

液相色谱-串联质谱法检测动物源性水产品中 7 种微囊藻毒素

杨振宇, 周 瑶

(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要:微囊藻毒素是由淡水蓝绿藻产生的一类最常见的环肽肝毒素, 对动物及人类健康具有较大的危害性, 建立准确、快速的检测微囊藻毒素的方法对于水产品食用安全非常重要。本实验对动物源水产品样品的提取、固相萃取、色谱和质谱等条件进行优化, 建立了液相色谱-串联质谱同时检测 7 种微囊藻毒素(LR、RR、YR、LW、LA、LF、LY)的方法, 并采用了固相萃取和基质分散固相萃取两种前处理方法。固相萃取方法的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 添加回收率为 75%~106%, 相对标准偏差小于 20%; 基质分散固相萃取方法的检出限为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 添加回收率为 73%~93%, 相对标准偏差小于 16%。该方法适用于水产品中微囊藻毒素的日常检测和确证。

关键词:微囊藻毒素; 液相色谱-串联质谱; 固相萃取; 基质分散固相萃取; 水产品

中图分类号:O 657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2014)05-0447-07

doi:10.7538/zpxb.youxian.2014.0035

Determination of Seven Microcystins in Aquatic Products by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

YANG Zhen-yu, ZHOU Yao

(Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: Microcystins are common hepatotoxic cyclic toxins released from blue and green algae, which can harm to animal and human health. It is important to establish an accurate and rapid method for the safety of aquatic products. All the parameters of sample preparation and instrumental methods were optimized. Seven microcystins (LR, RR, YR, LW, LA, LF, and LY) in aquatic products were determined simultaneously by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Solid-phase extraction (SPE) and matrix solid-phase extraction (MSPD) were adopted for sample preparation. For SPE method, the LOQ is 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the recoveries are between 75% and 106% with RSD less than 20%. For MSPD method, the LOQ is 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the recoveries are between 73% and 93% with RSD less than 16%. This method is suitable for daily inspection and confirmation of microcystins in aquatic products.

Key words: microcystins; liquid chromatography tandem mass spectrometry; solid-phase extraction; matrix solid-phase extraction; aquatic products

收稿日期: 2013-09-03; 修回日期: 2013-12-06

作者简介: 杨振宇(1971~), 男(汉族), 上海人, 高级工程师, 从事食品安全检测研究。E-mail: yangzy@shciq.gov.cn

网络出版时间: 2014-06-23; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7538/zpxb.youxian.2014.0035.html>

近年来,水体富营养化现象出现在世界许多大水系中。水体出现富营养化现象时,藻类大量繁殖,产生的一些溶于水的代谢物(如藻毒素)不仅可使水体生物死亡,甚至可以通过饮用水和水产品富集危害人类健康。在水华藻类中,毒性最强、污染范围最广的是蓝藻(blue-green algae)。蓝藻广泛分布于江河、湖沼、海洋等水体中,大多数蓝藻在代谢过程中能产生各种毒素,其中,微囊藻毒素(microcystin, MC)是蓝藻释放的一类具有强烈致癌作用的肝毒素和神经毒素。

MC 是一种环肽肝毒素,其结构为环(*D*-丙氨酸-*L*- R_1 -赤- β -甲基-*D*-异天冬氨酸-*L*- R_2 -Adda-*D*-异谷氨酸-*N*-甲基脱氢丙氨酸)。其中,*N*-甲基脱氢丙氨酸(Mdha)是一种特殊的氨基酸,含有 α 、 β 不饱和双键;Adda 结构为 3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸,是 MC 生物毒性表达所必需的; R_1 、 R_2 为 2 种可变 *L*-氨基酸,由于 R_1 、 R_2 位置上的氨基酸不同,环状结构不同位置侧链的不同,以及侧链上甲基化/去甲基化产生的差异,可以形成多种不同结构。目前已从不同微囊藻菌株中分离鉴定了近 80 种 MC 结构。本实验将检测的 7 种 MC 结构中 R_1 与 R_2 的氨基酸种类列于表 1。

