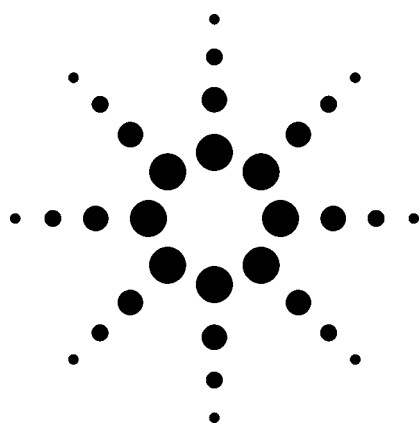




用 LC/MS 系统以分析模式和半制备模式鉴定和分离 DSP-毒素应用

食品安全

作者

Norbert Helle
TeLA GmbH
Bremerhaven, Germany

Sebastian Lippemeier
BlueBioTech Microalgen Biotechnologie
Ellerbek, Germany

Jürgen Wendt
Agilent Technologies Sales and Support GmbH
Waldbronn, Germany

摘要

本文介绍了鉴定和分离 DSP-毒素的液相色谱/质谱 (LC/MS) 联用系统的配置与操作方法。在分析模式中, 与 LC 荧光检测方法相比, LC/MS 联用系统监测岗田酸 (OA) 和鳍藻毒素-1 (DTX-1) 的选择性和灵敏度更好。采用更简单的样品处理步骤, 根据基质不同, 检测限可以降低 3 到 5 倍。在半制备模式中, 用基于质量的馏分收集器, 从利玛原甲藻类植物的粗提取液中分离出了 OA 和 DTX-1, 纯度 >98%。由于有了该方法, 现在可以购买到 DSP 毒素的参考标准品。

前言

蛤贝中毒 (DSP) 是人食用了双壳类软体动物如扇贝、蛤贝、蚌、牡蛎后而导致的肠胃综合症。其症状包括

腹部疼痛、呕吐、恶心、头疼、腹泻、感冒、发烧。DSP 毒素可以划分成三类: 岗田酸 (OA) 类, 包括岗田酸和鳍藻毒素 (DTX), 海扇毒素类 (PTX) 和扇贝毒素类 (YTX)。

在 OA 类中, OA 和 DTX-1 是导致 DSP 发生的主要毒素。这种病的爆发促使很多国家建立了海产品生物毒素的控制计划。在德国, 蚌类中 DSP 毒素的残留量目前被控制在 2000 年 6 月的第八次 Fischhygiene-Verordnung 会议所规定的允许量之下。这个规定要求通过动物检测 (老鼠活体鉴定) 或化学分析程序检测甲壳类动物中的毒素。液相色谱-荧光检测器联用是一种已建立的方法, 但它要求对本身无荧光特性的 DSP 毒素进行荧光衍生化。使用 LC/MS 电喷雾离子化 (ESI) 可以在更简单的样品制备条件下得到更灵敏、更有选择性的结果。

与监测 DSP 毒素的分析方法相关的最大问题是纯的参考标样要易得。DSP 毒素 OA 和 DTX-1 可以用基于质量的馏分收集的半制备模式从利玛原甲藻类植物的粗提取液中分离得到。本文介绍了 LC/MS 联用系统以分析模式和半制备模式进行分析的配置、设置及操作方法。



