

CLAM-2000-LCMS-8050 联用系统测定人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇含量

LCMSMS-368

摘要：本文建立了一种岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇含量的检测方法。此方法使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 处理血清样品，内标法定量，每个样品从在线自动前处理到液质分析完成仅需 6min；线性范围为 1~50 mg/L；相关系数为 0.9999；检出限为 0.001 mg/L，定量限为 0.004 mg/L。质控品均在靶值范围内，质控品日内准确度平均值分别为 99.77%、98.51% 及 101.48%，精密度分别为 0.43%、0.39% 及 0.40%；质控品日间准确度平均值为 99.92%，日间精密密度为 1.34%。此联用系统在线自动处理样品且数据重复性好，只需简单放入采血管、必要试剂和专用处理管，便可在线自动进行前处理，每个样品并行处理，优化仪器的使用和样品通量，提供可视化的图表和数据，可实时提醒用户试剂量的减少和质控品结果的变化等，是一种全自动化的分析系统，有助于更快、更简单、更安全地实现临床研究中高精度的工作流程。

关键词：CLAM-2000 在线自动前处理 三重四极杆质谱仪 1,5-脱水葡萄糖醇

乳糖尿病是一种代谢综合症，是因为胰岛素分泌缺陷或相应的生物功能受损所导致，或两者兼有导致。在目前的临床实践中，最为常见的用来评估血糖状态的两个指标分别是果糖胺和糖化血红蛋白 (HbA1c)。果糖胺能够反映过去的 2~3 周内血糖水平，且突发的血糖升高或降低不会对其产生影响，是一个比较可靠的近期糖尿病血糖控制的指标。HbA1c 则是反映过去 2~3 个月内血糖平均水平的变化，对它进行测定，可以较为全面的了解过去一段时间内血糖控制情况，但它不能准确地体现血糖波动。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，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 可以用来作为一种短期血糖控制的标志。甚至当

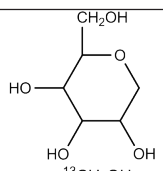
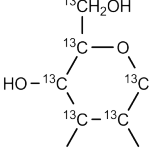
出现急性高血糖时，血清中的 1,5-AG 水平可以反映 24 小时内血糖调节动力学的变化。此外 1,5-AG 在血糖正常个体中含量十分稳定，无昼夜差异、不受食物影响，并且与糖尿病病程、体重和年龄等无关。

本研究使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统测定人血清中 1,5-AG 含量，此联用系统实现了样品在线自动前处理与液质分析一体化，实现了实验中关键工作流程的自动化，只需简单放置采血管或其他样品管，系统就会自动完成对血样或其他样品的前处理，然后自动输送至 LCMS 进行分析。因此，该系统能够最大限度地减少人为误差和样品前处理的差异；有助于更快，更简单，更安全地实现临床研究中高精度的工作流程。

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 ₆ H ₁₂ O ₅	164.16	
¹³ C ₆ -1,5-脱水葡萄糖醇 (¹³ C ₆ -1,5-AG)	-	¹³ C ₆ H ₁₂ O ₅	170.16	

1.2 仪器

CLAM-2000-LCMS-8050 联用系统 (见图 1)。具体配置为: 在线自动前处理仪 CLAM-2000, CLAM-2000 Ver. 1.13 在线自动前处理仪工作站, LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A5R 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪配 ESI 离子源, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。



图1 岛津CLAM-2000-LCMS-8050联用系统

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST (2.1 mmI.D.
×100 mmL., 2 μm)

柱温: 40°C

进样量: 2 μL

流动相: A 相 - 水 B 相 - 乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 洗脱程序见表 2。

流速: 0.2 mL/min

表2 液相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
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	

液相条件

色谱柱质谱条件

离子化模式: ESI (-)

接口温度: 300°C

接口电压: -4.0 kV

DL 温度: 250°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 450°C

加热气: 空气 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气: 氮气 10.0 L/min

驻留时间: 200 ms

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 3

表3 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
¹³ C ₆ -1,5-AG	169.00	105.00	28.0	12.0	16.0

1.4 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): 13C6-1,5- 脱水葡萄糖醇 (4.8 mL, 浓度为 20 mg/L)

