

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定双壳贝类中9种腹泻性贝类毒素

卢嘉丽^{1,2}, 郑仁锦¹, 管秋美², 黄宏南^{1,2}, 林守二¹, 杨艳¹

(1. 福建省疾病预防控制中心 福建省人兽共患病研究重点实验室, 福建 福州 350001;

2. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350004)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法,测定双壳贝类样品中9种腹泻性贝类毒素(DSP)。方法 样品经100%甲醇提取过滤后,经ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱分离,乙腈-0.01%氨水为流动相,流速为0.2 ml/min,柱温为30℃,采用电喷雾电离和正负离子分段扫描,在多反应监测(MRM)模式下测定游离态的毒素(原多甲藻酸1、原多甲藻酸2、原多甲藻酸3、大环内酯类扇贝毒素2、软海绵酸、鳍藻毒素1、鳍藻毒素2、虾夷扇贝毒素和类虾夷扇贝毒素)。当软海绵酸、鳍藻毒素1或鳍藻毒素2任一种或多种毒素呈阳性时,须采用碱水解将酯化的软海绵酸、鳍藻毒素1和鳍藻毒素2转化为游离态形式后,用UPLC-MS/MS测定其水解态毒素含量,外标法定量。结果 9种DSP在3个添加水平的平均回收率为85.9%~95.3%,相对标准偏差(RSD)为2.76%~4.18%,检出限(LOD)为4.4~9.9 μg/kg,定量限(LOQ)为14.7~33.0 μg/kg。结论 该方法操作简便、灵敏度高,适用于DSP的日常检测。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法;双壳贝类;腹泻性贝类毒素;食品污染物;食品安全;检测方法

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)06-0690-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.06.011

Determination of nine diarrhetic shellfish poisonings in bivalve molluscs by ultra performance liquid chromatography-mass/mass spectrometry

LU Jia-li^{1,2}, ZHENG Ren-jin¹, GUAN Qiu-mei², HUANG Hong-nan^{1,2},
LIN Shou-er¹, YANG Yan¹

(1. Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis Research, Fujian Center for Disease Prevention and Control, Fujian Fuzhou 350001, China; 2. College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fujian Fuzhou 350004, China)

Abstract: Objectice Determination method of nine diarrhea shellfish poisons by ultra performance liquid chromatography-mass/mass spectrometry (UPLC-MS/MS) in bivalve molluscs was established. **Methods** The samples were extracted by methanol and separated on a reversed phase ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column with acetonitrile-0.01% ammonium hydroxide as the mobile phase, with a flow rate at 0.2 ml/min and the column temperature of 30℃. The free toxins (AZA1, AZA2, AZA3, PTX2-b, OA, DTX1, DTX2, YTX and hYTX) in the samples were detected under positive and negative multiple reactions monitoring (MRM) mode through polarity switching between time segments. When any one or more toxins of OA, DTX1 or DTX2 were positive in the sample, the esterified OA, DTX1 and DTX2 were converted to the free form by alkaline hydrolysis and their hydrolyzed toxins were determined by UPLC-MS/MS and quantified by external standard method. **Results** The average recoveries ranged from 85.9% to 95.3% at three spiked concentrations with the relative standard deviation (RSD) of 2.76% to 4.18%. The detection limit (LOD) ranged from 4.4 to 9.9 μg/kg. The quantification limit (LOQ) ranged from 14.7 to 33.0 μg/kg. **Conclusion** The method was highly sensitive and simple, and was suitable for daily detection of diarrhea shellfish poisons in bivalve molluscs.

Key words: Ultra performance liquid chromatography-mass/mass spectrometry; bivalve molluscs; diarrhetic shellfish poisonings; food contaminants; food safety; testing methods

收稿日期:2017-08-28

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2015J01296)

