

液相色谱-串联质谱法检测9种腹泻性贝毒毒素

吴振兴^{1*}, 静平¹, 曹文卿¹, 鲍蕾¹, 梁成珠¹, 宫小明²

(1. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002; 2. 潍坊出入境检验检疫局, 潍坊 261000)

摘要: **目的** 建立腹泻性贝毒毒素9种代表性化合物: 大田软海绵酸、鳍藻毒素、蛤毒素2、扇贝毒素及其衍生物、环亚胺米氏裸甲藻毒素、螺环内酯毒素1和原多甲藻酸的高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)检测方法。**方法** 以80%甲醇水溶液对贝类组织中的毒素进行提取,再以亲水亲脂平衡柱(HLB)对提取液进行净化,最后以高效液相色谱-电喷雾串联质谱测定。**结果** DSP毒素9种代表性化合物在各自浓度范围内线性良好,回收率为68.9%~94.2%,精密度为3.5%~9.5%。**结论** 该方法具有灵敏度高、重现性好、操作简便、准确可靠等特点,适用于贝类中腹泻性贝毒毒素的测定。

关键词: 海洋贝类; 腹泻性贝毒毒素; 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法

Determination of 9 kinds of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WU Zhen-Xing^{1*}, JING Ping¹, CAO Wen-Qing¹, BAO Lei¹, LIANG Cheng-Zhu¹, GONG Xiao-Ming²

(1 Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China, 2 Weifang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weifang 261000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC)-electrospray ionization mass spectrometry method for determination of 9 kinds of representative diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins including okadaic acid(OA), dinophysistoxin1, 2(DTX1, DTX2), pectenotoxin2(PTX2), yessotoxin(YTX), homo-yessotoxin(hYTX), gymnodimine(GYM), spirolide1(SPX1) and azaspiracid1(AZA1) in shellfish. **Methods** The toxins were extracted with 80% methanol aqueous solution from the shellfish, then cleaned up by hydrophile-lipophile balance columns, at last, the extractive was determined by a reversed phase HPLC gradient program coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **Results** Nine representative diarrhetic shellfish poisoning toxins had a good linear relationship in respective concentration range, the average recoveries were ranged from 68.9%~94.2%, and the precision was in ranged from 3.5%~9.5%. **Conclusion** The developed method is simple and accurate, which can be applied for determination of DSP toxins in shellfish.

KEY WORDS: marine shellfish; diarrhetic shellfish poisoning toxins; high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry

基金项目: 青岛创业创新领军人才计划项目(13-CX-28)

Fund: Supported by the Entrepreneurial and Innovative Leading Talents Project of Qingdao (13-CX-28)

*通讯作者: 吴振兴, 高级工程师, 主要研究方向为生物毒素检测。E-mail: zhxwoo@126.com

*Corresponding author: WU Zhen-Xing, Senior Engineer, Inspection and Quarantine Technology Center of SDCIQ, Qingdao 266002, China. E-mail: zhxwoo@126.com

1 引言

腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)毒素是由鳍藻(*Dinophysis* spp.)和原甲藻(*Prorocentrum* spp.)等海洋藻类产生的脂溶性海洋生物毒素^[1], 这些毒素经海洋贝类积累后通过食物链进入人体, 严重危害人类健康安全。自 1976 年, 日本报道首例 DSP 毒素中毒事件^[2]以来, 世界各地沿海, 特别是西欧、北欧和亚洲沿海各国均发现了 DSP 毒素。根据近年来对中国沿海部分海区的调查显示, 辽东湾、胶州湾、莱州湾、秦皇岛、福建等海域双壳贝类已经广泛受到 DSP 毒素的污染^[3-5]。

DSP 毒素的主要化学结构为聚醚或大环内脂化合物^[6], 除常见的酸性成分大田软海绵酸(okadaic acid, OA)及其衍生物鳍藻毒素(dinophysistoxin1、2, DTX1、DTX2)以外, 还有多种新型 DSP 毒素被发现, 如中性成分聚醚内脂-蛤毒素 2(pectenotoxin2, PTX2), 其他成分, 硫酸盐化合物扇贝毒素(yessotoxin, YTX)及其衍生物(homo-yessotoxin, hYTX), 环亚胺米氏裸甲藻毒素(gymnodimine, GYM)和螺环内酯毒素 1(spirolide1, SPX1), 原多甲藻酸(azaspiracid1, AZA1)^[7,8]。

