

麻痹性贝毒素电喷雾质谱负离子模式分析特征

李兆永¹, 陈军辉¹, 王 帅¹, 张茹潭¹, 史 倩^{1,2},
郑 立¹, 王小如^{1,3}

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 海洋生态研究中心, 山东 青岛 266061;
2. 中国海洋大学化学化工学院, 山东 青岛 266100; 3. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用多级质谱技术对 8 种常见麻痹性贝毒素(GTX1, GTX 4, GTX2, GTX 3, dcGTX2, dcGTX3, C1 和 C2)在电喷雾质谱负离子模式下的分析特征进行研究。结果表明:8 种目标化合物在一级质谱分析过程中均易失去 1 个 H, 形成准分子离子[M-H]⁻峰(基峰);在二级质谱分析过程中,各化合物的母离子([M-H]⁻)主要通过丢失-H₂O 和-NHCO 等中性碎片,形成稳定的特征子离子峰,并且同分异构体的二级质谱图有差异,可为含硫麻痹性贝毒素的二级质谱定性、定量分析提供依据。此外,对各目标化合物二级质谱的主要碎片峰进行三级质谱分析,对产生的主要特征碎片峰进行归属,并推测裂解途径。本研究可为电喷雾质谱在负离子模式下检测含硫麻痹性贝毒素提供参考和依据。

关键词: 麻痹性贝毒素;电喷雾质谱;裂解途径

中图分类号: O 657. 63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2014)01-0008-08

doi: 10. 7538/zpxb. 2014. 35. 01. 0008

MS Characteristic of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins Detected by Electrospray Ionization Mass Spectrometry in Negative Ion Mode

LI Zhao-yong¹, CHEN Jun-hui¹, WANG Shuai¹,
ZHANG Ru-tan¹, SHI Qian^{1,2}, ZHENG Li¹, WANG Xiao-ru^{1,3}

(1. *Research Center for Marine Ecology, The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;*
2. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;*
3. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China*)

Abstract: The MS characteristic of eight common paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, dcGTX2, dcGTX3, C1 and C2) were investigated by electrospray ionization multi-stage mass spectrometry (ESI-MSⁿ) in negative ion mode. The results show that the quasi-molecular ion peak [M-H]⁻ (base peak) of each PSP toxin is detected by ESI-MS. Stability characteristic fragment ions are observed by the neutral loss of -H₂O and -NHCO for ESI-MS² detection, and the MS² spectra of PSP toxin isomers are

收稿日期:2013-05-24;修回日期:2013-07-02

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA092001-10);国家科技支撑计划项目(2013BAK12B00);上海市科委科研计划项目(11dz1204706)资助

作者简介:李兆永(1984~),男(汉族),山东人,助理工程师,环境科学专业。E-mail: lizhaoyong2056@126.com

通信作者:陈军辉(1978~),男(汉族),河北人,副研究员,海洋化学专业。E-mail: jhchen@fio.org.cn

different, which can provide experimental basis for qualitative and quantitative determination of sulfur containing PSP toxins by ESI-MS². ESI-MS³ detection is performed for the main characteristic fragment ions of the target toxins produced during ESI-MS² analysis. The main MS³ characteristics of the fragment routes are also discussed. This study can help to offer the reference and basis for determination of sulfur containing PSP toxins by electrospray ionization mass spectrometry in negative ion mode.

Key words: fragmentation pathway; electrospray mass spectrometry; paralytic shellfish poisoning

麻痹性贝毒素(paralytic shellfish poisoning, PSP)是赤潮毒素中毒性最大、发生毒害事件最多、影响人类最为严重的一类毒素,食入少量的 PSP 毒素即可引起神经系统疾病,严重时会导致呼吸系统麻痹,甚至死亡^[1]。麻痹性贝毒素是四氢嘌呤的衍生物,没有紫外吸收,易溶于水,但不溶于非极性有机溶剂^[2]。据最新统计,现已发现的 PSP 毒素有 20 多种,根据分子结构中 R₄ 基团的不同,可将其分为 4 类:1)氨基甲酸酯类毒素(carbamate toxins),包括石房蛤毒素(STX)、新石房蛤毒素(neoSTX)、膝沟藻毒素 1-4(GTX1-4);2) N-磺酰氨基甲酰基类毒素(N-sulfocarbamoyl toxins),包括 B1-2、C1-4;3)脱氨基甲酰基类毒素(decarbamoyl toxins),包括 dcSTX、dcneoSTX、dcGTX1-4;4)脱氧脱氨基甲酰基类毒素(deoxydecarbamoyl toxins),包括 dodecSTX、dodecGTX2、3 等^[3]。

