

血浆 1,5-脱水葡萄糖醇的 UPLC-TQMS 定量方法研究

瞿 纯,葛 坤,管朝慧,马晓静,包玉倩,贾 伟,赵爱华

[摘要] 目的 建立超高效液相色谱串联三重四级杆质谱 (ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-TQMS) 定量血浆中 1,5-脱水葡萄糖醇 (1,5-anhydroglucitol, 1,5-AG) 的方法。方法 采用乙腈:甲醇 (8:2, v:v) 对样本进行除蛋白处理后直接进行色谱分离,在负离子的多反应监测模式下,对 1,5-AG 进行定量。结果 在 6 min 内即可实现定量检测。1,5-AG 在 1~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呈良好的线性关系,回归相关系数为 0.998 8,检出限和定量限分别为 0.002 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$,重复性为 3.85%~6.08%;日内与日间精密度的相对标准偏差 (relative standard deviation, *RSD*) 分别为 3.77% 和 7.76%;1,5-AG 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存 1 周内的稳定性的 *RSD* 为 2.51%~4.24%,准确度为 97.28%~99.98%,*RSD* 为 2.72%~6.53%;平均加样回收率为 95.54%~101.53%,*RSD* 为 6.52%~9.82%。结论 UPLC-TQMS 定量血浆中 1,5-AG 检测方法简单灵敏,准确稳定,可为临床大样本的筛查、定量提供一种快速有效的方法。

[关键词] 1,5-脱水葡萄糖醇;定量;血浆;超高效液相色谱串联三重四级杆质谱

[中图分类号] R446.1;R392.119

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2020)04-0238-05

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2020.04.012

Study on UPLC-TQMS quantification of plasma 1,5-anhydroglucitol

QU Chun¹, GE Kun¹, JIAN Chaohui², MA Xiaojing², BAO Yuqian², JIA Wei¹, ZHAO Aihua¹

(1. Center for Translational Medicine, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 2. Department of Endocrinology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

[Abstract] **Objective** To develop a method for quantification of plasma 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG) by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-TQMS). **Methods** Acetonitrile: methanol (8:2, v:v) was chosen as the extraction solvent. After removed of protein, the supernatant was conducted to the chromatograph for separation and quantification using multiple reaction monitoring under negative mode. **Results** The whole separation and quantification could be completed within 6 min with a good linearity in the concentration range of 1~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the regression correlation coefficient was 0.998 8. The limits of detection and quantification were 0.002 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The repeatability was 3.85%~6.08%, the relative standard deviation (*RSD*) of intra-day and inter-day precision was 3.77% and 7.76%. The *RSD* of the stability of 1,5-AG stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for a week was 2.51%~4.24%. The accuracy was 97.28%~99.98% with *RSD* of 2.72%~6.53%. The average of added recovery was 95.54%~101.53% with *RSD* of 6.52%~9.82%. **Conclusion** A simple and sensitive, accurate and stable method which can be applied to screen and quantify clinical samples is achieved.

[Key words] 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG); Quantification; Plasma; Ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-TQMS)

1,5-脱水葡萄糖醇 (1,5-anhydroglucitol, 1,5-AG) 与葡萄糖的化学结构相似,为六碳糖醇,具有吡

喃环结构,由葡萄糖吡喃环状结构中 1 位上脱氧形成^[1]。人体内 1,5-AG 主要来源于饮食^[2],在肠道中被吸收,并分布到各种器官和组织中^[3]。在健康状态下,各组织间 1,5-AG 浓度水平相对稳定^[4]。当发生糖尿病,血糖高于肾阈值时,会竞争性的抑制 1,5-AG 在肾近曲小管的重吸收,导致尿中 1,5-AG 排泄增加,血清中含量降低^[5]。2003 年,1,5-AG 被

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81772530, 81974073), 市医院新兴前沿技术联合攻关项目 (SHDC12016108)

[作者单位] 200233 上海,上海交通大学附属第六人民医院转化医学中心(瞿 纯,葛 坤,贾 伟,赵爱华); 200233 上海,上海交通大学附属第六人民医院内分泌科(管朝慧,马晓静,包玉倩)