作者简介:卢嘉丽 女 硕士生 研究方向为食品分析 E-mail:lujiali0612@163.com

通信作者:郑仁锦 男 主管技师 研究方向为食品分析 E-mail:zrjvs2008@163.com

腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisonings, DSP)是以大田软海绵酸及其衍生物为代表、摄食后可产生以腹泻为主要特征的存在于贝类体内的海洋生物毒性物质的总称^[1]。YASUMOTO等^[2]首先从紫贻贝的肝胰腺中分离出腹泻性贝类毒素,因被人食用后产生以腹泻为特征的中毒效应而得名。腹泻性贝类毒素是一类脂溶性物质,其化学结构是聚醚或大环内酯化合物,不易溶于水,热稳定性极高,通常的加热处理不易破坏。其主要分为软海绵酸(okadaic acid,OA)、鳍藻毒素(dinophysis toxins,DTX)、蛤毒素(pectenotoxins,PTX)、原多甲藻酸(azaspiracids,AZA)和虾夷扇贝毒素(yessotoxins,YTX)。

目前腹泻性贝类毒素的检测方法主要有小鼠生物检测法^[3-4]、酶联免疫(ELISA)法^[5]、高效液相色谱(HPLC)及其联用技术^[6-10]。小鼠生物检测法是美国公职分析化学家协会(AOAC)采用海洋生物毒素的检测方法,也是许多国家普遍采用的方法,但其灵敏度低,不具有特异性,不能确定样品中毒素成分和结构;ELISA法具有特异性强、简便、快速的优点,但是其难以对样品进行准确定量;HPLC法由于大部分毒素不具有荧光特异性,所以必须进行衍生化才能检测,且其操作较为繁琐,液相色谱-质谱联用法由于分析速度快、灵敏度高、选择性好、检测限低、可提供待测物的结构信息等成为理想的贝类毒素分析方法,几乎可以分析所有的贝类毒素。本试验建立了同时检测9种腹泻性贝类毒素的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法,并将建立的方法运用到2016年福建省市售92份双壳贝类样品的检测分析。该方法简便、灵敏度高、专属性强,可用于腹泻性贝类毒素的日常检测。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱、Sep-Pak® C18 固相萃取柱(500 mg/6 ml)均购自美国 Waters,API 5000 三重四极杆串联质谱系统(美国 SCIEX)、高速离心机。

腹泻性贝类毒素标准物质:OA(14.3 μg/ml,CAS:78111-17-8)、DTX1(15.1 μg/ml,CAS:81720-10-7)、DTX2(7.8 μg/ml,CAS:139933-46-3)、YTX(5.6 μg/ml,CAS:112514-54-2)、类虾夷扇贝毒素(hYTX,5.8 μg/ml,CAS:196309-94-1)、大环内酯类扇贝毒素2(PTX2-b,4.4 μg/ml,CAS:97564-91-5)、AZA1(1.30 μg/ml,CAS:214899-21-5)、AZA2(1.22 μg/ml,CAS:265996-92-7)、AZA3(1.04 μg/ml,CAS:265996-93-8)均购自加拿大海洋生物科学研究所。乙腈、甲醇均为色谱纯,甲酸、甲酸铵均为分

析纯。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

混合标准中间液的配制:分别将9种标准溶液用空白基质液配制成混合标准中间液,使OA、DTX1、DTX2、YTX、hYTX、PTX2-b、AZA1、AZA2、AZA3的浓度分别为0.06、0.06、0.04、0.09、0.09、0.006、0.001、0.003、0.001 μg/ml。-20℃以下避光保存。

基质标准系列工作液的配制:准确吸取混合标准工作液50、100、300、500、700 μl,用空白基质液定容到1 ml,得到基质标准系列工作液,-20℃以下避光保存。

1.2.2 样品预处理

游离态毒素提取:准确称取(2±0.01)g贝类样品于15 ml离心管中,加入9 ml 100%甲醇,涡旋混匀3 min,9 000 r/min离心10 min,取上清液至50 ml离心管中,重复一次上述操作;合并上清液用甲醇定容至20 ml,涡旋混匀,过0.22 μm微孔滤膜,供UPLC-MS/MS分析。

水解态毒素(OA类毒素总量)提取:当检出OA、DTX1和DTX2中任一种或多种毒素时,须采用碱水解将酯化的OA、DTX1和DTX2转化为游离态的OA、DTX1以及DTX2测定其总量。取1 ml游离态毒素提取液于15 ml离心管中,加入125 μl 2.5 mol/L氢氧化钠溶液,涡旋混匀,于76℃恒温反应40 min,迅速冷却至室温后,加入125 μl 2.5 mol/L盐酸和2.5 ml水,涡旋混匀,9 000 r/min离心5 min,待净化。