在 CLAM-2000 工作站界面优化自动前处理参数、蛋白沉淀剂使用量、震摇转速、震摇时间、抽滤时间等。确定样品自动前处理程序具体操作为 (1)、吸取 20 μ L 甲醇活化过滤管, 准备上样; (2)、吸取对照品、质控品或血清样品 20 μ L 上样; (3)、吸取沉淀剂 10 μ L 及甲醇 70 μ L 至过滤管进行沉淀蛋白; (4)、转速 2400 rpm 震摇 90 秒; (5)、使用 -50~-60 kPa 的负压抽滤过滤管 150 s; (6)、吸取 80 μ L 纯水至接收管; (7)、接收管转速 1200 rpm 震摇 30 s; (8) 接收管转移至液相自动进样器, 进样 2 μ L (详见图 2)

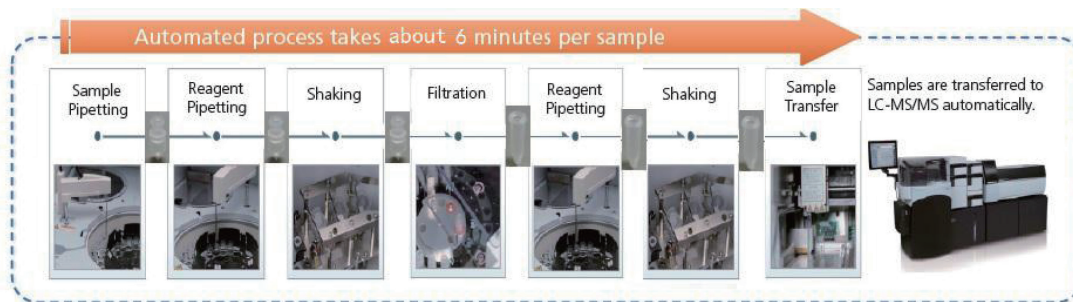


图2 CLAM-2000在线自动前处理过程

结果与讨论

2.1 在线自动前处理方式

岛津 CLAM-2000-LCMS-8050 联用系统可以实现并行前处理, 即在一个样品自动前处理时, 系统会根据前处理程序, 同时自动开始下一个样品的前处理, 并可以多个样品同时处理 (见图 3 及图 4), 大大缩短了前处理时间, 本实验单个样品前处理时间为 6 min, 质谱分析时间为 5 min, 并行前处理功能使样品在线自动前处理与液质分析时间重叠, 从在线自动前处理到液质分析完成仅需 6 min, 大大节省分析时间, 优化仪器的使用和样品通量。

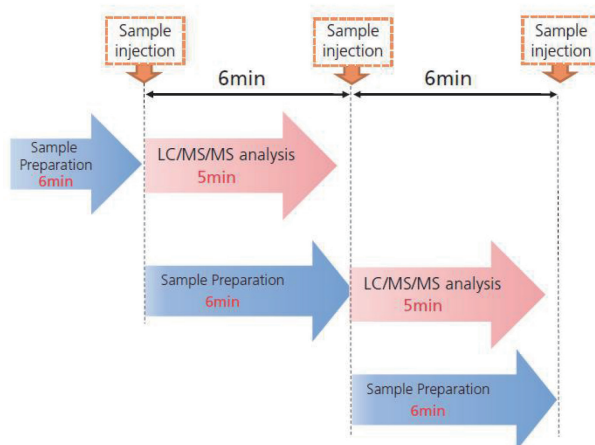


图3 CLAM-2000并行前处理示意图

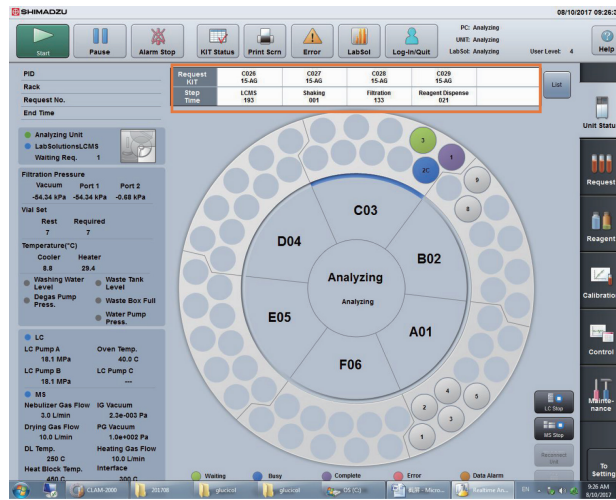


图4 CLAM-2000并行前处理实时状态图

2.2 专属性考察

按照 1.4 中的样品前处理方法制备 double blank 和 blank，按照 1.3 中条件进行分析后得到的色谱图，如图 5、图 6 所示，色谱图显示，本方法专属性强。

