

使用三重四极杆质谱仪同时分析符合欧盟法规的脂溶性贝毒

01-00376-CN

小林 真奈美

特点描述

- ◆ 依据 EU-RL-MB (欧盟海洋生物毒素参考实验室) 同时分析双壳贝类中的 5 种脂溶性贝毒。
- ◆ 使用碱性流动相高灵敏度分析扇贝毒素 (YTX)。
- ◆ 使用自动进样器的预处理功能配制基质匹配标准曲线

简介

贝类中毒主要发生在双壳类动物大量进食有毒的海洋海藻，这些毒素积累在双壳类动物的体内，人们食用有毒的贝类后会导人类中毒综合症。

欧盟制定了有关脂溶性毒素的法规，在法规 (EC)853/2004、附件 III 第七节 第 V 章中规定，人类食用的双壳贝类中所含脂溶性毒素的最大浓度限量：大田软海绵酸毒素、鳍藻毒素和蛤毒素 160 µg/kg (大田软海绵酸当量)，原多甲藻酸毒素 160 µg/kg (原多甲藻酸当量)。此外，在欧盟法规 786/2013 的附件 III 中，将生鲜双壳贝类中虾夷扇贝毒素的容许限度降至 3.75 mg/kg (扇贝毒素当量)。(EU) No. 15/2011 认定 EU-RL 的 LC-MS/MS 方法是双壳贝类脂溶性海洋生物毒素检测的标准方法。

日本根据食品卫生法设定了贝毒的相关安全标准和限值 (2015 年 3 月 6 日 Shokuanki 公告 0306-1 号)。对于腹泻性贝类毒素，双壳贝类可食用部位所含毒量需低于 0.16 mg 大田软海绵酸当量 /kg。根据 2015 年 3 月 6 日 Shokuanki 公告 0306-3 号，可使用酸性流动相，LC-MS/MS 方法检测大田软海绵酸毒素和鳍藻毒素。

本文介绍了使用碱性流动相，LC-MS/MS 分析扇贝萃取溶液中五种毒素的方法。5 种标准化合物代表了欧盟法规规定的 5 种脂溶性贝类毒素 (大田软海绵酸毒素、鳍藻毒素、蛤毒素、原多甲藻酸毒素和虾夷扇贝毒素)。萃取和分析步骤依据欧盟 LC-MS/MS Ver.5 测定软体动物中的亲脂性海洋生物毒素的统一标准操作流程。为了获得大田软海绵酸毒素和鳍藻毒素的总量，需要在萃取后进行水解处理。本试验分别制备了未水解和水解后的扇贝萃取溶液，用于配制基质匹配标准曲线。

化合物和结构

方法建立了同时分析大田软海绵酸毒素 (OA)、鳍藻毒素 -1 (DTX1)、蛤毒素 -2 (PTX2)、原多甲藻酸毒素 -1 (AZA1)、虾夷扇贝毒素 (YTX) 5 种化合物的方法。图 1 所示为 YTX 的结构。YTX 为雪卡毒素相关、脂溶性含硫元素的聚醚结构，由鞭毛藻类 (特别是 *Lingulodinium polyedrum* 和 *Gonyaulax spinifera*) 产生。

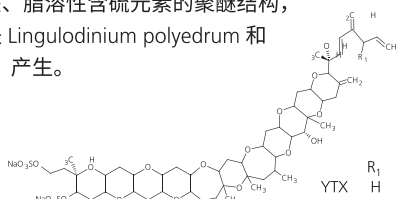


图 1 YTX 的结构

MRM 参数

表 1 所示为分析中使用的 MRM 参数。OA、DTX1、YTX 使用负离子模式检测，PTX2 和 AZA1 使用正离子模式检测。PTX2 的前体离子采用是更高灵敏度的 $[M+NH_4]^+$ 离子。

表 1 MRM 参数

化合物	采集模式	Q1	Q3	CE
		m/z	m/z	(V)
OA	-	803.5	255.2	48
OA	-	803.5	113.0	55
DTX1	-	817.5	255.2	49
DTX1	-	817.5	113.0	55
YTX	-	1141.5	1061.3	33
YTX	-	1141.5	855.5	54
PTX2	+	876.5	823.5	-26
PTX2	+	876.5	805.4	-27
PTX2	+	876.5	213.2	-40
AZA1	+	842.5	824.4	-31
AZA1	+	842.5	806.4	-40

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	: 耐高 pH 的 ODS 色谱柱*1 (100 mm × 2.1 mm, 3.5 µm)
流动相	: A) 2 mmol/L 碳酸氢铵水溶液 (pH 11) B) 乙腈: 2 mmol/L 碳酸氢铵水溶液 (pH 11) =9:1
流速	: 0.3 mL/min
柱温	: 40°C
进样量	: 5 µL
时间程序	: B Conc. 25% (0-1 min) – B Conc. 100% (11.4-16.7 min) – B Conc. 25% (16.71-22 min)

2.5-11 min 的馏分通过流路切换阀导入 MS 检测器。

[MS 条件] (LCMS™-8060)

离子化	: ESI 正 & 负
接口电压	: +4 kV & -3 kV
雾化气流量	: 2.5 L/min
雾化气流量	: 5 L/min
干燥气流量	: 15 L/min
IF/DL/HB 温度	: 350/200/450 °C
CID 气体压力	: 270 kPa
ESI 喷雾针位置	: +2 mm

