

LCMS-8045 测定扇贝中的软骨藻酸

LCMSMS-479

摘要：本文参考《GB 5009.198-2016 食品安全国家标准 贝类中失忆性贝类毒素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了扇贝中软骨藻酸的分析方法。扇贝肉搅碎后以 50% 甲醇溶液提取，强阴离子固相萃取柱净化后，以 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。以保留时间和离子对相对丰度比为定性依据，空白样品处理后，加标制作外标法校准曲线，来定量检测软骨藻酸含量。结果表明：软骨藻酸在样品中的定量限低于 0.01 $\mu\text{g/g}$ ，满足标准要求；空白样品处理后添加软骨藻酸，在 2.5-1000 ng/mL 的线性范围内，加标曲线各标点浓度准确度分别在 90.5-113.2% 之间，R 为 0.9991；Carryover 考察结果表明 ULOQ 加标样品进样后无明显系统残留；空白样品添加不同浓度软骨藻酸后进行处理，检测结果满足标准关于定性和定量结果的要求，回收率在 89.4-106.6% 之间。该方法灵敏度和准确度高，适合贝类中的软骨藻酸检测。

关键词：LCMS-8045 贝类 软骨藻酸

软骨藻酸 (Domoic acid) 是一种天然神经性氨基酸，为非蛋白氨基酸的一种，主要由某些拟菱形藻属和菱形藻属的海洋硅藻代谢产生。食用含软骨藻酸的贝类后，可引起食用者记忆丧失、眩晕、昏迷甚至死亡等症状，根据这种毒素的中毒特征，其被命名为记忆丧失性贝毒 (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)。

《GB 5009.198-2016 食品安全国家标准 贝类中失忆性贝类毒素的测定》推荐的检测方法包括：酶联免疫吸附法、液相色谱法和液相色谱 - 串联质谱法。

本文参考该标准第 3 法，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了扇贝中软骨藻酸的分析方法。该方法灵敏度和准确度高，适合贝类中软骨藻酸的检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045, 具体配置为 LC-40B X3 (输液泵), SIL-40C X3 (自动进样器), CTO-40S (柱温箱), CBM-40 系统控制器, LCMS-8045 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18, 100 mm \times 2.1 mm I.D., 2.7 μm (SGLC, P/N: 227-32003-03)

流动相：A-2 mM 甲酸铵水溶液；B- 甲醇

流速：0.35 mL/min

柱温：30 $^{\circ}\text{C}$

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	10
1.30	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.60	Pumps	Pump B Conc.	10
6.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8045

离子源: ESI+

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

干燥气流速: 10.0 L/min

加热模块温度: 300°C

DL 温度: 250°C

离子源温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

序号	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
1	软骨藻酸	312.20	266.10*	-22.0	-17.0	-30.0
			248.10	-22.0	-16.0	-26.0

* 定量离子对

1.3 样品前处理

(1) 试样提取: 参照《GB 5009.198-2016 食品安全国家标准 贝类中失忆性贝类毒素的测定》中“18.3 试样提取”部分, 称取 5 g 粉碎后的试样于 50 mL 离心管中, 加入 12 mL 甲醇溶液 (50%), 涡旋混合 1 min, 超声提取 10 min, 再涡旋混合 1 min, 以 4000 r/min 离心 10 min, 移出上清液。残渣再用 5 mL 甲醇溶液 (50%) 重复提取两次, 合并上清液, 以甲醇溶液 (50%) 定容至 25 mL, 混匀。于 -18°C 放置 2 h 后, 5°C 下 10000 r/min 离心 15 min, 上清液待净化。

(2) 试样净化: 参照《GB 5009.198-2016 食品安全国家标准 贝类中失忆性贝类毒素的测定》中“18.4 试样净化”部分, 准确称取提取液 5 mL, 于预先活化好的强阴离子固相萃取柱中, 分别用 5 mL 乙腈溶液 (10%) 和 0.3 mL 甲酸溶液 (0.3%) 淋洗, 弃去流出液, 用甲酸溶液 (0.3%) 4 mL 洗脱, 收集洗脱液, 用甲酸溶液 (0.3%) 稀释至 4 mL, 混匀后以 0.22 μm 的水相滤膜过滤后待测。

