

LCMS-8045 测定血液和尿液中的乙基葡萄糖醛酸苷

LCMSMS-480

摘要: 本文参考《GA/T 1633-2019 法庭科学 血液、尿液中乙基葡萄糖醛酸苷检验 气相色谱-质谱和液相色谱-质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了血液和尿液中乙基葡萄糖醛酸苷 (EtG) 的分析方法。血液和尿液以乙腈沉淀蛋白，离心，取上清液，以 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。以保留时间和离子对相对丰度比为定性依据，空白血液和尿液中加标制作外标法校准曲线，来定量检测样品中乙基葡萄糖醛酸苷含量。结果表明：EtG 在尿液和血液中的定量限均低于 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，满足标准要求；在 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的线性范围内，尿液和血液加标样品各标点浓度准确度分别在 92.8-104.3% 和 92.8-110.0% 之间，R 均不低于 0.9997；Carryover 考察结果表明尿液和血液高浓度加标样品进样后均无明显系统残留；尿液和血液待测样品检测结果满足标准关于定性和定量结果的要求。该方法灵敏度和准确度高，适合血液和尿液中的乙基葡萄糖醛酸苷检测。

关键词: LCMS-8045 血液 尿液 乙基葡萄糖醛酸苷

乙基葡萄糖醛酸苷 (Ethyl Glucuronide, EtG) 是乙醇在人体内代谢的标志性代谢物。相较于乙醇，其在血液和尿液中存在时间更久，通常情况下，EtG 在血液中的存在时间约为 12 h，血液中 EtG 检测结果是判定个体在 12 h 内是否饮酒的重要证据，尤其是在体内已不能检测出乙醇时。此外，血液和尿液中 EtG 的测定，对判定乙醇来源、区分是否血液腐败产生乙醇有着重要的意义。

EtG 的检测方法有 LC-MS/MS 和 GC-MS/MS 等，

GC-MS/MS 检测时，需要对 EtG 进行衍生，前处理较为复杂，而用 LC-MS/MS 检测 EtG 则不需要衍生。

本文参考《GA/T 1633-2019 法庭科学 血液、尿液中乙基葡萄糖醛酸苷检验 气相色谱-质谱和液相色谱-质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了血液和尿液中 EtG 的 LC-MS/MS 分析方法。该方法前处理简单，灵敏度和准确度高，适合血液和尿液中的 EtG 检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045, 具体配置为 LC-40B X3 (输液泵), SIL-40C X3 (自动进样器), CTO-40S (柱温箱), CBM-40 (系统控制器), LCMS-8045 (三重四极杆质谱仪), LabSolutions Ver. 5.97 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

液相色谱条件:

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 150 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μm (SGLC, P/N: 227-30008-07)

流动相: A-0.01% 甲酸水溶液; B- 乙腈

流速: 0.3 mL/min

柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$

进样量: 1 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 7%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.20	Pumps	Pump B Conc.	7
1.80	Pumps	Pump B Conc.	90
2.80	Pumps	Pump B Conc.	90
2.90	Pumps	Pump B Conc.	7
6.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8045

加热模块温度: 300°C

离子源: ESI-

DL 温度: 250°C

雾化气流速: 3.0 L/min

离子源温度: 400°C

加热气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

序号	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
1	乙基葡萄糖醛酸苷	221.10	75.10*	11.0	16.0	14.0
			85.10	11.0	18.0	15.0

* 定量离子对

1.3 样品前处理

(1) 实际样品: 参照《GA/T 1633-2019 法庭科学 血液、尿液中乙基葡萄糖醛酸苷检验 气相色谱 - 质谱和液相色谱 - 质谱法》中“7.1.1.2 沉淀蛋白法 (适用于液相色谱 - 串联质谱)”部分, 准确移取 100 μ L 血液或尿液样品 (双平行样) 于 1.5 mL 离心管中, 加入 900 μ L 乙腈, 涡旋 90 s, 13000 r/min 离心 3 min, 取上清液以 0.22 μ m 滤膜过滤后待测。

