

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01325

肾结石中三聚氰胺的表面解吸常压化学电离质谱测定

李建强¹ 贾滨¹ 胡斌¹ 陈焕文*¹ 曾祥泰*² 肖日海³

¹(东华理工大学应用化学系,抚州 344000) ²(赣南医学院第二附属医院外科,信丰 341600)

³(赣南医学院第一附属医院泌尿外科,赣州 341600)

摘 要 临床获取的人体肾结石固体样品难以在表面解吸常压化学电离质谱(DAPCI-MS)中获得满意的信号,将其制备成乙酸-甲醇溶液后直接滴加在信封纸表面,在无需脱盐处理的条件下,可以采用DAPCI-MS直接分析。结果表明:DAPCI-MS能够承受结石样品中的大量基体,快速测定结石中的三聚氰胺和尿酸等成分,并鉴定其结构。本方法操作简单方便,准确度高,为三聚氰胺引起的肾结石的临床诊断提供了科学依据。

关键词 表面解吸常压化学电离源;质谱;肾结石;三聚氰胺;尿酸

1 引 言

据报道,在中国超过5万婴幼儿因服用含有三聚氰胺的奶粉而患肾结石。目前,可采用超声方法对三聚氰胺引起的结石进行临床诊断^[1]。多数临床研究仍处在总结三聚氰胺结石的临床特点^[2,3],只能在临床观察和统计学的基础上给出一定的结论,并不能依据三聚氰胺结石的化学成分进行准确判断。红外和拉曼光谱是鉴定泌尿系统结石的主要方法^[4,5]。计算机X射线断层扫描(CT)^[6~9]也可以对结石样品进行分类,但是光谱和CT等方法易受到结石种类的限制,尚未对三聚氰胺结石开展研究。因此,对三聚氰胺结石的成分进行有效的鉴定,能够确定其结石病症是否由三聚氰胺引起,对于临床诊断和三聚氰胺的毒理研究具有重要的意义。表面解吸常压化学电离(DAPCI)是一种新兴的常压离子化技术^[10~13],具有灵敏度较高、选择性好、适用范围宽、易于小型化等优点,适用于药品、食品等实际样品的非破坏、无污染检测。本研究将DAPCI-MS用于鉴定结石中的尿酸和三聚氰胺等成分,操作简单方便,准确度高。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

DAPCI离子源(东华理工大学研制)^[10~13];LTQ-XL增强型线性离子阱质谱仪(美国Finnigan公司)配有Xcalibur数据系统。乙酸-甲醇(1:4,V/V)溶液;甲醇-水(1:1,V/V)溶液。肾结石样品为碎石手术后患者排出的结石碎片,由赣南医学院附属医院提供。

2.2 样品制备

取肾结石颗粒(粒径1~2mm)样品1~5mg于乙酸-甲醇(1:4,V/V)溶液中,并超声(10W,20min)辅助溶解,制备肾结石样品溶液(10mL)。将20μL样品溶液滴加在信封纸表面,干燥后进行检测。

2.3 质谱条件

分别设置DAPCI离子源的正离子模式下电离电压3.5kV;负离子模式下电离电压4.0kV;质量范围为50~500Da;离子传输管温度350℃;解吸气(N₂)气压为0.05MPa。其它实验参数由系统自动优化。在通过CID进行串联质谱时,母离子选择宽度为1.5Da,碰撞能量为20%~37%。

