



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117538458 B

(45) 授权公告日 2024.03.29

(21) 申请号 202410026718.1

(22) 申请日 2024.01.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117538458 A

(43) 申请公布日 2024.02.09

(73) 专利权人 中国医学科学院北京协和医院
地址 100730 北京市东城区王府井帅府园1号

(72) 发明人 郑昕 铁偲 崔馨戈 韩晓红
任建伟

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 李博

(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)

(56) 对比文件

- CN 103575827 A, 2014.02.12
- CN 103764659 A, 2014.04.30
- CN 113376264 A, 2021.09.10
- CN 102584728 A, 2012.07.18
- CN 110715997 A, 2020.01.21
- JP 2011057559 A, 2011.03.24
- 于越 等. 肼基标记试剂在质谱生化分析中的应用. 分析科学学报. 2020, 全文.
- Xue Bai et al.. Rapid and accurate identification of adulterated ingredients in lotus root powder based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and MS-IDF. Journal of Food Composition and Analysis. 2023, 全文.
- 赵先恩 等. 基于化学衍生化的靶向脂质组学质谱分析研究进展. 中国科学: 化学. 2017, (第12期), 全文.

审查员 张钰

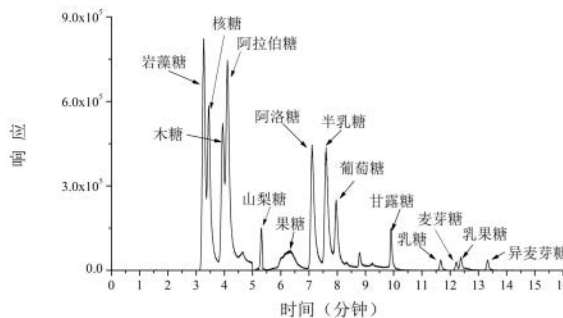
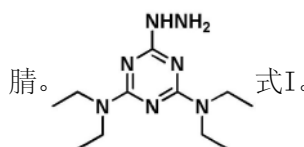
权利要求书2页 说明书15页 附图5页

(54) 发明名称

同时定量分析14种单糖/二糖的液相色谱串联质谱分析方法

(57) 摘要

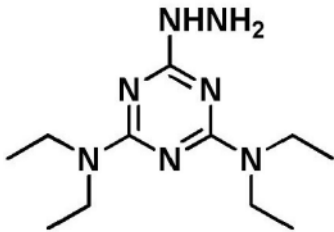
本申请提供了一种利用高效液相色谱-串联质谱联用装置同时定量分析14种糖类化合物的方法, 所述方法包括: 1) 制备含有所述糖类化合物的样品溶液; 2) 使所述样品溶液与具有式I结构的衍生化试剂进行衍生化反应而得到含有衍生化糖类化合物的样品溶液; 3) 将步骤2) 中得到的样品溶液注入到高效液相色谱-串联质谱装置中, 获得质量色谱图; 4) 根据所述质量色谱图使用内标法对所述糖类化合物进行定量分析, 其中所述高效液相色谱中使用由流动相A和流动相B组成的混合流动相进行梯度洗脱, 所述流动相A为含甲酸铵的水-甲醇溶液, 所述流动相B为乙



1. 一种利用高效液相色谱-串联质谱联用装置同时定量分析14种糖类化合物的方法, 所述14种糖类化合物为核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

1) 制备含有所述14种糖类化合物的样品溶液;

2) 使所述样品溶液与具有式I结构的衍生化试剂进行衍生化反应而得到含有衍生化糖类化合物的样品溶液;



式I

3) 将步骤2) 中得到的所述含有衍生化糖类化合物的样品溶液注入到高效液相色谱-串联质谱装置中, 获得质量色谱图;

4) 根据所述质量色谱图使用内标法对所述14种糖类化合物进行定量分析,

其中, 所述高效液相色谱中使用由流动相A和流动相B组成的混合流动相进行梯度洗脱, 所述流动相A为含1 mmol/L至20 mmol/L甲酸铵的水-甲醇溶液, 所述流动相A中的水与甲醇的体积比在2:1至4:1的范围内, 所述流动相B为乙腈, 并且所述梯度洗脱程序为:

0.00至2.00分钟, 95体积%至95体积%流动相B;

2.00至5.00分钟, 95体积%至93体积%流动相B;

5.00至13.00分钟, 93体积%至75体积%流动相B;

13.00至13.1分钟, 75体积%至95体积%流动相B;

13.10至16.00分钟, 95体积%至95体积%流动相B,

其中流动相A和流动相B的总量为100体积%, 并且其中所述高效液相色谱中的色谱柱为酰胺色谱柱。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述流动相A的pH在4.0至6.0的范围内。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述衍生化反应在30℃至45℃范围内的温度进行30分钟至4小时的时间。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述高效液相色谱中的色谱柱为以亚乙基桥杂化颗粒技术填充的色谱柱。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述14种糖类化合物来自庞贝病模型小鼠的血浆或血清。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述制备含有所述14种糖类化合物的样品溶液包括: 向10 μL的庞贝病模型小鼠的血浆或血清中加入10 μL内标物, 然后加入100 μL的浓度为2 mg/mL的所述衍生化试剂并混合均匀, 在37℃下反应4小时后加入100 μL水混合均匀, 用200 μL二氯甲烷萃取清洗两次, 每次去除底层有机相, 留水相, 最后, 加入6倍体积乙腈, 混合均匀。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述内标物为¹³C₆-葡萄糖和¹³C₁₂-麦芽糖。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述衍生糖类化合物的去簇电压在50至200 V的范围内,并且碰撞能量在20至60 eV的范围内。

同时定量分析14种单糖/二糖的液相色谱串联质谱分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学和分析化学领域,具体而言,涉及一种基于新型衍生化试剂利用高效液相色谱-串联质谱联用技术同时定量分析14种单糖/二糖即核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖的方法。

背景技术

[0002] 液相色谱-质谱分析法主要应用于药物代谢、药物动力学、临床药理学、天然药物开发等领域。其具有高灵敏度、高特异性、重现性好、定量准确、线性范围宽、数据处理简单等优点。高效液相色谱能够有效地将待测物的成分分离开,而质谱能够对分开的成分逐个地进行定性定量分析。液相色谱-质谱分析法是利用试样各组分在色谱柱中的流动相和固定相间的分配和吸附系数不同,由流动相把试样带入色谱柱中进行分离后,经接口装置,不同的离子碎片在不同的电场和/或磁场的运动行为不同,质量分析器把电离子按质荷比(m/z)分开,得到依质量顺序排列的质谱图。通过对质谱图的分析处理,可以得到样品的定性、定量分析结果。

[0003] 糖类又称碳水化合物,是除脂类、蛋白质和核酸外,世界第四大类生物分子,种类繁多,广泛分布于动物、植物和微生物中。糖类几乎在所有生物体中都扮演着重要的角色,是正常生命活动的重要物质基础[1]。根据分子的大小,糖类包括单糖,二糖,低聚糖和多糖。单糖是糖的最基本单位,不能水解成更小的碳水化合物。单糖可以直接被人体消化吸收,低聚糖和多糖必须消化成较小分子,然后消化成二糖,最后消化成单糖才能被人体吸收。在体内,单糖/二糖参与糖蛋白和糖脂的构建,并作为终末修饰参与生命活动。此外,单糖/二糖还参与碳水化合物代谢,维持血糖稳态和新陈代谢,并为基质提供能量,而细胞代谢功能障碍可能会改变单糖的消耗或产生。同时,一些单糖/二糖已被研究具有抗菌和抗肿瘤生理功能[1]。因此,单糖/二糖对于保持生物正常运作的生理过程至关重要。人类和动物可以吸收和利用多种单糖/二糖成分,主要有葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖和核糖,以及部分二糖如乳糖、乳果糖和麦芽糖等[1-3]。在体内,不同的细胞对单糖/二糖具有不同的敏感性。当细胞代谢功能受损时,单糖/二糖的体内水平可能会改变[1]。因此,单糖/二糖的水平可以反映身体的生理和病理状态,作为生物标志物对于疾病进展研究具有重要的意义。

