

气相色谱-质谱法检测尿液与滤纸尿中有机酸含量的对比

杨江涛¹, 林珊珊^{1△}, 钟沛强¹, 戴子鹏¹, 赵明¹, 李强¹, 钱俊¹

(1.深圳爱湾医学技术服务有限公司,广东深圳 518055)

作者简介: 杨江涛, 男, 1979 年生, 硕士, 主要从事化学计量学工作。

[△]通讯作者: 林珊珊, E-mail: linshanshan@aonelab.com.cn

摘要: **目的:**利用气相色谱-质谱联用仪测定尿液和滤纸尿中有机酸的含量并比较两者之间检测结果的差异。 **方法:**收集 6 名正常儿童的尿液标本, 用滤纸片对尿液标本进行处理, 制成尿滤纸片, 然后通过洗脱得到滤纸尿。以尿液作为对照组, 根据肌酐含量取相应体积的尿液和滤纸尿, 通过萃取、衍生后进行尿液代谢产物的检测并对其检测结果进行比较分析。 **结果:**6 例对照标本中, 尿液中乙醇酸、草酸、丙酮酸-OX、3-羟基异丁酸、乙基丙二酸、3-甲基戊烯二酸的浓度分别比滤纸尿高 14.0%、190.0%、48.0%、27.2%、32.1%、140.0%。 **结论:**尿液和滤纸尿在有机酸检测中有一定的差别, 尿液更能反映标本的真实情况, 能有效地提高检测的准确性, 更有利于阳性和可疑结果的诊断, 具有重要的现实意义。

关键词: 尿液; 滤纸尿; 气相色谱-质谱 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS); 有机酸

Comparison of the Organic acids detection results of urine and filter paper urine by gas chromatography-mass spectrometry

YANG Jiang-tao¹, LIN Shan-shan^{1△}, ZHONG Pei-qiang¹, DAI Zi-peng¹, ZHAO Ming¹, LI Qiang¹, QIAN Jun¹

(1.Shenzhen Aone Medical Laboratory Co. LTD, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

Abstract: Objective: Comparison of the difference of organic acids content by gas chromatography-mass spectrometry between urine and filter paper urine. **Method:** Urine samples were collected using filter paper from 6 normal children and made into the urine filter paper, then treatment to get the filter paper urine. The urinary metabolites were detected by GC-MS after the extraction and derivatization, then compared their test results. **Results:** In 6 case control samples, The detection results of Glycolic、Oxalic、Pyruvic-OX、3-OH-isobutyric、Ethylmalonic、3-Methylglutaconic in urine were 14.0%、190.0%、48.0%、27.2%、32.1%、140.0% higher than filter paper urine. **Conclusion:** Urine and filter paper urine organic acid content has a certain difference detected by GC-MS. The urine can reflect the actual situation of the sample, can effectively improve the accuracy of detection, more conducive to the diagnosis of positive and suspicious results, has a certain practical significance.

Key words: Urine; Filter paper urine; Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); Organic acids

遗传代谢病(inherited metabolic disorders, IMD)这一概念, 早在 1908 年英国专家 Garrod 在文章中首次提出。现已知 IMD 大部分为常染色体隐性遗传, 其余为 X 连锁遗传或线粒体遗传等。IMD 是由于体内某些代谢途径缺陷或发生障碍, 导致人体部分不需要的代谢物蓄积或人体必需代谢产物的缺乏, 从而造成人体代谢紊乱的一类疾病。目前为止发现的遗传代谢病已有 500 余种, 病种繁多, 且该类疾病一般表现为单一病种的发病率低, 发病率在几万至几十万分之一不等, 但将这些疾

病的发病率加起来，作为一类疾病总的发病率来看，其发病率却是很高^[4]。近年来，伴随着医学检验学、分子遗传学和计算机科学等领域的迅速发展，这类疾病的诊断有了更精确、更快速、更成熟的方法^[5-7]。

目前采用气相色谱-质谱联用仪（Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）从尿液中能检测出 132 种有机酸，可检测 40 余种代谢病^[1]。它不仅有色谱的高分辨率和质谱的高灵敏度，而且具有检测准确性高、自动化分析过程简便快速的特点，是遗传代谢病最广泛和最有效的检测方法，特别是有机酸代谢疾病的检测^[6]。尿液有机酸检测是根据被测尿液的肌酐含量（0.2 mg 当量肌酐）来确定取样体积进行分析检测，并根据检测结果结合患者的临床表现诊断相关疾病。我国幅员辽阔，各地区经济和科学发展水平严重不平衡，以往一般以滤纸片标本的方式送到筛查中心进行检测与诊断工作，有相关报道证实了滤纸片法的可行性，但均没有指出尿液与滤纸尿两者之间检测结果的具体差异^[2,4,5,7-9]。因此本实验采用气质联用仪分析了 6 例正常儿童的尿液和滤纸尿标本，并通过 GC-MS 先天性代谢异常诊断软件进行数据处理，对其有机酸检测结果进行对比，并且探讨了两者之间的具体差异。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂

GCMS-QP2010 Ultra 分析仪、紫外可见分光光度计 UV2600 及石英吸收池（日本 SHIMADZU 公司）；氮气发生器 LCMS30（英国 PEAK 公司）；氮吹仪 BF-2000、RL-821 型漩涡振荡混合器（北京八方世纪科技有限公司）；电热恒温培养箱 HPX-9082MBE（上海博迅实业有限公司）。Dragonlab 移液器（可调范围：20-200 μL 、100-1000 μL 、1000-5000 μL ，大龙兴创实验仪器（北京）有限公司）。

托品酸、十七烷酸、二十四烷酸、尿素酶、盐酸羟氨（Sigma-Aldrich 公司）；乙酸乙酯、甲基硅烷化衍生剂 BSTFA-TMCS(99: 1)（上海安普科学仪器）；苦味酸（分析纯，西亚试剂公司）；氢氧化钠（分析纯，DAMAO 公司）；盐酸（优级纯，湖南凯信公司）；实验用水均为 Milli-Q 纯水系统（美国 Millipore 公司）制得的超纯水。高纯氦气（99.999%）购于深圳市划时代科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 尿滤纸片的制作和洗脱

将收集好的儿童随机尿于洁净的培养皿中，把滤纸片放入尿液中完全浸泡，然后取出尿滤纸片在自然条件下晾干。将干尿滤纸片卷曲后放入针筒内，用去离子水浸泡洗脱，待滤纸片充分湿润后离心，得到滤纸尿。

1.2.2 尿液和滤纸尿肌酐含量的测定

采用苦味酸法测定肌酐含量^[10]。取 0.1 mL 尿液或滤纸尿，用去离子水定容至 3.0 mL。加入 2.0 mL 碱性苦味酸溶液，室温反应 25 min。最后加入 5.0 mL 去离子水，摇匀。以试剂空白作为参比，在波长 490 nm 下测定其吸光度值。每个标本测定 3 次，取其平均值作为该标本的吸光度值。

1.2.3 标本前处理方法

取 0.2 mg 当量肌酐的尿液或滤纸尿，分别加入尿素酶，混匀，置 37 °C 恒温培养箱温育 30 min，加入内标溶液，用去离子水定容至 2 mL。然后，加入 5% 盐酸羟胺，5N 氢氧化钠，混匀后于室温静置 60 min，之后加入盐酸充分混匀，调节溶液 pH 值。再用乙酸乙酯萃取两次，合并上清液，60 °C 下氮吹至干。最后加入衍生化试剂，70 °C 衍生 30 min，上机测定。

1.2.4 GC-MS 条件

柱温箱起始温度 100 °C，最终温度 280 °C；离子源温度 200 °C，接口温度 280 °C，扫描范围 50 ~ 500 m/z；色谱柱 DB-5（柱长 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 1 μm）。

1.2.5 稳定性分析

同一标本采用相同的处理方法分别处理 3 个，作为批内变异系数（Coefficient of Variation, CV）。

2 结果

2.1 肌酐测定结果

配制成浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的肌酐标准溶液，以吸光度对目标分析物的浓度进行线性回归计算，所得肌酐浓度标准工作曲线为 $y = 1.25515x + 0.00848$ ，相关系数： $r^2 = 0.99982$ ，滤纸尿肌酐浓度批内 CV < 9 %（结果见表 1）。

表 1 尿液与滤纸尿的肌酐浓度

	标本 1	标本 2	标本 3	标本 4	标本 5	标本 6
滤纸尿肌酐浓度(mg/mL)	0.265	0.611	0.204	1.349	0.587	0.565
	0.245	0.722	0.204	1.377	0.632	0.603
	0.288	0.695	0.224	1.373	0.609	0.652
滤纸尿批内 CV (%)	8.08	8.57	5.46	1.11	3.69	7.19
尿液肌酐浓度(mg/mL)	0.636	1.676	0.452	3.087	1.352	1.332

