

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0906 - 05

UHPLC-MS/MS 分析腹泻性贝毒在文蛤体内的积累与排出

饶涛¹, 张勇², 杜霞³, 张洋³, 贾睿³, 陶妍¹, 何培民³

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 国家海洋局东海环境监测中心, 上海 200137; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用超高压液相色谱-四极杆串联质谱法建立了腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、大田软海绵酸(okadaic acid, OA)和鳍藻毒素1(dinophysistoxin-1, DTX1)的检测方法。样品经80%甲醇提取后,经正己烷脱脂和C18固相萃取柱净化,采用Hypersil GOLD C18色谱柱分离,以50%(体积分数)乙腈水(0.2%甲酸)溶液为流动相等度洗脱,电喷雾电离,在选择反应监测(SRM)模式下进行定性与定量分析。OA和DTX1在25~400 μg/kg范围内线性关系良好,OA和DTX1最低定量限(LOQ, S/N>10)分别为5 μg/kg和1 μg/kg。样品平均回收率大于80%,相对标准偏差小于10%(n=6)。应用该检测方法研究了利玛原甲藻(*Pivocentrum lima*)产生的DSP毒素在文蛤(*Meretrix meretrix*)体内积累与排出规律。结果表明,DSP在文蛤体内积累迅速,摄食48 h,贝类肌肉中和消化腺中的DTX1含量即超过了食用安全限量。文蛤消化腺中的毒素含量大约是肌肉中的10倍。经96 h排出实验,贝体内的DSP毒素排除量大于80%。

研究亮点: 建立了腹泻性贝毒 OA 和 DTX1 超高压液相色谱-四极杆串联质谱检测方法,定量更准确。且 OA 和 DTX1 最低定量限分别低至 5 μg/kg 和 1 μg/kg 即 200 pg 和 40 pg (S/N = 10),灵敏度高;分离及检测 OA 和 DTX1 只需 10 min,分析速度快。并首次应用该检测方法研究了腹泻性贝毒在文蛤体内的积累、排出规律。

关键词: 超高压液相色谱-四极杆串联质谱;腹泻性贝毒;大田软海绵酸;鳍藻毒素1;文蛤

中图分类号: TS 207.4

文献标志码: A

腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)引起的食源性中毒事件在全球范围内经常发生^[1],在我国也是危害较严重的一种赤潮藻毒素^[2],其主要成分为软海绵酸(okadaic acid, OA)及鳍藻毒素1(dinophysistoxin-1, DTX1)^[3]。OA和DTX1是肿瘤促进因子^[4],研究表明如果贝肝脏内OA和DTX1的含量分别超过2 μg/g和1.8 μg/g,就不宜食用^[5]。欧盟对OA、DTX1采用的食品安全限量标准分别为20 μg/100g、16 μg/100g贝类鲜肉^[6]。

目前,DSP分析方法常采用小鼠生物学检测法(mouse bioassay, MBA)^[7]、免疫学法^[8-10]、高效液相色谱法(high-performance liquid

chromatography, HPLC)^[11-14]、液质联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)^[15-17]等。小鼠法分析时间长,无法确定毒素的种类和含量;免疫学法常伴有假阳性;由于DSP毒素的紫外吸收很弱,液相色谱法检测需要繁琐的柱前衍生步骤,检测时间长且不能准确地定性。液相色谱优越的分离能力与质谱强大的定性定量功能相结合,克服了其它方法分析时间长、定性、定量不准确的缺点,可以快速有效地监测环境中藻毒素的污染及水产品中富集的藻毒素的含量。

DSP主要通过受污染的水产品对人类产生影响,目前最受关注的是双壳贝类。藻毒素通过滤食性贝类富集并经食物链传递,威胁人类健康

收稿日期: 2012-01-19 修回日期: 2012-04-10

基金项目: 上海市国际合作项目(08540702600);上海市优秀学科带头人项目(08XD14037);上海市浦江人才项目(05PJ14086);上海市科学技术委员会农业重点攻关项目(10391901900);上海市教育委员会创新项目(11YZ149);国家海洋局东海分局项目(MATHAB20100205)

