

气相色谱-质谱法测定人血清中葡萄糖含量

丁兆婷¹ 全 灿^{2*} 金君素¹ 李红梅² 戴新华² 徐 蓓²

(1. 北京化工大学 化学工程学院, 北京 100029; 2. 中国计量科学研究院 化学计量与分析科学研究所, 北京 100013)

摘 要: 利用同位素稀释质谱法配制葡萄糖标准溶液、标记葡萄糖标准溶液以及校准比值混合溶液, 向血清样品中加入 $D-[^{13}\text{C}_6]$ 葡萄糖标记物作为内标。离心沉淀蛋白后, 两步衍生化, 通过气相色谱质谱联用仪测定高标校准混合液、血清样品以及低标校准混合液中葡萄糖与标记葡萄糖的峰面积比, 利用括弧法计算血清样品中葡萄糖的准确含量。低标、高标血糖浓度分别为 1150 mg/kg、1396 mg/kg, 相对标准偏差 1.65%、2.24%, 大幅降低了测量结果的不确定度。本方法与测定血糖浓度的其他方法比较, 具有特异性高、灵敏度好, 不易受血清中还原性物质的干扰等特点。

关键词: 气相色谱质谱法; 同位素稀释法; 血清; 葡萄糖; 定值

中图分类号: O657.7

引 言

血清葡萄糖含量的高低是人体健康状况的重要指标。空腹静脉血浆血糖浓度低于 3.33 ~ 3.89 mmol/L 时称为低血糖, 而超过 7.80 mmol/L 时称为高血糖^[1]。血糖含量测定是临床检验中最重要的指标之一, 它可为糖尿病、高血压以及心脑血管系统等疾病的诊断、疗效观察、病程检测、疾病预防等提供客观依据^[2]。

目前, 血清葡萄糖常用的检测方法主要有葡萄糖氧化酶(GOD-POD)法、微电流法、氧速率法、己糖激酶法(HK 法)、气相色谱/同位素稀释质谱法(GC-ID/MS 法)等^[3-9]。其中, ID/MS 是微量、痕量和超痕量物质含量的权威测量方法。HK 法、GOD-POD 法与 GC-ID/MS 法相比较, 血糖浓度在 5.6 ~ 10 mmol/L 时相对标准偏差分别为 19.27%、19.20% 和 1.65%, 10 mmol/L 以上时相对标准偏差分别为 27.31%、24.19% 和 2.24%。可见 GC-ID/MS 法测定的标准偏差远远小于另两种方法。

本文通过向样品溶液中加入同位素标记物作为内标物, 利用 GC-MS 测定标记物与溶质的峰强度比

来测定溶质的浓度。该法特异性高、准确度高。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

冰冻混合人血清, 军事医学科学院野战输血研究所; D -葡萄糖纯度标准品, 纯度为 99.8%, 美国 Amersco 公司; $D-[^{13}\text{C}_6]$ 葡萄糖标记物, 同位素丰度大于 99.9%, 英国 Cambridge Isotope Laboratories, Inc; 叠氮化钠, 分析纯, 德国 Merck 公司; 盐酸羟胺, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 吡啶, 分析纯, 美国 TEDIA 公司; 乙酸酐, 分析纯, 北京化工厂; 二氯甲烷, 色谱纯, 德国 Riedel-de Haën 公司; 乙酸乙酯, 分析纯, 天津市津科精细化工研究所; 无水乙醇, 分析纯, 美国 J T Baker 公司; 实验用水为高纯三次蒸馏水 (Millipore, 0.22 μm)。

Thermo Finnigan DSQ 气相色谱-质谱联用仪, 美国热电公司; Mettler Toledo UMX2 天平, 瑞士梅特勒公司; Touch Mixer MT-51 涡旋振荡器, 日本 Yamato 公司; BF-2000A 氮气吹干装置, 八方世纪公司; LD5-2A 离心机, 北京医用离心机厂。

1.2 样品试样制备

1.2.1 标准溶液、标记葡萄糖标准溶液配制

精确称取一定质量的 D -葡萄糖纯度标准品、 $D-[^{13}\text{C}_6]$ 葡萄糖标记物纯度标准品溶于一定体积 0.1% 叠氮化钠溶液中, 使各自质量分数与血清中葡萄糖质量分数初测值接近, 分别约为 1.15×10^{-3} 和 1.38×10^{-3} 。