[通讯作者] 赵爱华, E-mail: zhah@sjtu.edu.cn

美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准作为短期血糖监测的指标^[6]。临床上常用于监控血糖水平波动的指标还有糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbA1C)、糖化白蛋白 (glycated albumin, GA) 和果糖胺 (fructosamine, FA) 等。HbA1C 反映近 3 个月内血糖的平均水平^[7], GA 和 FA 可评估 2~3 周内血糖控制情况^[8-9], 而 1,5-AG 则可反映 1~2 周内更短时间的血糖变化^[2]。此外, 据文献报道, 1,5-AG 在反映餐后高血糖和血糖波动方面也具有一定的优势^[7]。

目前广泛应用的血清 1,5-AG 的定量方法主要为 FDA 推荐的 Glycomark™ 试剂盒方法^[10]。其原理首先用己糖激酶将干扰定量的葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸, 再将 1,5-AG 在吡喃糖氧化酶的作用下生成 1,5-脱水果糖和过氧化氢, 继而在辣根过氧化酶的催化下生成比色产物, 引起在特定波长下的吸光度升高^[11]。该方法灵敏且精确, 但必须去除血清中葡萄糖等类似物的干扰, 才能特异性定量 1,5-AG 的含量。此外, 早些年也有用气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 定量血清 1,5-AG^[12], 该方法首先需要去除样本中的蛋白, 再将去蛋白后的提取液浓缩干燥, 加入硅烷化试剂进行衍生。在特定的升温程序下, 根据化合物沸点的不同, 分离目标化合物, 结合外标法定量 1,5-AG。此方法前处理较为复杂^[13]。作者开发了一种利用超高效液相色谱串联三重四级杆质谱 (ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-TQMS) 定量血清 1,5-AG 的方法, 样本前处理简单, 不受血清中葡萄糖等干扰物质的影响, 检测时间较短, 可为临床批量样本的筛查提供一种简便、快捷的方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器 UPLC-TQMS (型号: XEVO-TQ, 美国 Waters 公司), 色谱柱 ACQUITY UPLC® BEH Amide (2.1×100 mm, 1.7 μm 粒径), 预柱 VanGuard™ Pre-column ACQUITY UPLC® BEH Amide (2.1×5 mm, 1.7 μm 粒径) 都选自美国 Waters 公司, EXP 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 仪器公司), Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 仪器公司)。

1.2 试剂 1,5-脱水-D-葡萄糖醇标准品 (纯度 ≥ 98%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 内标 (internal standard, IS) 1,5-脱水-D-¹³C 葡萄糖醇 (1,5-anhydro-D-¹³C₆-glucitol, ¹³C₆-1,5-AG, 纯度 ≥ 98%) 购自美国 Omicron Biochemicals 公司。氨水购于美国 Sigma-Aldrich 公司, MS 级别的乙腈和甲醇均购于美国 Fisher

Chemical 公司。超纯水由 Milli-Q 系统纯化, Ω=18.2。

1.3 研究对象 从上海交通大学附属第六人民医院内分泌科门诊收集经口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 即口服 75 g 葡萄糖液体后, 监测血糖变化。根据 WHO 标准诊断为健康正常对照 10 例, 糖尿病前期 8 例和糖尿病 22 例的空腹和 2 h 的静脉血静置 2 h 后, 于 1 200 r/min 下离心 20 min, 取血浆 -80 °C 保存, 待用。样本的临床指标见表 1。

表 1 健康对照与糖尿病人的临床指标

组别	年龄 (岁)	n	空腹血糖 (mmol/L)	餐后 2 h 血糖 (mmol/L)
健康对照	47.90 ± 8.25	10	5.27 ± 0.44	6.25 ± 1.52
糖尿病前期	41.63 ± 10.39	8	5.21 ± 0.53	8.73 ± 0.43
糖尿病	44.23 ± 16.12	22	6.43 ± 1.44	12.33 ± 4.62

1.4 方 法

1.4.1 样本前处理方法 称取 1 mg 同位素内标¹³C₆-1,5-AG 溶于 1 mL 甲醇中配制浓度为 1 mg/mL 的¹³C₆-1,5-AG, 取 200 μL 同位素内标母液加入含 800 mL 乙腈和 200 mL 甲醇的溶液中配制提取溶剂。于 50 μL 的血浆中加入 300 μL -20 °C 预冷过的提取液 (含 200 ng/mL¹³C₆-1,5-AG), 涡旋 30 s, 使样本与提取液充分混合, 放置 -20 °C 冰箱 20 min 后, 于 4 °C、13 500 r/min 离心 10 min, 取上清到进样瓶中待检测。

