

超高效液相色谱-串联质谱法同时检测贝类中 13种麻痹性贝类毒素

何明珠^{1,2}, 袁冠湘², 秦逍云², 刘红河², 姜杰², 杨胜园¹, 刘桂华^{1,2*}

(1. 南华大学公共卫生学院, 衡阳 421001; 2. 深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时测定双壳贝类中 13 种麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning toxins, PSTs)的方法。**方法** 用乙酸水溶液提取贝类中的 PSTs, 经乙酸乙酯除杂, 然后用石墨化碳黑固相萃取柱净化, 采用 UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离, 电喷雾正、负离子多反应监测模式同时检测, 基质匹配曲线外标法定量。**结果** 13 种 PSTs 的线性方程相关系数(r)均大于 0.998, 定量限为 2~20 μg/kg, 贻贝基质、牡蛎基质、扇贝基质的平均回收率为 92.2%~122%、106%~129%、107%~144%, 相对标准偏差均小于 11%。将该方法应用于 100 份贝类样品中 PSTs 的检测, 共有 30 份样品、5 种 PSTs 检出, 总毒性当量(saxitoxin equivalent, STXeq)为 10.0~159 μg/kg。**结论** 本方法灵敏度高, 具有良好的重现性, 可以准确定性定量 13 种 PSTs, 适用于贝类中 PSTs 的日常监测。

关键词: 麻痹性贝类毒素; 超高效液相色谱-串联质谱法; 基质效应; 贝类

Simultaneous detection of 13 kinds of paralytic shellfish poisoning toxins in bivalve by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HE Ming-Zhu^{1,2}, YUAN Guan-Xiang², QIN Xiao-Yun², LIU Hong-He², JIANG Jie²,
YANG Sheng-Yuan¹, LIU Gui-Hua^{1,2*}

(1. College of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China;
2. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 13 kinds of paralytic shellfish toxins (PSTs) in bivalve by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** PSTs in shellfish were extracted with aqueous acetic acid aqueous solution, purified by ethyl acetate, and then it was purified with a graphitized carbon black solid phase extraction column. The samples were separated by UPLC BEH Amide column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), simultaneously detected in negative ion multiple reaction monitoring mode (MRM), and quantified by matrix curve external standard method. **Results** The linear correlation

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605100)、国际原子能机构合作研究基金项目(CRP_D_52039_18859)、深圳市医学重点学科建设经费、深圳市三名工程项目(SZSM201811070)

Fund: Supported by the National Key R&D Program of China(2019YFC1605100), Supported by IAEA Research Contract(CRP_D_52039_18859), Shenzhen Key Medical Discipline Construction Found, and Sanming Project of Shenzhen(SZSM201811070)

***通信作者:** 刘桂华, 主任技师, 主要研究方向为食品安全与残留物检测。E-mail: 1106126629@qq.com

***Corresponding author:** LIU Gui-Hua, Chief Technician, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China. E-mail: 1106126629@qq.com

coefficients (r) of 13 PSTs were all greater than 0.998, and the limits of quantitation were 2–20 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries of PTS in the shellfish matrix, oyster matrix and scallop matrix were 92.2%–122%, 106%–129% and 107%–144%. The relative standard deviations were less than 11%. The method was applied to the detection of PSTs in 100 shellfish samples. A total of 30 samples and 5 kinds of PSTs were detected. The total toxicity (STXeq) was 10.0–159 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** This method has high sensitivity and good reproducibility, can accurately qualitatively quantify 13 kinds of PSTs, and is suitable for daily monitoring of PSTs in shellfish.

KEY WORDS: paralytic shellfish poisoning toxins; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; matrix effect; shellfish

0 引言

麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning toxins, PSTs)是天然海洋生物毒素,主要是由亚历山大藻属的甲藻产生^[1–2]。目前已确定了 30 多种同系物^[3],按照毒性高低,主要分 3 类:氨基甲酸酯类毒素,包括石房蛤毒素(saxitoxin, STX)、新石房蛤毒素(neosaxitoxin, NEO)和膝沟藻毒素组(gonyautoxins, GTX);脱氨基甲酰基类毒素,包括脱氨基甲酰基石房蛤毒素(decarbamoyl-saxitoxin, dcSTX)、脱氨基甲酰基膝沟藻毒素组(decarbamoyl-donyautoxins, dcGTX1-4)和脱氨基甲酰基新石房蛤毒素(decarbamoyl-neosaxitoxin, dcNEO);N-磺酰氨基甲酰基类毒素,包括 C1、C2、GTX5(B1)、GTX6(B2)^[4–5]。

PSTs致死率高,分布于世界沿海地区,是分布范围最广、危害最大的一类贝类毒素^[4,6–7]。联合国粮农组织、国际海洋学委员会、世界卫生组织及欧盟对 PSTs 最高限量值为 800 STXeq $\mu\text{g/kg}$ ^[3,8],消费者食用有毒贝类后,多出现肌肉和神经麻痹症状,严重可导致呼吸困难和死亡,目前没有特定的解毒药物^[8–9]。由于贝类中可能有 PSTs 中毒的潜在风险,对贝类中 PSTs 的监控是十分必要的。

小鼠生物法(mouse bioassay, MBA)是国际分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemisys, AOAC)检测 PSTs 的经典方法^[10],但是该方法特异性差,不能确定每种毒素的含量,且存在动物伦理学问题^[9,11]。酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)操作方法简便快速,但是易出现假阳性的结果^[12–13]。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)高效灵敏,但前处理复杂、需要将 PSTs 进行衍生化,同分异构体难以分离且耗时较长^[7,14]。而高效液相色谱-串联质谱技术(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)则弥补了这一缺点,该方法简单快速,能够准确定量各毒素^[15–16]。

我国 GB 5009.213-2016《食品安全国家标准 贝类中麻痹性贝类毒素的测定》将 LC-MS/MS 法作为 PSTs 的食品安全国家标准检测方法,但只能同时检测 10 种 PSTs,测定种类较少。本研究通过对质谱条件、液相条件、前处理

条件等方面进行优化,建立了超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS),同时检测 13 种 PSTs,以期为贝类毒素的检测提供准确可靠的检测方法,保障消费者的食用安全。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

