

高效液相色谱 - 串联质谱法测定麻痹性贝类毒素

1-00364-CN

小林 真奈美

特点描述

- ◆ 使用 LC-MS/MS 法可对石房蛤毒素 (STX)、脱氨甲酰基石房蛤毒素 (dcSTX)、新石房蛤毒素 (NEO)、脱氨甲酰基新石房蛤毒素 (dcNEO)、膝沟藻毒素 (GTX1~4)、膝沟藻原浆毒素 (C1~2)、脱氨甲酰基膝沟藻毒素 (dcGTX2、dcGTX3) 等 12 个毒素种类同时进行分析。
- ◆ 使用简单的 LC 系统可实现 15 分钟 / 次的快速分析。

简介

贝类毒素主要由双壳贝类 (扇贝、蛤蜊、牡蛎等) 捕食有毒海洋甲藻, 在体内积累毒素而产生的。人类食用这些有毒的贝类可能会出现中毒症状, 根据中毒症状不同, 贝类毒素分为腹泻性贝类毒素、麻痹性贝类毒素、神经性贝类毒素、记忆缺失性贝类毒素等。日本出现的中毒症状主要是由麻痹性贝毒和腹泻性贝毒引起的, 其毒素通常是由多个毒素组构成。

日本根据食品卫生法设定了贝类毒素的相关安全标准、监管限值 (2015 年 3 月 6 日食安发 0306 第 1 号)。其中规定, 双壳贝类可食用部所含毒性或毒量分别为: 麻痹性贝类毒素不高于 4 小鼠单位 / 克, 腹泻性贝类毒素不高于 0.16 mg 冈田酸当量 / 千克。该麻痹性贝类毒素的限值相当于 CXS 292-2008 法典标准和 EC 853/2004 法规的标准值 800 μg STX \cdot 2HCl 当量 / 千克。目前, 麻痹性贝类毒素的检测方法为小鼠毒性试验法, 另根据 2015 年 3 月 6 日食安发 0306 第 3 号通知, 腹泻性贝类毒素的检测已变更为使用 LC-MS/MS 仪器进行分析。另一方面, 农林水产省鉴于其他各国的情况, 正在与其他机构合作, 对麻痹性贝类毒素检测中采用的仪器分析法进行验证, 进而推进指导原则的确立。

国际上, 麻痹性贝类毒素的测定方法主要有两种: 一种是已获得国际船舶保安证书 (ISSC) 批准的柱后氧化 - 荧光检测液相色谱法 (J. AOAC Int. 2011, 94, 1154-1176), 该方法已被加拿大、美国部分地区、挪威等采用; 另一种则是 2019 年 1 月成为欧盟官方参考方法 (Official Reference Method) 的柱前氧化 - 荧光检测液相色谱法 (AOAC 2005.06), 该方法被英国、爱尔兰、葡萄牙、新西兰等国家采用。由于高效液相色谱 (HPLC) 系统和分析操作上较为复杂, 近年来还开发了使用亲水相互作用色谱 (HILIC) 的超快速 LC-MS/MS 法^[1,2]。2018 年, 由 21 家机构参加并实施了国际方法验证^[3], 继 HPLC 法后, 高效液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 分析法正式生效。

本文将介绍使用亲水相互作用色谱 - 串联质谱法对有毒扇贝样品进行分析的研究。

石房蛤毒素的结构

石房蛤毒素 (STX) 的基本结构如图 1 所示。

已知存在多个结构类似的毒素, 例如 R1 为羟基的类似物, R2 和 R3 为硫酸酯的类似物, R4 侧链上的氨甲酰氮磺化结构类似物。

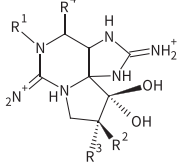


图 1 STX 基本结构

表 1 所示为麻痹性贝类毒素相关的分子种类中, R1~4 位点的各官能团和毒性当量因子 (TEF)。总毒性由每一种检出毒素的摩尔浓度与其 TEF 相乘后, 再汇总结果值计算而来。

由于难以获得 STX、dcNEO、dcGTX2、dcGTX3 的标准品, 此次对于这些毒素的测定, 使用能够获得标准品的结构相似毒素绘制校准曲线进行计算。表 1 的“校准物”列为每一种毒素化合物相对应的校准曲线物质。

