

UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 非定向筛查贝类中氮杂螺环酸毒素及其代谢产物*

吴海燕¹ 陈佳琦¹ 董晨帆^{1,2} 王松³ 崔海栋³ 谭志军¹

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 3. 青岛卫辽医用生物材料有限公司 青岛 266071)

摘要 为了分析复杂贝类和微藻中的氮杂螺环酸毒素(AZAs)及其代谢产物,建立一种基于超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS)联用技术的非定向筛查分析方法。采用 Full MS/dd MS²、PRM 和 Target-SIM/dd MS² 三种质谱鉴定模式,整合多种数据采集挖掘策略,通过研究多种 AZAs 在不同基质样品中的质谱裂解规律及特征碎片离子丰度,实现 AZAs 及其衍生物的快速筛查检测和精准鉴别。结果表明:PRM 模式能有效排除 AZAs 同分异构体的干扰,获得更高的专属性,适用于目标代谢物筛查;应用 Full MS/dd MS² 和 PRM 结合的方式,根据 AZAs 裂解途径及多种 AZAs 代谢产物裂解规律,在贝类中共鉴别出 20 种 AZAs 系列化合物,其中包括初步推测了 3 种新型 AZAs 代谢产物的结构。应用本方法还发现 AZA9、AZA10、AZA19 等代谢物均随代谢过程持续升高,是 AZA2 在贝类代谢过程中的末端产物。该方法能够为复杂基质中的 AZAs 系列毒素及其衍生常规检测与精准鉴别提供参考,可应用于解析 AZAs 毒素在贝类体内的代谢转化机制研究。

关键词 氮杂螺环酸毒素; 贝类; 高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱; 代谢

中图分类号 O656.22 doi: 10.11693/hyhz20200300057

氮杂螺环酸毒素(azaspiracids, AZAs)是一类具有独特聚醚类螺环结构(图 1)的脂溶性贝类毒素,具有毒性强、残留高且代谢慢等显著特点,因此成为国际研究热点和管控重点(EFSA, 2008; Furey *et al*, 2010; Hess *et al*, 2016; Pelin *et al*, 2018)。AZAs 主要由环胺藻(*Azadinium* spp.)产生,通过食物链传递到海洋贝类中,并经贝类的生物转化作用产生多种代谢产物,从而对消费者带来食用安全风险(Hess *et al*, 2016)。一般来说,环胺藻产生的 AZAs 组分主要为 AZA1、AZA2 和 AZA3 中的一种或两种(Rossi *et al*, 2017; Krock *et al*, 2019),也是毒性最强的三种组分(Pelin *et al*, 2018)。最新研究确定产毒藻原生 AZA 多达 26 种(Tillmann *et*

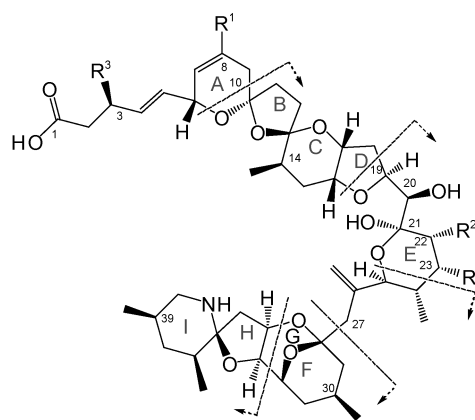


图 1 Azaspiracids 毒素的化学结构
Fig.1 The chemical structure of azaspiracids

* 国家重点研发计划资助, 2017YFF0211103 号; 国家自然科学基金, 41806138 号。吴海燕, 助理研究员, E-mail: wuhy@ysfri.ac.cn

通信作者: 谭志军, 博士生导师, 研究员, E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-03-06, 收修改稿日期: 2020-04-23

al, 2017; Krock *et al*, 2019), 且经过贝类代谢 (Jauffrais *et al*, 2013; Ji *et al*, 2018) 后可形成超过 50 余种代谢产物 (Miles *et al*, 2018), 而且部分代谢产物如 AZA17 和 AZA19 的毒性较高 (Krock *et al*, 2015)。贝类中 AZAs 的组成及其毒性强度总和决定了产品食用安全性, 因此采用高通量 AZA 及其代谢产物筛查方法进行检测与安全性评估尤为重要。

AZAs 的检测方法包括液相色谱法、液相色谱串联质谱法、酶联免疫检测方法 (Samdal *et al*, 2015; Leonardo *et al*, 2017) 等。由于毒素标准品的匮乏, 仅能分析鉴别 AZA1—3 三种组分, 而多达 40 余种的代谢产物尚缺少标准物质 (吴海燕等, 2016)。同时, 贝类制品的基质较为复杂, 目前仅通过前处理过程增加如 QuEChERS 技术 (韩深等, 2013)、固相萃取柱等净化方法, 虽可显著降低贝类基质干扰, 但在代谢物非定向筛查和鉴定中, 仍存在不同程度的基质干扰效应, 给定性鉴别带来一定困难。近年来, 线性离子阱、静电场轨道阱以及飞行时间高分辨质谱 (韩深等, 2014) 在多毒素筛查、代谢产物的发掘和结构鉴定等方面均有广泛应用。其中, Rehmann 等 (2008) 使用超高效液相色谱串联质谱法确定了 AZA12-32 的结构; 基于高分辨串联质谱与核磁共振的鉴别技术也同时应用于新型毒素 37-*epi*-1 鉴定 (Rehmann *et al*, 2008; Kilcoyne *et al*, 2014)、AZA7—9 (Kilcoyne *et al*, 2015)、AZA26、AZA33、AZA34 和 AZA37 (Kilcoyne *et al*, 2018) 等新型 AZAs 代谢产物结构鉴定。但目前的检测方法较为单一, 主要是限量 3 种毒素定量方法和单一化合物结构鉴定方法, 缺乏系统的非定向筛查与确证方法。

