

· 论 著 ·

高效液相色谱 - 串联质谱联用测定水产品中麻痹性贝类毒素

陈裕华, 刘红河

摘要:目的 利用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)建立同时测定水产品 11 种麻痹性贝类毒素的快速分析方法。方法 采用乙酸(0.1mol/L)提取贝类或鱼类中的麻痹性贝类毒素,经 OASIS HLB 固相萃取小柱净化后,以乙腈-乙酸铵溶液作为流动相,液相色谱柱分离,通过改变乙腈在流动相中的比例和流速,采用 HPLC/MS/MS 电喷雾电离(ESI) 阳离子模式,多反应监测(MRM)方式检测,外标法定量。结果 11 种 PSP 在不同浓度下的平均加标回收率为 90.7%~96.2%,线性相关系数均大于 0.998,相对标准偏差(RSD)均小于 9.3%,定量检出限在 0.12~0.24ng/g。结论 HPLC-MS/MS 法操作简便,灵敏度、精密度高,重现性较好,对水产品中痕量麻痹性贝类毒素具有良好的分析效果。

关键词: 高效液相色谱 - 串联质谱; 麻痹性贝类毒素; 水产品

中图分类号 R155.5 文献标识码 A 文章编号:1009-9727(2012)6-656-04

Determination of paralytic shellfish toxins in aquatic products by high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. CHEN Yu-hua, LIU Hong-he. (Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055 Guangdong, P. R. China)

Abstract Objective To establish a method for determination of 11 paralytic shellfish toxins in aquatic products simultaneously by high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. Methods Homogenized food samples were soaked in 0.1 mol/L HAc and ultrasonically extracted for 15 minutes, and cleaned up by solid phase extraction of OASIS HLB column. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method was used to determinate 11 paralytic shellfish toxins, which were separated by HILIC with mobile phase of acetonitrile and ammonium acetate. Analyte identification and quantification were performed by electrospray ionization (ESI) in positive mode using multiple reaction monitoring. Results The correlation coefficients of calibration curve were above 0.998. The detection limits of the method were 0.12~0.24ng/g (S/N=10). The spiked recoveries ranged from 90.7% to 96.2% (n=7). And the relative standard derivations were lower than 9.3%. Conclusion The method was simple, effective, and accurate and suitable for determination of paralytic shellfish toxin in aquatic products.

Key words: High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Paralytic shellfish poisoning toxins; Aquatic products

由于麻痹性贝类毒素(Paralytic shellfish poisoning, PSP)由毒甲藻或产毒微生物产生,通过食物链蓄积于贝类或一些鱼类的以石房蛤毒素(saxitoxin)为基本骨架的一类衍生化合物,目前已发现的 PSP 毒素多达 20 种以上,对海洋资源、水产养殖业及人类健康危害极大,成为当今海洋科学研究的热点^[1-2]。PSP 主要包括石房蛤毒素(saxitoxin, STX)、新石房蛤毒素(neo-STX)和膝沟藻毒素(GTX)及其它们的衍生物。PSP 毒性较大,食入少量的 PSP 毒素即可引起神经系统的疾病,严重时会导致呼吸系统麻痹甚至死亡。

目前 PSP 毒素的测定方法有酶联免疫法^[3-4]、放射免疫法^[4]、组织细胞培养法^[5]、液相色谱法^[5-8]和液

相色谱/质谱法(LC/MS)^[9]。酶联免疫法(ELISA)和放射免疫法(RIA)灵敏度较高,但由于无法准确定量,主要用作定性筛查;小鼠生物法灵敏度和选择性有限,通常也只用于筛选分析;液相色谱法,需进行衍生后测定,操作较为繁琐,干扰因素多,实用意义不大;液相色谱/质谱联用法,主要用来对 PSP 毒素的结构分析,但不适合于定量检测。本项研究测定水产品中麻痹性贝类毒素的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法,探讨其应用效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂 Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);API 3000 串联三重四级杆质谱仪(美

