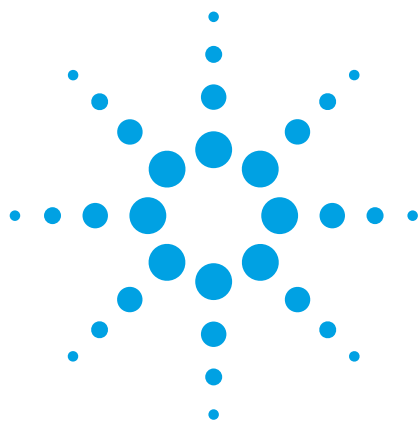




安捷伦 6460 三重四极杆液质联用仪用于亲脂性海洋贝类毒素的高灵敏度可靠分析

应用简报

环境，食品安全

作者

Oliver Keuth

Chemical and Veterinary Analytical
Institute Muensterland-Emscher-Lippe,
Muenster, Germany

Thomas Glauner

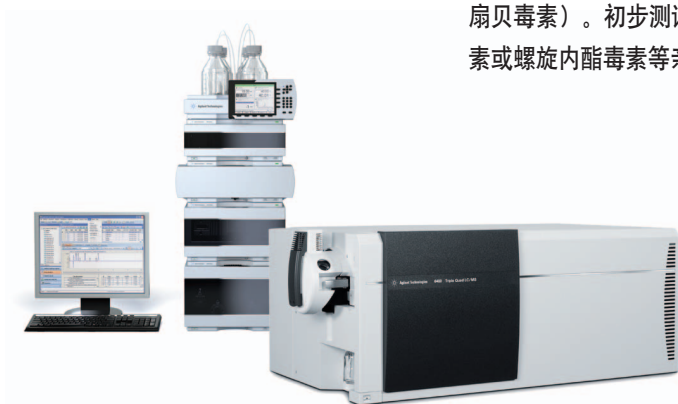
Agilent Technologies,
Waldbronn, Germany

摘要

海洋生物毒素正在世界各个地方日益威胁着人类的健康。毒素是由几类微观浮游藻类生成的，其浓度很低，但可以在双壳贝类中累积并达到毒性剂量。食用受污染的贝类或鱼类可导致人体中毒，甚至死亡。在动物和人类中，根据症状划分出了四类公认的贝毒：腹泻性贝毒（DSP）、麻痹性贝毒（PSP）、神经性贝毒（NSP）、记忆缺失性贝毒（ASP）。

小白鼠生物法（MBA）是用于监测亲脂性生物毒素的欧盟官方标准的参考方法 [委员会法规（EC）第 2074/2005 号]。最近，欧洲食品安全局（EFSA）认为，由于小白鼠生物法（MBA）的高变异性、低检测能力和有限的特异性，使得这个方法不能满足要求（EFSA 杂志，2009，1306，1-1）。因此需要一个具体的、能够替代低检测限（LOD）的方法来用于海洋生物毒素的检测。

本文描述了一种高灵敏度的液相色谱-串联质谱方法来测定亲脂性的海洋毒素，包括大田软海绵酸（OA）、鳍藻毒素（DTX 毒素）、聚醚类毒素（如原多甲藻酸，蛤毒素和虾夷扇贝毒素）。初步测试表明，若能找到标准物质，这种方法也适用于软骨藻酸、环亚胺毒素或螺旋内酯毒素等亲脂毒素的进一步检测。



Agilent Technologies

前言

海洋生物毒素是海洋植物藻类产生的次生代谢物，其浓度一般很低。在藻类生长时，毒素的浓度可以达到有毒水平，特别是双壳类软体动物中毒素的积累。在过去的二十年中，有害藻类大量繁殖，其数量和强度都日益增加，大量的有毒化合物在海洋食物链中被发现 [海洋生物毒素。粮农组织食品和营养文件 (80) 2004]。由于欧盟现有的官方的标准方法中，小白鼠生物法的高变异性、低检测能力和有限的特异性，欧洲食品安全局 (EFSA) 要求需要开发出更灵敏、更可靠的方法，用于脂性海洋生物毒素的测定。

