

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测 尿液和血浆中鹅膏毒肽和鬼笔毒肽

张秀尧* 蔡欣欣

(温州市疾病预防控制中心, 温州 325001)

摘 要 建立了同时快速检测尿液和血浆中 3 种鹅膏毒肽和 2 种鬼笔毒肽的超高效液相色谱三重四极杆质谱联用分析方法。尿液样品直接进样, 血浆样品经乙腈沉淀除蛋白后, 在 UPLC HSS T3 色谱柱上分离, 正离子电喷雾多反应监测(MRM)模式检测, 基体匹配标准外标法定量。尿液和血浆样品的线性范围分别为 2 ~ 100 和 1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$; 加标回收率分别在 92.0% ~ 108.0% 和 85.0% ~ 100.0% 的范围内; 相对标准偏差为 1.0% ~ 22.0% 和 2.0% ~ 22.0% ($n=6$); 样品的检出限为 0.2 ~ 1.0 $\mu\text{g/L}$ 和 0.1 ~ 0.5 $\mu\text{g/L}$ ($S/N=3$)。本方法灵敏, 简单, 快速, 特异性强。

关键词 超高效液相色谱三重四极杆质谱法; 鹅膏毒肽; 鬼笔毒肽; 尿液; 血浆

1 引 言

毒蘑菇又称毒蕈, 我国约有 100 种, 有 10 多种可引起人类严重中毒。引起中毒的毒蘑菇毒素类型较多, 主要有鹅膏毒肽类(Amatoxins)和鬼笔毒肽类(Phallotoxins), 它们分别属于双环八肽和双环七肽。目前, 已经分离出 9 种鹅膏毒肽, 其中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽和 γ -鹅膏毒肽毒性大, 在毒蘑菇中含量高, 为引起中毒的主要毒素。鹅膏毒肽属慢性毒素, 对人的致死量大约为 0.1 mg/kg 体重, 食用后至少 15 h 后才出现中毒症状, 其毒性比鬼笔毒肽强 20 倍。它们能强烈抑制细胞 RNA 聚合酶的活性, 从而阻碍了蛋白质的合成, 引起多种脏器细胞特别是肝、肾细胞的坏死, 9 ~ 12 d 内死亡, 死亡率高达 90%。鬼笔毒肽共有 7 种, 其中羧基二羟鬼笔毒肽和二羟鬼笔毒肽为主要毒性成分。鬼笔毒肽属速效毒素, 动物静脉或腹腔注射实验, 2 ~ 5 h 内死亡。该毒素能专一性地与细胞中肌丝蛋白(F-actin)结合, 从而打破肌丝蛋白与肌球蛋白(G-actin)之间聚合和解聚的动态平衡, 形成大量 F-actin 毒肽复合物^[1~3]。蘑菇中毒, 特别是鹅膏毒肽引起的中毒, 中毒症状在大量细胞被损坏后才出现, 因此病死率高。建立快速、准确检测尿液和血液中毒蘑菇毒素的确证检测方法, 对于疑似中毒病人的尽早诊断, 降低死亡率具有重要意义。

目前, 毒蘑菇毒素的检测多集中于鹅膏毒肽类的检测, 检测方法主要有放射性免疫测定法^[4]、毛细管区带电泳法^[5]、反相液相色谱法^[6~8]和液相色谱质谱联用法^[9~11]等, 这些方法多针对毒蘑菇中鹅膏毒肽的含量测定。由于鹅膏毒肽的毒性较大, 特别当中毒症状出现时大部分的毒素都已进入靶器官, 尿液和血浆中浓度较低, 常规的检测方法无法检出。Maurer 等^[12]采用免疫亲和柱净化液相色谱质谱联用法测定尿液和血浆中 α -鹅膏毒肽和 β -鹅膏毒肽, 检出限为 2.5 $\mu\text{g/L}$ 。Filigenzi 等^[13]采用液相色谱-线性离子阱质谱联用法, 以 MS/MS/MS 模式测定中毒病人血清和肝脏中 α -鹅膏毒肽, 采用固相萃取法将样品富集 4 倍, α -鹅膏毒肽的检出限分别为 0.25 ng/g 和 0.5 ng/g。

