

水产品中14种麻痹性贝类毒素的定量分析检测

Simultaneous Determination of 14 Paralytic Shellfish Toxins in Seafood using LC-MS/MS

史晓媛, 朱怀恩

Shi Xiaoyuan, Zhu Huaien

SCIEX, JAPAC Solution Innovation Center

Keywords : paralytic shellfish toxins, seafood, QTRAP® 4500

麻痹性贝类毒素 (PSP) 是由亚历山大藻 (Alexandrium)、短链裸甲藻 (Gymnodinium catenatum)、巴哈马麦甲藻 (Pyrodinium bahamense) 等海洋微藻产生的一类强效神经毒素。如果这些有害藻类污染海洋, 被贝类食用, 这些毒素就会在贝类中积累, 从而对贝类消费者的健康构成严重威胁。为了保护公众安全, 许多国家已经制定了麻痹性贝类毒素检测和分析方法及其允许的最高限量标准。在中国, 水产中的麻痹性贝类毒素限量受到NY5073的监控, 在欧盟, EC NO. 853/2004规定了毒素的限量。

目前, 小鼠生物法 (MBA) 是国内外通用的检测方法, 该方法属于半定量/筛选法, 方法简单, 但是缺点是重现性差、灵敏度低、耗时长。液相色谱-荧光法 (LC-FLD) 可以对多种PSP进行定量和定性, 但该方法需经过柱前或者柱后衍生化才能进行荧光检测, 操作比较繁琐。本文建立了LC-MS/MS快速同时测定贝类产品基质中14种麻痹性贝类毒素的方法。由于PSP是一类强极性水溶性化合物, 且有许多对同分异构体 (图1), 使色谱分离存在一定的难度, 采用亲水作用色谱柱对PSP具有很好地保留, 并能将多种同分异构体分离开。此外, 贝类产品中含有蛋白质、脂肪、矿物质等营养成分, 样品提取过程中会产生很多基质干扰, 因此建立

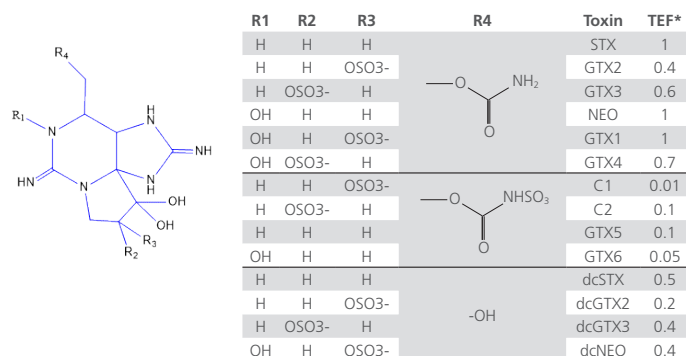


图1. 麻痹性贝类毒素结构. *- 毒性因子。

了一种快速有效的净化方法, 再结合超高效液相分离和高灵敏度的质谱, 使PSP检测更高效、准确, 同时节省劳动力。

实验流程

样品前处理

将蛤蜊、扇贝、贻贝等贝类样品进行均质, 用1%乙酸水超声提取。离心后取上清液过Cleanert® PEP-2固相萃取小柱 (Agela Technologies, P/N PE0603-2)。净化液超滤离心后用于LC-MS/MS分析。

液相条件

采用SCIEX Exion™ AD UHPLC系统进行液相色谱分离。色谱柱: TSK-GEL Amide-80 column (150 mm × 2.0 mm, 3.0 μm)。进样体积: 10 μL。流动相A为95%水含0.05%甲酸, 2 mM甲酸铵, 流动相B为95%乙腈含0.05%甲酸, 2 mM甲酸铵。

质谱条件

质谱采用SCIEX QTRAP® 4500 系统。

离子源为ESI源;

扫描方式为MRM采集模式, 正负离子同时扫描;

IS电压: 5500 V (+) / -4500 V (-);