API QTRAP 4500 串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Beckman Avanti J-26XP 低温高速离心机(美国贝克曼公司); XS205 分析电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q IQ 7000 超纯水机(美国 Millipore 公司); Centrifuge 5424R 台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司); Multi reax 振荡器(德国 Heidolph 公司); ED115 烘箱(德国 Binder 公司); 固相萃取柱(ENVI-CarbTM 250 mg/3 mL, 美国 Supelco 公司)。

氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl)(分析纯,广州化学公司); 乙腈、乙酸、乙酸乙酯、甲酸、甲酸铵(质谱纯,德国 CNW 公司); 三氯甲烷、正己烷(色谱纯,美国赛默飞世尔公司); 氨水(25%, 色谱纯,北京迪马科技公司); 实验用水为超纯水(电阻率 $>18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

标准品: 石房蛤毒素 [saxitoxin, STX, (66.3 $\pm$ 1.4) $\mu\text{mol/L}$]、新石房蛤毒素 [neosaxitoxin, NEO, (65.1 $\pm$ 2.1) $\mu\text{mol/L}$]、脱氨基甲酰基石房蛤毒素 [decarbamoyl-saxitoxin, dcSTX, (65.0 $\pm$ 1.8) $\mu\text{mol/L}$]、脱氨基甲酰基新石房蛤毒素 [decarbamoylsaxitoxin, dcNEO, (30.4 $\pm$ 1.7) $\mu\text{mol/L}$]、脱氨基甲酰基膝沟藻毒素 2&3 [decarbamoyl-gonyautoxin 2&3, dcGTX2&3, (100.1 $\pm$ 7.0) $\mu\text{mol/L}$ & (29.4 $\pm$ 2.1) $\mu\text{mol/L}$]、膝沟藻毒素 1&4 [gonyautoxin 1&4, GTX1&4, (51.2 $\pm$ 1.7) $\mu\text{mol/L}$ & (18.0 $\pm$ 0.9) $\mu\text{mol/L}$]、膝沟藻毒素 2&3 [gonyautoxin 2&3, GTX2&3, (102.6 $\pm$ 4.0) $\mu\text{mol/L}$ & (43.5 $\pm$ 2.9) $\mu\text{mol/L}$]、膝沟藻毒素 5 [gonyautoxin 5, GTX5, (55.7 $\pm$ 2.7) $\mu\text{mol/L}$]、N-磺酰氨基甲酰基类毒素 1&2 [N-sulfocarbamoylC1&2, (113.4 $\pm$ 3.6) $\mu\text{mol/L}$ & (33.9 $\pm$ 2.8) $\mu\text{mol/L}$](加拿大国家海

洋研究中心)。

实际样品: 广东省沿海城市市售贻贝、牡蛎、扇贝。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

PSTs 混合标准液的制备: 分别准确吸取 STX 100 μL、NEO 200 μL、dcSTX 500 μL、dcNEO 400 μL、dcGTX2&3 200 μL、GTX2&3 100 μL、GTX1&4 200 μL、GTX5 100 μL、C1&2 100 μL 于 2 mL 容量瓶中定容, 于 4 °C 冰箱中备用。

1%乙酸水溶液: 取 1 mL 乙酸于 100 mL 容量瓶中, 加入超纯水定容至 100 mL。

75%乙腈水(0.25%甲酸)溶液: 取 75 mL 乙腈和 24.75 mL 超纯水, 加入 250 μL 甲酸混匀。

20%乙腈水(0.8%乙酸)溶液: 取 20 mL 乙腈和 79.2 mL 超纯水, 加入 0.8 mL 乙酸混匀。

0.1%氨水溶液: 取 0.4 mL 氨水于 100 mL 容量瓶中, 加入超纯水至 100 mL。

1.2.2 样品前处理

(1)采样和试样制备

新鲜的贻贝、扇贝和牡蛎在清水下淋洗干净, 去壳取出完整贝肉, 淋洗干净后平铺沥水, 匀浆机匀浆。在-20 °C 保存备用。

(2)提取

准确称取样品 5.00 g 于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 1%乙酸水溶液, 涡旋混合 5 min, 放入 105 °C 烘箱中 10 min; 流水下冷却, 6000 r/min 转速离心 10 min, 取上清

液 1 mL 于 15 mL 离心管中备用。

(3)净化

将 2 mL 乙酸乙酯加入装有上清液的 15 mL 离心管中, 涡旋混匀 1 min, 6000 r/min 转速离心 5 min, 静置 5 min, 弃乙酸乙酯层。在水层中加入 5 μL 氨水混匀, 取 0.5 mL 过已活化的 Carb-SPE 固相萃取柱(依次加入 2 mL 乙腈、2 mL 20%乙腈水-含 0.8%乙酸和 2 mL 0.1%氨水活化), 正压挤干后, 加入 1 mL 75%乙腈水溶液(含 0.25%甲酸)洗脱, 收集洗脱液。15000 r/min 超高速离心 10 min, 上清放入进样小瓶。

1.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1)液相色谱条件

ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司), 柱温 40 °C, 流速为 0.4 mL/min, 进样量 10 μL。流动相: (正/负离子)A 为 0.5 mmol/L 甲酸铵和 0.04%甲酸水溶液, B 为纯乙腈。洗脱梯度: 0~2 min, 20% A; 2.1 min~6.0 min, 20%~70% A; 6.1 min~8.0 min, 70% A; 8.1 min~10 min, 70%~20% A; 10.1 min~12 min, 20%A。

(2)质谱条件

离子源为电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 正负离子同时采集模式; 电喷雾电压 5500 V 和-4500 V, 气帘气压力 0.3 MPa, 源内气 55 psi, 辅助气 55 psi, 碰撞气流速中等, 离子源温度 550 °C。其他参数见表 1。

表 1 13 种麻痹性贝类毒素质谱分析参数
Table 1 Mass spectrometric analysis parameters of 13 paralytic shellfish poisoning toxins

