

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

虞锐鹏¹, 陶冠军¹, 贡小清¹, 秦 方¹, 杨 健², 边学森³

(1. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘 要: 研究液相色谱 - 电喷雾质谱联用 (LC - ESIMS) 测定蚌类水产品中微囊藻毒素的分析方法。背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 样品经正丁醇、甲醇及水混合溶剂提取, 反相硅胶固相萃取柱净化后, 采用正离子检测模式的 LC - ESIMS 方法进行分析测定。以乙腈 - 水 - 甲酸 (体积比 38 : 62 : 0.1) 为流动相, 经 Symmetry C18 色谱柱 (2.1 × 150 mm, 3.0 μm) 分离。采用选择离子监测 m/z 520.3 (MC - RR)、1 046.1 (MC - YR)、996.9 (MC - LR) 及 1 156.4 (胰岛素, 内标) 分子离子峰进行定量分析。线性定量范围 0.02 ~ 20 μg/g, 蚌干粉检出限为 0.01 μg/g。此方法准确、灵敏度高、专属性好, 可作为食品安全风险评价和监测环境污染的分析方法。

关键词: 微囊藻毒素; 高效液相色谱 - 质谱; 背角无齿蚌; 固相萃取

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)05 - 0671 - 04

Determination of Microcystins in *Anodonta Woodiana* by High Performance Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Mass Spectrometry

YU Rui-peng¹, TAO Guan-jun¹, GONG Xiao-qing¹, QIN Fang¹, YANG Jian², BIAN Xue-sen³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: Microcystins were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) combined with electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS). Soft tissue samples of *Anodonta woodiana* from several areas of Taihu Lake were extracted with mixed solvents (1-butanol, methanol, and water), and purified by solid-phase extraction on the ENV F18 cartridge column. Chromatographic separation was performed on a Symmetry C₁₈ column (2.1 × 150 mm i.d., 3.0 μm) with acetonitrile - water - formic acid (38 : 62 : 0.1, by volume) as eluent. The protonated molecule was selected in the selected ion monitoring m/z 520.3, m/z 1 046.1, m/z 996.9 and 1 156.4 (insulin, internal) for specific measurement of MC variant - RR, - YR, - LR in the concentration range of 0.02 to 20 μg · g⁻¹. The lowest limit of detection was found to be around 0.01 μg · g⁻¹. The method is highly selective and sensitive for measurements of MCs and is adequate for analysis of MCs in aquatic products.

Key words: Microcystins; HPLC - MS; *Anodonta woodiana*; Solid-phase extraction

富营养化湖泊中的微囊藻毒素 (microcystins, MC) 对环境和人类健康的危害已成为全球关注的重大环境问题之一。微囊藻毒素 (结构式见图 1) 能强烈地抑制蛋白磷酸酶 (PP1、PP2A) 的活性, 是一种强烈的促癌剂^[1]。世界卫生组织 (WHO) 提出了饮用水中 MC 最常见异构体 MC - LR 的指导值^[2]。微囊藻毒素进入人体的途径主要是通过饮用水和被污染的水产品 (鱼虾、软体动物及藻类制品等)^[3-4]。MC 在动植物体内含量低, 检测干扰大。常用检测手段主要有小鼠腹腔注射生物分析法、酶联免疫法、蛋白磷酸酶抑制等生化分析方法, 但存在操作较复杂, 且不能用于 MC 不同种类的分析鉴定等缺点。近年

收稿日期: 2006 - 07 - 04; 修回日期: 2006 - 12 - 22

基金项目: 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室基金项目 (开 - 2 - 04 - 13); 江苏省科技厅大型科学仪器设备共享

服务平台项目 (06 - 57); 江南大学校基金资助项目 (2004LQN014)

作者简介: 虞锐鹏 (1972 -), 男, 浙江镇海人, 高级工程师, 硕士, Tel: 0510 - 85919690, E-mail: rp_yu@yahoo.com.cn