表 1 7 种 MC 结构中 R_1 与 R_2 的氨基酸种类

Table 1 Amino acid types of R_1 and R_2 in 7 MC structures

MC 名称	R_1	R_2
RR	精氨酸	精氨酸
LR	亮氨酸	精氨酸
YR	酪氨酸	精氨酸
LA	亮氨酸	丙氨酸
LW	亮氨酸	色氨酸
LY	亮氨酸	酪氨酸
LF	亮氨酸	苯丙氨酸

MC 具有水溶性和耐热性,易溶于甲醇,可溶于水。由于环状结构和间隔双键,其结构具有相当的稳定性^[1-2]。肝脏是 MC 主要的靶器官,所以肝毒性是 MC 的主要毒性,在低浓度时就有专有肝毒性和癌诱发活性。同时,MC 也表现出胚胎发育、免疫、遗传等方面的毒性^[1-3]。MC 不仅能直接导致一些水生生物(如鱼类、贝类及蚌类)患病及死亡,而且一些野生动物及家畜饮用了含有藻毒素的水后,会引起中毒甚至死亡,

同时还可能通过食物链的生物富集危害人类的健康。

MC 的检测方法较多^[4-6],可分为液相色谱-串联质谱方法^[7-8]、生物学方法^[9]和免疫检测法^[10-11]等。液相色谱-串联质谱由于定性准确、定量灵敏,是微量毒素分析最有效的检测技术^[11-18]。本实验拟采用固相萃取和基质分散固相萃取两种前处理方法,用液相色谱-串联质谱法检测水产品中 7 种 MC。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

TSQ Quantum Ultra 液相色谱-串联质谱仪;美国 Thermo-Fisher 公司产品,配有 Accela 液相色谱仪;Allegra X-22R 高速离心机;美国 Beckman Coulter 公司产品;PT2100 均质仪;Poly TRO 公司产品;QGC-12T 氮吹仪;上海青岛公司产品;890/H 超声仪;德国 Elma 公司产品;KMC-1 300 V 涡旋振荡器;Vision 公司产品;固相萃取装置;美国 Supelco 公司产品;Waters Oasis HLB 固相萃取小柱;美国 Waters 公司产品;DSPE PSA/C18 MSPD 基质分散固相萃取管;德国 CNW 公司产品;水相针式滤膜(聚醚砜材质,13 mm \times 0.22 μ m);德国 CNW 公司产品。

1.2 主要材料和试剂

水:满足 GB/T 6682 规定的一级水要求;甲醇:色谱纯;甲酸:色谱纯,含量 \geq 98%;正己烷:分析纯。

MC 标准品(MC-RR、LR、YR、LA、LW、LF、LY 微囊藻毒素固体标准):瑞士 Alexis 公司产品。MC-RR、MC-LR 为 0.1 mg,其它均为 0.025 mg,使用前用甲醇稀释,配成 7 种 MC 混合标准溶液,20%甲醇定容。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil GOLD C18 (50 mm \times 2.1 mm \times 1.9 μ m);柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L;流动相:0.1%甲酸水溶液(A)和甲醇(B);梯度洗脱程序:0~3 min、20%B,3~5 min、20%~95%B,5~5.1 min、95%~20%B,5.1~7 min、20%B。

1.3.2 质谱条件 电喷雾正离子模式,多反应监测,喷雾电压 3.5 kV,喷雾温度 300 $^{\circ}$ C,鞘气气压 30,辅助气压 10,毛细传输管温度 270 $^{\circ}$ C。

母离子、子离子和相关参数列于表 2。

1.4 前处理方法

1.4.1 样品匀浆 准确称取 2 g 淡水产品的食用部分于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 80% 甲醇水溶液,匀质器上以 20 000 r/min 混合 1 min,使样品均质成匀浆,然后超声 15 min,以 4 000 r/min 离心 5 min。

1.4.2 固相萃取法(SPE) 将 1.4.1 离心后的上清液转移至试管中,70 °C 氮吹至约 0.5 mL,加水至约 10 mL,待 SPE 柱净化。HLB 固相萃

取小柱在使用前应分别用 5 mL 甲醇和水以 1~2 mL/min 流速淋洗活化,活化后的小柱应尽快使用。将 10 mL 样液转移到 HLB 小柱上,控制上样流速为 1~2 mL/min;用 5 mL 10% 甲醇以 1~2 mL/min 流速淋洗,抽干;用 5 mL 80% 甲醇溶液以 1 mL/min 流速洗脱;收集洗脱液,并于 70 °C 下氮吹至近干;最后用 20% 甲醇水溶液定容至 1 mL,过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-质谱仪测定。

