

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2021011303

高思越, 沈怡, 杨方星. 稀有鮡鲫体内多种神经化学物质的同时测定[J]. 环境化学, 2022, 41(5): 1548-1558.

GAO Siyue, SHEN Yi, YANG Fangxing. Simultaneous determination of multiple neurochemicals in Chinese rare minnow[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41 (5): 1548-1558.

稀有鮡鲫体内多种神经化学物质的同时测定^{*}

高思越 沈 怡 杨方星^{**}

(浙江大学环境与资源学院环境健康研究所, 杭州, 310058)

摘 要 本文建立了一种可以同时检测稀有鮡鲫体内 24 种神经化学物质的分析方法. 该方法采用 QuEChERS 技术对样品进行提取和净化, 待测物采用超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 分析, 利用同位素内标法进行定量. 该方法仪器检测限 (IDL) 范围为 0.01—0.06 ng·mL⁻¹, 方法定量限 (MQL) 范围为 0.28—1.97 ng·g⁻¹. 在两种浓度添加水平下, 基质效应处于 60.6%—129.0% 之间, 相对回收率处于 66.8%—116.7% 之间, 仪器日内偏差≤8.3%, 仪器日间偏差≤10.9%, 方法相对标准偏差≤10.8%. 结果表明, 该方法准确可靠, 满足鱼体中神经化学物质定量分析要求.

关键词 神经化学物质, QuEChERS, 液相色谱-串联质谱, 稀有鮡鲫.

Simultaneous determination of multiple neurochemicals in Chinese rare minnow

GAO Siyue SHEN Yi YANG Fangxing^{**}

(Institute of Environmental Health, College of Environmental & Resource Sciences,
Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China)

Abstract An analytical method was developed to simultaneously detect 24 neurochemicals in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). In the method, QuEChERS is employed to extract and purify the sample. The neurochemicals are then analyzed and quantified by ultra-high performance liquid chromatography –tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) based on isotope internal standard method. The instrument detection limits (IDL) range from 0.01 to 0.06 ng·mL⁻¹, and the method quantification limits (MQL) are in the range of 0.28 to 1.97 ng·g⁻¹. The matrix effects are between 60.6% and 129.0% at the two spiking levels. The relative recoveries are in the range of 66.8% to 116.7%. The instrument intraday deviation are less than or equal to 8.3%, the instrument daily deviation are less than or equal to 10.9%, the relative standard deviations of method are less than or equal to 10.8%. The results show that the method is accurate and reliable, and meets the requirement of neurochemicals detection in fish.

Keywords neurochemical, QuEChERS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Chinese rare minnow.

2021 年 1 月 13 日收稿(Received: January 13, 2021).

^{*} 国家自然科学基金 (41977341) 资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41977341).

^{**} 通信联系人 **Corresponding author**, Tel: 0571-88982392, E-mail: fxyang@zju.edu.cn

当前,越来越多的环境污染物被排入到水环境中,继而对水生动物(特别是鱼类)产生各种不利影响^[1-2].其中,包括精神活性物质在内的一些污染物,能够作用于水生动物的神经系统,产生神经毒性影响.这类污染物通过直接或间接促进/抑制某种神经递质的释放,从而导致动物的行为发生改变,改变个体的捕食、繁殖、躲避猎食者等行为,进而影响其个体和种群生存状况^[3-5].因此,神经毒性已经成为污染物对水生动物不利影响的重要组成部分,越来越受到人们的关注^[6].

污染物的神经毒性通常借由神经递质或其上下游产物(统称为神经化学物质)实现.神经递质不仅是神经传递的基础,而且在中枢神经系统发育过程中起着至关重要的作用.神经递质在突触前神经元中合成,并由特定的突触囊泡转运体包装成囊泡,随后释放到突触间隙,在那里它们与突触后受体结合.随后,神经递质通过降解或再吸收来终止神经传递^[7].在大脑发育过程中,遗传或环境因素引起的神经递质合成、转运或代谢障碍可能导致儿童出现多种神经学表现,包括但不限于神经发育迟缓、运动障碍、癫痫和神经精神病学特征^[8-10].

基于神经化学物质的不同,神经系统可分为组胺能、谷氨酸能、氨基丁酸能、甘氨酸能、胆碱能、羟色胺能、儿茶酚胺能和肾上腺素能等不同系统.这些神经系统可以调节不同的行为及生理功能.例如胆碱能中乙酰胆碱(ACh)可激活两类受体:烟碱类受体(nAChRs)和毒蕈碱类受体(mAChRs).其中mAChRs可能参与神经传递、神经调节和嗅觉调控^[11],nAChRs在调节谷氨酸释放和记忆形成^[12]中发挥关键作用;儿茶酚胺能中多巴胺能神经元只占大脑神经元总数的不到1%,但它们对大脑生理有着重要的影响,多巴胺能调节运动、认知、情感和奖励^[13];羟色胺能中血清素可以调节知觉、攻击性、焦虑、性行为、食欲、血管功能和痛觉^[14].这些神经系统中的神经化学物质都有可能受到外源污染物的干扰,继而在暴露个体中产生神经毒性效应.