分析物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	入口电压/V	碰撞电压/V	碰撞室出口电压/V
STX	300	204.1 ⁺	30	10	31	14
	300	138.1	30	10	36	9
dcSTX	257	126.0 ⁺	30	10	27	8
	257	239.1	30	10	22	15
NEO	316	298.1 ⁺	30	10	25	12
	316	220.1	30	10	32	12
dcNEO	273	126.0 ⁺	30	10	29	8
	273	238.1	30	10	29	8
GTX5	380.1	300.1 ⁺	40	10	21	15
	380.1	204.1	40	10	38	15
GTX1	410.1	367.1 ⁺	-70	-10	-20	-12
	410.1	349.0	-70	-10	-28	-12
GTX4	410.1	349.0 ⁺	-70	-10	-28	-12
	410.1	367.1	-70	-10	-20	-12

表 1(续)

分析物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	入口电压/V	碰撞电压/V	碰撞室出口电压/V
GTX3	394.1	333.1 [*]	-70	-10	-28	-11
	394.1	351.2	-70	-10	-22	-11
GTX2	394.1	351.2 [*]	-70	-10	-22	-11
	394.1	333.1	-70	-10	-28	-11
dcGTX3	351	164.0 [*]	-70	-10	-38	-5
	351	333.0	-70	-10	-23	-10
dcGTX2	351	333.0 [*]	-70	-10	-23	-10
	351	164.0	-70	-10	-38	-5
C1	474	394.1 [*]	-70	-10	-27	-15
	474	351.1	-70	-10	-30	-15
C2	474	351.1 [*]	-70	-10	-30	-15
	474	394.1	-70	-10	-27	-15

注: *为定量离子。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

通过蠕动泵将稀释 10 倍的 PSTs 混合标准溶液以 7 μL/min 的流速注射进质谱, 分别以正离子和负离子模式扫描带电离子(母离子)和碎片离子(子离子)。在全扫描模式下, STX、dcSTX、NEO、GTX5 和 dcNEO 这 5 种毒素在正离子模式下灵敏度高, 形成[M+H]⁺母离子; 4 对同分异构体 GTX1&4、GTX2&3、dcGTX2&3、C1&2, 在负离子模式下响应值较高, 形成[M-H]⁻母离子。

在不同的碰撞能量下, 负离子的碎片较少, GTX1&4、GTX2&3 和 C2&2 主要产生母离子失去一分子水、-NHCO、-H₂O-NHCO 或-SO₃ 等碎片离子, dcGTX2&3 主要产生母离子失去-SO₃、-NH₃、-HNCNH 等碎片离子^[17], 而正离子可通过失去水分子、氨基、羧基或硫酸基得到较多碎片离子, 通过优化去簇电压、碰撞能量等确定 13 种 PSTs 离子对的 MRM 参数。详细 MRM 参数见表 1。

2.2 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱的选择

PSTs 是高度极性水溶性的化合物, 各物质结构相似, 且有 4 对同分异构体, 为了提高各待测物分离度, 选择合适的色谱柱、流动相和流动相洗脱梯度是极为重要的。常用的色谱柱为亲水性的酰胺基色谱柱, 本研究选用了 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm,

1.7 μm)^[15]。该色谱柱的 pH 范围较宽, 在 2~11 之间, 对酸的耐受较高; 粒径较小, 能高效快速分离 PSTs。

2.2.2 流动相的优化

PSTs 在纯水和纯乙腈条件下, 同分异构体 GTX1/4、GTX2&3、dcGTX2&3 分离度会随着不同样本类型、进样次数等因素产生不稳定的现象, 不利于定性。为此, 本研究通过比较在流动相中加入不同浓度的甲酸铵和 0.04% 的甲酸时 13 种 PSTs 的峰面积, 评估缓冲盐对同分异构体分离的稳定度及其对仪器响应的影响。由图 1 可以看出, 甲酸铵浓度低(0.1~0.3 mmol/L)时, NEO、dcNEO、GTX5 及 4 对同分异构体的峰值高, 但同分异构体分离不稳定。而当甲酸铵浓度为 0.5 mmol/L 时, 同分异构体分离稳定性好且峰面积值较高。因此综合分析, 本研究流动相中甲酸铵浓度为 0.5 mmol/L。图 2 为 13 种 PSTs 在该流动相下贻贝基质中的 MRM 通道色谱图。

2.3 前处理条件优化

2.3.1 萃取溶液优化

贝类基质复杂, 为了能够尽可能去除提取液中的干扰物质, 可采用有机溶剂液液萃取去除干扰。本研究在贻贝提取液中加入 100 μL 混合标准液, 比较贻贝基质中 13 种 PSTs 在不加萃取溶剂和在萃取溶剂乙酸乙酯+氯仿、乙酸乙酯、氯仿、正己烷 5 种情况下其峰面积的高低, 结果见图 3。在乙酸乙酯萃取后, 干扰物质减少, 基质效应相对降低, PSTs 的峰面积增高, 说明对于一些贝类基质如贻贝, 乙酸乙酯可以达到明显去杂的效果, 因此本研究前处理选用乙酸乙酯萃取技术净化提取液。