作者单位:深圳市疾病预防控制中心理化检验科 广东 深圳 518055

作者简介:陈裕华(1977~),男,主管技师,主要从事理化检验工作。

国应用生物系统公司) 配有 Turbo-Ionspray 源、针泵以及 Analyst 1.4 数据处理系统;高纯氮气(99.99%);液相色谱柱(日本 TOSOH 公司,TSK-GEL Amide-80, 2.0mm×250mm×5.0μm)。Allegra X-22R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);匀浆机(德国 IKA 公司);全自动吹氮浓缩仪(美国 Caliper 公司);漩涡振荡器(德国 IKA 公司);固相萃取柱(OASIS HLB 3ml,60mg,美国 Waters 公司);水系针筒式微孔滤膜过滤器(0.45μm)。

1.1.2 标准溶液 麻痹性贝毒标准溶液包括 GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, dcGTX2, dcGTX3, GTX5 (B1), STX, dcSTX, neoSTX, dcneoSTX(购自加拿大海洋生物科学研究所)。

1.1.3 LC/MS/MS 分析条件 液相色谱条件为流动相 A:2mmol/L 乙酸铵+0.1%甲酸, B:乙腈+0.1%甲酸, 梯度洗脱 0~0.5min 10%流动相 A, 0.6~25.0min 40%~80% 流动相 A, 25.1~30.0min 10%流动相 A, 流速 0.20ml/min; 柱温 30℃, 进样体积 20μl。

质谱条件为离子源为 ESI(+), 检测方式为多反应监测(MRM)方式。质谱条件具体为喷雾电压 5500V, 离子源温度 380℃, 雾化气压力 10psi, 气帘气压力 6psi, 碰撞气 7L/min, 源内气 11L/min, 辅助气 70L/min, 去簇电压 30V, 驻留时间 50sec, 部分 MRM 参数见表 1。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的测定 将 11 种 PSP 毒素混合标准用 0.1mol/L 乙酸溶液稀释成适当浓度的混合标准系列, 取 20ml 混标进样测定。以毒素浓度(mg/L)为横坐标, 定量离子对峰度比为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.2 样品处理 取水产(贝类、鱼类)样品可食用部分匀浆, 均质后称取样品 5.0g 于 50ml 离心管中, 加入 0.1mol/L 乙酸溶液 20ml, 超声提取 5min, 然后以 5000rpm 离心 10min, 离心后取 2ml 上清液过预先用 6ml 甲醇和 6ml 30mmol/L HAc 活化的 OASIS HLB 固相萃取柱, 滤液采用 0.45μm 水系微孔滤膜过滤后上机供 LC-MS/MS 测定。

2 结果

2.1 质谱条件 采用流动注射直接进样, 对质谱参数进行优化, 得到最优化质谱参数, 及最优化条件下的 MRM 质谱图, 见表 1 和图 1。

2.2 线性范围和检出限 配制不同浓度的 PSP 毒素标准系列, 按上述条件进行分析, 以各毒素浓度为横

表 1 麻痹性贝类毒素部分 MRM 参数表

Table 1 Parameters of paralytic shellfish toxins in multiple reaction monitoring detection

毒物 Toxin	母离子 (amu)	子离子 (amu)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	FP (V)
GTX2	396.0	316.1*	9	18	16	250
	396.0	298.1	9	28	16	250
GTX3	396.0	316.1*	9	18	16	250
	396.0	298.1*	9	28	16	250
GTX1	412.1	332.1*	8	14	9	250
	412.1	394.0	8	18	10	250
GTX4	412.1	332.1*	8	14	9	250
	412.1	394.0*	8	18	10	250
dcGTX2	353.1	273.1*	8	16	20	250
	353.1	335.1	8	18	20	300
dcGTX3	353.1	273.1	8	16	20	250
	353.1	335.1*	8	18	20	300
GTX5(B1)	380.1	300.1*	8	23	20	210
	380.1	257.1	8	19	18	210
STX	300.2	204.1*	8	33	16	210
	300.2	179.0	8	34	16	210
dcSTX	257.1	126.1*	10	30	12	210
	257.1	138.1	9	35	14	250
neoSTX	316.1	220.1*	8	32	16	250
	316.1	138.1	8	42	13	250
dcneoSTX	273.1	180.0*	8	30	14	210
	273.1	126.0	8	32	11	210