DSP 毒素传统的检测方法主要有小鼠生物法(mouse bioassay, MBA)、免疫分析法(immunoassays, IA)和高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)。MBA 法的主要缺陷是操作繁琐、缺乏特异性, 贝类组织中的游离脂肪酸对小鼠毒性影响很大, 假阳性率较高^[9]。IA 法也同样存在假阳性率较高的问题, 而且检测成分单一, 结果不能代表样本整体毒性。HPLC 法需要繁琐的衍生步骤, 主要利用衍生化试剂 9-蒽基叠氮甲烷(ADAM)和 4-溴甲基 7-甲氧基香豆素(BrMmc)等将 DSP 毒素衍生, 使其在荧光检测器上获得更高灵敏度^[10], 同时, 衍生化试剂还存在性质不稳定问题, 有时会导致 DSP 毒素不能够完全的衍生化^[11-13]。

本研究建立 9 种代表性 DSP 毒素 OA、DTX1、DTX2、PTX2、YTX、hYTX、GYM、SPX1 和 AZA1 的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测方法, 该方法具有灵敏、高效和准确等特点, 对 DSP 各毒素成分具有很强的定性、定量检测能力, 以期有效弥补现有传统检测方法的弊端。

2 材料与方 法

2.1 试 剂

DSP 毒素标准品(加拿大 NRC·CNRC), 色谱级甲醇、乙腈(美国 Honeywell Burdick & Jackson 公司), 色谱级甲酸和甲酸铵(德国 CNW 公司), 超纯水由 Synergy 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备。

2.2 实验仪器

1200 型高效液相色谱(美国 Agilent 公司), API 4000 型串联质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司), PL403 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), CR22G 型高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司), Maxi Mix II 型旋涡混匀仪(美国 Thermolyne 公司), N-EVAPTM111 型氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

2.3 标准溶液的配制

根据需要, 以 75%甲醇水溶液稀释标准品配制成标准储备液, 采用基质匹配标准溶液方式, 以空白提取液稀释储备液配制成标准工作液。各类标准溶液避光保存于-15℃。

2.4 实验方法

2.4.1 样品前处理

称取均质后的试样 2.00 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 80%甲醇水溶液 5.0 mL, 超声提取 5 min 后, 7000 r/min 离心 10 min, 重复以上操作 1 次, 合并上清液。将上述提取液旋转蒸发, 最终以 20%甲醇水溶液定容至 5.0 mL。

分别以 6.0 mL 甲醇和 6.0 mL 水活化 HLB 固相萃取小柱, 提取液以每秒钟 2~3 滴流速缓慢通过小柱, 再以 6.0 mL 20%甲醇水溶液淋洗小柱后, 最后以 2.0 mL 甲醇(含有 0.1%甲酸)分 2 次将毒素洗脱, 洗脱液上机测定。

2.4.2 HPLC-MS/MS 分析条件

(1) 液相条件

Waters Atlantis dC₁₈ 反相色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 柱温 30℃; 进样量 10 μL; 流动相 A 为水, B 为 95%乙腈水溶液, 两者皆含有 0.05%甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵。流动相洗脱条件如表 1 所示。

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: ESI-/ESI+切换扫描; 检测方式: 多离子反应监测; 离子源参数:

碰撞气(CAD)10 MPa, 气帘气(CUR)10 MPa, 电喷雾电压(IS)4500 V(-4500), 离子源温度(TEM)600 °C; 定性、定量离子对, 去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

| 时间/min | 流速/ $\mu\text{L}/\text{min}$ | A | B |
|--------|------------------------------|----|----|
| 0.0 | 300 | 75 | 25 |
| 2.0 | 300 | 20 | 80 |
| 9.0 | 300 | 20 | 80 |
| 9.1 | 300 | 75 | 25 |
| 15.0 | 300 | 75 | 25 |