[0004] 庞贝病(Pompe disease),是一种罕见病,位于我国第一批罕见病目录第35位,发病率约为1:40000。庞贝病是由GAA酶缺陷引起的糖原代谢障碍性疾病,体内单糖/二糖的水平可能会发生特征性改变[4, 5]。因此,特异性地区分体内某一种单糖或者二糖水平可能为该疾病的基础研究提供另一种思路,准确可靠地测定生物样品中单糖/二糖异构体化合物的浓度非常重要。

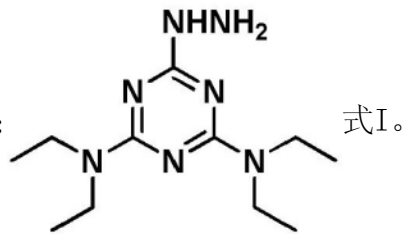
[0005] 尽管目前已经开发了用于检测单糖的光谱法[6]和酶法[7],但高效液相色谱-串联质谱(High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-

MS/MS)法是目前复杂生物基质中多组分定量的首选方法。但目前的检测手段面临如下问题:1)糖类物质极性高,与色谱柱填料相互作用较弱,在色谱中较难保留;2)糖类物质结构中易电离基团的缺乏大大降低了MS分析的灵敏度,使得在生物基质中检测限较差;3)糖类物质多为差相异构体,色谱分离较难。同时,糖类物质的端基差向异构体(Anomer)会导致峰分裂或分离使得糖类物质色谱行为更为复杂,增加了异构体分离的难度。

[0006] 使用柱前衍生化策略能够有效解决色谱保留和电离效率等问题。目前,已报道了多种柱前衍生化LC-MS/MS方法用于同时检测多种单糖,使用的衍生化试剂包括1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP) [8]和3-硝基苯肼[9]。然而,在这些技术中还存在着一些问题,首先,使用PMP进行衍生条件需要70 °C,这对于不稳定的糖类物质是不利的,所以这些方法的灵敏度没有得到很大的提高。在50 μL样本中其定量下限在500 ng/mL左右,难以满足微量生物样品分析的需求。其次,衍生化试剂的结构无法放大单糖或者双糖异构体本身的结构差异,对单糖和多糖异构体的分离度提升没有显著提高。

[0007] 中国专利CN102584728A公开了一类基于三嗪结构的糖标记试剂及其合成方法和应用,并且具体公开了一种新型胍类衍生化试剂:2,4-双(二乙基氨基)-6-胍基-1,3,5-三

嗪(T3),其具有以下式I的结构:



[0008] 然而,CN102584728A仅公开了T3试剂在毛细管电泳-质谱联用技术中用于标记多糖(具体为多聚葡萄糖)的应用。

[0009] 因此,本领域亟需一种简便、高效、高灵敏度的同时定量分析样品中的多种单糖/多糖异构体的方法。

发明内容

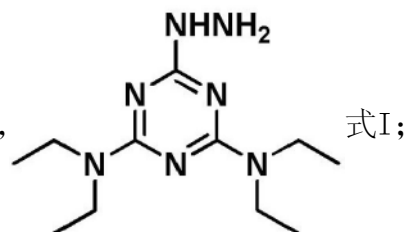
[0010] 本发明目的在于提供一种同时定量分析核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖的方法。

[0011] 鉴于此,本发明提供了一种利用高效液相色谱-串联质谱联用装置同时定量分析14种糖类化合物的方法,所述14种糖类化合物为核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖,所述方法包括以下步骤:

[0012] 1) 制备含有所述14种糖类化合物的样品溶液;

[0013] 2) 使所述样品溶液与具有式I结构的衍生化试剂进行衍生化反应而得到含有衍

生化糖类化合物的样品溶液,



[0014] 3) 将步骤2) 中得到的所述含有衍生化糖类化合物的样品溶液注入到高效液相色谱-串联质谱装置中,获得质量色谱图;

[0015] 4) 根据所述质量色谱图使用内标法对所述14种糖类化合物进行定量分析,

[0016] 其中,所述高效液相色谱中使用由流动相A和流动相B组成的混合流动相进行梯度洗脱,所述流动相A为含1 mmol/L至20 mmol/L甲酸铵的水-甲醇溶液,所述流动相B为乙腈,并且所述梯度洗脱程序为:

[0017] 0.00至2.00分钟,95体积%至95体积%流动相B;

[0018] 2.00至5.00分钟,95体积%至93体积%流动相B;

[0019] 5.00至13.00分钟,93体积%至75体积%流动相B;

[0020] 13.00至13.1分钟,75体积%至95体积%流动相B;

[0021] 13.10至16.00分钟,95体积%至95体积%流动相B,

[0022] 其中流动相A和流动相B的总量为100体积%。

[0023] 在一些实施方案中,所述流动相A中的水与甲醇的体积比在2:1至4:1的范围内。

[0024] 在一些实施方案中,所述流动相A的pH在4.0至6.0的范围内,并且优选地在4.5至6.0的范围内。优选地,所述流动相A的pH使用甲酸进行调节。

[0025] 在一些实施方案中,所述衍生化反应的温度在30°C至45°C的范围内,优选地在35°C至40°C的范围内,并且所述衍生化反应的时间在30分钟至6小时的范围内,优选地在3小时至5小时的范围内。

[0026] 在一些实施方案中,所述高效液相色谱中的色谱柱为酰胺色谱柱,并且优选为以亚乙基桥杂化颗粒技术填充的色谱柱。

[0027] 在一些实施方案中,所述14种糖类化合物来自庞贝病模型小鼠的血浆或血清。

[0028] 在一些实施方案中,所述制备含有所述14种糖类化合物的样品溶液包括:向10 μ L的庞贝病模型小鼠的血浆或血清中加入10 μ L内标物,然后加入100 μ L的浓度为2 mg/mL的所述衍生化试剂并混合均匀,在37°C下反应4小时后加入100 μ L水混合均匀,用200 μ L二氯甲烷萃取清洗两次,每次去除底层有机相,留水相,最后,加入6倍体积乙腈,混合均匀。

[0029] 在一些实施方案中,所述内标物为 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖和 $^{13}\text{C}_{12}$ -麦芽糖。

[0030] 在一些实施方案中,所述衍生化糖类化合物的去簇电压DP在50至200 V的范围内,并且所述衍生化糖类化合物的碰撞能量CE在20至60 eV的范围内。

[0031] 优选地,所述衍生化糖类化合物的去簇电压DP为80 V。

[0032] 优选地,衍生化的岩藻糖的碰撞能量CE为40 eV;衍生化的阿拉伯糖、核糖和木糖的碰撞能量CE为40 eV;衍生化的乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖的碰撞能量CE为55 eV;衍生化的山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖的碰撞能量CE为40 eV。