* 为定量离子 Quantota Tiveiou

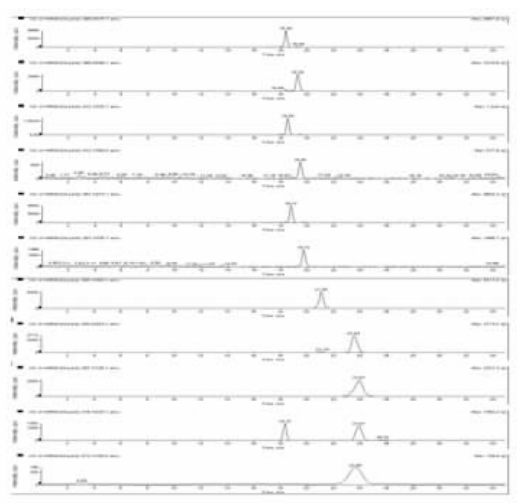


图 1 11 种麻痹性贝类毒素的多反应监测质谱图

Fig 1 Multiple Reaction Monitor (MRM) mass spectra of 11 paralytic shellfish toxins

坐标, 以各毒素峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线并计算线性回归方程, 得到线性方程及相关系数见表 2; 按取样量 5g, 以 3 倍信噪比(S/N)所对应的待测物的浓度计算方法检出限(LOD), 以 10 倍信噪比(S/N)所

表 2 标准曲线和检出限

Table 2 Calibration curve and detection limits of 11 paralytic shellfish toxins

毒素种类 Toxin	线性范围 Liner range(mg/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 coefficient	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
GTX2	0.014~0.47	$Y=2.86 \times 10^5 x - 3.17 \times 10^4$	0.9999	0.036	0.12
GTX3	0.0047~0.15	$Y=7.38 \times 10^5 x - 4.47 \times 10^3$	0.9999	0.054	0.18
GTX1	0.014~0.44	$Y=3.91 \times 10^5 x - 5.49 \times 10^4$	0.9997	0.063	0.21
GTX4	0.0044~0.14	$Y=1.95 \times 10^5 x - 920$	0.9993	0.060	0.20
dcGTX2	0.0013~0.40	$Y=3.14 \times 10^5 x - 3.28 \times 10^4$	1.0000	0.050	0.17
dcGTX3	0.0034~0.11	$Y=4.19 \times 10^5 x - 2.23 \times 10^3$	0.9982	0.071	0.24
GTX5(B1)	0.0078~0.25	$Y=2.63 \times 10^5 x - 2.42 \times 10^3$	0.9998	0.045	0.15
STX	0.0063~0.20	$Y=1.72 \times 10^5 x - 4.42 \times 10^3$	0.9983	0.051	0.17
DcSTX	0.005~0.16	$Y=2.02 \times 10^5 x - 4.24 \times 10^3$	0.9987	0.046	0.15
neoSTX	0.01~0.32	$Y=7.75 \times 10^5 x - 663$	0.9996	0.037	0.12
dcneoSTX	0.0041~0.13	$Y=1.98 \times 10^5 x - 157$	0.9985	0.040	0.13

对应的待测物的浓度计算方法定量下限(LOQ) 结果见表 2。从表中结果可以看出, 相关系数 (r) 在 0.9982~0.9999 之间, LOD 在 0.036~0.071ng/g 之间, LOQ 小于 0.24ng/g, 满足痕量分析要求。

2.3 加标回收率和精密度取 5g 均质后的样品分别加入 6 种不同浓度 PSP 标准, 进行加标回收试验。结果显示, 在不同浓度水平下各 PSP 毒素的加标回收率均在 90.7%~96.2% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 在 3.2%~9.3% 之间, 见表 3。

