

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.015

甲基丙二酸质控滤纸片的配制及其气相色谱-质谱联用技术检测尿液有机酸的应用评估

余晓英,张道杰,王小慧

(北京圣元惠仁医学检验所生化遗传室 101101)

摘要:目的 探讨甲基丙二酸质控滤纸片的配制方法及其在气相色谱-质谱联用技术测定尿有机酸方法中的应用价值。**方法** 收集健康者尿液标本,根据肌酐值及目标浓度添加甲基丙二酸溶液,配成甲基丙二酸尿液。采用 4 cm×6 cm 专用滤纸片浸取甲基丙二酸尿液后自然晾干,制成甲基丙二酸质控滤纸片。根据 CNAS-GL03 要求,对质控滤纸片的均匀性、稳定性进行评价。**结果** 甲基丙二酸质控滤纸片的最终浓度达到目标浓度,均匀性、稳定性评估结果表明该质控品基质均匀、稳定期至少 1 年。**结论** 本研究成功配制了用于气相色谱-质谱联用技术检测有机酸的甲基丙二酸质控滤纸片,为研制含其他有机酸的复合项目室内质控品提供了思路。

关键词:甲基丙二酸; 质控品; 气相色谱-质谱联用技术; 尿液有机酸

中图法分类号:R446.19

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)01-0051-03

Preparation of methylmalonic acid control filter paper and application evaluation in the determination of urinary organic acid by gas chromatography-mass spectrometry

YU Xiaoying, ZHANG Daojie, WANG Xiaohui

(Department of Biochemical Genetics, Beijing Shengyuan Huiren Clinical Laboratory Ltd., Beijing 101101, China)

Abstract: Objective To explore the method of preparing methylmalonic acid control based filter paper in laboratory and its value in gas chromatography-mass spectrometry for the determination of urinary organic acid. **Methods** Normal urine samples were collected, and methylmalonic acid solution was added according to the creatinine value and the target concentration, dubbed methylmalonic acid urine. With 4 cm × 6 cm special filter paper leaching methylmalonic acid urine and then dried to produce methylmalonic acid quality control filter paper, uniformity and stability and was evaluated according to CNAS-GL03. **Results** The final concentration of methylmalonic acid control filter paper reached the target concentration, and the uniformity and stability results showed that the quality control matrix was uniform and stable for at least one year. **Conclusion** The methylmalonic acid control filter paper has been successfully prepared for the detection of organic acids by gas chromatography-mass spectrometry. It fills the blank of the test system without indoor quality assessment, and provides ideas for the development of composite project with other organic acids.

Key words: methylmalonic acid; quality control products; gas chromatography-mass spectrometry; urinary organic acid

遗传代谢病病因复杂,临床表现缺乏特异性,需依靠液相串联质谱(MSMS)及气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析技术等特殊生化分析技术进行诊断。基于标本留取和运输的便利,MSMS 主要检测干血滤纸片中的多种氨基酸和酰基肉碱,GC-MS 主要检测尿滤纸片中的多种有机酸^[1]。2 种质谱技术各有特点、相互补充,广泛应用于氨基酸代谢病、脂肪酸代谢病和有机酸代谢病的筛查和诊断。目前,检测干血滤纸片中多种氨基酸和酰基肉碱的 MSMS 检测系统仪器和试剂盒,均有国家食品药品监督管理总局的注册产品,有商品化的成熟室内质控品,因此检测比较规

范^[2]。而检测尿滤纸片中的多种有机酸的 GC-MS 检测系统在实际应用中还有不少问题,不但无国家食品药品监督管理总局的注册仪器和配套试剂盒,也无商品化的室内质控品,因此该检测领域尚未开展行业要求的室内质控。本实验室从最常用的检测项目——甲基丙二酸着手,配制室内质控品,并对其均匀性和稳定性进行评估。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取经体检肝、肾功能正常、无遗传病史、1 周内未服用任何药物的 6~7 例成人,每例留取空腹晨尿 200~250 mL,置于 1 个带盖的干净大玻