收稿日期: 2009-05-07

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局食品安全四期 (AS-PAQ0809); 国家自然科学基金 (20627004)

第一作者: 女, 1984 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: superfluidcan@hotmail.com

1.2.2 校准比值混合溶液配制

根据血清样品中葡萄糖的大致浓度,移取体积一定的葡萄糖标记物标准溶液,加入至一定体积的葡萄糖标准溶液,保证二者浓度比例范围约为(0.95,1.05),轻摇混匀、充分平衡。

1.2.3 血样制备

待血清样品室温平衡后,根据血清样品中葡萄糖的大致浓度,向样品中加入一定体积的葡萄糖标记物标准溶液,轻摇、在4℃冰箱平衡过夜,使血清样品中葡萄糖与添加的葡萄糖标记物二者浓度比例范围约为1:1。

1.3 样品前处理过程

向已添加标记物的样品中加入1 mL无水乙醇,振荡混匀,在4℃下以5000 r/min离心10 min除去蛋白,取上层清液,过0.22 μm有机滤膜,60℃下N₂吹干。加入400 μL盐酸羟胺的吡啶溶液,90℃下反应30 min。冷却后,再加入600 μL乙酸酐,90℃下反应60 min。冷却,加入1.5 mL水和0.5 mL二氯甲烷,充分振荡、静置10 min以上,取下清液50℃下N₂吹干,加入150 μL乙酸乙酯复溶,移至色谱分析瓶中。将校准比值混合溶液60℃下N₂吹干,处理方法同前。将样品进行GC-ID/MS分析^[10]。

1.4 分析方法

1.4.1 气相色谱

DB-1701毛细管色谱柱30 m×0.25 mm×0.25 μm(膜厚),载气为高纯氦气(纯度≥99.999%),流速1.5 mL/min。柱温初始温度125℃,以20℃/min速率升温到180℃,再以5℃/min速率升温到280℃,保持20 min。进样方式为不分流;进样量1 μL,进样口温度270℃。

按低标→样品A→样品B→高标的进样次序进样,要求相邻两次进样的检测结果相对标准偏差小于1%,否则需要再增加进样次数,直至满足要求。

1.4.2 质谱

电离方式为电子轰击电离源(EI),电离能量70 eV。离子源温度250℃,传输线温度:270℃,溶剂延迟3 min。仪器分辨率1000;发射电流0.2 mA;采集方式SIM(选择离子监测);扫描时间为20 ms,间隔5 ms,双通道,*m/z* 314和*m/z* 319。

1.5 计算方法

样品中葡萄糖与标记葡萄糖的浓度比和响应峰面积比在两个校正标准之间符合线性关系,血清中葡萄糖的质量浓度可按括弧法计算

$$C = \frac{[(R_s - R_l)(W_h - W_l) + W_l]M_{lab}}{(R_h - R_l)M_{ser}}P_s \quad (1)$$

其中*C*为待测血清样品中的葡萄糖质量浓度,mg/kg;*R_s*、*R_l*、*R_h*分别为血清、低标、高标样品中葡萄糖与标记葡萄糖的峰面积比;*W_h*、*W_l*分别为高标、低标样品中葡萄糖与标记葡萄糖的质量比;*M_{lab}*、*M_{ser}*分别为加入血清样品标记的、待测血清样品中的葡萄糖的质量,g;*P_s*为葡萄糖标准品的纯度,99.8%;

通过测定葡萄糖与标记葡萄糖的峰面积比,计算血清样品中葡萄糖的准确含量。

2 结果与讨论

2.1 血清中葡萄糖含量计算结果

图1、图2列出了血清样品的选择离子扫描色谱图和质谱图,从图1中可以看出,葡萄糖及同位素的保留时间为10.09 min,响应约为1.01×10⁵。

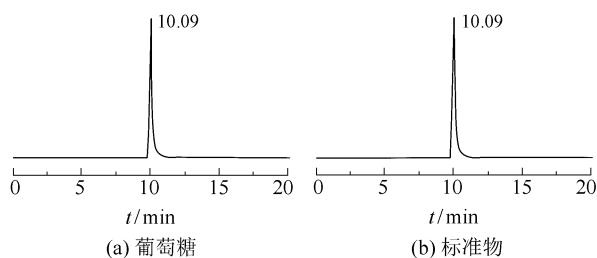


图1 血清样品的选择离子色谱图(*m/z* 314,319)