本研究利用固相萃取净化前处理, 结合超高效液相色谱 - 线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱整合全扫描二级质谱模式 Full MS/dd MS²、目标离子扫描二级质谱模式 Target-SIM/dd MS²、平行反应监测模式 PRM 模式等多种数据采集、挖掘策略快速分析方法, 分析贝类样品中的 AZAs 及其代谢产物, 解析质谱裂解规律及特征碎片离子组成, 为研究贝类中 AZAs 的代谢机制提供了快速、直观和准确的参考方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇、乙腈 (HPLC 级, 美国 Merck 公司); 乙酸铵 (HPLC 级, 美国 Sigma Aldrich 公司); 超纯水

(18.2 MΩ·cm); Strata-X 固相萃取柱 (200 mg/6 mL, 美国 Waters 公司), 其他未作特殊说明的试剂均为分析纯。AZA1 [CRM-AZA1, (1.24±0.07) g/mL], AZA2 [CRM-AZA2, (1.28±0.05) g/mL], AZA3 [CRM-AZA3, (1.04±0.04) g/mL] 以及 AZA 阳性基质样品, 其各组分含量分别为 AZA1 (1.16 μg/g), AZA2 (0.273 μg/g) 和 AZA3 (0.211 μg/g), 购自加拿大国家研究理事会海洋生物科学研究所。

腹孔环胺藻 (*Azadinium poporum*) 为我国海域分布的 AZA 产毒藻 (Krock *et al*, 2014), 具有独特的 AZA 组成 (Krock *et al*, 2019), 由国家海洋局第三海洋研究所提供。实验室以 f/2 培养液单种培养, 温度 (20±1) °C, 光照 6000 lx, 光暗比 12 h : 12 h。经检测该藻主要产生 AZA2, 单细胞产毒能力一般为 (7.05±0.52) fg/cell。

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 产自青岛市胶南灵山湾养殖海域的 2 龄贝 (67 mm±8 mm) 进行腹孔环胺藻 (AZA2 产毒藻) 暴露试验 (吴海燕等, 2017), 分别取 3、7 和 22 d 内脏团样品, 均质后冷藏于 -18 °C, 作为 AZA 代谢实验样本。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱 - 线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱联用仪 (UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS): 美国赛默飞世尔公司产品, 配有加热喷雾离子源 (HESI)、Xcalibur 2.1 化学工作站以及 Compound discovery 2.1 数据比对分析软件; Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱系统: 美国赛默飞世尔公司产品, 配有变色龙色谱工作站。Himac CR 22G 高速离心机 (日本 Hitachi 公司); N-EVAP 112 氮吹仪 (美国 Organomation 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 57250-U 固相萃取装置 (美国 Supelco 公司)。

1.3 仪器检测方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Kinetex XB-C18 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 柱温: 40 °C; 流速: 0.30 mL/min; 进样量: 5 μL; 流动相: A 为 0.15% (v/v) 甲酸水溶液, B 为乙腈; 洗脱梯度: 0—7.0 min, 20%—90% B; 90% B 持续 3 min; 10.0—10.1 min, 90%—20% B; 20% B 持续 1 min。

1.3.2 质谱条件 加热电喷雾离子源 (HESI), 正离子模式; 喷雾电压: 3.5 kV; 毛细管温度 320 °C; 加热器温度: 50 °C; 鞘气: 40 arb; 辅助气: 5 arb;

扫描模式: Full MS/dd MS² 与 Target-SIM/dd MS²; 采集范围 *m/z* 250—1500; 一级全扫描 (Full MS) 分辨

率为 70000FWHM, C-trap 最大容量(AGC target): 5×10^5 , Maximum IT 时间: 100ms; 数据依赖二级离子扫描(dd-MS²)分辨率为 17500FWHM, C-trap 最大容量(AGC target): 1×10^5 , C-trap 最大注入时间: 50ms。碰撞能量 CE 为 30、50、70。

平行反应监测模式 PRM 模式: 采集范围 m/z 250—1500; C-trap 最大容量(AGC target): 2×10^5 , Maximum IT 时间: 100ms; 碰撞能量 CE 为 30、50、70。

1.4 样品制备方法

称取(2.00±0.02)g 样品, 分别用 3 mL 甲醇提取 3 次, 离心后合并上清液, 于 40°C 氮吹至约 1mL, 加入 3mL 超纯水待净化。依次用 1mL 甲醇、1mL 30% (v/v) 甲醇水溶液活化 Strata-X 固相萃取柱, 然后加入提取液, 再用 1mL 20% (v/v) 甲醇水溶液淋洗, 最后用 1mL 0.3% (v/v) 氨水甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 用甲醇定容至 1mL 过 0.22μm 滤膜, 上机分析。