表 1 麻痹性贝类毒素分子种类各官能基团和 TEF

基团	类似物	R1	R2	R3	R4	TEF	校准物
C 型毒素	C1	H	H	OSO ₃ ⁻	COCONHSO ₃ ⁻	0.01	C1
	C2	H	OSO ₃ ⁻	H	COCONHSO ₃ ⁻	0.1	C2
	C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	COCONHSO ₃ ⁻	0.02	
	C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	COCONHSO ₃ ⁻	0.1	
GTXs	dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CH ₂ OH	0.2	GTX2
	dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CH ₂ OH	0.4	GTX3
	GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	COCONH ₂	1.0	GTX1
	GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	COCONH ₂	0.4	GTX2
	GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	COCONH ₂	0.6	GTX3
	GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	COCONH ₂	0.7	GTX4
STXs	GTX5	H	H	H	COCONHSO ₃ ⁻	0.1	
	GTX6	OH	H	H	COCONHSO ₃ ⁻	0.1	
	dcSTX	H	H	H	CH ₂ OH	1.0	dcSTX
	STX	H	H	H	COCONH ₂	1.0	dcSTX
	NEO	OH	H	H	COCONH ₂	1.0	NEO
	dcNEO	OH	H	H	CH ₂ OH	0.4	NEO

分析条件

表 2 所示为 LC 和 MS 的分析条件。

表 2 分析条件

[HPLC 条件] (Nexera™)

色谱柱	: 亲水作用 (HILIC) 色谱柱/Amide [®] (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)
流动相	: A) 0.015% 甲酸+0.015% 氨水 B) 0.01% 甲酸乙腈溶液:水=7:3
柱温	: 60°C
进样量	: 2 μL
时间程序	:

时间 (min)	流速 (mL/min)	A 浓度 (%)	B 浓度 (%)
5.00	0.4	2	98
8.50	0.4	50	50
10.00	0.6	50	50
10.10	0.6	2	98
15.00	0.6	2	98

[MS 条件] (LCMS™-8060NX)

离子化	: ESI 正 & 负
接口电压	: +1 kV & -1 kV
离子聚焦电压	: +2 kV & -2 kV
雾化气流量	: 3 L/min
加热气流量	: 15 L/min
干燥气流量	: 3 L/min
IF/DL/HB 温度	: 300/250/400 °C
CID 气体压力	: 270 kPa
ESI 探针位置	: +4 mm

MRM 参数

各毒素化合物的 MRM 参数如表 3 所示。根据设定参数，使用正负切换模式，对 12 种贝类毒素同时进行分析。

表 3 MRM 参数

分析物	保留时间 (分钟)	极性	MRM 通道 1	碰撞能量 (V)	MRM 通道 2	碰撞能量 (V)
STX	8.94	+	300.1>204.1	-20	300.1>138.0	-20
NEO	8.95	+	316.1>126.1	-24	316.1>220.1	-22
dcSTX	8.94	+	257.1>126.1	-22	257.1>220.1	-35
dcNEO	9.06	+	273.1>126.1	-20	273.1>225.1	-20
dcGTX2	7.08	-	351.1>164.0	20	351.1>333.1	20
dcGTX3	7.66	+	353.1>255.1	-20		
GTX1	7.11	-	410.1>367.1	18	410.1>349.1	20
GTX2	6.80	-	394.1>351.1	19	394.1>333.1	22
GTX3	7.65	+	396.1>298.1	-18		
GTX4	7.76	+	412.1>314.1	-18		
C1	3.68	-	474.1>122.0	33	474.1>351.1	25
C2	4.33	+	396.1>298.1	-23		