离子源温度为600 °C



SCIEX ExionLC™ AD 液相 和 SCIEX QTRAP® 4500 质谱系统

表1. 液相梯度洗脱。流速0.4 mL/min，包括平衡时间，液相总运行时间为16 min。

Time (min)	%B
1.0	80
8.0	55
9.0	55
9.5	40
10.5	40
11.0	80
16.0	80

XIC from Data20190611-PSP.wiff (sample 38) - Matrix-Lv6, Experiment 2, -MRM (S=4500) (16 transitions): dcGTX3 1 (351.1/333.1), Gaussian smoothed

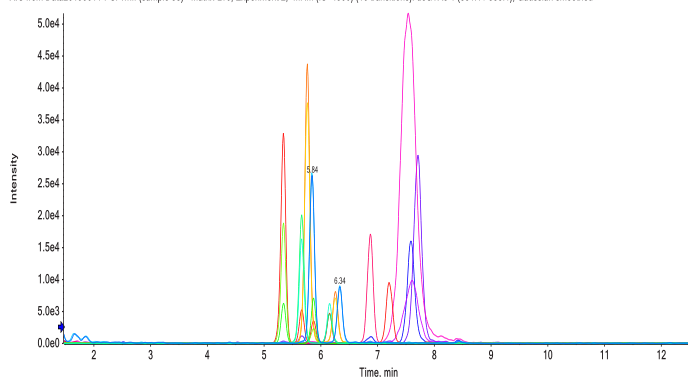


图2. 14种PSP提取离子色谱图。

结果与讨论

回收率高，重现性好

选取空白样品，在低浓度和高浓度水平下进行加标实验，通过前处理提取净化方法后进行分析，不同浓度加标均进行6次平行实验，回收率均在70%到115%之间，所有化合物的相对标准偏差RSD (n=6) 都小于20% (图3)。

灵敏度高、线性良好

根据每种化合物在仪器上的灵敏度不同，所有麻痹性贝类毒素的定量限在20 ng/g到200 ng/g之间，比国标要求的定量限低2~5倍 (图3)。由于基质效应，采用基质匹配曲线对未知样本进行定量。以STX 和GTX4为例，线性回归系数均大于0.99 (图4)。

结论

建立了一种快速、可靠的检测贝类中14种麻痹性贝类毒素的方法。正负模式切换确保分析物的最佳覆盖。简化了提取过程，

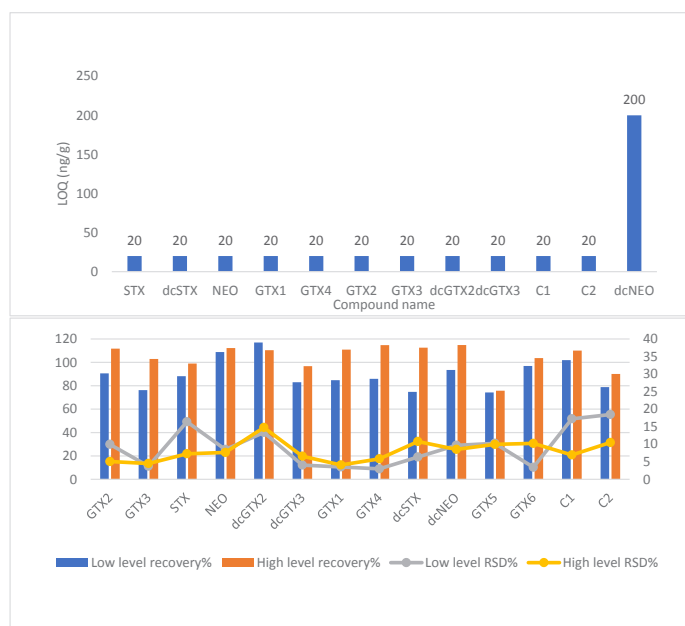


图3. 14种麻痹性贝类毒素的回收率和定量限。所有毒素的定量限 (LOQ) 在20 ng/g和200 ng/g之间。低、高浓度的加标回收率在70%到115%之间。这些结果表明，该方法具有良好的灵敏度和准确性。