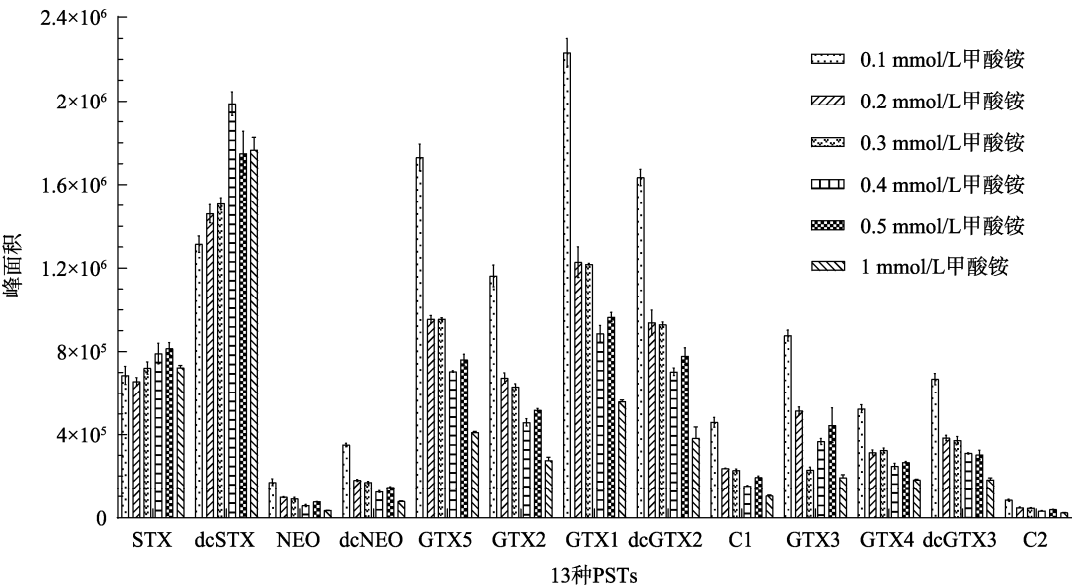
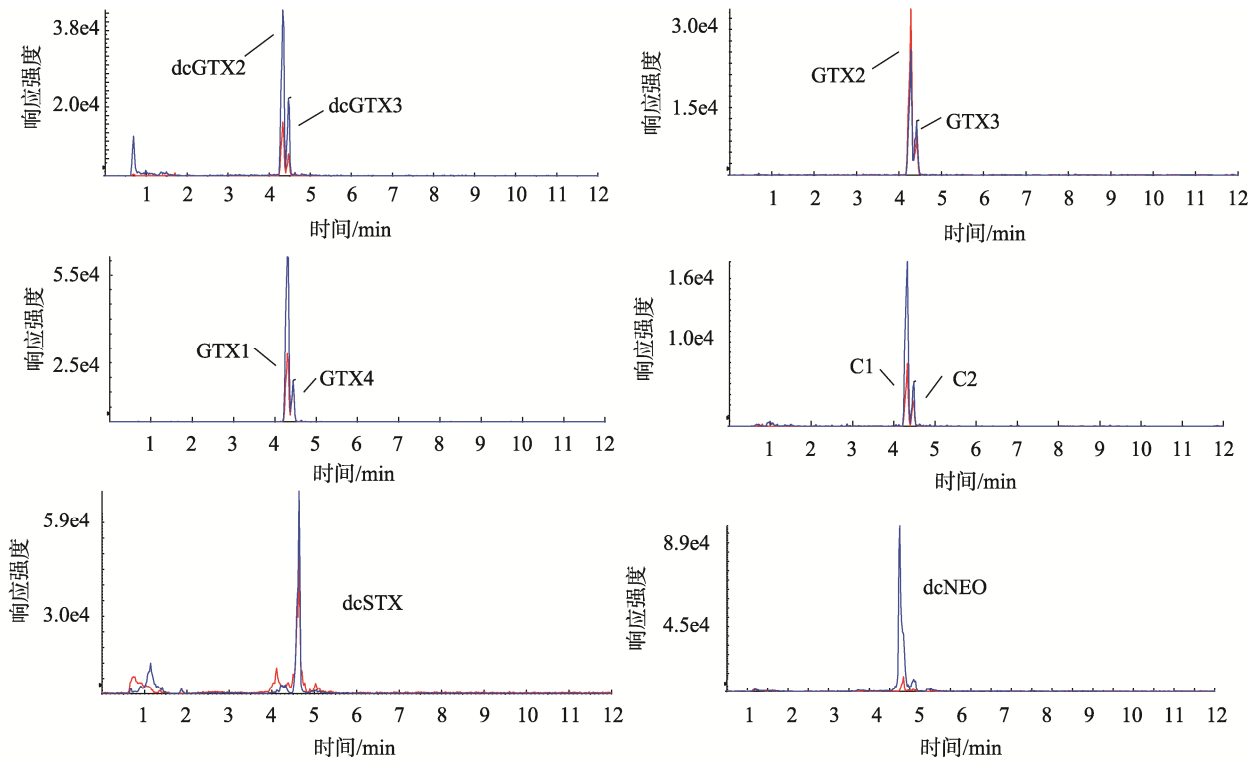
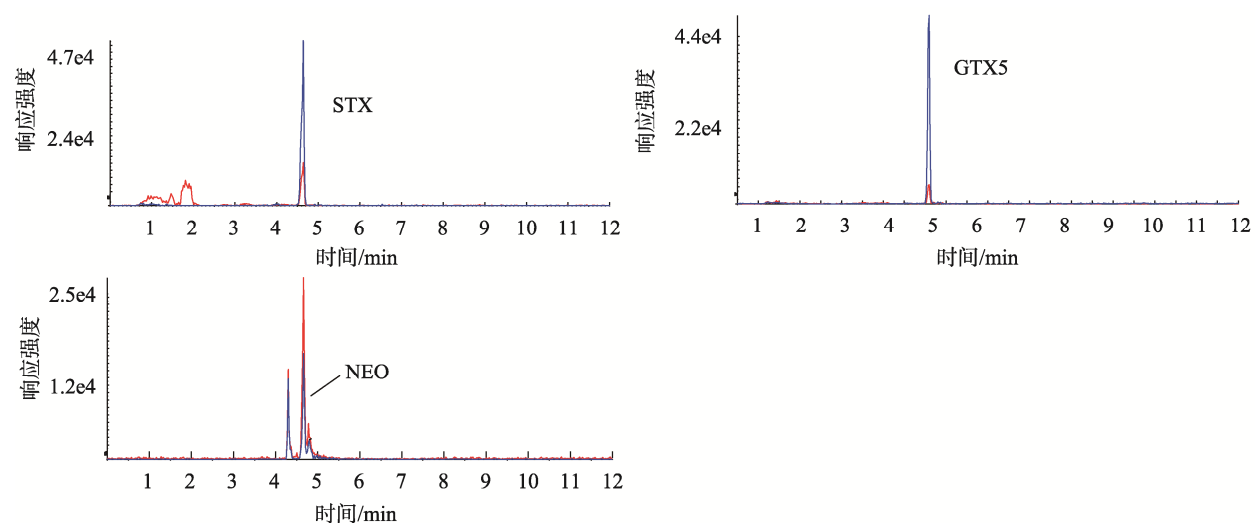


