液相色谱-四极杆/线性离子阱复合质谱测定双壳贝类中麻痹性贝类毒素*

吴海燕[1, 2] 郭萌萌[1, 2] 邴晓菲[3] 郑关超[1, 2] 彭吉星[1, 2] 谭志军[1, 2①] 翟毓秀[1, 2]

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 国家水产品质量监督检验中心 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 采用液相色谱-四极杆/线性离子阱复合质谱, 建立了双壳贝类中 13 种麻痹性贝类毒素的定性确证和定量分析方法。样品经乙酸水溶液提取, 石墨化碳黑固相萃取净化, 亲水性液相色谱柱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)分离; 质谱采集使用独有的多反应监测-信息依赖性采集-增强子离子扫描模式。13 种目标物线性范围相关系数不低于 0.99, 检出限为 62.0μg STX eq /kg, 其中石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)、新石房蛤毒素(Neosaxitoxin, NEO)、脱氨甲酰基石房蛤毒素(Decarbamoylsaxitoxin, dcSTX)、脱氨甲酰基新石房蛤毒素(Decarbaoylneosaxitoxin, dcNEO)以及 N -磺酰氨甲酰基类毒素 5(Gonyautoxin-5, GTX5)为 10.0μg/kg, 膝沟藻毒素 1&2 (Gonyautxins- 1&-2, GTX1&2)为 12.0μg/kg, 膝沟藻毒素 3&4 (Gonyautxins-3&-4, GTX3&4)、N-磺酰氨甲酰基类毒素 2 (N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-2, C2)和脱氨甲酰基膝沟藻毒素 3 (Decarbamoylgonyautoxins-3, dcGTX3)为 4μg/kg, N-磺酰氨甲酰基类毒素 1(N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-1, C1)和脱氨甲酰基膝沟藻毒 2 (Decarbamoylgonyautoxins-2, dcGTX2)为 13μg/kg。基质加标平均回收率为(79.6±10.4)%— (98.8±6.54)%。该方法能够有效降低贝类基质抑制效应, 简化前处理过程并通过减少样品稀释倍数来显著提高方法灵敏度, 使同分异构体达到基线分离, 适用于双壳贝类中麻痹性贝类毒素的监控分析。

关键词 麻痹性贝类毒素; 基质效应; 固相萃取
中图分类号 O657.6 doi: 10.11693/hyhz20161000229

麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish toxins, PSTs)是分布最广、危害最严重的海洋生物毒素之一, 多次造成消费者中毒甚至死亡事件。世界卫生组织(WHO)规定贝类可食部分的 PSTs 限量为 800μg STX eq/kg。目前, PSTs 已成为海产贝类国际贸易壁垒主要的限制对象, 重点加以监控。鉴于 PSTs 毒素可由亚历山大藻属(*Alexandrium*)、膝沟藻属(*Gonyaulax*)和裸甲藻属(*Gymnodinium*)等双鞭甲藻类产生, 其风险性又因产毒藻种类、藻株、地理位置以及蓄积贝类等因素而存在很大差异(Zou *et al*, 2014), 给监控监管工作带来一定的困难。

现有检测方法中, 小鼠生物法(Mouse Bioassay, MBA)和液相色谱检测法是目前应用最多, 也是欧盟官方指定 PSTs 标准检测方法。而两种检测方法均有其局限性。MBA 特异性、重现性和灵敏度都很差(Turner *et al*, 2012), 且仅能提供毒素总量的检出情况。液相方法前处理复杂需要经过柱前或者柱后衍生化, 检测过程中存在目标物共流出现象, 导致定性、定量不准确。不仅如此, 两种方法检测结果之间存在较大差异(Ben-Gigirey *et al*, 2012; Harju *et al*, 2015; Burrell *et al*, 2016)。因此, 欧盟、CAC 等国际组织经过多轮磋商, 初步商定以液质联用技术作为标准方

* 中央级基本科研业务费专项资金资助项目, 20603022015017-1 号, 20603022011004 号; 山东省重点研究计划, 2016GSF120018 号。吴海燕, 助理研究员, E-mail: wuhy@ysfri.ac.cn
① 通讯作者: 谭志军, 硕士生导师, 研究员, E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn
收稿日期: 2016-10-26, 收修改稿日期: 2017-01-13

法, 以提升国际社会对 PSTs 监控的一致性, 确保消费者健康安全。目前, 国内外已建立了多种 PSTs 液质联用检测技术(Zhuo *et al*, 2013; 周磊等, 2014; 于慧娟等, 2015), 其主要缺点是: 多残留折算毒力当量因子后的检出限总量与小鼠生物法比较不存在明显优势; 为了降低基质干扰, 在前处理过程中引入高倍数的稀释过程(Boundy *et al*, 2015), 使检测方法检出限偏高; 国家标准 GB/T 5009.213-2016 仅检测 10 种毒素, 而N-磺酰氨甲酰基类毒素在我国海域有广泛分布, 且该毒素可转化成其他高毒性物质。因此, 亟需建立包含全部 13 种限量毒素的检测方法。