作者简介: 饶涛(1985—),女,硕士研究生,研究方向为赤潮藻毒素检测。E-mail: raotao2@gmail.com

通讯作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

与生命安全,因此研究藻毒素与贝类的相互关系,观察贝类对毒素的累积和排出特点很有必要。DSP 毒素检测直接关系到食品安全,毒素在贝体内的积累和排出规律更是一个关系到消费者生命安全和贝类养殖业健康发展的亟待解决的重要课题。我国在 DSP 毒素与贝类的相互关系方面的研究报道还很少。利玛原甲藻(*Pivocentrurn lima*)是 OA 和 DTX1 毒素标准品的可靠来源。因此,本文选用利玛原甲藻,以分布广泛的文蛤(*Meretrix meretrix*)为研究对象,运用超高压液相色谱-四极杆串联质谱法对该藻所产生的 DSP 毒素在文蛤体内的累积和排出进行了初步研究。首次探讨了 OA 和 DTX1 在文蛤体内的富集、清除与时间的关系,以期为我国水产品中 DSP 毒素的监测分析工作提供理论依据和快捷、准确的检测方法,为食品安全研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用产毒利玛原甲藻(*Pivocentrurn lima*),取自上海海洋大学藻种库。实验室内单种培养,选用 f/2 培养液,温度为 20 ℃,光照强度为 3 000 lx,光照周期为 L:D = 12 h:12 h。文蛤(*Meretrix meretrix*)购自上海市芦潮港,实验室暂养,适量通气,每日投喂两次小球藻。OA、DTX1 标准品购自 NRC(National Research Council Canada),纯度大于 95%;HPLC 级甲醇、甲酸、乙腈购自 Merck(Darmstadt, Germany);其他试剂均为分析纯。

主要仪器:超高压液相色谱/串联质谱(赛默飞世尔科技 Thermo Fisher Scientific 公司),Accela 液相色谱仪系统,TSQ Quantum Access 三重四极杆串联质谱仪,超细匀浆机(F6/10),VARIAN C18 固相萃取小柱(500 mg,6 mL),L-550 离心机,TurboVap LV 全自动氮吹仪,Milli-Q 纯水仪(Millipore 公司)。

1.2 累积和排出实验

实验组和对照组分别设置 3 个平行,实验开始时,每组 150 只文蛤。取 50 mL 平台期的利玛原甲藻藻液,显微镜计数,抽滤至滤膜(Whatman GF/C),留待 UHPLC-MS/MS 分析毒素含量。毒素累积实验共进行 48 h,实验组每日投喂 200 mL 利玛原甲藻藻液 4 次,对照组以海水代替。另

外,每组每天再投喂小球藻两次。每隔 24 h 换水一次,并在实验开始后的 1、2、24、48 h 从实验组中各取出 10 只文蛤作为一组样品,解剖消化腺部分和肌肉部分袋装保存,-20 ℃ 冷冻留待 UHPLC-MS/MS 分析毒素含量。对照组也用同样方法在实验开始的第 1、2、24、48 小时取样。

排出实验共进行 96 h,累积实验结束后,停止投喂利玛原甲藻,每天投喂小球藻两次。96 h 后从实验组和对照组内分别取贝样,方法同上。

1.3 样品处理

称取 2.0 g 已匀浆贝肌肉样品(或 1 g 消化腺样),加入 4 mL 80%(体积分数)甲醇溶液,超声提取 2 min,3 500 r/min 离心 5 min,重复提取一次,合并提取液。用 10 mL 正己烷分两次脱脂,弃去正己烷层,剩下溶液在 40 ℃ 下氮气吹至约 2 mL 用于固相萃取。C18 固相萃取小柱分别用 5 mL 甲醇、水活化,上样后用 4 mL 水和 4 mL 10% 甲醇溶液清洗,柱床干燥后用 5 mL 甲醇(含 0.2% 乙酸)洗脱,氮气吹干后用 1 mL 初始流动相溶解残渣,超声溶解后过 0.22 μm 滤膜供 UHPLC-MS/MS 测定。