图 1 13 种 PSTs 在不同流动相中峰面积(n=3)
Fig.1 Peak areas of 13 PSTs in different mobile phases(n=3)



注: GTX1&4 浓度为 27.7&8.72 $\mu\text{g/L}$, GTX2&3 浓度为 24.0&10.2 $\mu\text{g/L}$, C1&2 浓度为 24.9&9.29 $\mu\text{g/L}$, dcGTX2&3 浓度为 42.6& 12.5 $\mu\text{g/L}$, STX、neoSTX、dcSTX、dcNEO、GTX5 浓度分别为: 24.7、25.3、53.5、21.0、13.9 $\mu\text{g/L}$ 。

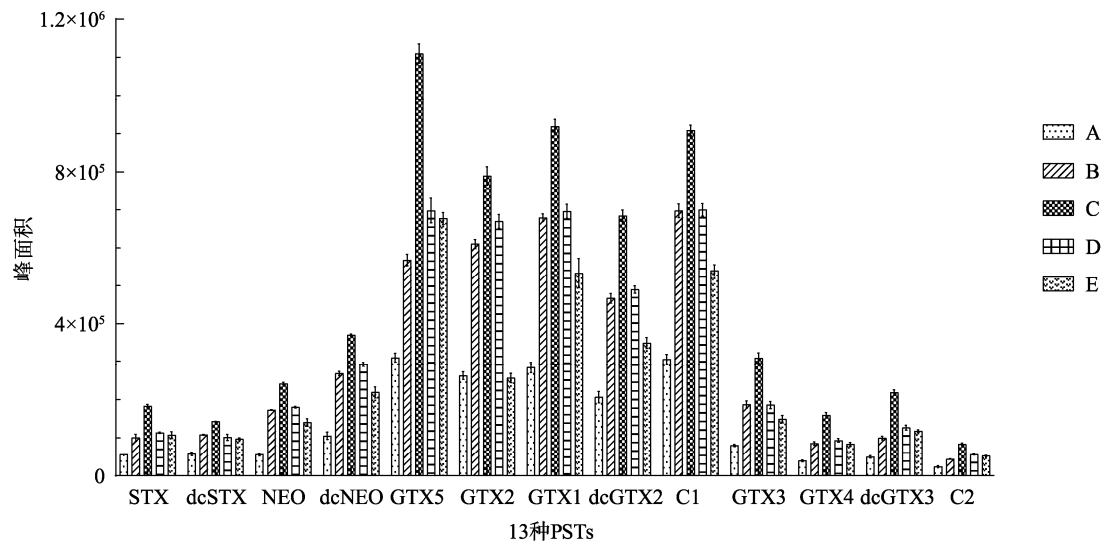
图 2 贻贝基质中 13 种 PSTs 色谱图
Fig.2 Chromatograms of 13 PSTs in mussel matrix



注: GTX1&4 浓度为 27.7&8.72 $\mu\text{g/L}$, GTX2&3 浓度为 24.0&10.2 $\mu\text{g/L}$, C1&2 浓度为 24.9&9.29 $\mu\text{g/L}$, dcGTX2&3 浓度为 42.6& 12.5 $\mu\text{g/L}$, STX、neoSTX、dcSTX、dcNEO、GTX5 浓度分别为: 24.7、25.3、53.5、21.0、13.9 $\mu\text{g/L}$ 。

图 2(续) 贻贝基质中 13 种 PSTs 色谱图

Fig.2 Chromatograms of 13 PSTs in mussel matrix



注: A: 提取液; B: 乙酸乙酯+氯仿; C: 乙酸乙酯; D: 氯仿; E: 正己烷

图 3 萃取溶液的比较($n=3$)

Fig.3 Comparison of extraction solutions($n=3$)

2.3.2 净化条件优化

除杂后样品通过固相萃取净化,能有效去除色素和杂质,减少基质效应的影响。本研究分别比较了 Supelco ENVI-Carb^[18]、HLB^[19]、C₁₈^[16]和 Silica 硅胶柱和 ENVI-18 固相萃取柱对 PSTs 峰面积的高低。添加 400 μL 混合标准液于 1.2.2 贻贝提取液中,进行前处理步骤,比较经过 5 种不同 SPE 净化的 PSTs 的峰面积,结果如图 4 所示。经 Supelco ENVI-Carb 固相萃取柱净化后 10 种 PSTs 峰面积高于经 4 种 SPE 柱净化的峰面积,且除色素效果较好,综合分析,采用 Supelco ENVI-Carb 固相萃取柱为本方法的净

化小柱。

2.3.3 洗脱溶剂的优化

为了提高 PSTs 在 SPE 中的洗脱效率,本研究对 SPE 的洗脱溶剂进行优化。根据 PSTs 的特性,分别采用超纯水、20%乙腈水(含 0.8%乙酸)^[15]、75%乙腈水(含 0.25%甲酸)^[16]作洗脱液,比较 PSTs 在 3 种洗脱液中响应强度。由图 5 可知 PSTs 在 75%乙腈水(含 0.25%甲酸)的响应值略高于 20%乙腈水(含 0.8%乙酸),且流动相中的酸为甲酸,因此,选择 75%乙腈水(含 0.25%甲酸)作为本研究方法的洗脱液。

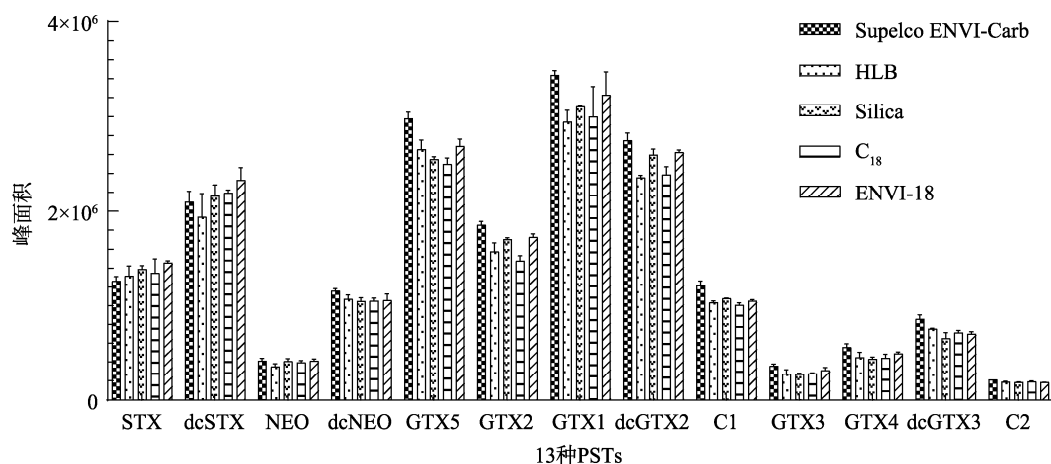


图 4 13 种 PSTs 在 5 种不同 SPE 柱的峰面积($n=3$)
Fig.4 Peak area of 13 PSPs on 5 different SPE columns($n=3$)

