

GCMSMS 半定量法快速筛查新生儿遗传代谢疾病

王喜智¹ 王申¹ 宋博研²

1 赛默飞世尔科技（中国）有限公司

2 首都医科大学附属北京妇产医院检验科

关键词

GC-MS/MS; 衍生化; 半定量; SIM/Full Scan

摘要

本文建立了利用三重四极杆气质联用仪 TSQ9000 SIM/Full Scan 两种模式同时进行半定量法测定新生儿尿液中 134 种有机酸含量的方法。采用液液萃取法对新生儿尿样进行萃取，除水吹干后，加入 BSTFA+1%TMCS 衍生化，直接进样分析。首先利用 Full Scan 对正构烷烃 C8~C30 进行测定，得到其保留时间，然后利用正构烷烃的保留时间和保留指数及有机酸的保留指数计算出 134 种有机酸的保留时间，便可以创建 SIM 方法对未知样品进行测定，利用特定内标 MGA（十七烷酸）半定量得到每种有机酸的相对含量，为新生儿代谢病的诊断提供最初的依据。通过添加内标 TA（托品酸）计算方法回收率，提高了定量的准确性。在使用 SIM 采集数据的同时进行 Full Scan，有效的排除了假阳性情况。选取部分有机酸的标准溶液进行测定，对比其实际保留时间和正构烷烃计算保留时间的差异，误差均在小数点后第二位；连续 6 针进样，测定其重复性，峰面积的 RSD% 在 10% 以下。通过若干实际样品测定，证明利用正构烷烃计算保留时间有效，能够准确锁定每种有机酸，能够准确测定样品中含有的 134 种有机酸。

前言

遗传性代谢疾病（inherited metabolic diseases, IMD）又称为先天性代谢缺陷疾病（inborn errors of metabolism, IEM），是指由于基因突变引起酶缺陷、细胞膜功能异常或受体缺陷，从而导致机体生化代谢紊乱，造成中间或旁路代谢产物蓄积，或终末代谢产物缺乏，引起一系列临床症状的一组疾病。

由代谢酶缺陷引起的遗传疾病已超过 1000 种。IEM 单一病种发病率低，但是因其种类繁多，所以总体发病率较高。综合发病率约在 1/2555~1/784 之间。1963 年，Guthrie 率先提出用细菌抑制法分析血滤纸片样本的苯丙氨酸水平，并以此筛查苯丙酮尿症（phenylketonuria, PKU），随后美国儿童局对此方法大规模应用的可行性进行了调查，同年马萨诸塞州宣布对州内所有新生儿进行 PKU 检测，新生儿筛查（newborn screening）一词由此诞生。在很长一段时间内，传统的筛查方法（如 Guthrie 细菌抑制法、放射免疫分析法、酶联免疫吸附实验等）都属于“一种实验检测一种疾病”，费用高、周期长，不适用于多种疾病的群体筛查。1990 年，Millington 等首次将串联质谱（MS/MS）应用于新生儿筛查，此项技术快速、可靠，能在 2 分钟实现对一个标本进行几十种代谢产物的分析，大

大提高了检测效率，经过二十年的发展，现已在欧美发达国家得以推广普及，目前，美国已在其所属 50 个州内全面开展 IEM 筛查，筛查病种达 54 种。我国的新生儿疾病筛查起步于 20 世纪 80 年代初，并于 1994 年 10 月颁布了《中华人民共和国母婴保健法》，以法律形式确定了新生儿疾病筛查在疾病预防发面的地位，卫生部于 2010 年 11 月制订了《新生儿疾病筛查技术规范（2010 年版）》，对我国目前的两个主要筛查病种 PKU 及先天性甲状腺功能减低症（congenital hypothyroidism, CH）的筛查进行了进一步的规范指导，其新生儿筛查工作已在全国范围内得到普及。

在新生儿群体中，用快速、敏感的实验室方法对新生儿的遗传代谢病、先天性内分泌异常以及某些危害严重的遗传性疾病进行筛查，对那些患病的新生儿在临床症状尚未表现之前或表现轻微时通过筛查，得以早期诊断、早期治疗，防止机体组织器官发生不可逆的损伤。避免患儿发生智力低下、严重的疾病或死亡。

本文利用液液萃取法对新生儿尿液样品进行萃取，串联质谱 TSQ9000 SIM/Full Scan 两种模式同时进行的分析技术，建立了尿液中 134 种有机酸的分析方法，利用正构烷烃进行保留时间校正，操作方便快捷，灵敏度高，为新生儿遗传代谢疾病的诊断提供有力的依据。

1 实验部分

1.1 仪器

质谱仪：TSQ9000（赛默飞世尔科技，美国）；

气相色谱仪：Trace 1310 GC 配 AI1310 自动进样器（赛默飞世尔科技，美国）；

色谱柱：毛细管色谱柱 DB-5（30 m × 0.25 mm × 1 μm）；

1.2 分析条件

GC-MS/MS 条件：

进样口温度：280 °C

进样方式：分流进样（10:1，1 min）

柱温程序：100 °C（4min）_4 °C/min_280 °C（11 min）

恒压：100.2 kPa

进样量：1 μL

离子化方式：EI

离子源温度：300 °C

传输线温度：280 °C

采集方式：SIM/Full Scan，化合物保留时间及特征离子信息如表 1 所示。

1.3 样品处理

将已测定肌酐含量的尿液混合均匀，吸取相当于 0.2 mg 肌酐的尿液，加到 15 mL 离心管中，加入 20 μL 脲酶（1 unit/μL），涡旋混合后置于 37 °C 恒温 30 min，加入事先计算体积的内标溶液（MGA 和 C24：0.5 mg/mL，TA：1.0 mg/mL）和蒸馏水，使总液量达到 2mL，涡旋混合，然后加入 500 μL 5% 盐酸羟铵和 400 μL 2.5N 氢氧化钠溶液，混匀，室温静置 60 min 氧化，加入 350 μL 6N 盐酸溶液，混匀。（此时，样品处理可以暂停，放入 4 °C 冰箱冷藏）用乙酸乙酯萃取两次，涡旋、离心，每次 6 mL，合并两次萃取液至于离心管中，加入 5 g 无水硫酸钠，涡旋、离心，转移萃取液至新离心管中，氮吹至 1 mL 左右，转移至 1.5 mL 进样瓶中，氮吹至干，加入 100 μL BSTFA+1%TMCS 80 °C 衍生化 30 min，之后转移至内插管中，进样测定。

