处理后对照品进样浓度相当于 0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L; 质控品浓度相当于 1.5 mg/L)

样品前处理方法: 取 50 μL 血清样品于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 20 μL 沉淀剂、180 μL 乙腈, 混匀, 涡旋混合 30 s, 高速离心 (20000 rpm) 3 min, 吸取 50 μL 上清液, 加入 50 μL 水, 混匀后供色谱进样分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

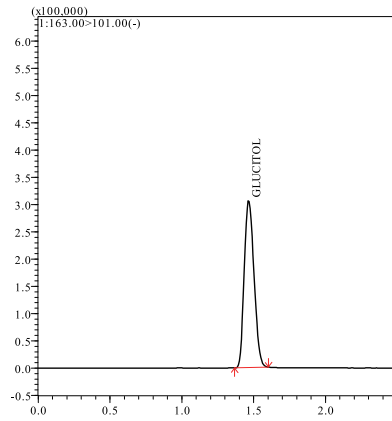


图3 标准样品MRM色谱图(浓度为10 mg/L)

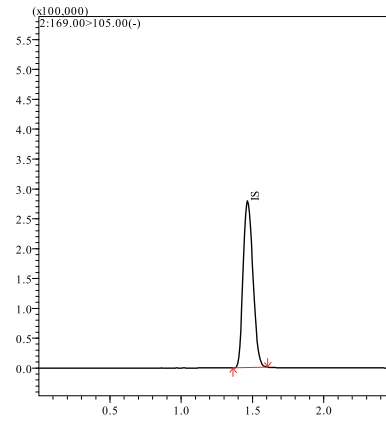


图4 内标MRM色谱图(浓度为20 mg/L)

### 2.2 质控品的 MRM 色谱图

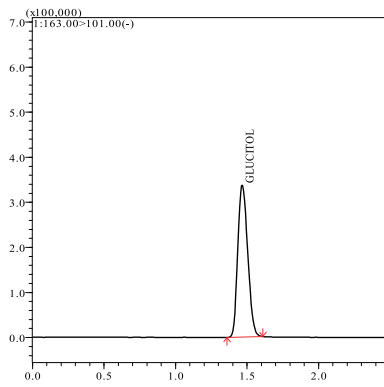


图5 质控品MRM色谱图(浓度为15 mg/L)

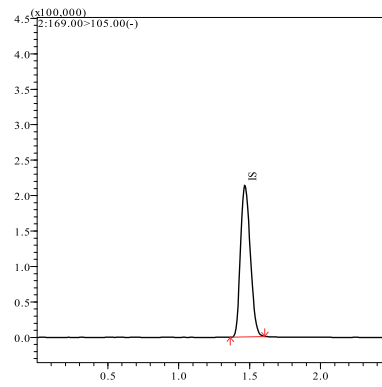


图6 内标MRM色谱图(浓度为20 mg/L)

### 2.3 样品的 MRM 色谱图

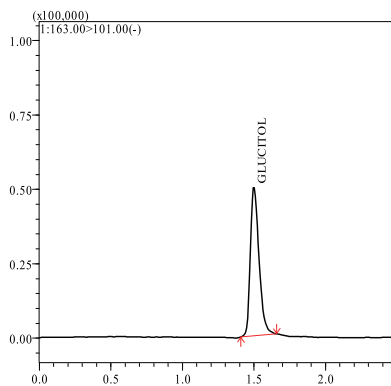


图7 样品MRM色谱图(浓度为26.18 mg/L)

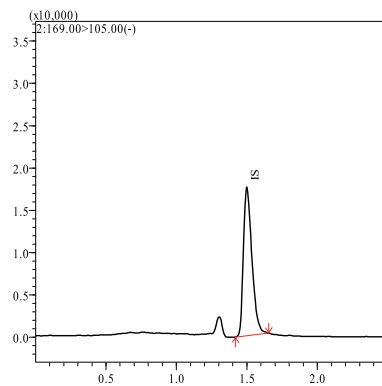


图8 内标MRM色谱图(浓度为20 mg/L)

## 2.4 专属性考察

按照 1.5 中的样品前处理方法制备 double blank 和 blank，按照 1.4 中条件进行分析后得到的色谱图，如图 9、图 10 所示，色谱图显示，本方法专属性强。

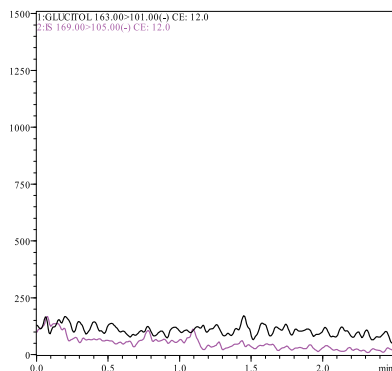


图9 double blank 谱图

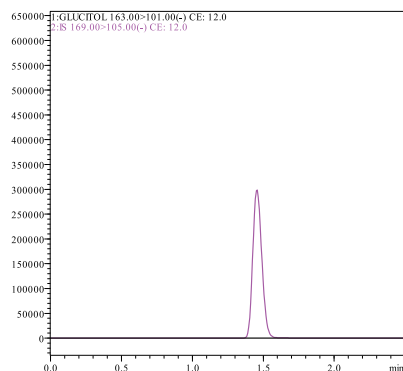


图10 blank谱图(浓度为20 mg/L)