针对上述问题, 本研究通过优化前处理条件, 降低前处理过程稀释倍数, 提高方法灵敏度; 采用 Qtrap 质谱的多反应监测(MRM)-信息依赖采集(IDA)-增强子离子扫描(EPI)模式, 建立了 13 种 PSTs 的同时定量检测与定性确证方法, 并用于渤海湾双壳贝类样品中 PSTs 的检测。

1　材料与方法

1.1　仪器、试剂与材料

AB-5500 QTRAP 液相色谱-四极杆/离子阱复合质谱(美国 AB SCIEX 公司), 配有电喷雾离子源(ESI); XW-80A 旋涡混合器(上海医大仪器厂); Himac CR 22G Ⅱ高速离心机(日立 Hitachi 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); 固相萃取装置(美国 Supelco 公司); 恒温水浴锅(上海蓝凯仪器仪表有限公司)。甲醇、乙腈(HPLC 级, 美国 Merk 公司); 甲酸、乙酸铵(HPLC 级, 瑞士 Fluka 公司); 超纯水(18.2 MΩ. cm); 石墨化碳黑固相萃取柱(ENVI-Carb^{TM}, 250mg/3mL, 美国 Supelco 公司), 其他未作特殊说明的试剂均为分析纯。

PSTs 标准溶液: 石房蛤毒素 STX, 新石房蛤毒素 NEO, 膝沟藻毒素 GTX1、GTX2、GTX3、GTX4, N-磺酰氨甲酰基类毒素 GTX5、C1、C2, 脱甲酰基类毒素 dcSTX、dcNEO、dcGTX2、dcGTX3 标准品(加拿大国家海洋研究中心), 用 75%乙腈水(含 0.25%甲酸)稀释配制成混合溶液, 其中各组分浓度分别为: GTX5、NEO、STX、dcNEO、dcSTX 为 500ng/mL; GTX3、GTX4、dcGTX3、C2 为 200ng/mL; GTX1, GTX2 为 606ng/mL; C1 为 650ng/mL; dcGTX2 为 711ng/mL。

1.2　样品预处理

1.2.1　试样制备　　用清水将贝壳外表洗净。切断闭壳肌, 用重蒸馏水淋洗内部去除泥沙及其它异物, 仔细取出贝肉, 切勿割破贝体, 在筛子上平铺沥水 5min, 然后将贝肉均质、混匀。冷冻贝类: 在室温下, 使冷冻的样品(带壳或脱壳的)呈半冷冻状态, 按上述步骤开壳、淋洗取肉、均质。样品量约 200g。如样品不能及时检测, 应–18°C 以下保存备用。

1.2.2　提取　　称取 5g 试样于 50mL 离心管中, 加入 5mL 1%乙酸水溶液, 涡旋混合 90s。将离心管密封置于沸水中煮沸 5min, 取出置于流水下冷却至室温。4500r/min 离心 10min, 待净化。

1.2.3　净化　　移取上述提取液 1mL 于 2mL 离心管中, 加入 5μL 氨水, 涡旋混匀。依次用 2mL 乙腈, 2mL 20%乙腈水溶液(含 1%乙酸)、2mL 0.1%氨水溶液活化 Supelco ENVI-Carb 固相萃取柱, 加入 500μL 提取液, 再用 700μL 超纯水淋洗, 正压挤干, 最后用 1mL 75%乙腈水(含 0.25%甲酸)洗脱混匀, 过 0.22μm 滤膜于进样小瓶中, 4°C 下保存, 供液相色谱-串联质谱分析。

1.3　液相色谱-串联质谱分析条件

液相色谱条件: TSK-Amide-80(3μm, 2mm×15cm); 柱温: 40°C; 流速: 0.35mL/min; 进样量: 10μL; 流动相: A: 水(含 2mmol/L 甲酸铵, 50mmol/L 甲酸), B: 95%乙腈水溶液(含 2mmol/L 甲酸铵, 50mmol/L 甲酸); 洗脱梯度: 0—3.0min, 80% B; 3.1—5.0min, 80%—40% B; 5.1—10.0min, 40% B; 10.1—11.0min, 40%—80% B; 11.1—13.0min, 80% B。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 多反应监测(MRM), 正负离子切换模式; 喷雾电压: 5.5kV, –4.5kV; 离子源温度 550°C; 碰撞气压力: Medium; 气帘气压力: 30psi; 雾化气压力 GS1: 50psi; 辅助加热气压力 GS2: 50psi。其他参数见表 1。

2　结果与讨论

2.1　质谱条件的优化

在电喷雾离子源下, 通过针泵进样, 正/负离子模式下进行母离子和碎片子离子的扫描, 以确定最佳 MRM 离子对。结果表明: STX 类毒素, 包括 STX, dcSTX, NEO, GTX5 以及 dcNEO 在正离子模式下灵敏度高, 获得碎片信息丰富; 其他含硫麻痹性贝类毒素 GTX 以及 C 在负离子模式下分子离子峰$[M-H]^-$有更好的离子响应, 较正离子模式灵敏度提高 2—10 倍, 所有的同分异构体可通过二级质谱进行区分。其中 GTX1—4 二级谱图中碎片峰较少, 主要为$[M-H-H_2O]^-$、$[M-H-NHCO]^-$和$[M-H-NHCO-H_2O]^-$(李兆永

