



改进的 QuEChERS 方法结合超高效液相色谱-三重四极杆质谱测定食用贝类中原多甲藻酸贝类毒素*

应用简报

作者

Shen Han, Peiyue Wang, Ying Liu,
Jin Gu, Jinhua Wang
北京出入境检验检疫局
中国北京

Meiling Lu, Shan Zhou
安捷伦科技（中国）有限公司
中国北京

摘要

我们已开发了一种检测贝类中原多甲藻酸贝类毒素的方法。该方法采用改进的 QuEChERS 进行样品前处理。使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统结合 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统完成样品的分离和定量分析。本文研究表明，该方法操作简便，快速可靠，可以在远低于法规规定的限度水平下进行分离和检测。

**Chin. J. Chromatogr.*, 2013, 31(10), 939-945.



Agilent Technologies

前言

海洋生物毒素是全球食品安全关注的主要焦点之一，尤其是在沿海国家。中国的海洋食品易受海洋生物毒素的污染。近年来，由于水体的工业化和富营养化，中国的内海经常发生浮游植物的大量增殖。水生物种的大规模海水养殖，尤其是占中国海水养殖产品总产量 40.7% 的贝类养殖，进一步促进了浮游植物的增殖。原多甲藻是一种浮游植物，其各种亚型在中国海域广泛分布，一些亚型的原多甲藻能够分泌原多甲藻酸 (AZA) 贝类毒素，这是一类海洋生物毒素，是我们重点选择研究的一类目标化合物。这些海洋毒素的毒性很高，它们在水生物种中的生物富集、转化和代谢，以及对来自污染水域食用贝类的消费，都可能对人类健康造成严重威胁。AZA 暂定的参考剂量低至 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW [1]。当前，欧盟规定贝类中总 AZA 的最大残留量是 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [2]。中国正在制定自己的海洋生物毒素监管法规，尤其是对于那些如 AZA 等急需监测的毒素。检测 AZA 的常用方法是小白鼠生物检定法和 LC/MS/MS 技术。然而，与小白鼠生物检定法相比，LC/MS/MS 具有更高的选择性、灵敏度和准确度，并且我们一般认为 LC/MS/MS 方法执行起来相对简单、耗时短，而且还不容易产生假阴性结果。本研究的目的是采用 LC/MS/MS 建立一个简单、快速、灵敏度高的方法，用于日常监测不同贝类如贻贝、牡蛎、蛤蚌和扇贝当中三种最常见的 AZA 毒素 (AZA1、AZA2、AZA3)，为中国相关标准方法的开发提供支持。

实验部分

样品前处理

按照如图 1 所述的过程对样品进行前处理 [3]。向样品中加入 5 g MgSO_4 和 2 g NaCl ，再加入 85% 乙腈水溶液匀质并提取样品。所得提取物采用 C18 吸附剂进行净化，然后旋转蒸发至近干。残渣用 80% 乙腈水溶液复溶并依次通过滤膜过滤。采用乙腈/水梯度洗脱进行分离。然后采用正离子电喷雾离子化 (ESI+) 和多反应监测 (MRM) 检测含有羰基和醚氧配体的 AZA (图 2)。