样品前处理

图 2 所示为样品前处理流程。采用了两种提取方法：乙酸提取法和盐酸提取法，并对这两种方法进行了比较。

同时分析麻痹性贝类毒素和河豚毒素使用乙酸提取法，而盐酸提取法为日本国内进行的小鼠毒性试验时所采用的方法。

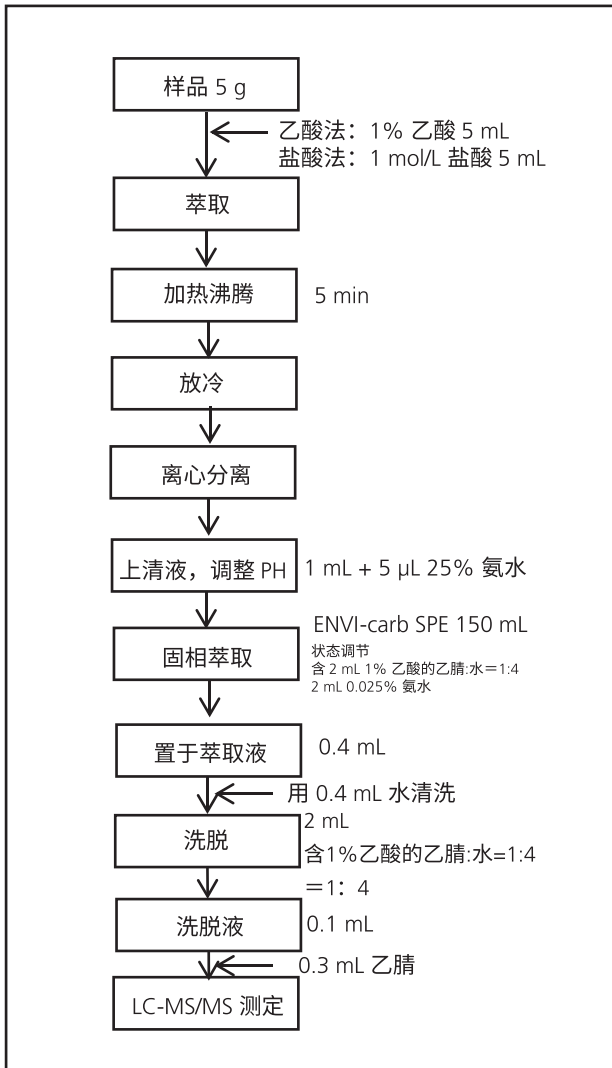


图 2 前处理操作

石房蛤毒素组 (STXs) 的色谱图

使用乙酸提取法处理有毒扇贝样品后，检测到的贝类毒素 MRM 色谱图如图 3 所示。该样品中浓度最高的毒素是 GTX2，其次为 STX。

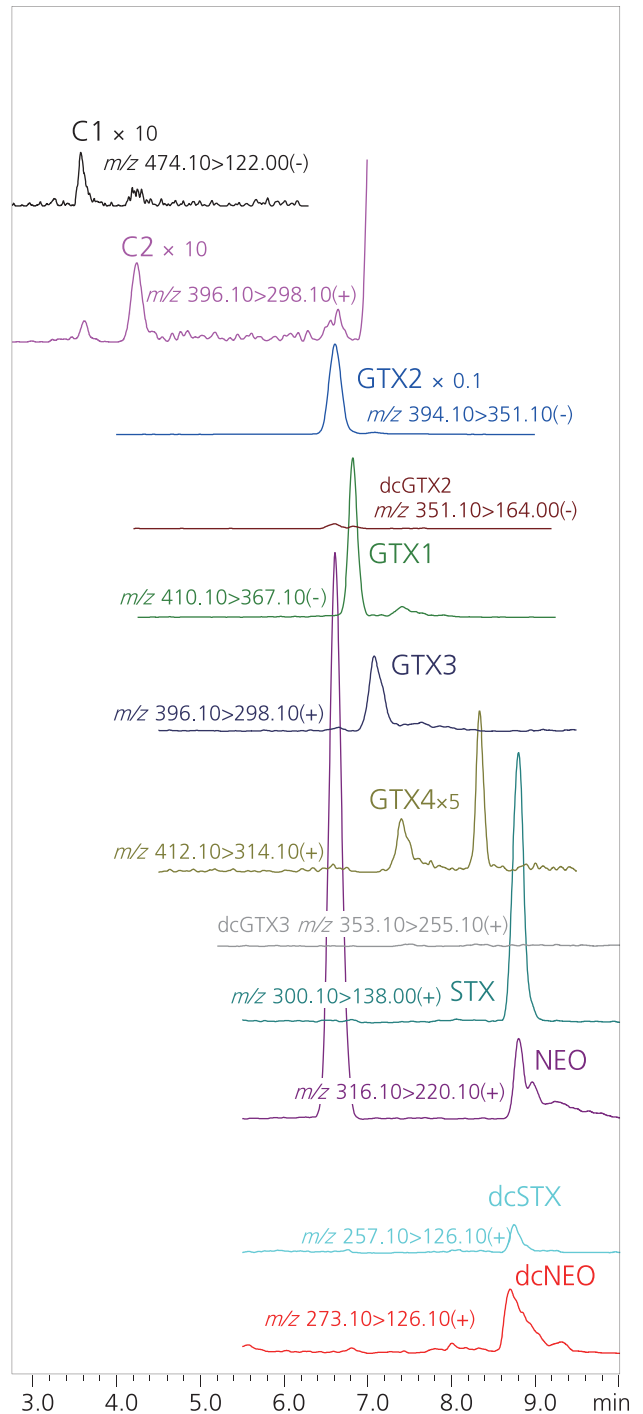


图 3 扇贝中 STXs 的 MRM 色谱图

■ 校准曲线

图3中各毒素分析物的校准曲线如图4所示。各毒素校准曲线的最低点浓度范围在0.39~3.09 ng/mL之间,相当于质量浓度范围0.0004~0.0031 mg/kg。这个浓度水平大大低于CXS 292-2008 法典标准规定的0.01~0.1mg/kg 检出限水平。