2.2 尿液与滤纸尿 GC-MS 分析结果

采用 GC-MS 分析仪分别对尿液和滤纸尿进行测定，然后使用 GC-MS 先天性代谢异常诊断软件进行数据处理。检测结果显示，乙醇酸、草酸、丙酮酸-OX、3-羟基异丁酸、乙基丙二酸、3-甲基戊烯二酸的保留时间分别为 10.14、12.04、12.78、13.17、17.43、22.78 min，如图 1 所示。尿液与滤纸尿有机酸检测结果见表 2。由表 2 中可知，在 GC-MS 检测中，尿液中乙醇酸、草酸、丙酮酸-OX、3-羟基异丁酸、乙基丙二酸、3-甲基戊烯二酸的含量分别比滤纸尿高 14.0%、190.0%、48.0%、27.2%、32.1%、140.0%。标本前处理批内 CV < 10 %（见表 3）。

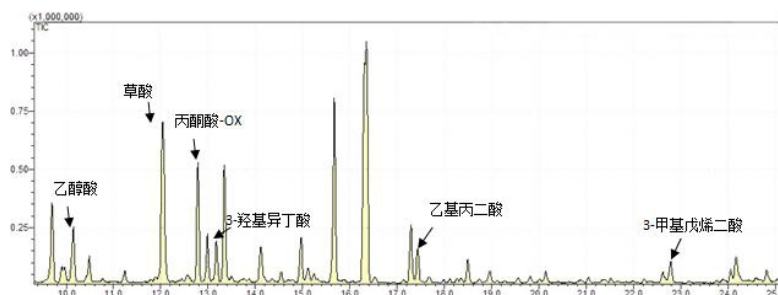


图 1 尿液 GC-MS 总离子流图

表 2 尿液与滤纸尿的有机酸含量

	乙醇酸		草酸		丙酮酸-OX		3-羟基异丁酸		乙基丙二酸		3-甲基戊烯二酸	
	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿
标本 1	2.49	1.60	1.18	0.00	4.15	2.38	2.23	1.38	0.37	0.23	0.60	0.38
标本 2	3.16	2.87	0.65	0.32	2.12	1.63	1.22	0.98	0.29	0.26	0.23	0.17
标本 3	1.35	1.07	1.30	0.73	10.74	5.91	1.76	1.18	0.68	0.41	0.58	0.37
标本 4	0.45	0.49	0.86	0.59	2.90	2.18	0.49	0.44	0.28	0.24	0.09	0.00
标本 5	2.02	2.06	1.49	0.35	4.09	3.18	1.39	1.40	0.31	0.28	0.31	0.00
标本 6	2.22	2.15	1.49	0.38	4.52	3.61	1.60	1.43	0.31	0.28	0.37	0.00
平均值	1.95	1.71	1.16	0.40	4.75	3.21	1.45	1.14	0.37	0.28	0.36	0.15
相差值	14.0%		190.0%		48.0%		27.2%		32.1%		140.0%	

表 3 尿液与滤纸尿的批内变异系数

	乙醇酸		草酸		丙酮酸-OX		3-羟基异丁酸		乙基丙二酸		3-甲基戊烯二酸	
	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿	尿液	滤纸尿
标本 1	4.04	9.02	3.82	/	6.68	4.78	3.91	5.34	6.80	9.05	1.67	3.04
标本 2	5.09	4.13	0.89	8.27	5.71	9.74	5.74	8.84	1.99	6.66	2.51	3.40
标本 3	1.13	9.76	3.87	5.97	4.6	9.06	8.28	9.55	4.73	6.14	2.99	1.56
标本 4	1.28	7.36	8.78	7.06	8.11	1.40	4.71	2.27	4.12	4.81	6.78	/
标本 5	4.05	1.28	0.67	8.73	2.57	6.65	2.72	0.41	3.23	7.43	3.23	/
标本 6	2.38	7.27	2.42	8.04	0.44	7.72	0.95	7.67	3.23	5.46	4.13	/

3 讨论

目前,尿液有机酸检测一般以滤纸尿标本的方式送到筛查中心进行检测。有相关报道指出,用尿滤纸片替代尿液方便运输,并且证实了滤纸片法的可行性,因此提出了滤纸尿标本可以简单替代尿液筛查部分有机酸尿症的观点^[11,12]。然而尿液经过滤纸片的处理可能会导致某些物质含量的降低,甚至流失。