表 1 13 种 PSTs 的质谱分析参数(Boundy *et al*, 2015)

Tab.1 The mass spectrometry parameters of 13 paralytic shellfish toxins (PSTs)

化合物	保留时间	母离子	定性与定量子离子	碰撞能量	解簇电压	离子模式
STX	6.11	300.2	221.0/204.0	35/30	30	正离子
dCSTX	6.11	257.1	239.1/126.1	22/30	30	正离子
NEO	6.14	316.1	298.2/126.1	34/34	34	正离子
dcNEO	6.07	273.1	225.2/126.1	35/35	35	正离子
GTX5	6.09	380.1	300.1/282.1	15/35	25	正离子
GTX2	5.92	394.0	333.1/351.1	22/16	16	负离子
GTX3	6.11	394.0	351.1/333.1	16/22	22	负离子
GTX1	5.95	410.1	349.1/367.1	22/15	15	负离子
GTX4	6.14	410.1	367.1/349.4	15/22	22	负离子
C1	5.85	474.1	122.0/351.1	25/30	30	负离子
C2	6.06	474.1	122.0/351.1	30/25	25	负离子
dcGTX2	5.99	351.1	333.1/164.0	17/30	30	负离子
dcGTX3	6.17	351.1	164.0/333.1	30/17	17	负离子

注：STX: Saxitoxin, 石房蛤毒素; NEO: Neosaxitoxin, 新石房蛤毒素; dcSTX: Decarbamoylsaxitoxin, 脱氨甲酰基石房蛤毒素; dcNEO: Decarbaoylneosaxitoxin, 脱氨甲酰基新石房蛤毒素; dcGTX2&3: Decarbamoylgonyautoxins-2&-3, 脱氨甲酰基膝沟藻毒素 2&3; GTX5: Gonyautoxin-5, N-磺酰氨甲酰基类毒素; C1&2: N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-2&-3, N-磺酰氨甲酰基类毒素; GTX2&3: Gonyautxins-2&-3, 膝沟藻毒素; GTX1&4: Gonyautoxins-1&-4, 膝沟藻毒素。

等, 2014)。dcGTX 和 C 类毒素，二级谱图碎片峰较多，但相对丰度低，其中包括中性丢失-SO_3 碎片。而 GTX5 在负离子模式下响应更佳，但无稳定碎片离子，因此采用正离子模式下扫描，以 MRM 离子对定性。

同时，为了完善 PSTs 的定量检测与高精确度定性分析，采用 MRM 检测结合 IDA-EPI 的采集模式，在检测过程中通过预设条件，对疑似检测结果触发 EPI 增强子离子扫描，分别采集碰撞能量为(20, 35, 50, 35)±15eV 的全扫描二级质谱图。如图 1 所示，同分异构体在相同的能量下，离子丰度比有明显差异。该质谱图可与预采集的标准物质质谱谱库进行匹配(IF>85%)，同时参考保留时间偏差(<3%)，共同确证目标化合物，提高分析结果可靠性。

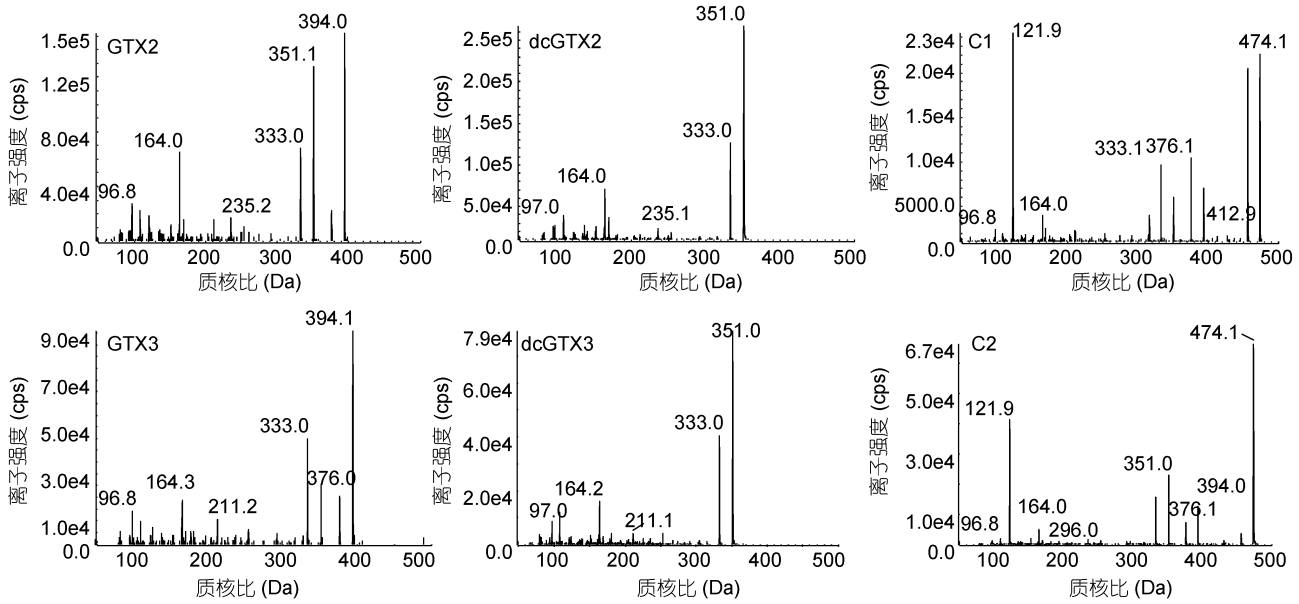


图 1 PSTs 的二级质谱图(以 C1, C2, dcGTX2, dcGTX3, GTX2, GTX3 为例, CE 为 35±15eV)