[0033] 在一些实施方案中,其中衍生化的 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖的去簇电压DP在50至200 V的范围内,优选为80 V,并且衍生化的 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖的碰撞能量CE在20至60 eV的范围内,优选为40 eV。

[0034] 在一些实施方案中,其中衍生化的 $^{13}\text{C}_{12}$ -麦芽糖的去簇电压DP在50至200 V的范围内,优选为80 V,并且衍生化的 $^{13}\text{C}_{12}$ -麦芽糖的碰撞能量CE在20至60 eV的范围内,优选为55 eV。

[0035] 本申请的发明人出人意料地发现,利用具有式I结构的衍生化试剂对单糖和双糖

异构体进行衍生化,消除了单糖和双糖的端基差向异构体导致的峰展宽或分离,对3种五碳单糖异构体,6种6碳单糖异构体和4种双糖异构体和1种岩藻糖实现了完全色谱分离。此外,通过该衍生化过程还增加了单糖和双糖的色谱保留和离子化效率,而且甚至允许在37 °C的温和条件下进行衍生化。因此,本发明通过新型衍生化试剂实现了单糖和双糖质谱检测更高的响应,更好的样本稳定性以及更简便的前处理方式。

[0036] 与现有技术相比,本发明基于新型衍生化试剂利用高效液相色谱-串联质谱联用技术同时分离并且定量分析了14种单糖和二糖化合物,即核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖。本发明的方法具有灵敏度高,分离度好,稳定性好,特异性强和数据重现性强等优点,具有较高的实用性和可靠性。此外,本发明的检测效率高,能够在庞贝病模型小鼠的血浆和血清中准确、高灵敏度地定量这14种单糖和二糖化合物,从而满足庞贝病生物标志物研究的需求。

附图说明

[0037] 为了更清楚地说明本发明的技术方案,下面将对实施方案描述中所使用的附图作简单地介绍。

[0038] 图1为基于新型衍生化试剂得到的核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖衍生物的代表性色谱图。

[0039] 图2为T3试剂衍生化条件优化图,其中(a)为葡萄糖,(b)为麦芽糖。

[0040] 图3为样本中的核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖衍生物的色谱图。

[0041] 图4为对比例中未衍生化的五碳糖、六碳糖、双糖和岩藻糖通道中色谱图,(a)为五碳单糖,(b)为六碳单糖,(c)为双糖,(d)为岩藻糖。

[0042] 图5-1和图5-2为对比例中未衍生化的14种单/双糖在各自通道中色谱图,(a)为阿拉伯糖,(b)为阿洛糖,(c)为甘露糖,(d)为果糖,(e)为核糖,(f)为麦芽糖,(g)为木糖,(h)为葡萄糖,(i)为乳果糖,(j)为乳糖,(k)为山梨糖,(l)为异麦芽糖,(m)为岩藻糖,(n)为半乳糖。

具体实施方式

[0043] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本公开一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0044] 在下面给出本发明的技术方案的具体实施例,但本领域技术人员能够理解,以下具体实施例仅是实施本发明的多种方案中的一部分示例,它们不应被理解为以任何方式限制本发明的范围。

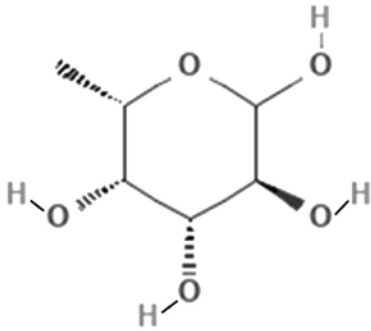
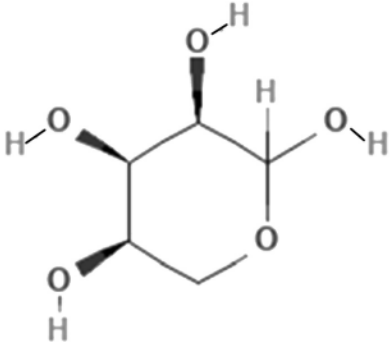
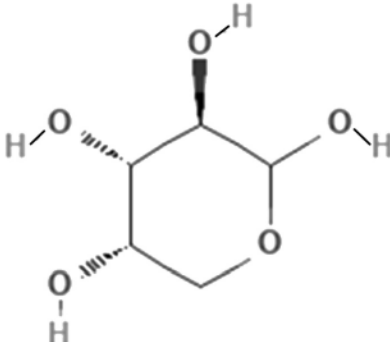
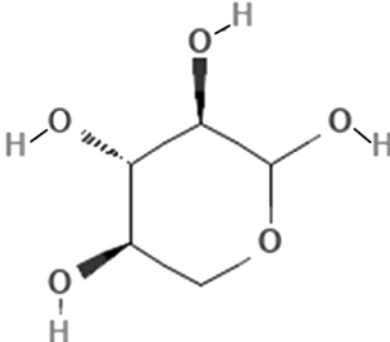
[0045] 通过本发明的方法,能够同时对14种糖类化合物(即核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖)进行准确定量分析。在这14种糖类化合物中,岩藻糖是脱氧六碳糖,阿拉伯糖、核糖和木糖是互为同分异构体的五碳糖,山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖是互为同分异构体

的六碳糖。以上糖类化合物均为单糖化合物。此外,乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖是互为同分异构体的二糖化合物。

[0046] 在以下表1中列出这14种糖类化合物的分子式、分子量和结构。

[0047] 由下表可以看出,这些糖类化合物彼此之间结构非常相似,因此通过常规的分析方法通常难以完全分离并且同时进行定量分析。

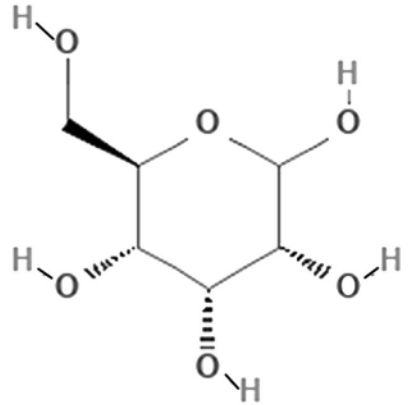
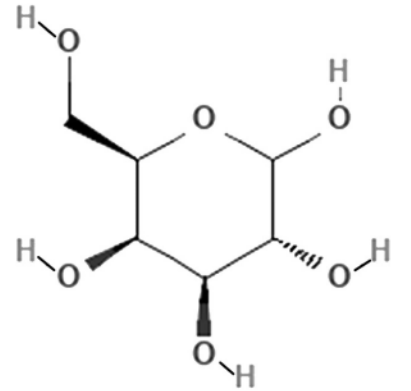
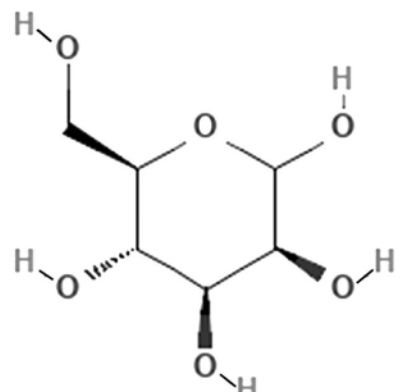
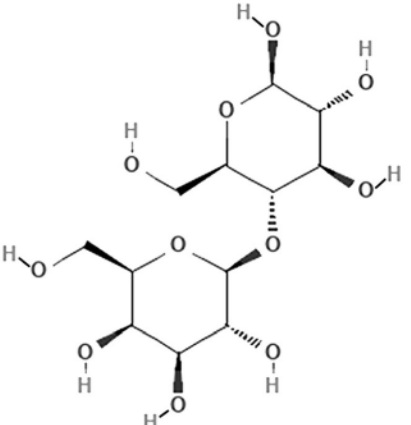
[0048] 表1:14种糖类化合物的分子式、分子量和结构