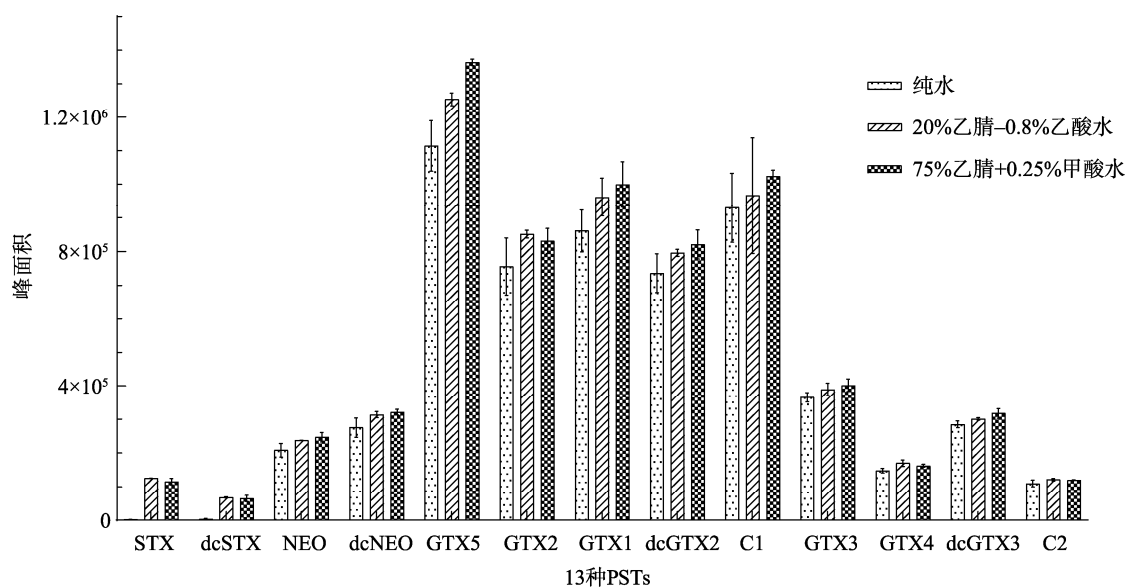


图 5 3 种洗脱液中 PSTs 峰面积的比较($n=3$)
Fig.5 Comparison of peak area of PSTS in 3 kinds of eluents ($n=3$)

2.4 基质效应

基于优化后的前处理方法, 本研究进一步评价了贻贝、牡蛎和扇贝中基质效应的大小。分别采用不含 PSTs 的空白贻贝、牡蛎、扇贝基质溶液, 准确移取备用的混合标准溶液 1、2、4、10、20、40 和 100 μL 配制一系列浓度的基质匹配标准系列, 同时测定用水配制的标准系列, 采用线性方程斜率比值来判断基质效应的影响。计算公式为: 基质效应(%)=基质匹配曲线斜率/标准曲线斜率 $\times 100\%$, 该值等于 100%则无基质效应, 高于或低于 100%则基质增强或抑制^[20-21]。结果如表 2 所示, 3 种贝类均具有较强的基质抑制效应作用, 贻贝基质抑制效应为 16.7%~62.1%, 牡蛎为 12.0%~52.9%, 扇贝 6.89%~48.1%。由于没有相应的 PSTs 同位素内标抵消基质效

应的影响, 也未找到其他合适的替代性化合物可用作内标, 因此本研究采用基质匹配曲线, 外标法定量。

2.5 方法的线性范围及检出限

准确移取备用的混合标准溶液 1、2、4、10、20、40 和 100 μL 配制一系列的贻贝、牡蛎和扇贝 3 种贝类基质匹配曲线, 以毒素的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得到 3 种贝类基质中 PSTs 的线性方程。以 3 倍信噪比为检出限, 10 倍信噪比为定量限, 得到每种毒素的检出限和定量限。结果见表 3, 13 种 PSTs 的线性方程的线性相关系数均大于 0.998, 牡蛎检出限为 1~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 2~15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 贻贝和扇贝检出限为 2~8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 4~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 说明该方法线性良好, 灵敏度高。

表 2 3 种贝类中麻痹性贝类毒素的基质效应(%)
Table 2 Matrix effects of paralytic shellfish toxins in 3 kinds of shellfish species(%)

PSTs	贻贝	牡蛎	扇贝
STX	23.7	15.9	16.4
dcSTX	16.7	12.0	10.7
NEO	33.4	30.7	23.5
dcNEO	25.5	25.3	7.29
GTX5	32.6	28.3	20.8
GTX2	37.1	33.3	21.8
GTX1	39.1	36.5	15.9
dcGTX2	25.5	25.5	10.9
C1	62.1	52.9	48.1
GTX3	27.8	14.9	6.89
GTX4	25.8	15.7	13.5
dcGTX3	27.6	20.9	21.4
C2	45.3	35.4	16.4

2.6 回收率及精密度

分别向贻贝、牡蛎和扇贝 3 种双壳贝类中添加 40、80、200 μL 混合标准溶液(6 个平行),进行低、中、高浓度的回收实验,基质匹配曲线外标法定量,计算各物质在 3 种贝类基质中的平均回收率,结果见表 4。贻贝基质中 PSTs 平均回收率为 92.2%~122%,牡蛎基质中平均回收率为 106%~129%,扇贝基质中 PSTs 平均回收率为 107%~144%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 11%,该方法具有良好的重现性和准确性。