您面临的挑战

目前的挑战是需要寻找灵敏和可靠的分析方法用于海产品中亲脂性的海洋毒素的测定，这些海洋毒素包括大田软海绵酸 (OA)、鳍藻毒素 (DSP 毒素)、聚醚类毒素 (如原多甲藻酸、蛤毒素和虾夷扇贝毒素)。这种方法应该能够扩展到亲脂毒素 (如软骨藻酸、环亚胺毒素或螺旋内酯毒素) 的进一步检测。欧盟立法规定检测限 (LOD) 应该低于原多甲藻酸、大田软海绵酸和鳍藻毒素和蛤毒素的总和以及

虾夷扇贝毒素的最大残留限量 (MRL)。基质使得痕量毒素的定量和确认分析更加复杂。由于很多标准品很难得到，所以只能根据其它的毒素进行定量分析。

我们的综合方法

当前，海洋生物毒素的分析方法主要是基于物理化学技术，如液相色谱-串联质谱。三重四极杆质谱能大幅减少或消除基质的干扰。多反应监测 (MRM) 是根据待测物的母离子在碰撞反应池产生特征离子，然后采集这些特征离子来完成检测。而且，待测物母离子 (MS1 设置成选择离子扫描模式) 与单四极杆质谱的选择离子扫描的选择性相同，生成的子离子 (MS2 的选择离子扫描模式) 更有可能成为目标化合物的特征离子，这样的模式能够大大提高 MRM 的选择性。特征的子离子组合 (更高的选择性) 和背景噪音的消除使得即使在复杂基质样品中也能得到更低的检测限。本文的方法中，使用安捷伦 6460 三重四极杆液质联用仪和多反应监测 (MRM)、安捷伦 1200 SL 快速高分离液相色谱以及 MassHunter 工作站软件，建立了贝类样品中亲脂性海洋生物毒素的高灵敏度和高选择性的分析方法。本文介绍的样品净化方法非常简单，因此很适合常规检测。它可以

用于 OA、DTX-1、DTX-2 的分析，包括水解后的脂、YTX、OH-YTX、PTX-1、PTX-2、AZA-1、AZA-2 和 AZA-3。由于缺少某些商品化的毒素标样，因此使用 *CopyCalibration Level.quant.script* 对其它的毒素化合物进行定量分析。

方法和运行

用于海洋生物毒素的现代分析方法是基于三重四极杆液质联用系统的技术。样品前处理很简单，只需要用溶液提取，然后过滤。液相色谱进行毒素的分离，然后用液相色谱-电喷雾离子源-串联质谱 (MRM 正/负模式) 进行待测物的定量分析。

分析步骤

液相萃取

高效液相色谱，线性梯度进行分离

液相色谱-电喷雾离子源-串联质谱 (MRM)

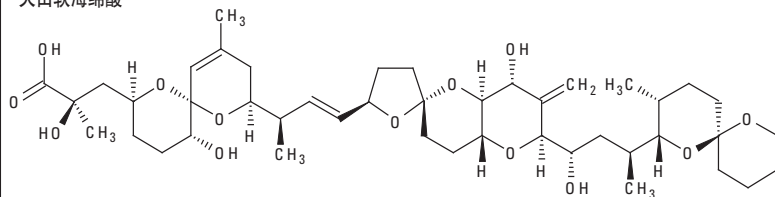
用于毒素检测

样品制备步骤

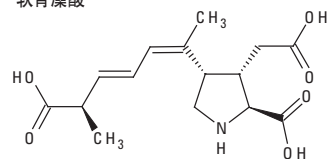
称取 2 g 熟的研磨贝类。加入 9 mL 甲醇溶液 (80%)。进行两次提取步骤。将两次提取液混合在一起，移至 50 mL 容量瓶。取一定体积的样品溶液，过滤 (RC 0.45 μ m)，10 μ L 样品进到液相色谱-串联质谱中进行分析。

