

# LC-MS/MS 测定鱼肉中微囊藻毒素

## LCMSMS-570

**摘要：** 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定鱼肉中微囊藻毒素的方法，该方法可在 6.5 min 内完成对待测物的检测。微囊藻毒素 LR、RR 和 YR 在 0.1 μg/L~5.0 μg/L 浓度范围内线性良好，校准曲线线性相关系数 r 在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于鱼肉中微囊藻毒素残留的快速检测。

**关键词：** 三重四极杆质谱 鱼肉 微囊藻毒素

微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 是由铜绿微囊藻、鱼腥藻和颤藻等淡水蓝藻产生的一类单环七肽类肝毒素，是富营养化淡水水体中最常见的藻类毒素之一，具有毒性大、分布广和结构稳定等特点。它能够强烈抑制蛋白磷酸酶的活性，还是强烈的肝脏肿瘤促进剂。MCs 结构通式见图 1，其环肽结构中含有 X 和 Y 两个可变氨基酸基团，X 和 Y 的不同氨基酸组合可以形成

相应的 MCs 异构体，其中 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 是目前研究较多的种类。(L、R、Y 分别代表亮氨酸、精氨酸和酪氨酸)。

本文参考 GB5009.273-2016《食品安全国家标准 水产品中微囊藻毒素的测定》，采用高效液相色谱串联质谱仪，建立了快速准确测定鱼肉中微囊藻毒素 LC、RR 和 YR 的方法，供相关人员参考。

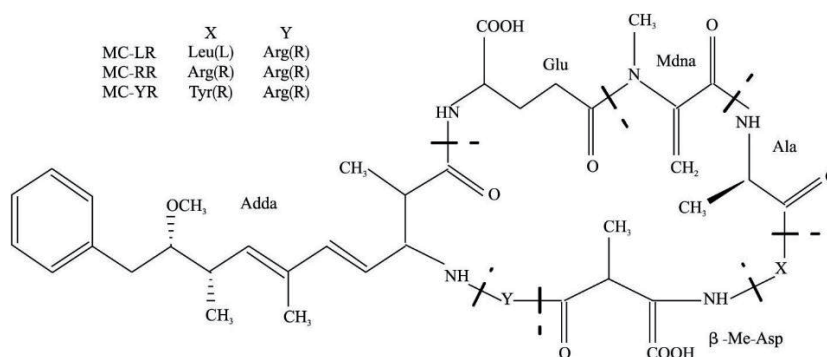


图 1 微囊藻毒素结构图

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40BX3

质谱仪：LCMS-8050

柱温箱：CTO-40S

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

在线脱气机：DGU-405

## 1.2 分析条件

### 液相条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液, B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

柱温：30°C

进样体积：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 25%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.10	Pumps	Pump B Conc.	25
6.50	Controller	Stop	
6.50	Controller	Stop	

### 质谱条件

离子源：ESI, 正离子模式

DL 管温度：150°C

离子源接口电压：2.5 kV

加热模块温度：300°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

接口温度：350°C

干燥气：氮气 10 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

加热气：空气 10 L/min

MRM 参数：见表 2

碰撞气：氦气

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文缩写	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
微囊藻毒素 LR	MC-LR	101043-37-2	498.2	135.1*	-20	-14	-26
				861.2	-12	-15	-32
微囊藻毒素 RR	MC-RR	111755-37-4	520.0	135.0*	-20	-35	-24
				127.0	-20	-52	-21
微囊藻毒素 YR	MC-YR	101064-48-6	523.5	135.0*	-20	-14	-25
				911.2	-20	-13	-32

\* 表示定量离子

## ■ 标准品溶液的配制及样品前处理

### 标准工作溶液配制：

微囊藻毒素标样中间液 (10 ng/mL)：取购买的微囊藻毒素 MC-LR、MC-YR、MC-RR 的标准储备液 (10 μg/mL) 10 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。

基质匹配的混合标准系列工作液：用空白基质溶液将微囊藻毒素标准中间溶液 (10 ng/mL) 稀释 成含量为 0.1、0.2、0.5、1.0L、2.0 和 5.0 μg/L 的混合标准系列工作液。现用现配。

样品前处理:

准确称取 5 g(精确至 0.01 g) 试样置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 80% 甲醇水溶液, 充分振荡均匀, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液。残渣重复提取一次, 合并两次提取液, 并定容至 30 mL, 玻璃纤维滤纸过滤。取 6 mL 液加入 30 mL 水稀释, 待净化。C<sub>18</sub> 固相萃取小柱使用前依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 水活化, 将提取液全部过柱后, 用 10 mL 20% 甲醇水溶液淋洗, 10 mL 0.1% 甲酸甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 以氮气浓缩至近干。加入 1 mL 20% 甲醇水溶液充分溶解残渣, 用有机相微孔滤膜过滤, 待上机检测。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 微囊藻毒素标准溶液谱图