结果讨论

2.1 专属性

空白样品和空白基质加标样品 (LLOQ) 的 MRM 色谱图如图 1 所示, 空白样品无干扰。

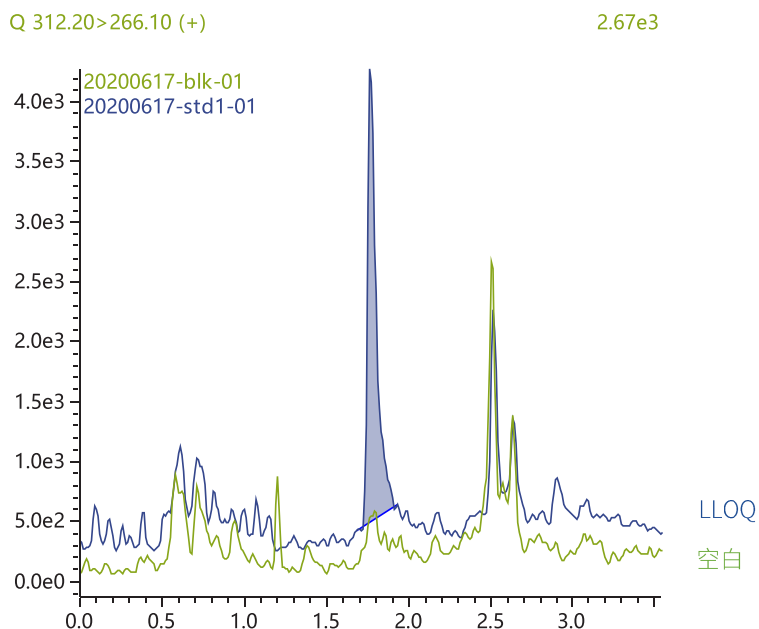


图 1 空白样品和空白基质加标样品 MRM 色谱图

2.2 定量限

参照标准，空白样品中添加 0.01 $\mu\text{g/g}$ 的软骨藻酸，前处理后进样样品浓度为 2.5 ng/mL (标准中校准曲线的 LLOQ)，色谱图如图 2 所示，满足标准中关于定量限的要求。

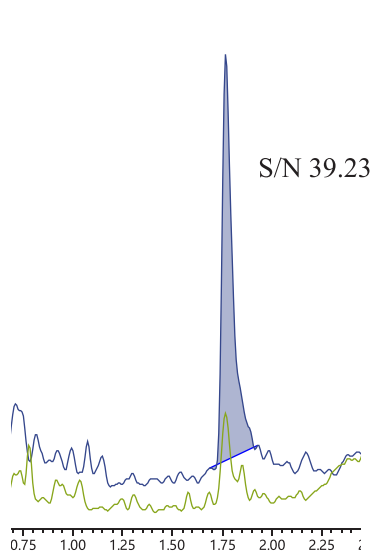


图 2 空白加标 0.01 $\mu\text{g/g}$ 样品 MRM 色谱图

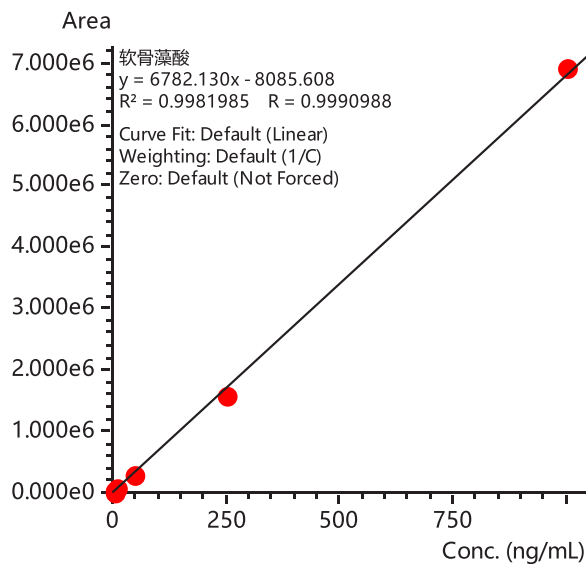


图 3 校准曲线

2.3 校准曲线

空白样品处理后添加软骨藻酸，配置浓度分别为 2.5、5、10、50、250、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的加标样品，外标法建立校准曲线如图 3 所示，线性方程、相关系数及准确度如表 3 所示。

表 3 校准曲线参数

目标物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 r	准确度 (%)
软骨藻酸	2.5-1000	$Y = (6782.130)X - (8085.608)$	0.9991	90.5-113.2