近年来,液相色谱-电喷雾质谱联用技术已成为海产品和藻体中 PSP 检测的先进方法之一。采用电喷雾质谱检测 PSP 的现有文献均为正离子(ESI⁺)模式,存在方法灵敏度低的缺点^[4-10]。而采用电喷雾质谱负离子模式检测 PSP 毒素的研究未见报道,负离子模式下的 PSP 质谱分析裂解规律也尚未阐明。在已经发现的 20 多种 PSP 毒素中,约有 65% PSP 毒素含有 OSO₃⁻ 基团,对于含有此基团的化合物而言,理论上更适合 ESI 负离子模式检测。本研究分别采用 ESI⁺ 和 ESI⁻ 两种模式,对含 OSO₃⁻ 基团的 8 种常见的 PSP 毒素:PSPGTX1、4(R₄ = COONH₂), GTX2、3(R₄ = COONH₂), dcGTX2、3(R₄ = OH)和 C1、2(R₄ = COONH-SO₃⁻)(均为同分异构体)进行分析比较,在负离子模式下进行多级质谱裂解规律研究,并对其碎片峰进行归属,以期液相色谱-电喷雾质谱法(ESI⁻模式)测定含 S 麻痹性贝毒素提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪:美国 Agilent 公司产品,配有四元泵、DAD 检测器、自动进样器等;6320 型离子阱质谱仪:美国 Agilent 公司产品,配有电喷雾(ESI)离子源;Milli-Q 超纯水处理系统:美国 Millipore 公司产品。

甲酸(色谱纯)和甲酸铵(优级纯):瑞士 Fluka 公司产品;乙腈(色谱纯):美国 Tedia 公司产品;超纯水:由 Milli-Q 超纯水系统制得。

麻痹性贝毒素标准溶液(CRM-GTX1&4-c, CRM-GTX2&3-c, CRM-dcGTX2&3-c, CRM-C1&2 等):加拿大国家海洋研究中心产品。

1.2 对照品溶液的配制

用 0.1 mol/L 乙酸稀释毒素标准溶液,配成混合标准储备液,各组分的浓度分别为:GTX1(0.124 mg/L)、GTX2(0.226 mg/L)、GTX3(0.086 mg/L)、GTX4(0.041 mg/L)、dcGTX2(0.205 mg/L)、dcGTX3(0.046 mg/L)、C1(0.270 mg/L)和 C2(0.083 mg/L)。

1.3 亲水作用色谱-电喷雾质谱条件

1.3.1 色谱条件 Waters Atlantis HILIC Silica 色谱柱(2.1 m×150 mm×3 μm);流动相:A 为水,B 为 95%乙腈(含有 5 mmol/L 甲酸铵和 0.1%甲酸);流速 0.4 mL/min;进样量 10 μL;室温 20~25 °C;梯度洗脱程序:时间为 0—5—33—35 min,B%为 100%—100%—89.8%—80%。

1.3.2 质谱条件 负离子模式(ESI⁻),扫描范围 *m/z* 100~500,干燥气温度 350 °C,干燥气流速 10 L/min,喷雾气压 241.3 kPa,毛细管电压 4.5 kV,裂解电压 120 V,锥孔电压 60 V。

2 结果与讨论

2.1 PSP 毒素 ESI-MS,ESI-MS² 质谱分析特征 分别采用 ESI⁺ 和 ESI⁻ 全扫描对 8 种常见

含 OSO_3^- 基团的 PSP 标准溶液进行检测, 结果发现, 这 8 种 PSP 化合物(两两为同分异构体) 在正、负离子模式下均有响应, 但是在负离子模式下的灵敏度明显好于正离子模式, 灵敏度约为正离子模式的 2~10 倍。8 种常见含 OSO_3^- 基团 PSP 毒素在负离子模式下的一级质谱图示于图 1。由图 1 可见, 8 种 PSP 化合物在负离子模式下均易失去 1 个 H, 形成准分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 峰(基峰), 各化合物 m/z 分别为 GTX1 和 GTX4: 410, GTX2 和 GTX3: 394, dcGTX2 和 dcGTX3: 351, C1 和 C2: 474; 在一级质谱检测过程中未发现 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ 峰, 且 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 峰稳定性较好, 一级质谱图上未见明显的碎片峰, 各组同分异构体的一级质谱图并无明显差异。