表 2 7 种 MC 分析物的母离子、子离子和相关参数

Table 2 Parent and daughter ions of MC and relative MS/MS parameters

化合物	相对分子质量	母离子(m/z)	透镜偏置电压	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
MC-LR	995.2	995.6[M+H] ⁺	190	135*	61
				213	62
				375	54
MC-RR	1 038.2	519.8[M+2H] ²⁺	120	103	44
				127	46
				135*	34
MC-YR	1 044.0	1 045.6[M+H] ⁺	210	135*	55
				213	61
				375	50
MC-LW	1 025.2	1 025.6[M+H] ⁺	200	135	44
				213	42
				375*	32
MC-LF	986.2	986.6[M+H] ⁺	190	135	44
				212	48
				375*	36
MC-LY	1 002.2	1 002.4[M+H] ⁺	200	135	48
				213	50
				375*	33
MC-LA	910.0	910.4[M+H] ⁺	185	135	45
				213	45
				375*	30

注: * 为定量离子

1.4.3 基质分散固相萃取法(MSPD) 将 1.4.1 离心后的上清液转移到 DSPE PSA/C18 MSPD 基质分散固相萃取管中,振摇 2 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,取全部上清液至 10 mL 比色管中,用水定容至 5 mL。混匀后,取 1 mL 溶液过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-质谱仪测定。

2 结果和讨论

2.1 质谱条件的优化

配制 10 mg/L 的 MC 标准溶液,分别对每个 MC 标准溶液进行母离子和子离子的参数

优化。

由于 ESI 离子源是一种软电离方式,大部分目标化合物会形成 1 价离子,也可能形成 2 价离子、多价离子或者其他加合离子。由表 2 可以看出,大部分 MC 主要形成加氢的 1 价正离子,但 MC-RR 的离子形成与其他离子不同,它产生 2 价离子的产率要比形成其他离子的高,所以选用 m/z 519.8[M+2H]²⁺ 作为 MC-RR 母离子。

子离子以 m/z 135、213、375 为主,这 3 种子离子都是 MC 的特征子离子,具体分子式和结构见表 3 和图 1。 m/z 135 是 MC 的共有基团

3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸(Adda)的甲氧键断裂形成的特征碎片,它在 MC-LR、MC-RR、MC-YR 子离子质谱图上的丰度最大,其他 MC 的子离子也含有此离子。另外, m/z 213、375 也是大部分 MC 共有结构的特征碎片,所以本实验所检测的 7 种 MC 的子离子也都有这 2 种质量数的碎片。MC-RR、LR、YR 将 m/z 135 作为定量离子,其他 4 种 MC 用 m/z 375 作为定量离子。

为了得到较高的离子化效率,在使用 ESI 离子源时,需加入一些离子化增强试剂。本实验

采用甲酸作为离子化试剂,并对流动相中的甲酸含量进行优化实验,不同甲酸浓度对灵敏度的影响示于图 2。

表 3 子离子的分子式

Table 3 Molecular formula of possible daughter ions

子离子(m/z)	分子式
135	$C_9H_{11}O + H$
213	$C_8H_{14}O_4N_2 + H$
375	$C_{11}H_{15}O + Glu + Mdha + H$

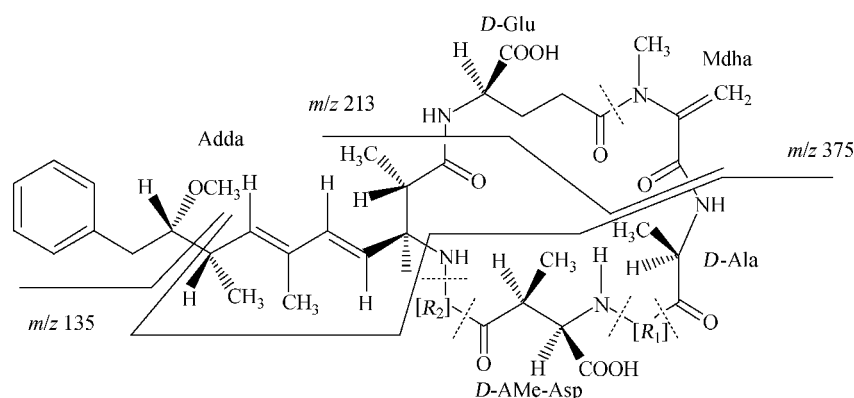


图 1 3 种子离子可能的碎裂方式

Fig. 1 The possible fragmentation of daughter ions

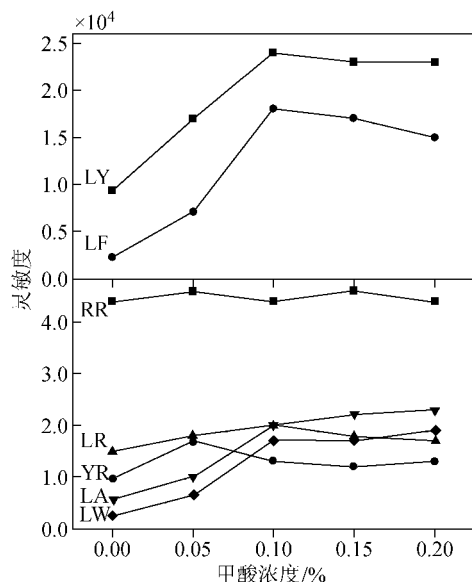


图 2 不同甲酸浓度对灵敏度的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of formic acid on sensitivity

从图 2 可以看到,加入甲酸后,MC-LA、LY、LF、LW 的灵敏度大大增加,但在 0.1% 和

0.2% 甲酸含量水平,灵敏度变化不大。所以采用在流动相中添加 0.1% 甲酸,优化后的总离子流图和定量离子色谱图示于图 3。

2.2 前处理方法的选择

根据文献^[2]和 MC 本身的特性,SPE 柱一般用 C18 小柱或者 HLB 小柱净化和富集样品。本实验对 HLB 小柱的淋洗条件做了回收实验,步骤如下:在活化的 HLB 小柱上,上样 10 mL 含 7 种 MC 的水样,其中每种 MC 各 20 ng,然后分别用 5 mL 100% 水、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 甲醇水溶液、100% 甲醇进行洗脱,分别收集洗脱液,上机测量 MC 含量,并计算洗脱液中 7 种 MC 含量。结果发现:RR 在 50%~80% 甲醇水淋洗段被淋洗下来;YR、LR、LA、LF、LW、LY 在 20%~80% 甲醇水淋洗段被淋洗下来。所以本实验使用 10% 甲醇水溶液淋洗,80% 甲醇水溶液洗脱。

目前,基质分散固相萃取方法(matrix solid phase dispersion, MSPD)已被用于多种残留分析的前处理^[19-20],在 MC 检测中,MSPD 也有一

些应用^[21-22]。

本实验采用 CNW 公司的 DSPE PSA/C18 MSPD 基质分散固相萃取管。这是一根容积为 15 mL 的离心管,里面灌装了 150 mg PSA、150 mg C18、900 mg 无水硫酸镁等固体粉末。当样品的甲醇水提取液倒入 MSPD 管,C18 会吸附其中的非极性物质,PSA(乙二胺-*N*-丙基)会吸附脂肪酸、有机酸、极性色素、糖类等物质,硫酸镁则会吸附水,同时吸附水溶性杂质,而 MC 则会留在甲醇溶液中,从而达到净化的目的。需要指出的是,该净化效果不如过柱法好,检出限差,回收率相对较低,但该过程的检测时间短、操作方便、检出限符合要求,是快速简便的方法。

2.3 方法指标

根据不同前处理方法导致的不同检出限,设置了不同的添加水平,对水产品中 MC 进行回收率和精密度实验。SPE 法的添加水平为 0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$; MSPD 法的添加水平为 2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对应上机溶液中的 MC 含量水平为 1、2、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。选取了均为阴性样品的笋壳鱼肉和蛎螺肉作为添加样品基质,平行测量 6 次,结果列于表 4。