表 1. 组分名称、保留时间及特征离子

Compound	中文名	Ion	Retention index	Retention time
Lactic-2	乳酸 -2	219	1057	9.1468
Lactic-2	乳酸 -2	191	1057	9.1468
2-OH-isobutyric-2	2-羟基异丁酸 -2	205	1063	9.3412
2-OH-isobutyric-2	2-羟基异丁酸 -2	233	1063	9.3412
? Hexanoic-1	己酸 -1	173	1067	9.4708
? Hexanoic-1	己酸 -1	132	1067	9.4708
Glycolic-2	乙醇酸 -2	205	1070	9.568
Glycolic-2	乙醇酸 -2	177	1070	9.568
Glyoxylic-OX-2	乙醛酸 -OX-2	218	1125	11.43
Glyoxylic-OX-2	乙醛酸 -OX-2	233	1125	11.43

Oxalic-2	草酸 -2	219	1126	11.4656
Oxalic-2	草酸 -2	190	1126	11.4656
2-OH-butyric-2	2- 羟基丁酸 -2	205	1126	11.4656
3-OH-propionic-2	3- 羟基丙酸 -2	177	1142	12.0352
3-OH-propionic-2	3- 羟基丙酸 -2	219	1142	12.0352
Pyruvic-OX-2	丙酮酸 -OX-2	232	1149	12.2844
Pyruvic-OX-2	丙酮酸 -OX-2	247	1149	12.2844
No3 Valproic(VPA)-1	丙戊酸 -1	201	1150	12.32
No3 Valproic(VPA)-1	丙戊酸 -1	174	1150	12.32
3-OH-butyric-2	3- 羟基丁酸 -2	191	1159	12.6404
3-OH-butyric-2	3- 羟基丁酸 -2	233	1159	12.6404
? 3-OH-isobutyric-2	3- 羟基异丁酸 -2	177	1161	12.7116
? 3-OH-isobutyric-2	3- 羟基异丁酸 -2	233	1161	12.7116
2-OH-isovaleric-2	2- 羟基异戊酸 -2	219	1167	12.9252
2-OH-isovaleric-2	2- 羟基异戊酸 -2	247	1167	12.9252
2-Methyl-3-OH-butyric-1-2	2- 甲基 -3- 羟基丁酸 -1-2	247	1202	14.1722
2-Methyl-3-OH-butyric-1-2	2- 甲基 -3- 羟基丁酸 -1-2	218	1202	14.1722
Malonic-2	丙二酸 -2	233	1204	14.2444
Malonic-2	丙二酸 -2	133	1204	14.2444
3-OH-isovaleric-2	3- 羟基异戊酸 -2	247	1212	14.5332
3-OH-isovaleric-2	3- 羟基异戊酸 -2	205	1212	14.5332
2-Keto-isovaleric-OX-2	2- 酮 - 异戊酸 -OX-2	260	1214	14.6054
2-Keto-isovaleric-OX-2	2- 酮 - 异戊酸 -OX-2	232	1214	14.6054
Methylmalonic-2	甲基丙二酸 -2	247	1216	14.6776
Methylmalonic-2	甲基丙二酸 -2	218	1216	14.6776
Ethylhydracrylic-2	乙基羟基丙烯酸 -2	247	1232	15.2552
Ethylhydracrylic-2	乙基羟基丙烯酸 -2	177	1232	15.2552
Urea-2	尿素 -2	189	1237	15.4357
Urea-2	尿素 -2	171	1237	15.4357
4-OH-butyric-2	4- 羟基丁酸 -2	204	1238	15.4718
4-OH-butyric-2	4- 羟基丁酸 -2	233	1238	15.4718
*T ?2-OH-isocaproic-2	2- 羟基异癸酸 -2	261	1242	15.6162
*T ?2-OH-isocaproic-2	2- 羟基异癸酸 -2	233	1242	15.6162
? 3-OH-valeric-2	3- 羟基戊酸 -2	233	1242	15.6162
? 3-OH-valeric-2	3- 羟基戊酸 -2	247	1242	15.6162
Acetoacetic	乙酰乙酸	231	1249	15.8689
Acetoacetic	乙酰乙酸	246	1249	15.8689
2-OH-3-methylvaleric-2	2- 羟基 -3- 甲基戊酸 -2	261	1250	15.905
2-OH-3-methylvaleric-2	2- 羟基 -3- 甲基戊酸 -2	233	1250	15.905
Benzoic-1	安息香酸 -1	179	1251	15.9411
Benzoic-1	安息香酸 -1	105	1251	15.9411
Acetoacetic-OX-2	乙酰乙酸 -2	246	1261	16.3021
Acetoacetic-OX-2	乙酰乙酸 -2	261	1261	16.3021
Octanoic-1	辛酸 -1	201	1262	16.3382
Octanoic-1	辛酸 -1	117	1262	16.3382
2-Keto-3-methylvaleric-OX-2	2- 酮 -3- 甲基戊酸 -2	274	1276	16.8436
2-Keto-3-methylvaleric-OX-2	2- 酮 -3- 甲基戊酸 -2	200	1276	16.8436
*T 2-Methyl-3-OH-valeric-2(1)	2- 甲基 -3- 羟基戊酸 -2	203	1276	16.8436
*T 2-Methyl-3-OH-valeric-2(1)	2- 甲基 -3- 羟基戊酸 -2	115	1276	16.8436
Glycerol-3	甘油	205	1278	16.9158
Glycerol-3	甘油	218	1278	16.9158
Phosphoric-3	磷酸 -3	299	1279	16.9519
Phosphoric-3	磷酸 -3	314	1279	16.9519

? Acetylglycine-1	2- 甲基 -3- 羟基戊酸 -2	203	1279	16.9519
? Acetylglycine-1	2- 甲基 -3- 羟基戊酸 -2	115	1279	16.9519
Ethylmalonic-2	乙基丙二酸 -2	261	1283	17.0963
Ethylmalonic-2	乙基丙二酸 -2	217	1283	17.0963
*T 2-Methyl-3-OH-valeric-2(2)	2- 酮 - 异己酸 -OX-2	274	1284	17.1324
*T 2-Methyl-3-OH-valeric-2(2)	2- 酮 - 异己酸 -OX-2	200	1284	17.1324
2-Keto-isocaproic-OX-2	乙酰甘氨酸 -1	130	1291	17.3851
2-Keto-isocaproic-OX-2	乙酰甘氨酸 -1	174	1291	17.3851
Phenylacetic-1	苯乙酸 -1	193	1302	17.7802
Phenylacetic-1	苯乙酸 -1	164	1302	17.7802
Maleic-2	马来酸 -2	245	1306	17.9206
Maleic-2	马来酸 -2	170	1306	17.9206
Succinic-2	琥珀酸 -2	247	1313	18.1663
Succinic-2	琥珀酸 -2	172	1313	18.1663
Methylsuccinic-2	甲基琥珀酸 -2	261	1327	18.6577
Methylsuccinic-2	甲基琥珀酸 -2	217	1327	18.6577
Glyceric-3	甘油酸 -3	292	1339	19.0789
Glyceric-3	甘油酸 -3	307	1339	19.0789
Fumaric-2	尿嘧啶 -2	241	1345	19.2895
Fumaric-2	尿嘧啶 -2	256	1345	19.2895
Uracil-2	福马酸 -2	143	1346	19.3246
Uracil-2	福马酸 -2	245	1346	19.3246
Propionylglycine-1	丙酰甘氨酸 -1	188	1359	19.7809
Propionylglycine-1	丙酰甘氨酸 -1	159	1359	19.7809
*T Acetylglycine-1	乙酰甘氨酸 -1	218	1371	20.2021
*T Acetylglycine-1	乙酰甘氨酸 -1	246	1371	20.2021
*T Mevalonolactone-1	甲羟戊酸内酯 -2	187	1378	20.4478
*T Mevalonolactone-1	甲羟戊酸内酯 -2	229	1378	20.4478
*T Mevalonolactone-2	异丁酰甘氨酸 -1	202	1388	20.7988
*T Mevalonolactone-2	异丁酰甘氨酸 -1	173	1388	20.7988
Isobutyrylglycine-1	甲羟戊酸内酯 -1	187	1392	20.9392
Isobutyrylglycine-1	甲羟戊酸内酯 -1	157	1392	20.9392
2-Propyl-3-OH-pentanoic(VPA)-2	2- 丙基 -3- 羟基戊酸 (丙戊酸) -2	275	1393	20.9743
2-Propyl-3-OH-pentanoic(VPA)-2	2- 丙基 -3- 羟基戊酸 (丙戊酸) -2	289	1393	20.9743
Mesaconic(Methylfumaric)-2	甲基福马酸 -2	259	1399	21.1849
Mesaconic(Methylfumaric)-2	甲基福马酸 -2	184	1399	21.1849
Glutaric-2	戊二酸 -2	261	1403	21.3208
Glutaric-2	戊二酸 -2	158	1403	21.3208
3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	273	1417	21.7912
3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	183	1417	21.7912
3-Methylglutaric-2	3- 甲基戊二酸 -2	275	1426	22.0936
3-Methylglutaric-2	3- 甲基戊二酸 -2	247	1426	22.0936
2-Propyl-3-ketopentanoic(VPA)-2	2- 丙基 -3- 酮 - 戊酸 (丙戊酸) -2	287	1426	22.0936
2-Propyl-3-ketopentanoic(VPA)-2	2- 丙基 -3- 酮 - 戊酸 (丙戊酸) -2	155	1426	22.0936
*T Propionylglycine-2	丙酰甘氨酸 -2	260	1428	22.1608
*T Propionylglycine-2	丙酰甘氨酸 -2	232	1428	22.1608
Isobutyrylglycine-2	异丁酰甘氨酸 -2	274	1430	22.228
Isobutyrylglycine-2	异丁酰甘氨酸 -2	100	1430	22.228
2-Deoxytetronic	2- 脱氧 -4- 羟基乙酰乙酸	233	1439	22.5304
2-Deoxytetronic	2- 脱氧 -4- 羟基乙酰乙酸	321	1439	22.5304
*T Butyrylglycine-1	丁酰甘氨酸 -1	202	1442	22.6312
*T Butyrylglycine-1	丁酰甘氨酸 -1	173	1442	22.6312

