

尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒中掺杂尿素的快速 GC/MS 检测

程茗¹, 王赫然², 姚静¹, 孙葭北¹, 施亚琴^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 科学技术部火炬高技术产业开发中心, 北京 100045)

摘要 目的: 建立尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒中掺杂尿素的快速检测方法。方法: 采用气相色谱-质谱联用法, 色谱柱为 Thermo TG-WAXMS A (15 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm), 单四极杆 EI 离子源进行检测, 选择离子扫描模式。结果: 2%~50% 的尿素加样测定理论值与实际值误差小于 0.4%, 3 批实际样品经检测未添加普通尿素。该检测方法的定量下限为 0.25 mg $\cdot$ mL⁻¹, 在 0.1~1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的线性范围内, 尿素 [^{13}C] 对照品的 ^{13}C 丰度均值为 99.0% ($n=6$, RSD=0.090%)。结论: 该方法操作简便快速、灵敏可靠, 适用于尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒中掺杂普通尿素的快速检测。

关键词: 尿素 [^{13}C]; 非法掺杂; 同位素丰度测定; 气相色谱质谱联用

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2020) 02-0268-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.02.10

Rapid determination of urea in urea [^{13}C] breath test kit by GC/MS

CHENG Ming¹, WANG He-ran², YAO Jing¹,

SUN Jia-bei¹, SHI Ya-qin^{1*}

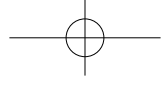
(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Torch High Technology Industry Development Center Ministry of Science and Technology, Beijing 100045, China)

Abstract Objective: To develop a rapid method for the determination of urea in urea [^{13}C] breath test kit. **Methods:** The method was based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The column was Thermo TG-WAXMS A (15 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm) and detection was performed on a single quadrupole EI ion source, scanning m/z 59-63 was detected by selective ion monitoring mode to calculate the ^{13}C abundance. **Results:** In the range of 2% to 50% urea addition to the sample, the measurement error was lower than 0.4%. Three urea [^{13}C] breath test kits were demonstrated no urea addition. The limit of quantification was 0.25 mg $\cdot$ mL⁻¹. In the range of 0.1-1 mg $\cdot$ mL⁻¹, the mean abundance of ^{13}C of UREA C13 USP reference standard was 99.0% ($n=6$, RSD=0.090%). **Conclusion:** The method is simple, rapid, sensitive and reliable. It is suitable for rapid testing of urea in urea [^{13}C] breath test kit.

Keywords: ^{13}C -urea; illegal mixed; isotope abundance; GC-MS

* 通信作者 Tel: (010) 53851506; E-mail: shiyq@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010) 53851512; E-mail: chengm@nifdc.org.cn



尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒临床用于诊断幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染, 是一种简便、准确、灵敏、特异性和重复性高而又无损伤的方法, 被公认为胃部 Hp 感染诊断的金标准^[1-2]。该试剂盒的诊断原理为 Hp 具有内源性尿素酶, 可将 ^{13}C 标记的尿素分解出 $^{13}\text{CO}_2$, 经检测呼气中 $^{13}\text{CO}_2$ 量, 从而判定 Hp 是否在体内存在^[3-4]。试剂盒内容物的有效成分是尿素 [^{13}C] 与辅料甘露醇、枸橼酸、枸橼酸钠等制成的 ^{13}C -颗粒。 ^{13}C 为稳定同位素, 在自然界的丰度仅为 1.11%, 由于尿素 [^{13}C] 价格较高, 与普通尿素相差较大, 因此存在尿素 [^{13}C] 中 ^{13}C 丰度不达标或故意掺杂普通尿素的可能性^[5-6]。尿素 [^{13}C] 呼气试验盒的标准在国外药典中未收载, 在该品种的国家药品标准 (YBH19362006-2015z) 中 ^{13}C 丰度测定方法为将尿素 [^{13}C] 用化学方法转化为 $^{13}\text{CO}_2$, 再用同位素质谱仪进行检测^[7-9]。该方法存在着操作烦琐, 仪器价格极高, 普及度差的问题, 气相色谱-质谱联用技术的仪器相对容易获取, 且已广泛应用于食品药品中微量物质的检测中^[10-12]。本文采用气相色谱-质谱联用技术建立快速定量检测尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒中 ^{13}C 丰度的方法, 可以用于检测试剂盒质量以及是否掺杂普通尿素, 为药品质量监管提供技术支持。