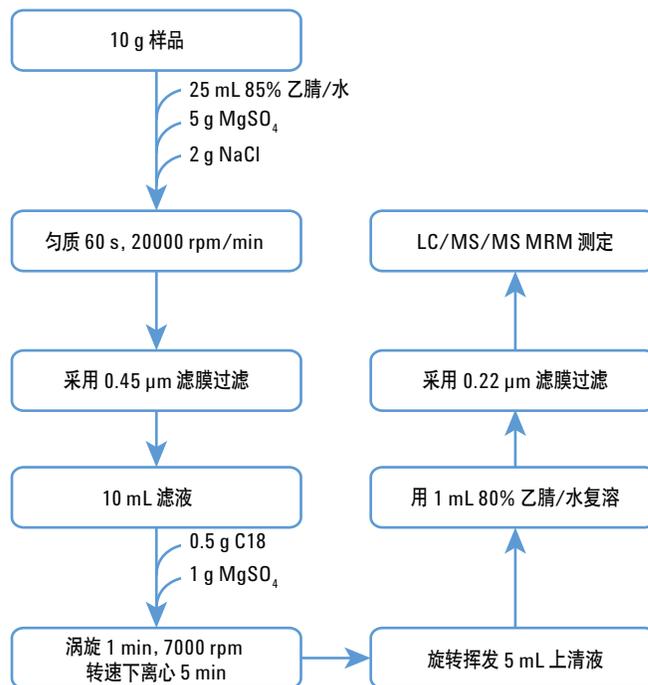
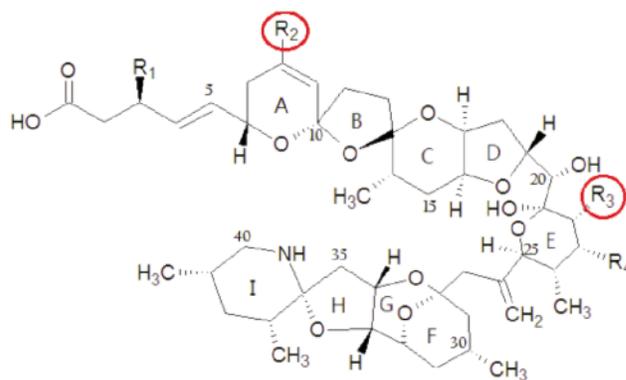


图 1. 分析食用贝类中 AZA 的过程



AZAs	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
AZA-1	H	H	CH ₃	H
AZA-2	H	CH ₃	CH ₃	H
AZA-3	H	H	H	H

图 2. AZA 的化学结构

详细的液相色谱和质谱条件列于表 1。

表 1. 仪器条件

液相色谱条件	
仪器	内置脱气机的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
自动进样器	带温控功能的 Agilent 1290 Infinity 自动进样器
柱温	1290 Infinity 柱温箱
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm
柱温	40 °C
流动相	溶剂 A) 0.1% 甲酸/5 mM 醋酸铵水溶液; 溶剂 B) 乙腈
流速	0.4 mL/min
进样量	5 μL
后运行时间	1 min
梯度洗脱程序	0–1 min, B% 从 20% 升至 50% 1–6 min, B% 从 50% 升至 90% 6–7 min, B% 保持在 90% 7–7.5 min, B% 从 90% 降至 20%
ESI-MS/MS 条件	
仪器	配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	6 L/min
雾化气压力	45 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V (+)
喷嘴电压	400 V (+)

表 2. 监测 AZA 的 MRM 参数

化合物名称	母离子	子离子	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	保留时间 (min)
AZA-1	842.5	824.5*	190	45	3.753
		806.6	190	50	
AZA-2	856.5	838.5*	210	45	4.019
		820.4	210	50	
AZA-3	828.4	810.4*	200	40	3.301
		792.4	200	45	

*定量离子

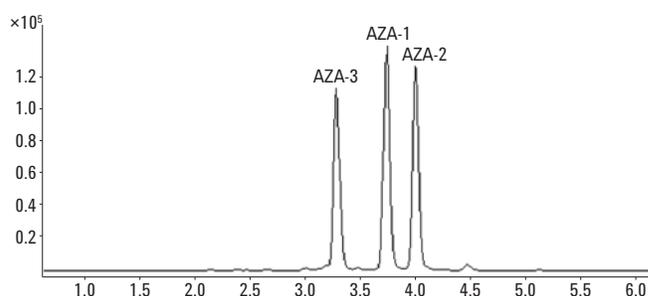


图 3. AZA 的典型 TIC MRM 色谱图

结果与讨论

三种 AZA 的分离

首先优化表 2 列出的每个化合物的 MRM 离子对参数, 以实现高检测灵敏度。使用乙腈/水流动相, 其中含 0.1% 的甲酸, 5 mM 醋酸铵作为水相的改性剂, 所得色谱图说明这三种化合物实现了基线分离 (图 3)。