在各化合物一级质谱分析的基础上, 以准分

子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 峰为母离子, 进行 ESI- MS^2 分析, 结果示于图 2。下面将对各 PSP 同分异构体的二级质谱分析特征进行逐一讨论。GTX1 和 GTX4 的 ESI- MS^2 分析主要得到 m/z 367、349 子离子峰。 m/z 367 子离子峰均为基峰, 推测为准分子离子 m/z 410 的 R_4 基团失去中性碎片 $-\text{NHCO}$ 而形成的 $[\text{M}-\text{H}-43]^-$ 子离子峰。由于 m/z 367 子离子峰丰度高、稳定性好, 故在 GTX1 与 GTX4 定量分析中可选为定量离子。推测 m/z 349 的子离子峰为母离子失去中性碎片 $-\text{H}_2\text{O}-\text{NHCO}$ 而形成的 $[\text{M}-\text{H}-61]^-$ 子离子峰。通过比较 GTX4 与 GTX1 的二级质谱图可以看出, 在 GTX4 的二级质谱图中还可观察到明显的 m/z 392 子离子峰, 推测为母离子 12 位

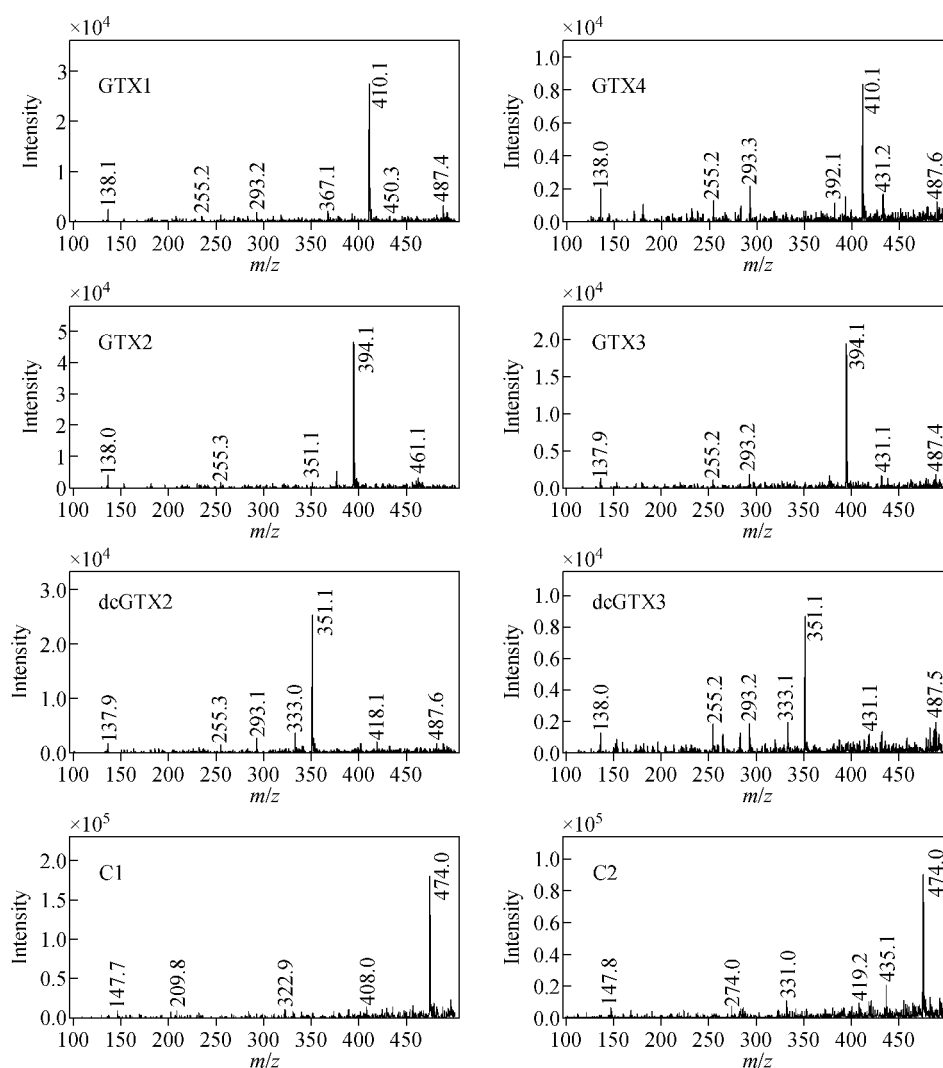


图 1 负离子模式下 8 种 PSP 毒素一级质谱图

Fig. 1 MS spectra of eight PSP toxins in negative ion mode

C 失去一分子水所生成的 $[M-H-18]^-$ 子离子峰。由此可知,在 ESI⁻ 二级质谱分析中,GTX4 母离子比 GTX1 更易产生稳定的脱水峰,这可作为区分这对同分异构体的质谱特征指标。