待测物的结构（举例）

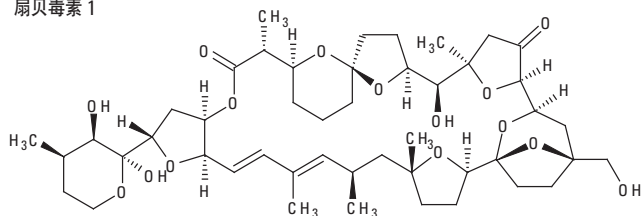
大田软海绵酸



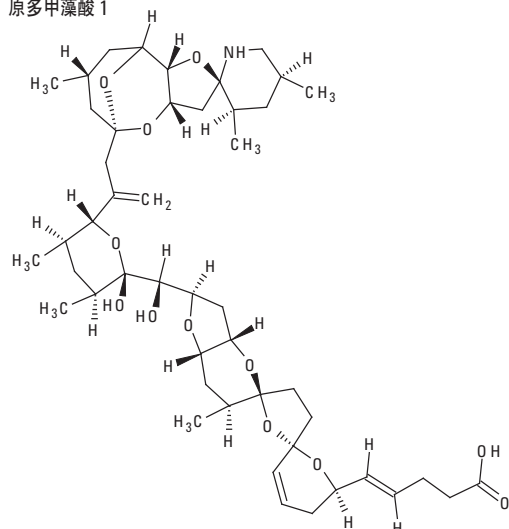
软骨藻酸



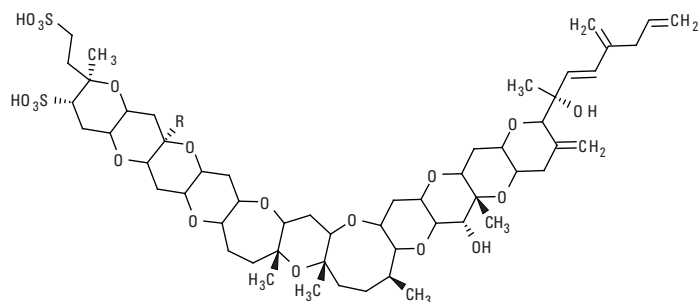
扇贝毒素 1



原多甲藻酸 1



虾夷扇贝毒素



鳍藻毒素 1

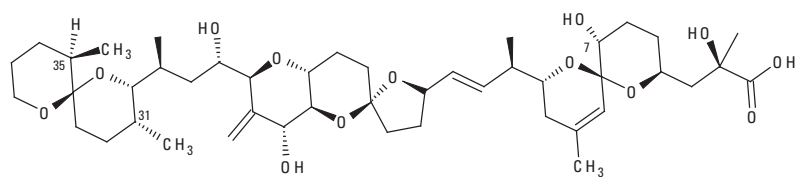


图 1. 一些海洋生物毒素的化学结构

液相色谱-串联质谱方法

亲脂性海洋生物毒素的总分析时间小于 30 min。分析方法中，对于 OA、DTX-1、DTX-2、PTX-1、PTX-2、AZA-1、AZA-2 和 AZA-3 采用正离子模式。YTX 需要用不同的色谱柱和流动相另外进行分析。提取物（10 µL）直接进到液相色谱-串联质谱系统进行分析。对于液相色谱方法，

正离子模式下用 0.1% 甲酸溶液（A）和甲醇（B）；对于负离子模式下用 2 mM 醋酸铵溶液（A）和甲醇（B）。色谱柱（Phenomenex Luna 5 µm C18 (2) 100 Å 150 x 2.0 mm [正离子模式]，ZORBAX Eclipse Plus C 8 4.6 x 75 mm 3.5 µm [负离子模式]），柱温为 30 °C，流速为 0.2 mL/min。