名称	分子式	分子量	结构式
岩藻糖	$C_6H_{12}O_5$	164.16	
核糖	$C_5H_{10}O_5$	150.13	
阿拉伯糖	$C_5H_{10}O_5$	150.13	
木糖	$C_5H_{10}O_5$	150.13	

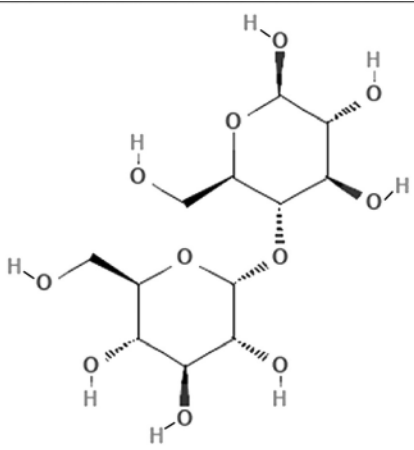
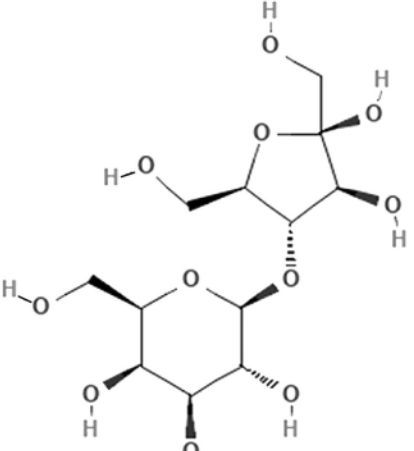
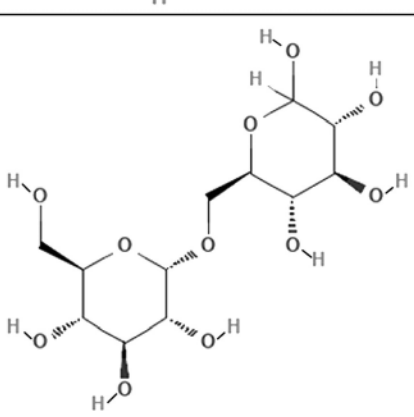
[0049]

葡萄糖	$C_6H_{12}O_6$	180.16	
山梨糖	$C_6H_{12}O_6$	180.16	
果糖	$C_6H_{12}O_6$	180.16	

[0050]

阿洛糖	$C_6H_{12}O_6$	180.16	
半乳糖	$C_6H_{12}O_6$	180.16	
甘露糖	$C_6H_{12}O_6$	180.16	
乳糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	

[0051]

	麦芽糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	
[0052]	乳果糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	
	异麦芽糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	

[0053] 实施例所使用的试剂及原料如下：

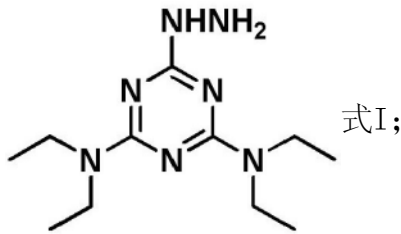
[0054] 木糖、核糖、阿拉伯糖购自CATO Research Chemicals Inc (尤金市,美国)；

[0055] 果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、乳果糖和岩藻糖购自中国食品药品检定研究院(北京市,中国)；

[0056] 阿洛糖、山梨糖和异麦芽糖购自坛墨质检科技股份有限公司(常州市,中国)；

[0057] $^{13}C_6$ -葡萄糖和 $^{13}C_{12}$ -麦芽糖购自Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (图克斯伯里,美国)；

[0058] 具有式I结构的衍生化试剂按照CN102584728A中记载的方法合成，



[0059] 甲醇、乙腈 (HPLC级, Honeywell, 美国)、甲酸 (分析纯, Sigma, 美国)、甲酸铵 (化学纯, Sigma公司, 美国) 均商购获得;

[0060] 若无特别说明, 在实验过程中使用的纯净水均由Milli-Q水纯化系统 (Millipore公司, Mosheim市, 法国) 制备而成。

[0061] 实施例所采用的仪器如下:

[0062] LC-30AD 高效液相色谱系统 (Shimadzu公司, 日本);

[0063] 串联质谱仪为Qtrap 5500系统 (Sciex公司, 美国)。

[0064] 实施例1: 根据本发明的衍生化的14种糖类化合物的定量分析

[0065] 本实施例说明了基于新型衍生化试剂结合高效液相色谱-串联质谱联用技术对上述14种糖类化合物 (核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖) 的定量分析。

[0066] 溶液配制: 分别精密称量上述14种糖类化合物、 $^{13}\text{C}_6$ -葡萄糖 (单糖内标物) 和 $^{13}\text{C}_{12}$ -麦芽糖 (二糖内标物) 并使用甲醇溶解, 配制为1 mg/mL浓度的糖类化合物溶液。再使用稀释液 (甲醇与水的体积比=1:1) 将1 mg/mL浓度的糖类化合物溶液稀释为1 μg /mL的糖类化合物溶液。精密称量具有式I结构的衍生化试剂, 并使用甲醇溶解, 配制为2 mg/mL浓度的衍生化试剂溶液。

[0067] 衍生化过程: 向10 μL 以上制备的各糖类化合物溶液中加入100 μL 的上述衍生化试剂溶液, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应4小时, 然后加入100 μL 超纯水, 用二氯甲烷萃取清洗两次 (每次留上清), 最后取上清加入6倍体积的乙腈混合均匀, 得到衍生化糖类化合物溶液。

[0068] 取10 μL 各衍生化糖类化合物溶液, 注入高效液相色谱的色谱柱中, 通过本发明的方法, 得到各糖类化合物的代表性色谱图 (图1)。

[0069] 由图1可见, 通过本发明的方法, 能够实现所述14种糖类化合物的完全分离和同时定量分析。

[0070] 在优化后的衍生化条件下, 核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖通过本发明的方法能够显著提高灵敏度。作为示例, 图2示出了关于葡萄糖 (a) 和麦芽糖 (b) 的实验, 其中分别考察了在不同温度和反应时间下的信号响应。根据图2所示, 分析物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应4小时后的响应与在45 $^{\circ}\text{C}$ 下反应4小时效果相当, 但温度过高可能造成分析物的分解, 因此在实施例中最终采用在37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应4小时的条件。

[0071] 分析物衍生后的响应与衍生前相比大大提升, 具体见以下表2。

[0072] 表2 分析物衍生前后响应对比

	分析物	衍生前 (响应)	衍生后 (响应)	提升 (倍)
[0073]	麦芽糖	1.0×10^4	7.0×10^5	70
	葡萄糖	8.0×10^3	3.0×10^5	37.5

[0074] 高效液相色谱条件:

[0075] 色谱柱:Acquity UPLC® BEH Amide柱,规格为:1.7 μm 2.1 \times 100 mm

[0076] 流动相:流动相A (10 mmol/L甲酸铵的水-甲醇溶液(水与甲醇的体积比为2:1,且用甲酸调节pH为5.5))和流动相B (乙腈)

[0077] 梯度洗脱程序:

[0078] 0.00至2.00分钟,95体积%至95体积%流动相B;

[0079] 2.00至5.00分钟,97体积%至93体积%流动相B;

