

人体尿液中有机酸的GC/MS定量分析

刘学志 刘 玲 苗 靖
朱国平 仇淑云 侯 卫

(天津医学院质谱室)

〔摘要〕从人体尿液中萃取得到的有机酸,用GC/MS法进行鉴定,以对氯苯甲酸作为内标物进行定量分析。

人体尿液中有机酸的定量分析是GC/MS法在生物学中的重要应用^[1-5],目前国内尚未见报道。本文主要报道定量分析的方法,此后将陆续报道正常人体及各种病态人体尿液中有机酸的分析结果,这对我国医学研究和临床诊断具有重要意义。

正常人体尿液中的有机酸可能有数百种,而与科研、诊断有关的能被有机溶剂萃取得到的有30多种^[6]。我们用32种标准有机酸的混合物溶液作为标准品(表1),以对氯苯甲酸作为内标物,经GC/MS分析后获得重复性良好的标样总离子流色谱图(图1, 2),从而得

表1 标准有机酸

代 号 n	有 机 酸 名 称	代 号 n	有 机 酸 名 称
1	对氯苯甲酸(内标物) (TMS)	24	甲基丁二酸 (di-TMS)
2	乳酸 (di-TMS)	25	甘油酸 (tri-TMS)
3	羟基乙酸 (di-TMS)	26	甲基丁烯二酸 (di-TMS)
4	α -羟基异丁酸 (di-TMS)	27	戊二酸 (di-TMS)
5	丙酮酸 (EO-TMS)	28	β -甲基戊二酸 (di-TMS)
6	α -羟基丁酸 (di-TMS)	31	N-异戊酰-甘氨酸 (EO-TMS)
8	α -酮基丁酸 (EO-TMS)	32	己二酸 (di-TMS)
9	α -酮基异戊酸 (EO-TMS)	33	β -甲基己二酸 (di-TMS)
10	乙酰乙酸 (EO-TMS)	35	邻位羟基苯乙酸 (di-TMS)
11	β -羟基丁酸 (di-TMS)	36	β -苯基乳酸 (di-TMS)
14	甲基丙二酸 (di-TMS)	37	α -酮基戊二酸 (EO-TMS)
15	α -酮基- β -甲基戊酸 (EO-TMS)	38	α -甲基- α -羟基戊二酸 (tri-TMS)
19	α -酮基异己酸 (EO-TMS)	39	苯丙酮酸 (EO-TMS)
20	乙基丙二酸 (di-TMS)	40	对位羟基苯乙酸 (di-TMS)
22	顺丁烯二酸 (di-TMS)	41	α -酮基己二酸 (EO-di-TMS)
23	丁二酸 (di-TMS)	42	辛二酸 (di-TMS)

代号:有机酸代号,本文内有有机酸名称皆用此代号。EO, TMS:该有机酸的EO或TMS衍生物

1986年11月21日收

Text: 01 50S 25ML 4UL

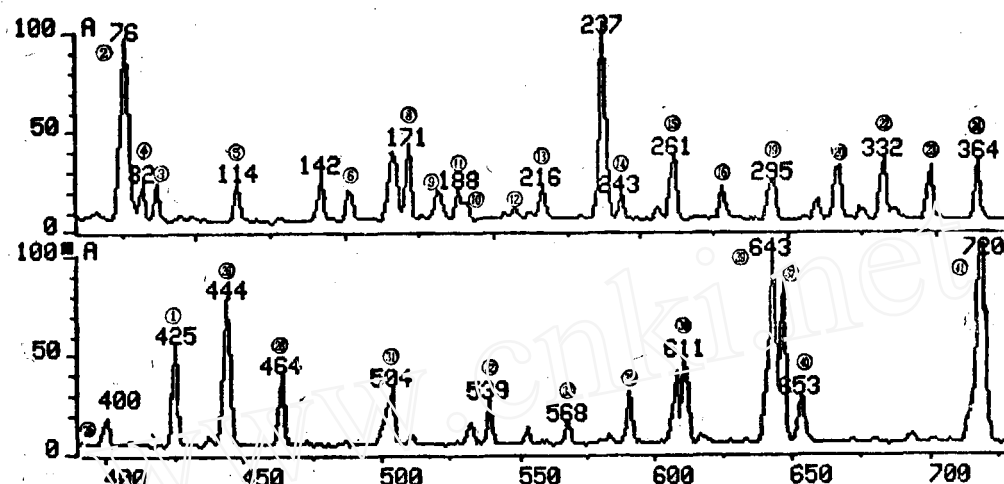


图1 标准有机酸混合物总离子色谱图(01)
图中圆圈内的数字是有机酸的代号(见表1)