1 实验材料

Thermo Trace1310-ISQ 气质联用仪, 分析软件为 Xcaribur 2.2; METTLER TOLEDO XP205 百万分之一电子天平。

尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒 (北京勃然制药有限公司, 批号 140807、140901、141005); 尿素 [^{13}C] 对照品 (UREA C 13, USP Reference Standard, 99.8%, 批号 10H205); 尿素对照品 (中国食品药品检定研究院, 含量 100.0%, 批号 100288-201302); 甲醇 (Merck, 色谱级, 含量 99.9%, 批号: I758107446)。

2 试验方法

2.1 气相色谱条件

采用 Thermo TG-WAXMS A (15 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm) 色谱柱, 载气为氦气, 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 分流进样, 分流比为 25:1, 进样量 1 μL 。程序升温: 初始温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 以 15 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 至 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 质谱条件

采用单四极杆 EI 离子源进行检测, 电离电压 70

eV, 离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$, 传输线温度 265 $^{\circ}\text{C}$, 选择离子扫描模式, 质量范围 m/z 59~63。

2.3 对照品溶液配制

尿素 [^{13}C] 对照品溶液: 精密称取尿素 [^{13}C] 对照品约 25 mg, 用甲醇配制成质量浓度约为 2.5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 尿素 [^{13}C] 对照品储备液。取适量, 分别用甲醇稀释, 制得质量浓度分别为 1.0、0.5、0.4、0.25、0.1、0.03 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的尿素 [^{13}C] 对照品溶液。

尿素对照品溶液: 精密称取尿素对照品约 25 mg, 用甲醇配制成质量浓度约为 2.5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 尿素对照品储备液。取适量, 分别用甲醇稀释, 制得质量浓度分别为 1.0、0.5、0.4、0.25、0.1、0.03 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的尿素对照品溶液。

2.4 供试品溶液配制

取同一批次的 10 瓶试剂盒内容物, 置于玻璃研钵中研细, 取 660 mg (约含尿素 [^{13}C] 10 mg), 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 超声 5 min, 取上清液用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。每批各配制 3 份溶液。

2.5 尿素加样回收溶液制备

精密称取样品 (批号 140901) 粉末约 260 mg, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入 1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 尿素 [^{13}C] 对照品溶液 0.5 mL, 再分别精密加入 2.5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 尿素对照品溶液 0.04、0.2、0.5 mL, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 超声 5 min, 取上清液用 0.45 μm 滤膜滤过, 制得约含 2%、10%、50% 普通尿素的加样回收溶液。

3 结果与讨论

尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒的内容物为白色颗粒, 含有大量甘露醇等辅料, 其不溶于甲醇, 采用甲醇超声可提取出尿素 [^{13}C] 及尿素, 除去大部分辅料干扰, 并且回收率满足要求。

