

尿中苯丙酮酸的 GC/MS 定量测定方法

刘 玲 李 光 韩海生 高文和
(天津医科大学质谱室 300070)

[摘要]采用患儿自身尿,人为地加入一定量的苯丙酮酸做为辅助标样,和标样及患儿尿一起在完全相同的条件下进行化学衍生化处理,作 GC/MS 定量分析,通过计算可求得患儿尿中的苯丙酮酸含量,此法克服了苯丙酮酸在尿中和在标准有机酸混合物中由于衍生化结果不同而给定量带来的困难,成功地解决了尿中苯丙酮酸的定量测定方法问题。

关键词:气相色谱—质谱分析 苯丙酮尿症 有机酸

1 引言

苯丙酮尿症是遗传代谢疾病中发病率较高的一种氨基酸代谢病^[1~3]。健康人尿中不含苯丙酮酸,只有苯丙酮尿症患者的尿中,才出现苯丙酮酸。因此,解决尿中苯丙酮酸的定量问题是有实际意义的^[4]。

在测定苯丙酮尿症患儿尿中的有机酸含量时发现,虽然做标样用的标准有机酸混合物和患儿尿样是在完全相同的条件下进行衍生化处理,但是苯丙酮酸的衍生化结果却不同^[5]。因此使得尿中苯丙酮酸的定量测定发生了困难。

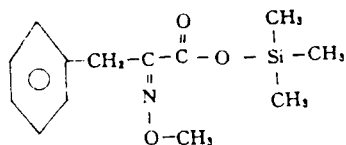


图 a 苯丙酮尿症患儿尿中
苯丙酮酸的衍生化结果

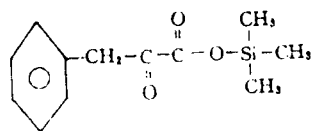


图 b 标样中的苯丙酮酸的
衍生化结果

为了解决这一问题,我们曾试图用健康儿童尿人为地加入苯丙酮酸作为辅助标样,以求得加入不同量苯丙酮酸后求得标准曲线,再借助标准曲线来解决定量问题。实验结果

1996-12-25 收

确实得到了线性关系较好的曲线^[6]。但是同时又发现,直线的斜率与所用健康儿童尿量有关,而且加入到健康儿童尿中的苯丙酮酸,有一部分转变为其他物质。这为解决定量问题又带来了新的影响因素。

我们在前期工作的基础上,改用患儿自身的尿,人为地加入一定量的苯丙酮酸作辅助标样,连同患儿尿样、标样一起在完全相同的条件下进行化学衍生化处理,进行GC/MS(气相色谱-质谱)定量测定,经计算求出了患儿尿中的苯丙酮酸含量。

2 实验部份

2.1 实验条件和试剂:与文献^[6]相同。

2.2 实验程序:

取患儿随沉尿,测定尿中的肌酐浓度。分别取1mL患儿尿2份,向其中的1份中加入20 μ L浓度为20mg/mL的苯丙酮酸甲醇溶液做辅助标样用。另取1mL标准有机酸混合物做标样用。将患儿尿、辅助标样、标样在相同条件下进行化学衍生化处理做GC/MS定量测定。样品的化学处理方法同文献。

2.3 结果计算:计算公式如式(1)。

$$W = \frac{R_1}{R_2 - R_1} \times \frac{400\mu\text{g}}{C} \quad (1)$$

W:患儿尿中苯丙酮酸含量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肌酐); $400\mu\text{g} = 20\text{mg}/\text{mL} \times 20\mu\text{L}$; R_1 :患儿尿中苯丙酮酸对内标的响应值; R_2 :患儿尿中加入20 μL 苯丙酮酸后对内标的响应值; $R_2 - R_1 = 400\mu\text{g}$ 苯丙酮酸对内标的响应值; C :尿的肌酐浓度。