提取条件对回收率的影响

考察了 AZA 的提取条件，包括提取溶液、提取方法、提取时间和温度。当使用 85% 乙腈水溶液室温下匀质混合 60 s 提取样品时，可获得最高的回收率（表 3）。因此，选择该最佳条件提取目标化合物。

表 3. 不同提取条件下回收率的比较

样品化合物	溶剂	AZA 加标 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的牡蛎		
		AZA-1	AZA-2	AZA-3
提取溶液	乙酸乙酯	43.5	30.9	34.4
	甲醇	37.2	33.1	32.9
	乙腈	44.5	40.9	39.3
	乙腈-水	44.9	42.1	38.5
提取方法	振荡	32.2	29.8	27.3
	超声	29.5	22.3	19.8
	匀质/匀浆/分散	44.2	45.1	40.0
提取时间 (s)	20	22.5	26.9	25.1
	60	43.2	40.9	42.6
	120	44.0	41.5	41.9
提取温度 ($^{\circ}\text{C}$)	保留时间	41.5	40.9	40.2
	40	41.4	41.2	40.5
	70	40.2	39.9	41.5

使用 QuEChERS 方法过程中，盐对提取效率的影响

采用 QuEChERS 方法时，通常在提取溶液中加入硫酸镁 (MgSO_4) 和氯化钠 (NaCl) 来改善提取效率。氯化钠可以降低目标化合物在水相中的分配，而 MgSO_4 可以有效吸收水分。因此，两者的加入可以提高分析物在有机相中的分配，从而提高了提取效率。如图 4A 和 4B 所示，对于所检查的四种贝类，包括贻贝、牡蛎、蛤蚌和扇贝，5 g MgSO_4 和 2 g NaCl 可提供最高的提取效率。

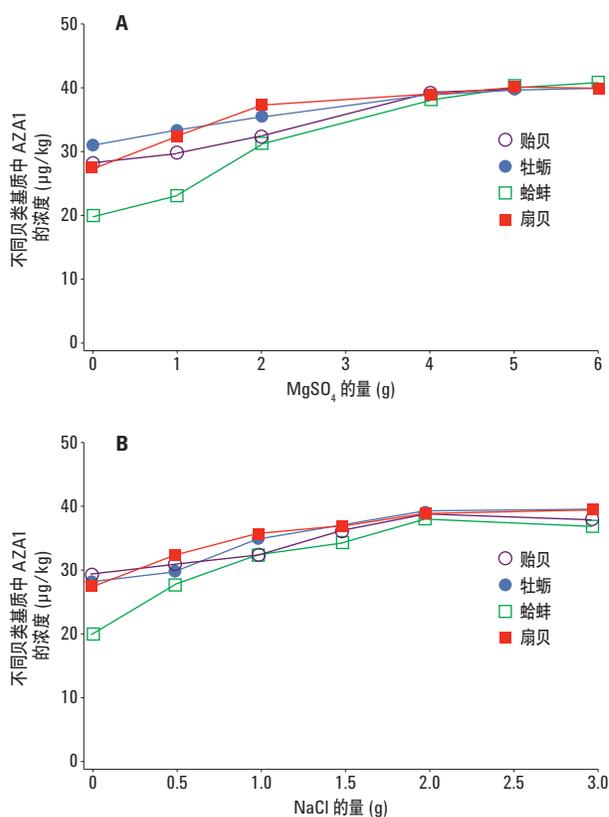


图 4. MgSO_4 (A) 和 NaCl (B) 对 AZA1 提取回收率的影响

净化吸附剂的选择

考察佛罗里硅土、C18、PSA 和 GCB 作为吸附剂净化提取物的效果。我们发现，极性吸附剂佛罗里硅土很难从基质中吸附脂类成分，导致贝类基质中 AZA 的回收率降低。GCB 对具有平面环状结构的化合物具有很强的吸附性，因此它会强烈吸附 AZA 并导致其回收率很低。PSA 是一种碱性吸附剂，会与 AZA 这类酸性化合物有相互作用，从而也可导致低回收率。相比而言，C18 可以有效去除脂类和碳水化合物，当然，过量使用 C18 也会降低回收率。多次试验后发现，如果预先加入 1 g $MgSO_4$ ，每 20 g 样品再加入 1 g 净化吸附剂 C18，即可获得最高的回收率。