梯度* 时间 [min]	溶剂比例 B [%]
0	5
10	85
22	85
23	5
30	5

表 1. 梯度设置
*适用于正、负电离模式

样品制备步骤



图 2. 检测贝类中海洋生物毒素过程中的样品前处理步骤

参考: McNabb, P., A.I. Selwood, and P.T. Holland “贝类中藻毒素多多残留检测方法” J AOAC .nt, 2005. 88: p. 761-772
Chapela, M.J., et al., 液相色谱-质谱用于鲜的冷冻, 处理过的软体动物中亲脂性毒素分析, 并且与小白鼠生物法的比较 J Agric Food Chem, 2008. 56 (19) : p. 8979-86
Moutfort, D.O., T. Suzuki, and P. Trueman, 蛋白磷酸酶抑制法适用于测定受污染贻贝中的总 DSP, Toxicon, 2001.39: p. 383-390

质谱参数设置和喷射流离子聚焦电喷雾源参数

安捷伦 6460 QQQ 喷射流电喷雾离子源参数

气体温度: 300 °C
 气体流速: 5 L/min
 雾化器压力: 45 psi
 鞘流气温度: 250 °C
 鞘流气流速: 11 L/min
 毛细管电压: + 3500 V
 - 3500 V
 喷嘴电压: +/- 500 V
 Delta EMV: 400

Agilent 6410 QQQ 离子源参数

离子源: ESI
 气体温度: 300 °C
 干燥气流速: 10 L/min
 雾化器压力: 43 psi
 毛细管电压: + 4500 V
 - 5200 V
 Delta EMV: 400