Agilent Technologies

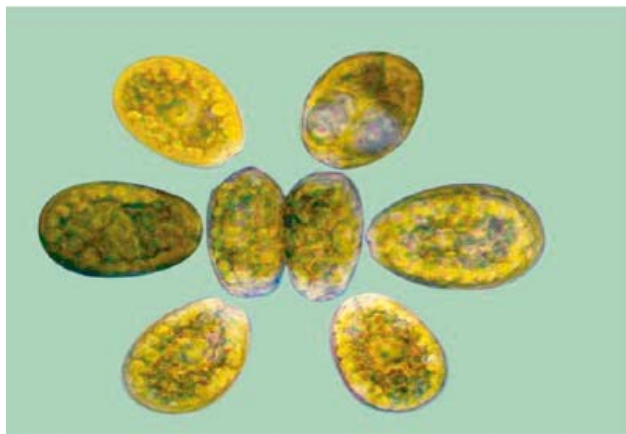
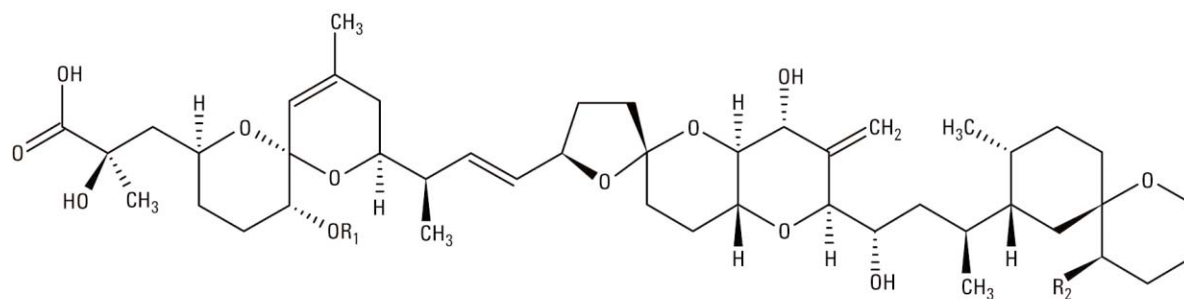


图 1. 显微镜下的利玛原甲藻类植物

实验

图 2 是本文工作中分析的 DSP 毒素的结构。分析以两种模式进行：分析模式和半制备模式。



OA: $R_1 = H, R_2 = H$ $C_{44}H_{68}O_{13}$
 DTX-1: $R_1 = H, R_2 = CH_3$ $C_{45}H_{70}O_{13}$

物理化学性质：多醚结构，亲脂性羧酸，无发色团

图 2. DSP 毒素

LC/MS 方法具体条件－分析模式

LC 条件

仪器：Agilent 1100 HPLC (四元泵)
 色谱柱：150 × 3.0 mm ZORBAX SB-C18, 5 μm
 流动相：A 水 (含 0.1% 甲酸)
 B 甲醇
 梯度：0 min 20% B
 5 min 20% B
 20 min 80% B
 停止时间：28 min
 运行后时间：4 min
 流速：0.6 mL/min
 进样量：10 μL

质谱条件

仪器：Agilent LC/MSD
 离子源：ESI 正离子化/负离子化模式切换
 干燥气流速：12 L/min
 雾化器：60 psig
 干燥气温度：350 °C
 V_{cap}：3000 V (正电压和负电压)

LC/MS 方法具体条件—半制备

LC 条件

仪器 1:	Agilent 1100 HPLC (四元泵)
色谱柱:	50 × 9.4 mm ZORBAX SB-C18, 5 μm
流动相:	A 水 (含 0.1% 甲酸) B 甲醇
梯度:	0 min 20% B 5 min 20% B 20 min 80% B
停止时间:	28 min
运行后时间:	4 min
流速:	7.0 mL/min
进样量:	100 μL (250 μL 使用多次抽取模式)
仪器 2:	Agilent 1100 HPLC (等度泵) 补充流量
流速:	0.8 mL/min (50% H ₂ O + 50% MeOH + 0.1% 甲酸)
分流器:	分流比 271:1

质谱条件

仪器:	Agilent LC/MSD
离子源:	负离子化模式电喷雾离子源
干燥气流速:	12 L/min
雾化器:	60 psig
干燥气温度:	350 °C
V _{cap} :	3000 V (正电压)

MSD 馏分收集设置

FC 模式:	方法所用目标离子; 加合离子: (M-H) ⁻
--------	------------------------------------

结果与讨论

分析工作

在 LC/MS 系统分析模式 (图 3) 中, 使用了 ESI 正/负离子化模式切换监测了 DSP 毒素。正离子化模式比负离子化模式的灵敏度好四倍多 (图 4)。从 OA 和 DTX-1 的质谱图可以得到加钠后的分子离子而不是质子化的分子离子, 特征的碎裂离子是 $[M+H - nH_2O]^+$, $n = 1-4$, 它们是由连续地失去水分子而形成的。负离子模式中, 只有 $[M-H]^-$ 被检测到。LC/MS 提供了一个比 LC 荧光检测方法的灵敏度、选择性优于 3-5 倍的方法来监测 DSP 毒素 (图 5)。