Fig.1 The secondary mass spectra of paralytic shellfish toxins (C1, C2, dcGTX2, dcGTX3, GTX2, GTX3, CE 35±15eV)

2.2　色谱条件的优化

PSTs 是强极性生物碱, 在 13 种目标化合物中, 8 种化合物存在同分异构体, 包括 GTX2 与 GTX3, GTX1 与 GTX4, dcGTX2 与 dcGTX3 以及 C1 与 C2。通过优化的色谱条件(Andrew, 2015; Boundy *et al*, 2015), 将同分异构体化合物分别选择正/负离子通道进行分析, 虽然可以解决部分离子响应差的问题, 但色谱条件较为苛刻, 稳定性差且对仪器要求较高。为了达到同分异构体化合物基线分离的目的, 本研究选用两种规格 HILIC 色谱柱: Acquity UPLC BEH Amide(1.7μm, 2.1×150mm)与 TSK-Amide-80(3μm, 2.1×150mm)。其中小粒径 Waters 色谱柱灵敏度优于 TSK 色谱柱, 但在普通高效液相色谱上分离度较差, 适用性不强。比较而言, 采用 75%的乙腈水(含 0.25%甲酸)作为标准品稀释溶液, 通过 TSK 色谱柱的分离, 即满足检测灵敏度要求且可将同分异构体达到基线分离, 故选用该色谱柱。如图 2 中所示, 由于 PSTs 结构与极性相近, 出峰时间较为集中, 但采用本方法优化的色谱条件, 目标物在各自离子通道达到完全分离。根据同分异构体化合物标准品浓度差异结合其离子响应, 可明显区分出峰先后顺序, 通过保留时间进行定性。