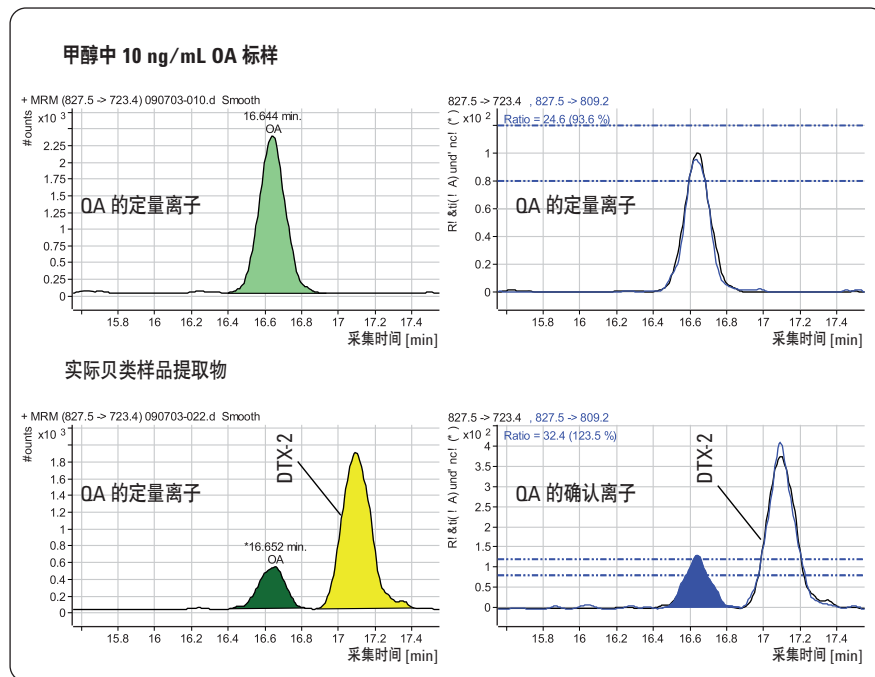


图 3. 含有 OA 和 DTX-2 的大田软海绵酸标样和实际贝类样品 (样品与图 4 所示相同)
OA 23 µg/kg 和 DTX-2 130 µg/kg

待测物	极性	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞电压 [V]	CE [eV]	定量离子
OA and DTX-2	pos	827.5	723.4	220	55	X
	pos	827.5	809.2	220	45	
DTX-1	pos	841.5	737.2	220	55	X
	pos	841.5	823.2	220	45	
PTX-1	pos	897.5	555.3	230	70	X
	pos	897.5	853.5	230	60	
PTX-2	pos	881.5	539.3	230	70	X
	pos	881.5	837.5	230	60	
PTX-2sa*	pos	899.5	855.5	230	60	X
	pos	899.5	557.3	230	70	
YTX	neg	1141.5	1061.3	135	35	X
	neg	1141.5	925.5	135	60	
Homo-YTX*	neg	1155.4	1075.5	135	35	X
OH-YTX	neg	1157.4	1077.5	135	35	X
OH-Homo-YTX*	neg	1171.4	1091.5	135	35	X
AZA-1	pos	842.5	824.5	200	40	X
	pos	842.5	806.5	200	55	
AZA-2	pos	856.5	838.5	200	40	X
	pos	856.5	820.5	200	55	
AZA-3	pos	828.5	810.5	200	40	X
	pos	828.5	792.5	200	55	

*MRM 参数参考文献

表 2. MRM 参数和质谱设定

结论

通过国际合作研究进行方法验证。合作研究是在 § 64 LFGB 工作小组的“藻类毒素”框架下进行的，由联邦消费者保护和食品安全 (BVL) 办公室主办。

化合物	检测限	定量限
¹ OA	6 µg/kg	20 µg/kg
¹ DTX-1 & 2	6 µg/kg	20 µg/kg
² AZA-1 to 3	6 µg/kg	20 µg/kg
¹ PTX-1 & 2	6 µg/kg	20 µg/kg
³ YTX	10 µg/kg	35 µg/kg

¹ 方法检测限 (MRL)：原始贝类样品中 OA, DTX-1 & 2, PTX-1 & 2 的总和：相当于 160 µg/kg OA

² 方法检测限 (MRL)：原始贝类样品中原多甲藻酸的总和：相当于 160 µg/kg AZA-1

³ 方法检测限 (MRL)：原始贝类样品中虾夷扇贝毒素的总和：相当于 1000 µg/kg YTX

表 3
熟的研磨贝类样品中亲脂性海洋生物毒素的检测限和定量限

分析结果的重现性 (S.D.) 在 10 % 至 35 % 之间（取决于样品基质、浓度、待测物）。
提取回收率在 75 % 至 102 %（取决于待测物和样品基质）。

优势

- 安捷伦 1200 SL 快速高分离液相色谱 / 6460 三重四极杆液质联用系统用于贝类中海洋生物毒素的高灵敏度和高选择性分析
- 样品前处理简单、成本低、分析流程容易，适合常规分析，具有很高的可靠性
- 符合 EFSA 的法规要求
- 具有很高的灵活性，可以扩展至其它亲脂性毒素的检测分析

实际贝类样品的总离子流图

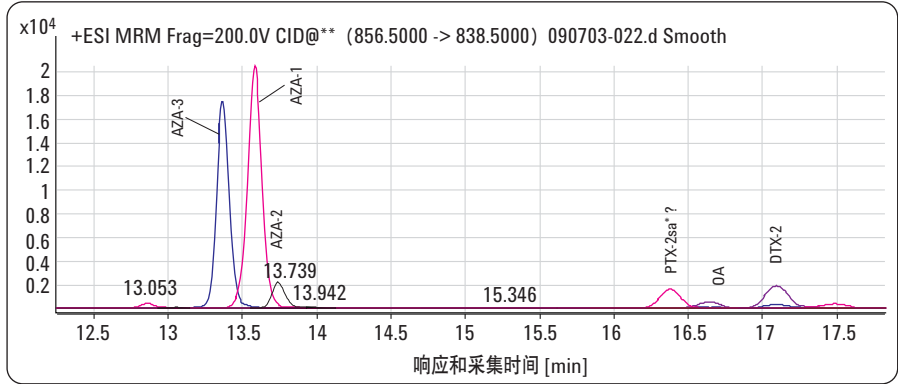


图 4. 实际样品提取物
浓度：96 µg/kg AZA-1, 22 µg/kg AZA-2, 50 µg/kg AZA-3, 23 µg/kg OA 和 130 µg/kg DTX-2
*根据文献的数据暂时定义得到 PTX-2sa, 无法获得 PTX-2sa 标样

