

Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

沃特世 (Waters®)  
环境分析园地

## UPLC/MS/MS 方法用于检测贝类亲脂性海洋生物毒素

艾丽·福克斯<sup>1</sup> 丹尼尔·麦克米兰<sup>2</sup> 罗纳尔·柏尔<sup>1</sup> 菲利普·赫斯<sup>1</sup>

(1 爱尔兰 Galway Rinville 海洋研究院生物毒素化学部; 2 沃特世公司, 曼彻斯特, 英国)

海洋生物毒素包括若干亲水性化合物和亲脂性化合物, 由于对人类健康有严重危害, 需要对所养殖的贝类化合物进行严格检测. 因此, 采用快速而准确的检测方法是十分重要的. 在欧盟, 目前所规定的唯一“官方的”检测方法是灰鼠生物鉴定方法 (MBA). 使用这种方法, 人们只能观察到贝类萃取物在活鼠上所产生的效果, 而且不是针对某一种毒物, 不是定性检测方法. 为了采用其它方法调查 DSP 毒素, 2005 年成立了 BIOTOX, 这是一个欧盟资助的项目, 根据《食品质量与安全优先性》(FP6-2003-食品-2A) 开展工作. 12 个欧洲合作实验室的首要目的是开发相关多种毒素的 LC/MS 检测方法, 并用这种方法确认另外一种节省成本的方法 (比如免疫测定法).

本文描述了一种方法, 对这种方法能够检测低于规定所要求的水平内囊括所有规定的化合物. 对于所提交的、进行分析的大量普通样品, 由于环境因素和气候因素, 可能要对这些毒素的分散性进行修改, 这种检测方法适合许多其它类型的亲脂性毒素.

人们知道, 贝类动物萃取物的基质很复杂. 在质谱分析中, 离子抑制或加强都可能出现, 因此, 对这部分的研究范围是调查并减少基质效应. 为实现这个目标, 我们采用了高级色谱技术和最先进的 MS/MS 仪器.

沃特世 (Waters®) 的 ACQUITY UPLC® (超高效液相色谱) 是一个高级分离系统, 它使用一个 1.7 μm 的固相颗粒, 在较短的时间内提高分辨率, 完善峰形. 这个系统使检测仪的选择性更好、灵敏度更高, 同时, 也意味着质谱仪的运行速度更快, 以保持数据的一体性.

沃特世的 Quattro Premiere™ XE 串联四极杆液质联用仪采用了 T-Wave™ 技术, 能够在多反应监测切换期间, 快速清除碰撞池中的残留离子. 它不仅极大地减少了交叉污染, 而且还使 dwell 及 inter-scan 时间很短, 以适应 UPLC® 快速分析的需要. 有了这些特点, 再加上已经被证明了的耐用性、ZSpray™ 源的高灵敏度以及各种离子化模式之间的快速切换能力, 人们可以使用这种仪器分析所有类型的样品.

### 1 贝类的萃取

称取 2g 样品置于 50ml 的塑料离心管中, 加入 6ml 甲醇萃取. 用涡流的方式, 以 2500r · min<sup>-1</sup> 的速度混合萃取 1min; 然后以 6000r · min<sup>-1</sup> 的速度, 离心分离 15min. 把上层清液倒入一个 20ml 的量瓶中, 以同样的方式对样品进行第二次萃取. 第三次萃取方式是, 加入 6ml 的甲醇, 以 11000r · min<sup>-1</sup> 的速度高速混合萃取物. 将三次萃取液合并. 如果做标准添加实验, 可以向萃取液中加入 AZA 和 OA 标准品, 浓度范围为 30ng · ml<sup>-1</sup> 到 1mg · ml<sup>-1</sup>. 定容. 用 0.2mm 规格的滤膜过滤该萃取, 倒入带盖的 LC 进样瓶中.

所使用的的 OA, PTX 2, YTX, GYM, SPX 13-DESME-C 是从加拿大 NRC 购买的. AZA 1 是由 Nils Rehmann 在海洋研究院从自然界受污染的贻贝中分离的. 主要毒素的结构样图如图 1 所示.