表 3 PSP 加标回收测定结果($n=6$)Table 3 The spiked recoveries of 11 paralytic shellfish toxins ($n=6$)

毒素 Toxin	添加量(ng) Additive Amount	回收率(%) Recovery rate	平均回收率(%) Average recovery rate	RSD(%)
GTX2	2.82	85.2~101.5	93.5	7.7
GTX3	0.90	87.4~99.2	95.4	4.9
GTX1	2.64	84.5~97.6	93.6	9.3
GTX4	0.84	92.1~99.7	96.2	3.3
dcGTX2	2.40	88.6~99.1	93.8	5.1
dcGTX3	0.66	83.5~96.9	90.7	6.6
GTX5(B1)	1.50	86.0~101.6	92.9	8.2
STX	1.20	81.5~97.9	94.7	6.3
dcSTX	0.96	85.9~97.6	92.6	6.0
neoSTX	1.92	80.9~98.8	91.9	8.6
dcneoSTX	0.78	88.0~98.3	92.5	3.2

2.4 样品测定 从市场上采集了牡蛎、扇贝和海洋鱼类共 16 份样品, 按上述方法进行操作分析, 在其中两份牡蛎和三份扇贝中不同程度检出几种贝类毒素, 浓度在 3.0~360 μ g/100g 之间, 其中 GTX4 和 GTX5 含量较高, 见表 4。

3 讨论

3.1 前处理条件的确定 水产品样品成分复杂, 共存物对测定有很大干扰, 影响色谱柱寿命, 并可能污染离子源喷嘴导致灵敏度下降, 因此需要对样品进行净化。鉴于 PSP 毒素为碱性的水溶性化合物, 易溶于稀酸溶液, 我们采用 0.1mol/L 醋酸对样品进行提取^[3], 再采用 C18 固相萃取小柱对样品进行净化处理。通过对几种的 C₁₈ 小柱测定结果的比较, 结果显示 Waters OASIS HLB 小柱净化的样品回收率较高, 回收率大于 87.5%, 满足分析要求, 因此, 本方法采用 OASIS HLB 柱来对样品进行净化。

3.2 色谱条件的确定 由于 PSP 毒素为强极性化合物, 在 C18 固相萃取柱上几乎无保留, 很难进行分离分析^[7]。特别是对 GTX1 和 GTX4、GTX2 和 GTX3、dcGTX2 和 dcGTX3 三组互为同分异构体的几种物质, 它们母离子和子离子一致, 如果不能达到基线分离将无法准确单独定量。本方法结合 PSP 毒素的理化特性, 通过对几种色谱柱进行比较测定, 选择对极性化合物有很好保留的日本 TOSOH 公司 TSK-GEL Amide-80HILIC 柱^[9]进行分离, 通过多种溶剂和缓冲盐做流动相的色谱行为的对比, 发现采用乙腈 + 2mmol/L 乙酸铵做为流动相, 梯度洗脱测定十一种 PSP 毒素的灵敏度较高, 峰形和分离效果较好, 另外, 为提高待测物离子化效率, 在流动相中加入了 0.1%(v/v) 甲酸。

3.3 质谱条件的确定 根据欧盟委员会非强制执行法案 2002/657/EC 的规定, 对禁用药物进行确证检测的方法要求达到规定的 4 个确证点(其中一个母离子 1IP, 一个子离子 1.5IP), 对每种组分, 选取丰度较强的两个子离子作为定性和定量确证的质量控制依据。

表 4 部分水产品中麻痹性贝类毒素的检测结果(μ g/100g)

Table 4 Results of determination of same paralytic shellfish toxins in aquatic products