(2) 空白样品和空白基质加标样品: 取等量相似基质的空白样品于离心管中, 其中一份作为空白样品, 其他添加 EtG 标准物质作为添加样品 (添加样品的浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0、10 μ g/mL, 其中 0.1 μ g/mL 为标准规定的定量限), 与实际样品平行操作, 得到空白样品提取液和添加样品提取液供仪器分析。

结果讨论

2.1 专属性

空白样品和空白基质加标样品 (0.1 μ g/mL, 标准规定的 LOQ) 的 MRM 色谱图如图 1 所示, 空白样品无干扰。

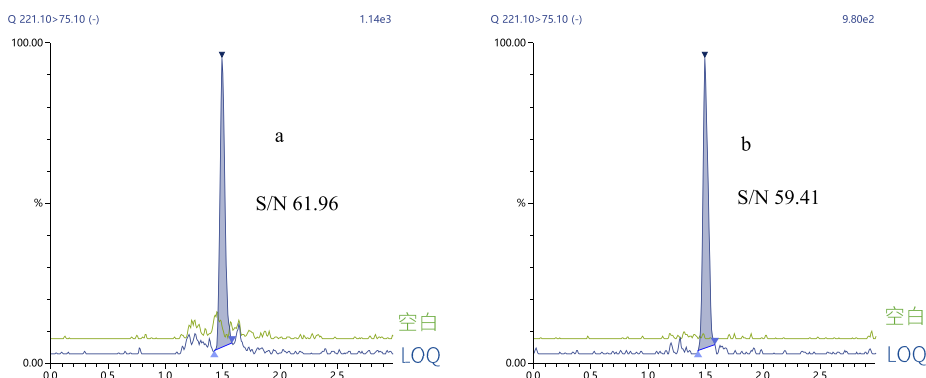


图 1 尿液 (a) 和血液 (b) 空白样品和空白基质加标样品 MRM 色谱图

2.2 定量限

参照标准，将空白尿液和血液中分别添加 0.1 μg/mL 的 EtG，前处理后进样 1 μL 考察方法的定量限，色谱图如图 2 所示。其中，尿液和血液加标 0.1 μg/mL 色谱图中目标峰的 S/N (USP) 分别为 61.96 和 59.41，满足标准中关于定量限为 0.1 μg/mL 的要求。

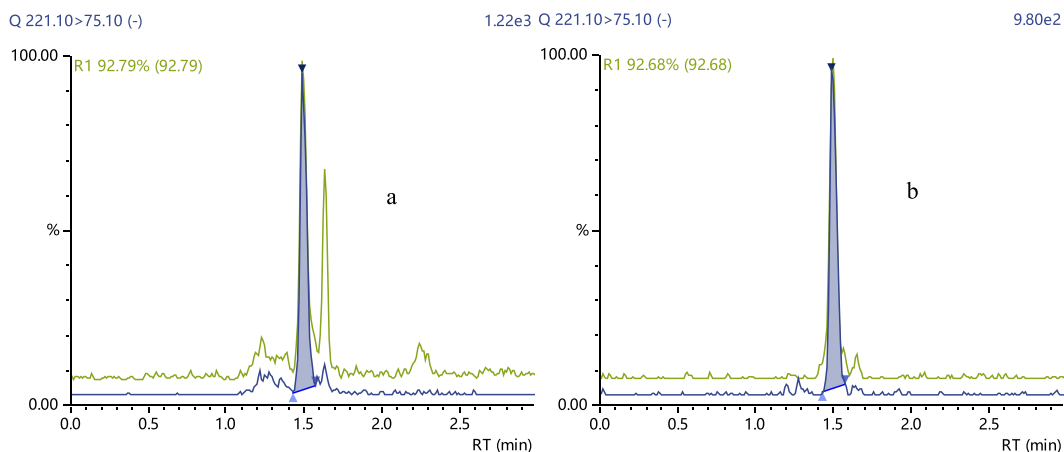


图 2 空白尿液 (a) 和血液 (b) 加标 0.1 μg/mL 样品 MRM 色谱图

2.3 校准曲线

空白尿液和血液中分别添加 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/mL 标样，前处理后进样分析，外标法建立校准曲线如图 3 所示，线性方程、相关系数及准确度如表 3 所示。