含有各种类似 YTX 物质的样品是由奥斯陆 NSVS 的 John Aasen 和意大利 Cesenatico Centro Ricerche Marine 的 Anna Milandri 共同制作的. PTX 萃取物和 6 种受污染的扇贝萃取物由日本东京 JFRLde Yasumoto 教授慷慨捐赠. 本文作者非常感谢所有这些人所提供的帮助, 感谢 NRC 捐赠了一个事先注册了的、符合 YTX 标准的样品.

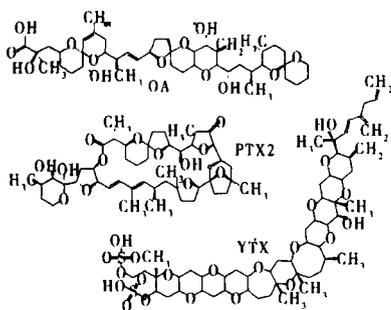


图 1 毒素结构样图: OA, pectenotoxin 2 和扇贝毒素

## 2 分析方法

沃特世的 ACQUITY UPLC 超高效液相色谱 流动相 A:  $\text{H}_2\text{O} + 2\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{CHOONH}_4 + 50\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{CHOOH}$ ; 流动相 B: 含 95% MeCN 的水溶液 +  $2\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{CHOONH}_4 + 50\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{CHOOH}_4$ ; 色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC<sub>18</sub> 1.7  $\mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 100\text{mm} + 2\mu\text{m}$  串联过滤器; 流速:  $0.4\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样体积:  $10\mu\text{l}$ ; 色谱柱温度:  $30^\circ\text{C}$ ; 梯度时间:  $t = 0\text{min} 30\% \text{B}$ ,  $t = 3\text{min} 90\% \text{B}$ ,  $t = 4.5\text{min} 90\% \text{B}$ ;  $t = 4.6\text{min} 30\% \text{B}$ ; 循环时间: 6.6min

沃特世 Quattro Premier<sup>TM</sup> XE 串联四极杆液质联用仪 离子模式: ES + /ES-毛细管; V:  $\pm 2.5\text{kV}$ ; 脱溶剂气体:  $850\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \text{N}_2$ , 温度为  $350^\circ\text{C}$ ; 锥孔气体:  $50\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \text{N}_2$ ; 源温度:  $120^\circ\text{C}$ ; 采集模式: 多反应检测模式; 锥孔电压和碰撞能量见表 1; 碰撞气体: Ar, 压力为  $4.5 \times 10^{-3} \text{mbar}$

使用沃特世 MassLynx<sup>TM</sup> 软件获取数据, 用 TargetLynx<sup>TM</sup> 应用管理软件进行数据处理.

## 3 贝类毒素化合物的定性分析

各种毒素在表 1 中列出. 开发的色谱分析法并不只适用于某类毒素, 它适用于所有相关的贝类毒素化合物, 结果都很好. 因此, 采用这种方法可以很好地分离大多数贝类毒素, 尽管有时会出现一起洗脱现象或者峰形比所期望的理想峰形要宽. MS/MS 法的选择性高, 能够很方便地区分这些峰形.

表 1 所确认的分析物 (带有多反应监测和具体仪器参数)

化合物	多反应监测离子	模式	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	化合物	多反应监测离子	模式	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
GYM	508.3 > 392.4	正离子	50	35	OA <sub>ε</sub> DTX2	803.5 > 255.2	负离子	70	50
	508.3 > 490.4			24		803.5 > 113			65
Spx-13-desMeC	692.5 > 164.2	正离子	50	60	DTX1	817.5 > 255.5	负离子	70	65
	692.5 > 444.4			55		817.5 > 113			90
Carboxyhydroxy-YTX	1189.5 > 1109.5	负离子	45	40	AZA1 <sub>ε</sub> AZA1b	842.5 > 654.5	正离子	50	55
	1141.5 > 1061.5			55		842.5 > 362			55
YTX	1141.5 > 925	负离子	40	55	AZA2	856.5 > 672.5	正离子	30	55
	1061.5 > 981.5			40		856.5 > 654.5			45
1-去硫-YTX	1061.5 > 981.5	负离子	45	40	AZA3	828.5 > 362	正离子	50	55
45-OH-YTX	1157.5 > 1077.5	负离子	40	55		828.5 > 640.5			55
Carboxy-YTX	1173.5 > 1094.5	负离子	40	55	PTX2	876.5 > 823.5	正离子	40	40
Homo-YTX	1155.5 > 1075.5	负离子	40	55	876.5 > 212.5	50			
Carboxy homo-YTX	1187.5 > 1107.5	负离子	40	55	PTX1	892.5 > 839.5	正离子	40	25
	45-OH-Homo-YTX			1171.5 > 1091.5	负离子	40			55
					PTX2 <sub>sae7</sub> -Ept-PTX2 <sub>sa</sub>	894.5 > 805.2	正离子	40	40