GTX2 和 GTX3 在 ESI-MS² 分析中主要得到 m/z 376、351、333 子离子峰,分别为准分子离子 m/z 394 失去中性碎片 $-H_2O$, $-NHCO$ 和 $-H_2O-NHCO$ 所形成的子离子峰。在 GTX2 的二级质谱图中, m/z 351 的子离子峰为基峰,子离子峰 m/z 376,333 丰度均较低;而 GTX3 的二级质谱图与 GTX2 差异明显,其中 m/z 376 子离子峰为基峰, m/z 351,333 子离子峰丰度也相对较高。这两种化合物(同分异构体)在二级质谱分析中检测到的子离子差异明显,可用于该化合物的区分。GTX2 定量离子可选用 m/z

$394 > m/z$ 351,而 GTX3 的定量离子可选用 m/z $394 > m/z$ 376。

dcGTX2 和 dcGTX3 在 ESI-MS² 分析中主要得到 m/z 333 子离子峰(基峰),推测为准分子离子 m/z 351 的 12 位 C 上失去一分子水,可选用 m/z $351 > m/z$ 333 作为检测离子,用于 dcGTX2 和 dcGTX3 的定量测定。比较 dcGTX2 和 dcGTX3 的二级质谱图可以发现,两者有一定的差异,可通过二级质谱分析对二者进行区分。

C1 和 C2 在 ESI-MS² 分析中主要得到 m/z 456、351、431、413、394 的子离子峰。基峰为 m/z 456 子离子,推测为母离子 12 位 C 上失去一分子水,可选用其作为检测子离子进行 C1 和 C2 的定量测定。子离子峰 m/z 351 推测为母离