[0080] 5.00至13.00分钟,93体积%至75体积%流动相B;

[0081] 13.00至13.1分钟,75体积%至95体积%流动相B;

[0082] 13.10至16.00分钟,95体积%至95体积%流动相B,

[0083] 其中流动相A和流动相B的总量为100体积%。

[0084] 流速:0.4 mL/min

[0085] 柱温:40°C

[0086] 自动进样器温度:10°C

[0087] 进样体积:5 μL

[0088] 所述串联质谱的工作参数在以下表3中示出。

[0089] 表3:串联质谱的工作参数

质谱条件		参数	
质谱仪		API 5500	
离子化接口		TurboIonSpray®	
温度		550°C	
气体 1 (氮气)		55 psi	
气体 2 (氮气)		55 psi	
气帘气(氮气)		35 psi	
碰撞气(氮气)		7 psi	
离子喷雾电压		5500 V	
[0090]	MS/MS 前体>监测的产物离子	岩藻糖衍生物	m/z 400.4 -> 254.1 m/z 400.4 -> 239.1
		阿拉伯糖、核糖和木糖衍生物	m/z 386.4 -> 254.1 m/z 386.4 -> 239.1
		乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖衍生物	m/z 578.4 -> 254.1 m/z 578.4 -> 239.1
		山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖衍生物	m/z 416.4 -> 254.1 m/z 416.4 -> 239.1
		¹³ C ₆ -葡萄糖衍生物	m/z 422.4 -> 260.1 m/z 422.4 -> 245.1
		¹³ C ₁₂ -麦芽糖衍生物	m/z 590.4 -> 260.1 m/z 590.4 -> 245.1
		岩藻糖衍生物	80
		阿拉伯糖、核糖和木糖衍生物	80
		乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖衍生物	80
		山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖衍生物	80
		¹³ C ₆ -葡萄糖衍生物	80
		¹³ C ₁₂ -麦芽糖衍生物	80
去簇电压 DP			

		岩藻糖衍生物	40
		阿拉伯糖、核糖和木糖衍生物	40
	碰撞能量 CE	乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖衍生物	55
		山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖衍生物	40
		¹³ C ₆ -葡萄糖衍生物	40
		¹³ C ₁₂ -麦芽糖衍生物	55
		岩藻糖衍生物	13
		阿拉伯糖、核糖和木糖衍生物	13
[0091]	碰撞室出口电压 CXP	乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖衍生物	13
		山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖衍生物	13
		¹³ C ₆ -葡萄糖衍生物	13
		¹³ C ₁₂ -麦芽糖衍生物	13
		岩藻糖衍生物	10
		阿拉伯糖、核糖和木糖衍生物	10
	入口电压 EP	乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖衍生物	10
		山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖衍生物	10
		¹³ C ₆ -葡萄糖衍生物	10
		¹³ C ₁₂ -麦芽糖衍生物	10

[0092] 实施例二：方法学验证

[0093] 本实施例说明了庞贝病模型小鼠的血浆和血清中的所述14种糖类化合物的定量分析方法的方法学验证。

[0094] 混合内标工作液的配制：分别取¹³C₆-葡萄糖和¹³C₁₂-麦芽糖的1 mg/mL母液10 μL加入980 μL甲醇-水（体积比：1:1）并混匀，然后取20 μL加入980 μL甲醇-水（体积比：1:1）混匀，制成混合内标工作液（200 ng/mL）。

[0095] 衍生化试剂溶液的配制：精密称量具有式I结构的衍生化试剂，并使用甲醇溶解，配制为2 mg/mL浓度的衍生化试剂溶液。

[0096] 样本制备方法：

[0097] 取10 μL庞贝病模型小鼠的血浆或血清（其含有所述14种糖类化合物），加入10

mL混合内标工作液(200 ng/mL),混匀后加入100 μ L衍生化试剂溶液(2 mg/mL),涡旋混匀10秒,37°C反应4小时后加入100 μ L超纯水,涡旋混匀10秒,加入200 μ L二氯甲烷,涡旋混匀30秒,以17000 g离心1分钟后取上清,将以上步骤重复一次,最后取150 μ L上清液加入900 μ L乙腈,涡旋混匀10秒,最后取5 μ L进样。

[0098] 采用本发明提供的分析方法,使用内标法进行定量分析。对方法的选择性、标准曲线、定量下限、精密度和准确度、基质效应和稳定性进行了验证,详细结果见表4。

[0099] 表4. 14种糖类化合物的线性范围

序号	化合物	离子化	线性范围 (ng/mL)	相关系数(R^2)	检测基质
1	核糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
2	阿拉伯糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
3	木糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
4	山梨糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
5	果糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
6	阿洛糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
7	半乳糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
8	葡萄糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
9	甘露糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
10	岩藻糖	+	1-10000	0.99	血浆, 血清
11	乳糖	+	20-10000	0.99	血浆, 血清
12	麦芽糖	+	20-10000	0.99	血浆, 血清
13	乳果糖	+	20-10000	0.99	血浆, 血清
14	异麦芽糖	+	20-10000	0.99	血浆, 血清

[0101] 本发明方法的各项性能参数均满足相关要求,通过本发明的方法定量的14种单糖/二糖在各自的线性范围内线性良好,精准度高,重现性好,基质干扰小,灵敏度高,分离度好,选择性高,无残留影响。因此,本发明的方法具有较高的实用性和可靠性。

[0102] 实施例三:庞贝病生物标志物研究

[0103] 本实施例说明了将该方法应用于庞贝病生物标志物研究。

[0104] 收集庞贝病模型小鼠的血清和血浆样本。样本收集后置于-80°C冰箱中,在一个月內完成分析。

[0105] 采用本发明所提供的预处理方法,基于新型衍生化试剂利用高效液相色谱-串联质谱联用技术的定量分析方法分析庞贝病模型小鼠血清和血浆中的核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖浓度,以探索这14种单糖/二糖作为庞贝病新型生物标志物的可能性,从而可能为庞贝病药效学评估提供依据。样本中14种单糖/二糖的代表性色谱图见图3。

[0106] 本发明的方法是一种多分析物分析方法,在一次运行中可同时定量14种单糖/二糖。在本发明的方法中,采用新型衍生化试剂和二氯甲烷萃取法制备庞贝病模型小鼠的血清和血浆样本溶液,可大大提高方法的分离度和灵敏度。首先,从图1中可以看出,14种单糖/二糖经过衍生化后在选定的色谱柱中均可实现基线分离,减少分析物之间的干扰。其

次,新型衍生化试剂可将14种单糖/二糖的定量下限由未经过衍生的500 ng/mL (50 μ L样本)降至1-20 ng/mL (10 μ L样本),极大地增加了微量样本检测的灵敏度。另外,本方法未观察到任何分析物残留,无需在相邻样本之间注入空白样本减少干扰。最后,本方法适用于两种基质中14种单糖/二糖浓度的检测,这对于探索庞贝病新型生物标志物是非常有意义的。

[0107] 对比例:未衍生化的14种糖类化合物的分析

[0108] 本对比例说明了通过色谱-串联质谱联用技术对未衍生化的14种糖类化合物(核糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、山梨糖、果糖、阿洛糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、乳果糖和异麦芽糖)的分析。图4示出了未衍生化的14种糖类化合物在五碳糖、六碳糖、双糖和岩藻糖通道中的色谱图,图5-1和图5-2示出了未衍生化的14种糖类化合物在各自通道中的色谱图。