来，高效液相色谱法 (HPLC)、高效液相色谱 - 质谱联用方法 (LC - MS)已愈来愈多被用于 MC的检测 [5 - 6]。

利用生物指示物来监测环境污染是简便易行且成效显著的研究方式，贝类具有广泛的地理分布，是最为常见的指示水体污染物的生物指示物 [7]。本研究选用太湖中分布广泛、仍被食用的背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*)作为测定动物，建立了 LC - ESIMS技术测定蚌类样品中 MC的分析方法，并通过二级质谱特征裂解得以确认 MC确实存在。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters ZMD4000 高效液相色谱 - 质谱联用仪 (美国 Waters公司)；Acquity超高效液相色谱 /Quattro PremierMS/MS (美国 Waters公司) 联用仪用于验证实验；ENV F18固相萃取柱 (500 mg, 美国 Supelco公司)；Freeione 18L 冷冻干燥仪 (美国 Labconco公司生产)；RE52CS旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)；甲醇、乙腈 (色谱纯，美国天地公司)；水为超纯水，甲酸、乙酸、正丁醇为分析纯；15 mg/L 的猪胰岛素 (美国 Fluka公司) 甲醇内标溶液；MC - RR、MC - LR (美国 Calbiochem 公司) 及 MC - YR (日本东京理工大学 Yoshio Ueno 教授赠) 使用前再以甲醇稀释配制成标准系列。

1.2 色谱与质谱条件

Symmetry C18柱 (2.1 ×150 mm)，3.0 μm，柱温 30.0 °C；流动相：乙腈 - 水 - 甲酸 (体积比 38 : 62 : 0.1)，流速：0.3 mL /min；进样体积：5 μL。

采用正离子电离方式，喷雾电压 3.7 kV，脱溶剂温度：300 °C，源温：120 °C，离子能量：1.0 V，扫描范围：m / z 300~1 200。

1.3 样品处理

将新鲜蚌样软组织均质，冷冻干燥后，按 0.2 g蚌干粉加正丁醇 - 甲醇 - 水 (体积比 1 : 4 : 15，下同) 抽提液 10 mL 比例，并加入 0.20 mL 的内标溶液 (据 MC 含量，酌情增减)，在冰水浴下搅拌抽提 30 min，10 000 r/min 离心 10 min，移取上层清液，沉淀再抽提两次 (条件同前)，合并上清液并减压浓缩至 5 mL。分别用甲醇、水活化处理固相萃取柱后，浓缩液上样富集毒素。待样品全部吸附，分别以纯水、30% 的甲醇水溶液冲洗固相萃取柱后，用 5 mL 80% 甲醇水溶液洗脱柱上毒素，洗脱液浓缩，于 - 18 °C 冷冻保存，进行液相色谱分析前用甲醇定容，定容体积 1.00 mL。

2 结果与讨论

2.1 样品的提取与纯化

分别采用含 5% 乙酸的水溶液，80% 甲醇水溶液和正丁醇 - 甲醇 - 水 (体积比 1 : 4 : 15) 混合溶液 3 种不同的溶剂体系提取蚌中的 MC。对蚌样进行超声波提取 MC 实验，比较发现：正丁醇 - 甲醇 - 水混合溶剂体系有着最大提取量。每克蚌样添加 MC - RR、- YR、- LR 量均为 10 μg，样品处理见“1.3”。结果见表 1。