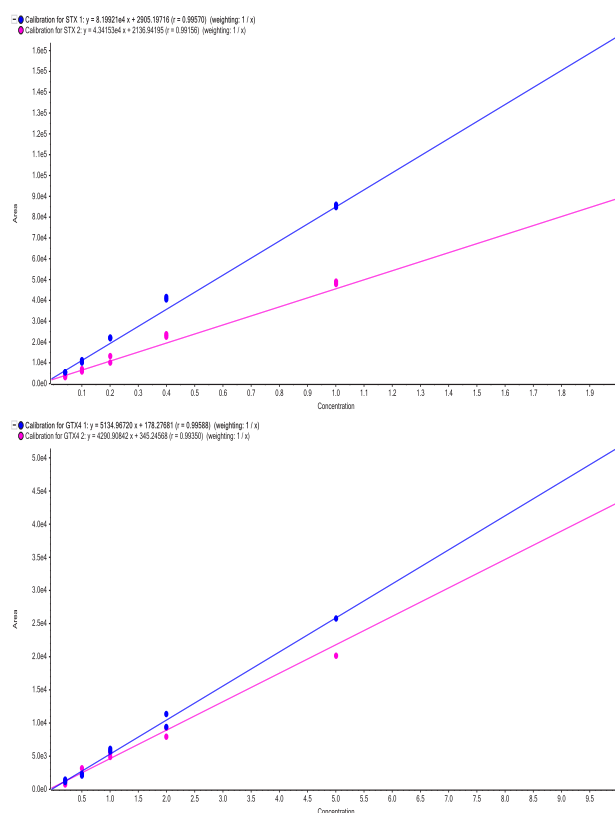


图4. STX (顶部) 的校准曲线从0.04 ng/mL到2 ng/mL和GTX4 (底部) 的校准曲线从0.2 ng/mL到20 ng/mL。每个化合物监测了两个离子对：定量离子对 (蓝色) 和定性离子对 (粉色)。两种代表分析物的r值均>0.99。

省去了额外的净化步骤，节省了前处理的时间和劳动力。在不同的贝类产品中进行方法验证，回收率高，重复性好。所有的贝类毒素的定量限在20 µg/kg 至200 µg/kg 之间。所有化合物定量限都满足标准要求。

参考文献

1. European Commission (EC) No. 853/2004
2. GB 5009.213-2016
3. Food safety supervise department 0305, No2(Japan)
4. Michael J. Boundy, Andrew I. Selwood, D. Tim Harwood, etc, Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitized carbon solid phase extraction. Journal of Chromatography A, 1387(2015) 1-12
5. Choonsik Shin, Haerim Jang, Hyejin Jo, etc, Development and validation of an accurate and sensitive LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish and tunicate. Food Control, 77(2017) 171-178

表2. 麻痹性贝类毒素离子对和保留时间列表。

化合物名称	保留时间 (min)	定量离子对	定性离子对
膝沟藻毒素2 (GTX2)	5.66	394.1>351.0	394.1>333.0
膝沟藻毒素3 (GTX3)	6.15	394.1>333.0	394.1>351.0
石房蛤毒素(STX)	7.57	300.1>204.1	300.1>179.2
新石房蛤毒素(NEO)	7.69	316.1>126.1	316.1>220.1
脱氨甲酰基膝沟藻毒素2 (dcGTX2)	5.84	351.1>333.1	351.1>164.1
脱氨甲酰基膝沟藻毒素2 (dcGTX3)	6.33	351.1>333.1	351.1>164.1
膝沟藻毒素1(GTX1)	5.75	410.1>367.1	410.1>349.1
膝沟藻毒素4(GTX4)	6.25	410.1>367.1	410.1>349.1
脱氨甲酰基石房蛤毒素(dcSTX)	7.59	257.1>126.1	257.1>180.0
膝沟藻毒素5(GTX5)	6.86	380.1>300.1	380.1>204.1
膝沟藻毒素6(GTX6)	7.20	396.1>316.1	396.1>298.1
脱氨甲酰基新石房蛤毒素 (dcNEO)	7.54	273.1>225.1	273.1>190.1
N-磺酰氨甲酰基类毒素2(C1)	5.34	474.1>394.0	474.1>376.1
N-磺酰氨甲酰基类毒素3(C2)	5.86	474.1>376.1	474.1>394.0

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-10052-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX