

使用UPLC/MS/MS方法对贝类中管制和非管制的亲脂性海洋生物毒素进行常规定量分析

Arjen Gerssen¹、Mirjam D. Klijnstra¹、Simon Cubbon²和Antonieta Gledhill²

¹瓦格宁根大学食品安全研究所（荷兰瓦格宁根）

²沃特世公司（英国曼彻斯特）

应用优势

这是一种能够快速、可靠地分析贝类中管制和非管制亲脂性海洋生物毒素的方法。与传统的HPLC/MS/MS方法相比，其分析速度提高了4倍：（单次分析由20 min缩短为5 min）。本方法还可以满足规定的检测水平，可用于代替小鼠生物检测法。

简介

食用受到生物毒素污染的贝类（贻贝、牡蛎、蛤等）可能会引起人体严重中毒，如腹泻性贝毒（DSP）。由于DSP毒素具有亲脂性，通常将其归类为亲脂性海洋生物毒素。海洋生物毒素由不同种类的浮游植物自然产生，因此也称之为藻毒素。亲脂性海洋生物毒素在理化性质方面呈现出多样性，如羧酸、磺酸、氨基和亚氨基官能团，因此具有一定的复杂性。

欧盟（EU）立法对各种类别的毒素进行管制，并在官方控制程序中具体介绍了对这些毒素实施监控的方式。如图1A所示，应当受到监控的亲脂性生物毒素有冈田软海绵酸（OA）；鳍藻毒素1、2、3（DTX1, 2, 3），其中DTX3分别是OA、DTX1和2的酯形式；扇贝毒素1、2（PTX1, 2）；虾夷扇贝毒素（YTX）；450H虾夷扇贝毒素（450H YTX）；同源虾夷扇贝毒素（homoYTX）；450H同源虾夷扇贝毒素（450H homoYTX）；原多甲藻酸1、2和3（AZA1, 2, 3）¹。

在2011年7月之前，上述毒素的官方检测方法为一种生物检测法，该方法基于大鼠口服贝类肉或小鼠腹腔注射贝类提取物进行检测。这种方法主要存在两个问题：第一，有违生物伦理学；第二，无法非常科学地、可靠地测定痕量的特定毒素。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® 系统

ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱

Xevo® TQ-S 质谱仪

TargetLynx™ 应用软件

QUANPEDIA™ 数据库

关键词

贝类，生物毒素，亲脂性，藻毒素，贻贝，蛤，牡蛎，腹泻性贝毒，DSP

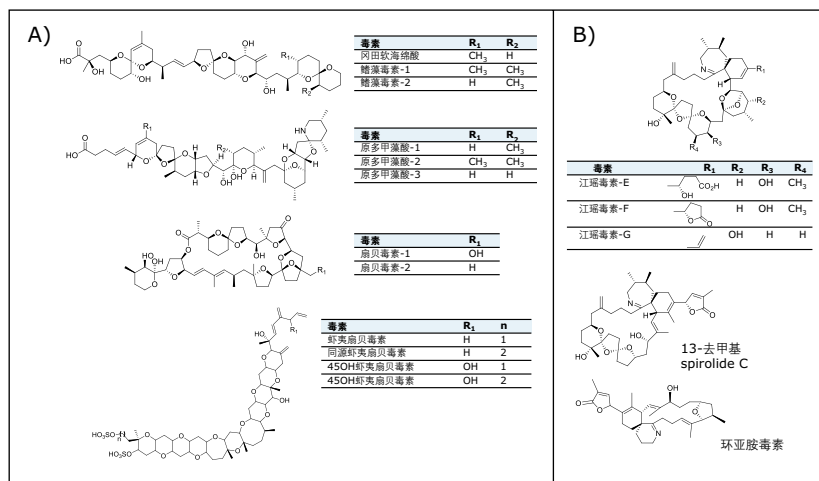


图1. a) 管制毒素和b) 非管制环亚胺类毒素的化学结构式。

采用生物检测法进行检测时，环亚胺类毒素的存在会引起一种物理反应，通常使动物致死。环亚胺类毒素如图1B所示，根据理化性质也被归类为亲脂性海洋毒素。虽然这些毒素目前尚未受到管制，但欧洲食品安全局（EFSA）指出，这类毒素的毒性数据以及其贝类中的存在情况应当被更多地收集。

自2011年7月起，LC/MS/MS成为贝类中亲脂性海洋生物毒素的官方检测方法²。欧盟引用的LC/MS/MS方法是使用固定的提取步骤提取生物毒素，再通过传统LC方法在酸性或碱性流动相下进行分离，并使用串联四极杆MS进行检测。