Fig.1 Gas chromatograms of serum sample with selective ion monitoring (*m/z* 314, 319)

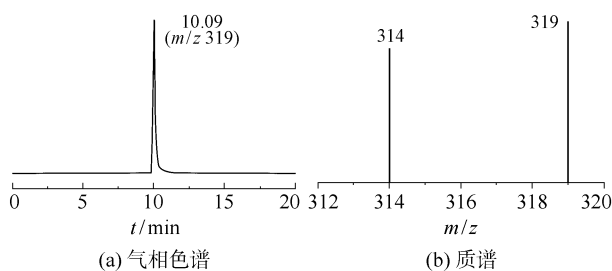


图2 血清样品的气相色谱与质谱图(*m/z* 314,*m/z* 319)

Fig.2 Gas chromatogram and mass spectrum of serum sample (*m/z* 314, *m/z* 319)

表1、表2分别为取5瓶低标和6瓶高标血清样品,每瓶取2个平行样,每个样进2针取平均值。测得低标、高标血糖浓度分别为1150 mg/kg、1396 mg/kg,即9.86 mmol/L、11.97 mmol/L,高于糖尿病所规定浓度下限(7.8 mmol/L),即所测两种样品均为糖尿病人血清。

表 1 样品 1 血清中葡萄糖含量定值结果
Table 1 Analytical results for serum glucose 1 (n = 5)

样品 1	$\rho/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		总相对标准 偏差/%
	平均值	总平均值	
1#	1142.6	1150.5	1.65
2#	1131.3		
3#	1169.4		
4#	1137.1		
5#	1172.0		

表 2 样品 2 血清中葡萄糖含量定值结果
Table 2 Analytical results for serum glucose 2 (n = 6)

样品 2	$\rho/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		总相对标准 偏差/%
	平均值	总平均值	
1#	1377.6	1396.3	2.24
2#	1379.5		
3#	1392.5		
4#	1436.0		
5#	1359.8		
6#	1432.8		

2.2 血清中葡萄糖含量不确定度计算

测量结果的不确定度包括随机因素和非随机因素产生的不确定度,计算结果如表 3 所示。

表 3 血清中葡萄糖含量不确定度计算结果
Table 3 Uncertainties in analytical measurements

不确定度影响因素	低浓度	中间浓度	高浓度
血糖测定均值/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1150.5	1273.4	1396.3
方法精密度和重复性/%	0.19	0.15	0.05
标准品的纯度/%	0.17	0.17	0.17
标准品的称量/%	0.025	0.025	0.025
样品称量/%	0.017	0.02	0.02
标准溶液的称量/%	0.005	0.005	0.005
加入标液标记物溶液量/%	0.005	0.005	0.005
加入样品标记物溶液量/%	0.005	0.005	0.005
标准不确定度/%	0.257	0.229	0.180
绝对标准不确定度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1.86	2.10	2.06
扩展因子	2	2	2
相对扩展不确定度/%	0.51	0.46	0.36
绝对扩展不确定度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	3.69	4.21	4.12

置信概率为 95%;对于低浓度样品其测量的不确定度 = $0.53\%/(9-1)^{1/2} = 0.19\%$;中间和高浓度样品方法测量的不确定度计算方法完全相同

测量结果的不确定度,与如下因素有关:(1) 检测仪器的性能,包括精密度、灵敏度、误差。在实验过程中,质谱性能不稳定常引起结果波动较大,主要体现在样品瓶内偏差呈增大趋势,采用 GC-ID/MS 相对于 LC-ID/MS 更加稳定。(2) 样品前处理过程复杂,化学衍生反应受多种因素影响。为准确检测样品中葡萄糖的含量,需确保样品中的葡萄糖完全被衍生化。(3) 加样的准确性对数据的重复性有直接影响。实验过程中,由于使用高精度的天平称量样品,加样时使用电动移液器,重复性较好,减小了人为操作引起的不准确度。

3 结论

应用气相色谱 - 质谱法对两种不同浓度血清葡萄糖进行定值,测得两种血清浓度分别为 1150.5 mg/kg、1396.3 mg/kg,相对标准偏差分别为 1.65% 和 2.24%,总相对标准偏差完全符合要求。此方法大幅降低了测量结果的不确定度,完善了临床葡萄糖检测溯源的参考系统。

参考文献:

[1] 张胜兰. 糖尿病的诊断标准及分型[J]. 山东医药, 1997, 37(12): 37.
Zhang S L. Diagnosis criteria and typing for diabetes[J]. Shandong Medical Journal, 1997, 37(12): 37. (in Chinese)

[2] Magni F, Paroni R, Bonini P A, et al. Determination of serum glucose by isotope dilution mass spectrometry: Candidate Definitive Method[J]. Clin Chem, 1992, 38(3): 381-385.