Text: 02 80S 25ML 4UL

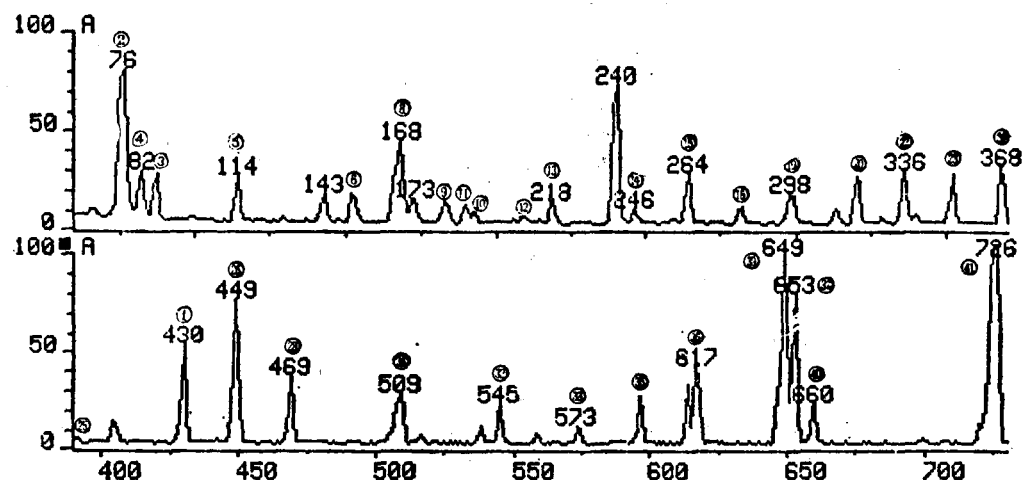
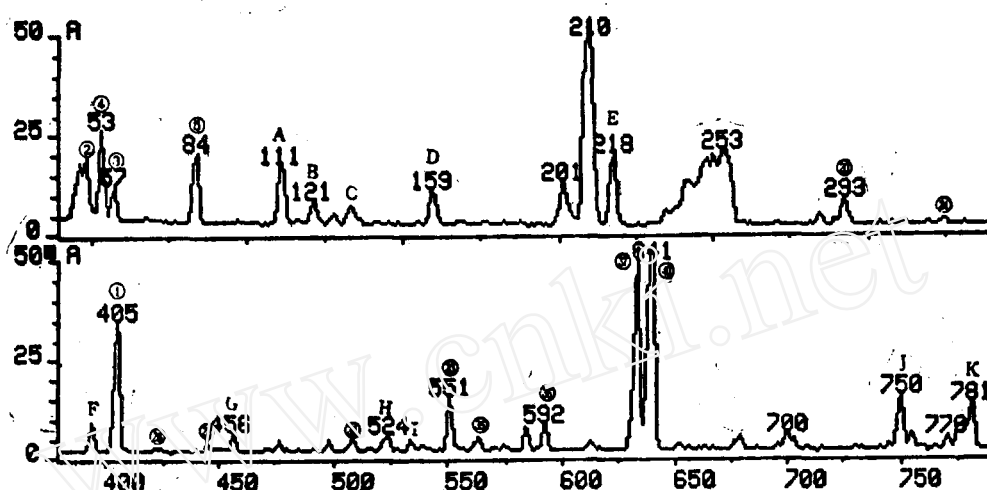


图2 标准有机酸混合物总离子色谱图(02)
图中圆圈内的数字是有机酸的代号(见表1)

到各有机酸色谱峰的保留时间,峰面积、响应因子R值(Response Factor)及质谱图。根据保留时间及质谱图,对各有机酸进行鉴定。再根据各有机酸的色谱峰面积及内标物的峰面积,计算出各有机酸的R值。同时,在同样实验条件下获得正常人体尿样的总离子流色谱图(图3),得到尿样中各有机酸色谱峰的保留时间及峰面积,与标样总离子流色谱图(图2)中相应的色谱峰对照,经计算机进行谱库检索及质谱分析,就可对各有机酸进行鉴定及定量计算,得到各有机酸的含量(表2)^[6-9]。