1.5 数据采集与处理

本研究运用 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术整合多种数据采集、挖掘策略, 对复杂贝类基质中 AZAs 及其代谢产物筛查与鉴别。首先, 比较全扫描二级质谱模式 Full MS/dd MS²、目标离子扫描二级质谱模式 Target-SIM/dd MS²、平行反应监测模式 PRM 模式采集方法, 确定标准品与基质样品中的裂解规律和特征碎片; 应用 Full MS/dd MS² 筛查与 PRM 目标鉴定, 结合精确分子质量和文献信息, 共鉴别出 20 种具有 AZAs 母核结构的化合物; 选择不同质量段碎片离子, 通过 PRM 的离子扫描模式, 设置最大分子质量误差为 5×10^{-6} , C、H、O 和 N 原子数目的范围分别为 20—50、40—80、5—15 和 1, 实现了未知代谢产物筛查的功能, 通过高能碰撞(HCD)采集方法, 对疑似 AZAs 代谢产物进行精细区分和结构鉴定。对确证后的 AZA 代谢物采用半定量方法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 标准品与基质样品中 AZAs 的质谱裂解规律

在 LTQ-Orbitrap MS HESI 源电离正离子检测模式下(分辨率 70000), AZA1、AZA2 和 AZA3 的准分子离子峰为 $[M+H]^+$ 。典型的 AZAs 的二级碎片离子特征碎片主要包括: $[M+H]^+$ 、 $[M+H-nH_2O]^+$ 、 $[M+H-H_2O-C_9H_{10}O_2R_1R_3]^+$, 特征离子包括 m/z 672.4106 (AZA-3 m/z 658.3954)、 m/z 462.3214 (AZA-3 m/z 448.3050) 和 m/z 362.2690 等(图 3)。AZAs 分子电离产生的最小结

构离子碎片为发生 RDA (Retro-Diels-Alder)反应的 A 环断裂。除此以外, 其结构中不同碎片均产生脱 H₂O, 在高能诱导裂解 HCD 下, 多采用分子离子的脱水峰 (18u)作为特征离子, 也可作为定性的判定依据。在 HCD 裂解下, MS² 图谱中产生了 A、D、E、G 环等碎片离子。其中 m/z 362.2707 的特征碎片结构式为 $C_{22}H_{36}NO_3^+$ (Δ -1.03×10⁻⁶)是目前已鉴定结构 AZA 化合物特有碎片离子(除 AZA36 和 AZA39 外)。

由于贝类的基质效应造成的干扰, 使在实际检测过程中造成假阳性现象。研究应用多种数据采集、挖掘策略, 包括 Full MS/dd MS²、PRM 和 Target-SIM/dd MS² 三种鉴定模式, 比较了基质溶液中 AZAs 的质谱裂解规律。其中 Full MS/dd MS² 能获得部分主要裂解碎片, 但特异性差。通过建立已知结构的 AZAs 化合物 Inclusion 条件, 采用 PRM 和 Target-SIM/dd MS² 检测模式, 在四级杆过滤掉大量干扰离子提高了灵敏度的同时, 显著提高二级高分辨质谱选择性, 灵敏度更佳。比较而言, PRM 所获得离子碎片信息更为丰富, 且响应提高 1 个数量级, 贝类基质干扰得到有效排除。因此, 采用目标筛查 PRM AZA 基质标准物质在不同扫描模式下 AZA2 的特征碎片(图 2)。

2.2 AZAs 代谢产物的快速筛查和鉴别

通过甲醇提取, 固相萃取柱净化前处理过程, 针对强残留能力的脂溶性 AZAs 代谢物进行分离提取。运用 LTQ-Orbitrap MS 仪 PRM 数据采集方法, 比较代谢物的精确分子质量、保留时间以及 AZAs 二级碎片离子碎裂规律与特征碎片对代谢样品进行快速筛查和鉴定。共鉴别出了 20 种 AZAs 代谢产物, 结果见表 1 (化合物 1—20)。AZAs 代谢产物类型包括分子结构中的 C3 和 C23 的羟基化, C8 和 C22 甲基化及羧基化代谢产物(Rehmann *et al*, 2008)。结合色谱保留行为和文献报道发现, 经过贝类的代谢作用, 与母体化合物(AZA2)相比, 多种代谢产物的极性增加(Krock *et al*, 2015), 在反相色谱柱上的保留时间提前, 从而在代谢过程中更易于排出体外。

在代谢产物样品中, 检测到目标 m/z 858.4998 通道, 保留时间分别为 5.51 和 6.18min 的两种成分, 其高分辨质谱中显示的精确分子离子峰分别为 m/z 858.5062 (Δ 0.62×10⁻⁶)和 m/z 858.5115 (Δ 1.36×10⁻⁶), 与理论分子量比对质量精度均小于 3×10^{-6} , 初步判定为同分异构体 AZA9 和 AZA10 (吴海燕等, 2018), 为 AZA2 在贝类基质的代谢中间过程的上游代谢产物。