图 2 给出的是从四个样品中提取出的所有贝类毒素化合物的色谱图. 所有化合物的出峰时间都在 3.5min 以内, 再把色谱柱的平衡时间考虑进去. 两个进样之间的时间为 6.6min.

## 4 定量与确认

在两个离子化模式下, 质谱分析的快速切换能力能够为每个峰生成足够的数据点; 获取这些数据点的目的是使每个峰形能够准确定量. 对于最重要的化合物来说, 需要检测两个子离子, 以便能够准确定性. 我们用这个软件包 TargetLynx Application Manager 处理数据.

图 3 是 TargetLynx 的结果浏览器, 上面显示的是一个样组中 OA 的校正曲线和结果. 中间的总结栏, 标黑色的两个样品显示的是含有痕量扇贝毒素 OA; 由于扇贝毒素的含量很少, 低于定量的范围, 因此, 它的浓度不能由母、子离子对的比率确认.

从 NRC 购买了一种经过注册的贻贝萃取参考物质 (RMDSP-Mus-b), 用它来确定这个方法的准确性. 进行了两次分析, 浓度分别为  $9.55\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $9.48\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . 结果表明, 与所规定的 OA 值 ( $10.1 \pm 0.8\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相比, 平均准确率为 93.7%.

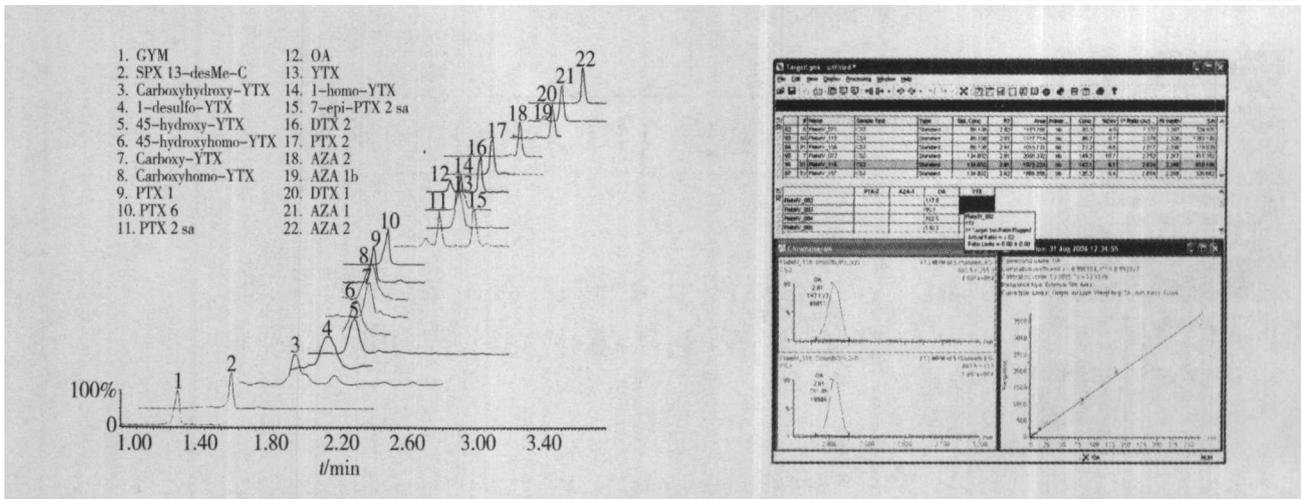


图2 样品色谱图

图3 OA 的校正曲线

(来自四个样品, 它们含有所有已经经过确认的毒素)

(黑色标出的部分是离子对比率超出误差的范围)

表 2 的数值是对前面数值的总结, 其基础是六种已知标准化合物的大约 2000 个样品. 它们的浓度已知, 并在海洋研究所进行了净化处理.

