

高效液相色谱 – 串联质谱法测定鲫鱼中的微囊藻毒素

刘飞 王勇为 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

Key Words

- 微囊藻毒素
- TSQ Quantum
- 鲫鱼

摘要：建立了高效液相色谱/串联质谱法(LC-MS/MS)同时定量检测鲫鱼中微囊藻毒素(MC-RR, YR, LR, LW, LF)的方法,用甲醇提取鲫鱼中待测物,HLB(Oasis)小柱固相萃取法净化,并对提取溶剂和淋洗液及分析条件进行了优化。该法检出限(LOD)为0.2 µg/kg,定量限(LOQ)为0.7 µg/kg,标准曲线的线性相关系数均大于0.99,回收率为85.3% - 101.3%,该方法操作简便且灵敏度较高。实际鱼样未检测出MC-RR, YR, LR, LW, LF。

关键词：微囊藻毒素；TSQ Quantum；鲫鱼

1 引言

近几十年由于水体富营养化程度的日益加剧,涉及范围不断扩大,包括水源水库水在内的淡水水体经常发生蓝藻水华。有害藻类水华的频繁发生已成为国内外普遍关注的环境问题。据2004年资料,已从不同藻株中分离、鉴定了70多种微囊藻毒素^[1]。在已发现的蓝藻毒素中,微囊藻毒(Microcystins, MCs)是一种在蓝藻水华污染中出现频率最高、造成危害最严重的藻毒素种类^[2]。

MCs的一般结构为环(D-丙氨酸-L-赤-β-甲基-D-异天冬氨酸-L-Z-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸)。其中,Adda(3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸)是一种特殊的氨基酸^[3]。在已发现的MCs异构体中,MC-LR, RR, YR毒性最强(L、R、Y分别代表亮氨酸、精氨酸、色氨酸)。MCs是一种水溶性肝毒素^[4-5],它对动物和人类健康的潜在危害逐渐引起关注。

由于藻毒素可通过食物链累积,供食用的水产品如鱼类、贝类等也可能携带藻毒素危害人类健康。为防止藻毒素对人类的进一步危害,需进行更广泛而深入的研究。目前WHO仅规定了饮用水中微囊藻毒素可耐受量1.0 µg/L,及暂定的微囊藻毒素临时可耐受的每日摄入量0.04 µg/(kg•d BW)^[6],结合各国微囊藻毒素的安全限量标准,微囊藻毒素每日安全摄入总量在2.4 µg之内应是安全的。但鱼类等水产品中微囊藻毒素的限量还有待进一步的研究。鉴于微囊藻毒素对人体的危害,应逐步建立和完善水产品中MCs含量的检测方法,并制定食品中MCs的限量。

越来越多的分析技术用于MCs的检测当中,水体中MCs中的检测方法已相对较完善^[7-9]。本文报道了同时

对鱼体中MC-RR, YR, LR, LW, LF进行定量分析,建立了鱼体中MCs的高效液相色谱/串联质谱(LC-MS/MS)分析方法,这些毒素可产生典型的离子谱,质谱仪对藻毒素有最佳分辨效果,LC-MS/MS方法由于其优良的选择性,对样品的纯化步骤要求不高,能够在混合物中同时实现多种藻类毒素的分离和鉴定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

液质联用仪由Surveyor液相色谱系统和Thermo Fisher TSQ Quantum三重四极杆串联质谱组成;氮气吹干仪(美国Zymark公司);MilliQ去离子水发生器(美国Millipore公司);Sartorius冷冻离心机;WH-861漩涡混合器。

二次去离子水;甲醇(色谱纯);Oasis HLB固相萃取柱(Waters公司,60 mg,3 mL);标准品:微囊藻毒素-LR(MC-RR),微囊藻毒素-LF(MC-YR),微囊藻毒素-YR(MC-LR),微囊藻毒素-RR(MC-LW),微囊藻毒素-LW(MC-LF),纯度不低于95%;鲫鱼样品来自市场,冷冻保存于实验室。

分别准确称取标准品各10.00 mg,至10 mL棕色容量瓶,用甲醇定容,-20 °C避光保存。再用甲醇稀释上述标准储备液,配制成1.0 µg/mL的混合标准溶液,于4 °C避光保存1个月。