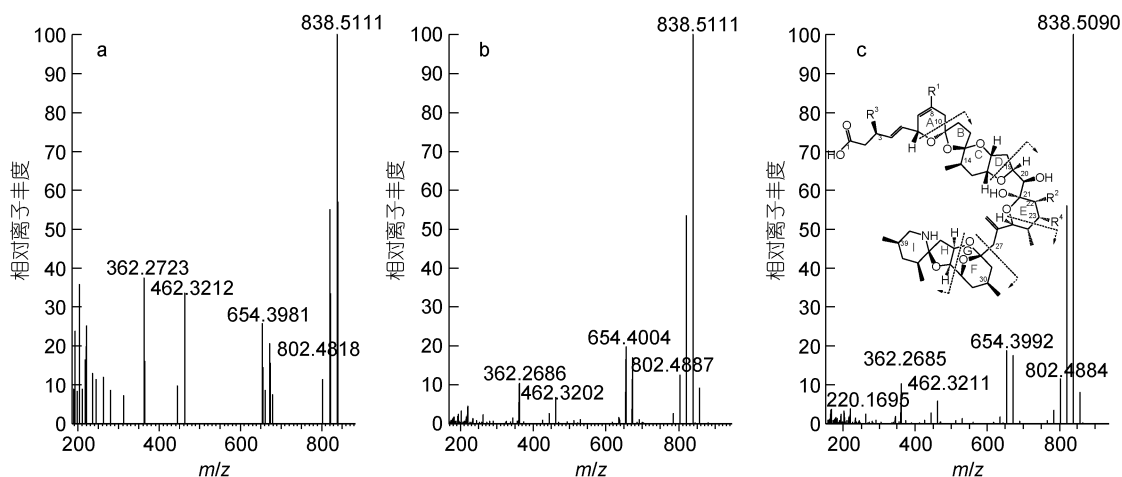


图 2 不同扫描模式下基质标准物质中 AZA2 质谱图

Fig.2 Mass spectrometry of AZA2 in matrix reference materials by different scanning modes

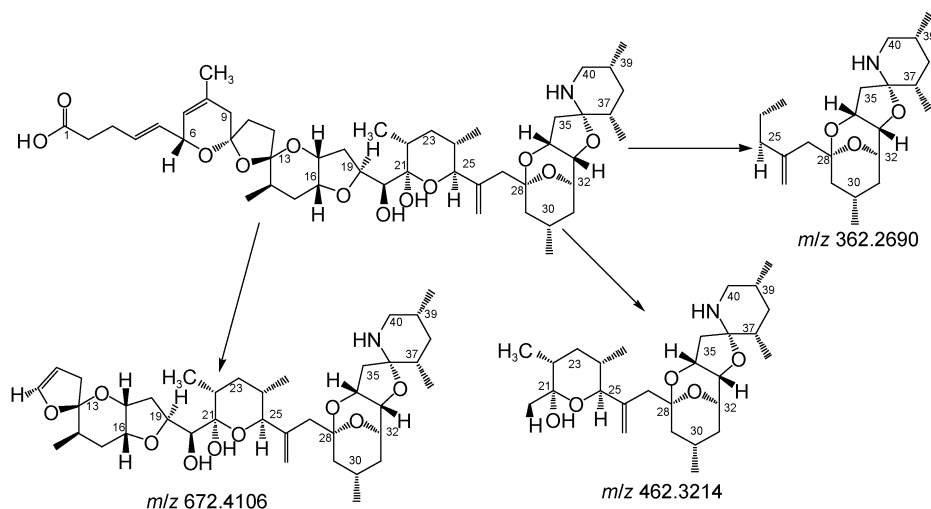
注: a: Full MS/dd MS² 模式; b: Target-SIM/dd MS² 模式; c: PRM 模式

图 3 PRM 模式下 AZA2 质谱裂解途径

Fig.3 Fragmentation pathways of AZA2 in PRM mode

其中, AZA9(RT 5.51min)在 R_1 位发生羟基化反应(图 4), 而 AZA10 在 R_4 位发生羟基化反应, 因此其 $[M+H-H_2O-C_9H_{10}O_2R_1R_3]^+$ 碎片不同, 分别为 m/z 658.3991 和 m/z 674.4143, 差值为一个 O(16u)原子。该碎裂模式与 AZA9 和 AZA10 结构匹配。

已知 AZA19 为 AZA2 R3 位发生羧基化产物, 其分子离子丰度为 m/z 886.4965 ($\Delta 1.95 \times 10^{-6}$), 其 A 环断裂碎片为 658.3951 ($\Delta 0.26 \times 10^{-6}$); AZA19 的 R2 位发生去羧基化反应后的 AZA17, 其 A 环断裂碎片为 670.3940 ($\Delta -1.45 \times 10^{-6}$)(图 5)。通过上述裂解规律分析 860.4791 通道, 分别在 5.17 和 5.38min 有两个同分异构体化合物, 精确分子离子峰分别为 m/z 858.5062