3 结果与讨论

3.1 肾结石样品的DAPCI-MS检测

无论是采用DAPCI-MS还是DESI-MS对肾结石固体样品进行直接检测,均难以获得肾结石样品的

2009-12-09 收稿;2010-02-23 接受

本文系国家自然科学基金仪器专项(No.20827007)和国家科技部创新方法专项基金(No.2008IM040400)资助项目

* E-mail: chw8868@gmail.com, zxtjxgz888@sohu.com

质谱信号。这可能是因为在结石中钙含量高,其中的少量有机物质被包裹在致密的钙结构中,使得结石中的物质难以被 DAPCI/DESI 离子源电离。将 20 μL 结石样品溶液滴加在信封纸上后分别在正/负离子检测模式下进行 DAPCI 实验,得到肾结石的 DAPCI-MS 指纹谱图,如图 1a~d 所示。由于样品成分比较复杂,质谱指纹谱图中三聚氰胺和尿酸的信号峰较低,但是仍然能够通过多级串联质谱对结石样品中的三聚氰胺等进行鉴定。在负离子模式下, m/z 119 为溶剂中去质子化的乙酸二聚体所形成的质谱峰(图 1e)。如果样品中含有较多量的尿酸,也能够在负离子模式下被检测,其分子离子峰为 m/z 167。

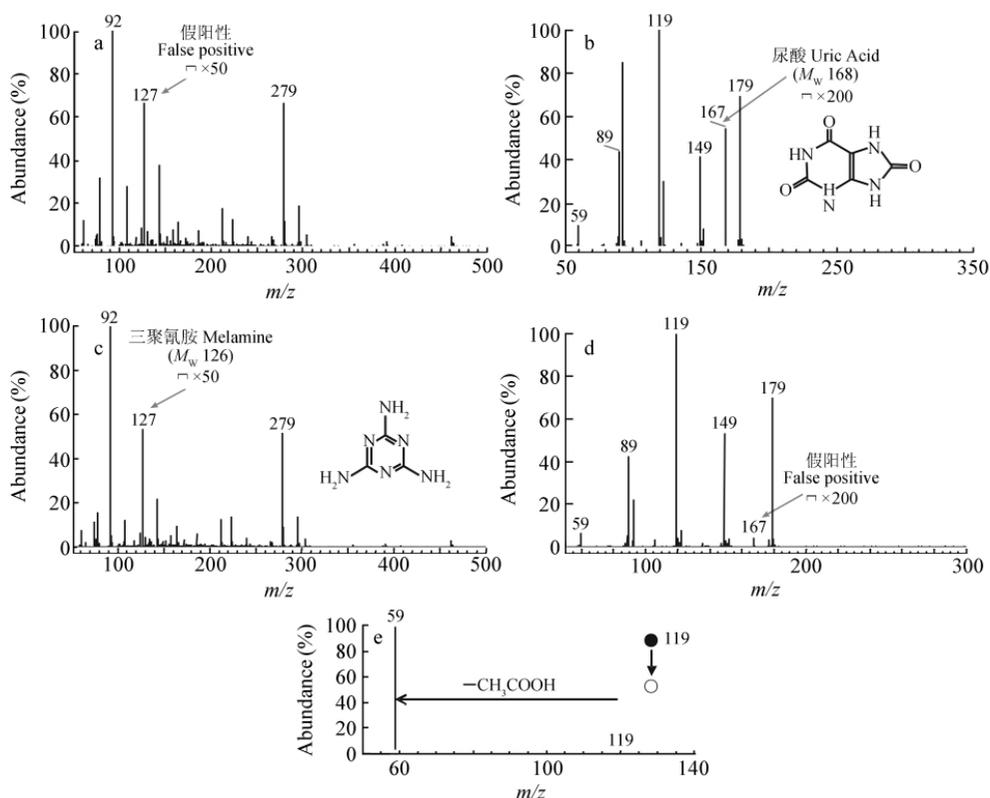


图 1 肾结石溶液样品的 DAPCI-MS 谱图

Fig. 1 Mass spectra of kidney stone solution samples recorded using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (DAPCI-MS)

a: 2 号样品正离子检测模式 (Sample 2 at positive ion detection mode); b: 3 号样品正离子检测模式 (Sample 3 at positive ion detection mode); c: 2 号样品负离子模式 (Sample 2 at negative ion detection mode); d: 3 号样品负离子模式 (Sample 3 at negative ion detection mode); e: 负离子模式 m/z 119 的二级谱图 (MS/MS spectra of m/z 119 at negative ion detection mode)。