1.4.2 色谱条件 柱温 45 °C, 进样体积 5 μL, 流速 0.5 mL/min。流动相 A 由乙腈:异丙醇:水 (95:5:5, v:v:v) + 0.05% 氨水组成, 相 B 由水 + 0.05% 氨水组成。梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	80	20
2	80	20
2.5	50	50
4	50	50
4.1	100	0
6	100	0

1.4.3 质谱条件 采用负离子多重反应监测模式, 电喷雾离子源。离子源温度 150 °C, 毛细管电压 2.0 kV, 脱溶剂气温度 500 °C, 脱溶剂气流速 1 000 L/h, 锥孔流速 50 L/h。1,5-AG 及¹³C₆-1,5-AG 的定量离子见表 3。

表3 1,5-AG 和¹³C₆-1,5-AG 的定量离子

名称	母离子	子离子	Cone(v)	Collision(v)
1,5-AG	163.13	113.02	24	12
¹³ C ₆ -1,5-AG	169.08	118.02	22	12

1.4.4 提取溶剂的选择 为了有效地提取血清中的1,5-AG,本研究摸索了乙腈与甲醇在1:0、8:2、1:1、2:8、0:1不同比例下的提取效果。采用所有测试样本等量混合作为方法学考察所用样本(quality control, QC)。平行取5份QC样本,每份50 μL,分别加入以上预冷过的不同比例的提取溶剂300 μL,涡旋30 s, -20 ℃下放置20 min后,于4 ℃下,13 500 r/min离心10 min,取上清液进样。比较不同比例溶剂组合下1,5-AG的峰型及响应强度,确定最佳提取溶剂。

1.4.5 检测限、定量限和线性 将1,5-AG的标准品储存液用水稀释为一系列浓度的标准溶液,以3倍信噪比(S/N≥3)和10倍信噪比(S/N≥10)对应的浓度分别为检测限(limits of detection, LOD)和定量限(limits of quantitation, LOQ)。在确定LOQ后,用1、2、4、8、10、15、20、25、40 μg/mL的标准溶液,由低到高的顺序进样,以标准液的浓度(μg/mL)为横坐标,定量离子对的峰面积为纵坐标,建立线性回归方程,考察其线性。

1.4.6 重复性 分别取6份低(2 μg/mL)、中(10 μg/mL)、高(25 μg/mL)的标准品溶液和6份QC样本,以确定好的提取溶剂比例,平行提取样本,取上清液进样测定。比较6针1,5-AG的峰面积,计算峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.4.7 日内精密性与日间精密性 取3等份QC样本,1 d内处理1个QC样本,重复进样6次,计算6针所得的1,5-AG峰面积的RSD,考察日内精密性。3 d内每天处理1个QC样本,每天的样本重复进样6针,连续3 d。计算3 d内1,5-AG峰面积的RSD,考察日间精密性。

1.4.8 稳定性 按确定好的方法,平行处理6份低、中、高的标准品溶液和6份QC样本,分别将提取液放置4 ℃下保存。于0、12、24、48、72 h和1周不同时间点进行测试,每次重复进样6针。计算各时间点1,5-AG峰面积的RSD。

1.4.9 准确度 取6份低、中、高的标准品溶液,采用确定好的提取溶剂,按相同的方法处理。用标准曲线法定量低、中、高标准品溶液的实际浓度与理论

浓度的比值,考察准确度。

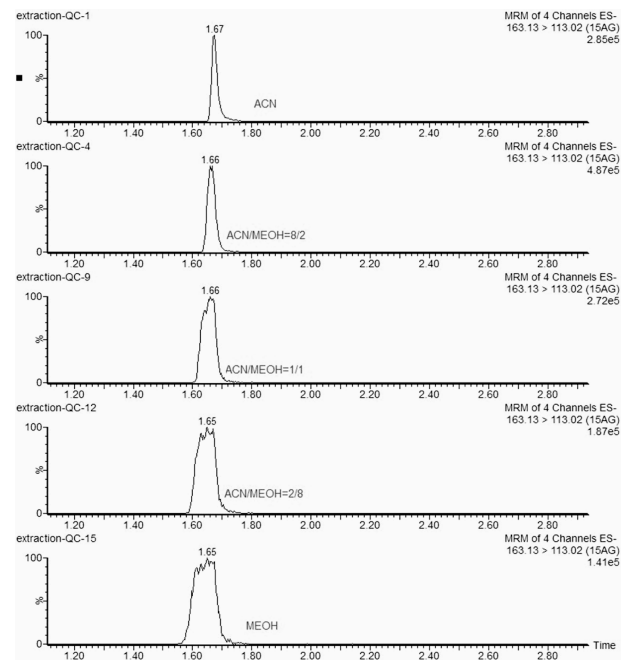
1.4.10 加样回收率 平行取18份QC样本,每6份中加入低、中、高不同浓度的1,5-AG标准品溶液,采用所确定的提取溶剂,按相同的方法进行处理。用标准曲线法定量未加标准品溶液的QC样本以及加入不同浓度溶液后QC样本中的浓度,计算加样回收率。