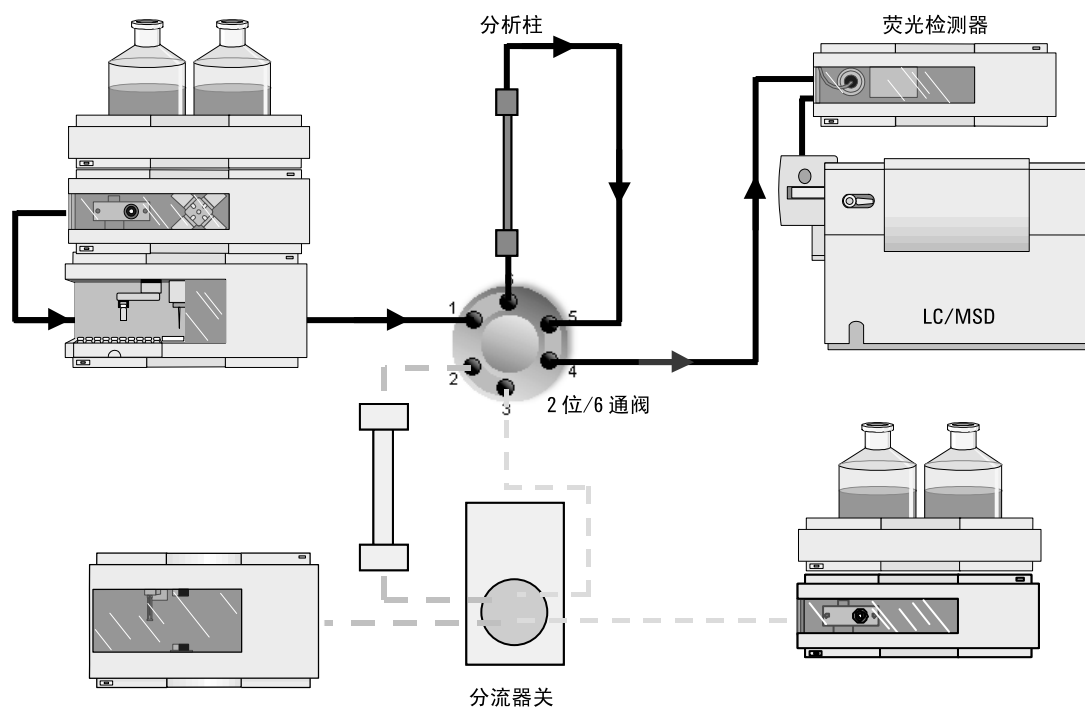


图 3. 系统图示 (分析工作)

