

# 超高效液相色谱质谱联用检测人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇

LCMSMS-346

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用检测人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇的方法。样品经 1,5-脱水葡萄糖醇试剂盒中提供的试剂处理后，使用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050 在 5.0 min 内完成定量分析。1,5-脱水葡萄糖醇在浓度范围 1~50 mg/L 内线性良好，相关系数大于 0.9999；使用试剂盒标定浓度为 10 mg/L 的血清标准样品进行了批内批间的精密度的实验，实验结果表明批内批间的精密度的 RSD 均小于 1.3%；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。

**关键词：**临床 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 1,5-脱水葡萄糖醇

糖尿病是一种代谢综合症，主要的特征就是高血糖，它是由于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 周内血糖平均水平，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 则是过去 2、3 个月内血糖平均水平的反映，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，但它不能准确的体现血糖波动，这种波动有可能伴随餐后高血糖或低血糖的发生。1,5-脱水葡萄糖醇 (1,5-anhydroglucitol, 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，不参与能量代谢。研究表明，在糖尿

病患者中，1,5-AG 含量是明显降低的。其原因是 1,5-AG 与葡萄糖结构类似，1,5-AG 与葡萄糖一起由尿排泄出肾小球滤出。高血糖状态下，当血糖超过肾小管的肾糖阈时，1,5-AG 在肾小管的重吸收会受到尿糖的竞争性抑制，最终导致尿 1,5-AG 排出量增加，而其血液中浓度明显下降。研究显示，1,5-AG 对血糖的变化是极其敏感的，也可以说 1,5-AG 可以实时反映血糖的变化，说明了 1,5-AG 可以用作为一种短期血糖控制的标志。

本文使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，建立人血清中 1,5-脱水葡萄糖醇含量测定方法，该方法操作简捷、特异性好、灵敏度高、分析速度快，适用大规模临床 1,5-脱水葡萄糖醇检测的需要，该方法可以在临床检验方面发挥较大的作用。供相关检测人员参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津临床用超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2(输液泵)，DGL-20A<sub>SR</sub>(在线脱气机)，SIL-30AC(自动进样器)，CTO-30A(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。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

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℃

进样量：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1

表1 梯度洗脱时间程序

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

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI -

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 450°C

干燥气流速: 10 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM), MRM 参数见表 2

表2 化合物信息及MRM参数

编号	名称	CAS.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	1,5 - AG	154-58-5	163.00	101.00	28.0	12.0	16.0
2	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> - 1,5 - AG	-	169.00	105.00	28.0	12.0	16.0

1.3 标准样品、质控品及样品准备

使用 1, 5- 脱水葡萄糖醇检测试剂盒 (液相色谱 - 串联质谱法)。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

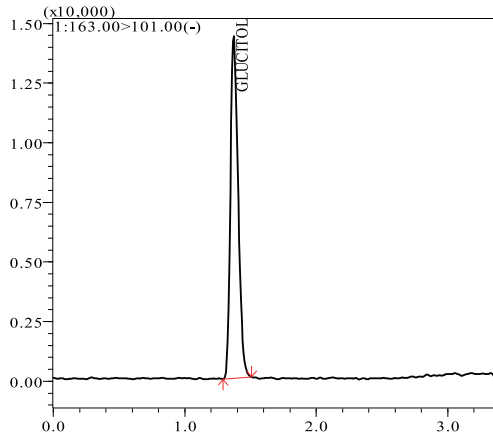


图1 对照品MRM色谱图(浓度为0.1 mg/L)