然而,在神经毒性研究中,特别是对非靶标物种的神经毒性研究中,往往并不知道污染物的作用靶点,如果只选择一种或少数几种神经化学物质作为研究对象有可能错失真正的作用靶点.此外,由于生物体是完整的有机整体,体内存在复杂的反馈机制,污染物对生物体的神经毒性影响最终可能会表现在多种神经化学物质上.因此,当涉及神经化学物质的神经毒性研究时,特别是未知机理的神经毒性研究时,应尽可能地覆盖更多的神经化学物质,才能准确和全面地评估污染物的神经毒性效应及其机制.

同时分析多种神经化学物质无疑对分析手段提出了更高的挑战.传统的单个测定神经化学物质的方法已很难满足对神经化学物质高通量分析的要求.当前,能够同时检测多种神经化学物质检测方法主要有气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)和超高效液相色谱—串联质谱法(UPLC-MS/MS)等,其中GC-MS能够检测的物质比较有限,HPLC的灵敏度较低,而UPLC-MS/MS不仅能够同时检测更多的化学物质,且具有更高的灵敏度和准确度^[15-17].目前已有文献利用UPLC-MS/MS对神经化学物质进行检测,但是,大部分研究也仅包括几种典型神经递质,如血清素、乙酰胆碱、谷氨酸、多巴胺等^[18-19].本研究共选取了包括组胺能、谷氨酸能、胆碱能、羟色胺能、儿茶酚胺能和肾上腺素能系统在内的24种神经化学物质,这些物质包括典型的神经递质及其前体和代谢物,以期能够更加全面地反映神经系统对污染物的响应.

稀有鮡鲫是中国特有鱼种,属于冷水鱼,具有对污染物敏感,易饲养等特点,在一些毒性实验中已经被采用为模式鱼种.鱼类是典型的水生动物,关于污染物对鱼类的神经毒性影响已有许多报导^[20-22].本文采用稀有鮡鲫作为受试动物,结合超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS),建立了一种适用于包括稀有鮡鲫在内的鱼体中24种神经化学物质同时检测的快速分析方法,为全面评估污染物对鱼类的神经毒性影响提供技术手段.

1 实验部分(Experimental section)

1.1 实验材料

超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(Xevo TQ-S, Waters, 美国), 配电喷雾离子源(ESI); 制冰机(精宏, 上海); Milli-Q 纯水仪(Millipore, 美国); 分析天平(220 g/0.1 mg, ME204, Mettler-Toledo, 瑞士); 超声波清洗器(KQ3200, 舒美, 中国); 匀浆机(IKA, 德国); 高速离心机(TG20WS, 湘智, 中国); 氮

吹浓缩仪(N-EVAP-12, Organomation, 美国).

24 种神经化学物质和 11 种同位素内标均购自中国百灵威公司, 详细信息见表 1. 所有神经化学物质标准品和同位素内标根据其溶解度用乙腈或含一定比例水的乙腈溶液配制成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的储备液, 在-20℃ 条件下保存, 配制低浓度单标或混标溶液时用 5% 乙腈水溶液逐步进行稀释.

表 1 24 种神经化学物质和 11 种同位素内标详细信息

Table 1 The detailed information of neurochemicals and isotope internal standard

神经系统分类 Category	神经化学物质 Neurochemical	英文全称 English name	简称 Abbreviation	纯度 Purity
胆碱能系统	乙酰胆碱	Acetylcholine	ACh	98%
	胆碱	Choline	Cho	98%
	甘油磷酸胆碱	Glycerophosphocholine	GPC	99%
	磷酸胆碱	Phosphocholine	CHOP	99%
	甜菜碱	Betaine	Bet	98%
羟色胺能系统	血清素	Serotonin	5-HT	99%
	色氨酸	Tryptophan	Trp	99%
	5-羟基色氨酸	5-Hydroxy-L-tryptophan	5-HTP	98%
	5-羟基吲哚-3-乙酸	5-Hydroxyindoleacetic acid	5-HIAA	99%
儿茶酚胺能系统	左旋多巴	3,4-L-dihydroxyphenylalanine	L-DOPA	99%
	多巴胺	Dopamine	DA	98%
	3-甲氧基酪胺	3-Methoxytyramine	3-MT	99%
	酪氨酸	Tyrosine	Tyrs	99%
	酪胺	Tyramine	Tyrm	97%
肾上腺素能系统	肾上腺素	Epinephrine	E	100%
	去甲肾上腺素	Norepinephrine	NE	98%
	去甲变肾上腺素	Normetanephrine	MNE	99%
谷氨酸能系统	L-谷氨酰胺	L-Glutamine	Gln	99%
	L-谷氨酸	L-Glutamic acid	Glu	99%
	L-缬氨酸	L-Valine	Val	99%
其他神经系统相关物质	组织胺	Histamine	HSM	97%
	L-天冬氨酸	L-Aspartic acid	Asp	98%
	L-蛋氨酸	L-Methionine	Met	99%
	L-脯氨酸	L-Proline	Prol	99%
同位素内标	乙酰胆碱-d ₄	Acetylcholine-d ₄	ACh-d ₄	99%
	胆碱-d ₄	Choline-d ₄	Cho-d ₄	99%
	甜菜碱-d ₃	Betaine-d ₃	Bet-d ₃	99%
	血清素-d ₄	Serotonin-d ₄	5-HT-d ₄	99%
	5-羟基吲哚-3-乙酸-d ₅	5-Hydroxyindoleacetic acid-d ₅	5-HIAA-d ₅	99%
	多巴胺-d ₄	Dopamine-d ₅	DA-d ₄	99%
	左旋多巴-d ₃	3,4-L-dihydroxyphenylalanine-d ₃	L-DOPA-d ₃	99%
	酪氨酸- ¹³ C	Tyrosine - ¹³ C	Tyrs- ¹³ C	99%
	去甲变肾上腺素-d ₃	Normetanephrine-d ₃	MNE-d ₃	99%
	L-缬氨酸- ¹³ C	L-Valine- ¹³ C	Val- ¹³ C	99%
	脯氨酸- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	L-Proline- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	Prol- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	99%