璃瓶中充分混匀。取 200 μL 检测肌酐, 剩余尿液标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂 气相色谱质谱联用仪(型号: Shimadzu GC-MS-QP2010 ULTRA, 日本岛津公司产品)。十七烷酸、托品酸、二十四烷、尿素酶(美国西格玛奥德里奇公司产品); 硅烷化衍生剂 BSTFA : TMCS=90 : 10(上海安谱科学仪器公司产品); 甲基丙二酸(上海九鼎化学科技有限公司产品)。试剂配制浓度为十七烷酸、二十四烷: 0.5 mg/mL; 托品酸 1.0 mg/mL; 甲基丙二酸溶液: 0.5 mg/mL、100.0 mg/mL。

1.3 仪器分析流程 标本经前处理后上机检测, 经 GC-MS solution 软件工作站进行色谱和质谱分析, 采用先天性代谢异常筛查诊断软件(Inborn Errors of Metabolism Screening System)对色谱和质谱图进行数据处理与化学诊断, 再传入实验室信息系统(LIS)进行室内质控分析和检测报告签发^[3]。

1.4 质控品的配制及评估

1.4.1 初始样品及质控测试样品浓度测定 根据基础尿液肌酐值, 取 2 份浓度为 0.2 mg 肌酐的尿液标本, 1 份作为初始样品; 另 1 份加入 0.5 mg/mL 的甲基丙二酸 40 μL (与内标十七烷酸加入量一致), 充分混匀配制成质控测试样品。2 份样品分别执行有机酸检测前处理: 加入尿素酶, 混匀, 分解尿素; 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、2.5N 氢氧化钠溶液, 进行脎化反应避免 α 酮酸漏检; 加入 6N 盐酸溶液充分混匀, 调节溶液 pH 值; 再用乙酸乙酯萃取 2 次, 合并上清液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干; 最后加入硅烷化试剂(BSTFA : TMCS=90 : 10)衍生, GC-MS 分析测定。使用 GC-MS 先天性代谢异常诊断软件进行数据处理, 获得甲基丙二酸结果。

1.4.2 质控尿液配制 根据步骤 1.4.1 中初始样品及质控测试样品的甲基丙二酸测定结果, 计算配成 1 000 mL 目标浓度的质控尿液需加入甲基丙二酸的数量, 加入 1 000 mL 尿液中充分混匀后, 取相当于 0.2 mg 肌酐的尿液标本, 执行有机酸检测前处理, GC-MS 分析得出质控尿液最终浓度。

1.4.3 甲基丙二酸质控滤纸片的配制 采用 4 cm \times 6 cm 专用滤纸片(与被检者使用滤纸片相同)充分浸

取质控尿液后自然晾干, 制成甲基丙二酸质控滤纸片, 分装后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存^[4]。

1.4.4 均匀性和稳定性评估 按照 CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》进行稳定性和均匀性评价^[4]。随机抽取 10 份标本(每份含 4 张滤纸片), 先将每份标本中的 2 片干滤纸片卷曲后放入 2.5 mL 针筒, 用去离子水浸泡洗脱, 等滤纸片充分湿润后离心, 得到滤纸尿, 检测肌酐值。根据滤纸尿肌酐值取相当于 0.2 mg 肌酐的尿液标本执行前处理, 于 GC-MS 检测。使用每份标本中的另外 2 片干滤纸片重复上述步骤 1 次。记录检测结果, 使用方差分析计算 F 值, 若 $F < F_{0.05(9,10)}$, 说明分装样品间差异无统计学意义, 均匀性评估通过。配制分装后及 3、6、9、12 个月后, 均随机抽取 6 份标本(每份含 2 张滤纸片)分别测定, 记录测定值, 计算均值及标准差, 计算 t 值, 若 $t < t_{0.05,10}$, 表示稳定性评估通过。

