

105 种临床重要有机酸类衍生物在 SE-54 和 OV-210 毛细管柱上的程序升温保留指数*

余兆楼 郭 勃 常理文

(中国科学院化学研究所, 北京, 100080)

自从 Tanaka 使用气相色谱发现了首例异戊酸尿症以来^[1], 这一技术在有机酸遗传代谢病的研究和诊断中得到了广泛应用。通过分析尿、血以及羊水等体液中的代谢物组成, 人们陆续发现了数十种有机酸遗传代谢病, 其中近 60 种已经可以采用这一技术进行诊断^[2]。

鉴定体液中有机酸类代谢物最准确可靠的方法是采用气相色谱-质谱联用法。然而这需要昂贵的质谱仪。在没有这种大型仪器的情况下, 单独使用气相色谱双柱保留指数法也可以获得可靠的结果。为了便于今后开展有机酸遗传代谢病的临床研究和诊断, 本工作测定了 105 种有机酸类 TMS 衍生物(醛、酮酸类为脲化物 TMS 衍生物)在不同极性的毛细管柱上的程序升温保留指数。利用这些保留值, 可以方便地鉴定尿、羊水等体液中的大部分有机酸类代谢物。

实验部分

(一) 试剂

硅烷化试剂(六甲基二硅胺烷, 简称 HMDS, N, O-双三甲基硅烷基三氟乙酰胺, 简称 BSTFA)及大部分有机酸标准物购自日本东京化成公司。正构烷烃购自上海化学试剂一厂, 色谱纯。其余试剂为北京化工厂产品, 分析纯。

(二) 样品制备

样品前处理参照文献^[3]介绍的方法。取 10 μ l 含 40 μ g 标准酸的甲醇液, 用 N₂ 小心吹干后加入 100 μ l 硅烷化混合试剂(混合液的配比为: BSTFA : 吡啶 : HMDS = 50 : 10 : 1(V/V/V))。混匀密封后于 60 $^{\circ}$ C 加热 30min 进行硅烷化反应。将溶液冷至室温即可进行气相色谱分析。

只能获得有机酸盐的标准物, 硅烷化反应前需将其转化为有机酸的形式。吸取 2ml 相当于 40 μ g 游离酸的有机酸盐标准水溶液, 用 6mol/L 盐酸调溶液的

pH 为 1, 加 2ml 重蒸乙酸乙酯, 反复萃取 4 次。萃取液用 1g 无水 Na₂SO₄ 干燥 1h, 过滤后用 N₂ 小心吹去溶剂。硅烷化反应和标准酸的操作相同。

醛、酮酸易形成互变异构体^[2], 其 TMS 衍生物在色谱图中出现多峰。为了在色谱图中获得单峰, 在硅烷化反应前需将醛酸和酮酸转化为醛脲酸和酮脲酸。吸取 2ml 含 40 μ g 标准酸水溶液, 用 6mol/L NaOH 调溶液的 pH 为 14, 加入 1ml 含 25mg 盐酸羟胺的水溶液, 密封后于 60 $^{\circ}$ C 加热 30min。将溶液冷至室温后, 按上述处理有机酸盐的条件进行萃取和硅烷化反应。

(三) 气相色谱分析

气相色谱分析在 Carlo Erba 4160 型(意大利)和 Varian 6000 型(美国)氢火焰气相色谱仪上进行。分析条件: A. SE-54 键合石英毛细管柱(美国 PE 公司), 36m \times 0.32mm, 液膜厚 0.25 μ m, 起始温度 70 $^{\circ}$ C, 保持 2min 后以 2.5 $^{\circ}$ C/min 速率升至 250 $^{\circ}$ C, 最后保持 10min; B. OV-210 键合石英毛细管柱(美国 J & W Scientific 公司), 25m \times 0.25mm, 液膜厚 0.25 μ m, 起始柱温 50 $^{\circ}$ C, 保持 2min 后以 2.5 $^{\circ}$ C/min 速率升至 220 $^{\circ}$ C, 最后保持 10min。氢气作载气, 线速度均为 46cm/s。进样器、检测器温度分别为 250 和 270 $^{\circ}$ C。偶数碳的正构烷烃与试样同时进样, 待测物的进样量控制在 10 μ g 以内。保留时间由 SP 4270 和 HP 3390A 积分仪记录。保留指数采用竺安建立的方法按下列公式在 IBM 微机上计算^[4]:

$$I_A = 100N + 100n \cdot \frac{\log V'_A - \log V'_N}{\log V'_{N+n} - \log V'_N}$$

式中 I_A 为有机酸衍生物 A 的程序升温保留指数, V'_{N+n} 和 V'_N 是碳原子为 $N+n$ 与 N 的正构烷烃的调整保留体积, 它们分别大于和小于有机酸衍生物 A 的调整保留体积 V'_A 。