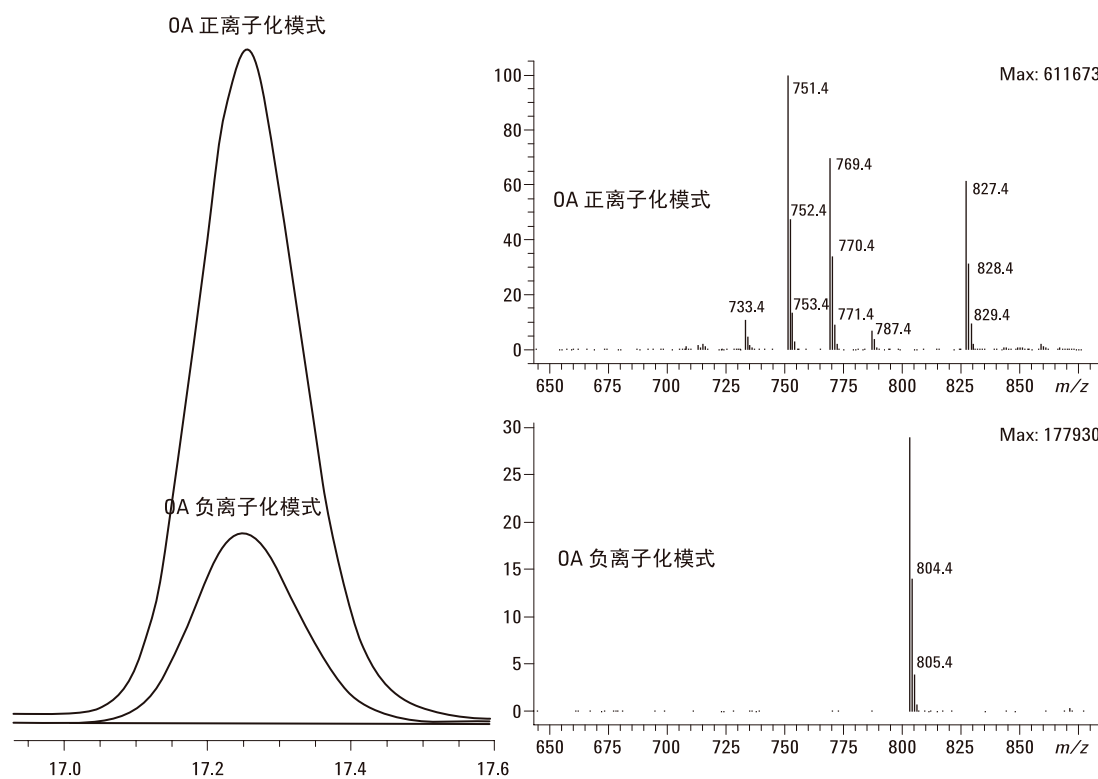


图 4. LC/MS 分析 OA

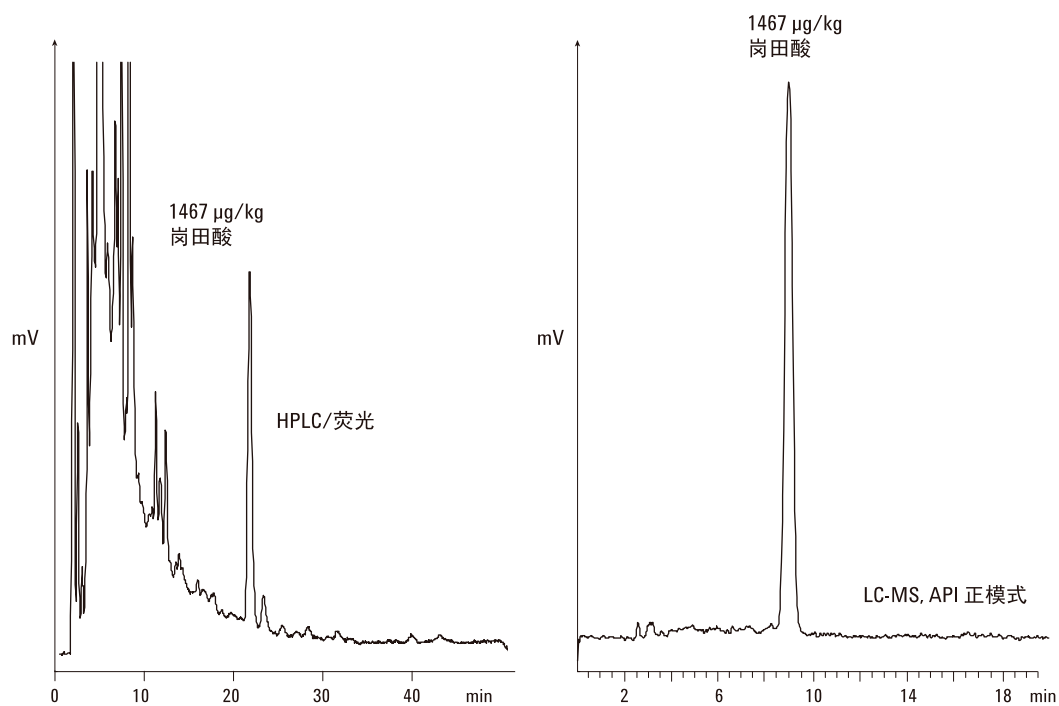


图 5. 甲壳类动物中 DSP 毒素的对比分析

半制备工作

通过把系统切换到半制备模式可以得到参考标样（图 6）。把阀转到位置 2，使主液流通过半制备柱，然后

经过分流流到馏分收集器（AS）。补充流量流过分流器，将从主流中分流得到的部分化合物带向质谱检测器（MSD）。