($\Delta 0.62 \times 10^{-6}$)和 m/z 858.5115 ($\Delta 1.36 \times 10^{-6}$), 其碎片 2 的 m/z 分别为 $C_{44}H_{54}O_4N$ 660.3935 ($\Delta -1.82 \times 10^{-6}$)和 $C_{45}H_{46}O_5$ 672.4135 ($\Delta -2.61 \times 10^{-6}$)丢失 C(12u)碎片, 判定该化合物为 AZA13 同分异构体, 为 R1 位发生羧基化反应。

m/z 716.4727 通道中, 保留时间为 6.34min 的化学成分, 其结构中有丰富的去 H_2O (18u)碎片, 且 m/z 362.2689 碎片与 AZAs 的 $C_{22}H_{36}NO_3^+$ ($\Delta -0.18 \times 10^{-6}$), m/z 462.3224 碎片与 AZAs 的 $C_{27}H_{44}NO_5^+$ ($\Delta 2.10 \times 10^{-6}$)符合 AZA 的基本的碎裂模式, 将该化合物鉴别为 AZA33, 其多级质谱图及裂解规律示于图 6。

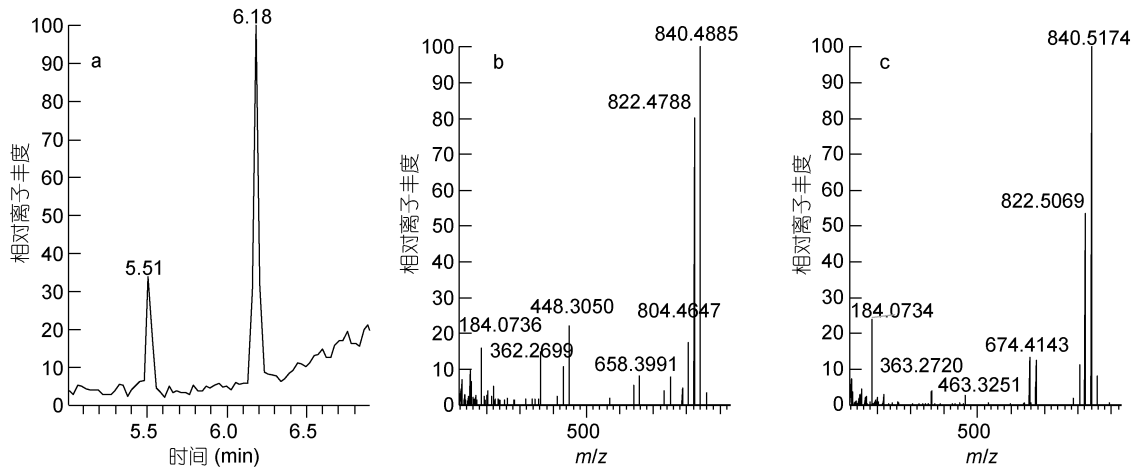


图 4 m/z 858.4998 提取离子流图和二级质谱图

Fig. 4 Extracted ion chromatogram and MS/MS spectra of m/z 858.4998

注: a: 提取离子流图; b: RT 5.51 化合物二级质谱图; c: RT 6.18 化合物二级质谱图

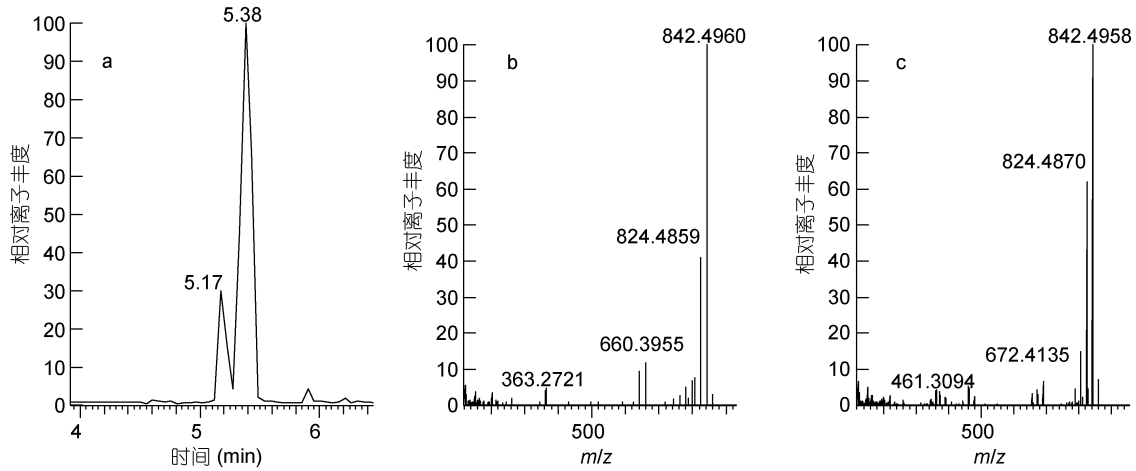


图 5 m/z 860.4791 提取离子流图和二级质谱图

Fig. 5 Extracted ion chromatogram and MS/MS spectra of m/z 860.4791

注: a: 提取离子流图; b: RT 5.17 化合物二级质谱图; c: RT 5.38 化合物二级质谱图

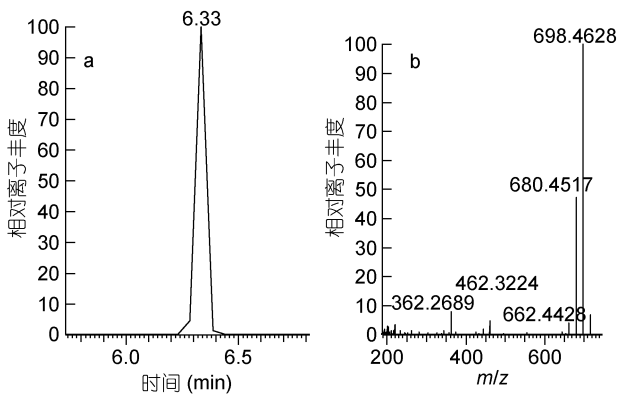


图 6 m/z 716.4727 提取离子流图和二级质谱图

Fig. 6 Extracted ion chromatogram and MS/MS spectra of m/z 716.4727

注: a: 提取离子流图; b: RT 6.33 化合物二级质谱图

2.3 代谢实验样品分析

应用 Full MS/dd MS² 和 PRM 结合的方式, 对 AZAs 代谢实验解毒器官——内脏团样品(O'Driscoll *et al.*, 2014)进行代谢产物筛查鉴定分析。共鉴别 11 种 AZA 代谢产物, 主要成分包括 AZA2、AZA6、AZA9、AZA10、AZA11、AZA12、AZA19、AZA23 以及 3 种新型 AZAs 成分。对 3 种新型 AZAs 成分查阅文献比对裂解方式, m/z 844.4842 初步鉴定为 AZA4 和 AZA5 的同分异构体, 888.4740 为 AZA21 的同分异构体。通过该检测方法获得检测结果与液相色谱-四极杆/线性离子阱复合质谱(吴海燕等, 2016)比较, 灵敏度更高, 定性更为精准。AZA12 和 AZA19

表 1 贝类基质中 AZA 代谢产物的质谱裂解信息及鉴定
Tab.1 Characterization of AZA metabolites in the shellfish

峰	保留时间 (min)	理论值 (<i>m/z</i>)	实测值 (<i>m/z</i>)	分子式	误差 / 10^{-6}	MS/MS 裂解碎片	鉴定
1	4.71	886.4947	886.4965	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄ N	1.95	824.4954, 702.3827, 658.3954, 516.3296, 392.2453	AZA19
2	6.34	716.4732	716.4724	C ₄₁ H ₆₆ O ₉ N	1.02	698.4632, 462.3223, 362.2685	AZA33
3	5.01	872.5155	872.5163	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₃ N	0.92	818.4786, 806.4824, 658.3945, 546.3477, 378.2639	AZA11
4	5.64	872.5155	872.5135	C ₄₈ H ₇₃ O ₁₄ N	-2.29	765.5430, 729.5336, 462.3128, 443.2963, 361.2560	AZA12
5	3.92	842.5049	842.4960	C ₄₇ H ₇₁ O ₁₂ N	-1.06	613.3621, 602.2907, 585.3664, 483.2120, 451.2728, 338.1908, 311.1248	AZA6