1.4 UHPLC-MS/MS 检测条件

色谱条件:Hypersil GOLD C18(100 × 2.1, 1.9 μm, Thermo scientific)色谱柱;流动相 A 为含 0.2% 甲酸的超纯水,B 为乙腈;体积分数为 50% 的乙腈溶液等度洗脱 10 min,流速 0.3 mL/min;进样体积 15 μL;柱温 30 ℃。

质谱条件:电喷雾离子源,选择反应监测(SRM)模式;ESI⁻电喷雾电压(spray voltage)4.0 kV;毛细管温度 280 ℃;鞘气(N₂)压:30 psi;辅助气(N₂)压:10 psi;氮气用作碰撞气,碰撞压力为 1.5 mTorr。

2 结 果

2.1 色谱和质谱条件的优化

OA 和 DTX1 在色谱上的保留时间分别为 3.4 min 和 7.5 min(图 1)。ESI 离子源,分别在正负离子模式下工作,发现 OA 和 DTX1 均在负离子模式响应高。一级质谱全扫描提取目标化合物的分子离子峰,选取 m/z 为 803.5 和 817.5 作为母离子,优化电喷雾电压、鞘气、辅助气等。用二级质谱选择扫描收集各自的子离子信息,确定定性与定量的特征离子对,结果如表 1。

表 1 选择反应监测 (SRM) 离子对

化合物	监测离子对/(m/z)	碰撞能量/eV	保留时间/min
OA	803.5/255.2*	49	3.4
	803.5/150.8	55	
DTX1	817.5/255.2*	50	7.5
	817.5/151.1	48	

注: * 表示定量离子。

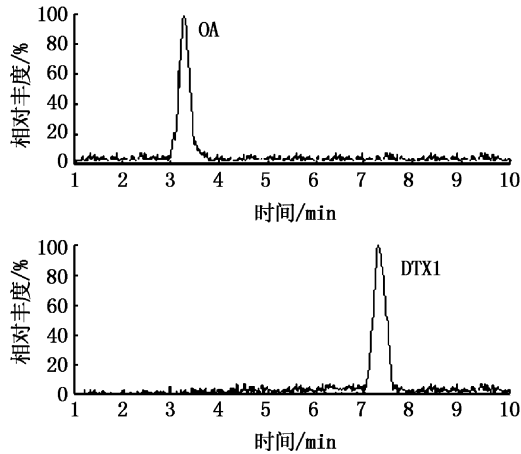


图 1 腹泻性贝毒的 SRM 色谱图

Fig. 1 Selective reaction monitoring (SRM) chromatogram of diarrhetic shellfish poisoning

表 2 腹泻性贝毒的线性方程、线性范围和相关系数

Tab. 2 Linear equations, linear ranges and correlation coefficients for diarrhetic shellfish poisoning

化合物	线性方程	线性范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相关系数	定量检测限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
OA	$Y = 74409X + 749940$	25 ~ 400	0.999 7	5
DTX1	$Y = 147621X + 943422$	25 ~ 400	0.996 7	1

表 3 平台期利玛原甲藻产生的 DSP 毒素组分及含量
Tab. 3 The profiles and contents of DSP produced by *P. lima* stationary phase