实际贝类样品的提取离子流图

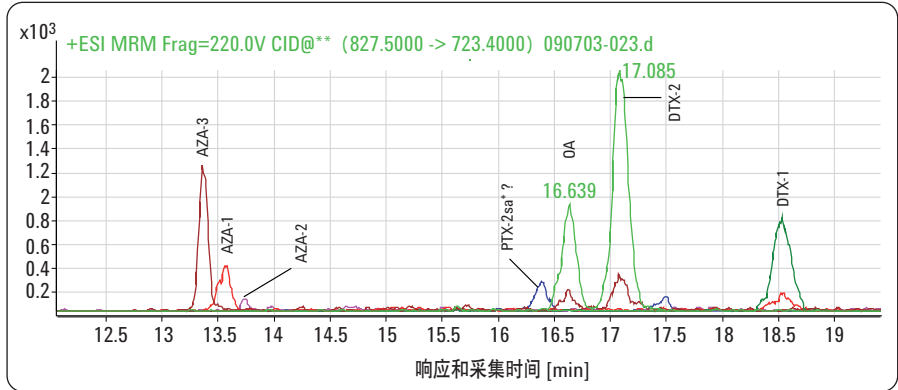


图 5. 实际贝类样品提取物, AZA-1 检测限-3 < 20 µg/kg
浓度：37 µg/kg OA, 120 µg/kg DTX-2 和 69 µg/kg DTX-1
*根据文献的数据暂时定义得到 PTX-2sa, 无法获得 PTX-2sa 标样