3.2 样品中三聚氰胺和尿酸的 DAPCI 串联质谱检测

三聚氰胺在正离子模式下易质子化形成 $[M+H]^+$ 的分子离子^[12]。在正离子模式下,对样品一级质谱(如图 1a b)中检测到的三聚氰胺信号 m/z 127 进行串联质谱检测,发现来自 3 号患者的肾结石样品的 DAPCI 串联质谱图中检测到了三聚氰胺的二级质谱特征碎片^[12-14](m/z 110, 85 和 43, 如图 2a 所示)和 m/z 85 的三级质谱碎片 m/z 43(图 2b 所示)。由此,可以判断该样品中含有三聚氰胺,从而确诊 3 号结石样品为三聚氰胺结石样品。其它样品中的 m/z 127 在串联质谱中无法产生三聚氰胺的特征碎片,为假阳性结果(如图 1a),可能是普通的肾石症患者。这与 3 号患者有 2.5 年服用奶粉的历史吻合,也与医院的临床诊断为阴性结石的结果一致。

某些非钙类结石(如尿酸结石)临床表现为 X 光阴性,也有可能被误判为三聚氰胺结石。采用 DAPCI-MS 也可以对这类结石样品进行准确鉴定。在负离子模式下,对样品一级质谱中的 m/z 167 (去质子化的尿酸)进行串联质谱分析,仅在 2 号患者的肾结石样品的二级谱图中检测到尿酸的特征碎片^[15] m/z 124, 及其三级质谱碎片 m/z 81, 如图 2c 和 d 所示。由此,可以判断该样品中含有尿酸。综合

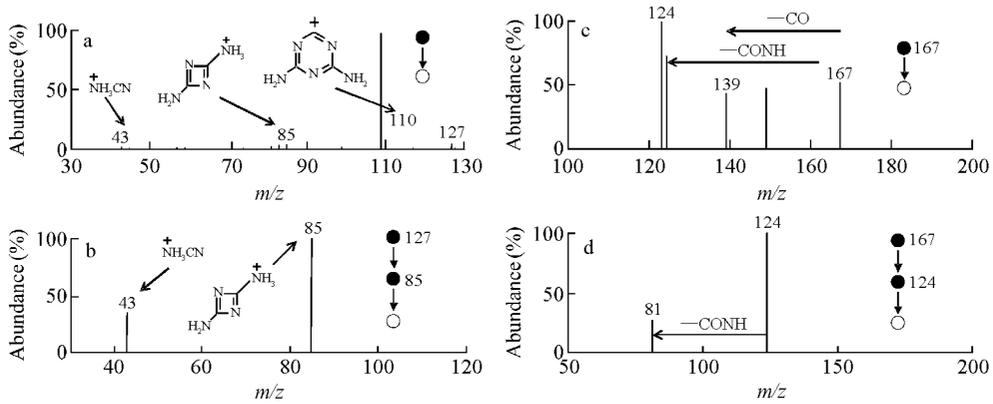


图 2 肾结石样品的 DAPCI 串联质谱图

Fig. 2 DAPCI-MSⁿ spectra of kidney stone

a: 3 号样品中三聚氰胺的二级质谱图 (MS/MS spectrum of melamine); b: m/z 127 的三级质谱图 (MS³ spectrum of m/z 127); c: 2 号样品中尿酸的二级质谱图 (MS/MS spectrum of uric acid); d: m/z 167 的三级质谱图 (MS³ spectrum of m/z 167)。

这些实验检测结果, 可以确诊 2 号结石样品为尿酸结石, 而非三聚氰胺结石。

3.3 肾结石样品的电喷雾串联质谱 (ESI-MS/MS) 检测

结石样品基体较复杂, 需将肾结石样品溶液稀释 1 万倍后才能进行 ESI-MS 分析。稀释后的样品的信号较弱, 一级质谱中获得的信号也较少; 因此需要根据二级质谱 ESI-MS/MS 的信号进行比较。在正离子检测模式下 3 号样品中检测到三聚氰胺 (m/z 127) 的特征碎片 m/z 43, 60, 85 和 110 (图 3a), 其中碎片 m/z 60 较难产生, 在 DAPCI-MS/MS 中未能检测到。在负离子模式下 2 号样品中检测到尿酸 (m/z 167) 的特征碎片 m/z 124, 如图 3b 所示。ESI 实验结果可以证明 3 号结石样品为三聚氰胺结石; 2 号结石样品为尿酸结石, 此结果与 DAPCI 实验结果相吻合。