2.4 Carryover 考察

ULOQ 加标样品进样后，以空白样品进样得色谱图如图 4 所示，软骨藻酸保留时间处无明显色谱峰。

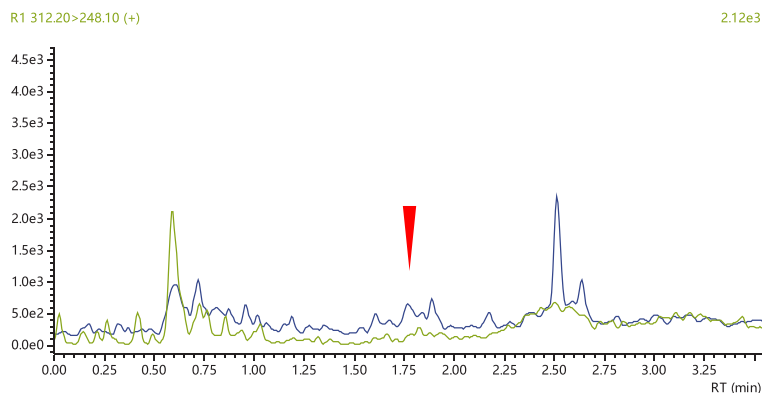


图 4 Carryover 考察

2.5 重复性考察

对不同浓度的基质加标样品分别连续分析 6 次，计算保留时间和峰面积的 RSD. 结果见表 4，保留时间 RSD 均不高于 0.18%，峰面积 RSD 均不高于 4.63%。

表 4 保留时间和面积 RSD

名称	浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD (%)
基质加标样品	2.5	0.14	4.63
	50	0.18	1.23
	1000	0.07	0.56

2.6 回收率及平行样考察

空白样品中添加浓度分别为 20 ng/g(SA1) 和 400 ng/g(SA2) 的软骨藻酸后进行前处理，各平行制备两份，上机测定。

参照标准规定，以保留时间（与标曲样品保留时间平均值相对偏差不高于 2.5%）和离子对相对丰度比（范围由标曲样品离子丰度比平均值确定，本文中离子丰度比为 10~20%，要求最大允许相对偏差范围为 30%）为定性依据，定性结果如表 5 所示。保留时间以及离子丰度比相对偏差均未超出规定范围，符合要求。

表 5 定性结果

No.	样品	保留时间 (min)	保留时间相对偏差 (%)	离子丰度比	离子丰度比相对偏差 (%)
1	标曲样品	1.778	-	19.57	-
2	SA1- 平行 1	1.793	0.84	21.30	8.84
3	SA1- 平行 2	1.795	0.96	20.93	6.95
4	SA2- 平行 1	1.797	1.07	20.09	2.66
5	SA2- 平行 2	1.798	1.12	20.17	3.07

参照标准规定，各待测样品均记录 2 份平行处理样品中目标物的含量，按公式 $RD = (|C1 - C2| / C_{\text{平均}}) * 100\%$ 计算相对相差，结果应不超过 15%，结果如表 6 所示，实际样品的双平行处理样相对相差均不高于 15%，符合要求。回收率在 89.4-106.6% 之间。

表 6 定量结果及回收率

No.	样品	含量 (ng/g)			双样相对相差 (%)	平均回收率 (%)
		平行 1	平行 2	平均值		
1	SA1	19.16	23.45	21.31	10.09	106.6
2	SA2	348.36	366.85	357.60	2.58	89.4

■ 结论

本文参考《GB 5009.198-2016 食品安全国家标准 贝类中失忆性贝类毒素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了扇贝中软骨藻酸的分析方法。扇贝肉搅碎后以 50% 甲醇溶液提取，强阴离子固相萃取柱净化后，以 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。以保留时间和离子对相对丰度比为定性依据，空白样品处理后，加标制作外标法校准曲线，来定量检测软骨藻酸含量。结果表明：软骨藻酸在样品中的定量限低于 0.01 $\mu\text{g/g}$ ，满足标准要求；空白样品处理后添加软骨藻酸，在 2.5-1000 ng/mL 的线性范围内，加标曲线各标点浓度准确度分别在 90.5-113.2% 之间，R 为 0.9991；Carryover 考察结果表明 ULOQ 加标样品进样后无明显系统残留；空白样品添加不同浓度软骨藻酸后进行处理，检测结果满足标准关于定性和定量结果的要求，回收率在 89.4-106.6% 之间。该方法灵敏度和准确度高，适合贝类中的软骨藻酸检测。

岛津应用云