使用溶剂均为 LC-MS 级. 甲醇购自美国 Fisher Scientific 公司, 乙腈购自美国 J.T.Baker 公司. 甲酸 (Formic acid, FA, 纯度 99.0%) 购自中国百灵威公司. 吸附剂 PSA (Primary secondary amine) 购自美国 Agilent Technologies 公司, C₁₈ 购自美国 Welch Materials 公司. 分析纯中性 Al₂O₃、无水 MgSO₄、NaCl 均用乙腈洗涤后晾干, 使用前分析纯中性 Al₂O₃ 在 180 ℃ 条件下烘烤 12 h 活化, 无水 MgSO₄ 和 NaCl 450 ℃ 烘烤 4 h 以去除可能残留的有机物.

1.2 样品采集及前处理方法

成年稀有鮕鲫((0.8±0.2)g)购自中国科学院水生生物研究所, 实验前均用经 48 h 曝气除氯的自来水驯化一周, 每天维持 12 h 光照且喂食一次丰年虫, 每 48 h 更换装置内一半水.

样品前处理方法采用 QuEChERS (Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe) 方法, 该方法在 2003 年由 Anastassiades 等提出^[23], 分为乙腈萃取和基质净化两个步骤, 通过吸附剂去除基质中的脂肪等杂质, 可有效降低基质效应^[24-25]. 具体操作如下:

成年稀有鮕鲫于-20℃ 的条件下冷冻断颈处死, 每条鱼称重后各加入体重两倍比例的超纯水(如 0.5 g 鱼加 1 mL 超纯水)充分匀浆, 将全部匀浆液置于 2 mL 离心管中, 加入 20 μL 同位素内标混合液(各同位素内标浓度为 100 ng·mL⁻¹), 用 3 mL 含 0.1%(体积分数)甲酸的乙腈溶液超声萃取 10 min. 加入 100 mg NaCl 和 100 mg 无水 MgSO₄ 涡旋混匀后在 5000 r·min⁻¹ 下离心 5 min, 取上清液. 上清液中加入 60 mg PSA, 30 mg Al₂O₃, 30 mg C₁₈ 和 20 mg 无水 MgSO₄ 后涡旋混匀, 5000 r·min⁻¹ 下离心 5 min, 取上清液, 剩余部分用 2 mL 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液润洗后再次离心取上清液. 两次上清液合并后氮吹浓缩至近干, 再用 200 μL 5% 乙腈水溶液复溶, 过 0.22 μm 滤膜以去除可能含有的颗粒物, 进 UPLC-MS/MS 分析.

1.3 仪器分析条件

色谱条件: 液相分离色谱柱为 Synergi Polar-RP 100 Å column (100 mm×2 mm, 2.5 μm, Phenomenex, Torrance, 美国), 柱前加 VanGuard 保护柱(2.1 mm×5 mm, 1.7 μm). 分析时, 柱温设置为 20 ℃, 进样量为 10 μL. 流动相用二元洗脱液, A 路甲醇, B 路水, 均添加 0.1% 的甲酸, 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 梯度设定为: 0 min 5%A, 2 min 5%A, 4 min 25%A, 7 min 95%A, 8 min 5%A.

质谱条件: 质谱运行模式为正离子模式, 多反应选择离子监测 (multiple reaction monitoring, MRM). 电压设置为 3.5 kV, 氮气作为脱溶剂气, 流速为 800 L·h⁻¹, 温度为 350 ℃, 氩气作为碰撞气.

按“1.3”仪器分析条件得到 24 种神经化学物质 10 ng·mL⁻¹ 标准溶液的总离子流色谱图(图 1)和 24 种神经化学物质和 11 种同位素内标的保留时间、离子对和对应内标物等参数(表 2).