本次研究的目的是建立一种在碱性条件下比传统LC方法更快速的常规分析方法，其中还包括EFSA关注的其他非管制类化合物的分析。在本应用纪要中，我们使用Waters® ACQUITY UPLC系统串联Xevo TQ-S质谱仪，对包括部分非管制环亚胺类毒素在内的多种亲脂性海洋生物毒素进行了为时五分钟的分析。UPLC®技术能够缩短分析运行时间，并且不会对色谱峰分离度和峰质量产生不良影响，而Xevo TQ-S（串联四极杆质谱仪）可提供超高灵敏度的检测，还能够在切换电喷雾正离子（ESI⁺）和负离子（ESI⁻）模式下同时采集多重反应监测（MRM）跃迁数据，该采集过程是分析亲脂性海洋生物毒素的必需步骤。

标准品制备

经认证的标准品OA、DTX1, 2、PTX2、YTX、AZA1, 2, 3、环亚胺毒素（GYM）和13-去甲基Spirolide C（SPX1）均购自加拿大哈利法克斯市国家研究委员会海洋生物科学研究所（NRC-CNRC）。江瑶毒素E（PnTX-E）、F（PnTX-F）和G（PnTX-G）的半纯化标准品购自新西兰尼尔森的Cawthron研究所。各种毒素的标准储备液均采用甲醇制备。使用空白贻贝提取物并加入储备液，绘制基质加标（MMS）校准曲线。空白提取物按照样品提取方法进行制备。基质加标标准品的浓度分别为验证浓度的0、0.125、0.25、0.5、1.0和1.5倍（受管制毒素的验证浓度水平与允许浓度接近，如表1所示）。

亲脂性海洋生物毒素	欧盟限制浓度	(MMS)	0.125	0.25	0.5	1	1.5
		(µg/kg) 0					
OA, DTX1, DTX2, PTX2	160 µg OA当量/kg*	0	20	40	80	160	240
AZA1, 2, 3	160 µg AZA1当量/kg*	0	20	40	80	160	240
虾夷扇贝毒素	1000 µg YTX当量/kg*	0	125	250	500	1000	1500
GYM, PnTX-E, PnTX-F	200 µg/kg*	0	25	50	100	200	300
SPX1	100 µg/kg*	0	12.5	25	50	100	150
PnTX-G	50 µg/kg*	0	6.25	12.5	25	50	75
OA, DTX1, DTX2, PTX2	160 µg OA当量/kg*	0	20	40	80	160	240
AZA1, 2, 3	160 µg AZA1当量/kg*	0	20	40	80	160	240
虾夷扇贝毒素	1000 µg YTX当量/kg*	0	125	250	500	1000	1500
GYM, PnTX-E, PnTX-F	200 µg/kg*	0	25	50	100	200	300
SPX1	100 µg/kg*	0	12.5	25	50	100	150
PnTX-G	50 µg/kg*	0	6.25	12.5	25	50	75

表1. 亲脂性海洋生物毒素的欧盟限制浓度和建议报出浓度。*为食用贝类

实验

UPLC条件

系统：ACQUITY UPLC
运行时间：5.0 min
色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C₁₈
2.1 × 100 mm, 1.7 μm
柱温：40 °C
样品温度：10 °C
流动相A：6.7 mM氢氧化铵水溶液
流动相B：乙腈/水 (9:1)
含6.7 mM氢氧化铵
弱清洗液：水/乙腈 (9:1)
强清洗液：乙腈/水 (9:1)
流速：0.6 mL/min
进样体积：5 μL

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初值	0.6	70	30	N/A
0.5	0.6	70	30	6
3.5	0.6	10	90	6
4.0	0.6	10	90	6
4.1	0.6	70	30	6
5.0	0.6	70	30	6

MS条件

质谱仪：Xevo TQ-S
电离模式：ESI -/+
毛细管电压：3.0 kV
源温度：150 °C
脱溶剂气温度：500 °C
脱溶剂气流量：800 L/h
MRM方法：见表2

样品提取

准备三份肉贝类全组织匀浆 (1 g)，分别用3 mL甲醇进行提取。分别加入甲醇后涡旋混合。完成涡旋混合后，将提取物在2000 g下离心5 min，并转移上清液至10 mL容量瓶中。待第三次提取完成后 (共9 mL)，加入适量甲醇至体积为10 mL。所得贝类提取原液先用0.2 μm膜过滤器过滤，然后再加标或进行分析。

为测定DTX3 (OA、DTX1和2的酯类形式) 的含量，还用2.5 M氢氧化钠对提取物进行了碱水解。再将碱性混合物在76 °C下加热40 min，并冷却至室温，最后用2.5 M盐酸中和。