2.7 实际样品测定

采集广东省沿海城市贻贝样品 47 份、牡蛎样品 29 份、扇贝样品 24 份。通过本研究方法进行检测,共有 30 份样品,5 种 PSTs 被检出。其中贻贝检出率最高,为 42%,共检出 17 份 NEO、4 份 dcSTX,含量分别为 15.8~173、20~24.2 μg/kg;牡蛎检出率为 17%,NEO、STX 和 dcSTX 被检出,含量分别为 16.8~54.8、15.2~16.1、29.3~42.1 μg/kg;扇贝检出率为 21%,共检出 2 份 NEO、1 份

dcSTX、2 份 dcGTX2&3,含量分别为 12.0~52.8、108、49.5~125 和 15.4~44.2 μg/kg。

通过各 PSTs 对应的毒性因子计算样品中总毒性当量(saxitoxin equivalent, STXeq)^[18],STXeq 在 10.0~159 μg/kg 之间,未超过欧盟限量值 800 μg/kg STXeq^[7],说明 3 种贝类只受到 PSTs 的轻度污染。而在检测结果中,贻贝的 PSTs 检出率最高,总毒性最强,与吴海燕等^[16]检测市售贝类的结果一致,提示人们食用贻贝有潜在风险。

3 结 论

本研究通过质谱条件优化和流动相优化,使 13 种 PSTs 分离。优化前处理条件和净化条件,减少贝类中复杂基质的影响,并通过基质匹配曲线外标法进行定量分析,灵敏度高,线性良好。做基质加标回收实验,回收率高,重现性好。该方法高效灵敏,定量分析准确,适用于贝类产品的检测,为贝类产品的食用安全提供准确可靠的检测技术。

表 3 13 种 PSTs 的线性方程、检出限和定量限
Table 3 Linear equations, detection limits and quantification limits of 13PSTs

PSTs	贻贝				牡蛎				扇贝			
	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
STX	$Y=1242.41X+257.91$	0.9998	5	10	$Y=832.06X+1678.65$	0.9997	3	10	$Y=857.90X+383.00$	0.9995	5	10
dcSTX	$Y=910.16X+6111.63$	0.9991	7	20	$Y=657.04X+9506.90$	0.9997	4	12	$Y=581.65X+3112.43$	0.9989	7	20
NEO	$Y=377.37X+5769.43$	0.9994	5	10	$Y=346.86X+10438.63$	0.9991	5	15	$Y=265.31X+3004.34$	0.9985	7	15
dcNEO	$Y=316.87X+3.21e4$	0.9995	3	10	$Y=313.71X+1833.65$	0.9995	3	10	$Y=90.49X+85.54$	0.9990	8	20
GTX5	$Y=1733.49X+563.49$	0.9996	2.5	5	$Y=1502.43X+3890.89$	0.9993	2.5	5	$Y=1106.89X-1016.03$	0.9991	2.5	5
GTX2	$Y=940.40X-2681.88$	0.9992	5	10	$Y=845.11X-820.78$	0.9992	2	5	$Y=553.61X+607.08$	0.9996	2	5
GTX1	$Y=1627.938X-3518.31$	0.9998	2	5	$Y=1520.36X+97.184$	0.9998	2	5	$Y=663.58X-1105.73$	0.9986	2	5
dcGTX2	$Y=812.31X-439.56$	0.9995	8	15	$Y=812.91X-796.43$	0.9998	3	10	$Y=348.12X-2679.14$	0.9983	8	15
C1	$Y=579.43X-934.21$	0.9996	7	20	$Y=493.07X+476.94$	0.9994	4	12	$Y=448.53X+2514.85$	0.9996	2	6
GTX3	$Y=348.20X+198.2$	0.9996	2	4	$Y=186.83X+311.56$	0.9991	1	2	$Y=86.40X+62.21$	0.9995	2	6
GTX4	$Y=652.81X+63.79$	0.9997	2	4	$Y=398.74X+128.46177$	0.9992	2	3	$Y=342.97X+120.21$	0.9989	2	5
dcGTX3	$Y=681.94X+854.65$	0.9997	2	6	$Y=515.78X+2318.74$	0.9991	3	10	$Y=529.29X-153.12$	0.9993	3	10
C2	$Y=201.71X+841.23$	0.9991	2	7	$Y=157.99X+1830.92$	0.9992	2	5	$Y=73.146X+619.07$	0.9985	2	7

表 4 13 种 PSTs 在 3 种贝类中加标回收率和相对标准偏差(n=6)
Table 4 Recoveries and relative standard deviations of 13 kinds of PSTs in 3 kinds of shellfish(n=6)

PSTs	浓度/(μg/L)	贻贝		牡蛎		扇贝	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
STX	9.87	121	2.38	118	3.26	119	5.64
	19.7	109	4.90	111	4.90	109	4.23
	49.4	110	3.96	113	3.98	116	2.80
dcSTX	21.4	122	4.64	121	2.51	121	4.80
	42.8	111	4.54	116	2.10	113	2.72
	107	108	2.76	111	3.63	111	2.69
NEO	10.1	116	8.43	127	4.50	144	3.75
	20.2	115	5.19	125	2.79	129	3.22
	50.5	112	5.24	122	4.85	122	2.57
dcNEO	8.40	92.2	5.78	123	5.26	107	8.02
	16.8	108	7.28	115	4.05	113	5.82
	42.0	112	3.23	117	5.03	115	3.95
GTX5	5.54	119	4.85	129	7.03	127	3.64
	11.1	111	1.81	119	3.75	122	2.86
	27.7	111	3.47	119	1.90	116	1.51
GTX2	9.61	122	4.12	116	5.00	121	5.42
	19.2	108	3.69	108	5.63	116	3.46
	48.1	107	3.74	116	7.77	114	2.74
GTX1	11.1	120	3.29	118	4.95	117	5.60
	22.2	108	2.63	106	3.80	121	4.22
	55.4	104	2.39	110	3.96	117	2.33
dcGTX2	17.0	121	2.51	126	3.39	128	3.89
	34.1	112	4.65	118	4.65	116	1.54
	85.1	113	2.98	120	3.04	113	3.12
GTX3	4.07	120	4.66	118	4.84	111	9.31
	8.15	110	10.6	114	5.30	112	5.60
	20.4	108	2.18	115	5.58	112	4.74
GTX4	3.49	119	4.85	125	4.79	121	3.79
	6.97	118	4.06	120	4.94	112	6.88
	17.4	114	3.04	115	4.03	117	2.49
dcGTX3	5.00	119	4.32	120	4.84	125	5.12
	10.0	115	5.70	107	6.74	111	5.40
	25.0	109	7.21	108	4.68	122	5.53
C1	12.4	119	3.46	117	4.79	117	3.92
	24.9	110	4.35	115	3.97	115	7.57
	62.2	107	4.27	110	3.58	117	3.83
C2	3.72	108	7.69	112	9.24	119	6.76
	7.43	111	3.62	116	5.35	115	6.42
	18.6	103	8.27	112	5.40	113	3.37