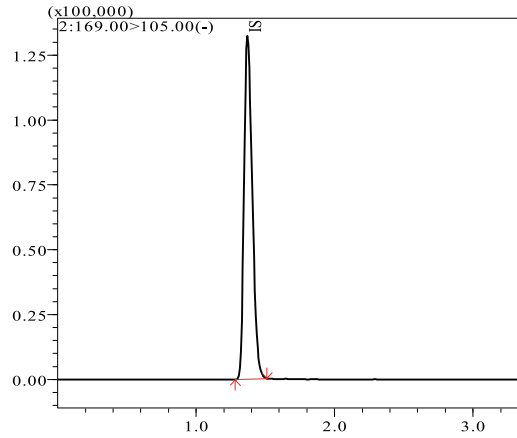


图2 对照品内标MRM色谱图

### 2.2 质控品的 MRM 色谱图

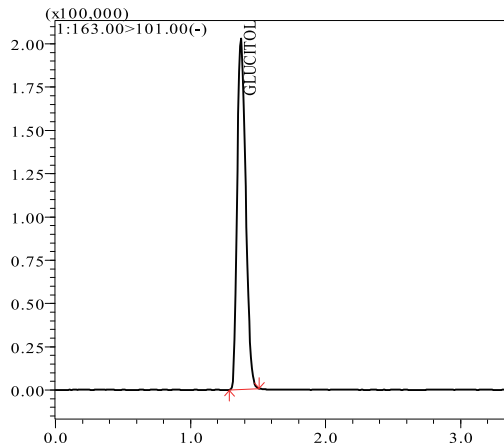


图3 质控品MRM色谱图(浓度为1.5 mg/L)

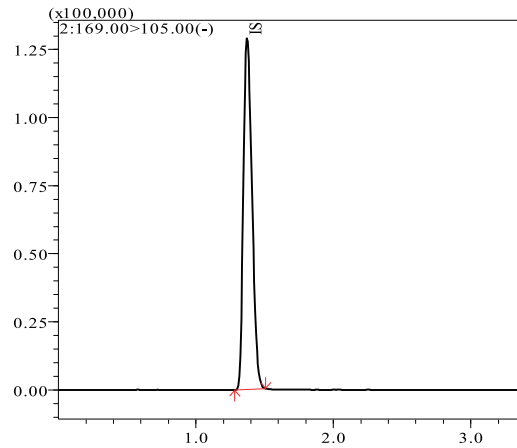


图4 质控品内标MRM色谱图

### 2.3 样品的 MRM 色谱图

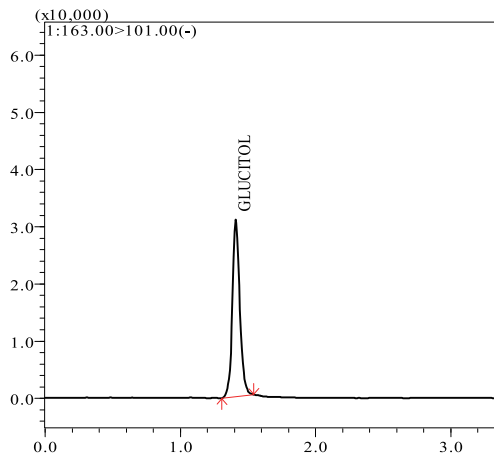


图5 样品MRM色谱图(浓度为26.51 mg/L)

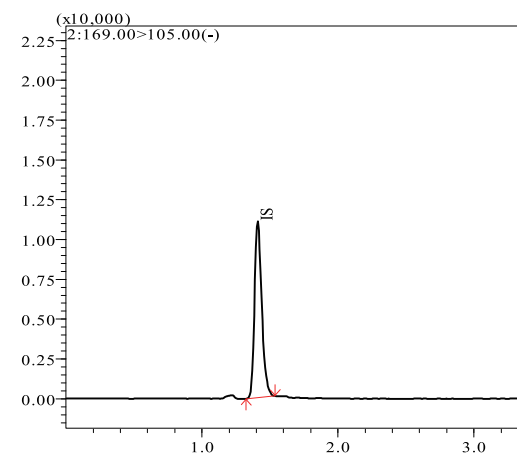


图6 样品内标MRM色谱图

## 2.4 专属性考察

按照 1.3 中的样品前处理方法制备 blank 和 double blank 样品，按照 1.2 中条件进行分析后得到的色谱图如下所示，下图显示，本方法专属性强。

