

## 【解决方案】GC×GC TOF MS 3300 全二维气相色谱-飞行时间质谱

### 应用于人体尿液分析

## 1 前言

人体排出代谢废物的主要途径之一是排尿，通过尿液检查可以判断相应的病症。遗传性代谢缺陷病是有机酸、氨基酸、糖、脂肪、激素等多种物质代谢缺陷的总称，虽然单一病种发病率低，但病种繁多，总体发病率较高。目前已认识的遗传代谢病已达 500 余种。利用气相色谱-飞行时间质谱联用仪（gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, 简称 GC TOF MS）检测技术进行代谢性疾病的诊断，目前用此方法同时筛查氨基酸、有机酸、糖代谢异常及脂肪代谢紊乱等一百多种疾病。本文采用全二维气相色谱-飞行时间质谱联用仪对人体尿液样品进行了分析，并与气相色谱-飞行时间质谱联用仪分析结果进行了比较，获得了更准确、更丰富的样品组分信息。

## 2 实验部分

### 2.1 主要设备与试剂

GC×GC TOF MS 3300 全二维气相色谱-飞行时间质谱联用仪  
分析天平  
涡旋混合器  
离心机  
氮吹仪  
烘箱  
冰箱  
移液枪  
PH 试纸  
容量瓶  
具塞玻璃试管  
盐酸羟胺（优级纯）  
盐酸（优级纯）  
氯化钠（优级纯）  
乙酸乙酯（色谱纯）

### 2.2 样品处理

采用干燥洁净的容器采集人体新鲜尿液，分装到离心管，冷藏保存。

取约 20mL 人体尿样于 50mL 塑料离心试管中，于冰箱中冷藏 1h，然后放置于离心机中以 4000r/min 离心 10min，然后取上层澄清尿样 2mL 于 10mL 的玻璃具塞试管中，加入 1mL 5%盐酸羟胺水溶液，涡旋混匀，室温下进行脎化反应 1h；脎化反应完成后加入浓盐酸调节 PH 值为 1，加入氯化钠使水层饱和（约 1g），然后用 6mL 乙酸乙酯涡旋提取两次，将两次的提取液合并于同一玻璃具塞试管中（共准确移取出 5mL），然后于氮吹仪中 60℃慢慢吹干，吹干后加入 200 $\mu$ L 衍生化试剂（BSTFA+TMCS 99:1），涡旋混合，然后放置于烘箱中于 80℃衍生化反应 30min，反应完成后将其转移至 2mL 小样品瓶中，然后取 1 $\mu$ L 进仪器分析。

### 2.3 分析条件

GC TOF MS 分析条件：

一维色谱柱： DB-5MS (25m×0.25mm×0.25μm) ，  
程序升温： 70℃ (保持 5min) -6℃/min -220℃(保持 3min) -10℃/min -325℃(保持 5min)；  
进样口温度： 260℃；  
载气： 高纯氮 (纯度 99.999%以上) ；  
进样方式： 不分流进样， 开阀时间 50s， 阀开后分流 30:1；  
进样量： 0.5μL；  
流速： 1.0mL/min， 恒流；  
溶剂延迟： 4.5min。

#### **GC×GC TOF MS 分析条件：**

一维色谱柱： DB-5MS (25m×0.25mm×0.25μm) ，  
程序升温： 70℃ (保持 5min) -6℃/min- 220℃(保持 3min) -10℃/min -325℃(保持 5min)；  
二维色谱柱： DB-17HT (3m×0.25mm×0.15 μm) ；  
程序升温： 70℃ (保持 5min) -6℃/min- 220℃(保持 3min) -10℃/min- 325℃(保持 5min)；  
进样口温度： 260℃；  
载气： 高纯氮 (纯度 99.999%以上) ；  
进样方式： 不分流进样， 开阀时间 50s， 阀开后分流 30:1；  
进样量： 0.5μL；  
流速： 1.0mL/min， 恒流；  
溶剂延迟： 4.5min。