参考文献

- [1] YUE Y, ZHUA B, LUNB L, *et al.* Quantifications of saxitoxin concentrations in bivalves by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the purification of immunoaffinity column [J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1147: 1–5.
- [2] LASSUDRIE M, HEGARET H, WIKFORS GH, *et al.* Effects of marine harmful algal blooms on bivalve cellular immunity and infectious diseases: A review [J]. *Dev Comp Immunol*, 2020, 108: 1–45.
- [3] EFSA. Marine biotoxins in shellfish-Saxitoxin group [J]. *EFSA J*, 2009, 1019: 1–76.
- [4] RAPOSO MIC, GOMES M, BOTELHO MJ, *et al.* Paralytic shellfish toxins (PST)-transforming enzymes: A Review [J]. *Toxins*, 2020, 12(5): 1–20.
- [5] THOMAS KM, BEACH DG, REEVES KL, *et al.* Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitation of paralytic shellfish toxins: Validation and application to reference materials [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(24): 5675–5687.
- [6] CHANG FH, ANDERSON DM, KULIS DM, *et al.* Toxin production of *Alexandrium minutum* (dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand [J]. *Toxicon*, 1997, 35(3): 393–409.
- [7] BOTANA AM, OTERO P, RODRIGUEZ P, *et al.* Current situation on analysis of marine toxins [J]. *Rev Anal Chem*, 2013, 32(1): 15–34.
- [8] TOYOFUKU H. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report) [J]. *Marine Pollut Bull*, 2006, 52(12): 1735–1745.
- [9] GERSSEN A, POL-HOFSTAD IE, POELMAN M, *et al.* Marine toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation [J]. *Toxins*, 2010, 2(4): 878–904.
- [10] 孟文琪, 裴志鹏, 冯雅伟, 等. 海洋生物毒素检测技术研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(9): 1148–1158.
- MENG WQ, PEI ZP, FENG YW, *et al.* Recent technique development in marine biotoxin analysis and detection [J]. *Acad J Second Med Univ*, 2016, 37(9): 1148–1158.
- [11] COMMUNITY E. Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December of 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004. [J]. *Off J Eur Union*, 2005, 338: 27–59.
- [12] 焦坤, 孙浚源, 胡波, 等. 海洋生物毒素检测进展[J]. 生命的化学, 2018, 38(5): 713–716.
- JIAO K, SUN JY, HU B, *et al.* Detection progress on marine biotoxins [J]. *Chem Life*, 2018, 38(5): 713–716.
- [13] 吴益春, 郭海波, 罗海军, 等. 海产品中麻痹性贝类毒素快速检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(8): 16–20.
- WU YC, GUO HB, LUO HJ, *et al.* Research progress in rapid detection of paralytic shellfish toxins in seafood [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(8): 16–20.
- [14] BURRELL S, CRUM S, FOLEY B, *et al.* Proficiency testing of laboratories for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by QUASIMEME: A review [J]. *TrAC, Trends Anal Chem*, 2016, 75:10–23.
- [15] TURNER AD, MCNABB PS, HARWOOD DT, *et al.* Single-laboratory validation of a multitoxin ultra-performance LC-hydrophilic interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish [J]. *J AOAC Int*, 2015, 98(3): 609–621.
- [16] 吴海燕, 郭萌萌, 邵晓菲, 等. 液相色谱-四极杆/线性离子阱复合质谱测定双壳类中麻痹性贝类毒素[J]. 海洋与湖沼, 2017, 48(3): 508–515.
- WU HY, GUO MM, BING XF, *et al.* Simultaneous identification and detection of paralytic shellfish toxin in bivalves mollusks by liquid chromatography coupled with quadrupole/linear ion trap tandem mass spectrometry [J]. *Ocean Et Lim Sin*, 2017, 48(3): 508–515.
- [17] 李兆永, 陈军辉, 王帅, 等. 麻痹性贝类毒素电喷雾质谱负离子模式分析特征[J]. 质谱学报, 2014, 35(1): 8–15.
- LI ZY, CHEN YJ, WANG S, *et al.* MS characteristic of paralytic shellfish poisoning toxins detected by electrospray ionization mass spectrometry in negative ion mode [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2014, 35(1): 8–15.
- [18] BOUNDY MJ, SELWOOD AI, HARWOOD DT, *et al.* 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 [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1387: 1–12.
- [19] 于慧娟, 蔡友琼, 黄宣运, 等. 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[J]. 海洋渔业, 2015, 37(4): 364–371.
- YU HJ, CAI YQ, HUANG XY, *et al.* Determination of 10 paralytic shellfish poisoning toxins by SPE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mar Fish*, 2015, 37(4): 364–371.
- [20] RODRIGUEZ I, ALFONSO A, GONZALEZ-JARTIN JM, *et al.* A single run UPLC-MS/MS method for detection of all EU-regulated marine toxins [J]. *Talanta*, 2018, 189: 622–628.
- [21] MATUSZEWSKI BK, CONSTANZER ML, CHAVEZ-ENG CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3019–3030.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



何明珠, 硕士研究生, 主要研究方向为理化检验。
E-mail: 1158176413@qq.com



刘桂华, 主任技师, 主要研究方向为食品安全与残留物检测。
E-mail: 1106126629@qq.com