2.2 样品前处理

2.2.1 提取

准确称取5.00 g鲫鱼试样均匀样品于100 mL离心管中,加入50 µL标准MC-RR, YR, LR, LW, LF(1 µg/mL),于液体混匀器(10000 r/min)上快速混合1 min,使标准与试样混合均匀,再加入10 mL甲醇溶液,均质2 min,超声15 min,离心5 min(3000 r/min),将上清液转移到试管中,氮吹至约0.5 mL,加水至约10 mL。

2.2.2 净化

分别用5 mL甲醇、水活化HLB固相萃取小柱,流量为1-2 mL/min。将上述混合物转移到HLB小柱上,控制流上样流速为1-2 mL/min。用二次去离子水5 mL淋洗,淋洗速度为1-2 mL/min,抽干,用甲醇溶液4 mL洗脱,洗脱流速约1 mL/min,收集洗脱液于50 °C氮吹,甲醇-水(甲醇:水=3:7)定容至1 mL,过0.45 µm的滤膜到进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。

2.3 液相色谱和质谱条件

2.3.1 液相色谱条件

色谱柱: Polaris C18 色谱柱(150 mm×2.1 mm×5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%(体积分数)甲酸水溶液; 流速: 0.25 ml/min; 梯度洗脱程序: 0.00min(20%甲醇, 80%甲酸水溶液), 4.00 min (95%甲醇, 5%甲酸水溶液), 8.00 min(95%甲醇, 5%甲酸水溶液), 8.10 min (20%甲醇, 80%甲酸水溶液), 10.00 min (20%甲醇, 80%甲酸水溶液); 柱温: 25℃; 进样量: 10 μL。

2.3.1 质谱条件

电离方式为电喷雾电离源(ESI+); 选择反应监测(SRM); 毛细管温度300 ℃; 喷雾电压(spray voltage) 3.5 kV; 鞘气(N₂)流量: 6 L/min; 辅助气(N₂)流量: 2 L/min; 碰撞气(N₂)压力: 1.5 mTorr。

表1 MCs的母离子/子离子离子及碰撞能量

化合物 Compounds	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)
MC-RR	519.8[M+2H] ²⁺	135.0 *	30
		440.4	25
MC-YR	1045.6[M+H] ⁺	135.0 *	60
		375.0	45
MC-LR	995.6[M+H] ⁺	135.0 *	56
		553.0	45
		375.0 *	30
MC-LW	1025.6[M+H] ⁺	135.0	60
		375.0 *	43
MC-LF	986.6[M+H] ⁺	135.0	50
		375.0 *	22

* 定量离子 (quantitative ion)

3 结果与讨论

3.1 线性范围、定量限和检出限

将MC- RR, YR, LR, LW, LF逐级稀释配置成1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL系列浓度的混合标样, 在1.0~50.0 ng/mL内线性良好, 当信噪比(S/N)为3时, 方法检出限分别为0.2, 0.3, 0.3, 0.4, 0.4 μg/kg。以3倍信噪比、10倍信噪比分别计算检出限和定量限, 结果见表2, 相关系数均大于0.99, 显示了良好的相关性。MC- RR, YR, LR, LW, LF的检出限分别为0.7, 1.0, 0.8, 1.2, 1.3。