[3] 刘文晖, 段学云. 血清葡萄糖测定的方法比较[J]. 实用医技杂志, 2002, 9(6): 424-425.
Liu W H, Duan X Y. Comparison between HK and GOD-POD determination for serum glucose[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2002, 9(6): 424-425. (in Chinese)

[4] 邱辅佑, 马明. 氧速率法测定血清葡萄糖与其他方法的比较[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2004, 22(3): 266-268.
Qiu F Y, Ma M. Comparison of the glucose oxidase-oxygen rate method with the other methods in determining blood sugar[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2004, 22(3): 266-268. (in Chinese)

[5] 屈跃军, 卢占勇, 卢明友. 己糖激酶法与氧化酶法试剂测血糖在生化分析仪上的应用体会[J]. 实用医技

- 杂志, 2005, 12(4): 826 – 847.
- Qu Y J, Lu Z Y, Lu M Y. Hexokinase and oxidase method reagent determine application experience of serum glucose in biochemical analyzer[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2005, 12(4): 826 – 847. (in Chinese)
- [6] Khalil O S. Spectroscopic and clinical aspects of noninvasive glucose measurements[J]. Clin Chem, 1999, 45(2): 165 – 177.
- [7] 张家庆. 血糖及其他体液葡萄糖测定进展[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2003, 19(4): 333.
- Zhang J Q. Progress in the determination of blood glucose and glucose of other body fluids[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2003, 19(4): 333. (in Chinese)
- [8] 戴新华, 齐韬, 杨梦瑞, 等. 血清中葡萄糖含量的测定方法及其研究进展[J]. 化学分析计量, 2008, 17(3): 78 – 80.
- Dai X H, Qi T, Yang M R, et al. Determination methods of glucose in serum and its development[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2008, 17(3): 78 – 80. (in Chinese)
- [9] Hannestad U, Lundblad A. Accurate and precise isotope dilution mass spectrometry method for determining glucose in whole blood[J]. Clin Chem, 1997, 43(5): 794 – 800.
- [10] 全灿, 武利庆, 戴新华, 等. 血清中葡萄糖含量 CCQM K11.1 国际比对[J]. 化学分析计量, 2006, 15(4): 50 – 53.
- Quan C, Wu L Q, Dai X H, et al. CCQM-K11.1 International comparison on the determination of serum glucose[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2006, 15(4): 50 – 53. (in Chinese)

Determination of serum glucose by gas chromatography – mass spectrometry

DING ZhaoTing¹ QUAN Can² JIN JunSu¹ LI HongMei² DAI XinHua² XU Bei²

(1. College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Division of Metrology in Chemistry, National Institute of Metrology, Beijing 100013, China)

Abstract: An accurate and precise method to determine glucose concentration in serum is presented. We use isotope dilution to prepare a glucose standard solution, a $D-[^{13}\text{C}_6]$ standard solution and a mixed solution, with addition of $D-[^{13}\text{C}_6]$ standard solution into serum as an internal standard. The protein was then precipitated by addition of anhydrous ethanol followed by centrifugation, and the supernatant was evaporated to dryness under nitrogen at 50 °C. The glucose and $D-[^{13}\text{C}_6]$ glucose in the sample were converted to derivatives after adding hydroxylamine hydrochloride solution in pyridine and acetic anhydride. Through measuring the peak areas of the high standard mixed solution, the serum sample and the low standard mixed solution by gas chromatography-mass spectrometry, we use the method of bracketing to calculate the content of serum glucose. The low standard and high standard serum glucose concentrations were 1150 mg/kg and 1396 mg/kg with relative standard deviations of 1.65% and 2.24%, respectively, which can substantially reduce the uncertainty of the results obtained.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry; isotope dilution; serum; glucose; fixed value