本研究采用超高效液相色谱三重四极杆质谱法同时测定了尿液和血浆中的 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽和羧基二羟鬼笔毒肽, 特别适合于毒蘑菇中毒的确证分析。一次进样分析仅需 9 min。本方法灵敏, 快速, 简便, 选择性好。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Aquity UPLC-Quattro Premier XE 超高效液相色谱-串联质谱仪配有电喷雾源(美国 Waters 公司),

2009-04-30 收稿; 2009-08-20 接受

本文系温州市医学重点学科、温州市第三轮“311”工程建设项目基金(No. 2008012)资助

* E-mail: xyzwz123@126.com

Masslynx 4.1 工作站; MS2 旋涡混旋器(德国 IKA 公司); HUP-100 手持式超声波细胞破碎仪(天津恒奥科技发展有限公司); TDZ5-WS 台式离心机(湘仪离心机仪器有限公司); N-EVAP 氮吹仪(12 孔, 美国 Organomation 公司); 2510 超声波清洗机(美国 Branson 公司); Gradient A10 Mill-Q 超纯水器(法国 Millipore 公司); 针头过滤器(13mm GHP 0.2 μm , 美国 Pall 公司)。

乙腈和甲醇(HPLC 级, 德国 Merck 公司); 乙酸铵(HPLC 级, Fluka 公司); α -鹅膏蕈毒肽($\geq 90\%$)、 β -鹅膏蕈毒肽($\geq 90\%$)、 γ -鹅膏蕈毒肽($\geq 90\%$)、二羟鬼笔毒肽($\geq 95\%$)和羧基二羟鬼笔毒肽($\geq 90\%$)均购自 Alexis Biochemicals 公司, 用甲醇配制成 100 mg/L 标准贮备溶液, 保存于 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

2.2 液相色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm , Waters 公司); VanGuard BEH C₁₈ 保护柱(5 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , Waters 公司); 流动相 A 为 2 mmol/L 乙酸铵水液, 流动相 B 为 2 mmol/L 乙酸铵甲醇液, 采用梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1; 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样 10 μL 。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源正离子多反应监测(MRM)

模式。ESI + 毛细管电压: 3.5 kV; 离子源温度: $120\text{ }^{\circ}\text{C}$; 锥孔反吹气流量: 50 L/h, 脱溶剂温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流量: 600 L/h, 碰撞室氦气压力: 0.346 Pa。其它质谱参数见表 2。

运行开始时, 色谱柱流出液经六通切换阀切换至废液中, 直到 1.80 min。质谱从 1.80 min 开始采集数据直到 4.70 min 结束, 同时六通切换阀又将柱流出液切换至废液中。

表 2 质谱的 MRM 参数

Table 2 MS parameters for multiple reaction monitoring

化合物 Compounds	保留时间 Retention time (min)	监测离子对 Mass transitions (m/z)	锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞能 Collision energy (eV)
β -鹅膏蕈毒肽 β -Amanitin	1.98	920.7/86.1*	50	70
		920.7/259.1		45
α -鹅膏蕈毒肽 α -Amanitin	2.60	919.8/86.1*	50	70
		919.8/259.1		45
γ -鹅膏蕈毒肽 γ -Amanitin	3.66	903.7/86.1*	45	50
		903.7/259.1		45
羧基二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	4.15	847.7/157.0*	35	65
		847.7/86.1		75
二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	4.49	789.6/157.0	30	65
		789.6/86.1*		75

* 定量离子对(Quantificational ion pair)。

2.4 样品的前处理方法

2.4.1 尿液 取适量尿液过 0.2 μm 滤膜, 待测。同时在 6 支试管中分别按标准曲线的浓度加入适量标准溶液, 加入空白尿液至 1000 μL , 混匀, 过 0.2 μm 滤膜, 制作工作曲线系列。