表 2 五种毒素和 YTX 的定性结果

化合物	相关系数	LOD /pg · ml <sup>-1</sup>	LOQ /ng · ml <sup>-1</sup>	范围/ng · ml <sup>-1</sup>
OA	0.997 ± 0.0012	483.1	1.61	1.5—232
YTX	0.9969 ± 0.0009	336.3	1.12	2.8—56
AZA1	0.9996 ± 0.0004	32.8	0.11	0.4—77
PTX2	0.9993 ± 0.0007	47.4	0.16	0.5—96
GYM	0.9974 ± 0.0014	60	0.2	1.5—111
SPX 13-desMe-C	0.9966 ± 0.0037	22	0.07	1.0—80

### 5 基质效应

处理贝类萃取物这样的复杂基质, 重要的是要考虑到目标物离子化的离子抑制或加强效应. 这种抑制或加强是因为一起洗脱的离子化杂质产生的. 在研究中使用的是 OA 和 AZA 1 标准添加法(基质匹配标准)和萃取后添加法. 我们分别对生、熟贻贝和牡蛎进行了分析, 为的是调查基质效应的差别是如何产生的.

从图 4 给出的标准添加实验结果上可以清楚地看出, AZA1 基质添加标准与溶剂标准相比, 抑制在很大程度上依赖于基质, 生贻贝, 生牡蛎所受到的影响大于熟贻贝和熟牡蛎所受到的影响.

图 5 显示的是萃取后添加实验的结果. 图 5 表明, 由于基质百分比增加(即样品数量增加或萃取溶剂数量减少), 抑制方面的问题也越来越大.

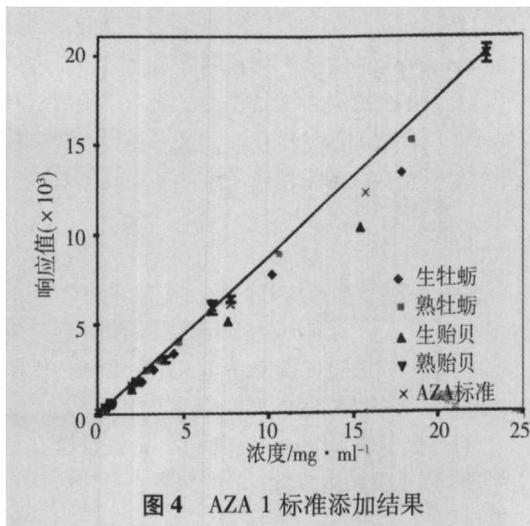


图 4 AZA 1 标准添加结果

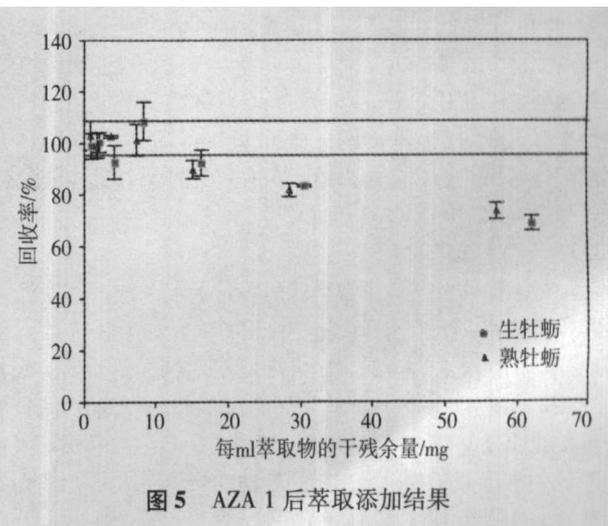


图 5 AZA 1 后萃取添加结果

综上所述, UPLC/MS/MS 法是快速而准确的. 主要相关化合物的分析方法包括了定性及定量的方法. Quattro Premier XE 串联四极杆液质联用仪能够快速进行正、负离子模式切换, 实现了同时检测样品的正、负离子, 可以分析更多的欧盟规定的贝类毒素. 采用这种方法灵敏度高, 能够稀释样品, 减少进样体积, 因此, 也就最大限度地减少了基质效应.