3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	273	1444	22.6984
3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	183	1444	22.6984
Glutaconic-2	戊烯二酸 -2	259	1447	22.7992
Glutaconic-2	戊烯二酸 -2	230	1447	22.7992
Succinylacetone-OX-2(1)	琥珀酰丙酮 -OX-2(1)	212	1453	23.0008
Succinylacetone-OX-2(1)	琥珀酰丙酮 -OX-2(1)	227	1453	23.0008
Decanoic-1	癸酸 -2	229	1457	23.1352
Decanoic-1	癸酸 -2	145	1457	23.1352
2-Propyl-5-OH-pentanoic(VPA)-2	2- 丙基 -5- 羟基戊酸 (丙戊酸) -2	289	1484	24.0424
2-Propyl-5-OH-pentanoic(VPA)-2	2- 丙基 -5- 羟基戊酸 (丙戊酸) -2	185	1484	24.0424
3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	273	1484	24.0424
3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	183	1484	24.0424
Isovalerylglycine-1	异戊酰甘氨酸 -1	216	1487	24.1432
Isovalerylglycine-1	异戊酰甘氨酸 -1	189	1487	24.1432
*T Butyrylglycine-2	丁酰甘氨酸 -2	274	1492	24.3112
*T Butyrylglycine-2	丁酰甘氨酸 -2	289	1492	24.3112
Malic-3	苹果酸 -3	335	1496	24.4456
Malic-3	苹果酸 -3	233	1496	24.4456
Adipic-2	己二酸 -2	275	1507	24.804
Adipic-2	己二酸 -2	111	1507	24.804
Isovalerylglycine-2	异戊酰甘氨酸 -2	288	1518	25.156
Isovalerylglycine-2	异戊酰甘氨酸 -2	176	1518	25.156
? 2-Hexenedioic-2	2- 己烯酸 -2	273	1522	25.284
? 2-Hexenedioic-2	2- 己烯酸 -2	288	1522	25.284
5-Oxoproline-2(pyroglutamic)	5- 氧合脯氨酸 -2	258	1534	25.668
5-Oxoproline-2(pyroglutamic)	5- 氧合脯氨酸 -2	230	1534	25.668
Thiodiglycolic-2	3- 甲基己二酸	289	1537	25.764
Thiodiglycolic-2	3- 甲基己二酸	204	1537	25.764
? 3-methyladipic	亚硫基二乙酸 -2	204	1539	25.828
? 3-methyladipic	亚硫基二乙酸 -2	294	1539	25.828
2-Propyl-hydroxyglutaric(VPA)-2	2- 丙基 - 羟基戊二酸 (丙戊酸) -2	303	1551	26.212
2-Propyl-hydroxyglutaric(VPA)-2	2- 丙基 - 羟基戊二酸 (丙戊酸) -2	259	1551	26.212
7-OH-octanoic-2	7- 羟基 - 辛酸 -2	289	1551	26.212
7-OH-octanoic-2	7- 羟基 - 辛酸 -2	260	1551	26.212
5-OH-methyl-2-furoic-1	5- 羟基 - 甲基 -2- 糠酸 -1	271	1556	26.372
5-OH-methyl-2-furoic-1	5- 羟基 - 甲基 -2- 糠酸 -1	197	1556	26.372
Tiglylglycine-2	巴豆酰甘氨酸 -2	286	1564	26.628
Tiglylglycine-2	巴豆酰甘氨酸 -2	301	1564	26.628
3-Methylcrotonylglycine-1	3- 甲基巴豆酰甘氨酸 -1	214	1564	26.628
3-Methylcrotonylglycine-1	3- 甲基巴豆酰甘氨酸 -1	229	1564	26.628
Tiglylglycine-1	巴豆酰甘氨酸 -1	229	1571	26.852
Tiglylglycine-1	巴豆酰甘氨酸 -1	214	1571	26.852
*T 3-Methylcrotonylglycine-2	3- 甲基巴豆酰甘氨酸 -2	286	1578	27.076
*T 3-Methylcrotonylglycine-2	3- 甲基巴豆酰甘氨酸 -2	184	1578	27.076
*T 3-OH-glutaric-3 Cf#81	2- 羟基戊二酸 -3	349	1582	27.204
*T 3-OH-glutaric-3 Cf#81	2- 羟基戊二酸 -3	203	1582	27.204
2-OH-glutaric-3	3- 羟基戊二酸 -3	247	1583	27.236
2-OH-glutaric-3	3- 羟基戊二酸 -3	349	1583	27.236
Phenylactic	苯乳酸 -2	194	1600	27.78
Phenylactic	苯乳酸 -2	267	1600	27.78
Pimelic-2	庚二酸 -2	155	1605	27.9315
Pimelic-2	庚二酸 -2	289	1605	27.9315