[0109] 通过将实施例1的结果与本对比例的结果进行比较可以看出,单糖/双糖色谱行为明显改善。由图4和图5-1和图5-2可以看出,非衍生化的单糖/双糖在各自的通道中存在两个及以上的色谱峰,同时色谱峰峰形较差,灵敏度较低。在五碳糖、六碳糖、双糖和岩藻糖的总离子色谱图中,虽然存在多个色谱峰,但这些色谱峰是各个单/双糖色谱峰叠加,不具有特异性。而在衍生化后,各个单/双糖仅存在一个色谱峰,且这些色谱峰响应高,灵敏度好(参见图1)。这说明在本发明中利用衍生化试剂消除了糖类物质在色谱中产生的端基差向异构体,简化糖类物质的色谱行为,增加了多种单糖和双糖异构体的分离效果。

[0110] 总之,本研究开发的方法在色谱分离度、分析灵敏度和分析效率方面显示出巨大的优势。

[0111] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本公开揭露的技术范围内,可轻易想到变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

[0112] 参考文献

[0113] [1] Wang H, Zhang X, Peng Y, et al. A LC-MS/MS method to simultaneously profile 14 free monosaccharides in biofluids [J]. *Journal of Chromatography B*, 2022, 1192: 123086.

[0114] [2] Okutucu B, Önal S. Molecularly imprinted polymers for separation of various sugars from human urine [J]. *Talanta*, 2011, 87: 74-79.

[0115] [3] Peelen G O H, de Jong J G N, Wevers R A. High-performance liquid chromatography of monosaccharides and oligosaccharides in a complex biological matrix [J]. *Analytical biochemistry*, 1991, 198(2): 334-341.

[0116] [4] Rozaklis T, Ramsay S L, Whitfield P D, et al. Determination of oligosaccharides in Pompe disease by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Clinical chemistry*, 2002, 48(1): 131-139.

[0117] [5] Da Silva A. Glycovecteurs pour le ciblage thérapeutique d'une maladie rare lysosomale: la maladie de Pompe [D]. Montpellier, 2017.

[0118] [6] Mopper K, Dawson R, Liebezeit G, et al. The monosaccharide spectra of natural waters [J]. *Marine Chemistry*, 1980, 10(1): 55-66.

[0119] [7] Hjelm M, Verdier C H. A methodological study of the enzymatic determination of glucose in blood [J]. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, 1963, 15(4): 415-428.

[0120] [8] Li M, Li P, Ji Y, et al. Precolumn derivatization LC-MS/MS method to simultaneous quantitation of 10 monosaccharides in rat plasma. J Pharm Biomed Anal. 2023 Sep 20; 234:115537.

[0121] [9] Han, Jun, et al. Quantitation of low molecular weight sugars by chemical derivatization-liquid chromatography/multiple reaction monitoring/mass spectrometry. Electrophoresis 37.13 (2016): 1851-1860.