表 2 DSP 毒素多反应监测质谱参数
Table 2 MRM parameters for DSP toxins

| 化合物 | 扫描方式 | 母离子/ m/z | 子离子/ m/z | 碰撞能量/ V |
|------|------|------------|------------|-----------|
| OA | | 803.6 | 255.1* | -65 |
| | | | 113.1 | -84 |
| YTX | | 1141.6 | 1061.6* | -36 |
| | | | 855.3 | -70 |
| hYTX | ESI- | 578.0 | 475.0* | -42 |
| | | | 509.7 | -33 |
| DTX1 | | 817.9 | 255.2* | -65 |
| | | | 151.2 | -72 |
| DTX2 | | 803.8 | 255.2* | -65 |
| | | | 563.5 | -60 |
| GYM | | 508.4 | 490.4* | 34 |
| | | | 392.4 | 47 |
| SPX1 | | 692.3 | 674.6* | 44 |
| | | | 444.5 | 52 |
| PTX2 | ESI+ | 876.3 | 823.3* | 36 |
| | | | 805.4 | 42 |
| AZA1 | | 842.5 | 824.5* | 30 |
| | | | 672.4 | 38 |

*为定量离子 Product ions used for quantitation
(在以上表格中的 dtx2 和 gym 中间加一个分割线以区分正负电力模式)

3 结果与讨论

3.1 质谱和色谱条件的优化

采用流动注射泵以流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 速度进样, 对 9 种 DSP 毒素的质谱条件进行优化。首先进行一级质谱扫描获得分子离子峰, GYM、SPX1、AZA1 分子离子为 $[\text{M}+\text{H}]^+$, PTX2 分子离子为 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, OA、YTX、hYTX、DTX1、DTX2 分子离子为 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 再进行二级质谱扫描获得相应的特征子离子峰, 选择信号强度较高、干扰较小的两个子离子。然后通过多反应监测扫描模式对去簇电压、入口电压、碰撞能量和碰撞室出口电压等参数进行优化, 使分子离子与特征子离子强度达到最大, 确定最佳质谱参数。最后以流动注射进样(FIA)考察离子源温度、雾化气、气帘气等参数。

本研究比较乙腈和甲醇 2 种溶剂作为流动相的实验效果, 使用乙腈作为流动相获得峰型更为尖锐。

在流动相中分别加入甲酸铵和乙酸铵 2 种缓冲盐进行比较分析, 结果显示使用甲酸铵可以获得更强的信号, 同时基线也更为平滑。甲酸铵的浓度在 0~2 mmol/L 范围内时, 对于保留时间的影响较为明显, 而更高浓度的缓冲盐对保留时间的影响就很小。最终确定添加 2 mmol/L 浓度的甲酸铵。

流动相的 pH 值对于毒素的分离也具有一定影响。随着 pH 降低, 保留时间差异和分离度随之增强。最终确定甲酸的添加浓度为 0.05%(pH 约为 3.5)。

在上述流动相条件下 9 种代表性 DSP 毒素的总离子流图 and 选择离子流图如图 1、图 2 所示。

3.2 净化条件的优化

本实验选用 4 种固相萃取柱 SILICA、MAX、 C_{18} 和 HLB 进行净化效果比较分析, 结果显示, HLB 固相萃取柱可获得较好的净化富集效果, 但是该萃取柱对 GYM 的提取率小于 80%, 对 YTX 的回收率约为 70%, 对其他 7 种 DSP 毒素的回收率可达到约 90%。综合考虑各方面因素, 最终确定选用 HLB 固相萃取柱。

3.3 方法评价

3.3.1 线性关系和检测下限

根据本实验确定的前处理及检测条件, 以空白基质提取液配置梯度标准溶液, 以峰面积为纵坐标, 待测物的浓度为横坐标进行线性回归, 结果如表 3 所示, 9 种 DSP 代表性化合物的相关系数均大于 0.99, 浓度