6	5.02	872.4791	872.5138	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₃ N	-1.92	824.4947, 818.4838, 810.2746, 806.4875, 658.3924, 598.6357, 478.3164, 378.2626	AZA17
7	4.21	902.4897	902.4889	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₅ N	-0.43	840.4916, 674.3911, 606.4189, 553.7598, 543.0434, 428.0240, 373.1351, 341.5772, 336.7645	AZA45
8	5.50	858.4998	858.5062	C ₄₇ H ₇₁ O ₁₃ N	0.62	751.5260, 733.5148, 570.3542, 362.2709, 316.3268	AZA9
9	6.18	858.4998	858.5115	C ₄₇ H ₇₁ O ₁₃ N	1.36	838.5074, 674.4147, 656.4048, 464.3278, 364.2744	AZA10
10	6.00	842.5049	842.5054	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₂ N	0.63	810.4794, 806.4847, 792.4653, 530.3488, 462.3207, 362.2687	AZA1
11	6.20	856.5206	856.5215	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₂ N	1.09	824.496, 820.5001, 806.4761, 672.4109, 640.3850, 636.3896, 462.3221, 362.2695	AZA2
12	5.69	828.4893	828.4892	C ₄₆ H ₇₀ O ₁₂ N	-0.07	658.3946, 516.3336, 448.3053, 362.2686, 262.1802	AZA3
13	5.12	844.4842	844.4858	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₂ N	1.89	826.4727, 674.3874, 446.2893, 390.2651, 362.2693, 262.1802	AZA4
14	5.27	844.4842	844.4861	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₂ N	2.25	808.4643, 790.4537, 674.3892, 446.2902, 362.2692	-
15	5.89	844.4842	844.4860	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₂ N	2.13	808.4904, 660.4013, 642.3908, 362.2688	AZA5
16	6.00	844.4842	844.4863	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₂ N	1.30	824.5034, 812.4886, 674.4167, 464.3264, 364.2745	-
17	4.97	888.4740	888.4734	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄ N	-0.67	812.4788, 808.4914, 674.4158, 464.3238, 364.2760	AZA21
18	4.70	888.4740	888.4727	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄ N	-1.46	840.4868, 834.4713, 826.5006, 704.3915, 660.4006 842.4968,	-
19	5.17	860.4791	860.5025	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₃ N	2.72	824.4865, 806.4733, 690.4220, 672.4015, 462.3112, 372.2230	AZA13
20	5.38	860.4791	860.5015	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₃ N	2.62	824.4865, 812.4835, 810.4695, 690.4120, 479.3187, 462.3112	AZA13