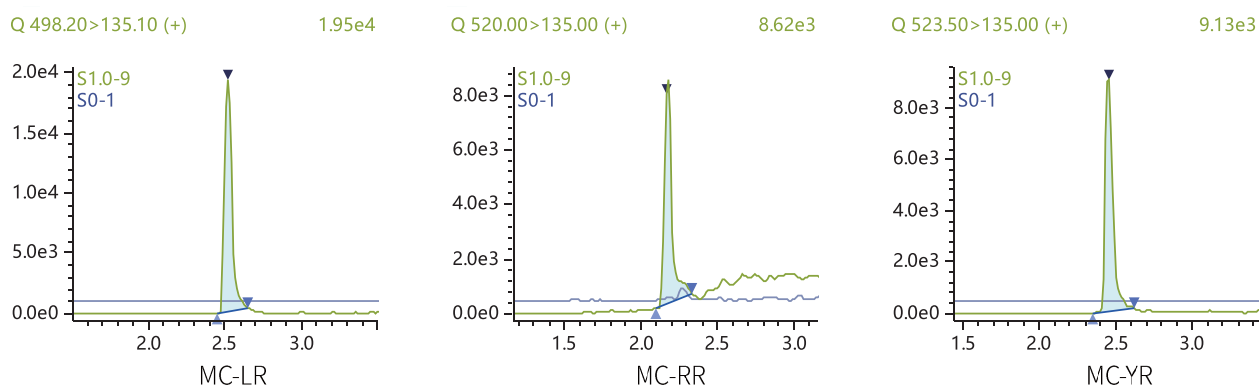


图 2 空白基质 (S0) 与 1.0 ng/mL 基质标样 (S1.0) 质量色谱图

### 3.2 线性关系

将 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 和 5.0 μg/L 的系列基质混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定, 外标法定量。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如图 3 所示; 具体信息见表 3。所得校准曲线线性关系良好, 线性方程为  $Y = (0.4619613)X + (-0.03947536)$ , 相关系数  $R^2 = 0.9994$ , 准确度在 95.8~117.4% 之间。

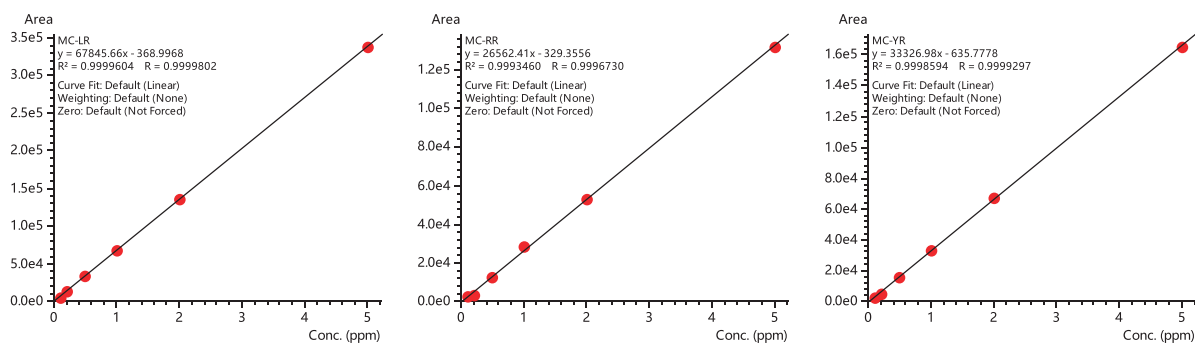


图 3 微囊藻毒素校准曲线

表 3 微囊藻毒素标准曲线信息

编号	化合物	标准曲线	相关性系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	MC-LR	$Y = (67845.66)X - (368.9968)$	0.9999	97.2~104.8	0.007	0.024
2	MC-RR	$Y = (26562.41)X - (329.3556)$	0.9997	84.9~111.4	0.025	0.083
3	MC-YR	$Y = (33326.98)X + (635.7778)$	0.9999	91.8~103.8	0.012	0.042

### 3.3 精密度试验

对 0.1、0.5 和 5  $\mu\text{g/L}$  三个浓度标准工作液连续测定 6 次，考察仪器精密度。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04%~0.18% 和 1.61%~7.57% 之间，仪器精密度良好。