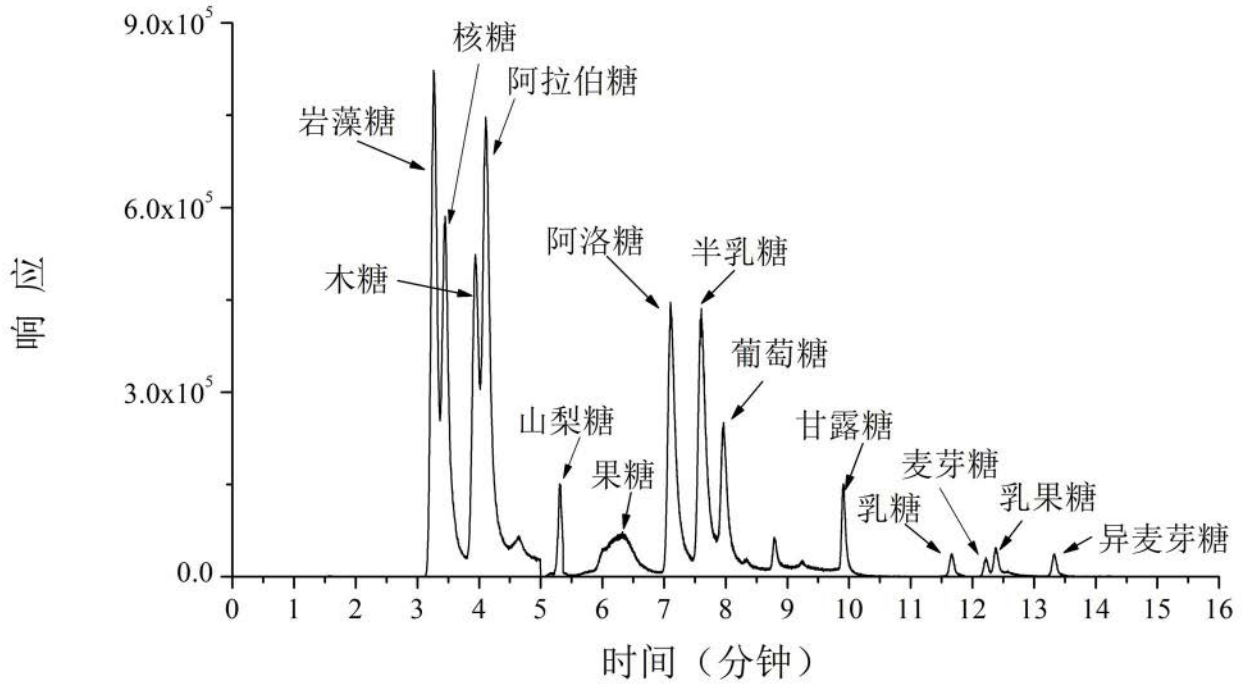


图 1

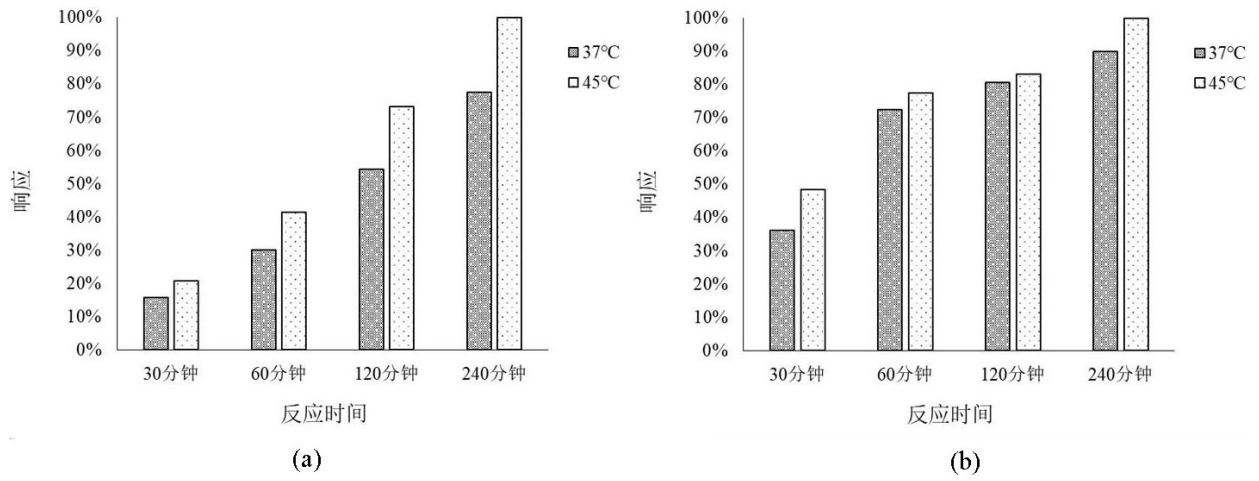


图 2

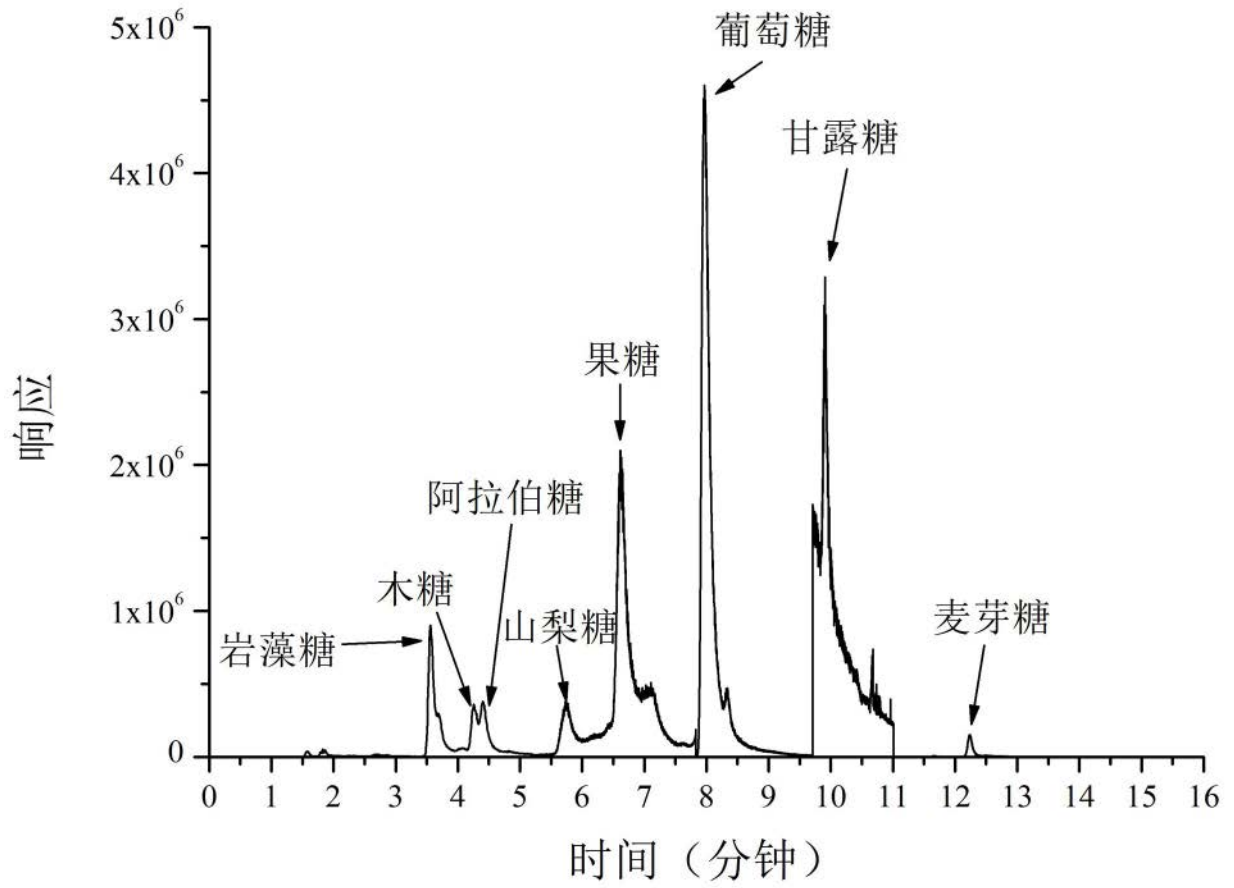


图 3