DSP 组分	分子量	毒素含量/ μg
OA	803.5	1.80×10^{-7}
DTX1	817.5	2.03×10^{-6}

2.5 毒素在文蛤体内的积累和排出

对照组贝样中未检出 DSP 毒素。DSP 毒素分布在文蛤消化腺和肌肉中,在累积实验阶段,OA 和 DTX1 的含量呈上升的趋势(图 2)。累积实验结束时,贝类肌肉中 OA 和 DTX1 含量分别为 $18.2 \mu\text{g}/100\text{g}$ 和 $25.4 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 贝类鲜肉,其中 DTX1 含量超过贝类禁止食用的卫生标准($20 \mu\text{g}$ OA/ 100g 、 $16 \mu\text{g}$ DTX1/ 100g 贝类鲜肉);消化腺中 OA 和 DTX1 含量分别为 $1.3 \mu\text{g}/\text{g}$ 和 $1.9 \mu\text{g}/\text{g}$ 消化腺,其中 DTX1 含量达到不宜食用的限量($2 \mu\text{g}$ OA/ g 和 $1.8 \mu\text{g}$ DTX1/ g 消化腺)。消化

2.2 方法的线性范围和检出限

将 DSP 标准溶液梯度稀释后添加到 2.0g 空白基体中,配制成样品中含量为 $25, 50, 100, 200$ 和 $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的标准品系列。用与样品提取相同的步骤处理后进行测定,以峰面积和加标浓度绘制标准曲线,X 轴代表峰面积,Y 轴代表样品浓度,结果如表 2。另在空白基质中添加标样,计算定量下限(LOQ, $S/N > 10$),OA、DTX1 的 LOQ 分别为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

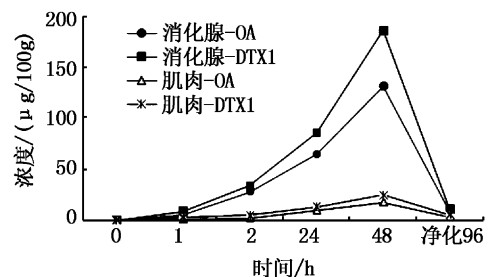
2.3 回收率与精密度

在 2.0g 空白基体中添加了高、中、低 3 个水平的 DSP 标准品,按照 1.3 中所述步骤处理,测定回收率和精密度($n = 6$)。结果表明,在 DSP 添加量为 $5, 20$ 和 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时,OA 的平均回收率为 $85.1\% \sim 104.1\%$,DTX1 的平均回收率为 $87.4\% \sim 99.9\%$,相对标准偏差均小于 10% 。

2.4 利玛原甲藻的毒素含量

实验选用平台期的利玛原甲藻,OA 和 DTX1 毒素的含量见表 3。可见利玛原甲藻细胞中 DTX1 的含量高于 OA。

腺中 DSP 毒素浓度是贝肌肉中的近十倍,文蛤消化腺是 DSP 毒素的主要分布部位。

图 2 OA 和 DTX1 在文蛤消化腺和肌肉中含量的变化
Fig. 2 Contents of OA and DTX1 in digestive gland and muscles of *Meretrix meretrix* during the experiments

停止投喂立玛原甲藻后,DSP 毒素在贝体内的含量下降(图 2),经过 96h 的毒素排出实验,贝肌肉中 OA 和 DTX1 的毒素含量分别为 $3.1 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 和 $6.0 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 贝类鲜肉;消化腺中

OA 和 DTX1 含量分别为 0.08 $\mu\text{g/g}$ 和 0.11 $\mu\text{g/g}$ 消化腺, DSP 毒素总排除量大于总积累量的 80%。