利用定性/定量 MRM 离子对比率确证化合物

针对加标 AZA 1 $\mu g/kg$ 的扇贝基质，比较了其定性 MRM 和定量 MRM 离子对。如图 5 所示，定性与定量 MRM 离子对的比率范围是 100.4% - 104.4%，表明分析物的鉴定正确。

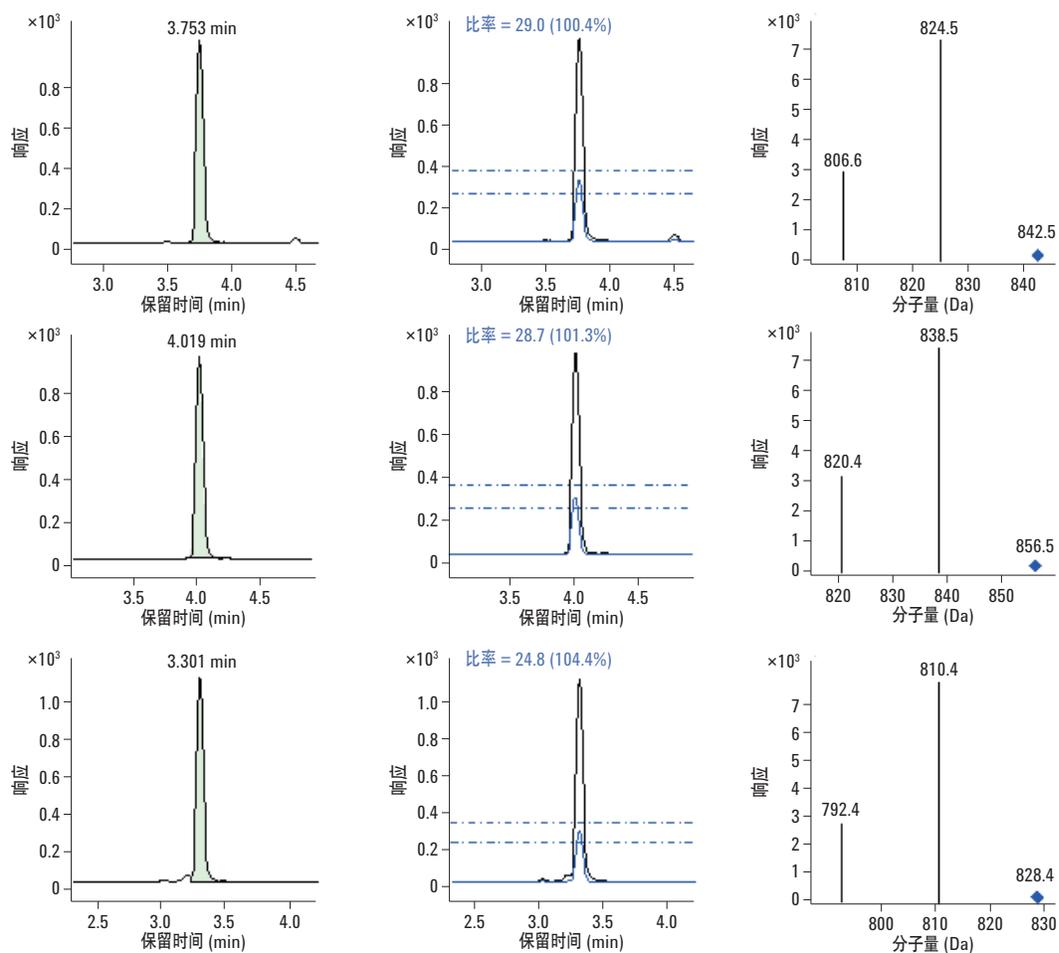


图 5. AZA 加标浓度为 1 $\mu g/kg$ 扇贝基质的定性和定量 MRM 离子对的比较

方法性能

针对每种基质中的 AZA，分别建立了基质匹配的校准曲线。加标浓度范围内获得了良好的线性关系，相关系数 ≥ 0.996 。每种化合物的 LOQ 测定为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。扇贝基质的典型性能见表 4。分析 AZA 加标浓度分别为 10、20 和 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的混合贝类基质，表明总体回收率在 71–108% 范围内，RSD 为 4.69–7.81%，表明方法准确度高、精密度好（表 5）。