2.4.2 血浆 吸取 1000 μL 血浆于 10 mL 试管中, 加入 3.0 mL 1% 醋酸-乙腈, 用手持式超声波细胞破碎器均质 2 min, 以 4000 r/min 离心 4 min, 吸取 2.0 mL 上清液于 10 mL 试管中, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干, 加入 250 μL 流动相, 超声 1 min, 旋涡 30 s, 过 0.2 μm 滤膜, 待测。

同时在 6 支试管中分别按标准曲线的浓度加入适量标准溶液, 加入空白血浆至 1000 μL , 混匀, 放置 30 min 后, 加入 3.0 mL 1% 醋酸-乙腈, 与样品一起处理, 制作工作曲线系列。

3 结果与讨论

3.1 质谱条件的优化

在电喷雾正离子 MRM 检测方式下对质谱测定条件进行优化, 使目标化合物的分子离子对信号达

到最佳。它们的二级质谱图见图 1,可能的裂解方式见图 2。遵循国际惯例,确证分析需要 4 个识别点,故每个化合物选择 2 对分子离子对,同时设定合适的峰驻留时间,确保色谱峰的采样点数在 15~20 点,从而提高定量分析的重复性。优化后的测定条件见表 2。

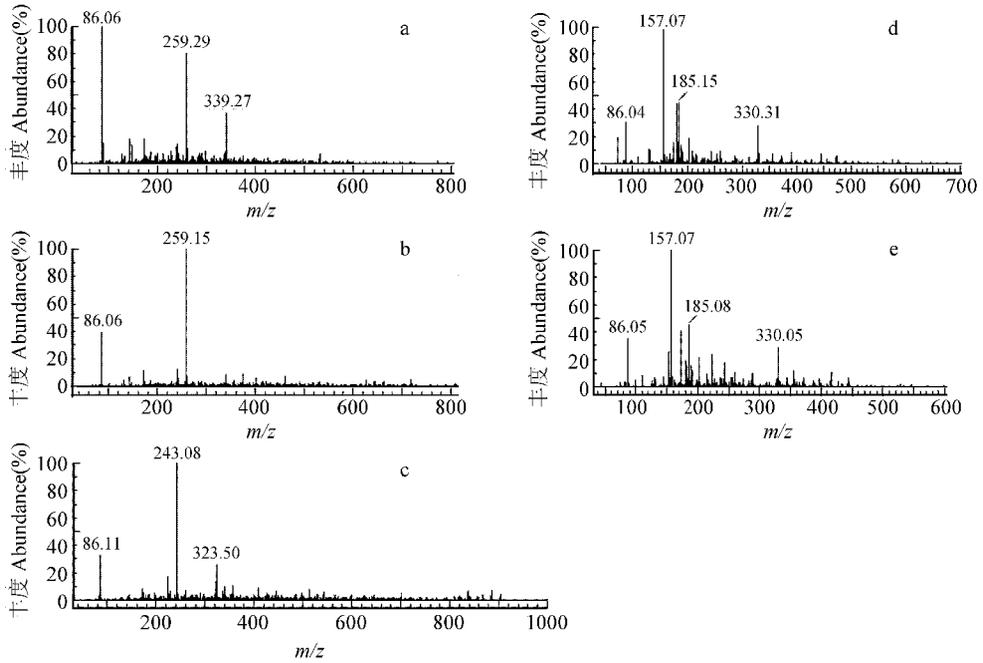


图 1 α -鹅膏毒肽(a)、 β -鹅膏毒肽(b)、 γ -鹅膏毒肽(c)、羧基二羟鬼笔毒肽(d)和二羟鬼笔毒肽(e)的电喷雾二级质谱图

Fig.1 Product ion mass spectra of α -amanitin (a), β -amanitin (b), γ -amanitin (c), phalloidin (d) and phalloidin (e)