3 结果与讨论

3.1 采用患儿自身的尿做辅助标样,可不作标准曲线,测定1个患儿尿中的苯丙酮酸和其他有机酸,只需做患儿尿、辅助标样和标样3个样品,就可通过公式求出苯丙酮酸的含量,简化了定量过程。

3.2 利用此法,曾对13例苯丙酮尿症患儿进行了尿中苯丙酮酸含量的测定。把尿中苯丙酮酸含量测定结果与用细菌抑制法对血液中苯丙氨酸含量测定结果以及尿中其他异常有机酸含量进行比较时发现,血液中苯丙氨酸含量、尿中苯丙酮酸含量、其它异常有机酸含量的变化趋势基本一致^[4]。特别是当血液中苯丙氨酸含量高于20mg/dL时,用细菌抑制法已很难确定具体含量数值,但尿中苯丙酮酸和其他异常有机酸却表现出了很好的一致性的变化趋势。

3.3 当血中苯丙氨酸含量低于16mg/dL时,尿中的苯丙酮酸只有一种衍生化产物a,而当血中苯丙氨酸含量高于16mg/dL时,尿中的苯丙酮酸的两种衍生化产物a、b都存在,因此在计算尿中苯丙酮酸的含量时应为两者之和。

3.4 在对苯丙酮尿症患儿治疗过程中对尿中异常代谢物含量监测中发现,当血中苯丙氨酸含量为8mg/dL时,尿中能发现苯丙酮酸,其它异常有机酸含量也明显高于正常值;而当血中苯丙氨酸含量为6mg/dL时,尿中不能发现苯丙酮酸。这一结果对指导苯丙酮尿症患儿的治疗也是有意义的。

3.5 医学临床上对苯丙酮尿症患儿通常是用高压液相色谱的方法,对血液中的苯丙氨酸进行定量测定,以确定患病的程度。由于此法用血较多,新生儿采血操作比较困难,家长感情上也不易接受。健康人尿中不含有苯丙酮酸,只有苯丙酮尿症患者的尿中才出现苯丙酮酸。因此,解决尿中苯丙酮酸的定量问题,是有实际意义的。利用气相色谱-质谱测定尿中苯丙酮酸含量方法的确定,将为苯丙酮尿症的诊断和治疗提供一个新的、有效的检测方法。

参 考 文 献

- 1 李永等译. 遗传代谢性疾病,人民卫生出版社,1981
- 2 杜传书,刘祖洞. 医学遗传学,人民卫生出版社,1992
- 3 袁丽芳. 遗传与疾病,1988,5(2):91
- 4 刘玲. 苯丙酮尿症患儿尿中异常有机酸代谢物气相色谱-质谱定量测定结果的对比分析. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1996,17(特刊):8~9
- 5 刘玲. 苯丙酮尿症患儿尿中异常有机酸代谢物的 GC/MS 分析. 质谱学报 1995,16(1):50~53
- 6 刘玲. 尿中苯丙酮酸的 GC/MS 定量分析方法的探讨. 质谱学报 1995,16(3):31~34
- 7 刘学志. 健康人尿液中有机酸含量正常值测定. 分析化学,1991,19(2):159~161

The Quantitative Analysis of Phenyl-pyruvic Acid in Urine by GC/MS

Liu Ling, Li Guang, Han Haisheng, Gao Wenhe

(Laboratory of GC/MS, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Received 1996-12-25

Abstract

After treating by chemical derivation under complete same condition, child patients' urine, auxiliary sample coming from child patients themselves and added certain amount phenyl-pyruvic were measured quantitatively by GC/MS. Through this way, quantity of phenyl-pyruvic in child patient's urine could be evaluated. This method overcame the difficulty in determining amount due to difference derivative result of phenyl-pyruvic in child patients' urine and in standard organic acid mixture, and also successfully solves the problem of quantitative measurement of phenyl-pyruvic in urine.

Key Words: quantitative analysis, GC/MS, phenylketonuria, organic acid