实验通过改变甲醇水溶液的浓度，确定用 30% 甲醇水溶液洗涤反相固相萃取柱上干扰物质后，用

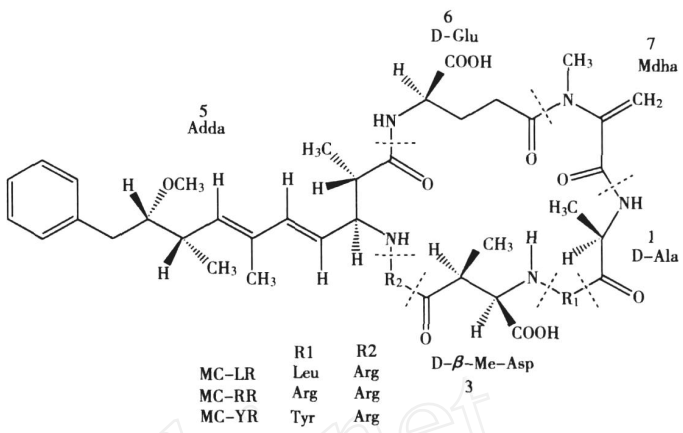


图 1 3种微囊藻毒素的分子结构
Fig.1 Molecular structures of three microcystins

表 1 不同溶剂对 MC 的提取效果比较

Compound	Extracting recovery R / %		
	Acetic acid - water	Methanol - water	n-Butyl alcohol - methanol - water
MC - RR	54	70	81
MC - YR	58	72	74
MC - LR	66	79	85

80%甲醇水溶液一次性洗脱下微囊藻毒素，得到最高回收率。

2.2 液相色谱及质谱条件选择

实验比较了几种类型的反相色谱柱，其中 Symmetry C8 5 μm (2.1 $\times$ 150 mm)和 DELTA PAK C18 5 μm (3.9 $\times$ 150 mm)难以将 MC - YR、- LR 分开，且峰形差；而 Inertsil ODS-3 5 μm (4.6 $\times$ 250 mm)，300SB Zorbax C18 5 μm (4.6 $\times$ 250 mm)可以得到较好的分离度，采用 Symmetry C18 5 μm (4.6 $\times$ 250 mm)柱则效果最好，且能很好地用于实际样品测定。

质谱测定依据 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 或 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 准分子离子的信号强度稳定性进行手动方式优化质谱参数。结果表明，喷雾电压 3.7 kV 能产生最丰富且稳定的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰信号。MC - LR 与 MC - YR 分别给出基峰为 m/z 996.9、1 046.1 的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰，而 MC - RR 给出了基峰为 m/z 520.3 的 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 峰，内标猪胰岛素给出 m/z 1 156.4 的 $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$ 峰。通过调节锥体电压可以获取最佳的灵敏度，理论上高相对分子质量化合物宜选用比较高的电压。实验研究发现检测 MC - RR (其中大部分以双电荷存在， m/z 520.3)应选择较小的锥孔电压 (30 V)，能有较佳的响应；MC - LR (m/z 996.9)随锥孔电压的增高响应增大，选择较大的锥孔电压 (60 V)有好的结果。另一方面，锥孔电压增高会引起分子破裂，产生源内碰撞诱导解离 (CID)，反而使分子离子峰变小，响应值降低。实验中锥孔电压分别设置为 30、60、60 V，选择离子扫描选定 m/z 520.3、996.9、1 046.1，可以大大提高灵敏度，同时可以避免由于色谱柱的分离效能所引起对被测组分的干扰。

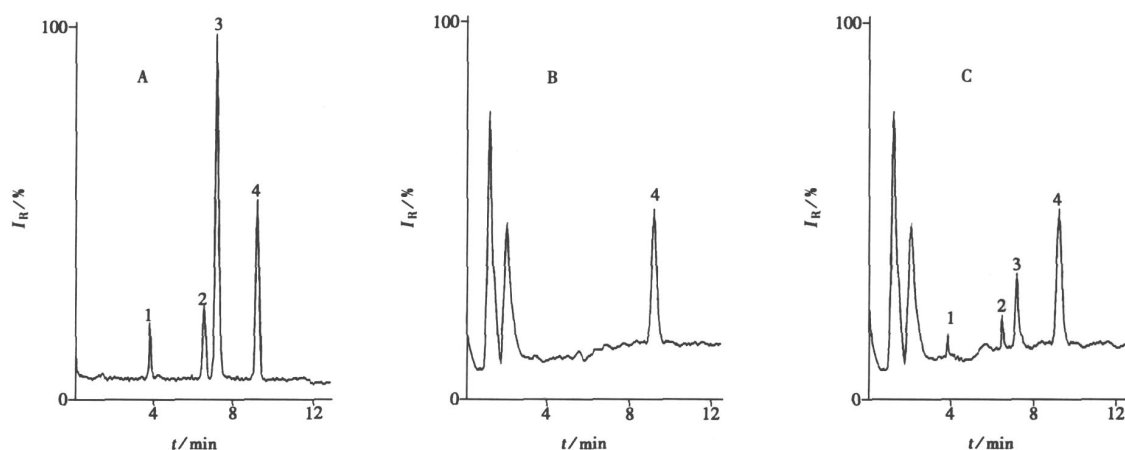


图 2 MC - RR、- YR、- LR 选择离子总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatograms of MC - RR, - YR, and - LR