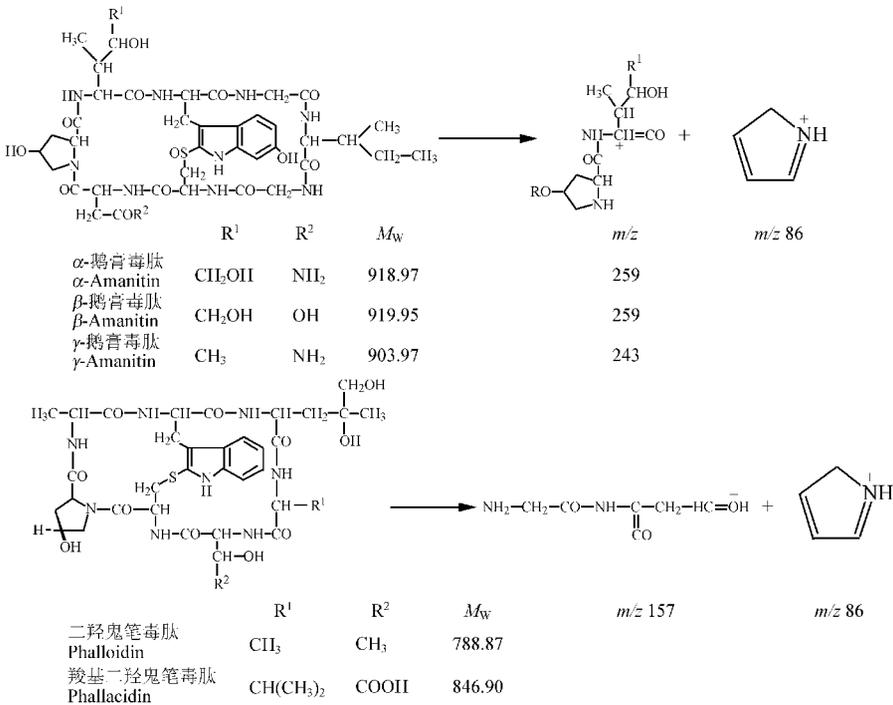


图 2 5 种蘑菇毒素 ESI 裂解方式

Fig.2 Proposed dissociation reaction mechanism for toxins

3.2 色谱条件的优化

采用 Acquity UPLC HSS T3 柱为分析柱,乙酸铵-甲醇为流动相并进行优化。实验发现,流动相中乙酸铵的浓度为 2 mmol/L 时最佳。增加乙酸铵的浓度会抑制质谱信号,加入甲酸也会抑制质谱响应,最终流动相 A 选用 2 mmol/L 乙酸铵水溶液,流动相 B 选用 2 mmol/L 乙酸铵-甲醇液。选择适当的梯度洗脱程序使 5 种毒素分离完全,一次梯度分析仅需 9 min。

3.3 样品前处理方法的优化

对于公共卫生突发事件和临床抢救,分析速度最为重要。本研究中尿液样本可以直接进样,与溶剂标准相比较 5 种组分的回收率在 74.0% ~ 116.0% 之间。虽然由于基体成分的影响使得检出限升高数倍,但方法还是足够灵敏,检出限为 0.2 ~ 1 $\mu\text{g/L}$ 能够满足检测的需求;血浆样品采用 1% 醋酸-乙腈沉淀去除蛋白等杂质,提取液再经氮气吹干,用小体积的流动相复溶,浓缩 1 倍,经液质分析显示基体成分不影响待测物的检测。在分析测试时,样品处理液中强极性和弱极性杂质成分使用六通切换阀切换至废液而不进入质谱仪,分析 100 份样品后不需清洗质谱仪的样品锥,同时采用基体匹配标准外标法定量,有效补偿了基体效应,方法简单、快速。

比较了乙腈、甲醇和丙酮为沉淀剂的效果,结果表明,乙腈沉淀效果最好,蛋白沉淀完全,易于离心分离。实验发现,血浆样品只用乙腈沉淀, β -鹅膏毒肽的回收率偏低,仅有 6.7%,在乙腈中加入醋酸可提高它们的回收率,乙腈中醋酸含量对它们回收率的影响见图 3。本方法最终选用 1% 醋酸-乙腈为血浆的沉淀剂。血浆样品采用超声均质可提高提取率,避免蛋白沉淀物包裹待测物。

3.4 线性范围和检出限

用空白样品加入标准溶液制作 6 点系列标准工作溶液,在选定的色谱和质谱条件下进行测定。采用 Masslynx 4.1 中 Targetlynx 组件以定量离子对的峰面积对基质标准系列浓度作图,血浆和尿液中 5 种毒素的线性相关系数分别在 0.9980 ~ 0.9998 之间,符合线性关系的要求。在本法操作条件下,信噪比为 3 时,定量离子对信号对应的样品浓度作为检出限 (LOD);信噪比为 10 时的样品浓度作为定量限 (LOQ),具体结果见表 3。本方法灵敏度高,线性范围宽,能够满足公共卫生突发事件、法医毒物学和临床毒物学检测的需要。如果样品浓度过高,则应稀释后重新进样测定。

表 3 方法的线性范围和检出限

Table 3 Calibration curves and detection limits for mushroom toxins in human urine and plasma

分析物 Analytes	尿液 Urine				血浆 Plasma			
	线性范围 Linearity range ($\mu\text{g/L}$)	回归方程 Regression equation*	相关系数 Correlation coefficient (r)	检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)	线性范围 Linearity range ($\mu\text{g/L}$)	回归方程 Regression equation*	相关系数 Correlation coefficient (r)	检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)
β -鹅膏毒肽 β -Amanitin	2 ~ 100	$y = 98.85x + 13.21$	0.9995	0.3	1 ~ 100	$y = 213.5x - 20.27$	0.9998	0.1
α -鹅膏毒肽 α -Amanitin	2 ~ 100	$y = 76.35x - 16.15$	0.9991	0.5	1 ~ 100	$y = 183.1x - 17.61$	0.9989	0.1
γ -鹅膏毒肽 γ -Amanitin	2 ~ 100	$y = 59.13x + 16.02$	0.9991	1	1 ~ 100	$y = 129.66x - 4.84$	0.9997	0.1
羧基二羟鬼 笔毒肽 Phalloidin	2 ~ 100	$y = 59.38x - 4.96$	0.9993	0.4	1 ~ 100	$y = 149.0x - 10.54$	0.9994	0.3
二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	2 ~ 100	$y = 101.4x + 54.21$	0.9980	0.2	1 ~ 100	$y = 232.1x - 33.39$	0.9990	0.5

* : x 为浓度 (Concentration of analyte) $\mu\text{g/L}$; y 为峰面积 (Chromatographic peak area)。

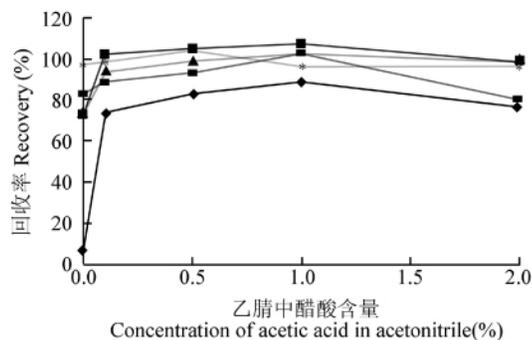


图 3 乙腈中醋酸含量对待测物提取回收率的影响

Fig. 3 Effect of concentration of acetic acid in acetonitrile on the recoveries of toxins

(\diamond) β -鹅膏毒肽 (β -Amanitin); (\blacksquare) α -鹅膏毒肽 (α -Amanitin); (\blacktriangle) γ -鹅膏毒肽 (γ -Amanitin); (\blacksquare) 羧基二羟鬼笔毒肽 (Phalloidin); ($*$) 二羟鬼笔毒肽 (Phalloidin)。

3.5 方法的回收率和精密度

用空白血浆和尿液进行加标回收率和精密度实验,样品添加不同浓度的标准溶液后,放置 30 min,使待测成分与样品基体成分相互作用达到平衡,再按样品前处理方法进行操作,其回收率和精密度结果见表 4。尿液和血浆样品的加标回收率分别在 92% ~ 108% 和 85% ~ 100% 的范围内,相对标准偏差分别为 1% ~ 22% 和 2% ~ 22%,符合痕量分析的要求。血浆加标样品的色谱图见图 4。

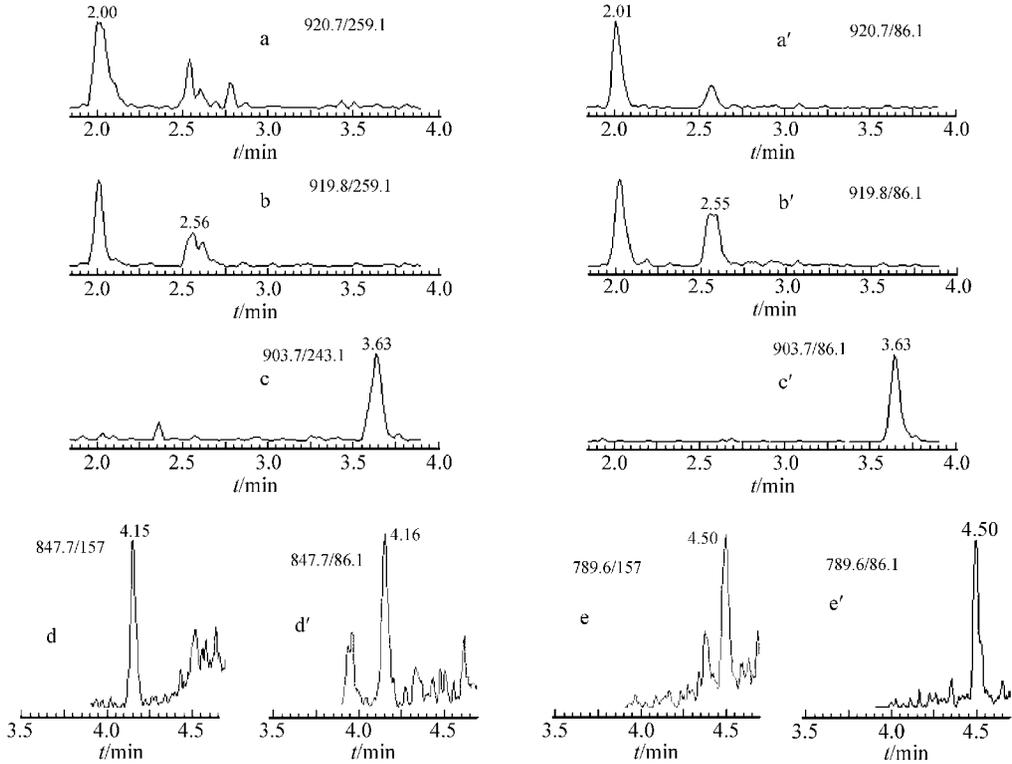


图 4 空白血浆加标样品 MRM 色谱图(1 µg/L)

Fig. 4 UPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma spiked five toxins at the level of 1 µg/L

a, a': β-鹅膏毒肽(β-Amanitin); b, b': α-鹅膏毒肽(α-Amanitin); c, c': γ-鹅膏毒肽(γ-Amanitin); d, d': 羧基二羟鬼笔毒肽(Phalloacidin); e, e': 二羟鬼笔毒肽(Phalloidin)。

表 4 加标回收率和精密度(n=6)

Table 4 Recoveries and RSDs of mushroom toxins in urine and plasma(n=6)

化合物 Analytes	尿液 Urine			血浆 Plasma		
	加标浓度 Added (mg/L)	加标回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	加标浓度 Added (mg/L)	加标回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
α-鹅膏毒肽 α-Amanitin	2.0	103	14	1.0	96	15
	10	101	6	10	88	3
	80	96	3	80	98	2
β-鹅膏毒肽 β-Amanitin	2.0	101	12	1.0	98	9
	10	99	10	10	90	7
	80	92	3	80	100	2
γ-鹅膏毒肽 γ-Amanitin	2.0	97	22	1.0	96	22
	10	95	5	10	87	4
	80	98	1	80	97	2
羧基二羟 鬼笔毒肽 Phalloacidin	2.0	99	16	1.0	94	17
	10	94	6	10	85	3
	80	97	3	80	99	3
二羟鬼笔毒肽 Phalloidin	2.0	108	13	1.0	99	13
	10	96	8	10	86	5
	80	98	3	80	98	2

References

- 1 Vetter J. *Toxicon*, **1998**, 36(1): 13 ~ 24
- 2 CHEN Zuo-Hong (陈作红), ZHANG Zhi-Guang (张志光). *Practical Preventive Medicine* (实用预防医学), **2003**, 10(2): 260 ~ 262
- 3 BAO Hai-Ying (包海鹰). *Studies on Chemical Compositions and Pharmacological Action of Some Toadstools* (毒蘑菇化学成分与药理活性的研究). Huhhot (呼和浩特): Inner Mongolia Education Press (内蒙古教育出版社), **2006**: 1 ~ 20
- 4 Faulstich H, Trischmann H, Zobeley S. *FEBS Lett.*, **1975**, 56(C): 312 ~ 315
- 5 Bruggemann O, Meder M, Freitag R. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 744(1-2): 167 ~ 176
- 6 Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H, Faulstich H. *J. Chromatogr.*, **1992**, 598(2): 227 ~ 236
- 7 Defendenti C, Bonacina E, Mauroni M, Gelosa L. *Forensic Sci. Int.*, **1998**, 92(1): 59 ~ 68
- 8 LI Dong-Ping (李东屏), ZHANG Zhi-Guang (张志光). *Life Science Research* (生命科学研究), **1997**, 1(1): 41 ~ 46
- 9 Maurer H H, Kraemer T, Ledvinka O, Schmitt C J, Weber A A. *J. Chromatogr. B*, **1997**, 689(1): 81 ~ 89
- 10 Chung W C, Tso S C, Sze S T. *J. Chrom. Sci.*, **2007**, 45(2): 104 ~ 111
- 11 Maurer H H, Schmitt C J, Weber A A, Kraemer T. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 748(1): 125 ~ 135
- 12 Filigenzi M S, Poppenga R H, Tiwary A K, Puschner B. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55(8): 2784 ~ 2790

Rapid Simultaneous Determination of Five Amatoxins and Phallotoxins in Human Urine and Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole Mass Spectrometry

ZHANG Xiu-Yao*, CAI Xin-Xin

(Wenzhou Center for Disease Control and Prevention, Wenzhou 325001)

Abstract Specific detection of amatoxins and phallotoxins in body fluids is necessary for an early diagnosis of an intoxication with mushrooms. In this study, a rapid method for the simultaneous determination of α -, β - and γ -amanitin, phalloidin and phalloidin in human urine and plasma was first developed by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Urine sample was directly injected into the separation system and plasma sample was initially prepared by precipitation of proteins with 1% acetic acid in acetonitrile. The toxin was analyzed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column using a gradient program with a cycle time of 9 min, and detected by positive electrospray ionization tandem mass spectrometry in the MRM mode, and quantified by matrix-match standard solution. The detection limits ($S/N = 3$) of the toxins were within 0.2 - 1 $\mu\text{g/L}$ and 0.1 - 0.5 $\mu\text{g/L}$ for urine and plasma, respectively. The standard curves were linear in the range of 2 - 100 $\mu\text{g/L}$ for urine and 1 - 100 $\mu\text{g/L}$ for plasma. The average recoveries were 92.0% - 108.0% and 85.0% - 100.0% for the toxins spiked in urine and plasma, with RSDs of 1.0% - 22.0% and 2.0% - 22.0% ($n = 6$), respectively. The method was simple, selective and sensitive to detect the amatoxins and phallotoxins in urine and plasma for both clinical and forensic purposes.

Keywords Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Amatoxins; Phallotoxins; Urine; Plasma

(Received 30 April 2009; accepted 20 August 2009)