1.4.11 方法验证 采用所确定的测定方法,定量10例健康对照、8例糖尿病前期和22例糖尿病血浆样本中1,5-AG的含量。

1.5 统计学处理 采用SPSS 22.0统计学软件,相关性用Spearman相关分析,显著性用t-test双尾检验,以P<0.05为差异比较具有统计学意义。

2 结果

2.1 最佳提取溶剂的确定 5种不同比例的提取溶剂对应1,5-AG的定量离子色谱图,如图1所示。结果显示随着甲醇比例的增加,色谱峰逐渐加宽,峰响应越来越低,而乙腈比例越高,色谱峰越窄、对称性好。虽然单纯的乙腈作为提取溶剂时,峰型最窄,但峰响应强度大约只有乙腈:甲醇(8:2, v:v)的一半。综合考虑,乙腈:甲醇(8:2, v:v)的提取效果最好,1,5-AG色谱峰半峰宽较窄,峰型对称,且响应强度最大,是较理想的提取溶剂。



MEOH:甲醇;ACN:乙腈

图1 不同比例的提取溶剂的1,5-AG定量离子色谱图

2.2 LOD值、LOQ值和线性关系 LOD值和LOQ值分别为0.002 5 μg/mL, 0.005 μg/mL。在1~40

$\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,线性回归方程为 $y=0.5562x+0.0678$,相关系数 r 为 0.9988 。表明 1,5-AG 在 $1\sim 40\ \mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内具有良好的线性关系,满足定量的要求。

2.3 重复性 1,5-AG 低、中、高标准品和混合血 QC 样本的 RSD 为 $3.85\%\sim 6.08\%$,表明该方法具有良好的重复性。

2.4 日内和日间精密度 日内精密度 RSD 为 3.77% ,日间精密度 RSD 为 7.76% 。表明该方法具有良好的精密度,满足定量的要求。

2.5 稳定性 根据 0、12、24、48、72 h 和 1 周内 1,5-AG 低、中、高标准品溶液及 QC 样本 1,5-AG 的浓度所示, RSD 为 $2.51\%\sim 4.24\%$,表明 1,5-AG 在 $4\ ^\circ\text{C}$ 环境下保存 1 周具有良好的稳定性。

2.6 准确度 1,5-AG 低、中、高标准品的准确度为 $97.28\%\sim 99.98\%$, RSD 为 $2.72\%\sim 6.53\%$,表明该方法具有良好的准确度。

2.7 加样回收率 平均加样回收率为 $96.92\%\sim 101.53\%$, RSD 为 $6.52\%\sim 9.82\%$,表明该方法具有良好的回收率。

2.8 方法验证结果 应用将血清样本采用所建立质量的方法进行 1,5-AG 浓度的测定。空腹时,糖尿病前期和糖尿病血中 1,5-AG 的浓度均分别低于健康对照 ($P<0.01$ 和 $P<0.05$),但糖尿病前期与糖尿病之间差异比较无统计学意义(图 2A)。同样,在 OGTT 2 h 时,糖尿病前期和糖尿病血中 1,5-AG 的浓度亦分别低于健康对照(均 $P<0.05$),并且糖尿病前期与糖尿病之间差异比较无统计学意义(图 2B)。将本方法所测得的 2 h 血 1,5-AG 浓度与血糖值进行 Spearman 相关分析,结果显示血 1,5-AG 与餐后 2 h 血糖呈明显负相关($r=-0.51, P<0.01$),图 3。