*T IS-2(tropic acid)	内标 -2 (托品酸)	280	1610	28.083
*T IS-2(tropic acid)	内标 -2 (托品酸)	295	1610	28.083
3-OH-3-methylglutaric-3	3- 羟基 -3- 甲基戊二酸 -3	247	1613	28.1739
3-OH-3-methylglutaric-3	3- 羟基 -3- 甲基戊二酸 -3	273	1613	28.1739
3-OH-phenylacetic-2	3- 羟基 - 苯乙酸 -2	296	1617	28.2951
3-OH-phenylacetic-2	3- 羟基 - 苯乙酸 -2	281	1617	28.2951
4-OH-benzoic-2	2- 酮戊二酸 -2	362	1636	28.8708
4-OH-benzoic-2	2- 酮戊二酸 -2	377	1636	28.8708
4-OH-phenylacetic	4- 羟基 - 安息香酸 -2	267	1647	29.2041
4-OH-phenylacetic	4- 羟基 - 安息香酸 -2	282	1647	29.2041
2-Ketoglutaric-OX-2(1)	4- 羟基苯乙酸	296	1655	29.4465
2-Ketoglutaric-OX-2(1)	4- 羟基苯乙酸	281	1655	29.4465
2-Ketoglutaric-OX-2(2)	2- 酮 - 戊二酸 -2	362	1655	29.4465
2-Ketoglutaric-OX-2(2)	2- 酮 - 戊二酸 -2	377	1655	29.4465
Hexanoylglycine-1	己酰甘氨酸 -1	302	1655	29.4465
Hexanoylglycine-1	己酰甘氨酸 -1	200	1655	29.4465
*T Phenylpyruvic-OX-2	苯丙酮酸 -OX-2	308	1662	29.6586
*T Phenylpyruvic-OX-2	苯丙酮酸 -OX-2	147	1662	29.6586
N-Acetylaspartic-2	N- 乙酰门冬酰胺 -2	202	1665	29.7495
N-Acetylaspartic-2	N- 乙酰门冬酰胺 -2	304	1665	29.7495
2-OH-adipic-3	2- 羟基己二酸 -3	261	1683	30.2949
2-OH-adipic-3	2- 羟基己二酸 -3	363	1683	30.2949
? Octenedioic-2	辛烯二酸 -2	185	1686	30.3858
? Octenedioic-2	辛烯二酸 -2	301	1686	30.3858
3-OH-adipic-3	3- 羟基己二酸 -3	363	1691	30.5373
3-OH-adipic-3	3- 羟基己二酸 -3	247	1691	30.5373
Suberic-2	辛二酸 -2	303	1700	30.81
Suberic-2	辛二酸 -2	187	1700	30.81
*T 3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	345	1714	31.2132
*T 3-Methylglutaconic-2	3- 甲基戊烯二酸 -2	360	1714	31.2132
2-Keto-adipic-OX-3	2- 酮己二酸 -OX-3	302	1724	31.5012
2-Keto-adipic-OX-3	2- 酮己二酸 -OX-3	258	1724	31.5012
Aconitic-3	乌头酸 -3	229	1754	32.3652
Aconitic-3	乌头酸 -3	375	1754	32.3652
Orotic-3	乳清酸 -3	357	1758	32.4804
Orotic-3	乳清酸 -3	254	1758	32.4804
Vanillic-2	香草酸 -2	312	1775	32.97
Vanillic-2	香草酸 -2	297	1775	32.97
Homovanillic-2(HVA)	高香草酸 -2	326	1782	33.1716
Homovanillic-2(HVA)	高香草酸 -2	311	1782	33.1716
Azelaic-2	壬二酸 -2	317	1799	33.6612
Azelaic-2	壬二酸 -2	152	1799	33.6612
Hipupuric-2	马尿酸 -2	323	1819	34.2087
Hipupuric-2	马尿酸 -2	308	1819	34.2087
Isocitric-4	异柠檬酸 -4	245	1839	34.7547
Isocitric-4	异柠檬酸 -4	465	1839	34.7547
Citric-4	柠檬酸 -4	273	1839	34.7547
Citric-4	柠檬酸 -4	465	1839	34.7547
Hippuric-1	尿黑酸 -3	384	1849	35.0277
Hippuric-1	尿黑酸 -3	341	1849	35.0277
Homogentisic-3	马尿酸 -1	236	1850	35.055

Homogentisic-3	马尿酸 -1	206	1850	35.055
Methylcitric-4(1)	甲基枸橼酸 -4 (1)	389	1862	35.3826
Methylcitric-4(1)	甲基枸橼酸 -4 (1)	479	1862	35.3826
3-(3-OH-phenyl)-3-OH-propionic-3	3- (3- 羟基苯) -3- 羟基丙酸 -3	280	1864	35.4372
3-(3-OH-phenyl)-3-OH-propionic-3	3- (3- 羟基苯) -3- 羟基丙酸 -3	398	1864	35.4372
Methylcitric-4(2)	甲基枸橼酸 -4 (2)	389	1871	35.6283
Methylcitric-4(2)	甲基枸橼酸 -4 (2)	479	1871	35.6283
*T 3-OH-octenedioic-3	3- 羟基 - 辛烯二酸 -3	233	1879	35.8467
*T 3-OH-octenedioic-3	3- 羟基 - 辛烯二酸 -3	389	1879	35.8467
*T 3-OH-suberic-3	3- 羟基 - 辛二酸 -3	169	1881	35.9013
*T 3-OH-suberic-3	3- 羟基 - 辛二酸 -3	391	1881	35.9013
Vanilmandelic-3(VMA)	香草扁桃酸 -3 (VMA)	297	1894	36.2562
Vanilmandelic-3(VMA)	香草扁桃酸 -3 (VMA)	371	1894	36.2562
Sebacic-2	癸二酸 -2	331	1896	36.3108
Sebacic-2	癸二酸 -2	215	1896	36.3108
Decadienedioic-2	癸二烯 -2	195	1905	36.5505
Decadienedioic-2	癸二烯 -2	327	1905	36.5505
4-OH-phenyllactic(PHPLA)-2	4- 羟基 - 苯乳酸 -2	308	1918	36.8898
4-OH-phenyllactic(PHPLA)-2	4- 羟基 - 苯乳酸 -2	293	1918	36.8898
4-OH-phenylpyruvic(PHPPA)-OX-2	4- 羟基苯丙酮酸 -OX-2	396	1954	37.8294
4-OH-phenylpyruvic(PHPPA)-OX-2	4- 羟基苯丙酮酸 -OX-2	179	1954	37.8294
*T 2-OH-hippuric-3	2- 羟基马尿酸 -3	396	1973	38.3253
*T 2-OH-hippuric-3	2- 羟基马尿酸 -3	411	1973	38.3253
Indole-3-acetic-2	吲哚 -3- 乙酸 -2	202	1984	38.6124
Indole-3-acetic-2	吲哚 -3- 乙酸 -2	319	1984	38.6124
*T Suberylglycine-2	辛二酰甘氨酸 -2	360	2026	39.6774
*T Suberylglycine-2	辛二酰甘氨酸 -2	229	2026	39.6774
Palmitic-1	棕榈酸 -1	313	2046	40.1754
Palmitic-1	棕榈酸 -1	269	2046	40.1754
2-OH-sebacic-3	2- 羟基癸二酸 -3	317	2059	40.4991
2-OH-sebacic-3	2- 羟基癸二酸 -3	391	2059	40.4991
3-OH-sebacic-3	3- 羟基癸二酸 -3	303	2074	40.8726
3-OH-sebacic-3	3- 羟基癸二酸 -3	233	2074	40.8726
2-OH-hippuric-2	2- 羟基马尿酸 -2	324	2086	41.1714
2-OH-hippuric-2	2- 羟基马尿酸 -2	206	2086	41.1714
Dodecanedioic-2	十二烷二元酸 -2	359	2092	41.3208
Dodecanedioic-2	十二烷二元酸 -2	243	2092	41.3208
*T N-Acetyltyrosine-3	N- 乙酰酪氨酸 -2	308	2119	41.9741
*T N-Acetyltyrosine-3	N- 乙酰酪氨酸 -2	424	2119	41.9741
Uric-4	尿酸 -4	456	2127	42.1653
Uric-4	尿酸 -4	441	2127	42.1653
MGA	内标 -1 (17 烷酸)	327	2146	42.6194
MGA	内标 -1 (17 烷酸)	145	2146	42.6194
3,6-Epoxydodecanedioic-2	3,6- 环氧十二烷二酸 -2	201	2171	43.2169
3,6-Epoxydodecanedioic-2	3,6- 环氧十二烷二酸 -2	174	2171	43.2169
3-OH-dodecanedioic-3	3- 羟基 - 十二烷二酸 3	233	2262	45.3236
3-OH-dodecanedioic-3	3- 羟基 - 十二烷二酸 3	447	2262	45.3236
*T 3,6-Epoxytetradecanedioic-2	3,6- 环氧十四烷烯 -2	201	2361	47.5259
*T 3,6-Epoxytetradecanedioic-2	3,6- 环氧十四烷烯 -2	159	2361	47.5259
Tetracosane(C24)	24 烷	99	2400	48.38
Tetracosane(C24)	24 烷	67	2400	48.38