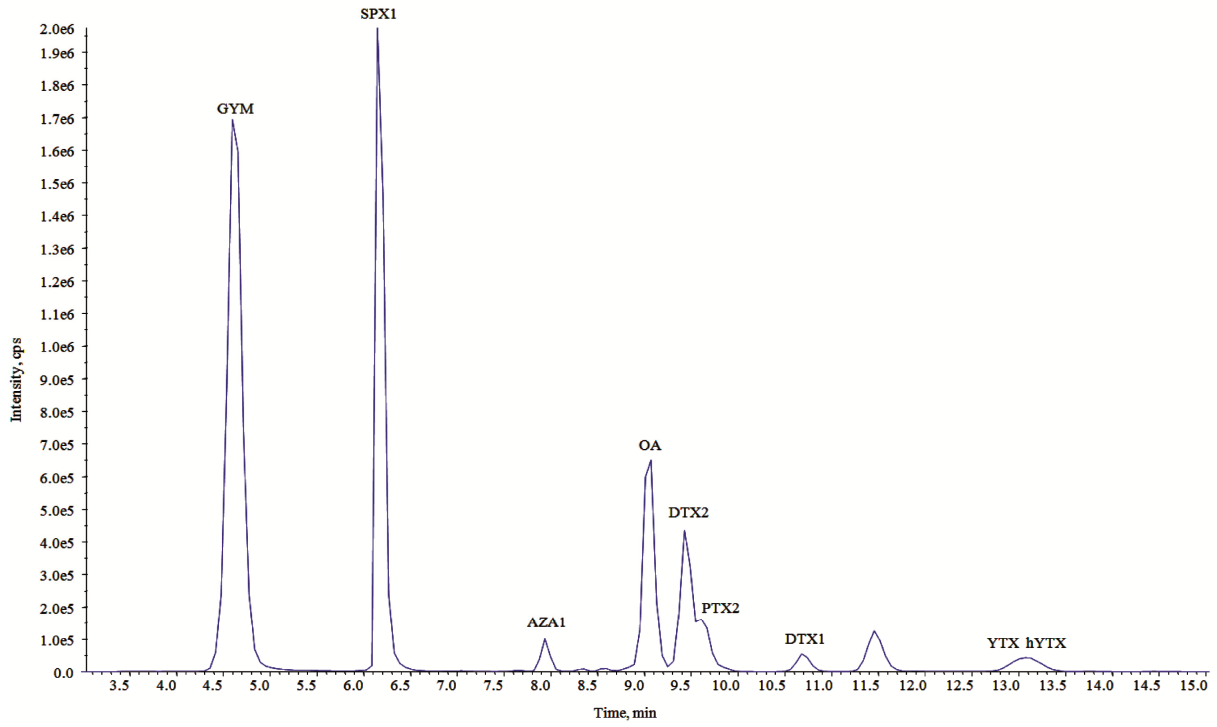
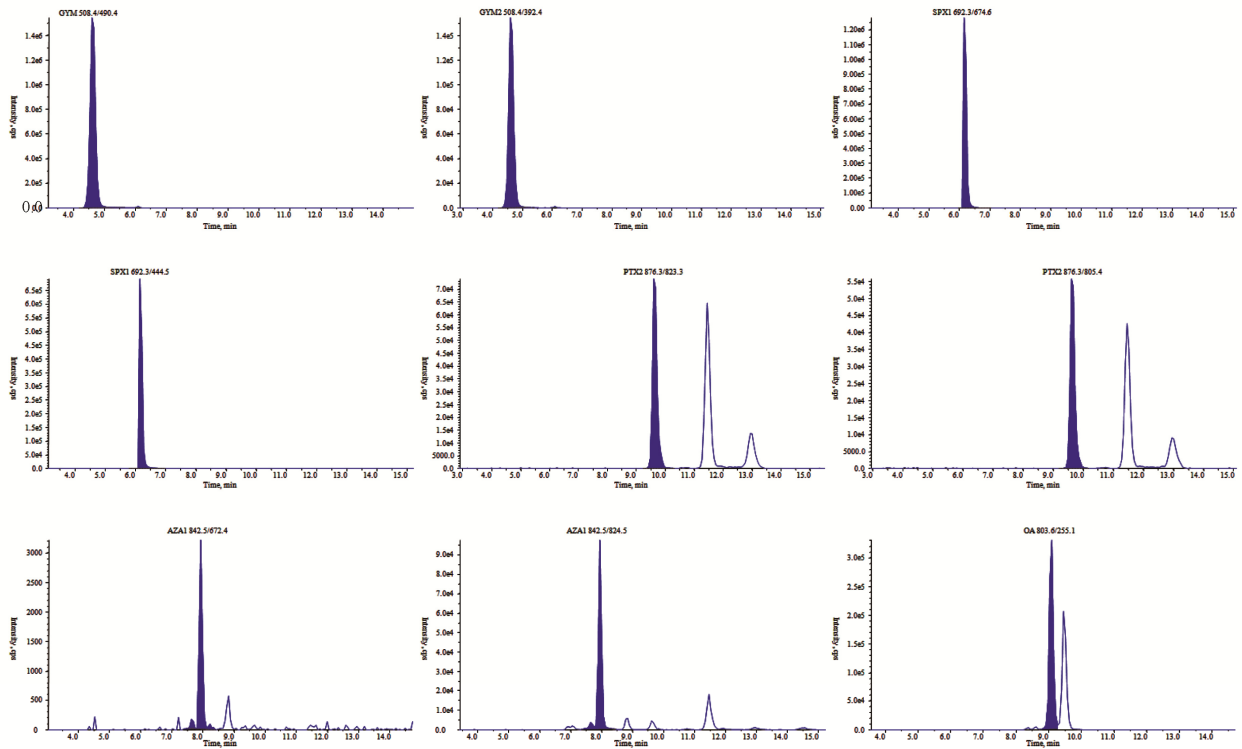