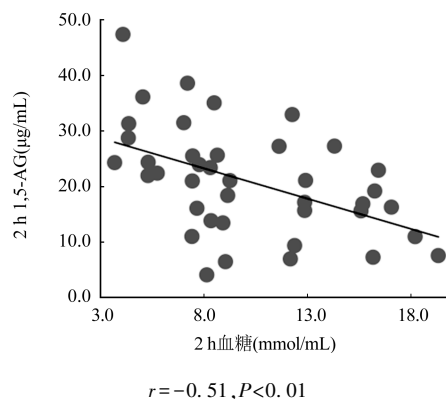
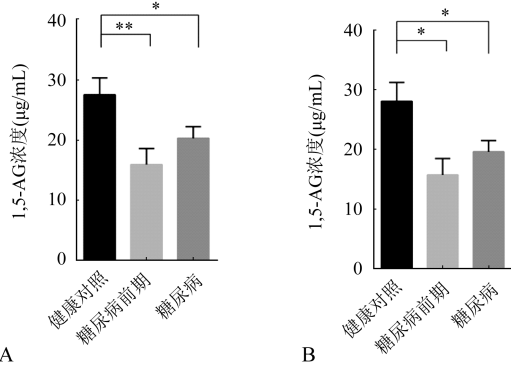


图 3 餐后 2 h 血浆 1,5-AG 与餐后 2 h 血糖的相关性

3 讨论

糖尿病患者的血糖水平监控是诊断、治疗中的重要依据。近年来,血清 1,5-AG 作为血糖监控的短期标志物而倍受关注,并且越来越多的研究者不仅关注血中 1,5-AG 的含量,同时还关注唾液、玻璃体液、脑脊液等不同生物体液中 1,5-AG 的含量。Halama 等^[10]的研究表明唾液 1,5-AG 可用于糖尿病患者的无创筛查。早期 Servo 等^[14]研究者发现糖尿病患者脑脊液中 1,5-AG 的水平降低。此外, Takata 等^[15]在 47 具尸体中研究发现玻璃体和脑脊液中 1,5-AG 的水平呈正相关,可为法医评估死者生前血糖水平提供重要的参考依据。由此可见 1,5-AG 在不同生物体液中具有重要的临床价值。目前 Glyco-mark™ 试剂盒检测方法是通用的血中 1,5-AG 的定量方法,而 1,5-AG 在不同生物体液中的定量不仅受到样本中葡萄糖的干扰,还受到胆红素^[16]、血红蛋白^[16]、麦芽糖^[17]、肌醇^[18]、半乳糖^[10]等类似物的影响,在准确定量前需要排除这些干扰因素。但去除干扰物的过程涉及到复杂的生化反应过程,需要严格控制温度、反应时间等条件,干扰物去除的与否则完全会影响到测定 1,5-AG 的准确性。本研究建立了基于 UPLC-TQMS 的一种定量方法。样本前处理只需沉淀蛋白后即可上机检测,整个检测运行过程仅需 6 min 即能完成。该方法具有较高的灵敏度、重复性好、高精密度、准确度和稳定性,并且操作简单、快捷,适合于不同生物大样本的快速筛查需求,具有较强的推广应用价值。

本研究采用所开发的方法对健康对照、糖尿病前期和糖尿病患者中的血 1,5-AG 进行了定量,结果显示糖尿病前期和糖尿病患者的血 1,5-AG 的含量均显著低于健康对照,这与文献报道的用 Glyco-mark™ 试剂盒测试糖尿病前期和糖尿病患者的结果相吻合^[19]。但本次结果中提示糖尿病前期和糖尿



A: 空腹血浆,糖尿病前期与对照比较, $**P<0.01$ ($t=2.952$, 双侧); 糖尿病与对照比较, $*P<0.05$ ($t=2.110$, 双侧);
B: 餐后 2 h 血浆,糖尿病前期与对照比较 $*P<0.05$ ($t=2.844$, 双侧), 糖尿病与对照比较 $*P<0.05$ ($t=2.425$, 双侧)

图 2 正常对照、糖尿病前期和糖尿病血浆 1,5-AG 浓度

病患者之间无显著性差异,这很可能与所用的样本数量较少、个体之间的差异较大有关。进一步分析可知,餐后2h的血糖与1,5-AG之间存在显著的负相关关系,这与葡萄糖和1,5-AG在肾小管中共用相同的转运体有关。当尿中葡萄糖超过阈值后,转运体对二者的转运具有竞争性,对葡萄糖的转运增加,使血糖升高就会使得对1,5-AG的转运减少,血1,5-AG含量下降。该结果提示餐后的1,5-AG水平能较好反映餐后血糖的波动情况,与文献报道的结果相吻合^[20]。