## 2.5 线性关系

连续三天对试剂盒内三个浓度的标准样品，按 1.4 中的分析条件进行了 3 个批次的分析，以浓度为横坐标，峰面积比值为纵坐标，内标法制作校准曲线。在 1~50 mg/L 进样浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 6。

表6 校准曲线参数

编号	校准曲线	线性范围(mg/L)	准确度(%)	相关系数 r
批 1	$Y = (0.109583)X + (-0.00488135)$	1~50	97.2~101.6%	0.9999
批 2	$Y = (0.108947)X + (0.00228196)$	1~50	99.6~100.4%	0.9999
批 3	$Y = (0.109597)X + (-0.00571962)$	1~50	99.6~103.5%	0.9999

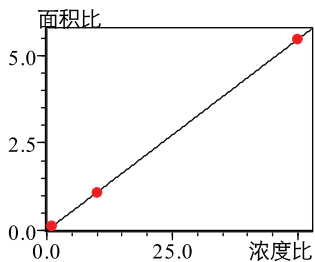


图10 批1校准曲线

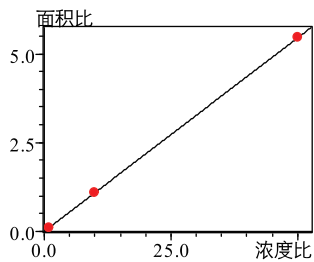


图11 批2校准曲线

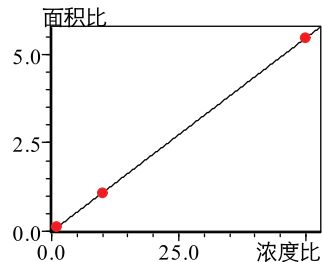


图12 批3校准曲线

## 2.6 检出限和定量限

对浓度为 1 mg/L 的标准样品按照 1.5 的方法进行前处理后进样分析 (进样浓度 0.1 mg/L)，最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 7 所示。

表7 检出限和定量限

名称	信噪比	检出限(mg/L)	定量限(mg/L)
1,5-AG	276.5	0.001	0.004

## 2.7 质控品准确度考察

按 1.4 中的分析条件和 1.5 中的前处理方法对试剂盒中的质控品进行分析，质控品的准确度结果如下表所示，结果显示，测定结果与靶值接近，完全落在质控样本的靶值范围之内 (靶值由试剂盒提供)。

表8 质控样本测试结果

编号	靶值(mg/L)	靶值范围(mg/L)	测定浓度(mg/L)	准确度%
QC-1			14.519	96.8
QC-2			14.471	96.5
QC-3	15	13.5~16.5	14.582	97.2
QC-4			14.474	96.5
QC-5			14.511	96.7
QC-6			14.335	95.6
RSD			0.57%	

## 2.8 批内、批间精密度实验

连续三天对试剂盒中浓度为 50 mg/L 的标准样品测定 6 次, 进行三个批次分析, 考察批内、批间的精密度, 结果如表 9 所示。1, 5-AG 批内和批间精密度分别小于 0.58% 和 0.64%。

表9 批内批间精密度结果(mg/L)

理论值	批内精密度(n=6)		批间精密度(n=18)	
	平均实测值	RSD	平均实测值	RSD
50	50.006	0.58%	50.003	0.64%

## 2.9 稳定性实验

取 3 批次血清样品, 按 1.5 中的前处理方法处理样品后, 进行进样器放置 0 天、1 天及 2 天稳定性考察, 结果如下表所示, 表中结果显示, 该方法稳定性良好。

表10 进样器放置稳定性考察结果

样品	0 天实测浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	放置时间(天)	浓度比例百分比(%)
样品 1	26.18	0	100.0
		1	99.6
		2	99.3
样品 2	27.98	0	100.0
		1	99.9
		2	100.2
样品 3	32.90	0	100.0
		1	100.5
		2	99.7

## 结论

本文使用岛津 Nexera MX System 超高效平行液相三重四极杆质谱联用系统, 建立人血清中 1, 5-脱水葡萄糖醇含量测定方法, 与常规液质联用方法相比, Nexera MX 系统在保证方法精密度与稳定性的基础上, 充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间, 提供较以往两倍的 LCMS 处理速度与分析能力, 显著缩短分析时间, 提高生物样品检测速率, 实现 LCMS 数据采集速度最大化, 适用于大样本分析的超高通量检测, 可以为临床中人血清中 1, 5-脱水葡萄糖醇的检测提供很好的借鉴和参考。