图 1 DSP 毒素 9 种代表性化合物总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatogram of 9 kind of representative DSP toxins



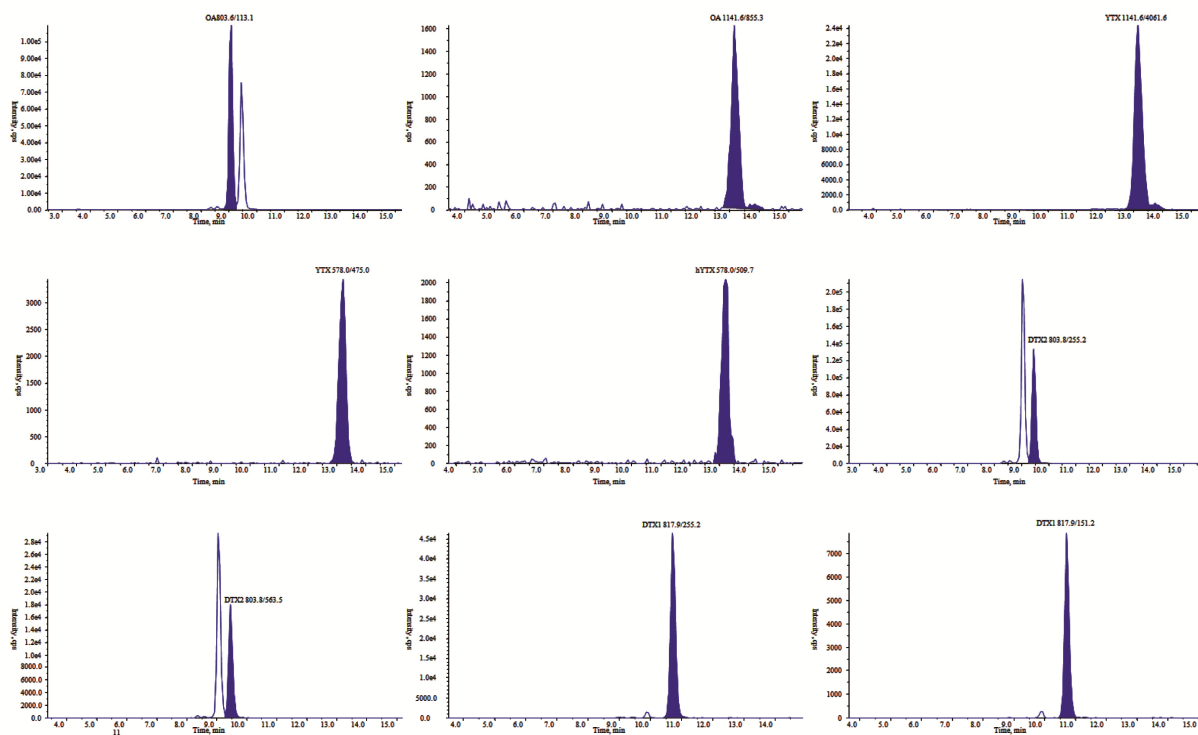


图 2 DSP 毒素 9 种代表性化合物选择离子流图

Fig. 2 Selected ion chromatogram of 9 kind of representative DSP toxins

表 3 DSP 毒素 9 种代表性化合物线性关系和检测低限

Table 3 Linear relationship and LOQ of nine representative DSP toxins

| 化合物 | 线性范围($\mu\text{g/L}$) | 相关系数 | 检测底限($\mu\text{g/kg}$) |
|------|-------------------------|--------|--------------------------|
| OA | 5.0~100.0 | 0.9964 | 5.0 |
| YTX | 10.0~200.0 | 0.9991 | 10.0 |
| hYTX | 50.0~500.0 | 0.9958 | 50.0 |
| DTX1 | 10.0~200.0 | 0.9963 | 10.0 |
| DTX2 | 2.0~50.0 | 0.9985 | 2.0 |
| GYM | 2.0~50.0 | 0.9982 | 2.0 |
| SPX1 | 5.0~100.0 | 0.9948 | 5.0 |
| PTX2 | 5.0~100.0 | 0.9976 | 5.0 |
| AZA1 | 5.0~100.0 | 0.9989 | 5.0 |