3.1 ^{13}C 丰度的计算

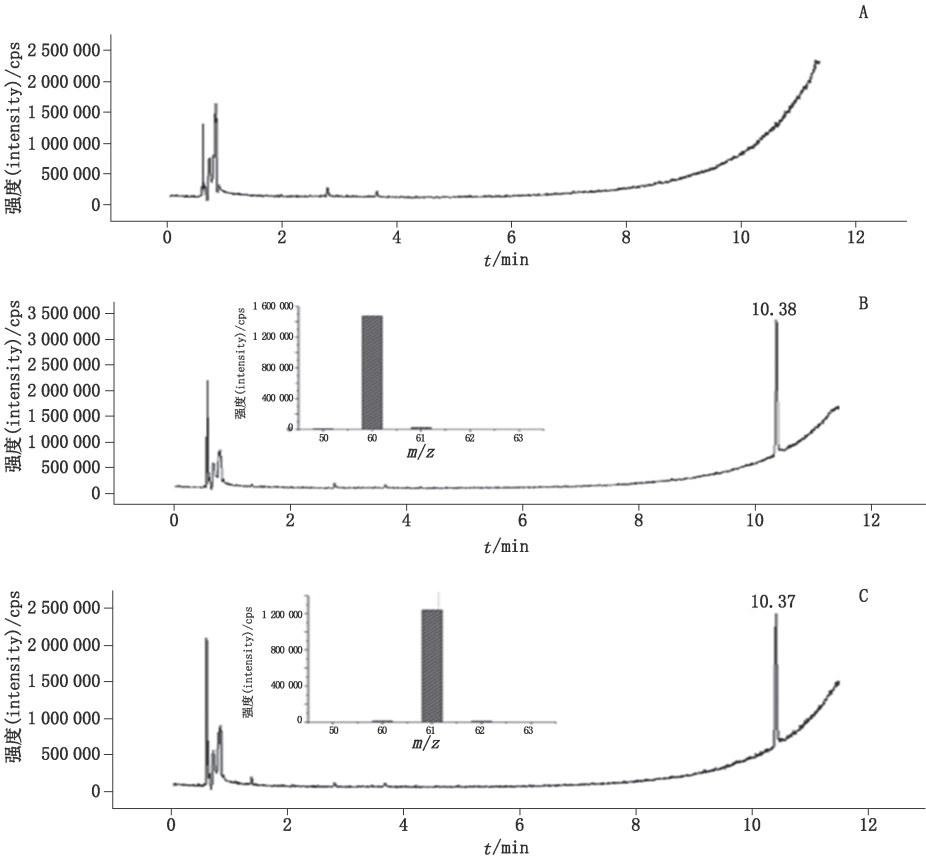
尿素 [^{13}C] 是由 ^{13}CO 与 NH_3 反应制备得到, 其原料 ^{13}CO 在低温精馏法制备过程中会有少量 $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$ 作为副产物出现^[13-14], 导致终产物有 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 、 $^{13}\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 、 $^{13}\text{CH}_4\text{N}_2^{18}\text{O}$ 。因此参照美国药典按 ^{13}C 丰度 (%) = $(I_{61} + I_{63}) / (I_{60} + I_{61} + I_{63}) \times 100\%$ 计算 ^{13}C 的同位素丰度^[15] (I_{60} 为 m/z 60 离子的强度值, I_{61} 为 m/z 61 离子的强度值, I_{63} 为 m/z 63 离子的强度值)。

3.2 专属性及精密度

采用“2.2”项下测定条件, 以甲醇为空白对照,

分别对 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尿素 [^{13}C] 对照品溶液及 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尿素对照品溶液进行分析(图1)。尿素 [^{13}C] 的保留时间约为 10.4 min 与尿素完全一致,但尿素 [^{13}C] 的主要分子离子峰为 $m/z\ 61$, 尿素的主要分子离子

峰为 $m/z\ 60$, 空白溶剂无干扰,说明该方法专属性良好。尿素 [^{13}C] 对照品溶液连续进样6针,其 ^{13}C -丰度的均值为 99.0% , RSD 为 0.090% , 方法精密度较好。



A. 空白溶液 (blank solution) B. $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尿素对照品溶液 ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ urea reference substance solution) C. $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尿素 [^{13}C] 对照品溶液 ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^{13}C -urea reference substance solution)

图1 样品溶液的总离子流色谱图及其中尿素峰的质谱图

Fig. 1 Total ion chromatograms and mass spectra of urea in sample solution

3.3 检测下限、定量下限及适用浓度范围

“2.3”项中各对照品溶液的 ^{13}C 丰度测定结果如表1所示,该检测方法的检测下限 ($S/N>3$) 为 $0.03\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量下限 ($S/N>10$) 为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,尿素 [^{13}C] 对照品的 ^{13}C 丰度值 $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内均值为 99.0% ,尿素对照品的 ^{13}C 丰度均值为 1.3% ,与 ^{13}C 的天然丰度 1.1% 相近。上述数据说明该 ^{13}C 丰度测定方法在 $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内适用。

