

液质联用技术在生物毒素食品安全检测 分析中的应用

王 婵^{1,2}, 孙兴权², 吴远高³, 代 弟², 刘慧颖², 张 或¹, 曹际娟^{2*}

(1. 大连工业大学, 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001;
3. 塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700)

摘 要: 生物毒素是自然界一种重要的生命现象, 是人们探讨生命科学奥秘和开发新药的重要工具和物质基础, 也是食品安全领域的重点防治对象。真菌毒素和海洋生物毒素是与食品安全相关的两类生物毒素, 二者均具有毒性强、污染面广的特点, 对人类健康具有极大的危害。在生物毒素众多分析检测手段中, 液质联用技术因灵敏、高效等特点而被广泛应用。本文以液质联用技术为切入点, 综述了该技术用于生物毒素食品安全检测分析的研究与应用进展, 同时对相关的样品处理技术研究也进行了概要介绍。

关键词: 真菌毒素; 贝类毒素; 河鲀鱼毒素; 西加鱼毒素; 液质联用技术; 样品处理

Applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry in the detection of biological toxin in food safety testing

WANG Chan^{1,2}, SUN Xing-Quan², WU Yuan-Gao³, DAI Di², LIU Hui-Ying²,
ZHANG Yu¹, CAO Ji-Juan^{2*}

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 3. Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng 834700, China)

ABSTRACT: Biological toxin is a kind of important life phenomenon in nature, an important tool and the material basis to explore the secrets of life science and development of new drugs, and is also a key preventive treatment object in the field of food safety. Mycotoxin and marine biotoxins which are two kinds of natural toxic substances associated with food safety, have the characteristics of strong toxicity and pollute widely and a great harm to human health. Among the detection means of mycotoxin and marine biotoxin, the technique of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) is widely used for its sensitive and efficient characteristics. Based on the LC-MS technique as a breakthrough point, its application in biological toxins related to food safety testing analysis in recent years were reviewed, as well as the related sample processing technology progress.

KEY WORDS: mycotoxin; shellfish toxin; tetrodotoxin; ciguatera; liquid chromatography couple to mass spectrometry; sample processing

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201310141)

Fund: Supported by the Special Scientific Research Fund of AQSIQ Public Welfare Profession of China (201310141)

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Senior Researcher, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.60, Changjiang East Road, Dalian 116001, China. E-mail: cjj0909@163.com

1 引言

生物毒素(biotoxin)又称天然毒素,是动植物和微生物中存在的某种对其他生物物种有毒害作用的、非营养性天然物质成分,或因贮存方法不当,在一定条件下产生的某种有毒成分^[1]。作为自然界一种重要的生命现象,生物毒素结构多样,种类繁多,蕴涵着大量奥妙复杂的重要生物学信息,广泛存在于自然环境与农产品中。根据来源不同,生物毒素可分为动物毒素、植物毒素、微生物毒素、海洋生物毒素4大类。随着研究的不断深入,目前生物毒素已成为人们探讨生命科学奥秘和开发新药的重要工具和物质基础。而其中涉及到的真菌毒素和海洋生物毒素也是食品安全领域的重点防治对象。

生物毒素检测分析技术主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[2]、免疫荧光法(immunofluorescence, IF)^[3]、放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)^[4]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[5]、质谱法(mass spectrometry, MS)^[6]、实时聚合酶链反应法(real time polymerase chain reaction, RT-PCR)^[7]、组织或细胞检测法^[8]、小鼠生物法^[9]、高效毛细管电泳法(high performance capillary electrophoresis, HPCE)^[10]、表面等离子体共振法(surface plasmon resonance, SPR)^[11]、压电免疫传感法(piezoelectric immunosensor, PI)^[12]、极谱法(polarography)^[13]等。在众多的分析测试方法中,液质联用技术以其同时具备高特异性和高灵敏度的特点而被广泛应用于生物毒素研究领域。本文以液质联用技术为切入点,对其在食品安全领域中真菌毒素和海洋生物毒素检测分析中的应用进行综述。

2 质谱的分类

近年来,质谱技术因为良好的定性确证和定量功能而被越来越多地用于科研和检测领域。根据分析对象和应用角度的不同,质谱仪可大致分为有机质谱仪和无机质谱仪两种。目前有机质谱仪数量最多,应用最广,主要包括气质联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)和液质联用仪(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)。根据检测器工作原理不同,质谱仪又可分为四极杆质谱仪(quadrupole mass spectrometer, QMS)、飞行时间质谱仪(time of flight mass spectrometer, TOFMS)、离子阱质谱仪(ion trap mass spectrometer, ITMS)和磁质谱仪(magnetic sector mass spectrometer, MSMS)等。质谱技术在保留了传统技术高分离度的同时,还兼备高选择性、高灵敏度、能提供化合物分子质量及结构信息等优点,从分析检测效率及结果看来,是微量样品中痕量组分分析的最好选择。