2. 结果讨论

2.1 色谱图

RT: 0.00 - 60.09

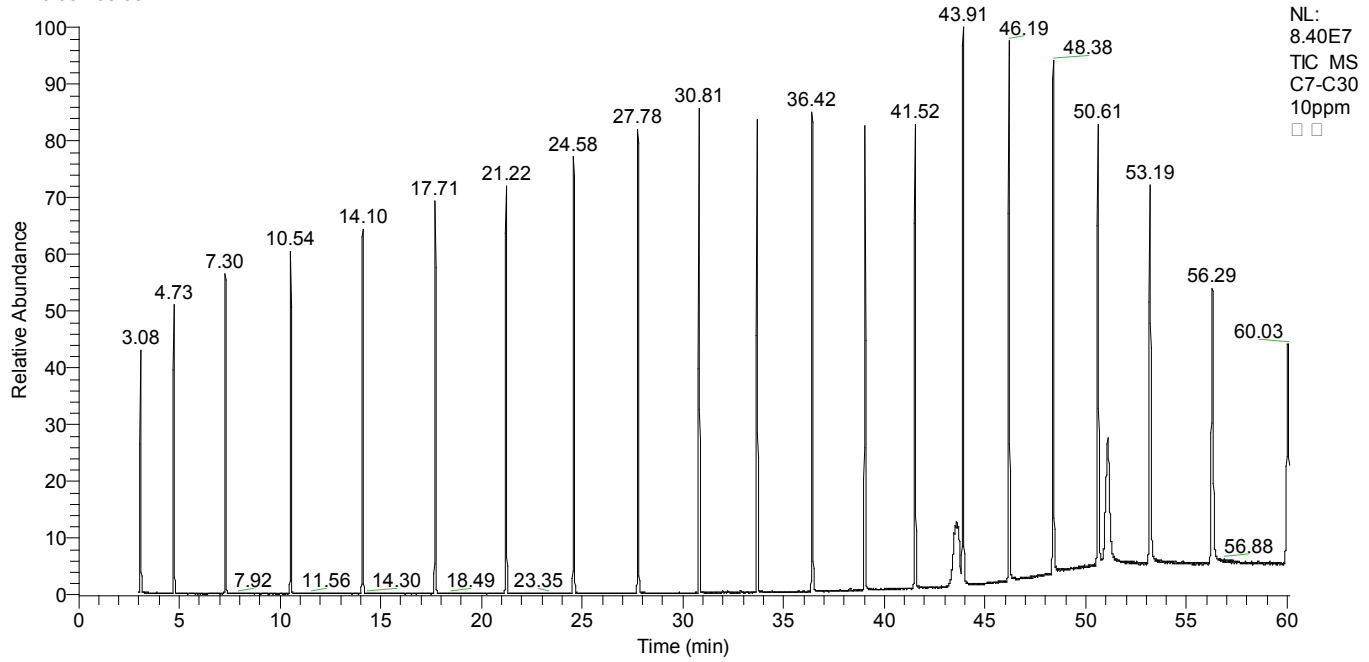


图 1. C8-C28 Full Scan 色谱图

RT: 7.47 - 55.15

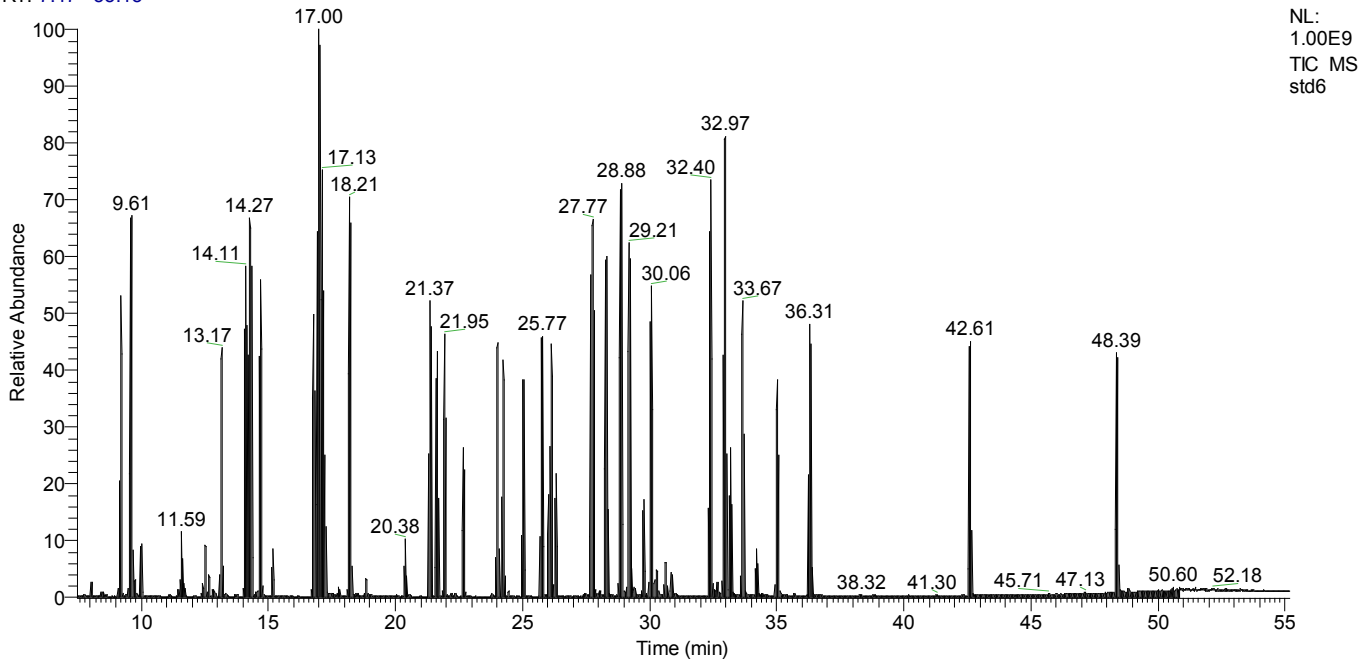


图 2. 基质加标 (含内标 26 种) 色谱图

2.2 正构烷烃法校正保留时间

利用不同化合物在相同色谱柱上与正构烷烃出峰的相对位置不变的原理，通过 134 种有机酸的保留指数及测得正构烷烃的保留时间，利用如下公式，即可计算出每一种有机酸的保留时间。

$$RT_T = RT_1 + (RT_2 - RT_1) \times \frac{RI_T - RI_1}{RI_2 - RI_1}$$

RI_T, RT_T: 目标化合物的保留指数和保留时间

RI₁, RT₁: 位于目标化合物前面（左侧）的正构烷烃的保留指数和保留时间

RI₂, RT₂: 位于目标化合物后面（右侧）的正构烷烃的保留指数和保留时间

已将此公式写于 Excel 表格中，只需输入 RT₁ 和 RT₂ 即可自动得出对应化合物的保留时间，如图 3 所示。

1	Compound	中文名	Ion	Retention index	Retention time	Alkanes RT1	Alkanes RT2
2	Lactic-2	乳酸-2	219	1057	0		C10-C11
3	Lactic-2	乳酸-2	191	1057	0		
4	2-OH-isobutyric-2	2-羟基异丁酸-2	205	1063	0		
5	2-OH-isobutyric-2	2-羟基异丁酸-2	233	1063	0		
6	? Hexanoic-1	己酸-1	173	1067	0		
7	? Hexanoic-1	己酸-1	132	1067	0		
8	Glycolic-2	乙醇酸-2	205	1070	0		
9	Glycolic-2	乙醇酸-2	177	1070	0		
10	Glyoxylic-OX-2	乙醛酸-OX-2	218	1125	0		C11-C12
11	Glyoxylic-OX-2	乙醛酸-OX-2	233	1125	0		