重复性、重现性和回收率

我们还检查了方法的日内和日间回收率和精密度。如表 6 所示，该方法具有良好的回收率和精密度。

表 4. 扇贝基质中 AZA 的线性和 LOQ

化合物	加标浓度范围 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	校准方程	相关系数 (R^2)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
AZA-1	1–100	$Y = 5,108.97x + 2,086.41$	0.996	1.0
AZA-2	1–100	$Y = 4,601.08x - 1,459.56$	0.997	1.0
AZA-3	1–100	$Y = 4,478.17x + 1,185.58$	0.996	1.0

表 5. 混合贝类基质中 AZA 的加标回收率和精密度 ($n=6$)

化合物	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	最大 RSD (%)
AZA-1	10, 20, 50	74–108	5.77
AZA-2	10, 20, 50	71–102	7.81
AZA-3	10, 20, 50	78–107	4.69

表 6. 加标 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 混合基质的日内和日间分析的回收率和精密度 ($n=6$)

分析物	浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	第一天 10:00		第一天 18:00		第二天 10:00	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
AZA-1	20	96.3	8.6	89.6	7.2	92.4	7.5
AZA-2	20	86.5	6.4	88.2	9.4	93.5	5.4
AZA-3	20	95.5	7.0	90.8	6.1	88.3	7.9

真实样品筛查

检验了包括扇贝、贻贝、牡蛎和陆蛤等 17 个样品。其中 7 个样品中检测到 AZA (表 7)。其中, 三个样品中的 AZA 浓度高于 10 µg/kg, 但仍低于当前规定的限量浓度 160 µg/kg。

结论

本文介绍了一种优化的 QuEChERS 样品前处理和 MRM 模式下与 LC/MS/MS 联用, 检测各种贝类中三种原多甲藻酸贝类毒素的方法。所建立的方法灵敏度高, 每种 AZA 的 LOQ 为 1 µg/kg。在加标浓度范围 1–100 µg/kg 内, 基质匹配的校准曲线具有良好的线性, $R^2 > 0.99$ 。回收率在 71–108% 范围内, 精密度低于 10% (RSD)。方法操作简便、快速可靠, 因此可完全满足实际样品如蓝贻贝、牡蛎、陆蛤和扇贝中 AZA 的筛选分析。

表 7. 本地市场上 17 个样品中 AZA 的浓度

样品	AZA1 (µg/kg)	AZA2 (µg/kg)	AZA3 (µg/kg)
扇贝-1	11.2	1.8	—
扇贝-2	—	—	—
扇贝-3	2.5	—	—
贻贝-1	—	—	—
贻贝-2	4.1	1.5	—
贻贝-3 (进口)	2.8	—	—
牡蛎-1	—	—	—
牡蛎-2	—	—	—
牡蛎-3 (进口)	15.2	4.5	3.1
陆蛤-1 (进口)	—	—	—
陆蛤-2 (进口)	2.6	—	—
陆蛤-3 (进口)	—	—	—
贻贝罐头产品	—	—	—
牡蛎罐头产品	—	—	—
干贝-1	—	—	—
干贝-2	18.3	10.5	—
干贝-3	—	—	—

参考文献

1. H. Toyofuku *Marine Pollution Bull.*, 2006, **52**(12):1735
2. European Commission, Commission Decision 2002/225/EC *J. Eur. Commun.*, 2002, **62**
3. K. Ofuji, M. Satake, T. McMahon, *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, **65**:740

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014
2014年3月18日，中国印刷
5991-3336CHCN



Agilent Technologies