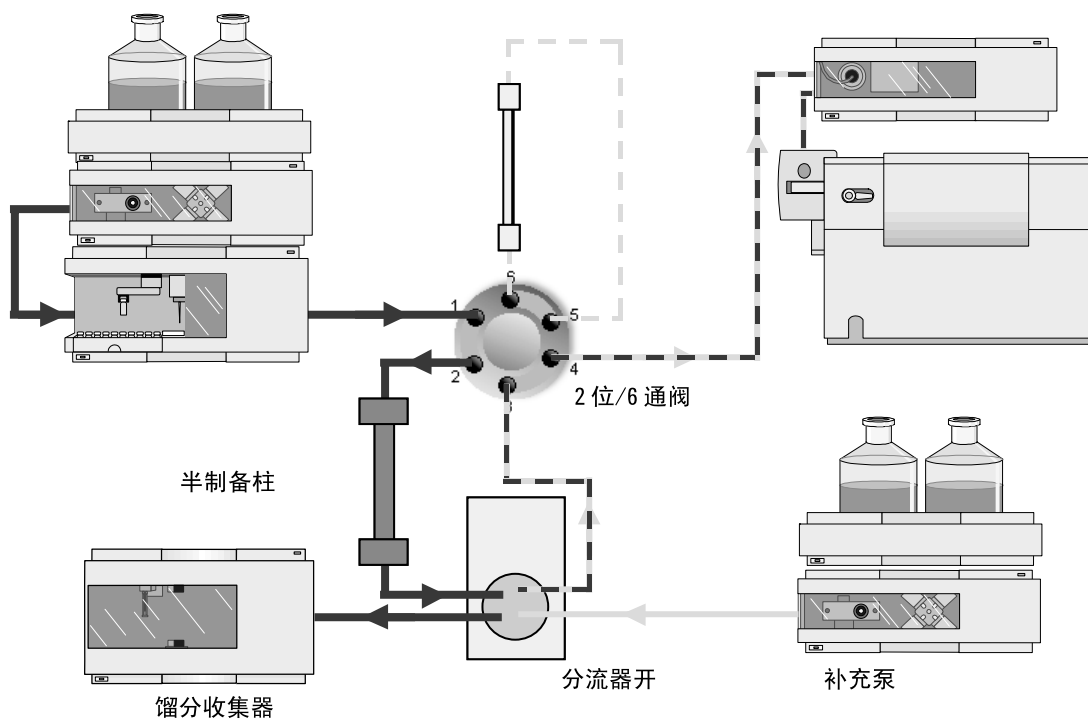


图 6. 系统图示（半制备工作）

除了 OA 和 DTX-1，用基于质量的馏分收集器从利玛原甲藻类植物的粗提取液中分离得到了一种有类似质谱特性的新的 OA 毒素（图 7）。用基于质量的馏分收集器从利玛原甲藻类植物的甲醇提取液中得到了三种组分：OA，DTX-1 和一种未知毒素。从 MSⁿ 实验中可以判定未知毒素的分子结构与 OA 和 DTX-1 非常相似。