3 质谱技术在食品安全检测中的应用

近年来,生物毒素导致的人或动物中毒事件频频发生,其中与食品安全有关的主要涉及真菌毒素和海洋生物毒素两类。

3.1 质谱技术在真菌毒素检测中的应用

受气候变暖、干旱等因素影响,全球食用和饲用农产品受真菌毒素污染日趋严重。根据中国农科院农产品加工研究所统计,2001至2011年10年间,受真菌毒素污染的影响,我国出口欧盟食品违例事件达2559起,其中真菌毒素超标占28.6%,高于公众熟知的重金属、食品添加剂、农药残留等因素^[14]。目前为止,全世界已经发现了300多种结构不同的真菌毒素,其中已经被分离鉴定的有20多种。真菌毒素是由产毒真菌在适宜的环境条件下产生的有毒代谢产物,按其主要产毒菌种可分为曲霉毒素,如黄曲霉毒素(aflatoxins, AF)、赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)等;青霉菌毒素,如展青霉素(patulin, PAT)、桔青霉素(citrinin, CIT)等;镰刀菌毒素,如脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)等及其他(如孢子毒等)几大类^[15]。真菌毒素广泛污染农作物、粮油食品及饲料等植物源产品,人畜摄食后可导致肝毒、肾毒、神经毒等急慢性中毒,且部分已被证实具有三致作用。鉴于真菌毒素的危害性,我国国家 GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量^[16]规定了食品中 AF B1、AF M1、DON、PAT、OTA 以及 ZEN 的限量指标。

现有的传统真菌毒素分析方法大多是借助免疫亲和柱固相萃取法净化,后续采用高效液相色谱法或液质联用法检测来进行。这种检测方式往往是只针对某一种毒素的检测,检测效率低,且成本较高。因此,发展真菌毒素多组分协同检测技术是当务之急。美国 Trilogy 分析实验室研发的 PuriToxSR TC-M160 真菌毒素多功能净化柱(MFC, MultiSe)将极性、非极性、离子交换等多类基团作为填充剂填充到柱体中,可选择性吸附液中的脂类、蛋白类等杂质,而 AF、ZEN、DON 等毒素则不被吸附而直接通过,一步即可完成以上3类毒素样品的净化,30 s左右即完成整个净化过程,且净化效果理想(回收率为85%~95%),既降低了成本,又提高了检测效率^[17]。鲍蕾等^[18]采用多功能柱(MycoSep225, ROMER),同时借助高效液相色谱法检测了粮谷及其制品中的 DON,方法定量限为0.3 μg/g,在0.5、1.0、1.5 μg/g 的添加水平下,样品回收率为66.0%~98.3%,室内相对标准偏差为1.9%~12.7%。最近,美国 Vicam 公司推出了真菌毒素6合1免疫亲和柱,该柱可一次性检测 AF、OTA、伏马毒素(fumonisin, FB)、DON、ZEN、T2 和 HT2,效果良好(回收率为80%~110%)^[19]。

近些年,发展较快的 QuEChERS(quick, easy, cheap,

effective, rugged, and safe)样品处理方法在真菌毒素检测中的应用越来越多,该方法具有高通量、快速、安全等特点,与液质联用法联用,可实现农作物、饲料、酒类等产品中真菌毒素的高效检测,表 1 列出了相关不同基质样品中真菌毒素的样品处理及检测方法的代表性案例。

由以上案例可以看出,QuEChERS 法具有快速、高通量的特点,可以根据实际需要采用不同提取剂、吸附剂组合进行样品处理,其与液质联用技术结合在真菌毒素检测分析中起到了事半功倍的效果。而高通量样品处理方法通常会存在一定的基质效应,这会对方法的检测限、选择性,以及测试结果的准确定量产生影响,同时还会增加仪器的维护成本。因此,新净化体系和新净化材料的研究开发将是提高 QuEChERS 法净化效果的一个新的研究方向^[25]。