1.2.3 净化

将游离态毒素提取液加入已活化的Sep-Pak® C18固相萃取柱(500 mg/6 ml,依次用6 ml甲醇和6 ml水活化),待提取液流干后,用2 ml 20%甲醇水淋洗除杂,最后用2 ml 0.2%氨水甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,涡旋混匀,过0.22 μm微孔滤膜,供UPLC-MS/MS分析。

1.2.4 仪器条件

色谱:色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相A为0.01%氨水,B为乙腈。流速0.2 ml/min;进样量10 μl;柱温30℃;梯度洗脱程序:0~2 min 80%~70% A,2~6 min 70%~10% A,6~7 min 10% A,7~8.5 min 10%~80% A,8.5~10 min 80% A。

质谱:离子源为ESI,气帘气压力(CUR)2.07 bar,雾化气(GS1)3.45 bar,辅助气(GS2)3.45 bar,出口电压(CXP)25 V,离子源喷雾电压(IS)4 500 V,离子源温度(TEM)650℃,9种腹泻性

贝类毒素的质谱参数如表 1。

表 1 9 种腹泻性贝类毒素的质谱参数

Table 1 Parameters of UPLC-MS/MS for determination of nine kinds of DSP					
分析物	ESI 模式	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	去簇电 压/V	碰撞能 量/eV
OA	[M-H] ⁻	803.5	255.1 [*] /563.3	-200	-65/-60
DTX1	[M-H] ⁻	817.6	255 [*] /113.1	-200	-65/-85
DTX2	[M-H] ⁻	803.5	255 [*] /151.2	-200	-65/-75
YTX	[M-H] ⁻	570.7	467.7 [*] /396.6	-330	-41/-44
hYTX	[M-H] ⁻	1 155.5	1 075.5 [*] /869.5	-136	-65/-95
PTX2-b	[M+H] ⁺	876.6	823.4 [*] /213.2	170	34/54
AZA1	[M+H] ⁺	842.8	824.5 [*] /806.7	190	42/52
AZA2	[M+H] ⁺	856.9	838.9 [*] /821	200	42/54
AZA3	[M+H] ⁺	828.7	810.4 [*] /792.4	210	39/51

注：^{*}为定量离子

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

采用多重反应监测(MRM)模式,对 9 种腹泻性贝类毒素标准溶液进行一级离子扫描,发现 AZA1、

AZA2、AZA3 和 PTX2-b 在[M+H]⁺离子模式下质谱信号强,因此本试验对这 4 个组分选择[M+H]⁺离子,而 OA、DTX1、DTX2、YTX 和 hYTX 在[M-H]⁻离子强度较[M+H]⁺离子强度强,因此本试验对这 5 个组分选择[M-H]⁻离子,在获得分子离子峰后,进行二级质谱扫描,并进行 MRM,优化去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)等质谱参数,从而获得 1.2.4 中的质谱条件。

2.2 色谱条件的优化

选取 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱有利于亲脂性贝类毒素的保留,考察乙腈-0.1% 甲酸和乙腈-0.01% 氨水体系作为流动相对 9 种腹泻性贝类毒素的色谱分离效果,试验结果表明,在两种流动相体系下 AZA1、AZA2、AZA3、PTX2-b、OA、DTX1 和 DTX2 的峰形及灵敏度基本相同,而 YTX 和 hYTX 仅在乙腈-0.01% 氨水体系下出峰良好、灵敏度较高且保留时间稳定,因此本试验选取乙腈-0.01% 氨水体系作为流动相。其 MRM 色谱图见图 1。