1. MC - RR; 2. MC - YR; 3. MC - LR; 4. insulin (150 $\mu\text{g/L}$); A. standard; B. blank mussel sample; C. mussel sample (spiked with 25 $\mu\text{g/L}$ different standards)

2.3 线性关系与检出限

将不同浓度的 MC - RR、- YR、- LR 系列标准溶液，按“1.2 节”色谱、质谱条件测定，回归方程及相关系数：MC - RR ($Y = 3.562 X + 0.009$, $r = 0.998 8$)，MC - YR ($Y = 4.281 X - 0.010$, $r = 0.999 0$)，MC - LR ($Y = 25.299 X + 0.094$, $r = 0.999 4$)；其中 Y 表示 MC 与胰岛素峰面积之比， X 表示样品质量浓度 (单位： mg/L)。在信噪比 (S/N) 为 3 的条件下，MC - LR 绝对量检出限达到 25 pg ，MC - RR、- YR 达到 50 pg 。

2.4 精密度与回收率

取同一蚌样为本底，分别加入高、低两种质量浓度的微囊藻毒素混合标准溶液，按上述方法进行样品处理，分析测定其精密度及回收率。结果显示：相对标准偏差不大于 7.5%；添加高浓度标样 (10 $\mu\text{g/g}$) MC - RR、- YR、- LR 的回收率分别为 87%、79%、90%；添加低浓度标样 (0.2 $\mu\text{g/g}$) MC - RR、- YR、- LR 的回收率分别为 83%、75%、91%。对实际样品分析，其方法检出限可达 0.01 $\mu\text{g/g}$ ，线性定量范围为 0.02~20 $\mu\text{g/g}$ 。

2.5 实际样品的测定

2004 年 8 月及 2005 年 9、10 月在太湖水域大埔、华庄、雪堰、湖州和犍山水厂五地收集背角无齿蚌

样本。应用上述方法,对蚌样中 3 种微囊藻毒素进行检测。共检测蚌样 25 份,其中在华庄和犍山水厂收集的 6 份蚌样存在 MC - RR, - LR 两种藻毒素异构体。样品干燥后测定其中最高含量 MC - RR 达到 11.2 $\mu\text{g/g}$, MC - LR 为 0.47 $\mu\text{g/g}$ 。根据 WHO 推荐的 MC 每日耐受摄入量 (TDI) 为 0.04 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,若某人体重 60 kg,每天摄入鱼肉等水产品 300 g,其中 MC 含量 8 ng/g,个体 MC 摄入量即达 TDI^[8]。考虑到鲜肉平均含水约 70%,仅考查 MC - LR 的含量,食用本实验中高毒鲜蚌肉个体 17.0 g,便会达到 TDI。

2.6 MS/MS 谱确证蚌样中微囊藻毒素的存在

为了进一步证实 MC - LR 和 MC - RR 确实存在于蚌样体内,同时参照欧盟 EEC/657/2002 指令中所规定的对于禁用物的质谱确证方法必须达到 4 个确证点(一个质谱离子为一个确证点),进行了二级质谱 (MS/MS) 的测定及分析。利用多级反应监测 (MRM),对蚌样中可能存在的这两个微囊藻毒素化合物,分别选择 m/z 996.9、520.3 分子离子作为母离子进行碰撞诱导裂解谱分析,其结果见图 3。两种微囊藻毒素均存在明显的子离子 m/z 134.9,可判断为 Adda 特征结构。Adda 为一特殊的 β 氨基酸 (3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-癸二烯酸),是所有已知蓝绿藻肝毒素的共有结构^[9]。