为主要的代谢产物, 在 3d 代谢样品中含量比例分别为 5.9%和 2.6%, 主要以 AZA2 形式存在(含量为 84.0%)。在 7d 代谢样品中, 共检测到 9 种代谢产物组分, AZA2 含量显著降低, 约为 66.9%, AZA12 和 AZA19 含量升高, 含量分别为 11.5%和 9.8%。至代谢 22d 样品中, 检出全部 11 种代谢产物。其中部分代谢产物如 AZA9, AZA10, AZA19 均随代谢过程持续升高, 是 AZA2 在贝类代谢过程中的末端产物。因此, 应用本方法对促进 AZAs 的代谢进程具有重要的作用。

综上所述, 脂溶性 AZAs 在贝类基质体内, 以多种代谢物形式进行代谢转化, 代谢产物极性增加,

当残留能力较强, 可长时间残留在基质样品中。由于目前多种 AZAs 代谢产物的毒性当量因子未知, 因此整体增加贝类对消费者食用安全的风险性, 需加以重视。

3 结论

本研究采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 高分辨质谱技术建立了多种数据采集模式、挖掘策略用于 AZAs 及其代谢物质的精准筛查。分析比较标准品和基体标准物质, 共获得 20 种 AZAs 系列化合物二级碎片信息, 初步推测了 3 种新型 AZAs 代谢产物的结构。应用该方法分析 AZA2 在贝类中的代谢轮廓, 共

表 2 扇贝代谢实验样品 AZAs 组成及含量
Tab.2 AZA metabolites and content of *Chlamys Farreri* metabolite samples

AZAs 种类	毒素含量(μg/kg)		
	3d	7d	22d
AZA2	166±16.5	210±19.2	89.7±5.96
AZA12	11.8±2.65	36.2±2.20	35.2±2.59
AZA19	5.15±0.65	30.7±1.05	42.6±1.95
AZA6	2.05±0.25	1.68±0.15	6.48±0.26
AZA9	2.56±0.18	9.45±0.68	15.6±0.96
AZA10	2.32±0.36	12.8±1.24	19.8±0.16
AZA11	5.46±0.22	5.61±0.68	6.54±0.67
AZA23	2.65±0.15	7.62±0.19	6.55±1.26
峰 14	-	-	4.89±0.68
峰 16	-	-	9.54±0.97
峰 18	0.65±0.11	-	1.94±0.12

注: 用 AZA2 标准品进行相对定量

检测出 11 种 AZAs, 其中 AZA12 和 AZA19 为主要的代谢上游产物。该方法能够实现复杂基质中的 AZAs 的精准鉴别, 可为 AZA 的代谢机理研究提供参考。

参 考 文 献

- 吴海燕, 李清云, 邴晓菲等, 2017. 氮杂螺环酸毒素在栉孔扇贝体内的代谢规律. 中国水产科学, 24(6): 1298—1306
- 吴海燕, 郭萌萌, 郑关超等, 2018. 氮杂螺环酸毒素的生态分布、蓄积代谢与检测技术监控研究进展. 中国渔业质量与标准, 8(1): 7—15
- 吴海燕, 郭萌萌, 赵春霞等, 2016. 液相色谱-串联质谱法筛查原多甲藻酸毒素及其代谢产物. 色谱, 34(4): 401—406
- 韩 深, 王珮玥, 刘 莹等, 2013. QuEChERS 净化技术结合超高效液相色谱-串联质谱法筛查食用贝类中的 3 种原多甲藻酸贝类毒素. 色谱, 31(10): 939—945
- 韩 深, 刘 鑫, 李建辉等, 2014. 超高压液相色谱-高分辨质谱快速筛查和确证食用贝类中多种原多甲藻酸贝类毒素. 食品科学, 35(4): 116—121
- EFSA, 2008. Marine biotoxins in shellfish-azaspiracid group-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. EFSA Journal, 6(10): 723
- Furey A, O'Doherty S, O'Callaghan K *et al*, 2010. Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: Toxicological and health considerations. Toxicon, 56(2): 173—190
- Hess P, Twiner M J, Kilcoyne J *et al*, 2016. Azaspiracid toxins: toxicological profile. In: Gopalakrishnakone P, Haddad Jr V, Kem W R *et al* eds. Marine and Freshwater Toxins. Dordrecht: Springer, 169—191
- Jauffrais T, Kilcoyne J, Herrenknecht C *et al*, 2013. Dissolved azaspiracids are absorbed and metabolized by blue mussels (*Mytilus edulis*). Toxicon, 65: 81—89
- Ji Y, Qiu J B, Xie T *et al*, 2018. Accumulation and transformation of azaspiracids in scallops (*Chlamys farreri*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) fed with *Azadinium poporum*, and response of antioxidant enzymes. Toxicon, 143: 20—28
- Kilcoyne J, McCarron P, Hess P *et al*, 2015. Effects of heating on proportions of azaspiracids 1—10 in mussels (*Mytilus edulis*) and identification of carboxylated precursors for azaspiracids 5, 10, 13, and 15. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(51): 10980—10987
- Kilcoyne J, McCarron P, Twiner M J *et al*, 2014. Epimers of azaspiracids: isolation, structural elucidation, relative LC-MS response, and *in vitro* toxicity of 37-*epi*-azaspiracid-1. Chemical Research in Toxicology, 27(4): 587—600
- Kilcoyne J, McCarron P, Twiner M J *et al*, 2018. Identification of 21, 22-dehydroazaspiracids in mussels (*Mytilus edulis*) and *in vitro* toxicity of azaspiracid-26. Journal of Natural Products, 81(4): 885—893
- Krock B, Tillmann U, Potvin É *et al*, 2015. Structure elucidation and *in vitro* toxicity of new azaspiracids isolated from the marine dinoflagellate *Azadinium poporum*. Marine Drugs, 13(11): 6687—6702
- Krock B, Tillmann U, Tebben J *et al*, 2019. Two novel azaspiracids from *Azadinium poporum*, and a comprehensive compilation of azaspiracids produced by *Amphidomataceae*, (Dinophyceae). Harmful Algae, 82: 1—8
- Krock B, Tillmann U, Witt M *et al*, 2014. Azaspiracid variability of *Azadinium poporum* (Dinophyceae) from the China Sea. Harmful Algae, 36: 22—28
- Leonardo S, Rambla-Alegre M, Samdal I A *et al*, 2017. Immunorecognition magnetic supports for the development of an electrochemical immunoassay for azaspiracid detection in mussels. Biosensors and Bioelectronics, 92: 200—206
- Miles C O, Kilcoyne J, McCarron P *et al*, 2018. Selective extraction and purification of azaspiracids from blue mussels (*Mytilus edulis*) using boric acid gel. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(11): 2962—2969
- O'Driscoll D, Škrabáková Z, James K J, 2014. Confirmation of