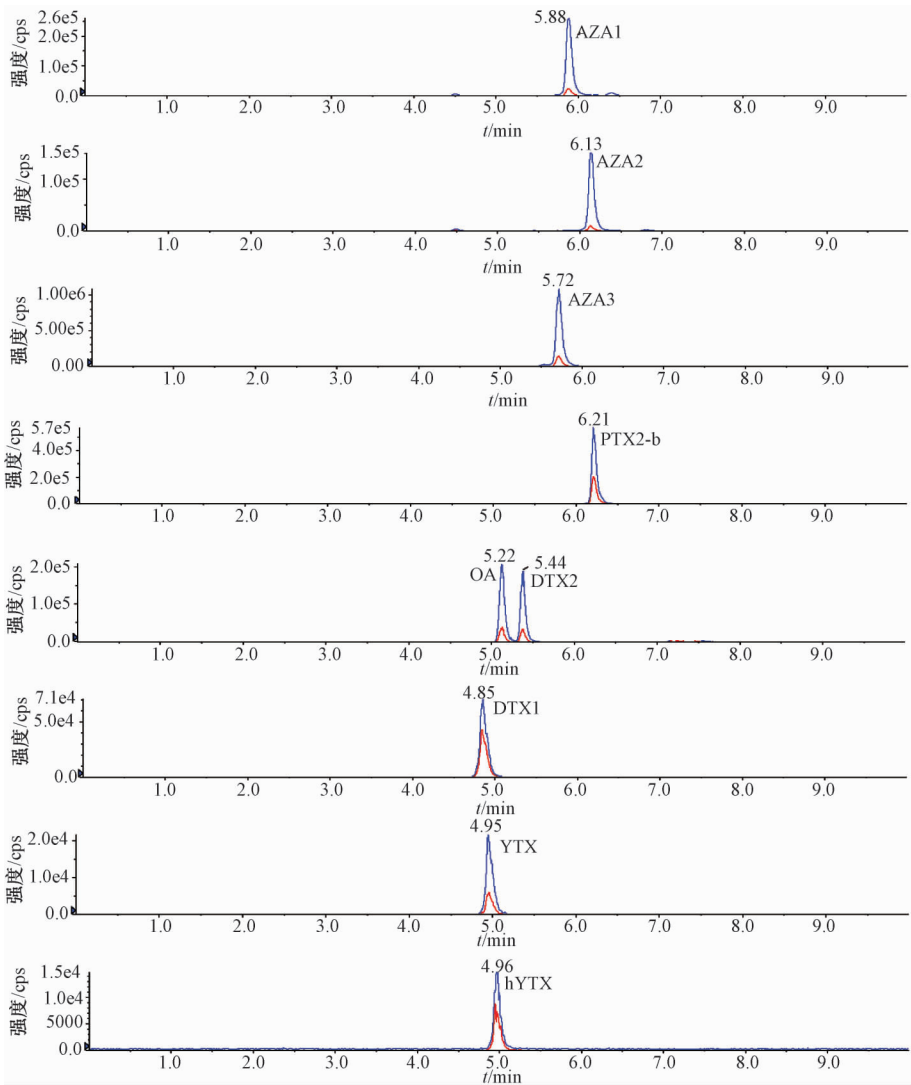


图 1 9 种腹泻性贝类毒素标准溶液的 MRM 色谱图
Figure 1 MRM chromatograms of nine kinds of DSP standard solution

2.3 OA 及 DTXs 含量的测定

如图 2,由于 OA 及 DTXs 类海洋生物毒素结构中的 R₃、R₄ 位置易酯化,主要酯化产物有 10 种,其在贝类体内既有游离态又有结合态存在,所

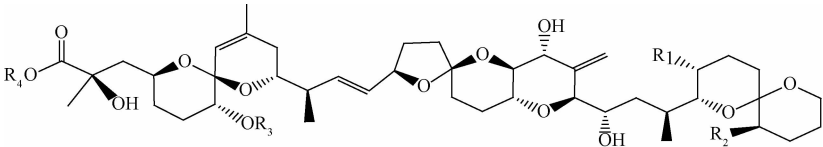


图 2 OA、DTXs 及其酯化物的化学结构通式
Figure 2 Chemical structure of nine kinds of OA, DTXs and their ester compounds

2.4 线性范围及检出限(LOD)

选取空白贝类样品作为空白基质,配制 9 种腹泻性贝类毒素的基质标准曲线,以定量离子峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,试验结果表明,9 种腹泻性贝类毒素线性关系均良好,以 3 倍信噪比($S/N\geq 3$)确定 9 种腹泻性贝类毒素的 LOD 为 4.4~9.9 $\mu\text{g/kg}$,以 10 倍信噪比($S/N\geq 10$)确定 9 种腹泻性贝类毒素的定量限(LOQ)为 14.7~33.0 $\mu\text{g/kg}$ 。结果见表 2。