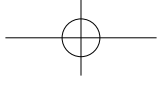
3.4 稳定性试验

将 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的尿素 [^{13}C] 对照品溶液室温放置,在第1天、第2天、第3天分别进行 ^{13}C 丰度测定,其平均值为 99.0% 、 98.8% 、 98.9% ,表明尿素 [^{13}C] 对照品溶液的 ^{13}C 丰度值在3 d内稳定性较好。

表1 尿素 [^{13}C]、尿素的定量下限及在 $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的 ^{13}C 丰度值 (%)

Tab.1 LOQ and ^{13}C abundance of $0.1\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^{13}C -urea and urea (%)

浓度 (concentration)/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	尿素 [^{13}C] (^{13}C -urea)	尿素 (urea)/%
0.1 (LOQ)	99.2	1.6
0.25	98.9	1.2
0.4	99.0	1.0
0.5	99.0	1.4
1	99.0	1.4



3.5 与法定检验测定结果的对比

为更好地评价该方法,对比了采用法定检验与 GC/MS 方法测定批号为 141002、150408、150503 的样品丰度的结果,见表 2。由表可见,2 种方法测定结果基本一致。

表 2 法定方法与 GC/MS 方法丰度测定结果对比

Tab. 2 Comparison of ^{13}C abundance results between legal method and GC/MS method

批号 (batch No.)	法定方法 (legal method)	GC/MS
141002	99.1	98.9
150408	99.1	98.8
150503	99.1	98.9

3.6 普通尿素的加样回收

对 3 批尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒进行测试,批号为 140807、140901、141005 的样品 ^{13}C 丰度平均值 ($n=3$) 分别为 98.7% (RSD=0.65%)、99.0% (RSD=0.090%) 和 99.3% (RSD=0.28%)。并对批号为 140901 的样品添加不同量的普通尿素,结果如表 3 所示,3 组数据理论丰度与测定丰度最大误差小于 0.4%,RSD 小于 1.2%,回收良好。说明该方法可以避免辅料的基质效应,有效检测出产品中普通尿素的添加量。

表 3 尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒掺杂不同量的普通尿素后的实测 ^{13}C 丰度值与理论值的比较

Tab. 3 The ^{13}C abundance comparison between measured value and theoretical value of addition different amount of urea in Urea [^{13}C] breath test kit

样品名称 (sample name)	^{13}C 丰度 (^{13}C abundance) /%	RSD/%	理论 ^{13}C 丰度 (theoretical ^{13}C abundance) /%	回收率 (recovery) /%
140807	98.7	0.65	/	/
140901	99.0	0.09	/	/
141005	99.3	0.28	/	/
2% 加样回收 (2% recovery)	97.4	0.13	97.0	100.4
10% 加样回收 (10% recovery)	89.7	0.19	89.4	100.3
50% 加样回收 (50% recovery)	47.1	1.09	47.5	99.2

4 结论

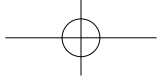
本试验使用甲醇超声直接处理样品,不需要进行衍生化等复杂的前处理,简便快捷,可以实现尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒颗粒中尿素 [^{13}C] 的快速提取。采用 GC-MS 测定 ^{13}C 丰度,方法专属性、精密度、线性范围、日间稳定性均良好,且定量限满足 ^{13}C 丰度检测需求,适用于尿素 [^{13}C] 呼气试验诊断试剂盒中 ^{13}C 丰度的测定。同时可用于产品是否掺杂普通尿素的快速检测,较现有国家药品标准 YBH19362006-2015z 的方法具有更加简便、快速及可行性强的优势,并对 3 批样品进行检验发现其未掺杂普通尿素。

参考文献

- [1] GISBERT JP, PAJARES JM. Review article: ^{13}C -urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection—a critical review [J].