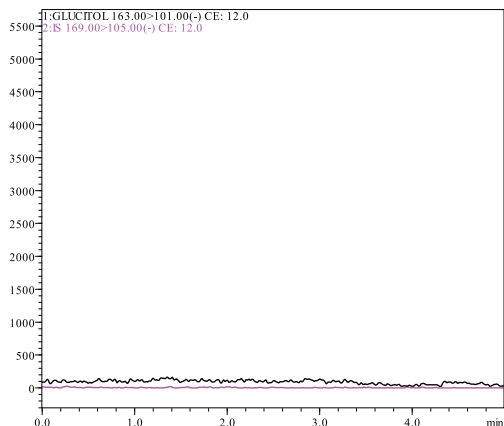


图7 double blank 谱图

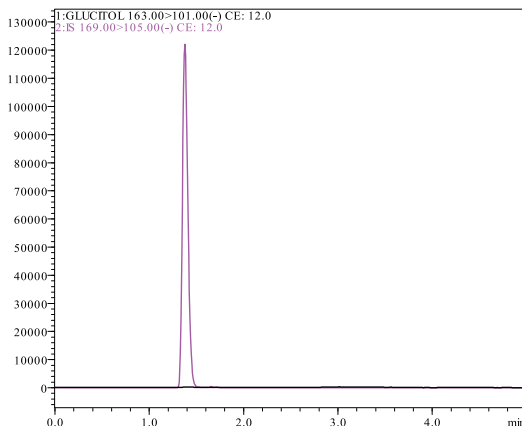


图8 blank 谱图

## 2.5 线性关系

连续三天对试剂盒内三个浓度的标准品，按 1.2 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 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

表3 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 mg/L	准确度 (%)	相关系数 r
1	批 1	$Y = (0.108595)X + (-0.00206101)$	1~50	98.6~100.4%	0.9999
2	批 2	$Y = (0.109333)X + (-0.00788114)$	1~50	98.0~101.3%	0.9999
3	批 3	$Y = (0.107609)X + (-0.00345924)$	1~50	98.4~100.6%	0.9999

## 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 3 所示。

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	230.1	0.001	0.004

## 2.7 质控样本准确度考察

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，质控样本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。

表5 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			14.42	96.1
QC-2			14.46	96.4
QC-3	15	13.5~16.5	14.36	95.7
QC-4			14.38	95.9
QC-5			14.54	96.9
QC-6			14.43	96.2
RSD			0.45%	

### 2.8 批内、批间精密度实验

连续三天对试剂盒中浓度为 10 mg/L 的校准品, 分别测定 6 次, 进行三个批次分析, 考察批内、批间的精密度, 结果如表 7 所示。1, 5-AG 批内和批间精密度分别小于 0.69% 和 0.85%。

表6 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
10	9.970	0.69%	9.952	0.85%

### 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7 进样器放置稳定性考察结果

样品	0 天实测浓度(mg/L)	放置时间(天)	浓度比例百分比(%)
样品 1	26.18	0	100.0
		1	100.0
		2	99.8
样品 2	27.98	0	100.0
		1	99.1
		2	100.7
样品 3	32.90	0	100.0
		1	100.0
		2	99.1

## 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用建立了测定人血清中 1, 5-脱水葡萄糖醇的方法。使用 1, 5-脱水葡萄糖醇试剂盒的内标、标准样品及质控样本进行了方法的专属性、线性、精密度及稳定性的考察。结果显示该方法专属性良好, 标准曲线相关系数均大于 0.9999, 批内和批间精密度均小于 1.0%, 进样器放置的稳定性满足样品检测的需要。

此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高, 可以为临床人血浆中总同型半胱氨酸的检测提供很好的借鉴和参考。