在本研究中,对于标准品无法获得的毒素分析物采用可获得标准品的毒素校准曲线进行定量计算(参见表1)。其中,STX、dcNEO、dcGTx2、dcGTx3 分别使用dcSTX、NEO、GTx2、GTx3的校准曲线进行计算。

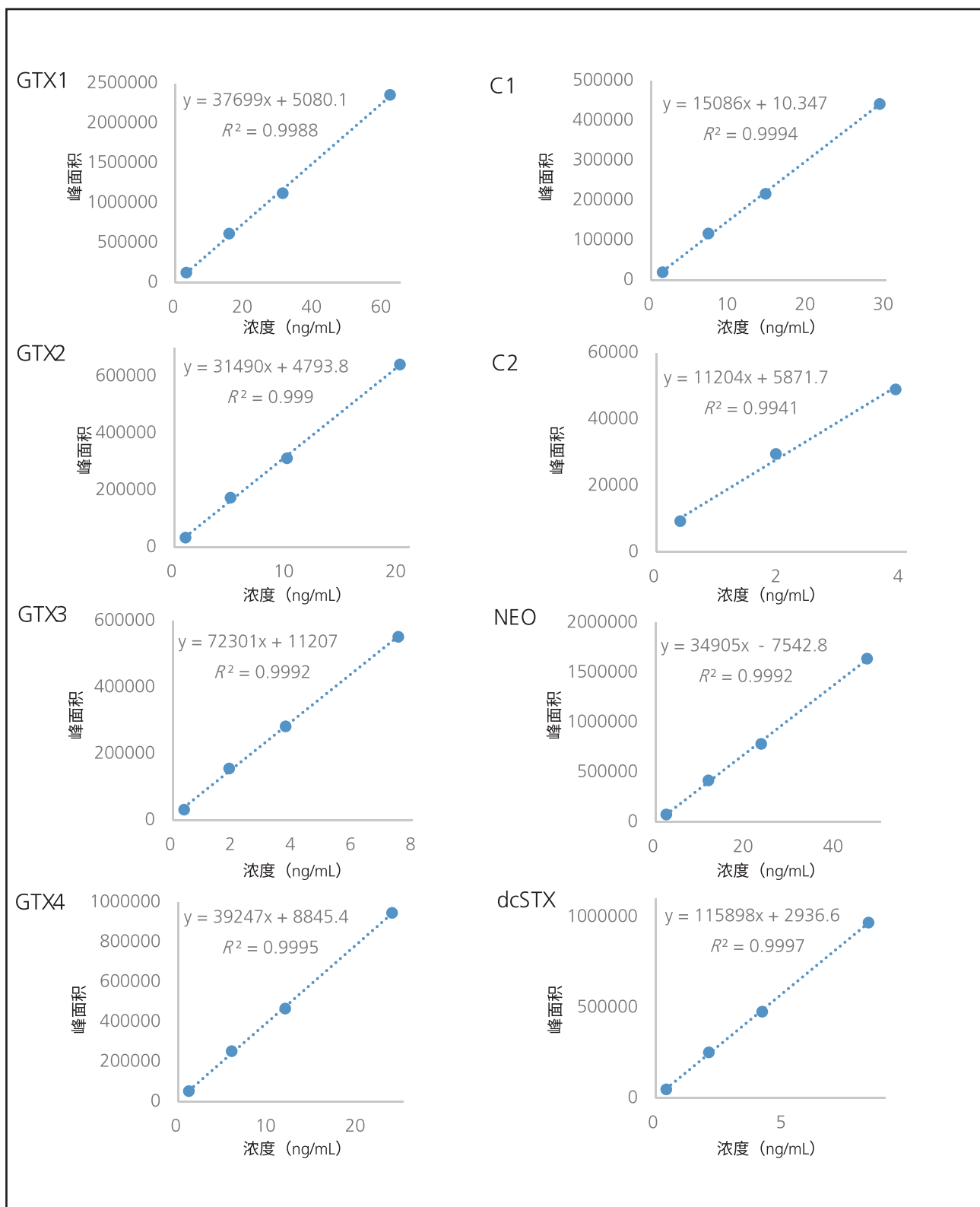


图4 各毒素分析物的校准曲线

定量结果

在所有 5 个有毒扇贝样品 (A~E) 中均检出有 STX 和 STX 类似物。图 5 所示为样品中毒素的定量结果。此外，图 3 为样品 A 上机分析的色谱图。

在使用的两种样品前处理方法中，用于小鼠毒性试验的盐酸提取法所得定量结果值偏低。这可能是由于在使用盐酸提取法中，pH 调整不当、固相萃取的回收率偏低、基质效应等引起的。

以上结果表明，在使用 LC-MS/MS 法时，乙酸提取法更适合样品前处理。定量值的计算方式为“各毒素的定量值 (ng STX eq/g) = 各毒素的定量值 (ng/g) × 毒性当量因子 (TEF) × 石房蛤毒素二盐酸盐的分子量 ÷ 毒素分子量”。

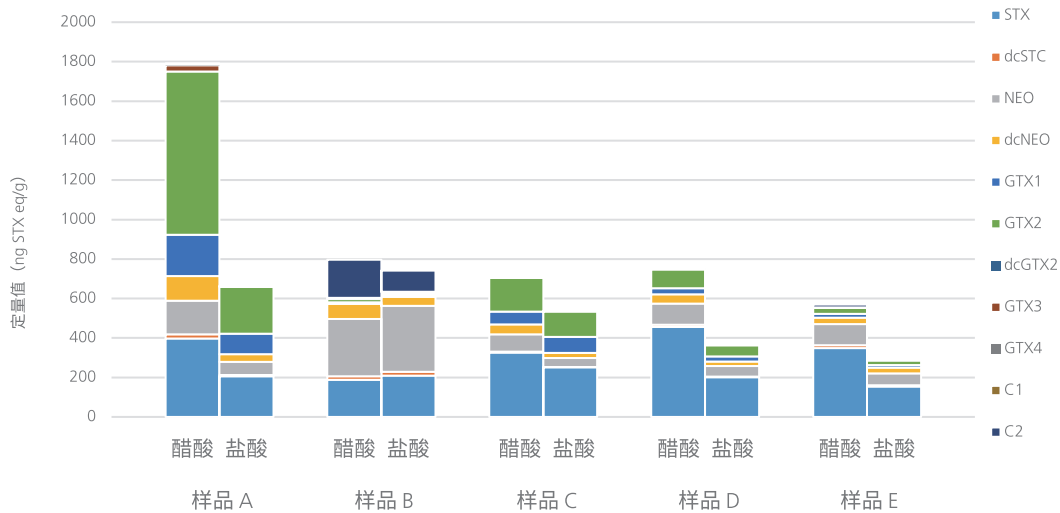


图 5 5 个样品定量结果比较

结论

以上介绍了采用亲水作用色谱 (HILIC) 的 LC-MS/MS 法作为麻痹性贝类毒素的仪器分析法，可替代小鼠毒性试验。该方法使用简单的 LC 系统，可在 10 min 内完成贝类毒素的高灵敏定量分析。

相比较盐酸提取法，发现乙酸提取法是更适合在 LC-MS/MS 分析法中进行扇贝样品前处理。

2020 年 10 月，欧盟通过 WTO 以草案的形式发布了 SPS 通报。[ePing \(eping.alert.org\)](http://eping.alert.org)

不久的将来，在向欧盟出口时，应根据 (EU) 2019 627 的要求仅采用不需要动物的替代法检测麻痹性贝类毒素 [Paralytic Shellfish Poison (PSP)]。

此外，未来在日本国内公布仪器分析法时，建议开发各检测实验室能够购买到所有标准品的环境。

参考文献

- [1] Boundy M. et al., J. Chromatography A, 1387, 1-12 (2015).
- [2] A. D. Turner et al., J. AOAC Int., 98, 3, 609-621 (2015).
- [3] A. D. Turner et al., J. AOAC Int., 103, 2, 533-562 (2020).

致谢

一般财团法人 日本食品检查在标准品、样品、数据提供方面给予了大力协助。

在此由衷感谢。

[HOME | JFIC 一般财团法人 日本食品检查 \(jffic.or.jp\)](http://HOME | JFIC 一般财团法人 日本食品检查 (jffic.or.jp))

岛津应用云



LCMS 及 Nexera 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家所使用的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2022 年 3 月