随着现代交通运输和冷链运输技术的迅速发展,尿液标本的保温及快速运输问题基本得到了解决,取尿液送检的方式相应会逐渐增多。此外,尿滤纸片的处理过程比尿液更为复杂,需要制作和洗脱尿滤纸片,复杂的操作更容易导致标本损失与污染,使检测结果误差更大。相对的取尿液送检,不但可以减少医护人员制作尿滤纸片的工作量,还可以简化检测人员的处理流程,节省时间,减少误差,使检测结果更加准确。

本研究通过对 6 例儿童的尿液进行有机酸检测,结果显示,在相同肌酐含量下,尿液中乙醇酸、草酸、丙酮酸-OX、3-羟基异丁酸、乙基丙二酸、3-甲基戊烯二酸的含量分别比滤纸尿高 14.0%、190.0%、48.0%、27.2%、32.1%、140.0%。且上述有机酸均为某些尿液有机酸疾病的标志物^[13](见表 4),患者初期尿液中相关标志物浓度相对偏低,浓度可能在诊断临界值附近,特别是对于新生儿患者,由于新陈代谢还不是十分充分,尿液中的代谢产物含量相对偏低,用滤纸尿进行有机酸检测,可能存在漏诊或误诊的风险。对于该类疾病,早期的发现对于患者的治疗和预后有着

重要的意义。综合考虑，尿液更能反映标本的实际情况，能简化实验操作，有效地提高检测的准确性与效率，更有利于某些代谢疾病的检测，特别是对于新生儿患者的检测，具有重要的现实意义。

表 4 遗传代谢病中尿液有机酸检测的标志物

疾病名称	疾病相关标志物
高草酸尿症 I 型	乙醇酸、草酸
高乳酸血症	丙酮酸-OX、乳酸
3-羟基异丁酸尿症	3-羟基异丁酸
戊二酸尿症 II 型	乙基丙二酸、戊二酸、2-羟基戊二酸
3-甲基戊烯二酸尿症	3-甲基戊烯二酸

参考文献

- [1] 杨楠,韩连书,叶军等.新生儿期氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢病疾病谱分析[J].临床儿科杂志,2012,30(9):805-808
- [2] 彭薇,张万巧,封志纯.气相色谱-质谱法检测遗传代谢性疾病高危患儿[J].临床儿科志,2014,32(9):888-891
- [3] 肖昕,郝虎.质谱技术在小儿遗传性代谢病筛查中的应用[J].中国新生儿科杂志,2013,28(1):3-5
- [4] 韩凤,韩连书,叶军等.气相色谱-质谱检测的 564 例遗传代谢病疾病谱分析[J].中华内分泌代谢杂志,2013,29(8):693-695
- [5] 高岭,申改青,张松华.尿液气相色谱-质谱分析筛查诊断代谢缺陷病的临床研究[J].现代中西医结合杂志,2008,17(1):20-21
- [6] 孙卫华,杨毅,曹迪,王艺,陆炜.气-质联用技术测定尿有机酸方法的建立及在遗传代谢病诊断中的应用[J].中华检验医学杂志,2008,31(10):1161-1165
- [7] 耿国兴,李旺,范歆等.乙酸乙酯萃取-气相色谱-质谱联用技术对 267 例疑似遗传代谢病筛查的结果[J].中国妇幼保健,2014,29(20):3289-3290
- [8] 杨艳玲,宋金青,秦炯.气相色谱-质谱联用分析在遗传代谢病筛查和诊断中的应用[J].中国医刊,2006,41(2):34-35
- [9] 罗小平,王慕逊,魏虹等.尿滤纸片法气相色谱-质谱分析技术在遗传性代谢病高危筛查诊断中的应用[J].中华儿科杂志,2003,41(4):245-248
- [10] 杨江涛,钱俊,林珊珊等.紫外分光光度法测定新生儿尿液中的肌酐含量[J].检验医学与临床,2015,12(增刊 1)
- [11] 曹奕,王艳萍,袁萍等.中国新生儿筛查率地域差异及其影响因素的空间关联分析[J].中华流行病学杂志,2011,32(1):93-94
- [12] 程静,刘丽,李秀珍等.滤纸尿半乳糖醇气相色谱/质谱分析在筛查希特林蛋白缺陷致新生儿肝内胆汁淤积症中的应用[J].实用儿科临床杂志.2012,27(8):628-630
- [13] 宋金青,杨艳玲,孙芳,张月华等.气相色谱-质谱联用分析在有机酸尿症筛查与诊断中的应用[J].中国医刊,2006,41(2):38-39