3 讨论

3.1 超高压液相色谱-四极杆串联质谱分析检测腹泻性贝毒

我们采用超高压液相色谱-四极杆串联质谱技术,建立了文蛤中腹泻性贝毒 OA 和 DTX1 的检测方法。比较了流动相中加酸、加碱及缓冲盐体系下超高压液相色谱-四极杆串联质谱对 OA 和 DTX1 的分离及响应。结果表明以乙腈和水(含 0.2% 甲酸)作为流动相,化合物分离度好且质谱响应高。由此确立了超高压液相色谱分析 OA 和 DTX1 的最佳方法,即 50% 乙腈溶液(0.2% 甲酸)流速 0.3 mL/min 等度洗脱 10 min, OA 和 DTX1 的保留时间分别是 3.4 min 和 7.5 min,峰间分离度好且分析时间短。单个样本的分析仅需 10 min,大大提高了分析效率。我国已有在 DSP 毒素的液质联用检测方面的研究报道,方晓明等^[18]利用高效液相色谱/四极杆-飞行时间质谱测定腹泻性贝毒 OA,基体加标制作标准曲线,结果表明,OA 的加标平均回收率为 89% ~ 93%,相对标准偏差为 9% ~ 10%,LOQ 为 100 $\mu\text{g/kg}$ 。卢士英等^[19]用高效液相色谱四极杆串联法检测 OA,样品平均回收率为 83.99%,检测下限(LOQ)为 5 $\mu\text{g/kg}$;本研究采用基体加标配制标曲,结果证明 OA 和 DTX1 在 25 ~ 400 $\mu\text{g/kg}$ 范围线性关系良好,相关度达到 0.99 以上。OA 和 DTX1 的 LOQ 分别为 5 $\mu\text{g/kg}$ 和 1 $\mu\text{g/kg}$,OA 的平均回收率为 85.1% ~ 104.1%,DTX1 的平均回收率为 87.4% ~ 99.9%。在实际样本检测中,每 3 针间插入 1 针 OA 和 DTX1 的标准品溶液样本(浓度 100 $\mu\text{g/kg}$)以观察基质效应,未发现明显的抑制。表明本方法不仅克服了基质效应的影响,而且灵敏度较高。

利用超高压液相色谱分离 OA 和 DTX1 分析时间短,四极杆串联质谱灵敏度高,二级质谱 SRM 模式对化合物的选择性好,因此可以对微量腹泻性贝毒 OA 和 DTX1 进行快速鉴别和测定。仪器自动进样,在大批量生物样品的筛查中,可节省人力、物力和时间。可为保障海产品食用安全及为大规模赤潮藻毒素的常规监测提供快速

准确的检测方法。

3.2 DSP 在文蛤体内的积累与排出特点

本文首次探讨了文蛤对腹泻性贝毒 OA 和 DTX1 的富集、清除与时间的关系。通过以上对文蛤投喂产毒利玛原甲藻,跟踪检测 OA 和 DTX1 在其体内的富积累与排出的实验,可以看出 DSP 毒素能通过文蛤摄食而在其体内累积,毒素主要分布在消化腺,由此建议宜摘除消化腺再食用,可以大大减少藻毒素的摄入。

染毒 48 h 后,文蛤肌肉和消化腺中的 DTX1 含量分别达到 25.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 贝类鲜肉和 1.9 $\mu\text{g}/\text{g}$ 消化腺,DTX1 的含量超出了安全限量(16 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 贝类鲜肉,1.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ 消化腺),但是 OA 的含量还未超标,这可能是由于喂食给文蛤的利玛原甲藻细胞中的 DTX1 的含量较 OA 更高的缘故。停止摄食利玛原甲藻后,文蛤能够通过自净逐渐排出其体内积累的腹泻性贝毒,经过 96 h 的流水净化,文蛤排出的毒素大于其在染毒 48 h 过程中积累总毒素的 80%,但是总的来说,OA 和 DTX1 在贝体内积累快而消失较慢。为确保食品安全,在赤潮爆发时节,应加强市售贝类的检测。

参考文献:

- [1] TORGERSEN T, AASEN J, AUNE T. Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (*Cancer pagurus*) in Norway [J]. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 2005, 46 (5): 572 - 578.
- [2] 杨维东,彭喜春,刘洁生,等. 腹泻性贝毒研究现状 [J]. *海洋科学*, 2005, 29(5): 66 - 72.
- [3] MACKENZIE L, HOLLAND P, MCNABB P, et al. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis [J]. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 2002, 40 (9): 1321 - 1330.
- [4] CREPPY E E, TRAOTÉ A, BAUDRIMONT I, et al. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid [J]. *Toxicology*, 2002, 181: 433 - 439.
- [5] HALLEGRAEFF G M. In vitro biochemical and cellular assays [J]. *Int Oceanographic Commission Manuals Guides*, 1995, 33: 182 - 190.
- [6] 李爱峰. 液-质联用技术分析海洋生物毒素的研究 [D]. 北京:中国科学院研究生院(海洋研究所), 2005.
- [7] 吴锋,江天久,张帆,等. 浙江南鹿海域双壳贝类的腹泻性贝毒分析 [J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(4): 492 - 495.
- [8] 刘仁沿. 我国贝类中赤潮毒素腹泻性贝毒免疫检测技术