#### **调制器分析条件：**

调制器恒定温度： 280℃；  
调制周期： 10s， 热吹 0.4s。

#### **TOF-MS 分析条件：**

接口温度： 250℃；  
离子源温度： 220℃；  
离子化能量： -70eV；  
检测电压： -1890V；  
质量数采集范围： 50-650 ；  
采集速度： 100 谱/秒 (全二维) ；  
采集速度： 1 谱/秒 (一维) 。

### **3 实验结果**

按上述方法条件对尿液样品进行前处理和气质联用仪分析。图 1 和图 2 是 GC TOF MS 和 GCxGC TOF MS 分析尿液样品色谱图。从图 1 可以看出，一维气相色谱-飞行时间质谱联用仪色谱图共检出 159 种化合物，大部分色谱组分没有达到基线分离。图 2 可知，GCxGC TOF MS 共检出 535 种化合物，所有组分基本可以达到完全分离。全二维气质强大的解析能力，让尿液样品复杂体系的完美分离成为了可能。

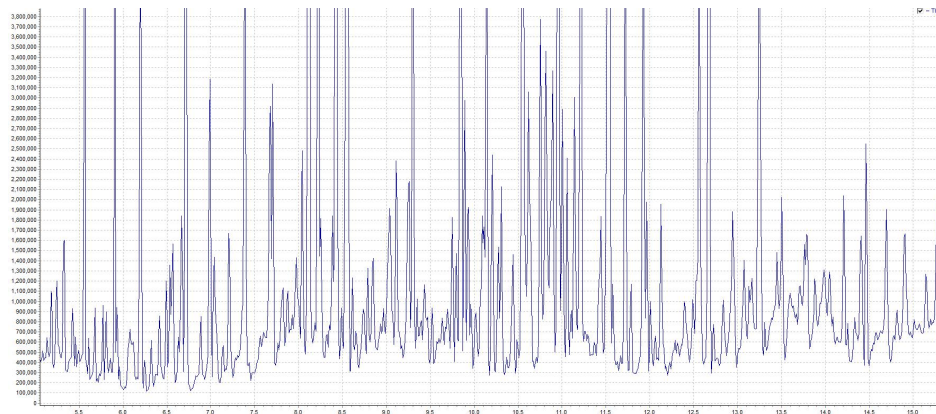


图 1. 一维 GC TOF MS 分析尿液样品总离子流图

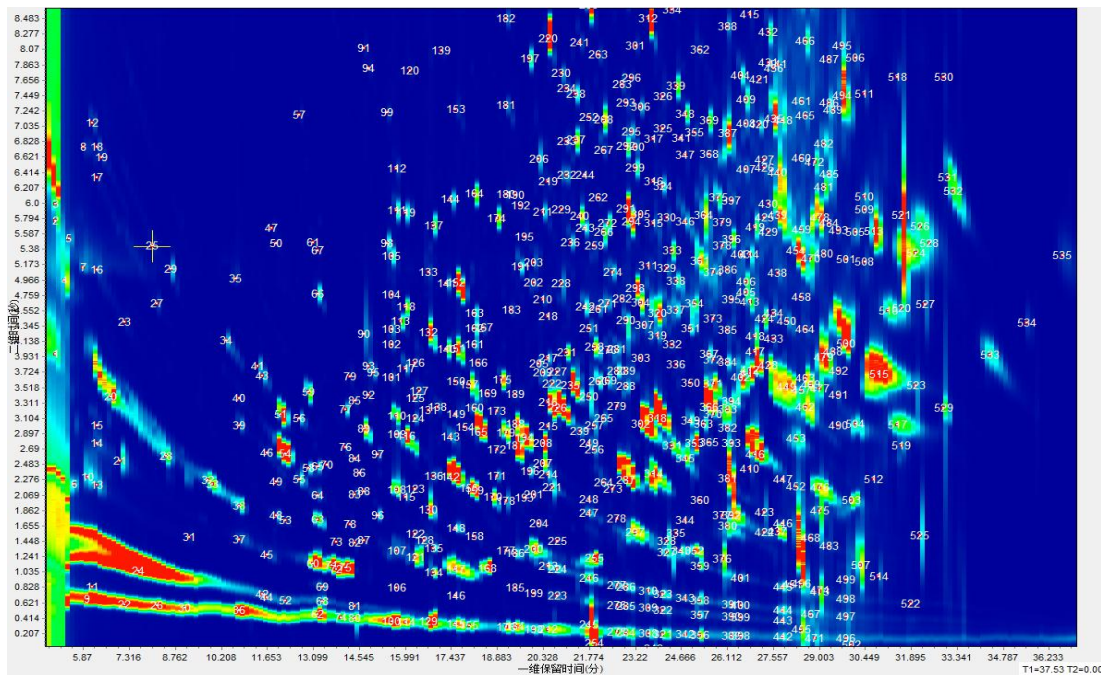


图 2. GCxGC TOF MS 分析尿液 2D 总离子流等高图

对 GC×GC TOF MS 检出的 535 个峰检索定性，NIST 相似度大于 70%，得到有机酸类、氨基酸类、糖类、醇类、酯类、酮类等 6 类物质共 204 种成分。检测结果中，有机酸数量为 107 种，相对含量为 52.45%，氨基酸类、糖类、醇类数量分别为 22、22、23 种，它们的相对含量基本相当，约为 11%。图 3 为 2D 色谱图，图 4 为 3D 色谱图。



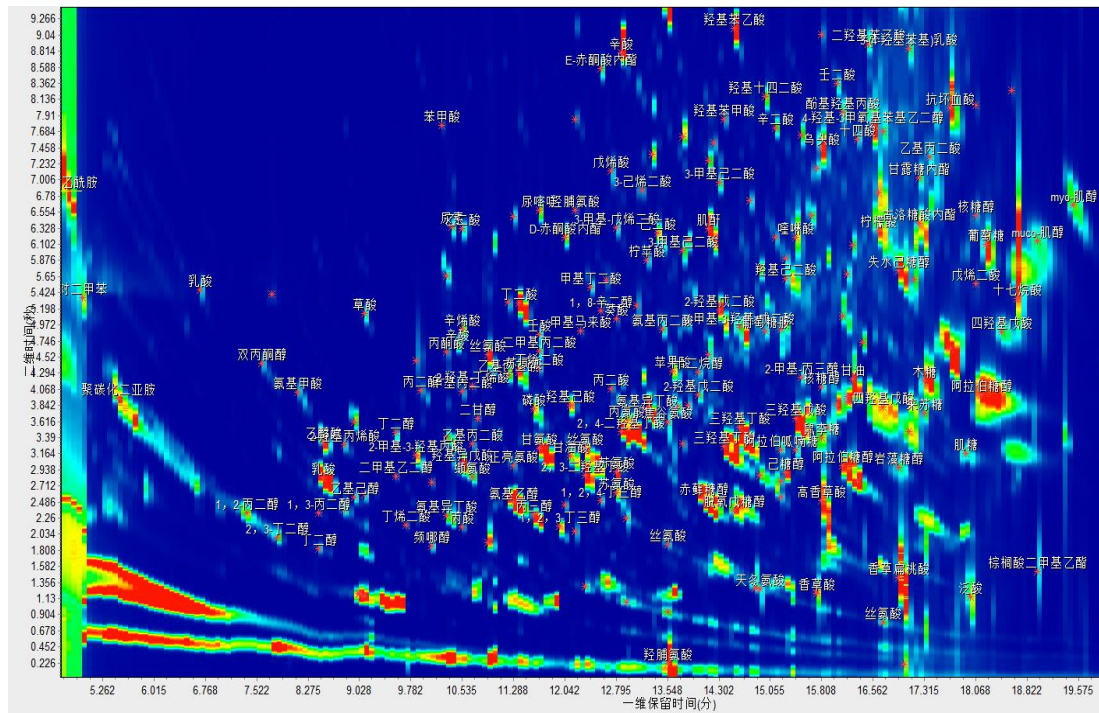


图 3. GCxGC TOF MS 分析尿液样品 3D 总离子流图等高图-定性 (定性结果 NIST 相似度大于 70%)