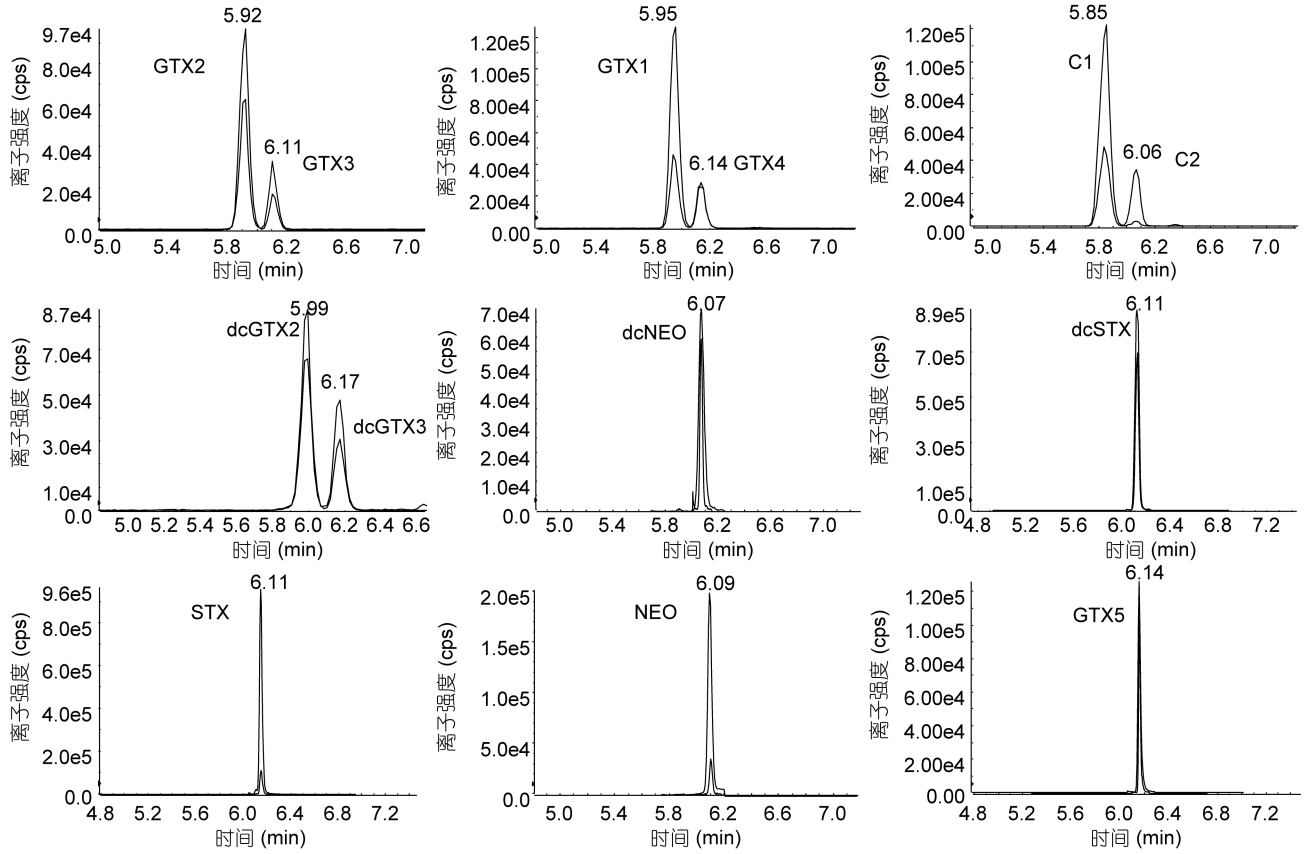


图 2　13 种 PSTs 标准溶液提取离子色谱图(STX 浓度为 20.0ng/mL 的混合标准溶液)

Fig.2　The extracted ion chromatograms of 13 PSTs standard solution ((mixed standard solution containing STX 20.0ng/mL))

2.3　样品前处理方法的优化

2.3.1　提取溶剂的优化　　为了提高 PSTs 的提取效率, 方法对比了四种常用 PSTs 提取试剂的提取效果, 分别为 1%乙酸水溶液、0.1mol/L 盐酸水溶液(EURLMB, 2014)、90%乙腈水溶液(Zhuo *et al*, 2013)以及 80%乙腈水溶液(Sayfritz *et al*, 2008)(含 0.1%甲酸)。每组实验设 6 个平行, 在扇贝基质中添加混合标准溶液 200μL, 通过测试各组分含量折算回收率, 以确定最佳提取溶剂。

结果表明, 乙腈水溶液提取效率最差不足 70%。1%乙酸水溶液提取效率优于 0.1mol/L 盐酸水溶液, 其回收率 81.8%—108%之间。这是因为 PSTs 在酸性条件下稳定(pH<4.50), 最佳 pH 为 3.00。1%乙酸水溶液 pH 为 2.90, 更有利于 PSTs 的提取。且 N-磺酰氨甲酰基类毒素 GTX5、C1、C2 在盐酸提取液的加热过程中, 可发生转化(Botana, 2008)形成 STX、GTX2、

GTX3, 从而影响检测结果。本研究选用 1%乙酸水溶液作为提取剂, 结合沸水浴加热 5min 的方式, 可模拟食物在胃中消化过程(Botana, 2008), 能较好地拟合毒素在人体中的作用方式, 是目前应用较为广泛的 PSTs 前处理方法。

2.3.2 固相萃取小柱的对比 双壳贝类样品基质复杂, 其中对检测结果造成影响的主要包括盐和金属离子(Mg^{2+}, Cu^{2+})等, 其基质抑制率在 30.0%—50.0%之间(于慧娟等, 2015)。方法比较了 C18、HLB(Zhuo *et al*, 2013)以及石墨化炭黑固相萃取柱(Turner *et al*, 2015)对 PSTs 的净化与回收率影响。如图 3 所示, 三种固相萃取小柱中, C18 对于部分毒素化合物如GTX5保留性差, 而石墨化炭黑柱能更好地去除贝肉基质干扰, 显著提高目标物回收率。这是因为 ENVI-Carb 包含高强度的大表面积球形粒子, 可回收 70%以上的强极性化合物。通过优化的洗脱液 75%乙腈水(含 0.25%甲酸), 保证目标化合物洗脱完全, 且显著降低前处理过程中的稀释倍数, 提高检测方法的灵敏度。

2.4 方法学验证

取适量 PSTs 混合标准溶液配制一系列浓度梯度的标准溶液依次测定(表 2)。以各组分的面积比值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归分析。采用空白扇贝基质添加相应混合标准溶液的方式, 以信噪比($S/N \geq 3$)确定各组分检出限(LOD), 以信噪比($S/N \geq 10$)确定各组分定量限(LOQ)。结果表明, 13 种 PSTs 的线性良好, 其相关系数(R^2)均大于 0.99。13 种 PSTs 在检出限下按毒性因子转换后相当于 62.0μg STX eq/kg, 满足目前 PSTs 限量要求。

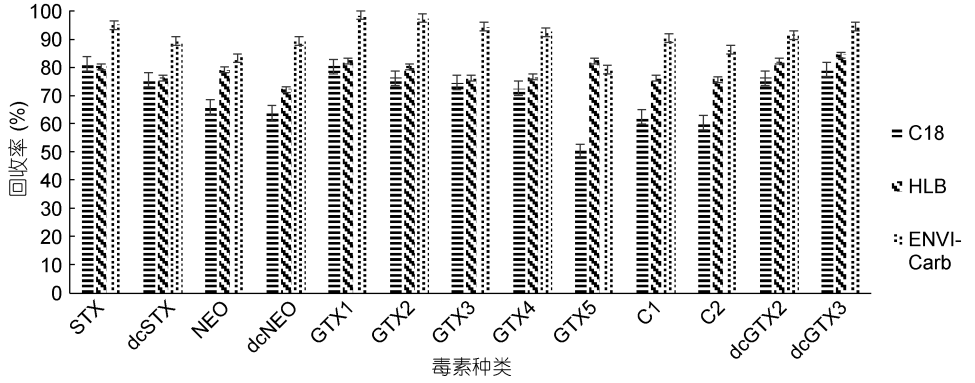


图 3 不同固相萃取小柱对回收率的影响(n=6)

Fig.3 Influence of solid phase extraction column on the ratio of recovery (n=6)

注: C18、HLB 和 ENVI-Carb 为三种固相萃取小柱型号。

表 2 13 种 PSTs 的线性范围、回归方程、相关系数和定量限

Tab.2 The linear range, regression equation, correlation coefficient, and quantitation limits of 13 PSTs

化合物	线性范围(ng/mL)	回归方程	相关系数	检出限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
STX	10.0—200	y=4528.1x–404.90	0.99718	10.0	20.0
dCSTX	10.0—200	y=6631.2x–1937.2	0.99505	10.0	20.0
NEO	10.0—200	y=664.60x–1096.4	0.99856	10.0	20.0
dcNEO	10.0—200	y=535.20x+442.70	0.99717	10.0	20.0
GTX5	10.0—200	y=10339x+22458	0.99795	10.0	20.0
GTX2	12.0—243	y=2964.5x+7455.6	0.99711	12.0	24.0
GTX3	4.00—80.0	y=2449.3x+1411.7	0.99921	4.00	8.00
GTX1	12.0—243	y=4088.4x+38.600	0.99952	12.0	24.0
GTX4	4.00—80.0	y=2549.5x+2489.3	0.99789	4.00	8.00
C1	13.0—260	y=4353.1x+5834.5	0.99983	13.0	26.0
C2	4.00—80.0	y=3743.5x–703.20	0.99848	4.00	8.00
dcGTX2	14.0—284	y=1655.9x+3887.7	0.99930	14.0	28.0
dcGTX3	4.00—80.0	y=3993.8x–3059.0	0.99973	4.00	8.00

选取栉孔扇贝、贻贝、波纹巴非蛤和太平洋牡蛎四种贝类基质, 分别通过添加 STX 浓度为 10.0、20.0、50.0μg/kg 混合标准溶液进行测定, 设定每个浓度测试 6 个平行样本。结果见表 3, PSTs 在四种贝类基质中的平均回收率与相对标准偏差分别为: 栉孔扇贝(79.6±10.4)%—(98.6±6.40)%, 贻贝(81.4±4.67)%—(97.6±4.39)%, 波纹巴非蛤(82.6±6.33)%—(99.4±6.38)%, 太平洋牡蛎(80.4±13.8)%—(98.8±6.54)%。方法的准确度与精密度良好, 能满足双壳贝类样品检测过程中 13 中 PSTs 的准确测量要求。

2.5　实际样品的测定

分别采集 2016 年 5 月渤海湾海域贝类样品 10 份, 包括贻贝、太平洋牡蛎、栉孔扇贝、毛蚶和波纹巴非蛤各 2 份, 发现部分样品 PSTs 总量较高, 最高达到 627μg STX eq/kg(表 4), 接近 PSTs 限量标准 800 μg STX eq/kg。对检出样品进行谱库检索, 匹配度>85.0%。主要的毒素种类为 STX、GTX1、GTX2、GTX3、GTX4 以及 C1、C2。其中以贻贝中毒素蓄积含量最高, 扇贝次之, 且蚶样品所有毒素均未检出。

在实际样品检测过程中, 应用方法中的定性功能发现其中 STX 疑似阳性样品。如图 4 所示, 目标峰的液相保留时间偏差<3%, 虽 MRM 离子对离子比率差异明显, 但在实际检测过程中容易发生误判, 定性为 STX 检出。应用本研究中检测方法, 将样品中 STX 的 EPI 谱图与谱库中 STX 相同高能量下的 EPI 谱图比对, 其匹配度 IF 值为 52.6%<85.0%判定值, 故可判

表 3　四种基质加标样品平均回收率以及相对标准偏差

Tab.3　Average recovery and relative standard deviation of PSTs in four shellfish spiked samples

化合物	栉孔扇贝		贻贝		波纹巴非蛤		太平洋牡蛎	
	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
STX	95.3	2.63	97.6	4.39	98.4	7.03	98.8	6.54
dCSTX	89.4	6.49	92.3	6.33	90.5	11.9	89.7	6.59
NEO	83.6	12.0	84.9	10.8	87.2	6.34	80.4	13.8
dcNEO	89.3	10.5	92.5	4.55	90.4	9.21	86.4	6.99
GTX5	98.6	6.40	96.3	8.19	99.4	6.38	92.4	7.22
GTX2	97.5	3.45	92.7	9.67	98.5	8.92	96.4	8.91
GTX3	94.6	6.72	93.8	4.12	96.4	10.9	92.0	5.10
GTX1	92.6	8.40	90.1	6.89	93.8	9.37	90.6	9.89
GTX4	79.6	10.4	81.4	4.67	82.6	6.33	80.8	8.31
C1	90.5	11.3	89.5	10.2	90.5	10.2	92.7	12.4
C2	86.4	10.9	87.6	7.69	85.4	11.4	88.0	10.6
dcGTX2	91.6	7.98	92.4	8.26	89.7	6.78	92.5	9.58
dcGTX3	94.8	6.12	92.6	4.38	93.7	7.34	94.1	9.34

注: RSD: relative standard deviation, 相对标准偏差

表 4　市售双壳贝类样品中的 **PSTs** 含量

Tab.4　Concentrations of the PSTs in bivalve mollusks purchased in local market (μg/kg)

化合物	STX	dcSTX	NEO	dcNEO	GTX1	GTX4	GTX2	GTX3	GTX5	dcGTX2	dcGTX3	C1	C2	总量
贻贝	92.6	10.1	76.9	ND	191	252	70.6	55.4	ND	ND	ND	210	164	627
	31.3	ND	10.6	ND	245	316	90.8	79.4	ND	ND	ND	194	154	609
牡蛎	ND	ND	69.0	ND	53.4	72.3	ND	ND	ND	11.4	ND	116	ND	176
	ND	ND	30.4	ND	72.6	70.4	ND	ND	ND	ND	ND	106	23.8	156
扇贝	34.6	ND	ND	ND	113	153	23.6	31.4	ND	ND	ND	34.6	31.0	287
	18.9	ND	ND	ND	146	37.2	104	56.7	ND	ND	ND	56.7	28.6	270
蚶	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
蛤	13.5	ND	16.8	ND	32.4	ND	15.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	68.9
	12.9	ND	13.6	ND	18.9	ND	13.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50.9

说明: ND 表示未检出。其中总量的单位为μg STX eq/kg, 计算方式参见(Turner *et al*, 2015)

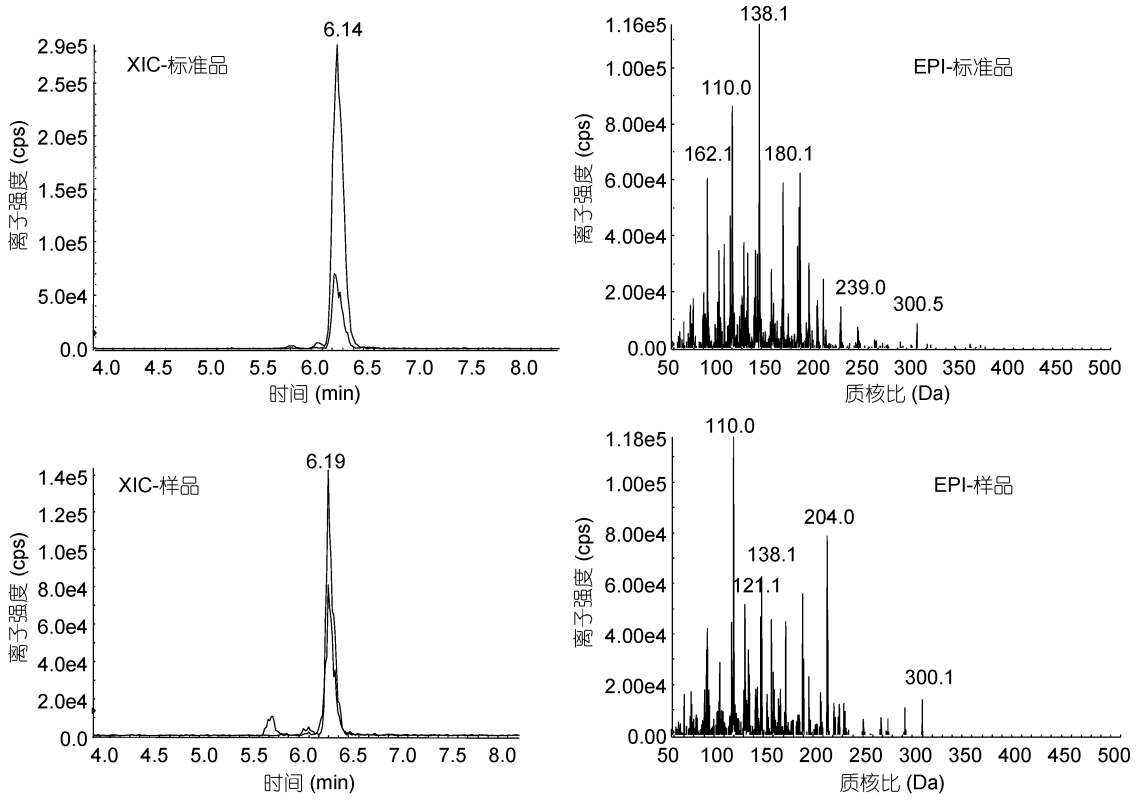


图 4 标准样品中 STX 与实际样品中疑似 STX 的提取离子流图与二级碎片谱图

Fig.4 XIC and EPI chromatography of STX in standard sample and actual sample

注: XIC: extracted ion chromatogram, 总离子流图; EPI: enhanced product ion chromatography, 增强子离子扫描谱图

定样品中未检出 STX。综上所述, 本方法适用于复杂样品基质条件下的 PSTs 定性检测, 可提高检测结果的可信度。

3 结论

本研究建立了适用于双壳贝类中 13 种 PSTs 的液相色谱-四级杆/离子阱复合质谱检测方法。本方法灵敏度高, 稳定性好。在实际样品检测中, 检出高含量阳性样品, 并对疑似阳性样品进行了准确的定性判定。本方法为进一步开展全国贝类中 PSTs 的监测, 保障消费者的食用安全以及实现贝类出口贸易复关, 提供了有效的技术手段。

参 考 文 献

于慧娟, 蔡友琼, 黄宣运等, 2015. 10 种麻痹性贝类毒素的固相萃取及液相色谱-串联质谱测定法. 海洋渔业, 37(4): 364—371

李兆永, 陈军辉, 王 帅等, 2014. 麻痹性贝毒素电喷雾质谱负离子模式分析特征. 质谱学报, 35(1): 8—15

周 磊, 杨宪立, 武爱波等, 2014. 麻痹性贝类毒素的安全评价与检测技术研究进展. 世界科技研究与发展, 36(3): 336—342

Ben-Gigirey B, Rodríguez-Velasco M L, Otero A *et al*, 2012. A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish. Toxicon, 60(5): 864—873

Botana L M, 2008. Seafood and Freshwater Toxins: pharmacology, physiology, and detection. New York: CRC Press, 167.

Boundy M J, Selwood A I, Harwood D T *et al*, 2015. Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. Journal of Chromatography A, 1387: 1—12

Burrell S, Crum S, Foley B *et al*, 2016. Proficiency testing of laboratories for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by QUASIMEME: A review. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 75: 10—23

EURLMB, 2014. Standard Operating Procedure for PSP toxins by Mouse Bioassay. Vigo, Spain: European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins

Harju K, Rapinoja M, Avondet M *et al*, 2015. Results of a saxitoxin proficiency test including characterization of reference material and stability studies. Toxins, 7(12): 4852—4867

Sayfritz S J, Aasen J A B, Aune T, 2008. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish

by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. Toxicon, 52(2): 330—340

Turner A D, Dhanji-Rapkova M, Algoet M *et al*, 2012. Investigations into matrix components affecting the performance of the official bioassay reference method for quantitation of paralytic shellfish poisoning toxins in oysters. Toxicon, 59(2): 215—230

Turner A D, McNabb P S, Harwood D T *et al*, 2015. Single-laboratory validation of a multitoxin ultra-performance LC-hydrophilic interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish. Journal of AOAC International, 98(3): 609—621

Zhuo L Y, Yin Y C, Fu W S *et al*, 2013. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. Food Chemistry, 137(1—4): 115—121

Zou C, Ye R M, Zheng J W *et al*, 2014. Molecular phylogeny and PSP toxin profile of the *Alexandrium tamarense* species complex along the coast of China. Marine Pollution Bulletin, 89(1—2): 209—219

SIMULTANEOUS IDENTIFICATION AND DETECTION OF PARALYTIC SHELLFISH TOXIN IN BIVALVE MOLLUSKS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH QUADRUPOLE/LINEAR ION TRAP TANDEM MASS SPECTROMETRY

WU Hai-Yan[1, 2], GUO Meng-Meng[1, 2], BING Xiao-Fei[3], ZHENG Guan-Chao[1, 2], PENG Ji-Xing[1, 2], TAN Zhi-Jun[1, 2], ZHAI Yu-Xiu[1, 2]

(1. *Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality*, *Ministry of Agriculture*, *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Qingdao* 266071, *China*; 2. *National Center for Quality Supervision and Test of Aquatic Products*, *Qingdao* 266071, *China*; 3. *College of Fisheries and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract　We developed a new method for simultaneous identification and detection of 13 paralytic shellfish toxins (PSTs) in bivalve mollusks using liquid chromatography coupled with quadrupole/linear ion trap tandem mass spectrometry (LC-QTrap/MS). Samples were extracted with acetic acid aqueous solution, and cleaned up in ENVI-Carb solid-phase extraction column. Separation of the 13 PSTs were performed on an HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) with multiple reaction monitoring (MRM)-information-dependent acquisition (IDA) experiment-enhanced product ion (EPI) scan in mass spectrometry acquisition. The calibration curves are linear well with correlation coefficient over 0.99. The overall detection limit of the method is 62.0μg for STX eq/kg; specifically, the limit for STX, dcSTX, NEO, dcNEO, and GTX5 was 10.0μg/kg; 12.0μg/kg for GTX1; 4μg/kg for GTX3, GTX4, C2 and dcGTX3, and 13μg/kg for C1 and dcGTX2. The average spiked recoveries for 13PSTs were (79.6±10.4)%—(98.8±6.54)%. This method could reduce shellfish matrix suppression effect, simplify pre-treatment, reduce the times of dilution, and increase the sensitivity, during which isomers could be separated from baseline. The proposed method therefore is recommended to identify and detect the 13PSTs in bivalve mollusks.

Key words　paralytic shellfish toxins;　matrix suppression effect;　solid-phase extraction