- 研究[D]. 大连:大连海事大学,2008.
- [9] 刘仁沿,梁玉波,陈媛,等. 胶体金免疫层析法快速检测腹泻性贝毒软海绵酸的研究[J]. 分析科学学报,2010,26(1):31-34.
- [10] 王丽,桑亚新,周群标,等. 大田软海绵酸人工抗原的合成及其多克隆抗体的制备[J]. 水产学报,2011,35(7):1001-1007.
- [11] 张树刚,邹清,陈雷,等. 浙南海域腹泻性贝毒分析[J]. 海洋科学,2011,35(1):44-47.
- [12] 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.
- [13] 杨莉,杨维东,刘洁生,等. 广州市售贝类麻痹性贝毒和腹泻性贝毒污染状况分析[J]. 卫生研究,2006,35(4):435-438.
- [14] 张树刚,邹清,陈雷,等. 浙南海域腹泻性贝毒分析[J]. 海洋科学,2011,35(1):44-47,53.
- [15] 母清林,方杰,万汉兴,等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素[J]. 分析化学,2011,39(1):111-114.
- [16] PAZ B H, DARANAS A, CRUZ P, et al. Characterisation of okadaic acid related toxins by liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Toxicon, 2007, 50: 225-235.
- [17] CIMINIELLO P, Dell' AVERSANO C, FATTORUSSO E, et al. Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Toxicon, 2006, 47: 174-181.
- [18] 方晓明,唐毅锋,刘俊平,等. 高效液相色谱/四极杆-飞行时间质谱测定腹泻性贝毒研究[J]. 检验检疫科学,2003,13(6):14-16.
- [19] 卢士英,张代辉,周玉,等. 大田软海绵酸液相色谱串联质谱检测方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(9):1537-1539,1551.

UHPLC-MS/MS analysis of the accumulation and elimination of DSP in *Meretrix meretrix*

RAO Tao¹, ZHANG Yong², DU Xia³, ZHANG Yang³, JIA Rui³, TAO Yan¹, HE Pei-min³

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. East China Sea Environmental Monitoring Center, State Oceanic Administration, Shanghai 200137, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Okadaic acid (OA) and dinophysistoxins-1 (DTX1) of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins were detected by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). After the toxins being extracted using methanol and water (80:20, V/V), the solution was further extracted with n-hexane to remove lipid components and then cleaned up by solid phase extraction (SPE) on an C18 cartridge. The analytes were eluted with 50% (V/V) acetonitrile water containing 0.2% formic acid on a Hypersil GOLD C18 column. The qualitative and quantitative determination of the toxins was performed by selective reaction monitoring (SRM) mode. OA and DTX1 were determined in the negative ion mode. The calibration curve was linear in the ranges of 25-400 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The quantification limits of OA and DTX1 were 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The mean recoveries at spiked concentrations of 5-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were more than 80% and the relative standard deviations were less than 10% ($n = 6$). We studied toxin accumulation, transformation and elimination of DSP in *Meretrix meretrix*. The results showed that the increase in DSP content with the increase in time both in digestive gland and muscle during an 48-hour accumulation period when *Meretrix meretrix* were fed with *P. lima*. At the end of the accumulation period, the toxin amount of DTX1 in *Meretrix meretrix* reached the regulatory limit in shellfish for OA group toxins. After the 96-hour elimination period, the amount of DSP decreased at least by 80%.

Key words: UHPLC-MS/MS; DSP; okadaic acid; dinophysistoxin-1; *Meretrix meretrix*