样品 Samples	GTX2	GTX3	GTX1	GTX4	dcGTX2	dcGTX3	GTX5(B1)	STX	dcSTX	neoSTX	dcneoSTX
牡蛎 1Oyster1	ND	ND	3.0	ND	ND	ND	61.2	ND	ND	ND	ND
牡蛎 2Oyster2	ND	ND	ND	18.7	ND	ND	360.0	ND	ND	ND	ND
牡蛎 3Oyster3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
牡蛎 4Oyster4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
牡蛎 5Oyster5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
牡蛎 6Oyster6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
扇贝 1Scallops1	4.1	ND	ND	51.7	ND	ND	198.0	ND	ND	ND	ND
扇贝 2Scallops2	ND	ND	ND	200.0	ND	ND	79.6	ND	ND	ND	ND
扇贝 3Scallops3	ND	3.5	26.1	8.1	ND	ND	233.0	ND	ND	ND	ND
扇贝 4Scallops4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
扇贝 5Scallops5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
扇贝 6Scallops6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
石斑鱼 Grouper	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
左口鱼 Sole fish	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
老虎斑 Tiger grouper	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
青斑 Green grouper	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注 ND 为未检出 Note * ND means negative

分别将试样和标准系列工作液注入液相色谱 - 质谱联用仪中,记录总离子流图、质谱图及各种贝类毒素峰面积,以保留时间及碎片离子的丰度定性,要求所检测的贝类毒素色谱峰信噪比(S/N)大于 3,被测试样中目标化合物的保留时间与标准溶液中目标化合物的保留时间一致,同时被测试样中目标化合物的相应监测离子丰度比与标准溶液中目标化合物的色谱峰丰度比一致。

本研究通过对前处理、色谱、质谱等条件的摸索,建立了适宜测定水产品中麻痹性贝类毒素的高效液相色谱 - 串联质谱(HPLC- MS/MS)分析方法,方法操作简便,灵敏度高,重现性好,能同时分析 11 种 PSP 毒素,用于实际样品的分析有较好的效果。

参考文献:

[1] Liu ZY, Ji R. Comparison of criteria for paralytic shellfish poisons in shellfish aquatic products in various countries [J]. China Trop Med 2006 6(1):176-178. (In Chinese).
(刘智勇, 计融. 各国贝类水产品中麻痹性贝类毒素限量标准的对比[J]. 中国热带医学 2006 6(1):176-178.)

[2] Liu ZY, Ji R. Advance in the research of paralytic shellfish poisons [J]. China Tropical Medicine 2006 6(2):340-344. (In Chinese).
(刘智勇, 计融. 麻痹性贝类毒素研究进展 [J]. 中国热带医学, 2006 6(2):340-344.)

[3] Usup G, Leaw CP, Cheah MY. Analysis of paralytic shellfish poisoning toxin congeners by a sodium channel receptor binding assay [J].

Toxicon 2004 44(1):37-43.

[4] Van den Top HJ, Elliott CT, Haughey SA, etc. Surface plasmon resonance biosensor screening method for paralytic shellfish poisoning toxins: a pilot interlaboratory study [J]. Anal Chem. 2011 83 (11):4206-4213.

[5] Diener M, Erler K, Christian B. Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins [J]. J Sep Sci. 2007 30(12):1821-1826.

[6] Van de Riet J, Gibbs RS, Muggah PM, et al. Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters and scallops: collaborative study[J]. J AOAC Int. 2011 94(4):1154-1176.

[7] Cervantes Cianca RC, Pallares MA, Durán Barbosa R. Application of precolumn oxidation HPLC method with fluorescence detection to evaluate saxitoxin levels in discrete brain regions of rats [J]. Toxicon 2007 49(1):89-99.

[8] Chen D, Fang XM, Fan X, et al. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography with fluorescence detection using precolumn derivatization with hydrogen peroxide oxidation [J]. Chinese J. Anal Chem 2006 34 (7):933-936(In Chinese).
(陈迪, 方晓明, 樊祥, 等. 过氧化氢柱前荧光衍生化液相色谱法测定麻痹性贝毒的研究[J]. 分析化学 2006 34(7):933-936.)

[9] Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E. Investigation of the toxin profile of Greek mussels Mytilus galloprovincialis by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Toxicon. 2006 47(2):174-181.

收稿日期 2012-02-16 编辑 符式刚