表 2 9 种腹泻性贝类毒素的线性范围、回归方程、LOD 和 LOQ
Table 2 Linear range, regression equations, LODs and LOQs of nine kinds of DSP

分析物	线性范围 /($\mu\text{g/L}$)	回归方程	相关 系数 r	LOD /($\mu\text{g/kg}$)	LOQ /($\mu\text{g/kg}$)
OA	3~60	$Y=1400X-2130$	0.999 5	6.6	22.0
DTX1	3~60	$Y=1250X+1130$	0.999 8	6.6	22.0
DTX2	2~40	$Y=1250X-77.9$	0.999 9	4.4	14.7
YTX	4.5~90	$Y=1170X-3100$	0.996 5	9.9	33.0
hYTX	4.5~90	$Y=846X-1300$	0.995 4	9.9	33.0
PTX2-b	0.3~6	$Y=81500X-326000$	0.993 3	8.2	27.3
AZA1	0.05~1	$Y=102000X-139000$	0.998 8	6.7	22.3
AZA2	0.15~3	$Y=76100X-76700$	0.998 7	6.7	22.3
AZA3	0.05~1	$Y=99200X-332000$	0.992 8	6.7	22.3

2.5 加标回收率及精密度

分别对双壳贝类空白样品进行低、中、高 3 个不同浓度水平的加标试验,按 1.2.2 样品预处理,每个水平平行测定 6 次,计算回收率与相对标准偏差(RSD)。测得回收率为 85.9%~95.3%, RSD 为 2.76%~4.18%,结果见表 3。

2.6 实际样品测定

应用本试验所建立的检测方法检测福建省 92 份双壳贝类样品,共有 7 份阳性样品,其中 1 份样品检出 AZA2(其含量为 18.8 $\mu\text{g/kg}$)、5 份样品检出 DTX1 和 OA(其中游离态 DTX1 含量为 56.7~103 $\mu\text{g/kg}$;游离态 OA 含量为 38.2~51.6 $\mu\text{g/kg}$)、另外 1 份样品只检出 DTX1(其含量为 70.5 $\mu\text{g/kg}$)、贝类样品经过水解后,OA 和 DTX1 的含量都有明

以只检测其游离态 OA 和 DTXs 的含量是不准确的,本试验采用碱水解的方式将其酯化的 OA 和 DTXs 转化为游离态的 OA、DTX1 和 DTX2,测定其总 OA 类毒素。

表 3 贝类样品中 9 种 DSP 在不同水平加标回收率和 $RSD(n=6, \%)$

分析物	低浓度加标		中浓度加标		高浓度加标	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
OA	93.7	3.67	92.6	2.76	94.2	3.97
DTX1	88.3	3.32	90.5	3.24	95.3	3.58
DTX2	91.1	3.58	87.3	3.87	92.7	4.12
YTX	85.9	4.15	88.7	3.05	89.4	3.85
hYTX	86.5	3.52	89.6	3.97	91.2	3.85
PTX2-b	92.6	4.18	94.3	3.85	95.1	3.16
AZA1	89.9	3.76	92.4	3.83	91.7	2.98
AZA2	92.8	3.63	91.6	3.59	89.5	3.82
AZA3	89.3	3.88	89.9	4.06	91.6	3.46

显的增加(其中水解态 DTX1 含量为 101.3~167.7 $\mu\text{g/kg}$;水解态 OA 含量为 68.7~96.8 $\mu\text{g/kg}$),说明贝类样品中含有 OA 和 DTX1 毒素的酯化物形态,这些化合物均来自贝类的新陈代谢过程^[11]。

3 小结

本试验通过优化质谱和色谱条件,建立了超高效液相色谱-串联质谱法检测分析双壳贝类样品中 9 种腹泻性贝类毒素(AZA1, AZA2, AZA3, PTX2-b, OA, DTX1, DTX2, YTX 和 hYTX)的定量、定性方法。试验结果表明,9 种毒素在一定的浓度范围内具有良好的线性关系,该方法可操作性强、灵敏度高,方法的回收率、精密度等均能满足双壳贝类产品中腹泻性贝类毒素日常检测分析的需要。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 贝类中腹泻性贝类毒素的测定:GB/T 5009.212—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[2] YASUMOTO T, OSHIMA Y, YAMAGUCHI M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district[J]. Nihon-suisan-gakkai-shi, 1978, 44(11):1249-1255.