3.2 质谱技术在海洋生物毒素中的应用

近年来,随着我国沿海养殖业的快速发展,以及城市工业废水和生活污水大量排入海中,导致赤潮频繁发生,由此加剧了海洋生物毒素的增加,食品安全风险也随之加大。海洋生物毒素是由海洋中的有毒藻类通过食物链传递给藻食性的鱼、虾及贝类等生物,并在其体内蓄积形成的有毒高分子化合物,与食品安全相关的海洋生物毒素主要有贝类毒素、河鲀毒素、西加鱼毒素等。

3.2.1 贝类毒素

贝类毒素是贝类摄入毒性海藻或与藻类共生时,由这些藻类合成并蓄积在贝类体内的多种毒素,其按照毒性机制可分为麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poison, PSP)、腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poison, DSP)、神经性贝类毒素(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)和健忘性贝类毒素(amnesic shellfish poisoning, ASP)4种;而按照化学结构则可分为 8 种:原多甲酸毒素(azaspiracid, AZA)组,

短裸甲藻毒素(brevetoxin, BTX)组,环亚胺类毒素(cyclic imine, CI)组,软骨藻酸毒素(domoic acid, DA)组,大田软海绵酸毒素(okadaic acid, OA)组,蛤毒素(pecenotoxin, PTX)组,石房蛤毒素(saxutoxin, STX)组,虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)组。贝类毒素危害具有突发性和广泛性,由于其毒性大、反应快、无适宜解毒剂,给防治带来了许多困难。

传统的贝类毒素分析检测方法多为小鼠生物检测法,但因涉及动物伦理,灵敏度低,准确性和重现性差,易出现假阳性,不具有特异性,无法确定毒素的成分和含量等原因,现正在被 LC-MS/MS 等化学检测法取代。很多研究人员用单四级杆建立贝毒检测方法,Stobo 等^[26]用 LC-MS 法建立了贻贝、蚌、牡蛎、扇贝等样品中 OA、DTXs、YTXs、PTXs 和 AZAs 等脂溶性贝毒的检测方法,试样经 80%甲醇水提取, C8 反相色谱柱分离, OA、PTX2 和 AZA1 的线性范围为 40~160 $\mu\text{g}/\text{kg}$, YTX 为 100~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOD 达到 40~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率为 72%~120%, 精密度范围可达 1%~22%。Toshiyuki 等^[27]也用 C8 反相色谱柱在酸性条件下梯度洗脱,负离子模式监测,建立了一次性检测双壳类水产品中 OA、DTX、PTXs 等 10 种毒素的方法,并同时用小鼠生物法进行对比,得出日常检测中 LC-MS 比小鼠生物法更为适用的结论。

单四级杆选择离子扫描采集质谱信息过少,对于复杂基质中微量残留物定性仍存在较大不确定性,缺乏确证功能,而采用二级质谱则可得到更为准确的定性结果。脂溶性贝类毒素是目前研究较多的一种贝类毒素,马景刚^[28]用 LC-MS/MS 建立了能够同步分析虾夷扇贝等样品中 OA、DTX2、PTX2、YTX、SPX1、GYM 和 AZA1~3 等 9 种脂溶性贝毒的检测方法,并应用所建立的方法对 2011 年我国宁波等地爆发的 DSP 中毒事件的肇事贻贝样品进行了分析,9 种毒素的方法 LOD 均达到 pg 级,该方法灵敏度

表 1 不同基质样品中真菌毒素的样品处理方法及检测技术

Table 1 Sample processing method and testing technology of mycotoxins in different sample matrices

毒素种类	样品基质	样品处理	检测方法	参考文献
AFs、FBs 等 191 种毒素	杏仁, 榛子, 花生, 开心果	乙腈/水/乙酸(79:20:1, v:v:v)提取	UHPLC-MS/MS	[20]
OTA、ZEN、DON、NIV 等 63 种毒素	高粱, 小米, 花生, 大米, 大豆等谷物, 加工过的食品及动物饲料	乙腈/水/乙酸(79:20:1, v:v:v)提取	LC-MS/MS	[21]
NIV、DON、NEO、PA 等 25 种毒素	木薯粉, 花生饼, 玉米	甲醇/乙酸乙酯/水(70:20:10, v:v:v)提取, 分别用玻璃纤维过滤器和氨基(NH ₂)固相萃取柱净化	LC-MS/MS	[22]
AFs、OTA、FBs、ZEN 等 11 种毒素	白酒、啤酒	乙腈/水(30:70, v:v)提取	LC-MS/MS	[23]
AFs、OTA 等 5 种毒素	红辣椒和黑胡椒	乙腈/水(86:14, v:v)提取	UHPLC-MS/MS 和 Orbitrap-MS	[24]

NIV: 雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol); NEO: 新茄病镰刀菌烯醇(neosolaniol); PA:青霉菌酸(penicillic acid)

高,能满足 9 种脂溶性贝毒的痕量分析。流动相的酸碱性对结果也产生一定的影响, Gerssen 等^[29]用乙腈/水在加入氨水的碱性条件下(pH 11),对从贻贝、蚌、牡蛎中提取的 OA、PTXs、YTXs 等 28 种贝类毒素进行梯度洗脱,实验表明亲脂类毒素在碱性条件下稳定,且与酸性条件相比,碱性条件下的 LOD 降低了 2~3 倍。除脂溶性贝类毒素外, NSP 和 PSP 也是公共突发事件的日常监测毒素, McNabb 等^[30]用 LC-MS/MS 对绿色壳贻贝、东部牡蛎、太平洋牡蛎和文蛤四种贝类中的 BTX2、BTX3 等 6 种双边甲藻神经毒素在 0.012~9.9 $\mu\text{g/g}$ 范围内进行定量分析, BTX3、BTX B5、BTX B2、s-desoxy-BTX B2 回收率为 73%~112%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 14%~18%, BTX2、BTX B1 的 RSD 分别为 27%和 12%。而 Zhuo 等^[31]采用 QuEChERS 法及 LC-MS/MS 检测 STX、NEO、GTX₁₋₅、dcSTX、dcGTX2 和 dcGTX3 10 种 PSP,通过基质匹配校准(matrix matched calibration standards)来弥补基质效应带来的不良影响,用含 0.1%甲酸的乙腈/水(90:10, v:v)溶液从贝类中提取毒素,亲水亲脂平衡柱(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)和石墨化碳黑(graphitized carbon blank, GCB)柱净化,利用亲水相互作用色谱-串联质谱(HILIC-MS/MS)、MRM 正离子模式监测,线性范围 8.1~225.5 $\mu\text{g/kg}$,回收率可达到 71.3%~104.6%, RSD 小于 15.8%。此外, Gerssen^[32]还建立了能查阅 85 种贝类毒素的数据库,其中包括 33 种 OA、26 种 YTX、18 种 AZA 和 8 种 PTX,数据库中可查到化合物名称、精确质量,质量偏差(< 5 ppm),保留时间(min)、保留时间偏差(<0.2 min),不用标准品也可进行快速高效的毒素检测。

3.2.2 河豚毒素

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是鲉鱼类及其他生物通过食物链摄入寄生有弧菌等产毒菌的藻类后,在体内产生或者积累的,会造成食用者中毒的一种生物碱。TTX 是氨基全氢喹啉型化合物,是自然界中所发现的毒性最大的神经毒素之一,可高选择性和高亲和力地阻断神经兴奋膜

上钠离子通道,其毒性比剧毒的氰化钠还要高 1250 多倍。目前发现 TTX 及其衍生物共有 11 种,且不只存在于河鲉体内, Tanu 等^[33]使用 LC-ESI-TOF/MS 系统在孟加拉树蛙体内发现了 TTX,人们还使用 LC-MS 系统分析了蜈蚣、纽虫、海螺、蟹类等生物体内的 TTX 成分^[34-36]。而仅就河鲉鱼而言, TTX 在其体内分布也有不同, Paula 等^[37]利用 LC-ESI-CID-MS/MS 建立了同时检测 8 种 TTX 及衍生物的方法, LOD 为 0.08 $\mu\text{g/g}$,对河鲉鱼的肝脏、生殖腺、胃肠道、肌肉和皮肤进行检测,结果显示肌肉和皮肤中毒素含量最少。

由于 TTX 的危害性和敏感性,易引发食物中毒事件,其也是食品安全领域研究的热点。TTX 的检测常采用样品均质粉碎后,利用酸性水溶液进行提取,再经有机溶剂甲醇沉淀、固相萃取柱或分散固相萃取,以及超滤等方式净化后,以液质联用法测定,相关案例见表 2。

3.2.3 西加鱼毒素

西加鱼毒素(ciguatoxin, CTX),又名雪卡鱼毒素、珊瑚鱼毒素,是鱼类通过食物链大量摄食底栖微藻类纲比甲藻等剧毒藻类而在体内积累的一种脂溶性大分子聚醚类神经毒素,由 13 个连续连接成阶梯状的醚环组成,目前已发现 3 类,即太平洋 CTX(pacificciguatoxin, P-CTX)、加勒比海 CTX(caribbeanciguatoxin, C-CTX)和印度 CTX(indianciguatoxin, I-CTX),它们是一些个别基团被不同程度修饰的同源物或同分异构体,其中 P-CTX-1 无论在数量上还是在毒性上都是最主要的 CTX(约占总致死率的 90%),其次是 C-CTX-1。CTX 误食后会出现肠胃、神经系统及少部分的心血管不适等症状,毒性比 TTX 强 100 倍。液质联用法在 CTX 检测应用中多以深海鱼鱼体为研究对象,检测其中的 P-CTX-1。刘红河等^[43]建立了测定鱼体中 P-CTX-1 含量的 LC-MS/MS 法,鱼类样品经丙酮提取后,用冷冻脱脂,经 PSA 固相萃取柱净化后, C18 色谱柱分离,采用电喷雾串联四极杆质谱进行检测。结果表明, P-CTX-1 在 0.5~20.0 $\mu\text{g/L}$ 范围时,线性关系良好($r=0.9998$)。P-CTX-1

表 2 液质联用法检测不同样品基质中的 TTX

Table 2 Liquid chromatography couple to tandem mass spectrometry detect tetrodotoxin in different sample matrices

样品基质	样品提取	样品净化	检出限	回收率范围 (%)	相对标准偏差 (%)	参考文献
烤鱼片	1%乙酸超声提取	甲醇沉淀后离心净化	16 $\mu\text{g/kg}$	84.6~98.1	3.9~13.7	[38]
织纹螺	0.03 mol/L 乙酸加热提取	C18 SPE 柱净化后超滤	2 $\mu\text{g/L}$	72.5~80.4	4.48~8.87	[39]
烤鱼片、鱼干等干制水产加工食品	0.1%乙酸提取	C18 分散固相萃取净化,超滤	5 $\mu\text{g/kg}$	71.2~102	5.23~12.4	[40]
鲜鱼肉和鱼肝	酸性水溶液提取、蛋白酶解	石油醚脱脂、甲醇沉淀、SPE 柱净化	0.03 mg/kg	94.6~102	<6.6	[41]
红鳍东方鲀肉	1%乙酸-甲醇溶液超声提取	C18,GCB 混合粉末吸附净化	10 $\mu\text{g/kg}$	74.0~105.0	11.0	[42]

在添加浓度为 1.0~20.0 ng/kg 范围内的平均回收率为 82.3%~87.2%, 相对标准偏差小于 7.8%, 方法的定量限(limit of quantity, LOQ)为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。张缙等^[44]建立了检测虎鳗等样品中 P-CTX-1 残留的 LC-MS/MS 法, 样品经甲醇-正己烷(4:1)提取, HLB 柱净化后, 采用高效液相色谱-串联质谱分析。实验结果表明, HLB 柱净化后基质效应明显降低, P-CTX-1 在样品中添加 0.01~0.10 $\mu\text{g/kg}$ 的回收率范围为 70%~84%, 相对标准偏差($n=6$)小于 7%, P-CTX-1 的检出限(limit of detection, LOD)为 0.01 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 为 0.02 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法样品前处理简单、分析时间短、灵敏、可靠, 适用于深海鱼中雪卡毒素含量的检测。Stewart 等^[45]建立了鱼肉中 P-CTX-1 的 LC-MS/MS 检测方法, 样品经甲醇快速提取, LOD 为 0.03 $\mu\text{g/kg}$, P-CTX-1 浓度范围 0.04~11.4 $\mu\text{g/kg}$, 变异系数 7.4%, 56 个样品中有 27 个检出 P-CTX-1, 其中 26 个样品还含有 P-CTX-2 和 P-CTX-3。此外, Wu 等^[46]还利用快速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)法提取鱼肉中 P-CTX-1, LC-MS/MS 法分析检测, LOQ 0.01 $\mu\text{g/kg}$, 相关系数大于 0.99, 回收率 49%~85%。对 12 个蓝点石斑鱼肉样品进行检测, 该法测试结果与小鼠神经母细胞瘤法(mouse neuroblastoma assay, MNA)的相当。麦艳玲等^[47]利用高效液相色谱-串联质谱法快速测定海鳗鱼肉中 3 种 P-CTX, 方法以基质标准曲线外标法定量, 线性范围为 0.01~50.0 ng/g, 相关系数均大于 0.999($r > 0.999, n=3$), P-CTX-1、P-CTX-2、P-CTX-3 的定量限分别为(LOQs, $S/N=10$) 0.009、0.019、0.017 ng/g。以 0.05、0.10、0.50 ng/g 3 个添加浓度水平进行方法验证, 回收率分别为 72.9%~81.0%、63.0%~77.9%、46.3%~69.5%, 相对标准偏差分别为 2.3%~2.7%、2.1%~12.2%、6.1%~15.3%。

4 结 语

生物毒素因其毒性强, 危害大, 常常会引起突发性的、大范围的中毒事件而在食品安全领域中更显其检测分析的重要性。质谱法灵敏准确, 已成为当前生物毒素检测的主要方法。由以上与食品安全相关的真菌毒素和海洋生物毒素的液质联用检测方法可见, 质谱技术在该领域生物毒素检测中的应用主要以三重四级杆质谱(QQQ-MS)为主, MALDI-TOF MS 和 Orbitrap MS 方法相对较少, 而后者作为高分辨质谱在识别并鉴定新毒素、获得毒素代谢产物的相关信息、未知化合物的筛查、定量分析及已知化合物的定性等领域的应用近年来也已逐步展开, 其在我国生物毒素食品安全检测领域的深入研究方面将具有广阔的应用前景。

目前, 与真菌毒素的相关研究相比, 海洋生物毒素相关的检测标准和限量规定尚未健全, 欧盟(European Union, EU)、欧洲食品安全管理局(European Food Safety Authority, EFSA)、国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CODEX)对同一贝类毒素的限量也有所不同, 这给建立检

测方法的验证工作带来了一定的困扰。此外, 贝类毒素标准品缺乏、难获得, 商品化的标准品价格昂贵等因素也限制了其 LC-MS/MS 方法研究的开展及推广应用。

参考文献

- [1] 刘岱岳, 余传隆, 刘鹤华. 生物毒素开发与利用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [2] Liu DY, Yu CL, Liu QH. Development and utilization of biological toxins [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
- [3] Ben-Gigirey B, Rodriguez-Velasco ML, Otero A, *et al.* A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish [J]. *Toxicon*, 2012, 60(5): 864–873.
- [4] 黄巍, 于国君, 江涛, 等. 河鲀毒素时间分辨荧光免疫分析法的初步研究[J]. *毒理学杂志*, 2009, 23(6): 485–488.
- [5] Huang B, Yu GJ, Jiang T, *et al.* A preliminary study of time-resolved fluorescence immunoassay of pufferfish poison [J]. *J Toxicol*, 2009, 23(6): 485–488.
- [6] 闫磊, 李卓, 张燕. 牛奶中黄曲霉毒素的放射免疫法检测[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(1): 135–137.
- [7] Yan L, Li Z, Zhang Y. Aflatoxins in milk by radio immunoassay method [J]. *Food Res Dev*, 2010, 31(1): 135–137.
- [8] Yoshizawa T, Kohno H, Ikeda K, *et al.* A practical method for measuring deoxynivalenol, nivalenol, and T-2+HT-2 toxin in foods by an enzyme-linked immunoabsorbent assay using monoclonal antibodies [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 10: 2076–2085.
- [9] Blay P, Hui JPM, Chang J, *et al.* Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(2): 577–585.
- [10] Fenicia L, Anniballi F, de Medici D, *et al.* SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(9): 490–495.
- [11] 李成梅, 吴雪霞, 谢晓东, 等. 实验性小鼠蓖麻毒素中毒的血液学试验[J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(3): 15–17.
- [12] Li CM, Wu XX, Xie XD, *et al.* Hematological studies of experimental ricin toxicity in mice [J]. *Chin J Vet Med*, 2013, 49(3): 15–17.
- [13] Okumura M, Tsuzuki H, Tomita B. A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay [J]. *Toxicon*, 2005, 46(1): 93–98.
- [14] de la Iglesia P, Gago-Martinez A, Yasumoto T. Advanced studies for the application of high-performance capillary electrophoresis for the analysis of yessotoxin and 45-hydroxyessotoxin [J]. *J Chromat A*, 2007, 1156 (1/2): 160–166.
- [15] Marjorie BM. Developing a fluorescent latex microparticle immunoassay using alexa fluor 568 for detection of staphylococcal enterotoxin A [J]. *J Rapid Methods Auto Microbiol*, 2007, 15(1): 33–48.
- [16] Maraldo D, Mutharasan R. Detection and confirmation of staphylococcal enterotoxin B in apple juice and milk using piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever sensors at 2.5 fg/mL [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(20): 7636–7643.
- [17] 刘斌, 周培疆, 宋荣. 微囊藻毒素的极谱测定法[J]. *中国环境监测*, 2005, 21(1): 33–37.
- [18] Liu B, Zhou PJ, Song R. Determination of microcystin in water with

- polarography [J]. *Environ Monit Chin*, 2005, 21(1): 33–37.
- [14] 食品产业网. 农科院: 我国农产品出口欧盟最大阻碍是真菌毒素超标 [EB/OL]. [2014-05-22]. <http://news.foodqs.cn/gnspsz01/201452291622.htm>
The food industry network. Academy of Agricultural Sciences: The biggest impediment of agricultural products exporting to the EU is the excessive of mycotoxins [EB/OL]. [2014-05-22]. <http://news.foodqs.cn/gnspsz01/201452291622.htm>
- [15] 许艳丽, 鲍蕾, 静平, 等. 生物传感器在生物毒素检测中的应用进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2012, 3(5): 432–436.
Xu YL, Bao L, Jing P, *et al.* Research and application of biosensor on detection of biotoxin [J]. *J Food Saf Qual*, 2012, 3(5): 432–436.
- [16] GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
GB 2761-2011 National Food Safety Standard Maximum levels of mycotoxins in foods [S].
- [17] 真菌毒素检测技术新革命——一步法净化多毒素样品[EB/OL]. [2011-07-14]. <http://shiyuan.ebioe.com/67653.htm>
New revolution of mycotoxin detection technology—One-step purifies a variety of toxins in samples [EB/OL]. [2011-07-14]. <http://shiyuan.ebioe.com/67653.htm>
- [18] 鲍蕾, 吴振兴, 石媛媛, 等. 多功能柱净化-高效液相色谱法检测粮谷及其制品中的呕吐毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(3): 776–782.
Bao L, Wu ZX, Shi YY, *et al.* Determination of deoxynivalenol in grain and grain products by multifunctional column clean-up and high performance liquid chromatography [J]. *J Food Safe Qual*, 2014, 5(3): 776–782.
- [19] 美国 VICAM 真菌毒素 6 合 1 免疫亲和柱[EB/OL]. <http://www.bioon.com.cn/picture/20133/2013312144543371.pdf>
American VICAM immunoaffinity column 6 in 1 of mycotoxin detection [EB/OL]. <http://www.bioon.com.cn/picture/20133/2013312144543371.pdf>
- [20] Varga E, Glauner T, Berthiller F, *et al.* Development and validation of a (semi-) quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(15): 5087–5104.
- [21] Warth B, Parich A, Atehnkeng J, *et al.* Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(36): 9352–9363.
- [22] Njumbe Ediage E, Diana Di Mavungu J, Monbaliu S, *et al.* A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(10): 5173–5180.
- [23] Al-Taher F, Banaszewski K, Jackson L, *et al.* Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(10): 2378–2384.
- [24] Škrbić B, Koprivica S, Godula M. Validation of a method for determination of mycotoxins subjected to the EU regulations in spices: the UHPLC-HESI-MS/MS analysis of the crude extracts [J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 461–466.
- [25] 朱坚. 食品中有害物质的检测新技术[J]. *检验检疫学刊*, 2012, 22(5): 1–7.
Zhu J. The new technology in analysis of harmful substances in food [J]. *J Inspect Quarant*, 2012, 22(5): 1–7.
- [26] Stobo A, Jean-Pierre L, Scott A, *et al.* Liquid chromatography with mass spectrometry-detection of lipophilic shellfish toxins [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(5): 1371–1382.
- [27] Hashimoto S, Suzuki T, Shiota Y, *et al.* Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography–mass spectrometry and comparison with mouse bioassay [J]. *Fisheries Sci*, 2005, 71(6): 1370–1378.
- [28] 马景刚. LC-MS/MS(液相色谱-质谱联用)同步分析多种脂溶性贝毒的方法及应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Ma JG. Study on the simultaneous detection for multiple lipophilic toxins in shellfish using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [29] Gerssen A, Mulder PP, McElhinney MA, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions [J]. *J Chromat A*, 2009, 1216(9): 1421–1430.
- [30] McNabb PS, Selwood AI, Ginkel RV, *et al.* Determination of brevetoxins in shellfish by LC/MS/MS: single-laboratory validation [J]. *J AOAC Int*, 2012, 95(4): 1097–1105.
- [31] Zhuo L, Yin Y, Fu W, *et al.* Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction [J]. *Food Chem*, 2013, 137(1): 115–121.
- [32] Gerssen A, Mulder PPJ, De Boer J. Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 685(2): 176–185.
- [33] Tanu MB, Mahmud Y, Tsuruda K, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin in the skin of a rhacophorid frog Polypedates sp. from Bangladesh [J]. *Toxicon*, 2001, 39(7): 937–941.
- [34] Asakawa M, Toyoshima T, Ito K, *et al.* Paralytic toxicity in the ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins [J]. *Toxicon*, 2003, 41(7): 747–53.
- [35] Shui LM, Chen K, Wang JY, *et al.* Tetrodotoxin-associated snail poisoning in Zhoushan: a 25-year retrospective analysis [J]. *J Food Prot*, 2003, 66(1): 110–114.
- [36] Tsai YH, Ho PH, Hwang CC, *et al.* Tetrodotoxin in several species of xanthid crabs in southern Taiwan [J]. *Food Chem*, 2006, 95(2): 205–212.
- [37] Rodríguez P, Alfonso A, Otero P, *et al.* Liquid chromatography–mass spectrometry method to detect Tetrodotoxin and Its analogues in the puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters [J]. *Food Chem*, 2012, 132(2): 1103–1111.
- [38] 阮丽萍, 蔡梅, 刘华良, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定烤鱼片中的河鲀毒素[J]. *江苏预防医学*, 2014, 25(2): 7–9.
Ruan LP, Cai M, Liu HL, *et al.* Determination of tetrodotoxin in roasted fish fillets by HPLC-MS/MS [J]. *Jiangsu J Prey Med*, 2014, 25(2): 7–9.
- [39] 骆和东, 贾玉珠, 朱宝平. 固相萃取-超过滤-液相色谱/质谱联用法测定织纹螺中的河鲀毒素[J]. *色谱*, 2007, 2(6): 917–921.
Luo HD, Jia YZ, Zhu BP. Determination of tetrodotoxin in nassarius by solid phase extraction, ultrafiltration and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2007, 2(6): 917–921.
- [40] 王智, 杨洁, 张颖, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定水产加

- 工食品中的河鲀毒素[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(3): 39-43.
- Wang Z, Yang J, Zhang Y, *et al.* Determination of tetrodotoxin in processed aquatic product by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin Fishery Qual Stand, 2013, 3(3): 39-43.
- [41] 金玉娥, 马佳鸣, 熊丽蓓, 等. HPLC-MS 法测定鲜鱼中河鲀毒素[J]. 中国司法鉴定, 2012, 2: 22-25
- Jin YE, Ma JM, Xiong LB, *et al.* Determination of Tetrodotoxin in Fish by HPLC-MS [J]. Chin J Forensic Sci, 2012, 2: 22-25.
- [42] 曹文卿, 林黎明, 吴振兴, 等. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法测定红鳍东方鲀肉中河鲀毒素[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 588-593.
- Cao WQ, Lin LM, Wu ZX, *et al.* Determination of tetrodotoxin in flesh of Fugu Rubripes by QuEChERS combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(5): 588-593.
- [43] 刘红河, 刘桂华, 杨俊, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定鱼体中雪卡毒素[J]. 分析化学, 2009, 37(11): 1675-1678.
- Liu HH, Liu GH, Yang J, *et al.* High performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry for analysis of pacific ciguatoxin in fishes [J]. Chin J Anal Chem, 2009, 37(11): 1675-1678.
- [44] 张缙, 徐敦明, 曾三妹, 等. 全自动固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法(HP-LC-MS/MS)测定深海鱼中雪卡毒素残留量[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 710-714.
- Zhang J, Xu DM, Zeng SM, *et al.* Determination of ciguatoxin residues in deep sea fish by auto-spe/high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(6): 710-714.
- [45] Stewart I, Eaglesham GK, Poole S, *et al.* Establishing a public health analytical service based on chemical methods for detecting and quantifying Pacific ciguatoxin in fish samples [J]. Toxicon, 2010, 56(5): 804-812.
- [46] Wu JJ, Mak YL, Murphy MB, *et al.* Validation of an accelerated solvent extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for Pacific ciguatoxin-1 in fish flesh and comparison with the mouse neuroblastoma assay [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(9): 3165-3175.
- [47] 麦艳玲, 林珊珊, 肖陈贵, 等. 高效液相色谱-串联质谱法快速测定海鳗鱼肉中 3 种太平洋雪卡毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3520-3528.
- Mai YL, Lin SS, Xiao CG, *et al.* Rapid determination of three Pacific ciguatoxins in muscle of moral eel by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(11): 3520-3528.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王 婵, 硕士, 主要研究方向为食品安全色谱检测。

E-mail: wangachan37@163.com



曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: cjj0909@163.com