综上所述,UPLC-TQMS检测血清1,5-AG快速简单,实现对血清1,5-AG准确的定量,可为临床高通量样本的筛查提供切实可行的方法,同时也能为各种复杂生物样本中1,5-AG的定量方法提供参考。

【参考文献】

- [1] Wada H, Dohi T, Miyauchi K, et al. Impact of serum 1,5-anhydro-D-glucitol level on the prediction of severe coronary artery calcification: an intravascular ultrasound study [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 69.
- [2] McGill JB, Cole TG, Nowatzke W, et al. Circulating 1,5-anhydroglucitol levels in adult patients with diabetes reflect longitudinal changes of glycemia: a U.S. trial of the Glyco Mark assay [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(8): 1859-1865.
- [3] Yamanouchi T, Akanuma Y. Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1994, 24(Suppl): S261-S268.
- [4] Stickler D, Turk J. A kinetic mass balance model for 1,5-anhydroglucitol: applications to monitoring of glycemic control [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(4): E821-830.
- [5] Welter M, Boritzka KC, Anghebem-Oliveira MI, et al. Reference intervals for serum 1,5-anhydroglucitol in children, adolescents, adults, and pregnant women [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 486: 54-58.
- [6] Dungan KM. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008, 8(1): 9-19.
- [7] Saglam B, Uysal S, Sozdinler S, et al. Diagnostic value of glycemic markers HbA1c, 1,5-anhydroglucitol and glycosylated albumin in evaluating gestational diabetes mellitus [J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2017, 8(12): 161-167.
- [8] Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, et al. Tests of glycemia in diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(Suppl 1): S106-S108.
- [9] Hom FG, Ettinger B, Lin MJ. Comparison of serum fructosamine vs glycohemoglobin as measures of glycemic control in a large diabetic population [J]. *Acta Diabetol*, 1998, 35(1): 48-51.
- [10] Halama A, Kulinski M, Kader SA, et al. Measurement of 1,5-anhydroglucitol in blood and saliva: from non-targeted metabolomics to biochemical assay [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 140.
- [11] Nowatzke W, Sarno MJ, Birch NC, et al. Evaluation of an assay for serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) and determination of reference intervals on the Hitachi 917 analyzer [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 350(1-2): 201-209.
- [12] Kametani S, Hashimoto Y, Yamanouchi T, et al. Reduced renal reabsorption of 1,5-anhydro-D-glucitol in diabetic rats and mice [J]. *J Biochem*, 1987, 102(6): 1599-1607.
- [13] Niwa T, Dewald L, Sone J, et al. Quantification of serum 1,5-anhydroglucitol in uremic and diabetic patients by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 1994, 40(2): 260-264.
- [14] Servo C, Pitkänen E. Variation in polyol levels in cerebrospinal fluid and serum in diabetic patients [J]. *Diabetologia*, 1975, 11(6): 575-580.
- [15] Takata T, Yamasaki Y, Kitao T, et al. Measurement of post-mortem 1,5-anhydroglucitol in vitreous humor for forensic diagnosis [J]. *J Forensic Sci*, 2016, 61(Suppl 1): S150-S153.
- [16] Fukumura Y, Tajima S, Oshitani S, et al. Fully enzymatic method for determining 1,5-anhydro-D-glucitol in serum [J]. *Clin Chem*, 1994, 40(11 Pt 1): 2013-2016.
- [17] Fukumura Y, Oshitani S, Ushijima Y, et al. Interference of maltose in Lana AG kit determination of 1,5-anhydroglucitol and how to avoid it [J]. *Clin Chem*, 1992, 38(12): 2553-2554.
- [18] Namba N, Watanabe F, Tokuda M, et al. A new method of quantitating serum and urinary levels of 1,5-anhydroglucitol in insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 1994, 24(1): 55-61.
- [19] Pramodkumar TA, Jayashri R, Gokulakrishnan K, et al. Relationship of glycemic control markers-1,5 anhydroglucitol, fructosamine, and glycosylated hemoglobin among Asian Indians with different degrees of glucose intolerance [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2016, 20(5): 690-695.
- [20] 邓子玄,周健,贾伟平. 1,5-脱水葡萄糖醇的临床应用及研究进展 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2014, 13(11): 867-871.