- extensive natural distribution of azaspiracids in the tissue compartments of mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicol*, 92: 123—128
- Pelin M, Kilcoyne J, Nulty C *et al*, 2018. Toxic equivalency factors (TEFs) after acute oral exposure of azaspiracid 1, -2 and -3 in mice. *Toxicology Letters*, 282: 136—146
- Rehmann N, Hess P, Quilliam M A, 2008. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(4): 549—558
- Rossi R, Dell'Aversano C, Krock B *et al*, 2017. Mediterranean *Azadinium dexteroporum* (Dinophyceae) produces six novel azaspiracids and azaspiracid-35: a structural study by a multi-platform mass spectrometry approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(4): 1121—1134
- Samdal I A, Løvberg K E, Briggs L R *et al*, 2015. Development of an ELISA for the detection of azaspiracids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35): 7855—7861
- Tillmann U, Trefault N, Krock B *et al*, 2017. Identification of *Azadinium poporum* (Dinophyceae) in the Southeast Pacific: morphology, molecular phylogeny, and azaspiracid profile characterization. *Journal of Plankton Research*, 39(2): 350—367

UNTRAGETED SCREENING OF AZASPIRACIDS AND ITS METABOLITES IN SHELLFISH AND TOXIN PRODUCING ALGAE BY UHPLC-LTQ-ORBITRAP

WU Hai-Yan¹, CHEN Jia-Qi¹, DONG Chen-Fan^{1,2}, WANG Song³, CUI Hai-Dong³, TAN Zhi-Jun¹

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Qingdao Value & Value Medical Biomaterial Co., Ltd, Qingdao 266071, China)

Abstract Azaspiracids (AZAs), one kind of lipid-soluble shellfish toxins, with the lowest provisional acute reference dose (ARfD) and relative high toxicity among all kinds of shellfish toxins, are easily accumulated to high levels in shellfish and can persist for long periods. Consumption of AZAs contaminated shellfish could cause severe acute gastrointestinal poisoning, posing threats to public health, and concerns on quality of shellfish products. In recent years, AZAs contamination has become a worldwide problem. AZAs producing microalgae are extensively distributed around the coasts of China, resulting in increased AZAs accumulation in shellfish. It is therefore necessary to assess the potential risk of AZAs in shellfish. However, the mechanism for AZAs detoxification in human remains poorly documented, and often generates inaccurate safety assessments. In this study, ultra-high-performance liquid chromatography linear ion trap/orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-LTQ-Orbitrap) was used to integrate the untargeted screening analysis method of AZAs and its metabolites in shellfish. The mass spectrum characterization of AZA standard solution and positive matrix samples was analyzed for routine detection and accurate identification in three identification modes: Full MS/dd MS², PRM, and target-SIM /dd MS². The results show that PRM could effectively eliminate the interference of isomers and obtain higher specificity. Non-target high-throughput screening analysis by Full MS/dd MS² and the PRM were conducted for metabolic samples. Twenty AZA species and three new AZA metabolites were identified from various samples. Therefore, this method can provide a reference for accurate routine detection of AZAs in complex matrixes and for studying the metabolic transformation mechanism.

Key words azaspiracid; shellfish toxin; ultra-high-performance liquid chromatography linear ion trap/orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-LTQ-Orbitrap); metabolite