由表 4 可以看到出:SPE 法的回收率为 75%~106%,相对标准偏差小于 20%; MSPD 法的回收率为 73%~93%,相对标准偏差小于 19%。

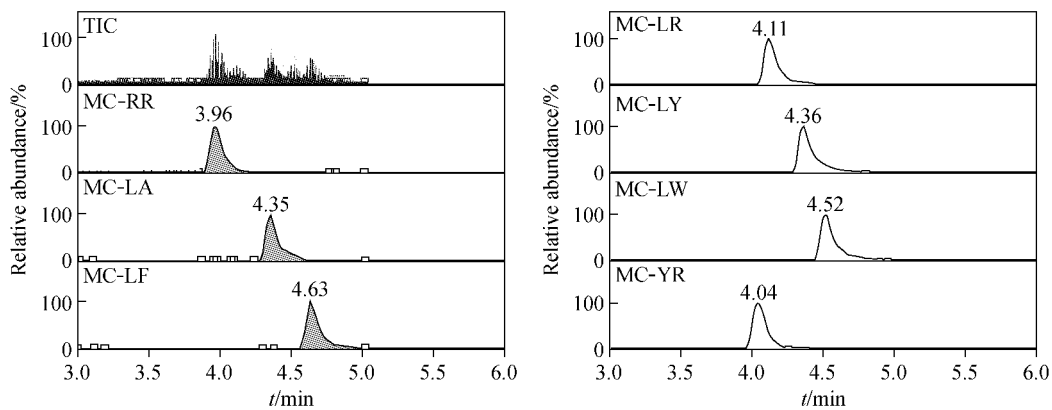


图 3 7 种 MC 的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of 7 MCs

表 4 7 种 MC 的添加回收率和相对标准偏差

Table 4 Recoveries and RSDs of 7 microcystins

MC 名称	SPE 法		MSPD 法	
	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
RR	77~98	<20	73~85	<15
YR	75~93	<16	73~89	<13
LR	81~96	<10	82~93	<16
LA	78~102	<13	75~90	<19
LF	83~106	<12	77~91	<12
LW	86~96	<13	80~89	<8
LY	82~93	<10	78~93	<11

3 结论

建立了液相色谱-串联质谱测定动物源性水产品中 7 种 MC 的方法, 7 种 MC 在 0.5~20 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好。根据动物源性水产品样品的情况, 建立了 SPE 和 MSPE 两种前处理方法。SPE 法操作较繁琐, 测量过程较长, 但检测限较低, 为 0.5 $\mu\text{g/kg}$, 添加回收率为 75%~106%, 相对标准偏差小于 20%; 而 MSPD 法操作简单, 但检测限则不如 SPE 法, 为 2.5 $\mu\text{g/kg}$, 添加回收率为 73%~93%, 相对标准偏差小于 19%。因此, 可以根据实际要求, 选取不同的前处理方法进行检测。

参考文献:

- [1] 李效宇. 微囊藻毒素及其毒理学研究[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [2] 谢平. 水生动物体内的微囊藻毒素及其对人类健康的潜在威胁[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [3] 张敬平, 肖付刚, 赵晓联. 微囊藻毒素分析检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [4] MORENO I M, MOLINA R, JOS A, et al. Determination of microcystins in fish by solvent extraction and liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1080(2): 199-203.
- [5] 虞锐鹏, 陶冠军, 贡小清, 等. 高效液相色谱-质谱联用方法测定背角无齿蚌体内微囊藻毒素[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(5): 671-674.
YU Ruipeng, TAO Guanjun, GONG Xiaoqing, et al. Determination of microcystins in *Anodonta woodiana* by high performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2007, 26(5): 671-674 (in Chinese).
- [6] MEKEBRI A, BLONDINA G J, CRANE D B. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(15): 3147-3155.
- [7] 刘晓慧. 多聚酶链反应(PCR)技术监测水中微囊藻毒素的方法及进展[J]. *河南预防医学杂志*, 2004, 15(6): 365-367.
LIU Xiaohui. Method and progress of determine the microcystins in water by PCR technical[J]. *Henan J Prev Med*, 2004, 15(6): 365-367 (in Chinese).
- [8] 闫建秀, 虞锐鹏, 汤坚, 等. 固相萃取-反相高效液相色谱法检测太湖螺中微囊藻毒素[J]. *食品与机械*, 2008, 24(5): 92-95.
YAN Jianxiu, YU Ruipeng, TANG Jian, et al. Determination of microcystins in the snail genus *eriocheir* from Taihu using RP-HPLC with an efficient solid phase extraction[J]. *Food & Machinery*, 2008, 24(5): 92-95 (in Chinese).
- [9] 王蕾, 李小艳, 薛文通, 等. 微囊藻毒素检测方法研究进展[J]. *食品科学*, 2005, 26(增刊): 135-138.
WANG Lei, LI Xiaoyan, XUE Wentong, et al. Review on research progress of microcystins detection[J]. *Food Science*, 2005, 26(Suppl): 135-138 (in Chinese).
- [10] 赵晓联, 孙秀兰, 汤坚. 藻毒素的危害及分析方法进展[J]. *食品科学*, 2005, 26(3): 257-261.
ZHAO Xiaolian, SUN Xiulan, TANG Jian. Development of assay methods and hazards of microcystins[J]. *Food Science*, 2005, 26(3): 257-261 (in Chinese).
- [11] BRUNO M, FIORI M, MATTEI D, et al. ELISA and LC-MS/MS methods for determining cyanobacterial toxins in blue-green algae food supplements[J]. *Natural Product Research*, 2006, 9(20): 827-834.
- [12] DAI M, XIE P, CHEN J, et al. Quantitative determination of microcystins in rat plasma by LC-ESI tandem MS[J]. *Chromatographia*, 2008, 68(9/10): 811-815.
- [13] 虞锐鹏, 陶冠军, 杨健, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速测定水产品中微囊藻毒素和节球藻毒素[J]. *分析实验室*, 2012, 31(1): 80-83.
YU Ruipeng, TAO Guanjun, YANG Jian, et al. Determination of microcystins and nodularins in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2012, 31(1): 80-83 (in Chinese).
- [14] 明俊超, 姜海洲, 袁新华. 微囊藻毒素对鱼类的毒性效应及其作用机理研究进展[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(35): 69-74.
Ming Junchao, Jiang Haizhou, Yuan Xinhua. A review of microcystin of toxic effects and mechanisms in exposed fish[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(35): 69-74 (in Chinese).
- [15] WELLER M G. Immunoassays and biosensors for the detection of cyanobacterial toxins in water

- [J]. *Sensors*, 2013, (13): 15 085-15 112.
- [16] XU W, CHEN Q, ZHANG T, et al. Development and application of ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 626(1):28-36.
- [17] DAI M, XIE P, LIANG G D, et al. Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 862 (1/2): 43-50.
- [18] 钮伟民,肖付刚,戴维杰,等. 液相色谱-串联质谱法同时检测水中 5 种微囊藻毒素[J]. *安徽农业科学*, 2008,36(29):12 554-12 556.
NIU Weimin, XIAO Fugang, DAI Weijie, et al. Simultaneous determination of five microcystins in water by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2008,36(29):12 554-12 556(in Chinese).
- [19] 李尧,张雪梅,党献民,等. 基质分散固相萃取净化液相色谱检测谷物中赭曲霉毒素 A[J]. *粮食与饲料*, 2012,(10):57-60.
LI Yao, ZHANG Xuemei, DANG Xianmin, et al. Determination of ochratoxin A in cereal by high performance liquid chromatography with matrix solid-phase dispersion cleaning [J]. *Cereal & Feed industry*, 2012, (10): 57-60 (in Chinese).
- [20] 乔凤霞,孙汉文,刘广宇,等. 基质固相分散-牛奶、蜂蜜中喹诺酮的多残留分析[J]. *河北大学学报:自然科学版*,2008, 28(6):620-624.
QIAO Fengxia, SUN Hanwen, LIU Guangyu, et al. Matrix solid-phase dispersion for multi-residues analysis of quinolones in milk and honey [J]. *Journal of Hebei University(Natural Science Edition)*, 2008, 28(6):620-624(in Chinese).
- [21] CAMEN A, MORENO I M, RUIZ M J, et al. Determination of microcystins in natural blooms and cyanobacterial strain cultures by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 380 (3):537-544.
- [22] RUIZ M J, CAMEÁN A M, MORENO I M, et al. Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1 073 (1/2): 257-262.