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 方法准确度和精密度

生物样品基质复杂, 为了验证和评价方法的可靠性, 本文对 QuEChERS 方法处理稀有鮕鲫样品检测多种神经化学物质的基质效应、相对回收率、仪器检测限和方法定量限等参数进行了测定. 具体方法如下:

基质本底的测定: 为减少个体差异, 将 10 条稀有鮕鲫匀浆液进行混匀, 再取 200 μL (n=3) 匀浆液按照“1.2 节”方法进行前处理, 氮吹至近干后, 用 200 μL 5% 乙腈溶液复溶, 使用 UPLC-MS/MS 测定神经化学物质浓度为 C₀;

基质效应 (matrix effect, ME): 取上述稀有鮕鲫匀浆液 200 μL (n=3) 按照“1.2 节”方法进行前处理, 氮吹至近干后, 分别加入 200 μL 浓度为 5、50 ng·mL⁻¹ 的神经化学物质混合标准溶液复溶, 使用 UPLC-MS/MS 测定神经化学物质浓度为 C₁, 代入公式(1)分别计算出 ME 后再计算 ME 的均值和标准差.

$$ME = \frac{C_1 - C_0}{C}$$

(1)

相对回收率 (relative recovery, Rr): 取上述稀有鮕鲫匀浆液 200 μL (n=3) 加入 20 μL 浓度为 50、500 ng·mL⁻¹ 的神经化学物质混合标准溶液, 按照“1.2 节”方法进行前处理, 氮吹至近干后, 加入 200 μL 5% 乙腈溶液复溶, 使用 UPLC-MS/MS 测定神经化学物质浓度为 C₂, 代入式(2)分别计算出 Rr 后再计算 Rr 的均值和标准差.

$$Rr = \frac{C_2 - C_0}{C}$$

(2)

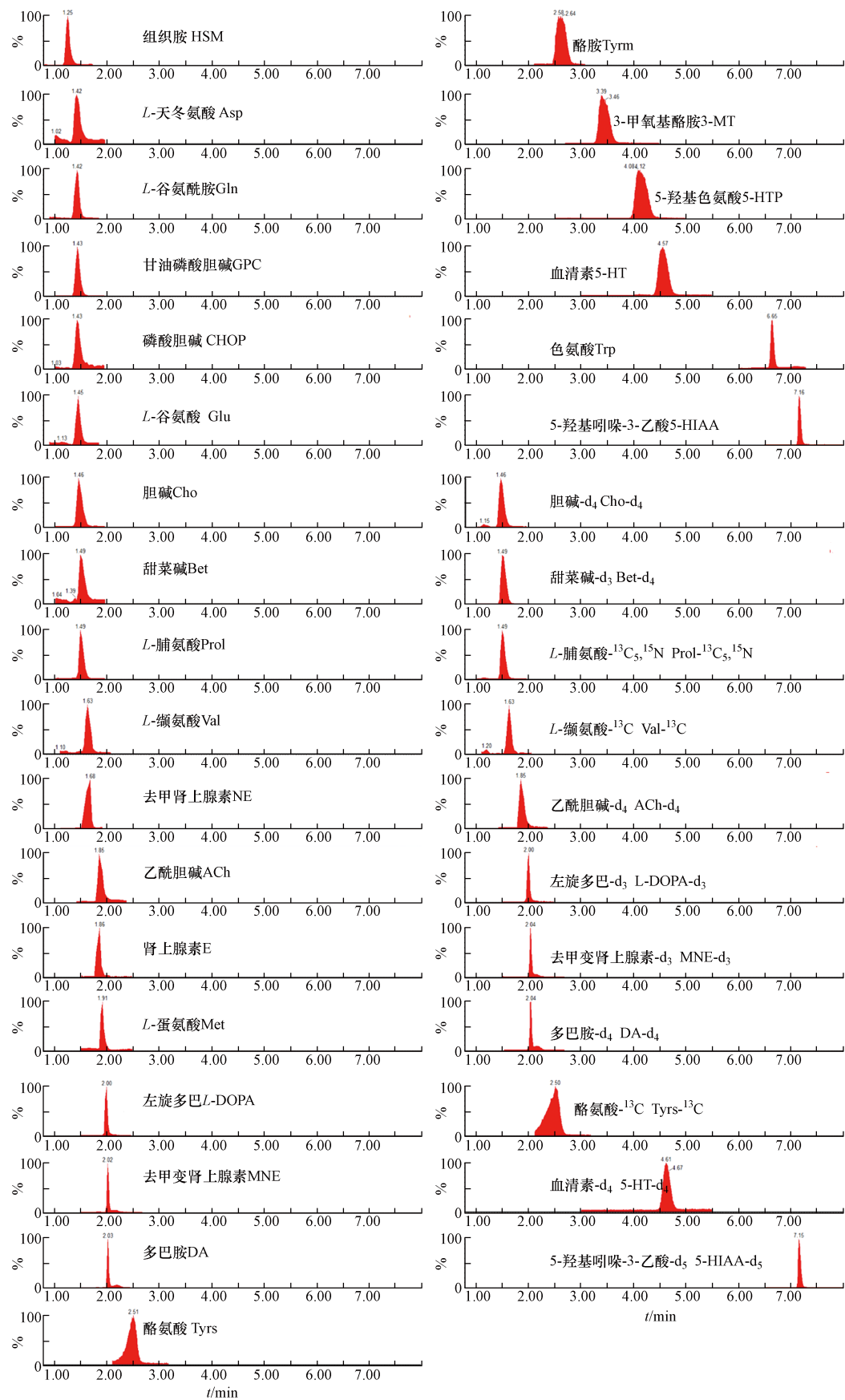


图 1 35 种神经化学物质标志物及内标标准品总离子流色谱图(10 ng·mL⁻¹)

Fig.1 TIC Chromatograms of standard solution of neurochemicals (10 ng·mL⁻¹)

表 2 保留时间、反应离子对和对应内标物
Table 2 Retention time, transitions and Internal internal standard