2 结果

2.1 基础尿液样品中肌酐检测结果 基础尿液样品肌酐检测值: 7 547 $\mu\text{mol/L}$, 肌酐摩尔质量: 113.1 g/mol, 通过换算可知肌酐 7 547 $\mu\text{mol/L}$ 相当于 850 mg/L。

2.2 基础尿液样品、质控测试样品及调配后的质控尿液中甲基丙二酸检测结果 基础尿液样品甲基丙二酸检测结果为 0 $\mu\text{g/mg}$ 的肌酐, 质控测试样品甲基丙二酸检测结果为 27.33 $\mu\text{g/mg}$ 的肌酐。根据既往本实验室甲基丙二酸尿症患者检测结果的均值显示, 将质控尿液配制的预计浓度调为 273.3 $\mu\text{g/mg}$ 的肌酐, 可以满足监测阳性结果的需要。由此可计算配成 1 000 mL 的质控尿液需加入的甲基丙二酸的数量为 0.85 g, 即加入 100 mg/mL 的甲基丙二酸溶液 8.5 mL。调配后质控尿液甲基丙二酸检测结果为 247.48 $\mu\text{g/mg}$ 的肌酐。

2.3 均匀性评价结果 随机抽取 10 份甲基丙二酸质控滤纸片的甲基丙二酸进行检测。单因子方差分析结果显示, 经统计分析, F 值为 0.33, 经查表 F 临界值 $F_{0.05(9,10)} = 3.02$, 结果计算的 F 值 $< F$ 临界值, 均匀性测试通过。见表 1。

表 1 10 份质控滤纸片甲基丙二酸测试结果($\mu\text{g/mg} \cdot \text{肌酐}$)

测定次数	标本 1	标本 2	标本 3	标本 4	标本 5	标本 6	标本 7	标本 8	标本 9	标本 10
1	240.69	219.92	217.68	227.32	229.61	221.49	237.28	201.26	227.42	224.87
2	236.74	266.55	225.38	230.80	231.56	256.42	249.54	250.31	235.46	244.56

2.4 稳定性评价结果 配制分装后及 3、6、9、12 个月后, 分别随机抽取 6 份标本的甲基丙二酸进行检测。稳定性评估结果显示, 经统计计算第 3、6、9、12

个月稳定性 t 值分别为 0.52、1.51、1.58、0.16, 均小于 t 临界值($t_{0.05,10} = 2.23$), 稳定性测试通过, 说明所配制的甲基丙二酸质控滤纸片 12 个月稳定性良好。

见表 2。

表 2 6 份标本配制分装后及 3、6、9、12 个月后甲基丙二酸测试结果 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

类别	分装后	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月
标本 1	257.25	249.43	282.05	258.29	240.50
标本 2	286.83	303.88	306.54	280.42	202.43
标本 3	153.83	278.30	308.60	300.61	245.66
标本 4	195.52	272.48	294.88	264.85	203.71
标本 5	194.10	191.93	227.85	281.50	274.37
标本 6	303.93	191.46	230.39	247.87	250.93
X	231.91	247.91	275.05	272.26	236.27
S	59.49	46.87	36.83	18.98	28.21

3 讨 论

目前 GC-MS 定量测定尿液含甲基丙二酸在内的 100 多种有机酸,是根据多种被测物质与同一种内标(十七烷酸)色谱峰面积的比值进行计算而完成,不是每个被测物质与各自内标相比计算得到,原因是目前尚无法得到含 100 多种被测成分相应内标的混合内标,因此 GC-MS 测定尿液 100 多种有机酸是相对定量。在加入的内标中,除十七烷酸外,还有二十四烷、托品酸,用于监测色谱保留时间及阳性对照。根据上述定量原理可知,一旦内标十七烷酸配制时间过长、稳定性差、加样出偏差、质谱离子强度读取等方面出现问题,包括甲基丙二酸在内的 100 多种有机酸检测结果均会发生偏差,且上机前的标本处理包括提取滤纸片尿液、测定肌酐浓度、加尿样、脲酶处理、氧化、调节 pH 值、加内标、萃取、氮气吹干及硅烷化试剂衍生等复杂、耗时的步骤。所以要想获得稳定、可靠的检测结果,进行室内质控是需要解决的问题。但目前尚无商品化的专门用于 GC-MS 测定 100 多种有机酸的室内质控品。为解决这一问题,本实验室从甲基丙二酸(筛查和诊断甲基丙二酸尿症的必须指标)着手,尝试配制室内质控品。