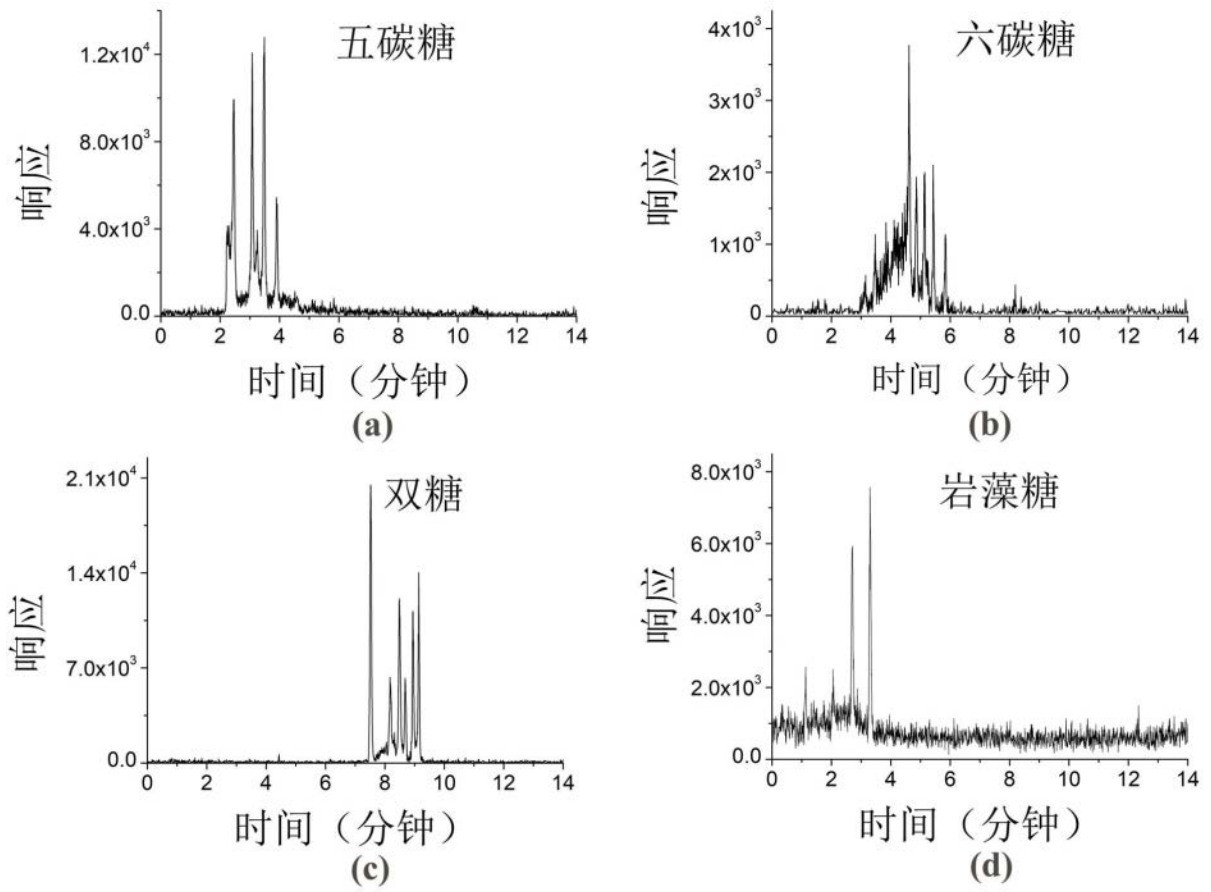


图 4

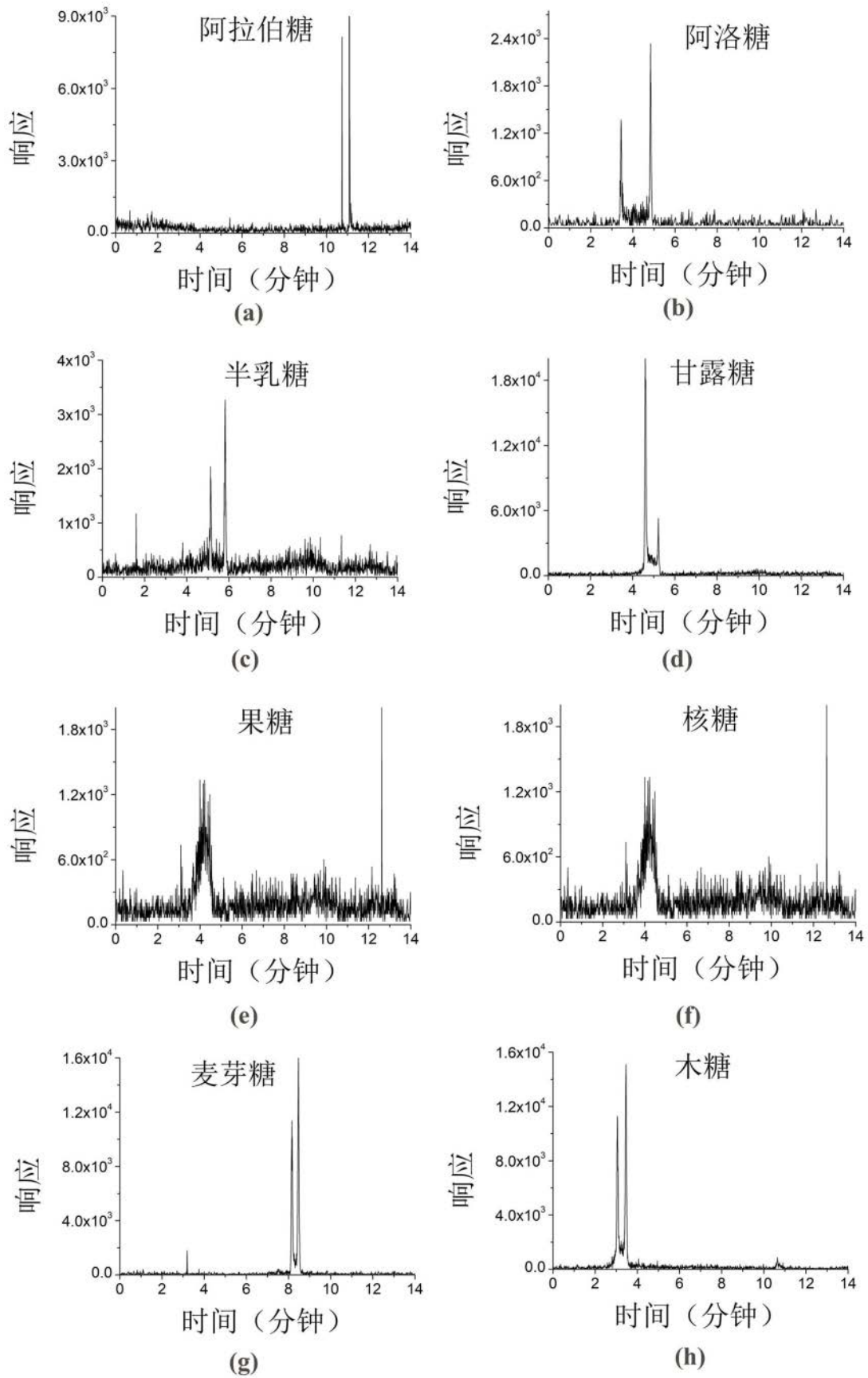


图 5-1

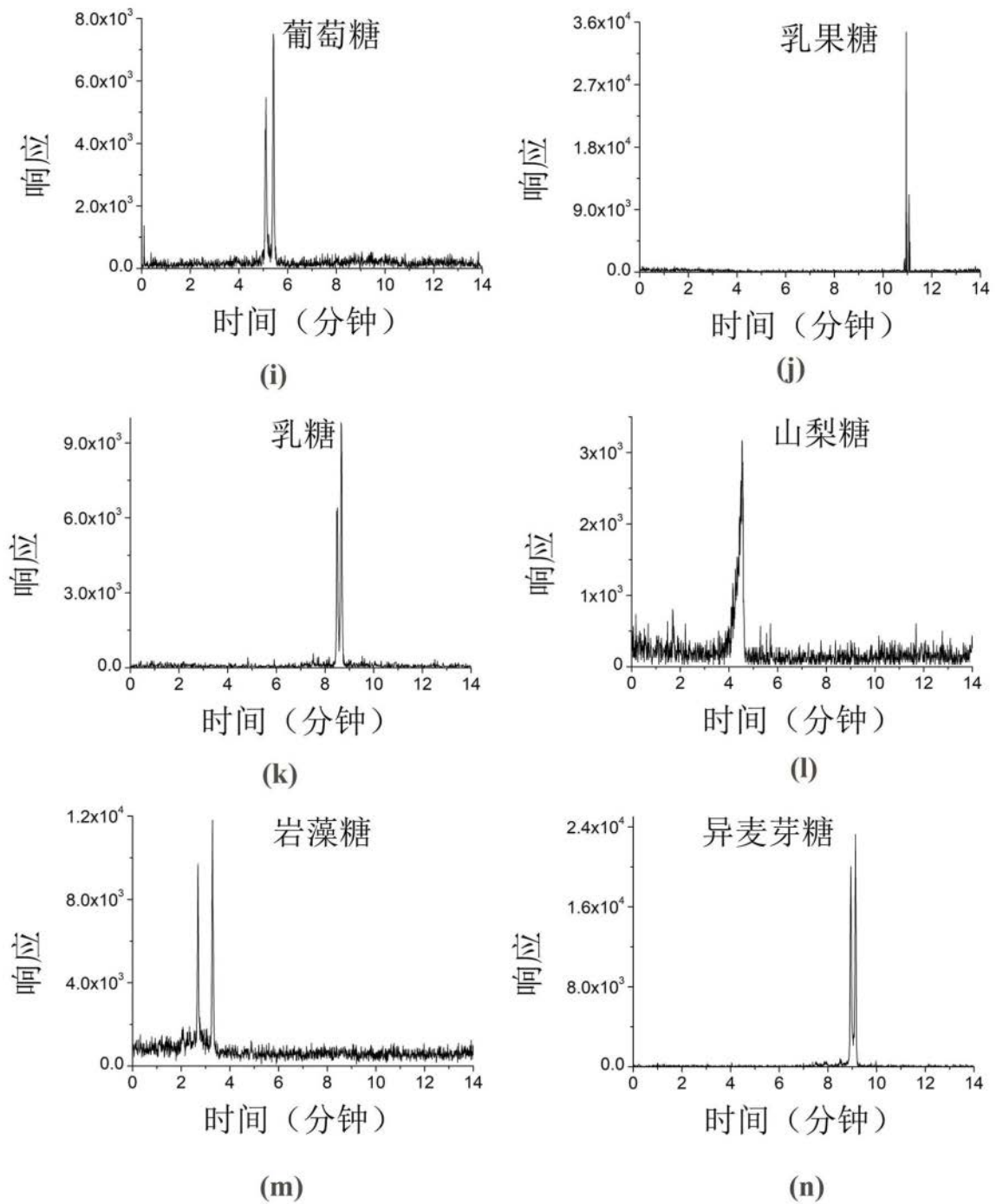


图 5-2