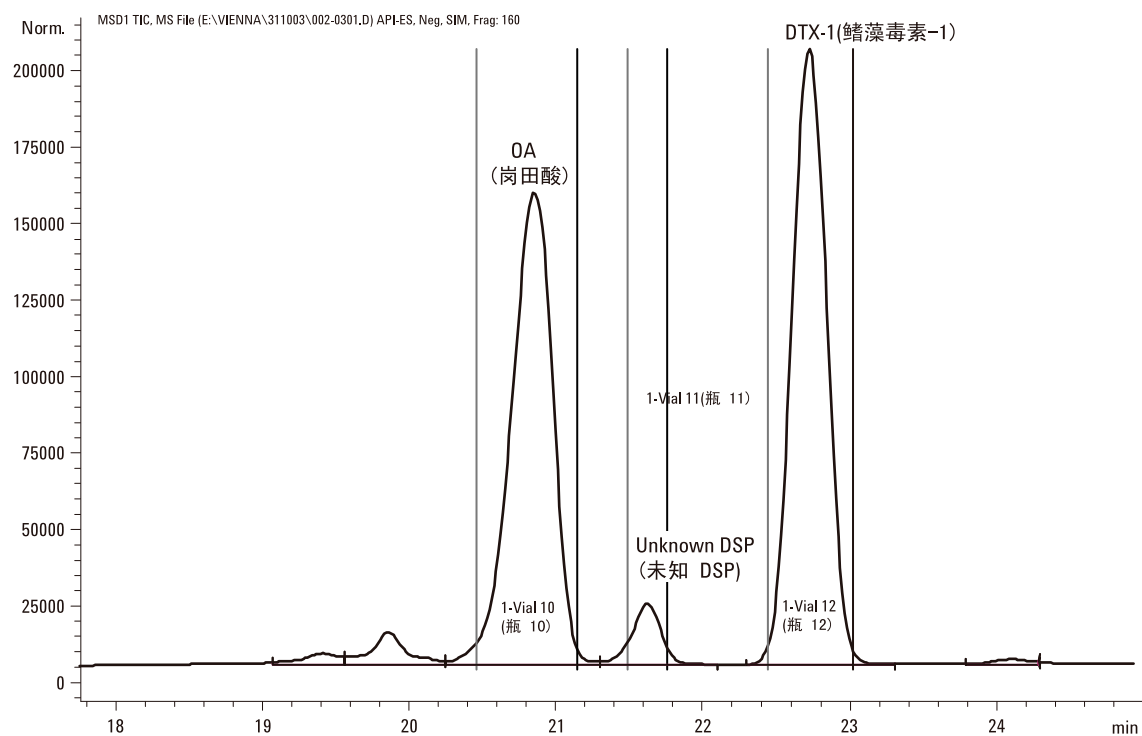


图 7. DSP 毒素的质量成分收集图

由于目标化合物的浓度低，必须多次运行同一样品，这个过程通常叫做 pooling（图 8）。重新分析收集的馏分能得到纯度 >98% 的化合物。这个方法高效，并且现在由这种方法制备的 DSP 毒素的标准品已经商品化。