MS/MS 谱分析结果表明, m/z 520.3 得到不同强度的子离子 m/z 440.4, 329.5, 推断为 [Mdh - Ala - Arg - MeAsp - H]⁺, [HCO - Glu - Mdh - Ala - NH₂ + H]⁺; 而 m/z 996.9 (LR) 分别得到子离子 m/z 553.5, 396.9, 269.1, 214.3, 推断为 [H - Mdh - Ala - Leu - MeAsp - Arg]⁺, [Mdh - Ala - Leu - MeAsp + H]⁺, [Mdh - Ala - Leu + H]⁺ 和 [Glu - Mdh + H]⁺。研究结果显示 MC - RR、MC - LR 标准品和检测的蚌样在相同实验条件下,都具有 4 种不同的特征离子,说明蚌样中确实存在 MC - RR 及 MC - LR。

我国湖泊中有毒蓝藻水华的发生频率、毒素含量均很高,水产品被微囊藻毒素污染的可能性很大,加之我国淡水水产品在水产品总量中的比例高达 40%~50%。微囊藻毒素对水产品食用安全性的影响关系到我国人民的健康,应该受到社会公众和学术界的关注和重视。因此,本研究结果对于食品安全风险评价和监测环境污染具有实际应用价值。

参考文献:

- [1] NISHIWAKI R, OHTA T, SUEOKA E, et al. Two significant aspects of microcystin - LR: specific binding and liver specificity[J]. Cancer Lett, 1994, 83: 283 - 289.
- [2] WHO. Report of the working group on chemical substances in drinking water[P]. Geneva: World Health Organization, Section 5.2, Microcystin - LR, 1997.
- [3] ISABEL M M, RAFAEL M, ANGELES J, et al. Determination of microcystins in fish by solvent extraction and liquid chromatography[J]. J Chromatogr, A, 2005, 1080(2): 199 - 203.
- [4] 虞锐鹏,陶冠军,贡小清. 固相萃取 - 液质联用测定螺旋藻保健品中的微囊藻毒素[J]. 化学通报, 2005, 68(11): w134.
- [5] LAWRENCE J F, MENARD C. Determination of microcystins in blue - green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography[J]. J Chromatogr, A, 2001, 922(1): 111 - 117.
- [6] BARCO M, FLORES C, JOSEP R, et al. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of Planktothrix(Oscillatoria) rubescens in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI - MS[J]. Toxicon, 2004, 44(8): 881 - 886.
- [7] LINTHURST R, BOURDEAU P, TARDIFF R G. Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems[M]. UK: John Wiley and Sons, 1995.
- [8] MAGALHAES V F, SOARES R M, AZEVEDO S M. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon: ecological implication and human health risk[J]. Toxicon, 2001, 39: 1077 - 1085.
- [9] CARMICHAEL W W. The toxins of cyanobacteria[J]. Sci Am, 1994, 270: 78 - 86.

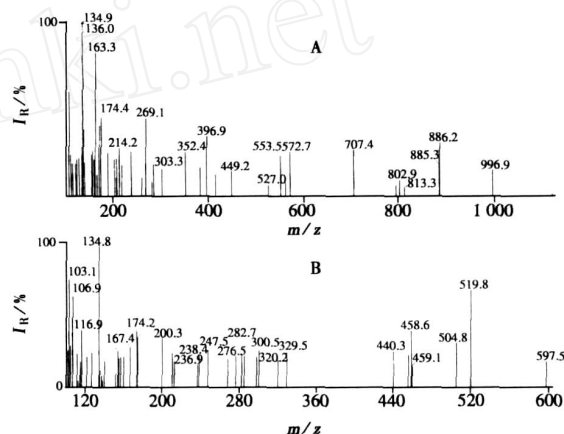


图 3 蚌样中 MC - LR 的 m/z 996.9(A) 和 MC - RR 的 m/z 520.3(B) 的 MS/MS 谱
Fig. 3 MS/MS spectra of MC - LR (A) and MC - RR (B) at m/z 996.9 and m/z 520.3, respectively, in mussel samples