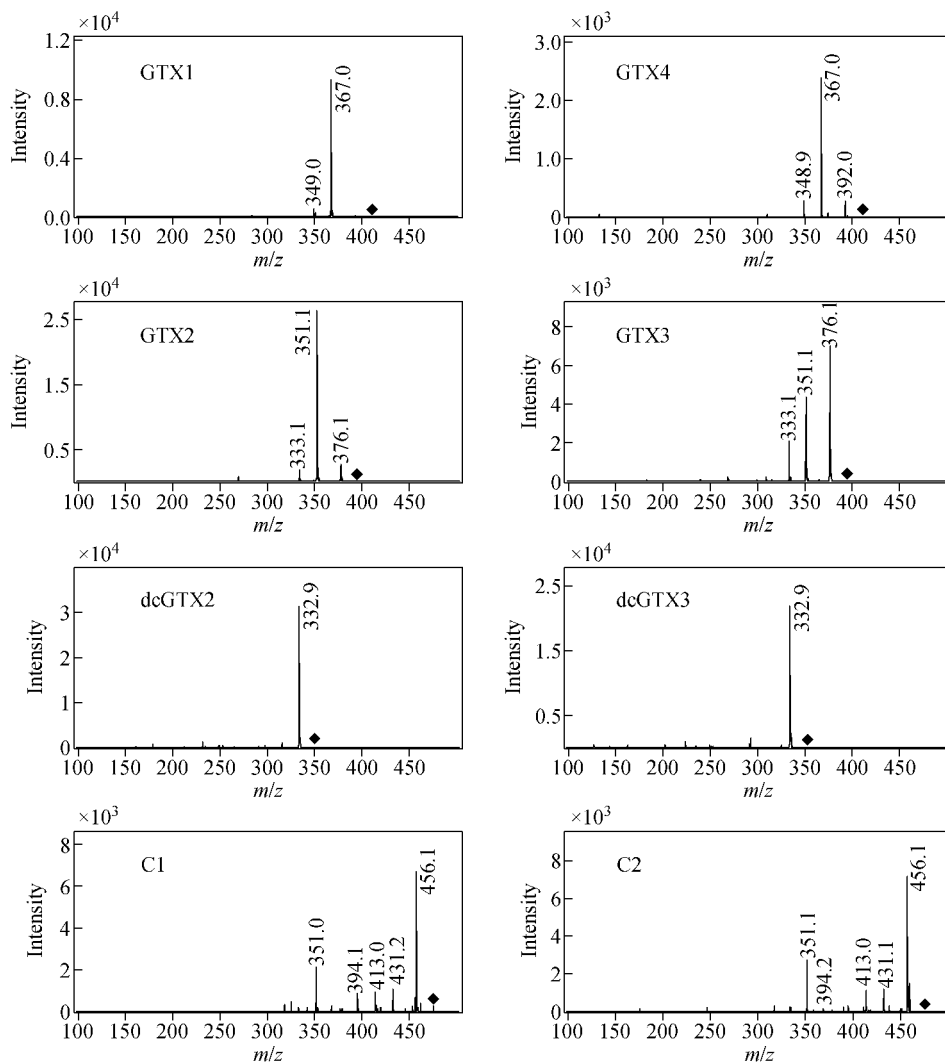


图 2 负离子模式下 8 种 PSP 毒素二级质谱图

Fig. 2 MS² spectra of eight PSP toxins in negative ion mode

子 R_4 基团失去碎片 $-\text{SO}_3-\text{NHCO}$; m/z 431 子离子峰推测为母离子失去中性碎片 $-\text{NHCO}$, 进一步失去一分子水生成 m/z 413 碎片峰; m/z 394 子离子峰推测为母离子失去碎片 $-\text{SO}_3$ 形成的子离子峰。

2.2 PSP 毒素 ESI-MS³ 质谱分析及裂解规律

在多级质谱分析中, 对子离子信号强度影响最大的是碎裂振幅。如果碎裂振幅过高, 母离子完全碎裂; 如果碎裂振幅过低, 母离子没有碎裂或子离子碎片过少, 不便对化合物进行结构鉴定^[11]。以各目标化合物在 ESI-MS² 分析中得到的丰度最大的离子峰为三级质谱分析母离子, 通过逐渐加大碎裂振幅, 比较不同碎裂振幅条件下的三级质谱图, 从而确定最佳的三级质谱分析条件, 8 种化合物的三级质谱图示于图 3。

从图 3 可以看出, GTX1 和 GTX4 三级质谱图均主要得到 m/z 349 离子, 推测为 m/z 367 离子峰失去一分子 H_2O 所生成 m/z 349 离子峰。GTX2 和 GTX3 三级质谱图都得到 m/z 333 离子峰, 但裂解途径不同; GTX2 为 m/z 351 离子峰失去一分子 H_2O 生成 m/z 333 离子峰; GTX3 为 m/z 376 离子峰失去中性碎片 $-\text{NHCO}$ 生成 m/z 333 离子峰。dcGTX2 和 dcGTX3 ESI-MS³ 质谱图主要得到 m/z 253、235、274 离子峰, 为 m/z 333 离子峰分别失去 $-\text{SO}_3$ 、 $-\text{SO}_3-\text{H}_2\text{O}$ 、 $-\text{NH}_3-\text{HNCNH}$ 所生成; dcGTX2 的 m/z 333 离子峰还可失去 $-\text{NH}_3$ 生成 m/z 316 离子峰, 失去 $-\text{HNCNH}$ 生成 m/z 291 离子峰; 而 dcGTX3 的三级质谱图中并无 m/z 316 和 m/z 291 离子产生。C1 和 C2 三级

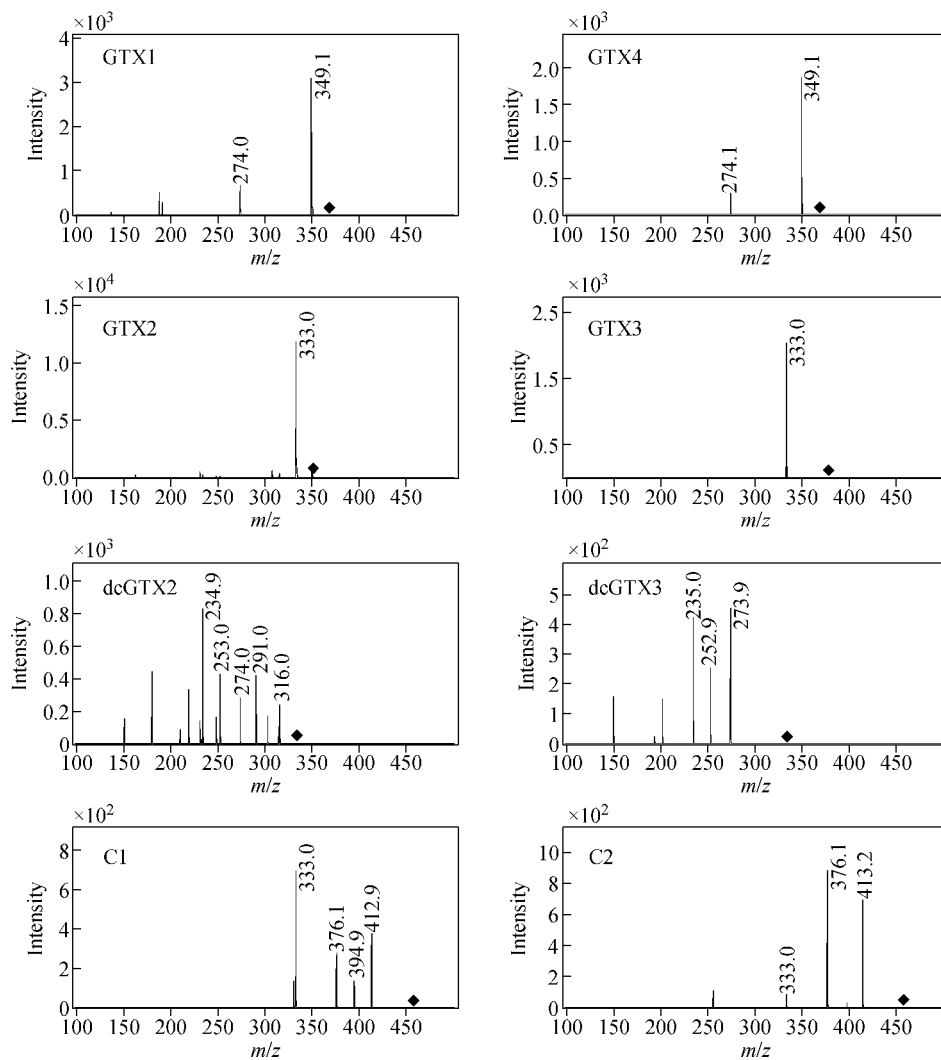


图 3 负离子模式下 8 种 PSP 毒素三级质谱图

Fig. 3 MS³ spectra of eight PSP toxins in negative ion mode

质谱图均得到 m/z 413、376、333 离子峰,为 m/z 456 离子峰分别失去 $-\text{NHCO}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-\text{SO}_3-\text{NHCO}$ 所生成,C1 的 m/z 413 离子峰还可失去一分子水生成 m/z 395 碎片峰,C2 无碎片 m/z 395 离子生成。

通过比较各化合物结构和多级质谱信息发现:GTX1~GTX4 多级质谱分析碎片峰较少,均可失去中性碎片 $-\text{NHCO}$ 和 $-\text{H}_2\text{O}$,三级质谱峰均为失去碎片 $-\text{NHCO}-\text{H}_2\text{O}$ 所形成,且

丰度较高,说明子离子 $[\text{M}-\text{H}-43-18]^-$ 结构相对比较稳定。而 dcGTX2 和 dcGTX3 二级质谱分析得到的基峰恰为结构稳定的 m/z 333 离子峰,其它二级碎片离子较少。dcGTX2、dcGTX3、C1、C2 的三级质谱分析碎片离子较多,丰度都很低,且这 4 种化合物都可失去 $-\text{SO}_3$ 中性碎片。8 种化合物多级质谱分析产生的碎片离子列于表 1,推测得出的各化合物多级质谱分析裂解途径示于图 4。

表 1 8 种麻痹性贝毒素多级质谱分析数据
Table 1 Mass spectral data of eight PSP toxins for MSⁿ analysis

化合物	ESI-MS		ESI-MS ²		ESI-MS ³	
	<i>t</i> /min	$[\text{M}-\text{H}]^-$	子离子	母离子	子离子	丢失碎片
GTX1	29.2	410(100)	367(100), 349(6),	367	349(100)	$-\text{H}_2\text{O}$
GTX2	30.8	394(100)	351(100), 376(11), 333(8)	351	333(100)	$-\text{H}_2\text{O}$
GTX3	32.8	394(100)	376(100), 351(63), 333(30)	376	333(100)	$-\text{NHCO}$
GTX4	31.3	410(100)	367(100), 349(12), 392(11)	367	349(100)	$-\text{H}_2\text{O}$
dcGTX2	31.5	351(100)	333(100)	333	235(100), 253(52), 291(51), 274(36), 316(30)	$-\text{SO}_3-\text{H}_2\text{O}$, $-\text{SO}_3$, $-\text{HNCNH}$, $-\text{NH}_3-\text{HNCNH}$, $-\text{NH}_3$
dcGTX3	33.1	351(100)	333(100)	333	274(100), 235(95), 253(58)	$-\text{NH}_3-\text{HNCNH}$, $-\text{SO}_3-\text{H}_2\text{O}$, $-\text{SO}_3$
C1	27.8	474(100)	456(100), 351(36), 431(15), 394(14), 413(14)	456	333(100), 413(56), 376(40), 395(20)	$-\text{SO}_3-\text{NHCO}$, $-\text{NHCO}$, $-\text{SO}_3$, $-\text{NHCO}-\text{H}_2\text{O}$
C2	28.9	474(100)	456(100), 351(39), 431(17), 413(16), 394(4)	456	376(100), 413(77), 333(9)	$-\text{SO}_3$, $-\text{NHCO}$, $-\text{SO}_3-\text{NHCO}$

3 结论

采用电喷雾质谱在负离子模式下测定 8 种常见含硫 PSP 毒素,其灵敏度明显高于正离子模式,离子稳定性较好,且能提供较丰富的碎片信息。8 种含硫 PSP 毒素在负离子模式一级质谱分析过程中均易失去 1 个 H,形成准分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 峰(基峰),且同分异构体的一级质谱图无明显差异;在二级质谱分析过程中,各 PSP 毒素的母离子($[\text{M}-\text{H}]^-$)主要通过丢失 $-\text{H}_2\text{O}$ 和 $-\text{NHCO}$ 的中性碎片,形成稳定的特征子离

子峰,并且同分异构体的二级质谱图有差异。GTX1~GTX4 的三级质谱分析碎片峰较少,三级质谱基峰均为失去碎片 $-\text{NHCO}-\text{H}_2\text{O}$ 所形成,且丰度较高。dcGTX2、dcGTX3、C1、C2 的三级质谱分析碎片离子较多,丰度很低,且这 4 种化合物都可失去 $-\text{SO}_3$ 中性碎片。在此基础上,对这 8 种含硫 PSP 毒素的多级质谱分析裂解途径进行了推测,其结果可为电喷雾质谱负离子模式定性、定量分析常见含硫 PSP 毒素提供依据。