质控样品的离子流图

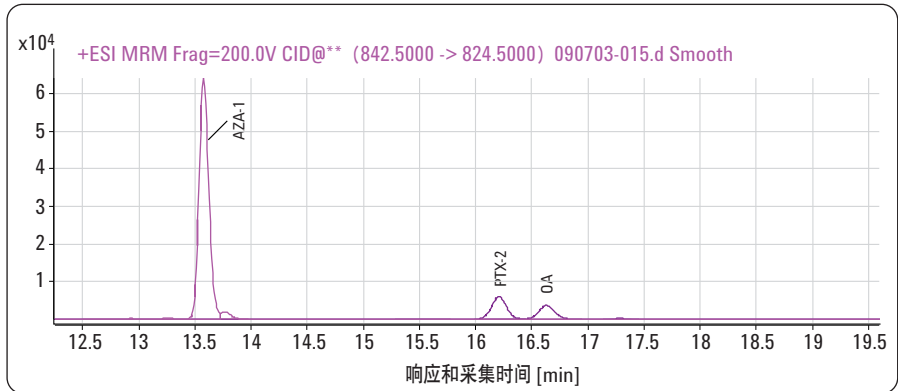


图 6. 质控样品, 15 µg/kg AZA-1, PTX-2 和 OA, 贝类加标提取样品

校正曲线（基质匹配）

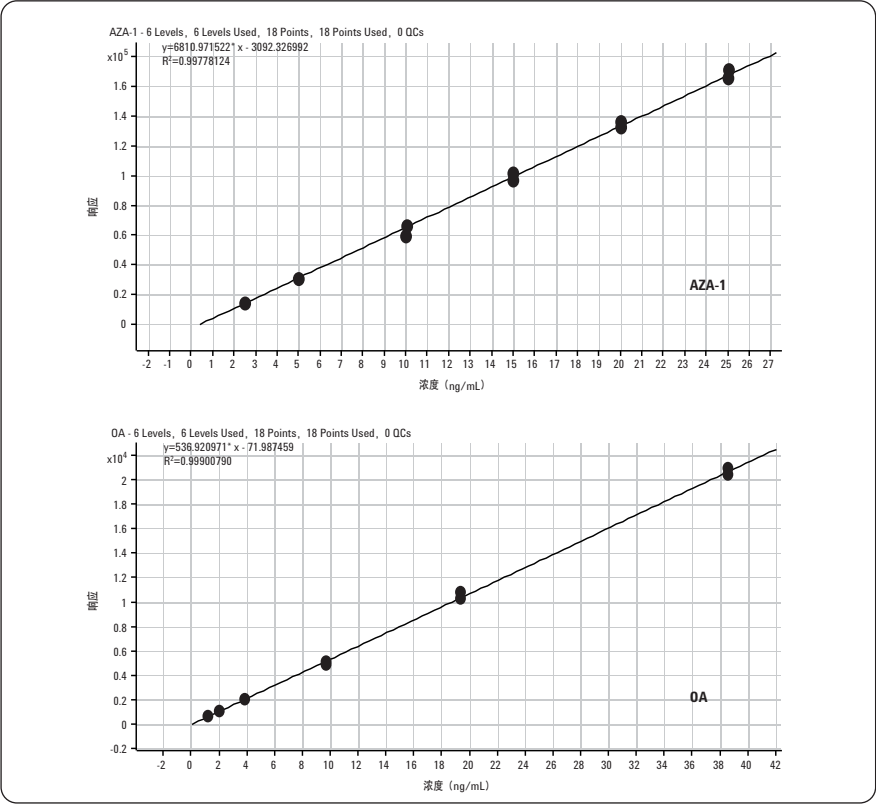


图 7. 贝类提取物中的 AZA-1 和加标 OA 的校正曲线，线性拟合，包括原点，没有权重。AZA-1 的浓度范围是 2.5 至 25 ng/mL，OA 的浓度范围是 1.1 至 38 ng/mL

校正曲线（甲醇）

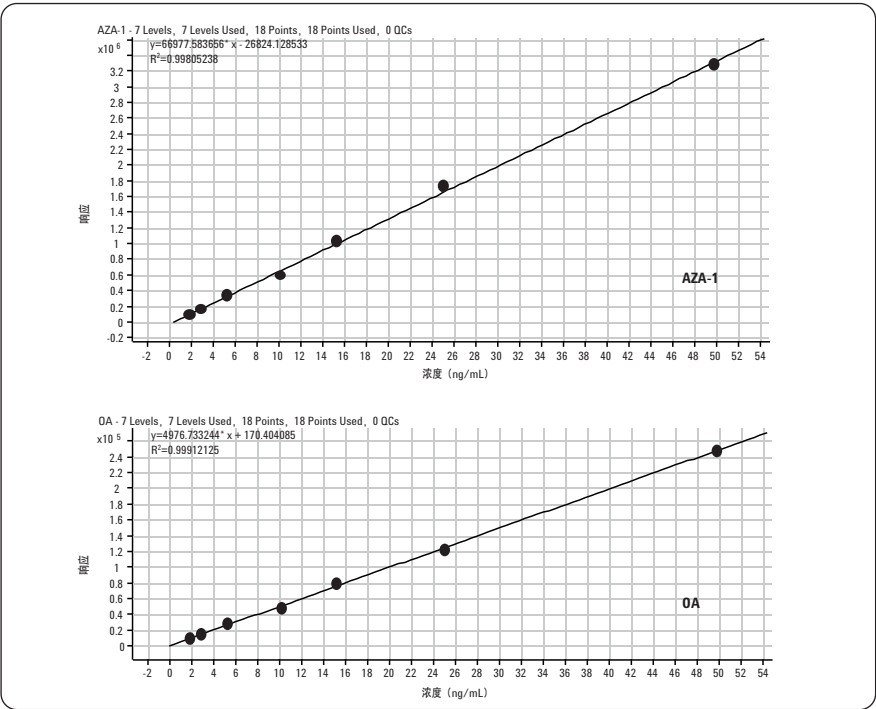


图 8. 甲醇中 AZA-1 和 OA 的校正曲线，线性拟合，包括原点，没有权重。两个化合物的浓度范围都是 1.5 至 50 ng/mL

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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，2010
2010 年 9 月 1 日，中国印刷
5990-6377CHCN



Agilent Technologies