范围内线性关系良好。方法的检测低限以定量、定性离子的信噪比 10 确定。

3.3.2 回收率和精密度

在空白蛤蜊样品中添加 3 个浓度水平的 DSP 毒素混合标准溶液, 每个添加水平 6 个平行样品, 计算回收率和精密度, 结果如表 4 所示。

3.3.3 实际样品的检测

将该方法应用于实际样品的检测, 结果显示, 该方法操作简便、灵敏度强、重现性好、准确性高, 完全可以满足日常对于 DSP 毒素的检测要求。图 3 为天然赤贝样品的总离子流图, 样品中含有 DTX2, 其含量为 $14.4 \mu\text{g/kg}$ 。

表 4 方法回收率和精密度($n=6$)
Table 4 Recovery and precision of the method ($n=6$)

| 毒素 | 添加水平($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 平均测定值($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 回收率(%) | 精密度(%) |
|------|---------------------------------|----------------------------------|--------|--------|
| OA | 5.0 | 4.63 | 92.6 | 8.9 |
| | 50.0 | 47.10 | 94.2 | 5.6 |
| | 200.0 | 187.21 | 93.6 | 6.3 |
| YTX | 10.0 | 6.89 | 68.9 | 6.7 |
| | 100.0 | 71.20 | 71.2 | 5.6 |
| | 500.0 | 361.51 | 72.3 | 6.1 |
| hYTX | 50.0 | 44.30 | 88.6 | 8.1 |
| | 200.0 | 179.03 | 89.5 | 6.1 |
| | 500.0 | 436.04 | 87.2 | 4.8 |
| DTX1 | 10.0 | 8.84 | 88.4 | 3.5 |
| | 100.0 | 86.80 | 86.8 | 7.8 |
| | 500.0 | 417.07 | 83.4 | 6.4 |
| DTX2 | 2.0 | 1.81 | 90.3 | 9.5 |
| | 10.0 | 9.13 | 91.3 | 9.4 |
| | 100.0 | 86.44 | 86.4 | 5.2 |
| GYM | 2.0 | 1.61 | 80.3 | 9.3 |
| | 10.0 | 8.14 | 81.4 | 8.6 |
| | 100.0 | 78.92 | 78.9 | 5.6 |
| SPX1 | 5.0 | 4.34 | 86.7 | 6.7 |
| | 50.0 | 42.80 | 85.6 | 5.9 |
| | 200.0 | 169.07 | 84.5 | 7.6 |
| PTX2 | 5.0 | 4.47 | 89.4 | 4.1 |
| | 50.0 | 45.75 | 91.5 | 6.9 |
| | 200.0 | 175.06 | 87.5 | 8.1 |
| AZA1 | 5.0 | 4.57 | 91.3 | 6.3 |
| | 50.0 | 46.20 | 92.4 | 5.2 |
| | 200.0 | 187.12 | 93.6 | 6.3 |