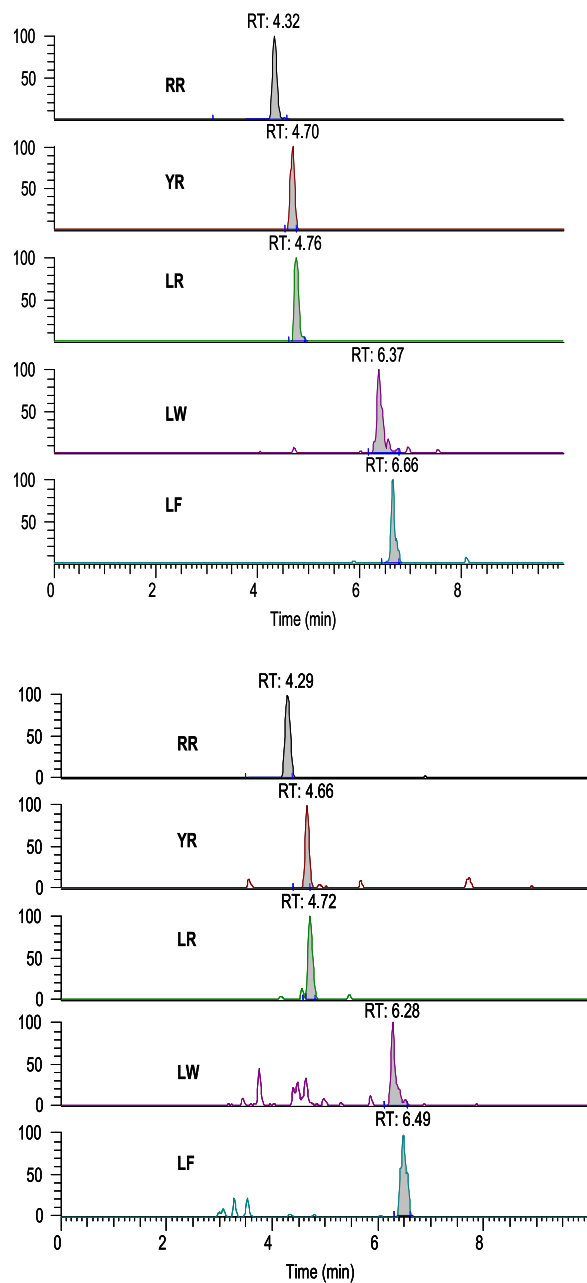


图1 5种MCs标准品及加标鱼样加标5μg/kg的LC/MS/MS谱图

3.2 方法的精密度和回收率

在空白样品中分别添加不同含量水平的MCs标准液, 按样品预处理方法处理, 每个添加水平平行测定6次, LC-MS/MS检测, 结果见表3。MC- RR, YR, LR, LW, LF的回收率均大于85%, 相对标准偏差范围为6.0%-10.1%。

表2 回收率及精密度 (n=6)

化合物 Compounds	添加水平 spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
RR	2.0	97.3	4.0
	5.0	95.4	3.2
	10.0	93.7	2.1
YR	2.0	92.6	4.1
	5.0	101.3	3.4
	10.0	85.3	1.3
LR	2.0	95.5	2.9
	5.0	93.1	2.1
	10.0	92.1	1.1
LW	2.0	91.6	3.9
	5.0	95.2	2.4
	10.0	94.7	2.0
LF	2.0	85.2	4.1
	5.0	97.6	2.8
	10.0	95.1	2.2

3.3 实际样品分析

鲫鱼样前处理和分析参照2.2和2.3, 鱼样中均未检测出 MC-RR, YR, LR, LW, LF。

参考文献

- [1]Ming Dai, Ping Xie, Gaodao Liang. 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: 43-50
- [2]聂晶晶, 李元, 李琴. 微囊藻毒素检测方法的研究进展 [J]. 中国环境检测. 2007, 23(2): 43-48
- [3]Humberto Vieira Frias, Maria Anita Mendes, Karina Helena Morais Cardozo. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006, 344: 741-746

- [4]郑明岚. 微囊藻毒素无害化处理的研究进展 [J]. 卫生研究. 2007, 36(1):114-116
- [5]赵建伟, 黄廷林. 高效液相色谱法测定饮用水中的微囊藻毒素RR和LR [J]. 中国环境检测. 2006, 22(3):12-14
- [6]WHO. Guidelines for drinking - water quality [M]. 3ed. Geneva :World Health Organization , 2004 :407 - 408
- [7]Wei Xu, Qi Chen, Ting Zhang. 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: 28–36
- [8]Jing Wang, Xiaolu Pang. An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China [J]. Toxicon. 2007, 49 :1120–1128
- [9] Liming Cong, Baifen Huang, Qi Chen. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta. 2006, 569: 157-168

In addition to these offices, Thermo Fisher Scientific maintains a network of representative organizations throughout the world.

赛默飞世尔科技

上海
上海浦东新金桥路27号6号楼
电话: 86-21-6865 4588
传真: 86-21-6445 7830

北京
北京市东城区安定门东大街28号
雍和大厦西楼702-715室
电话: 86-10-8419 3588
传真: 86-10-8419 3589

广州
广州东风中路410-412号
健力宝大厦3003-3004室
电话: 86-20-8348 7138
传真: 86-20-8348 6621

服务热线:
800 810 5118 400 650 5118

www.thermo.com
analyze.cn@thermoFisher.com

ISO REGISTERED
9001
COMPANY

Thermo Fisher Scientific,
San Jose, CA USA is ISO Certified.

CM0038 01/10