

LCMSMS检测海洋中贝类毒素

赵贵平 蒋宏健 李 丹
(美国应用生物系统公司 - 北京公司, 北京, 100027)

海洋贝类毒素是由海洋生物贝类食用一些浮游藻类时, 这些藻类经刺激而释放出的一类毒素. 这些毒素会在贝类中蓄积, 有时被代谢; 海上漂浮的藻类会因环境的影响而高速繁殖, 浓度达到一定值时, 水面因之变色, 形成赤潮, 赤潮所含藻类几乎都有毒性. 海洋贝类毒素是目前已知的最毒的有机化合物, 人食用了含有毒素的贝类后可能引起中毒死亡. 海藻毒素按作用可分为: 麻痹性海藻毒素 (PSP)、腹泻性海藻毒素 (DSP)、神经毒性海藻毒素 (NSP)、失忆性海藻毒素 (ASP)^[1, 2, 3].

本文建立了 10 种麻痹性贝类毒素的 LCMSMS 检测分析方法, 这类贝毒素是海洋有毒甲藻产生的水溶性四氢嘌呤衍生物. 包括 STX, NeoSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 为氨基甲酸酯类毒素, dcSTX, ddNeoSTX, dcGTX2, dcGTX3 为脱氨甲酰基类毒素, 这是水溶性化合物, 在反相色谱上很难保留, 所以在用 LCMSMS 定量分析这类毒素时, 要在流动相中加入恰当的缓冲剂.

1 实验方法

1.1 样品前处理方法

稀醋酸水溶液 ($\text{pH} < 2$) 对贝类样品进行提取, 经高速离心 10min, 取上清液, 上相萃取柱小柱 HLB 进行提取, 洗脱液定容到 1ml, 再过 0.45 μm 过滤膜过滤, 待 LCMSMS 分析.

1.2 仪器方法

液相条件: 仪器: 岛津 20-AD 二元高压液相系统; 色谱柱: Waters Symmetry 2.1mm $\times$ 150mm 5 μm C8; 进样量: 20 μl ; 流动相: A: 水, B: 甲醇, A 相 B 相中均有酸性挥发性缓冲盐 ($\text{pH} < 2$) 梯度洗脱. 液相梯度见表 1.

表 1 液相梯度表

时间 /min	流速 /ml $\cdot$ min ⁻¹	A %	B %
0	0.2	90	10
5	0.2	10	90
5.1	0.2	90	10
10	0.2	90	10

质谱条件: 仪器: AB API2000 串联四极杆质谱仪; 离子源: 电离模式: ESI+; 气帘气: 10; 碰撞气: 中, 离子喷雾电压: 4500V, 离子源温度: 400 $^{\circ}\text{C}$, 离子源气 1: 20, 离子源气 2: 15, 接口加热器: 开, 碰撞室进口电压: 10V, 碰撞室出口电压: 9V.

2 液相方法的建立

由于这 10 种海洋贝类毒素是水溶性的化合物, 所以一般的反相液相方法不能保留此类化合物, 如果在流动相中加入离子对试剂, 又不能满足质谱的分析要求. 本实验采用两种反相液相方法, 进行了比较; 一种是在样品中加入适量的庚烷磺酸钠进行分析, 这种液相方法虽然能的反相色谱上能保留住这类化合物, 但保留时间很不稳定, 这为定量分析带来很大不确定性; 另一种方法是在水相中加入适量五氟丙酸, 能很好地保留此类化合物, 而且保留时间很稳定, 色谱峰型对称, 但分离度不是很好, 本实验最后采用这种液相方法对实际样品进行了定量分析, 并获得了很好的定量结果 (表 2, 图 1).

本实验用美国应用生物系统公司的 API2000 系统进行的定量分析, 其检出限为 10ppb, 这已能满足对这类毒素定量分析要求.