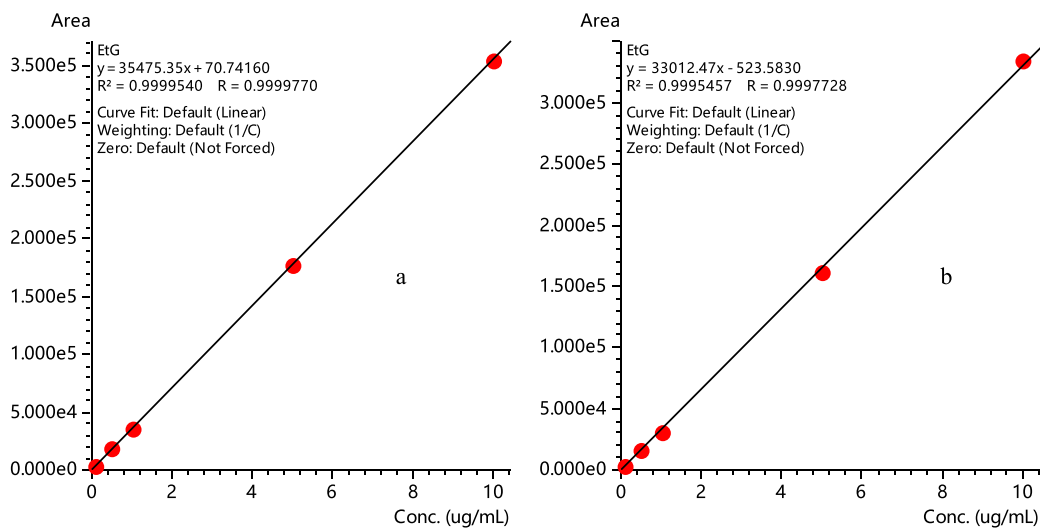


图 3 校准曲线 (a- 尿液加标曲线, b- 血液加标曲线)

表 3 校准曲线参数

No.	样品	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 r	准确度 (%)
1	尿液	0.1-10	$Y = (35475.35)X + (70.74160)$	>0.9999	92.8-104.3
2	血液	0.1-10	$Y = (33012.47)X - (523.5830)$	>0.9997	92.8-110.0

2.4 Carryover 考察

空白尿液和血液中添加 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 样品进样后，以空白样品进样得色谱图如图 4 所示，EtG 保留时间处无明显色谱峰。

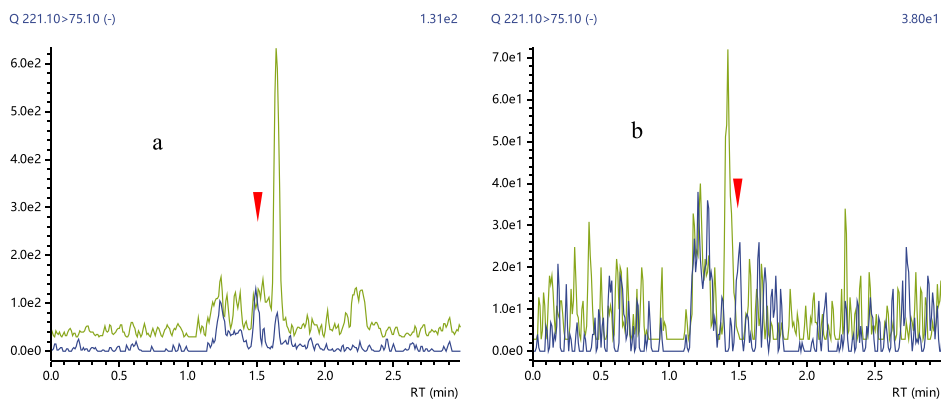


图 4 Carryover 考察 (a- 尿液, b- 血液)

2.5 重复性考察

对不同浓度的基质加标样品分别连续分析 6 次，计算保留时间和峰面积的 RSD. 结果见表 4，保留时间 RSD 均不高于 0.30%，峰面积 RSD 均不高于 5.86%。