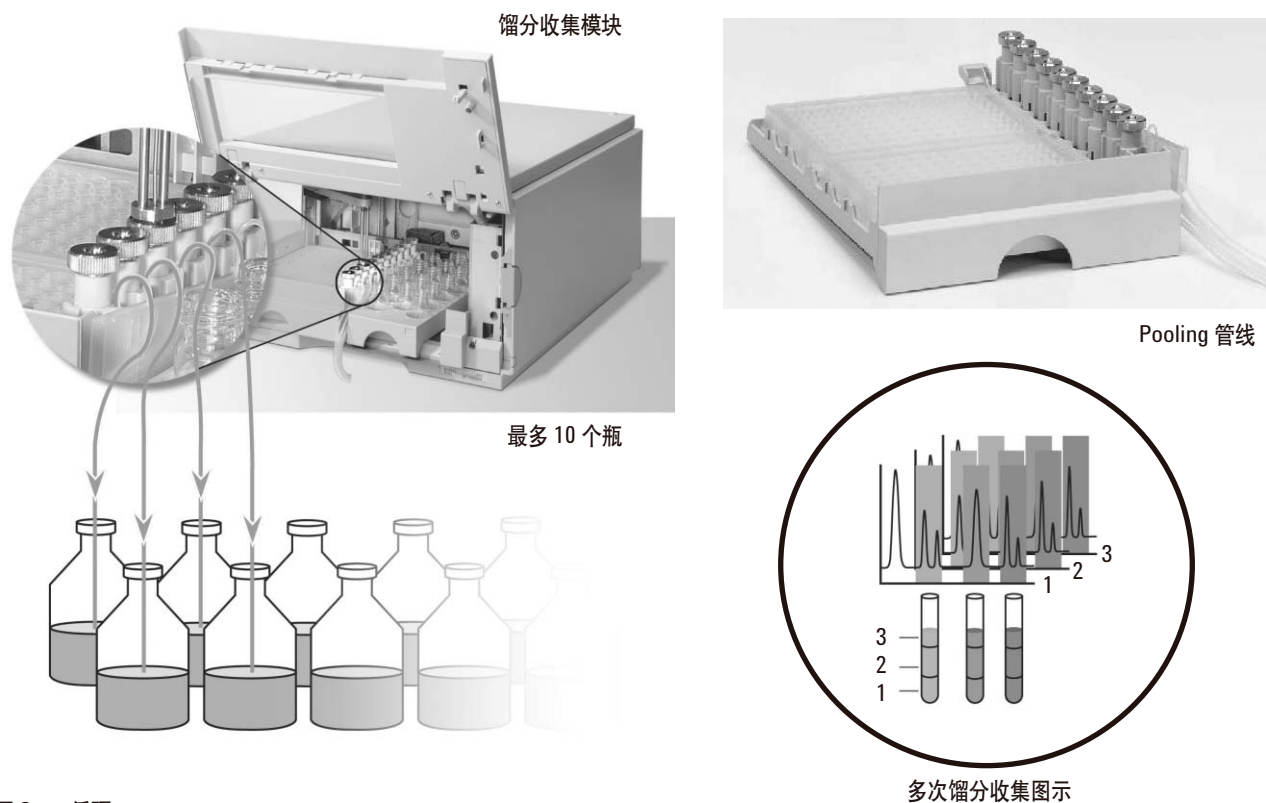


图 8. 循环

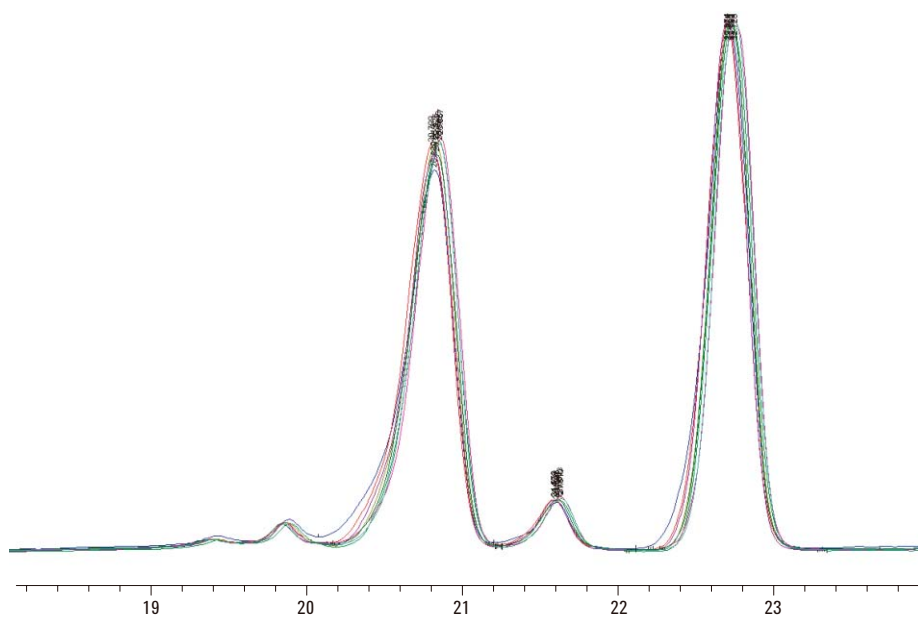


图 9. 方法的高度重现性—10 次基于质量的馏分收集图的叠加

总结

本文介绍了鉴别和分离 DSP 毒素的 LC/MS 联用系统的配置及操作。在分析模式中，对于监测 OA 和 DTX-1，LC/MS 联用方法比 LC 荧光检测方法更灵敏，更有选择性。由于所需的样品制备步骤较简单，根据基质不同，检测限可以降低三到五倍。在半制备模式中，用基于质量的馏分收集方法从利玛原甲藻类植物的粗提取液中分离 OA 和 DTX-1，纯度 >98%。正是基于这个方法，DSP 毒素的标准品目前已经商品化。

参考文献

1. M.A. Quilliam, A. Gago-Martinez, and J.A. Rodriguez-Vasquez, "Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxycarboxylic acids - Application to diarrhetic shellfish poisoning toxins", (1988), *Journal of Chromatography A*, **807**, 229–239.
2. A.G. Bauder; A.D. Cembella, V.M. Bricelj, and M.A. Quilliam, "Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*", (2001), *Marine Ecol. Progr. Ser.*, **213**, 39–52.

如需了解更多信息

有关本文的更多信息，请联系
Juergen_Wendt @Agilent.com。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2004

中国印刷
2005 年 5 月 24
5989-2912CHCN



Agilent Technologies