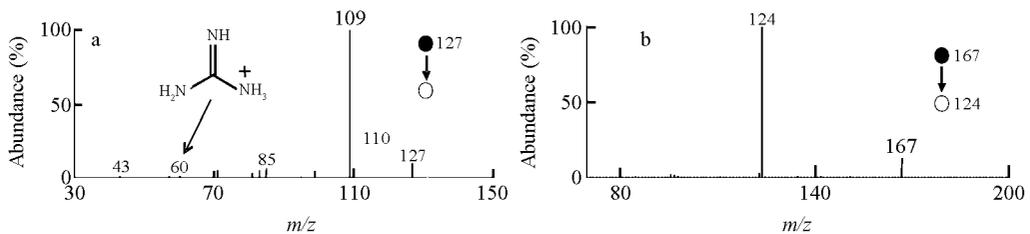


图 3 肾结石样品的 ESI 串联质谱图

Fig. 3 ESI-MSⁿ spectra of kidney stone

a: 3 号样品中三聚氰胺的二级 ESI 质谱图 (ESI-MS/MS spectrum of melamine in sample 3); b: 2 号样品中尿酸的二级 ESI 质谱图 (ESI-MS/MS spectrum of uric acid in sample 2)。

ESI-MS 实验需要对样品进行大量稀释或脱盐处理, 而 DAPCI 可以直接对样品溶液进行快速质谱分析。DAPCI-MS 能够对三聚氰胺进行定量分析^[11, 12], 但对结石类型的判断依靠定性分析完成, 因此本实验未对结石中三聚氰胺进行定量分析。与其它方法^[16, 17]相比, 使用 DAPCI-MS 技术检测三聚氰胺具有较高的灵敏度, 放在信封纸表面的三聚氰胺标准品的检出限为 3.4×10^{-15} g/mm²。采用本方法仅需要对肾结石样品进行简单的样品预处理, 即可快速完成样品的灵敏检测, 并且通过串联质谱方法对三聚氰胺结石和尿酸等进行鉴定。在大批量样品分析时, 可以将批量样品同时进行超声溶样, 显著缩短样品预处理时间, 较适合于相关部门对肾结石病例的致病原因的调查和临床诊断。本方法不仅为三聚氰胺结石患者的确诊提供科学依据, 而且对三聚氰胺结石的病理研究提供了可借鉴的方法。