12	Oxalic-2	草酸-2	219	1126	0		
13	Oxalic-2	草酸-2	190	1126	0		
14	2-OH-butyric-2	2-羟基丁酸-2	205	1126	0		
15	2-OH-butyric-2	2-羟基丁酸-2	233	1126	0		
16	3-OH-propionic-2	3-羟基丙酸-2	177	1142	0		
17	3-OH-propionic-2	3-羟基丙酸-2	219	1142	0		
18	Pyruvic-OX-2	丙酮酸-OX-2	232	1149	0		
19	Pyruvic-OX-2	丙酮酸-OX-2	247	1149	0		
20	No3 Valproic(VPA)-1	丙戊酸-1	201	1150	0		
21	No3 Valproic(VPA)-1	丙戊酸-1	174	1150	0		

图 3. 有机酸保留时间校正

2.3 重复性测定

将已有的部分有机酸添加到正常新生儿尿液中，通过上述前处理，之后重复进样 6 次，计算每种有机酸峰面积的 RSD% 值，详见表 2。

表 2. 添加有机酸信息及峰面积的 RSD% (n=6)

Compound	R1	R2	R3	R4	R5	R6	RSD%
Glycolic-2	15375883	14849787	14855446	14237297	14891770	14120642	3.17
Malonic-2	14084844	15851118	14248887	13014467	13115417	14309869	7.29
2-Methyl-3-OH-butyric-1-2	5668961	5883018	6090423	5518193	5973767	5580607	3.98
Methylmalonic-2	7958418	7487721	6794711	6406728	6387645	6456710	9.54
Phosphoric-3	359504943	340966989	341894374	316891649	323706886	301691000	6.26
Ethylmalonic-2	20188041	20900178	19347827	18347333	18621951	18228556	5.62