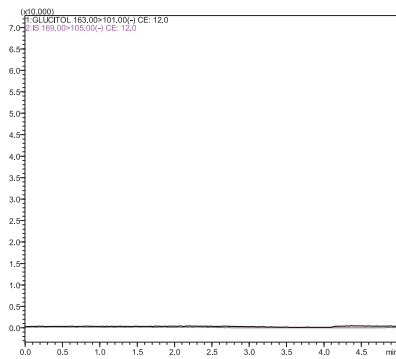


图5 double blank 谱图

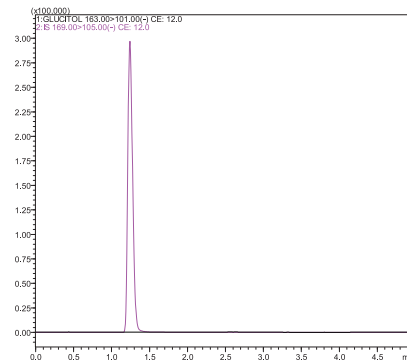


图6 blank 谱图

2.3 线性关系

对试剂盒内三个浓度的标准样品，按 1.3 中的分析条件进行分析，以浓度比为横坐标，峰面积比值为纵坐标，内标法制作校准曲线。校准曲线在 1~50 mg/L 浓度范围内线性良好，相关系数符合试剂盒要求（试剂盒要求相关系数大于 0.99）。线性方程、线性范围和相关系数见图 7。

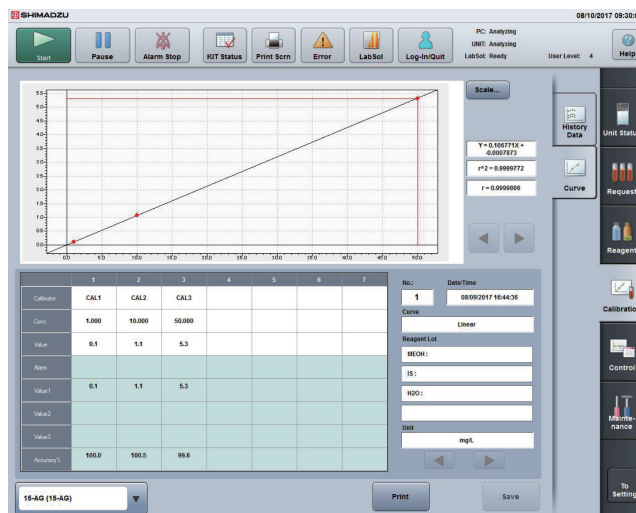


图7 1,5-AG标准曲线图

2.4 检出限和定量限

对浓度为 1 mg/L 的标准样品按照 1.4 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 4 所示。结果显示，该方法检出限及定量限能够满足日常检验需求。

表4 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	283.6	0.001	0.004

2.5 质控品准确度考察

按 1.3 中的分析条件和 1.4 中的前处理方法对试剂盒中的质控品进行分析，质控结果如图 8 及表 5 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）