表 2 10种化合物的相应 MRM 离子对及质谱参数

化合物	Q1	Q3	DT	DP	CE
STX	300. 2	204	100	35	28
STX	300. 2	282. 2	100	35	27
dcSTX	257. 2	222. 1	100	30	34
dcSTX	257. 2	239. 1	100	30	23
N eoSTX	316. 1	298. 2	100	30	34
N eoSTX	316. 1	220. 1	100	30	34
dcNeoSTX	273. 1	225. 2	100	30	35
dcNeoSTX	273. 1	255. 2	100	30	25
GTX 1, 4	412. 1	332. 1	100	15	21
GTX 1, 4	412. 1	314. 2	100	15	30
GTX 2, 3	396. 1	316. 2	100	15	22
GTX 2, 3	396. 1	298. 2	100	15	30
dcGTX 2 3	353. 1	273. 2	100	15	23
dcGTX 2 3	353. 1	255. 2	100	15	30

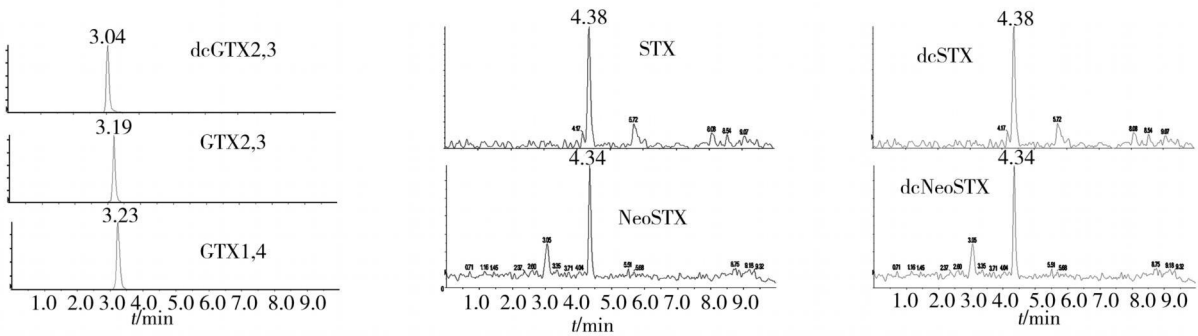


图 1 10种海洋贝类毒素标准品的 MRM 色谱峰及保留时间

3 样品定量检测

选取了三种海洋藻类进行了分析检测，这三种藻类分别是亚历山大藻、短裸甲藻、双鞭藻；样品经前处理后，进行定量分析检测其结果如表 3，其结果说明这类藻中只含有麻痹类贝毒素中的石房蛤类毒素 STX，而不含膝沟藻类毒素 GTX。

表 3 三种样品的定量结果

样品	STX /ppb	dcSTX /ppb	N eoSTX /ppb	d cNeoSTX /ppb	GTX 1, 4/ppb	GTX2, 3 /ppb	dcGTX 2 3/ppb
亚历山大藻	未检出	119	65	233	未检出	未检出	未检出
短裸甲藻	未检出	45	76	87	未检出	未检出	未检出
双鞭藻	未检出	67	20	90	未检出	未检出	未检出

随着气候环境的变化，海洋环境也在发生巨变，随之会产生多种海洋浮游藻类，这些藻类恰恰是海洋贝类的食物，通过海洋贝类的代谢，会产生各种藻类毒素，而这些毒素通常就存在于这些贝类体内，人们通过食用这些贝类，可能会引起中毒反应，所以建立可靠的检控方法，不仅能避免食物中毒，也能有效地检控海洋藻类的变化情况，本文建立了用 LC/MSMS 技术定量检测海洋贝类毒素的方法，其最低检出限为 10ppb

参 考 文 献

[1] Camek DellAversano et al, J. Chrom atography A, 2005, 1081: 190—201
[2] Bernd Krock Urban Tillmann et al, Anal. Bio Chem., 2008 392: 797—803
[3] Jiang Tianjiu Jiang Tao et al, Chinese J. Analy. Chem., 2006 34: 625—628