Succinic-2	33182759	36058299	39586493	37408871	37607798	37451279	5.79
Glutaric-2	54082961	58315207	46495429	45239266	47061336	45603228	10.96
3-Methylglutaconic-2(1)	3208827	3626416	3653114	3152271	3318732	3157523	6.87
3-Methylglutaconic-2(2)	7984367	7856629	8436446	7587433	7891808	7801069	3.57
Thiodiglycolic-2	124322536	110564428	105484607	108780148	101227143	106282813	7.27
3-Methylglutaconic-2(3)	4601185	4259075	4662344	4287359	4607051	4153600	4.95
5-OH-methyl-2-furoic-1	42280571	48161282	45153057	47525827	49550811	44134394	5.94
Phenyllactic	61642882	62667289	56755275	51959232	54573320	50421420	8.90
*T IS-2(tropic acid)	250816447	257613386	234065384	221655298	224930585	210358580	7.74
3-OH-phenylacetic-2	84297333	81235059	74514623	68734984	71703496	70550047	8.31
4-OH-benzoic-2	423077015	440489474	381645815	360262309	371934203	355250491	9.00
4-OH-phenylacetic	89126416	95202481	79845906	76029189	78654578	74109743	10.02
Aconitic-3	171147163	182659462	152826214	147416770	151795019	144554216	9.52
Vanillic-2	108310378	119231157	99927556	94304195	95827741	92951893	10.02
Homovanillic-2(HVA)	15500117	15831132	15366214	13414990	14549872	12760081	8.52
Azelaic-2	80057013	80399587	70703303	65482434	67629480	62751481	10.52
Citric-4	494170031	527974181	478772051	477092646	481035161	421638205	7.17
Hippuric-1	114479336	120946692	108579568	101492988	101755012	98557053	8.10
Sebacic-2	76374319	74807301	66278463	63189876	64411252	64329588	8.51
Tetracosane(C24)	49515735	43530929	47777281	44346798	45608893	38543447	8.49

2.3 实际样品测定

利用上述方法,对实际样品进行了测定,如下图4,上图为患有癫痫性脑病的4个月婴儿尿样,下图为正常2个月婴儿尿样。

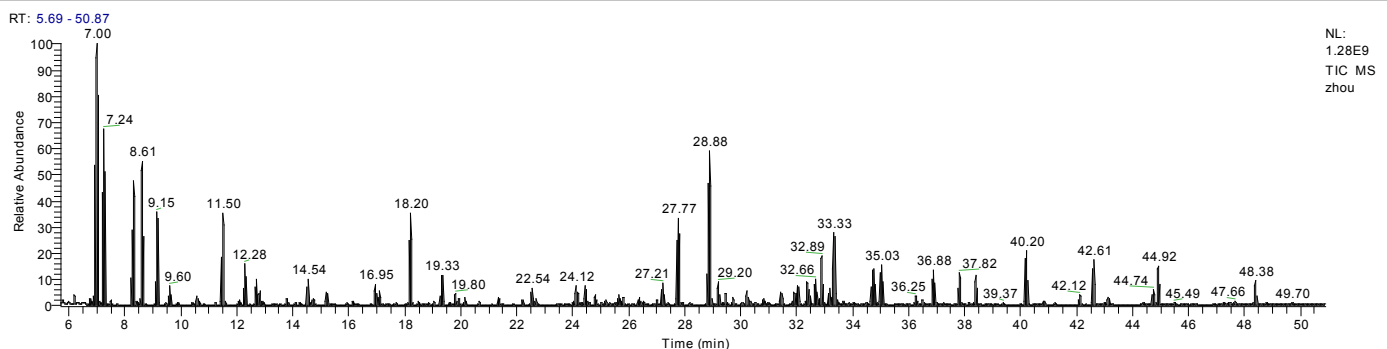
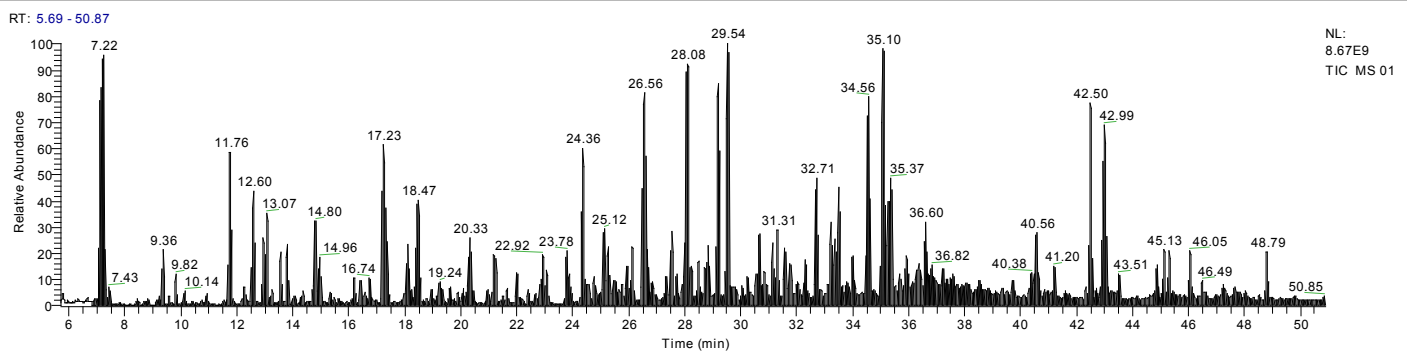


图 4. 实际样品色谱图

3. 结论

采用赛默飞世尔科技三重四极杆气质联用仪 TSQ9000 建立了测定新生儿尿液样品中 134 种有机酸的方法，该方法无需标液，利用正构烷烃计算每种化合物的保留时间，操作简单，重现性好，通过串联质谱 SIM/Full Scan 模式进行分析，在准确定量的同时还能有效排除假阳性，提高了检测结果的可靠性，能够为新生儿遗传代谢疾病的筛查与诊断提供初步的有力依据。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
和质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C