表 4 保留时间和面积 RSD

No.	样品	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD (%)
1	尿液	0.1	0.19	3.54
		1	0.21	1.10
		10	0.29	0.53
2	血液	0.1	0.30	5.86
		1	0.13	3.46
		10	0.14	0.64

2.6 实际样品测定

取尿液和血液样品，各平行制备两份，上机测定，各样品平行样 1 色谱图如图 5 所示。

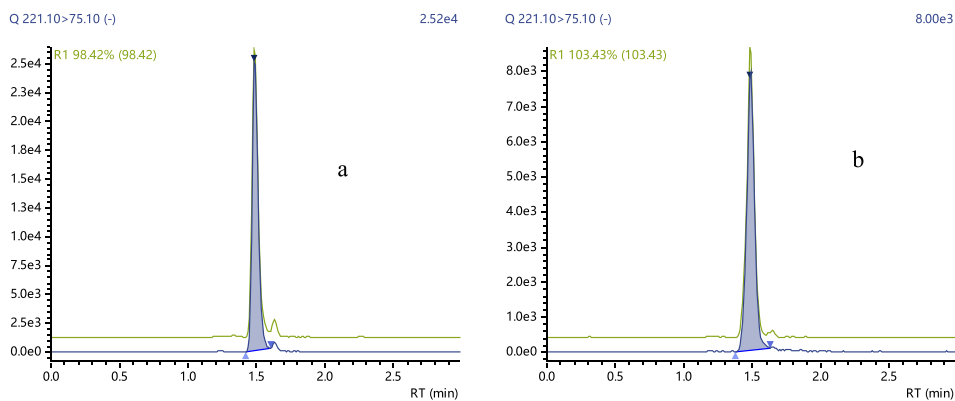


图 5 尿液 (a) 和血液 (b) 样品色谱图

参照标准规定，以保留时间（与空白加标样品保留时间平均值相对偏差不高于 2.5%）和离子对相对丰度比（范围由空白加标样品离子丰度比平均值确定，本文中离子丰度比大于 50%，要求最大允许相对偏差范围为 20%）为定性依据，定性结果如表 5 所示。尿液和血液待测样品的保留时间以及离子丰度比相对偏差均未超出规定范围，符合要求。

表 5 待测样定性结果

No.	样品	保留时间 (min)	保留时间相对偏差 (%)	离子丰度比	离子丰度比相对偏差 (%)
1	尿液加标样	1.489	-	99.51	-
2	尿液待测样 - 平行 1	1.483	0.40	98.42	1.09
3	尿样待测样 - 平行 2	1.487	0.13	96.76	2.76
4	血液加标样	1.490	-	98.25	-
5	血液待测样 - 平行 1	1.484	0.40	103.43	5.27
6	血液待测样 - 平行 2	1.483	0.47	99.48	1.25

参照标准规定，各待测样品均记录 2 份平行处理样品中目标物的含量，按公式 $RD = (|C1 - C2| / C \text{ 平均}) * 100\%$ 计算相对相差，结果应不超过 20%，结果如表 6 所示，实际样品的双平行处理样相对相差均不高于 20%，符合要求。

表 6 待测样定量结果

No.	样品	含量 (µg/mL)			双样相对相差 (%)
		平行 1	平行 2	平均值	
1	尿液待测样	2.17	2.23	2.20	1.36
2	血液待测样	0.96	0.92	0.94	2.13

■ 结论

本文参考《GA/T 1633-2019 法庭科学 血液、尿液中乙基葡萄糖醛酸苷检验 气相色谱 - 质谱和液相色谱 - 质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了血液和尿液中乙基葡萄糖醛酸苷 (EtG) 的分析方法。结果表明：EtG 在尿液和血液中的定量限均低于 0.1 µg/mL，满足标准要求；在 0.1-10 µg/mL 的线性范围内，尿液和血液加标样品各标点浓度准确度分别在 92.8-104.3% 和 92.8-110.0% 之间，R 均不低于 0.9997；Carryover 考察结果表明尿液和血液高浓度加标样品进样后均无明显系统残留；尿液和血液待测样品检测结果满足标准关于定性和定量结果的要求。该方法灵敏度和准确度高，适合血液和尿液中的乙基葡萄糖醛酸苷检测。

岛津应用云