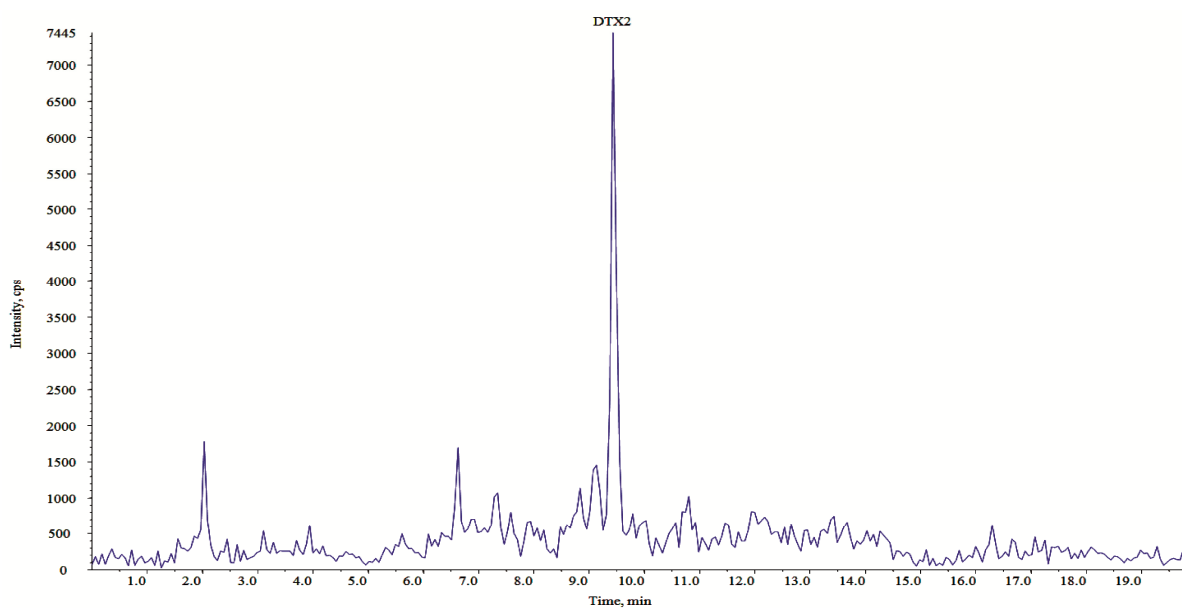


图 3 天然赤贝样品的总离子流图
Fig. 3 Total ion chromatogram of natural oyster sample

参考文献

- [1] Lee JS, Yanagi T, Kanna R. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography [J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 877-881 .
- [2] Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type shellfish poisoning in the Tohoku district [J]. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1978, 44: 1249-1255.
- [3] 李伟才, 奕刚, 李立, 等. 中国沿海部分海区贝毒毒素的调查 [J]. *海洋科学*, 2000, 24(9): 19-22.
Li WC, Yi G, Li L, *et al*. Investigation of shellfish toxins in some sea areas of China [J]. *Marine Sci*, 2000, 24(9): 19-22.
- [4] 刘宁, 潘国伟, 李春盛, 等. 辽东湾赤潮污染海区贝类软海绵酸的染毒情况调查分析 [J]. *中国公共卫生*, 1999, 15(3): 209-210.
Liu N, Pan GW, Li CS, *et al*. Analysis in investigation of okadaic acid in shellfish in red tide pollution sea area of Liaodong bay [J]. *Chin J Pub Health*, 1999, 15(3): 209-210.
- [5] 周名江, 朱明远, 张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展 [J]. *生命科学*, 2001, 13(2): 54-59.
Zhou MJ, Zhu MY, Zhang J. Status of harmful algal blooms and related research activities in China [J]. *Chin Bulletin Life Sci*, 2001, 13(2): 54-59.
- [6] Lee js, Tangen k, Yasumoto t, *et al*. Diarrhetic shellfish toxins in norwegian mussels [J]. *Nippon suisan gakkaiishi*, 1988, 54(11): 1953-1957.
- [7] Draisci R, Lucentini L, Giannetti L, *et al*. First report of pectenotoxin-2(PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe [J]. *Toxicol*, 1996, 34(8): 923-935.
- [8] Yasumoto T, Igarashi T, Satake M. Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. proceedings of the X international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins pp [C]. Wageningen the netherlands Ponsen & Looyen, 2001: 465-474.
- [9] Japanese Ministry of Health and Welfare. Method of testing for diarrhetic shellfish toxin [J]. *Food Sanit Res*, 1981, 7(31): 60-65.
- [10] Lee JS, Yanagi T, Kenma R, *et al*. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography [J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 877.
- [11] Kelly SS, Bishop AG, Carmody EP, *et al*. Isolation of dinophysistoxin-2 and the high performance liquid chromatographic analysis of diarrhetic shellfish toxins using derivatisation with 1-bromoacetylpyrene [J]. *J Chromatog A*, 1996, 749: 33-40.
- [12] Akasaka K, Ohroi H, Meguro H, *et al*. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 729(3): 81-386.
- [13] Lawrence JF, Roussel S, Menard C. Liquid chromatographic determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in shellfish after derivatization with 9-chloromethylanthracene [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 721: 359-364.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



吴振兴, 高级工程师, 主要研究方向为生物毒素检测。

E-mail: zhxwoo@126.com