表 4 微囊藻毒素保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	化合物	RSD% (0.1 $\mu\text{g/L}$ )		RSD% (0.5 $\mu\text{g/L}$ )		RSD% (5 $\mu\text{g/L}$ )	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	MC-LR	0.13	5.19	0.06	3.41	0.15	1.61
2	MC-RR	0.13	7.57	0.04	3.65	0.18	2.23
3	MC-YR	0.10	5.88	0.05	3.84	0.16	2.50

### 3.4 灵敏度实验

图 4 为 0.1  $\mu\text{g/L}$  微囊藻毒素 MRM 色谱图。根据检出限 MDL = 3.3 S/N，定量限 LOQ=10 S/N 计算检出限和定量限，具体结果见表 3。

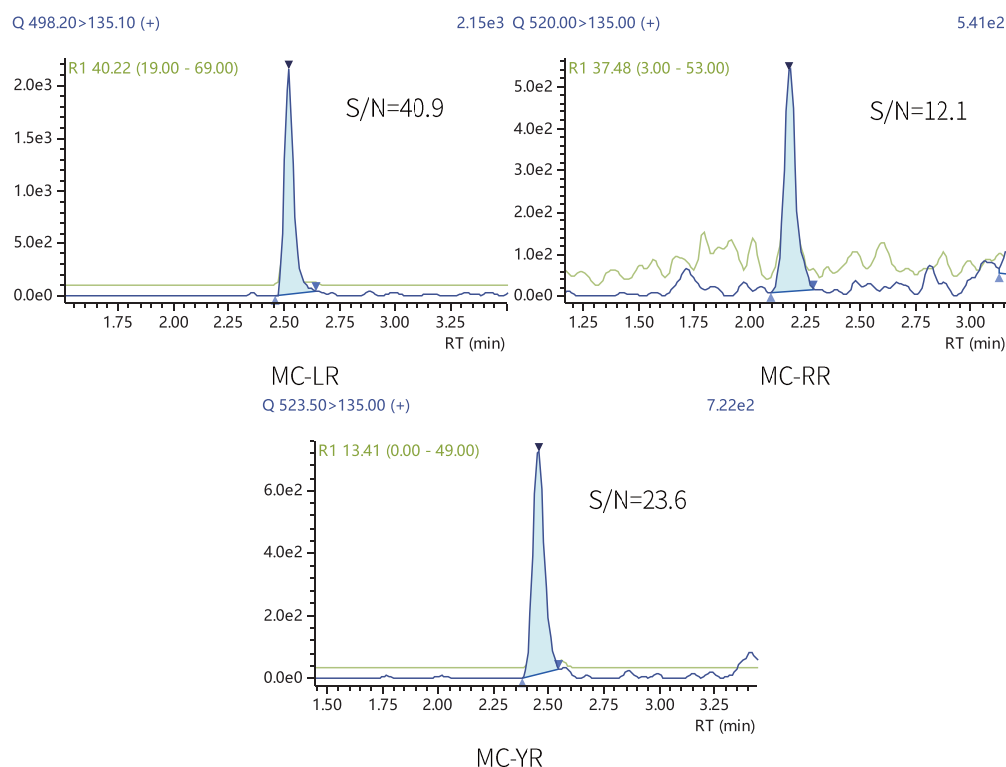


图 4 0.1  $\mu\text{g/L}$  微囊藻毒素 MRM 色谱图

### 3.5 基质加标实验

取空白鱼肉样品 5 g，加入少量微囊藻毒素标准工作液，使加标浓度为 1 和 5  $\mu\text{g/kg}$ ，样品经提取与净化后，按照 1.2 中的分析条件测定其加标回收率，平行测定 3 次。MC-LR、RR 和 YR 的回收率在 78.6~88.6 之间，具体结果见表 5。

表 5 微囊藻毒素 LR、RR 和 YR 的回收率和重复性结果 (n=3)

化合物	1 µg/kg		5 µg/kg	
	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%
MC-LR	83.7	5.43	88.6	4.80
MC-RR	78.6	9.43	82.0	7.67
MC-YR	82.5	6.89	83.3	5.81

## ■ 结论

建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 测定鱼肉中微囊藻毒素 LR、RR 和 YR 的方法。鱼肉经提取和净化后，用超高效液相色谱 LC-40 进行分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 进行定性和定量分析。微囊藻毒素 LR、RR 和 YR 在 0.1 µg/L~5.0 µg/L 浓度范围内线性良好；对不同浓度的标准工作液连续测定 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.04%~0.18% 和 1.61%~7.57%。添加浓度为 1 和 5 µg/kg 的鱼肉样品，回收率在 78.6~88.6% 之间。本方法操作简单，可用于鱼肉中微囊藻毒素的快速高灵敏度检测。

岛津应用云