[3] 吴锋,江天久,张帆,等. 浙江南鹿海域双壳贝类的腹泻性贝毒分析[J]. 海洋环境科学, 2010, 29(4):492-495.

[4] 柳俊秀,胡乐琴,何培民. 腹泻性贝毒素软海绵酸的昆明系小

鼠生物学检测法的建立[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 446-451.

[5] 刘晓玉,徐静,黄连芝,等. 腹泻性贝类毒素及检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 4096-4102.

[6] 卢士英,张代辉,周玉,等. 大田软海绵酸液相色谱串联质谱检测方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(9): 1537-1539.

[7] 姚建华,谭志军,周德庆,等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中的原多甲藻类毒素[J]. 色谱, 2010, 28(4): 363-367.

[8] 母清林,方杰,万汉兴,等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 111-114.

[9] KROCK B, TILLMANN U, JOHN U, et al. LC-MS-MS aboard ship: tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic plankton from the North Sea[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 392(5): 797-803.

[10] CHRISTIAN B, LUCKAS B. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(1): 117-134.

[11] MARR J C, HU T, PLEASANCE S, et al. Detection of new 7-O-acetyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Toxicon, 1992, 30(12): 1621-1630.

实验技术与方法

兽药残留八联检测盘在调查肉类兽药残留中的应用

曹德康¹, 苏建忠¹, 张瑛¹, 黄甜², 吴智坚², 张杰², 赵林萍², 秦璐¹
(1. 武警后勤部疾病预防控制中心, 北京 102613;
2. 郑州中道生物技术有限公司, 河南 郑州 450000)

摘要:目的 比对国标方法, 评估自主研制兽药残留八联检测盘结果的可靠性, 为新产品的应用提供依据。方法 随机采取北京市大兴区市场上销售的猪、牛、羊的肌肉样品, 应用兽药残留八联检测盘测定是否含有兽药残留, 对检测出的阳性样品再用其相应的国标方法进行复检。结果 共检测了 176 份样品, 有 21 份样品中含有兽药残留, 检出率为 11.9%。其中 11 份样品含禁用药物克伦特罗、沙丁胺醇、氯霉素、培氟沙星和诺氟沙星, 剩余 10 份样品中的恩诺沙星和磺胺类药物在残留限量范围内。结论 市场上的肉类中仍有部分兽药残留。
关键词:肉类; 兽药残留; 八联检测盘; 胶体金免疫层析; 应用; 可靠性; 比较
中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2017)06-0694-04
DOI: 10. 13590/j. cjfh. 2017. 06. 012

Application of the detection plate in the investigation of veterinary drug residues in the meat food
CAO De-kang¹, SU Jian-zhong¹, ZHANG Ying¹, HUANG Tian², WU Zhi-jian²,
ZHANG Jie², ZHAO Lin-ping², QIN Lu¹
(1. Center for Diseases Control and Prevention of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 102613, China; 2. Zhengzhou Zhongdao Biotechnology Co., Ltd, Henan Zhengzhou 450000, China)

Abstract: **Objective** To compare the reliability of octuplet veterinary drug residue detection plate with the national standard method, and to provide the basis for the application of new products. **Methods** The samples of pork, beef, lamb were collected randomly from the markets in Daxing District. Samples were tested by the detection plate, for veterinary drugs residues. The positive samples were confirmed by the corresponding GB method. **Results** Twenty-one samples were detected veterinary drug residues among 176 samples, with the positive rate of 11.9%. Among them, 11 samples contained banned drugs, which were clenbuterol, salbutamol, chloramphenicol, pefloxacin and norfloxacin, and the remaining 10 samples had norfloxacin and sulfonamides, which were within the standard limits. **Conclusion** There were still some veterinary drugs in the meat on the markets.
Key words: Meat product; veterinary drug residues; eight-link detection plate; colloidal gold immunochromatographic;

收稿日期: 2017-09-22
基金项目: 武警后勤部卫生局科研课题 (WJWSB2015-01)
作者简介: 曹德康 男 主任医师 研究方向为军事预防医学及环境监测 E-mail: wjsjz@139.com
通信作者: 苏建忠 男 主治医师 研究方向为卫生监督及环境监测 E-mail: wjsjz@139.com