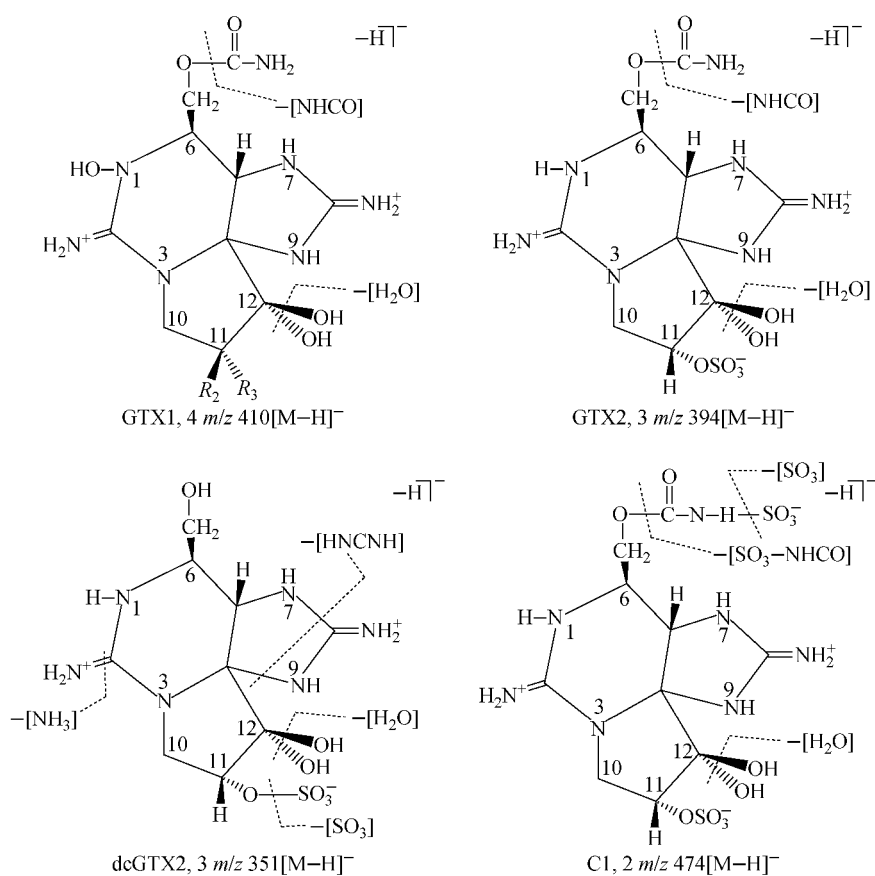


图 4 8 种 PSP 毒素质谱分析裂解途径

Fig. 4 Fragment pathways of eight PSP toxins for MS analysis

参考文献:

- [1] 刘红河, 杨俊, 陈裕华, 等. 亲水作用液相色谱串联质谱联用法测定海产品中麻痹性贝类毒素[J]. 现代预防医学, 2010, 37(7): 1 328-1 332.
LIU Honghe, YANG Jun, CHEN Yuhua, et al. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in sea foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry[J]. Modern Preventive Medicine, 2010, 37(7): 1 328-1 332(in Chinese).
- [2] 江天久, 江涛, 谢丽琪, 等. 一种检测麻痹性贝毒的高效液相色谱法[J]. 分析化学, 2006, 34(5): 625-628.
JIANG Tianjiu, JIANG Tao, XIE Liqi, et al. Method to determine paralytic shellfish poisoning by high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(5): 625-628(in Chinese).
- [3] 江涛, 江天久. 贝类体内麻痹性贝类毒素的提取方法研究[J]. 分析化学, 2008, 36(11): 1 460-1 464.
JIANG Tao, JIANG Tianjiu. Investigation of extraction method for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2008, 36(11): 1 460-1 464(in Chinese).
- [4] 赵贵平, 蒋宏健, 李丹. LC/MS/MS 检测海洋中贝类毒素[J]. 环境化学, 2009, 28(6): 961-962.
ZHAO Guiping, JIANG Hongjian, LI Dan. Determination of shellfish toxins in marine by LC/MS/MS[J]. Environmental Chemistry, 2009, 28(6): 961-962(in Chinese).
- [5] 张小军, 陈雪昌, 郭远明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定 4 种麻痹性贝类毒素[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2011, 30(2): 95-98.
ZHANG Xiaojun, CHEN Xuechang, GUO Yuanming, et al. Determination of four paralytic shellfish poisons by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2011, 30(2): 95-98(in Chinese).
- [6] KROCK B, SEGUEL C G, CEMBELLA A D. Tox-

- in profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. *Harmful Algae*, 2007, 6(5): 734-744.
- [7] AVERSANO C D, HESS P, QUILLIAM M A. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1 081 (2): 190-201.
- [8] TUTTELL E, STOBO L, LACAZE J P, et al. Optimization of hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry and development of solid-phase extraction for the determination of paralytic shellfish poisoning Toxins[J]. *Journal of AOAC international*, 2008, 91(6): 1 372-1 386.
- [9] SAYFRITZ S J, AASEN J A B, AUNE T. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection[J]. *Toxicon*, 2008, 52 (2): 330-340.
- [10] DIENER M, ERLER K, CHRISTIAN B, et al. Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins[J]. *Journal of Separation Science*, 2007, 30 (12): 1 821-1 826.
- [11] 韩建平, 李 伟, 张 超, 等. 水飞蓟宾的负离子电喷雾离子阱质谱研究[J]. *质谱学报*, 2009, 30 (1): 6-11.
- HAN Jianping, LI Wei, ZHANG Chao, et al. Study on silybin in negative mode by ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2009, 30(1): 6-11 (in Chinese).