Text: R4 80S 25ML 4UL

图3 尿样R₄的总离子色谱图

图中圆圈内的数字是有机酸代号(见表1), 大写英文字母是新发现的有机酸代号(见表3)

表2 尿样(R₄)的定量分析报告

N _o .	An	Rn	An'	Wn(μg)	%(mg/ml)
1(内标)	A _{IS} = 653.01	—	A' _{IS} = 998.63	—	—
2	1394.84	2.136	356.88	1.67	0.167
3	201.47	0.309	96.82	3.14	0.314
4	278.80	0.427	362.72	8.51	0.851
5	219.28	0.336	392.41	11.69	1.17
20	324.57	0.497	141.45	2.85	0.285
24	326.44	0.500	19.59	0.39	0.039
26	1065.00	1.631	12.18	0.08	0.008
28	379.25	0.581	28.85	0.50	0.050
32	206.96	0.317	64.48	2.04	0.204
33	93.52	0.143	289.02	20.24	2.02
35	268.40	0.411	78.80	1.92	0.192
36	567.20	0.869	134.30	1.55	0.155
37	909.25	1.392	1566.96	11.27	1.13
40	271.49	0.416	2999.35	72.20	7.22

N_o: 有机酸的代号, 其名称见表1。

实 验 部 分

一、仪器及实验条件

1. 仪器: 英国VG7070E GC/MS
2. 色谱条件: 毛细管柱, OV-1弹性柱, 25m×0.25mm(英); 载气He (99.999%); 柱前压0.8kg/cm²; 流速 20ml/min; 进样口温度 250℃; 程序升温 90℃ (8min) → 220℃ (8min), 升温速率3℃/min。
3. 质谱条件: GC/MS (EI); 电离室温度200℃; 电离电压70eV; 分辨率1000; 加速电压6KV; 扫描速度1sec/dec; 扫描范围30-500AMU。

二、试剂

1. 标准有机酸, 美国SIGMA及ALDRICH化学公司产品;
2. EO, Ethoxyamine Hydrochloride, CH₃CH₂ONH₂·HCl, 乙氧基胺盐酸盐;
3. TMSI, N-Trimethylsilyl-Imidazole (N-三甲基硅烷基咪唑), 硅烷化试剂;
4. BSTFA, N,O-Bis(trimethylsilyl)-Trifluoro-Acetamide, (N,O-双(三甲基硅烷基)-2,2,2-三氟乙酰胺), 硅烷化试剂;

以上EO, TMSI及BSTFA均为美国PIERCE化学公司产品;

5. 醋酸乙酯、吡啶等均为国产AR级试剂。

三、分析程序

1. 向两支分别盛有1ml标准有机酸混合液(每种有机酸含 10μg)及1ml尿样的试管中加6N NaOH溶液碱化后加入EO的吡啶溶液进行EO化;
2. 待上述反应完全后, 再向两管分别加入TMSI硅烷化试剂, 混匀使反应完成。
3. 将上述两管反应液酸化后, 加入适量固体NaCl及10μg对氯苯甲酸作为内标物, 混匀后用醋酸乙酯萃取, 萃取液用氮气吹干;
4. 向吹干的两支试管中加入适量吡啶及 BSTFA 试剂混匀, 待反应完全后, 在完全相同的条件下, 将标样及尿样分别进行 GC/MS (EI) 分析, 获得标样及尿样的总离子色谱图(图2, 3)。

四、结果处理

1. 对图2(标样)及图3(尿样R₄)进行分析, 根据保留时间及质谱分析, 对标样及尿样品中所有有机酸进行鉴定, 并计算出各有机酸及内标物色谱峰的峰面积。
2. 根据图2测得的A_n及A_{IS}计算R值:

$$R_n = \frac{A_n}{A_{IS}}$$

R_n为第n号标准有机酸的响应因子, A_n为第n号标准有机酸的色谱峰面积, A_{IS}为加入的内标物(10μg对氯苯甲酸)色谱峰面积。

3. 根据尿样R₄色谱图(图3)测得的A'_n及A'_{IS}计算尿样中各有机酸含量:

$$W_n = \frac{A'_n \cdot 10}{A'_{IS} R_n}$$

W_n为第n号有机酸的含量(μg), R_n由前式求得, A'_n为尿样中已检出的第n号有机酸色谱

峰面积, A_{is} 为尿样中加入的内标物 (对氯苯甲酸) 的色谱峰面积, 10 为加入的内标物重量 ($10\mu\text{g}$)。

讨 论

1. 使用EO化试剂的目的是把酮酸中的羰基转化为肟, 使酮酸不致异构化为烯醇式从而产生多个色谱峰, 并有利于酮酸在毛细管柱中挥发。

2. 先后两次TMS化是为了使硅烷基化反应更完全, TMSI试剂可在水溶液中进行TMS化, BSTFA试剂则在有机溶剂中进行TMS化。

3. 我们从一些尿样中检测出标样中所没有的11种有机酸 (表3), 这些有机酸在国外文献中报道不多。其生理意义及定量测定尚待研究。

表3 尿样“R₄”总离子色谱图中新发现的有机酸(A, B...K, 为其代号)

代 号	有 机 酸 名 称	代 号	有 机 酸 名 称
A	乙二酸 (di-TMS)	G	β -甲基- α -戊烯二酸 (TMS)
B	4-羟基戊烯酸 (di-TMS)	H	5-酮基-脯氨酸 (di-TMS)
C	α -甲基- α -羟基-丁酸 (di-TMS)	I	间位甲氧基苯乙酸 (TMS)
D	α -甲基- β -羟基-丙酸 (di-TMS)	J	1-丙烯-1,2,3-三羧酸 (tri-TMS)
E	β -甲基- β -羟基-丁酸 (di-TMS)	K	N-苯甲酰-甘氨酸 (TMS)
F	羟基丙二酸 (tri-TMS)		

4. 图1及图2的重复性良好可以证实仪器的稳定性和方法的可靠性。

参 考 文 献

1. S.I. Goodman et al., "Diagnosis of Organic Acidemias by Gas Chromatography-Mass Spectrometry", Alan R. Liss, New York, P. 105-108, (1981)
2. Stanburg, J.B. et al., Eds. "The Metabolic Basis of Inherited Diseases", McGraw-Hill: New York, (1980)
3. Chalmers, R.A. et al., "Organic Acids in Man", Chapman and Hall: New York, (1982)
4. Nyham, W.L. Ed. "Inherited Disorders of Amino Acid Metabolism", Wiley: New York, (1974)
5. Holmes, F.A. et al., Eds "Inborn Errors of Metabolism", Academic Press: London, (1973)
6. Richard M. Caprioli et al. Application Report, Finnigan Mat, No. 206
7. Chalmers, R.A., Watts, R.W.E., Analyst, 97:958-967 (1972)
8. Thompson, J.A., Markey, S.D., Anal. Chem., 47:1313-1321 (1975)
9. Gates, S.C. et al., Clin. Chem., 24: 1674-1679(1978)

Quantitative Determination of Organic Acid Profiles in Human Urine

Liu Xuezhi, Liu Ling, Miao Jing,

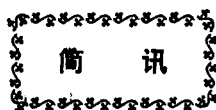
Zhu Guoping, Qiu Shuyun, Hou Wei

(Mass Spectrometry Laboratory, Tianjin Medical College)

Received 21, Nov. 1986

Abstract

Extractable organic acids in human urine were analyzed by GC/MS. The acids were identified and their concentration ranges were given with respect to 4-chloro-benzoic acid as an internal standard.



我会各专业委员会分别举行第四次学术年会

按质谱学会1987年工作计划, 我会四个专业委员会先后举行了第四次学术年会。同位素质谱年会10月30日至11月8日在西安举行, 与会代表73人, 提交论文38篇; 无机质谱年会于10月10日至14日在庐山举行, 33人参加会议, 提交论文20余篇; 有机质谱年会于9月25日至28日在西安召开, 185人参加会议, 提交论文109篇, 精装成册(上、下集); 质谱仪器专业年会于11月25日至30日在桂林进行, 32人参加会议, 提交论文报告15篇。年会充分交流了近两年间各专业领域内取得的最新进展和成果。同时还就明年即将召开的第六次全国质谱学会会议和第三届会员代表大会初步交换了意见。

(山 佳)