Aliment Pharmacol Ther, 2004, 20(10): 1001

- [2] 尹曙明, 张赣生, 项平, 等. ^{13}C -尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌感染的应用价值 [J]. 中华消化杂志, 2012, 32(10): 669
YIN SM, ZHANG GS, XIANG P, et al. Applying value of ^{13}C -urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric remnant [J]. Chin J Dig, 2012, 32(10): 669
[3] 李常芊. ^{13}C -尿素呼吸试验检测幽门螺杆菌 [J]. 现代诊断与治疗, 1995(5): 292
LI CQ. Detection of *Helicobacter pylori* by ^{13}C -urea breath test [J]. Mod Diagn Ther, 1995(5): 292
[4] DOMINGUEZ-MUNOZ JE, LEODOLTER A, SAUERBRUCH T, et al. A citric acid solution is an optimal test drink in the ^{13}C -urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection [J]. Gut, 1997, 40(4): 459
[5] 薛鸿堡. 稳定性同位素 [J]. 化工新型材料, 1989(12): 1
XUE HB. Stable isotopes [J]. New Chem Mater, 1989(12): 1
[6] 马培华, 荒井重义. 两阶段选择性红外多光子离解制取高浓度 (^{13}C) C [J]. 科学通报, 1990, 35(2): 102
MA PH, Hirokuni. Production of highly concentrated- ^{13}C by two-



- stage selective IRMPD [J]. *Chin Sci Bull*, 1990, 35(2): 102
- [7] 杜晓宁, 宋明鸣, 赵诚, 等. ^{13}C -尿素同位素丰度的检测方法[J]. *同位素*, 2010, 23(1): 39
- DU XN, SONG MM, ZHAO C, *et al.* Analytical method for isotope abundance of ^{13}C -urea [J]. *J Isot*, 2010, 23(1): 39
- [8] 窦淑萍, 罗志福. 尿素 [^{13}C]-胶囊呼气试验药盒新药申报进展[J]. *中国原子能科学研究院年报*, 2001: 96
- DOU SP, LUO ZF. Progress in new drug declaration of Urea [^{13}C]-capsule breath test kit [J]. *Annu Rep China Inst Atom Energ*, 2001: 96
- [9] 赵墨田. 同位素质谱仪技术进展[J]. *现代科学仪器*, 2012(5): 8
- ZHAO MT. Recent technology progress of isotope mass spectrometer [J]. *Mod Sci Instrum*, 2012(5): 8
- [10] 邹龙, 林洪, 江洁. 氘代同位素内标气相色谱-质谱法测定鱼贝类肌肉中 β -雌二醇残留[J]. *分析化学*, 2007, 35(7): 983
- ZOU L, LIN H, JIANG J. Determination of β -estradiol residues in fish/shellfish muscle tissues by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2007, 35(7): 983
- [11] 周秀锦, 杨会成, 邵宏宏, 等. HS/GC-MS/MS 法检测海产品中二甲苯[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(7): 98
- ZHOU XJ, YANG HC, SHAO HH, *et al.* Determination of three xylene isomers in seafoods by GC-MS/MS method with headspace injection [J]. *J Instrum Anal*, 2018, 37(7): 98
- [12] 周佳, 孙嘉茵, 李宇茜, 等. GC-MS/MS 同位素内标法测定肉制品中 *N*-二甲基亚硝胺[J]. *中国测试*, 2016, 42(9): 46
- ZHOU J, SUN JY, LI YX, *et al.* Isotope internal standard method analysis of *N*-nitrosodimethylamine in meat products by GC-MS/MS [J]. *China Meas Test*, 2016, 42(9): 46
- [13] 袁家均, 李虎林, 许保云, 等. ^{13}C 同位素低温精馏过程动态模拟[J]. *同位素*, 2010, 23(4): 197
- YUAN JJ, LI HL, XU BY, *et al.* Dynamic simulation of isotope ^{13}C separation by cryogenic distillation [J]. *Isotopes*, 2010, 23(4): 197
- [14] McInteer BB. Isotope separation by distillation: design of a carbon-13 plant [J]. *Sep Sci Tech*, 1980, 15(3): 491
- [15] USP 37/NF-32[S]. 2014: 2043
- (本文于 2019 年 12 月 5 日收到)