首先应考虑使用与患者标本前处理和检测系统响应方式尽可能接近的质控物^[5]。为避免基质效应,本实验室选择了与患者样品一致的人新鲜尿液作为基质。然后在基础尿液中添加甲基丙二酸,使其浓度达到约为既往甲基丙二酸尿症患者检测结果的均值。为实现此目的,本实验室采用先加入与内标物相同数量的甲基丙二酸进行测试,根据测试结果再进行调配,最终配制出预计浓度的质控品。这样既能起到监控甲基丙二酸阳性标本的作用,又能避免配制的甲基丙二酸浓度过高而引起 GC-MS 检测器的饱和。

在配制及保存过程中,应注意防污染,盛放尿液的容器在使用前需进行清洗;配制准备期间的尿液需低温储存;批量滤纸片浸取同一批次尿液需连续完成,并于自然条件下充分晾干;晾干后的质控滤纸片需配上干燥剂密封、冷冻保存。

足够的均匀性和良好的稳定性是确保质控效果的前提^[6]。按照 CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》对自配甲基丙二酸质控滤纸片进行稳定性和均匀性评价,结果表明均匀性及稳定性均能符合要求。本研究将自配的甲基丙二酸质控滤纸片用于日常室内质控,取得了较好的质控效果。如 2018 年 3 月 1—5 日,发现甲基丙二酸质控结果持续增高,而二十四烷、托品酸结果正常,在排除了人员操作、仪器状态等问题后,发现是内标十七烷酸配制时间过长所致,于是修改相关 SOP,明确内标配置间隔时间,并进行新旧内标工作液批号验证。若不进行室内质控,仅根据二十四烷、托品酸结果判断患者检测结果是否可靠,则发现不了此类问题,可能出现甲基丙二酸尿症假阳性结果。

目前采用气相色谱-质谱联用仪从尿液中能检测出 100 多种有机酸,可检测 40 余种代谢病^[7]。除甲基丙二酸尿症外,丙酸尿症、戊二酸尿症 I 型等也较常见,因此含其他有机酸的复合项目室内质控品研制很有必要,本研究对此提供了研制思路。

综上所述,本研究成功配制了用于气相色谱-质谱联用技术检测有机酸的甲基丙二酸质控滤纸片,为研制含其他有机酸的复合项目室内质控品提供了思路。

参考文献

- [1] 杨江涛,林珊珊,戴子鹏,等.遗传代谢病筛查中干尿滤纸片制作及洗脱方法探讨[J].检验医学与临床,2016,13(7):942-943.
- [2] 田明新,张道杰,崔小昭,等.氨基酸及肉碱非衍生化串联质谱法检测系统的性能验证[J].国际检验医学杂志,2016,37(21):3021-3023.
- [3] KIMURA M, YAMAMOTOT T, YAMAGUCHI S, et al. Automatic auromated metabolic profiling and interpretation of GCMS data for organic acidemia screening a personal computer based system[J]. Tohoku J Exp Med, 1999,18(8):317-334.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会.能力验证样本均匀性和稳定性评价指南:CNAS-GL03[S].北京:中国合格评定国家认可委员会,2018.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会.医学实验室质量和能力认可准则:CNAS-CL02[S].北京:中国合格评定国家认可委员会,2014.
- [6] 金献忠,郑曙昭,丘寅.能力验证样品均匀性和稳定性检验的统计方法[J].现代测量与实验室管理,2003,11(4):35-37.
- [7] 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.