表1 各种有机酸衍生物的程序升温保留指数

有机酸衍生物	SE-54	OV-210	代谢病 ^[2,3]	有机酸衍生物	SE-54	OV-210	代谢病 ^[2,3]
丁酸	881	1047	GA,IVA	间羟基苯乙酸	1619	1920	
2-甲基丁酸*	927	1116	GA	庚二酸**	1622	1974	LA,CD
3-甲基丁酸*	935	1124	GA,IVA	3-羟基-3-甲基戊二酸*	1631	1886	HMG
戊酸*	981	1155	IVA,PA	对羟基苯甲酸***	1639	1930	
苯酚**	1056	1208	MB	对羟基苯乙酸***	1656	1953	Tyr,SBS
2-羟基异丁酸	1077	1190		十二烷酸	1667	1844	
乳酸*	1080	1245	LA,FDP	苯丙酮酸*	1667	1869	PKU
羟基乙酸*	1081	1291	Hyp	2-酮戊二酸*	1670	1939	MSUD,GT
己酸***	1082	1254	GA,JVS	酒石酸**	1690	1899	
邻甲苯酚	1146	1310		邻苯二甲酸**	1713	2118	
草酸	1148	1392	Hyp	辛二酸*	1722	2081	EMA,GA
二羧乙酸	1149	1330	Hyp	间氨基苯甲酸	1750	2086	
对甲苯酚	1155	1315	MB	3-酮戊二酸	1752	2055	
丙酮酸*	1168	1303	LA,FDP	十三烷酸	1765	1947	
2-乙基己酸	1174	1338		间苯二甲酸	1772	2140	
庚酸*	1177	1352	IVA,PA	乳清酸	1774	—	OA
2,4-己二烯酸	1186	1416		顺式乌头酸**	1789	2173	
丙二酸	1229	1503		对苯二甲酸**	1815	2165	
甲基丙二酸*	1236	1519	MMA	壬二酸	1815	2186	LA
苯甲酸	1254	1491		马尿酸	1824	2486	
4-羟基丁酸**	1256	1443	HBA		1853	2507	
2-羟基异己酸	1259	1403	MSUD	十四烷酸	1862	2047	
辛酸	1280	1450		柠檬酸***	1863	2134	
2-酮戊酸	1282	1389		2,5-二羟基苯乙酸	1855	2167	
2-酮-3-甲基戊酸	1305	1397	MSUD	二苯基乙醇酸	1898	2045	
2-羟基己酸	1305	1453		癸二酸	1916	2294	
甘油**	1309	1354	GKD,HG	对羟基苯基甘氨酸**	1917	2318	
乙基丙二酸	1309	1575	GA,EMA	2-乙酰氨基肉桂酸**	1969	2227	
苯乙酸	1310	1563	PKU	D-葡萄糖酸**	1940	2369	
N-乙酰甘氨酸*	1312	1830		十五烷酸	1961	2148	
马来酸	1328	1697	PA	3,4-二羟基苯乙醇酸**	1971	2190	
丁二酸*	1337	1625		3-吡啶乙酸**	1972	2408	Har,PKU
4,6-二酮庚酸	1338	1619	Tyr	对羟基苯丙酮酸	1977	2231	Tyr
	1462	1937		抗坏血酸	1990	2496	
2-酮己酸	1355	1478		顺十六碳烯酸-9	2041	2184	
甘油酸**	1361	1526	Gly	十六烷酸	2058	2250	JVS
衣康酸	1366	1652		尿酸	2142	—	LN
精氨酸琥珀酸	1367	1700	Arg	十七烷酸	2156	2352	
反丁烯二酸*	1368	1698	FA	胞壁酸	2164	2703	
壬酸	1375	1547		亚油酸	2216	2434	
乙酰丙酸*	1365	1564		油酸*	2223	2429	
	1390	1532		亚麻酸	2227	2459	
戊二酸	1424	1746	GA	2-羟基十六烷酸	2229	2386	
3-甲基戊二酸**	1448	1758	HMG	反油酸	2232	2426	
癸酸	1474	1645		5-羟基-3-吡啶乙酸	2242	2675	PKU
3-羟基辛酸	1481	1626		十八烷酸*	2254	2453	JVS
间甲氧基苯甲酸	1489	1780		十九烷酸	2354	2555	
苯乙醇酸**	1501	1720	PKU	反蓖麻油酸	2431	2649	
苹果酸***	1519	1789		蓖麻油酸	2432	2648	
苯基乳酸	1525	1699	PKU	二十烷酸	2454	2657	
邻羟基苯甲酸	1527	1764		12-羟基十八烷酸	2461	2676	
己二酸**	1531	1864	GA,EMA,CD	十六烷二酸	2491	2913	
肉桂酸	1551	1867					
苯基丙氨酸	1560	1883	PKU				
十一烷酸**	1571	1747					
托品酸	1607	1707	(内标)				

*:羊水中检出的代谢物, **:尿中检出的代谢物

表 1 内代谢病缩写词的含义如下:

LA: 乳酸血症, GA: 戊二酸尿症, JVS: 詹氏呕吐症, MMA: 甲基丙二酸血症, MSUD: 枫糖尿症, MB: 吸收障碍, PKU: 苯丙酮尿症, GA: 戊二酸尿症, EMA: 乙基丙二酸-己二酸尿症, GKD: 甘油致活酶缺乏症, HG: 甘油过多症, Gly: 甘油酸尿症, CD: 肉碱缺乏症, HMG: 3-羟基-3-甲基戊二酸尿症, Tyr: 酪氨酸血症, SBS: SB 综合症, OA: 乳清酸尿症, GT: 糖原病, IVA: 异戊酸血症, FDP: 1, 6-二磷酸果糖酶缺乏症, PA: 丙酸尿症, Har: 哈特纳普氏病, Hyp: 初期高草酸尿症, HBA: 4-羟基丁酸尿症, FA: 富马酸尿症, Arg: 精氨酸琥珀酸尿症, LN: 核酸代谢病。

结果与讨论

表 1 列出了 105 种临床上重要的有机酸类代谢物在不同极性的两根毛细管柱上的程序升温保留指数。为便于临床研究,表中还列出了一些目前已经比较清楚的有机酸遗传代谢病实例^[1-3]。这些代谢病已被证明与表内左列对应的特定有机酸类代谢物有着密切的关系。

表 1 的数据是采用正构烷烃与待测物同时进样所获得的结果。我们考察过托品酸在 SE-54 柱子上程序升温保留指数的重复性,在不同日期内经 23 次测定,其程序升温保留指数的标准偏差为 ±0.4,结果是令人满意的。实验结果还表明,在一定的范围内改变载气流速和升温速率,程序升温保留指数基本保持不变。以丙酮酸衍生物为例,载气流速为 38、46 和 52cm/s 时,在 OV-210 毛细管柱上其程序升温保留指数分别为 1302、1303 和 1303。升温速率采用 2.5、5.0 和 7.5℃/min 时,其程序升温保留指数分别为 1303、1303 和 1302。其它代谢物的程序升温保留指数的变化与此基本类似。然而,起始温度的变化对程序升温保留指数则有着较大的影响。起始柱温从 50 变为 70

和 90℃时,丙酮酸衍生物在 OV-210 柱子上的保留指数从 1303 变为 1293 和 1280。这说明使用表 1 的数据时需要注意起始柱温。此外,进样量超载也会造成保留指数的变化,这在文献^[3]中已经讨论过。

从表 1 的数据还可看到,两种甚至多种化合物在一根毛细管柱上可能有相同或者非常接近的程序升温保留指数。然而,在另一根极性不同的柱子上,这些化合物的程序升温保留指数则有显著的差别。通过比较它们在双柱上的保留值,可以提高鉴定结果的可靠性。表 1 中用 *、* * 星号标记的化合物,是我们利用表内的数据鉴定尿和羊水中代谢物的结果。实践表明这是一种简单可靠的鉴定方法。

参考文献

- [1] K. Tanaka, M. A. Budd, L. Efron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56, 236-242(1966).
- [2] R. A. Chalmers, A. M. Lawson, "Organic Acids in Man", Chapman and Hall, London, PP210-228(1982).
- [3] K. Tanaka, D. G. Hine, A. West-Dull et al., Clin. Chem., 26, 1839(1980).
- [4] 竺安, J. Chromatogr., 331, 229(1985).

(收稿日期:1990年8月30日)

Retention Indices of 105 Clinically Important Acidic Metabolites on SE-54 and OV-210 Capillary Columns
Yu Zhaoou, Guo Qing and Chang Liwen, Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing, 100080

Gas chromatographic retention indices are given for 105 clinically important acidic metabolites as trimethylsilyl or oxime-trimethylsilyl derivatives on SE-54 and OV-210 capillary columns. With the data presented here, most organic acid metabolites in physiological fluids, such as urine and amniotic fluid, can be identified by the use of gas chromatography alone.

漳州水仙花头香的化学成分分析*

戴亮 杨兰苹 郭友嘉 彭奇**

(中国科学院福建物质结构研究所,福州,350002)

福建漳州人工栽培的水仙为中国水仙之上品。由于它的幽雅清香一直作为花卉盆景观赏而驰名中外。据记载水仙花自然散发出的香气(头香)兼备大

花茉莉的清新,风信子的甜鲜和紫丁香的幽鲜,并带有某种动物香的独特香味。其芳香化学成分的研究迄今尚无报道。前文^[1]我们介绍了利用色谱-质谱法

* 本项目为福建自然科学基金资助, ** 参加本工作的还有任青、孙魁二同志。