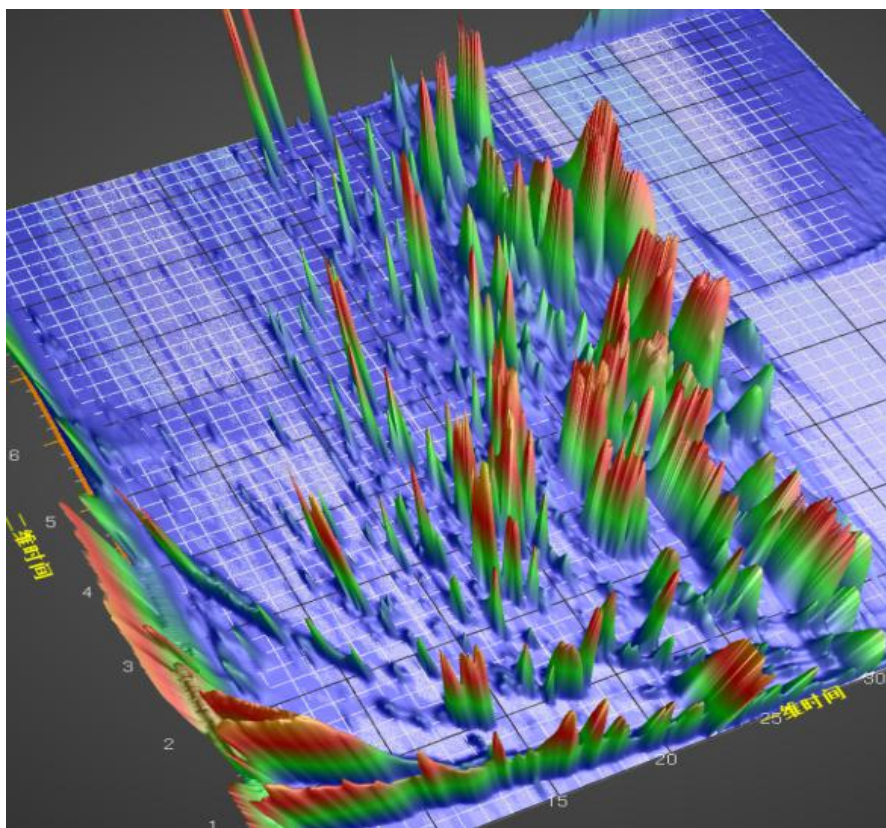


图 4. GCxGC TOF MS 分析尿液样品 3D 总离子流图

## 4、结论

本研究采用柱前衍生化全二维气相色谱-飞行时间质谱（comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, GC×GC TOF MS）技术对人体尿液进行检测，结果共检测出 535 个峰。同时，利用一维 GC TOF MS 对人体尿液进行分析，共检出 159 个峰。与一维 GC TOF MS 检出峰个数相比，GC×GC TOF MS 多检出 376 个峰，大大的丰富了样品信息。对 GC×GC TOF MS 检出的峰检索定性，得到有机酸类、氨基酸类、糖类、醇类、酯类、酮类等 6 类物质共 204 种成分。检测结果中有机酸数量为 107 种，相对含量为 52.45%，氨基酸类、糖类、醇类数量分别为 22、22、23 种，它们的相对含量基本相当，约为 11%。本研究可为人体尿液代谢性疾病的诊断提供更为丰富、准确的信息。

分解结果表明采用 GC×GC TOF MS 3300 全二维气相色谱-飞行时间质谱联用仪检测衍生化处理后的尿液样品，可获得尿液中氨基酸、有机酸、糖代谢及脂肪代谢产物更详细的组分信息。与 GC TOF MS 气相色谱-飞行时间质谱联用仪相比，该方法更准确，峰容量更大，分离度更高，给出的样品信息更丰富。