

# 三重四极杆质谱测定扇贝中的腹泻性贝类毒素

LCMSMS-022

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定扇贝中的腹泻性贝类毒素的方法。样品经提取后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。4 种样品在 2 分钟内得到快速分离和检测。GYM, SPX-1 和 PTX-2 在 0.001 ~ 0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好，OA 在 0.01 ~ 0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.999 以上；对 0.005  $\mu\text{mol/L}$ 、0.05  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$  混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 4.379% 和 0.152% 以下，系统精密度良好；从中国长江下游某城市的市售扇贝中检测出 PTX-2 和 OA，含量分别为 0.011 和 0.674  $\mu\text{mol/kg}$ 。

**关键词：**腹泻性贝类毒素 扇贝 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

腹泻性贝类毒素 (DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning) 是海洋中藻类或微生物产生的一类脂溶性次生代谢产物，其化学结构是聚醚或大环内酯化合物。自 20 世纪 60 年代荷兰首次报道 DSP 中毒之后，由此引起的人体中毒事件在世界范围内频繁发生，有近 20000 人中毒。中毒主要症状为呕吐、腹泻，严重者可出现黄疸、急性萎缩性肝坏死。自从 2002 年以来，使用 LCMS 对贝类毒素开始检测的相关法规才陆续发布。欧盟于 2002 年颁布了法规 2002/225/EC，规定了贝类毒素的检测方法和检出限量；日本规定了紫贻贝和扇贝中肠腺的标准分别为 120  $\mu\text{g}/100\text{g}$  和 200  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ；中国于 2008 年颁布了《贝类中腹泻性贝类毒素的测定》(GB/T5009.212-2008)，但使用的是生物法；2009 年浙江省发布了地方标准《水产品中腹泻性贝类毒素残留量的测定液相色谱-串联质谱法》(DB33/T 743-2009)。本文根据浙江省地标，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用，建立了快速准确测定扇贝中腹泻性贝类毒素的方法，供相关检测人员参考。

30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolution Ver. 5.41 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III  
(2.0 mm I.D.  $\times$  50 mm L., 1.6  $\mu\text{m}$ )

流动相：A - 10 mM 醋酸铵 -0.1% 甲酸水溶液；  
B - 乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：5  $\mu\text{L}$

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	30
1.00	Pumps	Pump B Conc.	98
2.00	Pumps	Pump B Conc.	98
2.30	Pumps	Pump B Conc.	30
3.00	Controller	Stop	

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-

质谱条件

分析仪器: LCMS-8030

离子源: ESI, 正负离子同时扫描

离子源接口电压: ESI+, 4.5 kV; ESI-, -3.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 50 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	Gymnodimine (GYM)	508.55	490.55	20.0	25.0	26.0
			121.35 *	20.0	50.0	14.0
2	Spirolidol (SPX1)	692.65	164.20	20.0	50.0	18.0
			674.45 *	20.0	35.0	26.0
3	Pectenotoxin2 (PTX2)	876.50	213.20	22.0	45.0	16.0
			823.45 *	22.0	45.0	16.0
			349.20 *	22.0	25.0	32.0
4	Kadaic acide (OA)	803.30	255.45	30.0	50.0	24.0
			189.20 *	30.0	20.0	15.0

\*表示定性离子

### 1.3 样品制备

标准溶液配制:

用乙腈配制 0.25  $\mu\text{mol/L}$  的混合标准溶液, 用水稀释成浓度为 0.001, 0.005, 0.010, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.25  $\mu\text{mol/L}$  的标准工作液。

样品前处理方法:

同浙江省地标《DB33/T 743-2009 水产品中腹泻贝类毒素残留量的测定 液相色谱 - 质谱质谱法》。

## 结果讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

图 1 为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  标准样品的 MRM 色谱, 4 种毒素在 2 分钟内得到了快速检测。

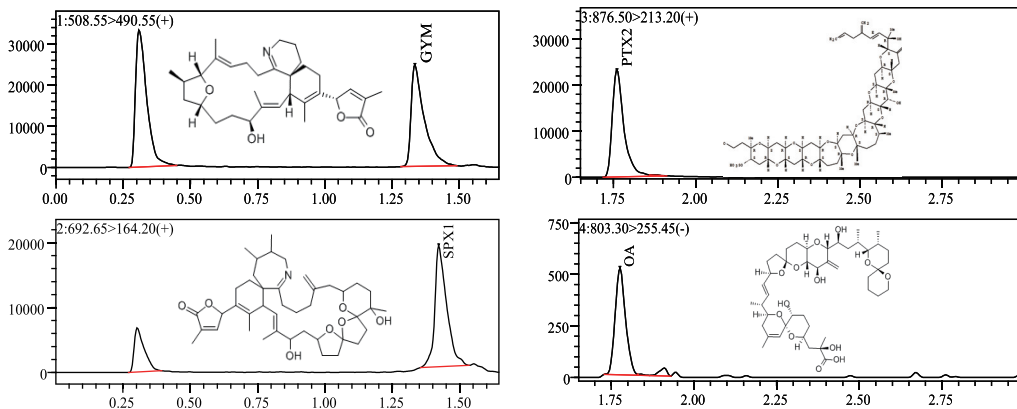


图1 0.1  $\mu\text{mol/L}$  标准样品的 MRM 色谱图

## 2.2 线性关系

将浓度为 0.001, 0.005, 0.010, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25  $\mu\text{mol/L}$  的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线如图 2~5 所示。GYM, SPX-1 和 PTX-2 在 0.001 ~ 0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好, OA 在 0.01 ~ 0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内所得校准曲线线性关系良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

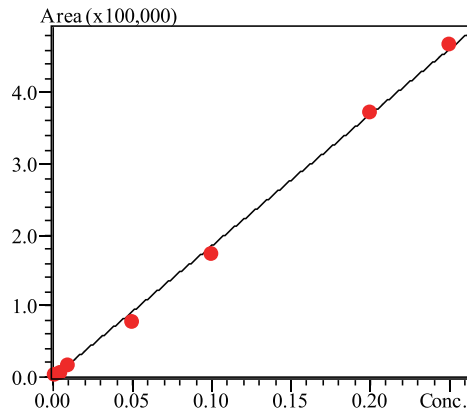


图2 GYM的标准工作曲线

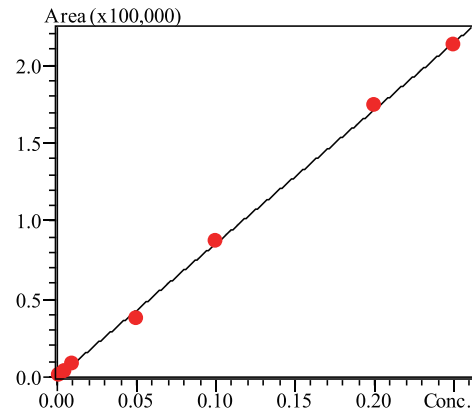


图3 SPX-1的标准工作曲线

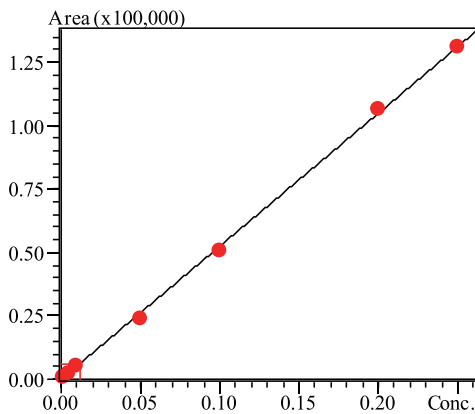


图4 PTX-2的标准工作曲线

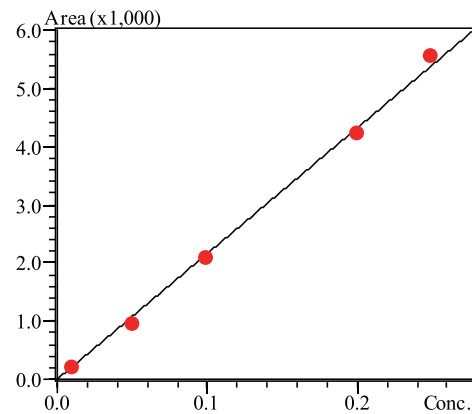


图5 OA的标准工作曲线

表3 4种贝类毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限 ( $\mu\text{mol/L}$ )	定量限 ( $\mu\text{mol/L}$ )
1	GYM	$Y = (1.848e+006)X$	$r=0.9994$	0.00027	0.00080
2	SPX-1	$Y = (857167)X$	$r=0.9996$	0.00020	0.00061
3	PTX-2	$Y = (524492)X$	$r=0.9996$	0.00017	0.00051
4	OA	$Y = (21601.8)X$	$r=0.9990$	0.00314	0.00952

### 2.3 精密度实验

对 0.005  $\mu\text{mol/L}$ 、0.05  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$  混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 1.405%~4.379% 和 0.036%~0.152% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% ( 0.005 mmol/L )		RSD% ( 0.05 mmol/L )		RSD% ( 0.25 $\mu\text{mol/L}$ )	
	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T
GYM	2.365	0.092	2.138	0.073	2.277	0.048
SPX-1	3.666	0.133	1.405	0.036	1.814	0.055
PTX-2	2.553	0.144	1.717	0.052	1.920	0.048
OA	3.996*	0.139*	4.379	0.152	2.821	0.054

\*浓度为0.01  $\mu\text{mol/L}$

### 2.4 实际样品

检测了中国长江下游某城市市售扇贝，检出了两种贝类毒素：PTX-2 和 OA，其浓度分别为 0.011 和 0.674  $\mu\text{mol/kg}$ 。其中 OA 的含量大大超出了浙江省地标规定的 0.02 mg/kg (约 0.025  $\mu\text{mol/kg}$ ) 的限量。

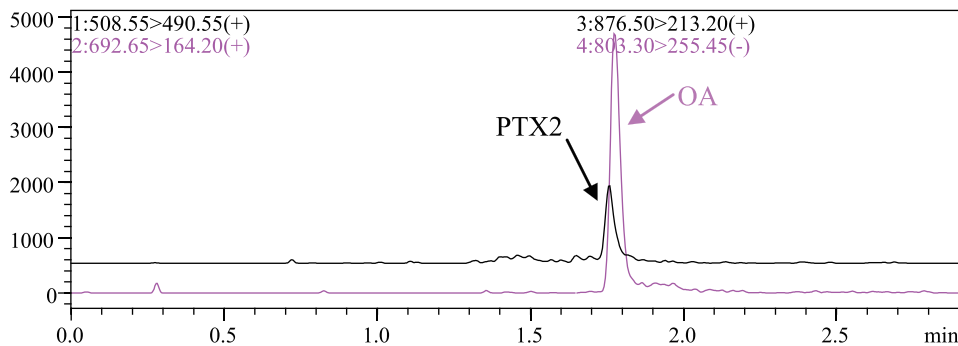


图6 扇贝样品的MRM色谱图

## 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定扇贝中 4 种腹泻性贝类毒素的方法。该方法分析速度快，重复性和精密度良好；GYM, SPX-1 和 PTX-2 在 0.001 ~ 0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好，OA 在 0.01 ~ 0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.999 以上；从中国长江下游某城市的市售扇贝中检测出 PTX-2 和 OA，含量分别为 0.011 和 0.674  $\mu\text{mol/kg}$ 。