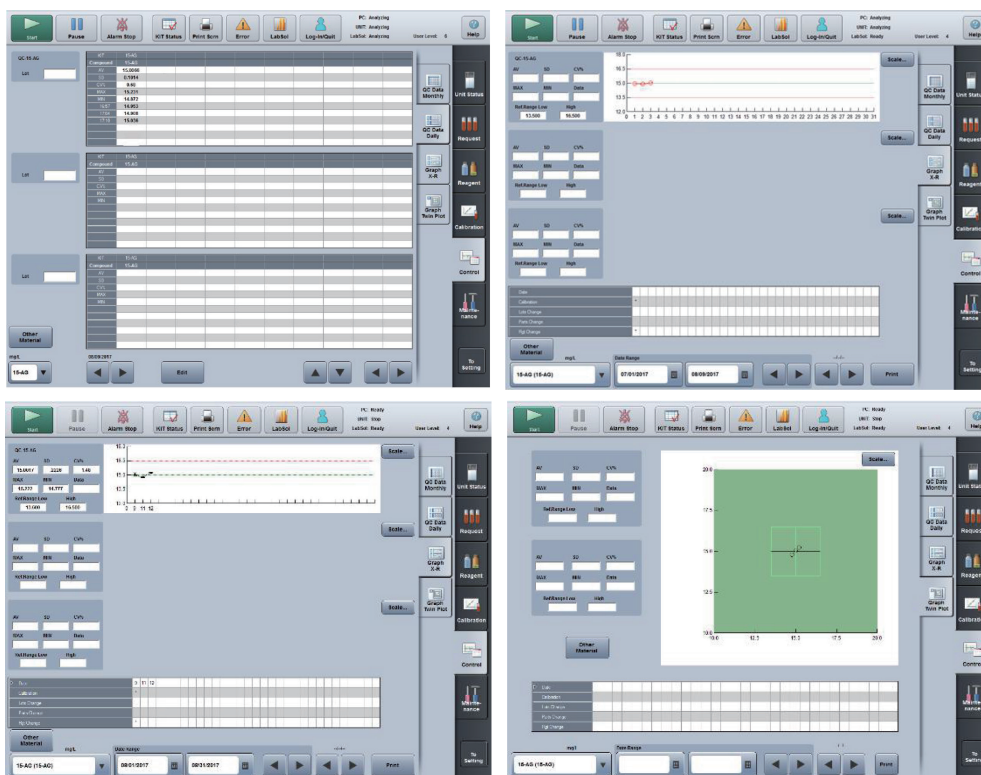


图8 质控样品控制图（A-日内质控统计数据；B-日内质控图；C-日间质控图；D-日间质控两点图）

表5 质控样本测试结果

靶值 (mg/L)	参考区间 (mg/L)	测定浓度 (mg/L)			日间质控 平均值	日间准确度 平均值 (%)	日间精密度 RSD (%)
		Day1	Day2	Day3			
15.0	13.5~16.5	14.95	14.82	15.23	14.99	99.92	1.34
		14.91	14.80	15.16			
		15.04	14.71	15.28			
平均准确度 (%)		99.77	98.51	101.48			
RSD (%)		0.43	0.39	0.40			

2.6 实测患者血清样品

取3批次血清样品,使用该联用系统测定人血清中1,5-AG的浓度,结果见表6,谱图见图9。结果显示,该系统可以用于测定人血清中1,5-AG的浓度。

表6 血清样品浓度

样品	测定浓度 (mg/L)
Sample-001	31.41
Sample-002	18.94
Sample-003	16.44

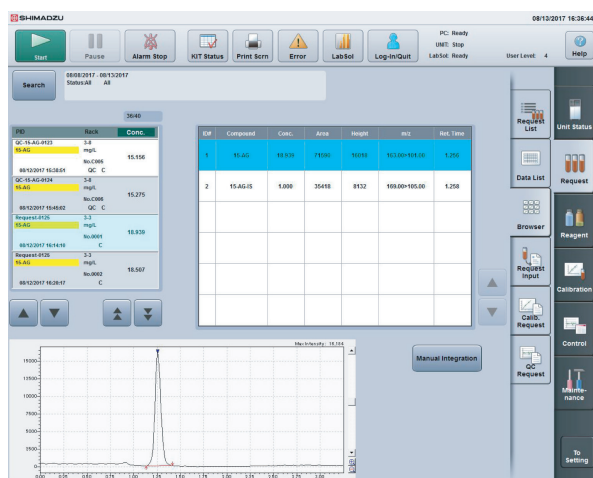


图9 Sample-002血清样品谱图

结论

本文建立了一种使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 及岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统测定人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇含量的方法。此方法使用岛津在线自动前处理仪 CLAM-2000 处理血清样品,内标法定量,每个样品从在线自动前处理到完成液质分析时间仅需 6 min,线性范围为 1~50 mg/L,相关系数为 0.9999,检出限为 0.001 mg/L,定量限为 0.004 mg/L。质控品均在靶值范围内,质控品日内准确度平均值分别为 99.77%、98.51% 及 101.48%,精密度分别为 0.43%、0.39% 及 0.40%;质控品日间准确度平均值为 99.92%,日间精密度为 1.34%。此联用系统在线自动处理样品且数据重复性好,消除手动操作生物样品带来的风险,最大限度地减少操作人员与生物样本的接触,只需简单放入采血管、必要试剂和专用处理管,便可进行在线自动前处理,每个样品并行处理,以优化仪器的使用和样品通量,并且通过软件来管理试剂、校准曲线、控制样品和系统维护,确保系统的性能和可靠性,系统提供可视化的图表和数据,可实时提醒用户试剂量的减少或 QC 样品结果的变化等,是一种全自动化的分析系统。