References

1 Jia L Q, Shen Y, Wang X M, He L J, Xin Y, Hu Y X. *Chin. Med. J.*, 2009, 122(3): 252 ~ 256

- 2 Sun N, Shen Y, Sun Q, Li X R, Jia L Q, Zhang G J, Zhang W P, Chen Z, Fan J F, Jiang Y P, Feng D C, Zhang R F, Zhu X Y, Xiao H Z. *Chin. Med. J.*, **2009**, 122(3): 245 ~ 251
- 3 Zhang L, Wu L L, Wang Y P, Liu A M, Zou C C, Zhao Z Y. *World J. Pediatr.*, **2009**, 5(1): 31 ~ 35
- 4 Yarynovska I H, Bilyi A I. *Diagn. Opt. Spectrosc. in Biomed. Iv*, **2007**, 6628: C6281 ~ C6281
- 5 Kinoshita H, Miyoshi N, Miyoshi K, Ogawa T, Ogasawara T, Kitagawa Y, Itoh H, Sano K. *J. Raman Spectrosc.*, **2008**, 39(3): 349 ~ 353
- 6 Bachmann R, Heimbach D, Kersjes W, Jacobs D, Schild H, Hesse A. *Invest. Radiol.*, **2000**, 35(11): 672 ~ 675
- 7 Deveci S, Coskun M, Tekin M I, Peskircioglu L, Tarhan N C, Ozkardes H. *Urology*, **2004**, 64(2): 237 ~ 240
- 8 Bellin M F, Renard-Penna R, Conort P, Bissery A, Meric J B, Daudon M, Mallet A, Richard F, Grenier P. *Eur. Radiol.*, **2004**, 14(11): 2134 ~ 2140
- 9 Thomas C, Patschan O, Ketelsen D, Tsiflikas I, Reimann A, Brodoefel H, Buchgeister M, Nagele U, Stenzl A, Claussen C, Kopp A, Heuschmid M, Schlemmer H P. *Eur. Radiol.*, **2009**, 19(6): 1553 ~ 1559
- 10 Chen H W, Zheng J, Zhang X, Luo M B, Wang Z C, Qiao X L. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42(8): 1045 ~ 1056
- 11 YANG Shui-Ping (杨水平), HU Bin (胡斌), LI Jian-Qiang (李建强), HAN Jing (韩京), ZHANG Xie (张燮), CHEN Huan-Wen (陈焕文), LIU Qing (刘清), LIU Qing-Jun (刘清珺), ZHENG Jian (郑健). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(5): 691 ~ 694
- 12 Yang S P, Ding J H, Zheng J, Hu B, Li J Q, Chen H W, Zhou Z Q, Qiao X L. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(7): 2426 ~ 2436
- 13 YANG Shui-Ping (杨水平), CHEN Huan-Wen (陈焕文), YANG Yu-Ling (杨宇玲), HU Bin (胡斌), ZHANG Xie (张燮), ZHOU Yu-Fen (周瑜芬), ZANG Li-Li (张丽丽), GU Hai-Wei (顾海巍). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(3): 315 ~ 318
- 14 Zhu L, Gamez G, Chen H W, Chingin K, Zenobi R. *Chem. Commun.*, **2009**, (5): 559 ~ 561
- 15 Dai X H, Fang X, Zhang C M, Xu R F, Xu B. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 857(2): 287 ~ 295
- 16 WANG Hao (王浩), LIU Yan-Qin (刘艳琴), CAO Hong (曹红), YANG Hong-Mei (杨红梅), LIU Xiao-Li (刘小力), YAN Long-Bao (闫龙宝). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(2): 273
- 17 LI Ai-Jun (李爱军), ZHANG Dai-Hui (张代辉), MA Shu-Min (马书民), LI Ming (李明), ZHANG Xiu-Zhen (张秀珍), YAO Tian-Ling (姚天灵). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(5): 699 ~ 701

Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry for Detection of Melamine in Kidney Stone Samples

LI Jian-Qiang¹, JIA Bin¹, HU Bin¹, CHEN Huan-Wen^{*1}, ZENG Xiang-Tai^{*2}, XIAO Ri-Hai³

¹(Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000)

²(Department of Surgery, the 2nd Hospital of Gannan Medical University, Xinfeng 341600)

³(Department of Urologic Surgery, the 1st Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000)

Abstract The clinical human kidney stone samples that generated no satisfactory signal in direct analysis using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (DAPCI-MS) were dissolved in acetic acid/methanol solutions, and then deposited on a paper surface for DAPCI-MS analysis without desalination. The results showed that the melamine and the uric acid as well, in the stone samples were rapidly detected and identified by using DAPCI-MS². The detection limits were about 3.4×10^{-15} g/mm² for melamine on the paper surface. The analytical results obtained using DAPCI-MS were validated by using conventional ESI-MS. The data demonstrate that DAPCI-MS² is a promising technique for clinical diagnosis of nephrolithiasis caused by either melamine or uric acid, particularly because of its high specificity, high throughput and good accuracy.

Keywords Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization; Mass spectrometry; Kidney stone; Melamine; Uric acid