神经化学物质 Neurochemical	保留时间/ min RT	反应离子对 Transitions	对应内标物 Internal standard	神经化学物质 Neurochemical	保留时间/ min RT	反应离子对 Transitions	对应内标物 Internal standard
ACh	1.85	145.8>87.0* 145.8>60.1	ACh-d ₄	Gln	1.42	147.0>84.0* 147.0>130.0	Val- ¹³ C
Cho	1.46	104.1>45.0 104.1>60.2*	Cho-d ₄	Glu	1.45	148.0>84.1* 148.0>102.0	Val- ¹³ C
GPC	1.43	258.1>60.0 258.1>104.0*	ACh-d ₄	Val	1.63	118.0>55.1 118.0>72.0*	Val- ¹³ C
CHOP	1.43	184.1>86.1* 184.1>125.1	ACh-d ₄	HSM	1.25	112.1>68.0* 112.1>95.0	Val- ¹³ C
Bet	1.49	118.1>58.2 118.1>59.1*	Bet-d ₃	Asp	1.42	134.0>74.0* 134.0>88.0	Prol- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N
5-HT	4.57	159.8>114.9* 159.8>132.0	5-HT-d ₄	Met	1.91	149.8>132.8* 149.8>103.8	Prol- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N
Trp	6.65	205.1>146.0* 205.1>118.0	5-HT-d ₄	Prol	1.49	116.0>42.7 116.0>70.0*	Prol- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N
5-HTP	4.12	220.8>133.8 220.8>161.8*	5-HT-d ₄	ACh-d ₄	1.85	149.9>42.7 149.9>90.8*	
5-HIAA	7.16	192.2>146.1*	5-HIAA-d ₅	Cho-d ₄	1.46	108.1>60.4 108.1>49.1*	
L-DOPA	2.00	197.8>152.1 197.8>181.1*	L-DOPA-d ₃	Bet-d ₃	1.49	121.1>61.2*	
DA	2.03	136.8>64.8* 136.8>90.8	DA-d ₄	5-HT-d ₄	4.61	163.8>135.9* 163.8>117.8	
3-MT	3.39	167.8>150.8* 167.8>90.8	DA-d ₄	5-HIAA-d ₅	7.15	197.0>150.2* 197.0>122.2	
Tyrs	2.51	182.0>136.0* 182.0>165.0	Tyrs- ¹³ C	L-DOPA-d ₃	2.00	200.8>153.9* 200.8>140.8	
Tyrm	2.58	137.8>120.9* 137.8>76.8	Tyrs- ¹³ C	DA-d ₄	2.04	140.8>123.1 140.8>94.8*	
E	1.86	184.1>106.9* 184.1>134.8	MNE-d ₃	Tyrs- ¹³ C	2.50	183.1>91.1 183.1>136.2*	
NE	1.68	151.8>135.0 151.8>107.0*	MNE-d ₃	MNE-d ₃	2.04	168.8>137.0* 168.8>109.0	
MNE	2.02	165.8>133.9* 165.8>149.0	MNE-d ₃	Val- ¹³ C	1.63	119.1>55.1*	
				Prol- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	1.49	122.0>75.0*	

注: *: 定量离子对. Note: *: Quantification transition.

在实验选定条件下,使用 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法对稀有鮟鮓体内 24 种神经化学物质进行检测,得出基质效应和相对回收率如表 3 所示.在加标浓度为 5 ng·mL⁻¹ 和 50 ng·mL⁻¹ 条件下的基质效应处于 60.6%—129.0% 之间,相对回收率处于 66.8%—116.7% 之间.

表 3 方法基质效应和相对回收率
Table 3 Matrix effects and relative recoveries

神经化学物质 neurochemical	相对回收率/% Relative recovery		基质效应/% Matrix effect	
	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹
ACh	97.2±6.7	87.3±2.7	117.0±2.2	84.6±7.0
Cho	97.4±6.0	100.0±7.3	105.5±6.6	95.5±7.7
GPC	104.8±9.4	109.4±4.5	126.0±18.5	88.4±4.4
CHOP	96.3±10.4	75.0±9.5	93.6±8.2	78.3±9.3
Bet	90.1±4.2	77.7±8.3	95.0±6.7	72.1±12.5
5-HT	91.2±5.5	96.0±4.8	79.5±1.6	104.1±2.2
Trp	100.5±5.7	86.9±8.3	72.5±2.9	76.7±3.2
5-HTP	89.8±6.2	89.1±9.6	99.4±1.2	102.0±4.4
5-HIAA	89.7±4.4	84.6±6.4	93.3±10.2	79.6±3.4
L-DOPA	96.3±5.7	91.7±5.8	91.1±15.3	61.8±15.8
DA	97.7±7.4	74.3±11.5	109.1±3.6	66.3±16.2
3-MT	103.9±2.0	85.3±8.8	84.8±5.9	117.2±5.7
Tyrs	101.8±7.0	76.2±9.8	95.9±3.0	87.0±7.3
Tyrm	99.1±9.8	111.6±8.0	103.6±6.1	96.1±0.4
E	101.5±3.3	85.1±8.7	113.8±7.7	60.6±15.6
NE	93.1±2.5	82.3±1.8	77.1±2.5	95.7±1.9
MNE	96.5±8.5	92.9±4.7	105.3±9.5	89.7±6.3
Gln	87.1±2.2	87.2±7.4	100.6±1.6	71.7±0.8
Glu	104.7±4.5	74.1±5.6	108.5±1.5	77.6±8.9
Val	91.3±8.4	66.8±1.0	105.5±2.8	70.4±9.4
HSM	107.9±9.1	79.7±10.7	99.5±2.5	67.4±12.9
Asp	83.4±4.1	98.4±10.6	100.7±5.7	97.6±11.5
Met	116.7±2.4	88.9±3.5	129.0±12.3	88.9±0.6
Prol	105.4±8.2	113.4±6.9	101.9±3.2	97.3±5.3

注: 基质效应>100%表示增强;<100%表示抑制。Note: matrix effect >100% means enhancement, <100% means suppression.

本次研究评估了仪器偏差和方法精密度, 仪器偏差包括仪器日内偏差和日间偏差, 结果见表 4。仪器日内偏差和日间偏差由 2 个不同浓度(5 ng·mL⁻¹ 和 50 ng·mL⁻¹)的混标溶液直接进样分析得到, 方法精密度由两个加标浓度(5 ng·mL⁻¹ 和 50 ng·mL⁻¹)的鱼匀浆液经方法“1.2”前处理得到, *n*=5。当加标浓度为 5 ng·mL⁻¹ 和 50 ng·mL⁻¹ 时, 仪器日内偏差≤8.3%, 仪器日间偏差≤10.9%, 方法精密度≤10.8%, 表明用超高效液相色谱-串联质谱来测量神经化学物质的准确度较高, 对神经化学物质的定量分析结果可靠。

表 4 仪器有效性和方法有效性(*n*=5)
Table 4 Instrumental validation and method validation (*n*=5)

神经化学物质 Neurochemical	仪器日内偏差/% Instrument intraday deviation RSD		仪器日间偏差/% Instrumental Interday deviation RSD		方法精密度/% Method precision RSD	
	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹
ACh	3.5	0.2	3.2	1.1	7.0	3.1
Cho	1.1	1.4	8.4	5.3	6.1	7.3
GPC	2.7	1.3	5.5	4.0	9.0	4.1

续表 4

神经化学物质 Neurochemical	仪器日内偏差/% Instrument intraday deviation RSD		仪器日间偏差/% Instrumental Interday deviation RSD		方法精密度/% Method precision RSD	
	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹
CHOP	5.9	1.8	3.5	2.9	10.8	5.3
Bet	2.0	0.3	4.7	2.6	4.6	10.3
5-HT	5.0	1.5	3.8	2.3	6.0	5.0
Trp	3.2	0.4	2.3	1.0	5.7	9.6
5-HTP	3.2	4.7	7.1	2.3	6.9	10.8
5-HIAA	1.4	0.3	2.4	0.8	4.9	7.8
L-DOPA	7.0	1.1	9.8	10.9	6.0	6.3
DA	1.2	0.3	7.3	3.0	7.6	10.7
3-MT	2.1	0.6	4.2	1.7	1.9	10.4
Tyrs	5.7	4.5	3.6	2.5	6.9	9.6
Tyrm	3.7	1.4	5.4	4.3	9.9	7.1
E	5.2	5.8	8.4	3.1	3.2	10.2
NE	2.6	3.4	9.0	8.8	2.7	2.1
MNE	2.9	2.1	7.5	4.3	8.8	5.0
Gln	6.0	1.0	3.8	2.0	2.5	8.5
Glu	1.7	1.7	7.6	3.6	4.3	3.0
Val	4.5	2.0	3.6	2.2	9.2	1.6
HSM	3.1	1.1	6.6	1.2	8.5	1.2
Asp	8.3	2.3	5.1	3.3	5.0	2.3
Met	6.7	3.8	7.4	3.4	2.1	7.1
Prol	3.6	0.4	7.3	5.1	7.8	6.1

2.2 方法检出限和线性范围

仪器检测限(instrument detection limit, IDL)使用 EPA^[26] 的推荐方法测定: 配制浓度为 0.1、1、10、100 ng·mL⁻¹ 的神经化学物质混合标准溶液, 每个浓度连续进样 5 次, 计算仪器响应平均值(mean peak area, M)和标准偏差(standard deviation, SD);

$$IDL = \frac{TINV(0.02, COUNT(a1:a5) - 1) \times SD \times C}{M}$$

(3)

方法检测限(method detection limits, MDL): 根据 IDL 和 Rr 计算获得;

$$MDL = \frac{IDL \times 0.2 \text{ mL} \times 1.6 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL} \times Rr \times 0.2 \text{ mL} \times 0.8 \text{ g}}$$

(4)

方法定量限(method quantification limits, MQL): 等于 3×MDL.

式中, C 表示相对应的标准溶液浓度(ng·mL⁻¹); *a_i* 表示同一浓度标准溶液连续测定 5 次的第 *i* 次峰面积值; MDL 计算中 Rr 值取 5、50 ng·mL⁻¹ 两种加标浓度回收率的平均值; 分子中 0.2 mL 为复溶溶液体积, 1.6 mL 为整鱼的匀浆液体积; 分母中 0.2 mL 为所取的鱼匀浆液体积, 0.8 g 为整鱼的质量. 同种神经化学物质取不同浓度仪器检测限计算值的最小值记为 IDL.

为减少基质效应对神经化学物质测定的干扰, 本方法采用基质匹配校准曲线. 基质匹配的校准曲线为 200 μL 稀有鮕鲫匀浆液, 经方法“1.2 节”前处理后, 最后以 1、5、10、50、100、1000、2000 ng·mL⁻¹ 的标准溶液构建的基质匹配的校准曲线, 24 种神经化学物质在 1—2000 ng·mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系, 相关系数 *R*² 范围为 0.990—0.999, 结果见表 5.

表 5 方法线性关系和检出限

Table 5 linear relationship and detection limits				
神经化学物质 Neurochemical	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	仪器检测限/(ng·mL ⁻¹) IDL	方法定量限/(ng·g ⁻¹) MQL
ACh	y=0.0588x	0.9956	0.01	0.31
Cho	y=0.1136x+18.186	0.9974	0.04	1.23
GPC	y=0.0242x+0.0275	0.9968	0.01	0.29
CHOP	y=0.0017x-0.0047	0.9900	0.02	0.62
Bet	y=0.0934x+7.0849	0.9959	0.01	0.33
5-HT	y=0.2304x-0.2847	0.9974	0.06	1.97
Trp	y=0.5648x+1.6208	0.9982	0.01	0.30
5-HTP	y=0.2386x+0.0196	0.9988	0.01	0.33
5-HIAA	y=0.1255x+0.0154	0.9995	0.01	0.33
L-DOPA	y=0.0755x+0.292	0.9989	0.03	0.93
DA	y=0.333x+0.6576	0.9958	0.01	0.31
3-MT	y=0.4708x+2.968	0.9950	0.03	0.87
Tyrs	y=0.0766x+0.3108	0.9951	0.02	0.59
Tyrm	y=0.037x-0.0155	0.9958	0.05	1.51
E	y=0.0074x-0.0024	0.9959	0.02	0.59
NE	y=0.1x-0.2194	0.9975	0.01	0.32
MNE	y=0.0334x+0.0628	0.9995	0.01	0.31
Gln	y=0.3987x+0.9834	0.9989	0.02	0.69
Glu	y=0.7131x+2.3598	0.9984	0.01	0.29
Val	y=1.0057x+12.349	0.9968	0.02	0.66
HSM	y=0.2451x-0.3618	0.9935	0.01	0.28
Asp	y=0.0029x+0.0356	0.9980	0.03	1.08
Met	y=0.0733x+0.5839	0.9990	0.03	0.77
Prol	y=0.8398x+7.5476	0.9965	0.01	0.28

2.3 实际样品测定

本方法采用 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测稀有鮡鲫体内 24 种神经化学物质的含量, 直接对驯化 7 d 后的稀有鮡鲫进行神经化学物质含量检测, 计算过程见公式(5), 结果以 ng·g⁻¹ (湿重)表示. 其中, 5-HTP 由于低于检测限未检出, Cho、Bet、Asp、Met、Prol 含量高于线性范围, 故不予定量, 其余神经化学物质的浓度结果见表 6. 检测到的神经化学物质水平与其它文献中报出的神经化学物质含量水平大致相同^[27-28], 因此, 证明该方法是可行的.

$$C' = \frac{C \times V}{0.2 \times m}$$

(5)

其中, C'表示鱼体内神经化学物质含量, 单位为 ng·g⁻¹(湿重); C 由神经化学物质峰面积和内标峰面积比值代入标准方程得到; V 表示鱼匀浆液总体积(mL); m 表示鱼的质量(g).

表 6 稀有鮡鲫体内神经化学物质含量(n=7)

Table 6 Concentrations of neurochemicals in Chinese rare minnow(n=7)		
神经化学物质 Neurochemical	雄鱼含量* /(ng·g ⁻¹)(湿重) Male	雌鱼含量* /(ng·g ⁻¹)(湿重) Female
ACh	66.3±8.9	55.8±6.5
GPC	2.8±0.7	1.1±0.2

续表 6

神经化学物质 Neurochemical	雄鱼含量* /(ng·g ⁻¹)(湿重) Male	雌鱼含量* /(ng·g ⁻¹)(湿重) Female
CHOP	6.0±2.2	4.0±0.8
5-HT	11.0±1.5	11.8±0.9
Trp	28.9±2.9	33.1±3.0
5-HIAA	13.6±1.6	11.1±1.8
L-DOPA	53.9±5.1	40.8±5.5
DA	611.1±80.2	660.1±74.3
3-MT	475.9±69.7	501.7±75.2
Tyrs	1189.4±69.4	184.0±95.5
Tyrn	840.7±52.2	034.5 ±150.7
E	5.7±0.6	6.0±0.5
NE	2.7±0.2	2.5±0.2
MNE	6.2±0.3	6.3±0.4
Gln	32.1±5.0	31.7±2.4
Glu	48.4±5.0	47.9±5.5
Val	849.7±54.6	273.0 ±121.7
HSM	33.1±5.5	38.3±7.4

*: Mean±SD.

3 结论(Conclusion)

本文建立了一种 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱分析方法,可同时检测稀有鮕鲫中 24 种神经化学物质. 该方法可有效去除基质干扰,方法回收率较好,稳定可靠. 该方法成功应用于稀有鮕鲫体内的神经化学物质的检测,可以对多种神经系统中的神经化学物质进行全面的分析,为鱼类神经生物学和神经毒理学提供了研究手段.

参考文献 (References)

[1] ZUCCATO E, CASTIGLIONI S, BAGNATI R, et al. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants [J]. Water Research, 2008, 42: 961-968.

[2] CASTIGLIONI S, ZUCCATO E, CHIABRANDO C, et al. Detecting illicit drugs and metabolites in wastewater using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Spectroscopy Europe, 2007, 19: 7-9.

[3] SAARISTO M, LAGESSON A, BERTRAM M G, et al. Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch (*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment [J]. The Science of the Total Environment, 2019, 655: 1311-1320.

[4] BRODIN T, FICK J, JONSSON M, et al. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations [J]. Science, 2013, 339(6121): 814-815.

[5] KLAMINDER J, JONSSON M, LEANDER J, et al. Less anxious salmon smolt become easy prey during downstream migration [J]. The Science of the Total Environment, 2019, 687: 488-493.

[6] GÓMEZ-CANELA C, TORNERO-CAÑADAS D, PRATS E, et al. Comprehensive characterization of neurochemicals in three zebrafish chemical models of human acute organophosphorus poisoning using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(6): 1735-1748.

[7] NG J, PAPANDREOU A, HEALES S J, et al. Monoamine neurotransmitter disorders: Clinical advances and future perspectives [J]. Nature Reviews. Neurology, 2015, 11(10): 567-584.

[8] Horzmann KA, Freeman JL. Zebrafish get connected: investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity [J]. Toxics, 2016, 4(3): 19.

[9] KURIAN M A, GISSEN P, SMITH M, et al. The monoamine neurotransmitter disorders: An expanding range of neurological syndromes [J]. The Lancet. Neurology, 2011, 10(8): 721-733.

- [10] PEARL P L, CAPP P K, NOVOTNY E J, et al. Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults [J]. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38(12): 1051-1058.
- [11] BROWN D A. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: Some functions and mechanisms [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2010, 41(3): 340-346.
- [12] KENNEY J W, FLORIAN C, PORTUGAL G S, et al. Involvement of hippocampal Jun-N terminal kinase pathway in the enhancement of learning and memory by nicotine [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(2): 483-492.
- [13] SCHULTZ W. Getting formal with dopamine and reward [J]. *Neuron*, 2002, 36(2): 241-263.
- [14] PARSEY R V. Serotonin receptor imaging: clinically useful? [J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2010, 51(10): 1495-1498.
- [15] ZHANG P P, WANG B, SUN Y M, et al. Analysis of 5-hydroxytryptamine and its related indoles in cerebrospinal fluid of leukemic children by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Laboratory Medicine*, 2020, 44(1): 41-45.
- [16] LI R W, WANG H Q, MI C, et al. The adverse effect of TCIPP and TCEP on neurodevelopment of zebrafish embryos/larvae [J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 811-817.
- [17] SHACKLETON. Clinical steroid mass spectrometry: A 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis [J]. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2010, 121(3-5): 481-490.
- [18] DAVID A, LANGE A K, TYLER C R, et al. Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 621: 782-790.
- [19] FARIA M, BEDROSSIANTZ J, PRATS E, et al. Deciphering the mode of action of pollutants impairing the fish larvae escape response with the vibrational startle response assay [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 672: 121-128.
- [20] GAY F, MADDALONI M, VALIANTE S, et al. Endocrine disruption in the European eel, *Anguilla anguilla*, exposed to an environmental cocaine concentration [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2013, 224(5): 1-11.
- [21] GAWORECKI K M, KLAINE S J. Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88(4): 207-213.
- [22] MELNYK-LAMONT N, BEST C, GESTO M, et al. The antidepressant venlafaxine disrupts brain monoamine levels and neuroendocrine responses to stress in rainbow trout [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(22): 13434-13442.
- [23] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, ŠTAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2003, 86(2): 412-431.
- [24] MA S, HAN P, LI A, et al. Simultaneous determination of trace levels of 12 steroid hormones in soil using modified QuEChERS extraction followed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. *Chromatographia*, 2018, 81(3): 435-445.
- [25] 丁锦建, 邓童庆, 徐萌萌, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定食物中有机磷酸酯阻燃剂 [J]. *环境化学*, 2017, 36(10): 2155-2164.
- DING J J, DENG T Q, XU M M, et al. Determination of organophosphate ester flame retardants in foodstuffs by QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(10): 2155-2164(in Chinese).
- [26] USEPA. Revised assessment of detection and quantification approaches[R]. EPA-821-B-04-005, 2004.
- [27] SANTOS-FANDILA A, VÁZQUEZ E, BARRANCO A, et al. Analysis of 17 neurotransmitters, metabolites and precursors in zebrafish through the life cycle using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2015, 1001: 191-201.
- [28] SELVARAJ V, VENKATASUBRAMANIAN H, ILANGO K, et al. A simple method to study motor and non-motor behaviors in adult zebrafish [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2019, 320: 16-25.