*1 见参考文献

■ 色谱图

此次分析采用自动进样器的预处理功能，吸出 5 μ L 扇贝萃取液作为基质溶液，之后吸出等量 5 μ L 的各浓度混合标准溶液，同时注入两种溶液。对于实际样品（添加标准溶液的扇贝萃取液），吸取甲醇溶液替代混合标准溶液。图 2 所示为标准曲线最低点处的各化合物的色谱图。AZA1、PTX2 和 YTX 采用未水解的萃取液作为基质溶液，OA 和 DTX1 采用水解的萃取液作为基质溶液。

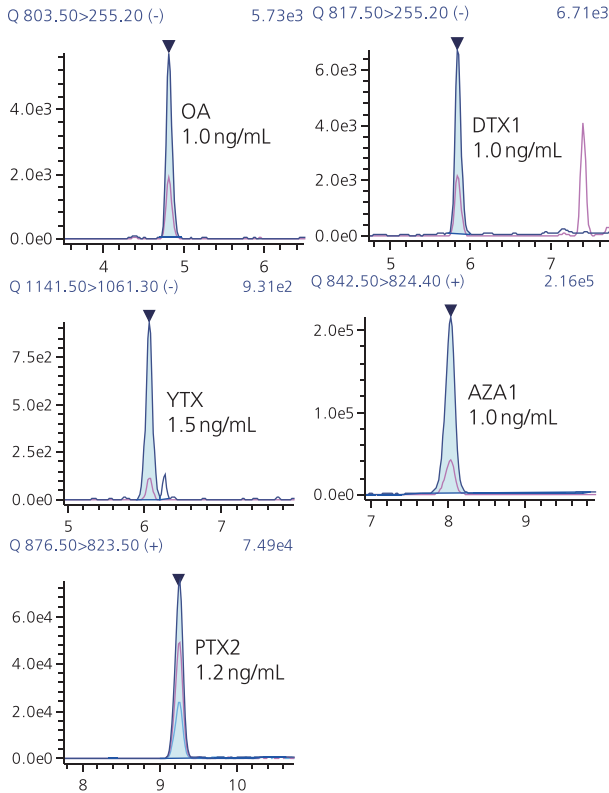


图 2 各化合物的色谱图

■ 标准曲线

图 3 所示为各化合物的标准曲线。

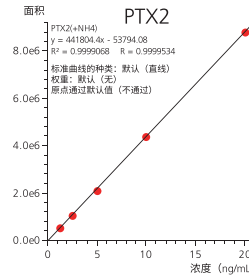
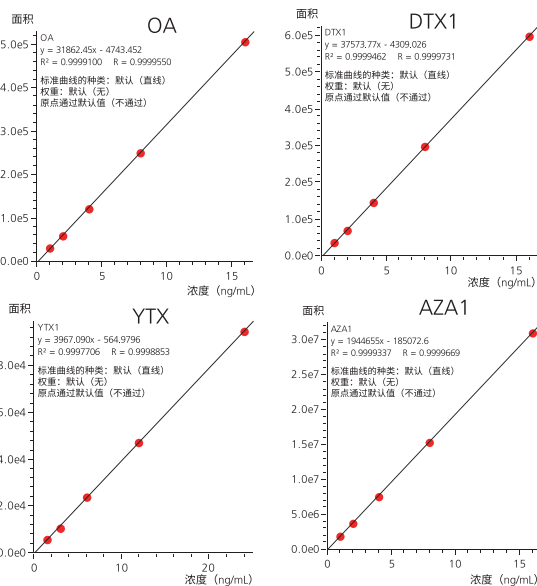


图 3 各化合物的标准曲线

■ 定量结果

向扇贝提取液中添加混合标准溶液，使得最终萃取液中 OA、DTX1、AZA1 的浓度为 2 ng/mL，YTX 和 PTX2 分别为 3 ng/mL 和 2.5 ng/mL。萃取液的水解处理旨在将自然界贝类中存在的 OA 和 DTXs 的酰化酯基团转化为游离形式。水解后，PTX、AZA 的毒素基团将被分解。

表 3 列出了未水解和水解处理后萃取液制作的基质匹配标准曲线相关系数，以及加标的扇贝萃取液的定量结果和回收率。PTX2 和 AZA1 在未水解的情况下可以测得，但经水解处理后未检出 (N.D.)。除此 PTX2 和 AZA1 之外，不管是否水解均可获得 95 ~ 104% 的良好回收率。

表 3 定量结果(ng/mL)和回收率(%)

化合物	R ²	未进行水解		进行水解		
		定量结果 (ng/mL)	回收率 (%)	定量结果 (ng/mL)	回收率 (%)	
OA	0.99977	2.06	103	0.99991	1.94	97
DTX1	0.99995	1.89	95	0.99995	1.99	100
YTX	0.99977	3.09	103	0.99980	3.13	104
PTX2	0.99991	2.44	98	0.99987	N.D.	-
AZA1	0.99993	1.96	98	0.99970	N.D.	-

■ 结论

建立了同时分析欧盟法规规定的五种化合物：大田软海绵酸毒素 (OA)、鳍藻毒素 -1 (DTX1)、蛤毒素 -2 (PTX2)、原甲藻酸毒素 -1 (AZA1) 和虾夷扇贝毒素 (YTX) 的方法。

该方法的灵敏度高、线性良好、加标回收率令人满意。通过在方法中设置自动进样器预处理功能，还可以自动配制高精度的基质匹配标准曲线。

参考文献

- 1) EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, Version 5, January 2015

致谢

一般财团法人日本食品检查在标准品、样品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)

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