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	电离模式	驻留时间 (s)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	是否提供 标准品
trinox YTX	550.4	396.4	负	0.003	75	30	否
	550.4	467.4	负	0.003	75	30	
YTX	570.4	396.4	负	0.003	75	30	是
	570.4	467.4	负	0.003	75	30	
homoYTX	577.4	403.4	负	0.003	75	30	否
	577.4	474.4	负	0.003	75	30	
45OH YTX	578.4	396.4	负	0.003	75	30	否
	578.4	467.4	负	0.003	75	30	
45OH homo YTX	585.4	403.4	负	0.003	75	30	否
	585.4	474.4	负	0.003	75	30	
COOH YTX	586.4	396.4	负	0.003	75	30	否
	586.4	467.4	负	0.003	75	30	
COOH OH YTX	593.4	396.4	负	0.003	75	30	否
	593.4	403.4	负	0.003	75	30	
COOH homo YTX	593.4	467.4	负	0.003	75	30	否
	593.4	474.4	负	0.003	75	30	
OA/DTX2	803.5	113.1	负	0.003	80	60	是
	803.5	255.2	负	0.003	80	45	
DTX1	817.5	113.1	负	0.003	80	60	是
	817.5	255.2	负	0.003	80	45	
GYM	508.2	162.2	正	0.003	60	55	是
	508.2	490.2	正	0.003	60	40	
SPX1	692.5	164.3	正	0.003	60	55	是
	692.5	444.2	正	0.003	60	40	
PnTX-G	694.5	164.3	正	0.003	60	55	是
	694.5	676.5	正	0.003	60	40	
20-Me SPX G	706.5	164.3	正	0.003	60	55	否
	706.5	346.2	正	0.003	60	40	
PnTX-F	766.5	164.3	正	0.003	60	55	是
	766.5	748.5	正	0.003	60	40	
PnTX-E	784.5	164.3	正	0.003	60	55	是
	784.5	766.5	正	0.003	60	40	
AZA3	828.5	658.4	正	0.003	35	40	是
	828.5	792.5	正	0.003	35	30	
AZA6	842.5	658.4	正	0.003	35	40	是
AZA1	842.5	672.4	正	0.003	35	40	是
AZA1/6	842.5	824.5	正	0.003	35	30	是/否
AZA4	844.5	658.4	正	0.003	35	40	否
AZA5	844.5	674.4	正	0.003	35	40	否
AZA4/5	844.5	826.5	正	0.003	35	30	否
AZA2	856.5	672.4	正	0.003	35	40	是
	856.5	838.5	正	0.003	35	30	
PTX12	874.5	213.1	正	0.003	40	30	否
	874.5	821.5	正	0.003	40	30	
PTX2	876.5	213.1	正	0.003	40	30	是
	876.5	823.5	正	0.003	40	30	
PTX11	892.5	213.1	正	0.003	40	30	否
	892.5	839.5	正	0.003	40	30	
PTX2sa	894.5	213.1	正	0.003	40	30	否
	894.5	805.2	正	0.003	40	30	

表2. 各种亲脂性海洋生物毒素的MRM通道。

单日验证

为评估开发出的UPLC/MS/MS方法的性能，在单个实验室进行了单日验证研究。评估参数如下：线性、回收率、重复性、实验室内重现性（根据重复性经验计算得出）、选择性和判断标准(CC α)。使用来自荷兰国家监测计划的空白贝类进行验证。验证所用的贝类包括贻贝（紫贻贝 *Mytilus edulis*）、牡蛎（长牡蛎 *Crassostrea gigas*）、鸟蛤（欧洲鸟蛤 *Cerastoderma edule*）和剑蛏（大西洋蛏 *Ensis directus*）。为了确保验证所用的贝类为空白样品，在研究开始之前对这些贝类进行了分析以确定是否存在表2中所示的毒素。将七份不同的贝类样品（四份贻贝、一份牡蛎、一份鸟蛤和一份剑蛏）进行提取并加标，浓度分别为验证浓度的0.0、0.5、1.0和1.5倍。

结果与讨论

用甲醇稀释各个环亚胺类毒素的储液，用以通过IntelliStart™技术获取调谐参数。IntelliStart能够自动进行仪器设置、化合物调谐和系统适用性检查，极大地简化了LC/MS系统的使用流程。各种毒素的 m/z 、锥孔电压和碰撞能量见表2。对于贵重的毒素标准品，可以用提取物加标代替原贝类组织匀浆，能节约10倍量的标准品。提取物加标这一方法因对所有相关毒素具有高提取率(>90%)而得到了验证。因此，加标提取物导致假阴性结果的可能性非常低。UPLC/MS/MS方法的开发基于之前由Gerssen等人所介绍的色谱法³。UPLC分离为各类不同毒素提供了良好的结果，仅原多甲藻酸受碱性条件的影响导致峰形有一定程度的劣化。但由于Xevo TQ-S具有较高的选择性和灵敏度，色谱峰仍能够在法规要求的灵敏度水平下轻松检出，因此这在常规应用中不会成为问题。各种毒素经五分钟UPLC分离得到的MRM色谱图如图2所示。

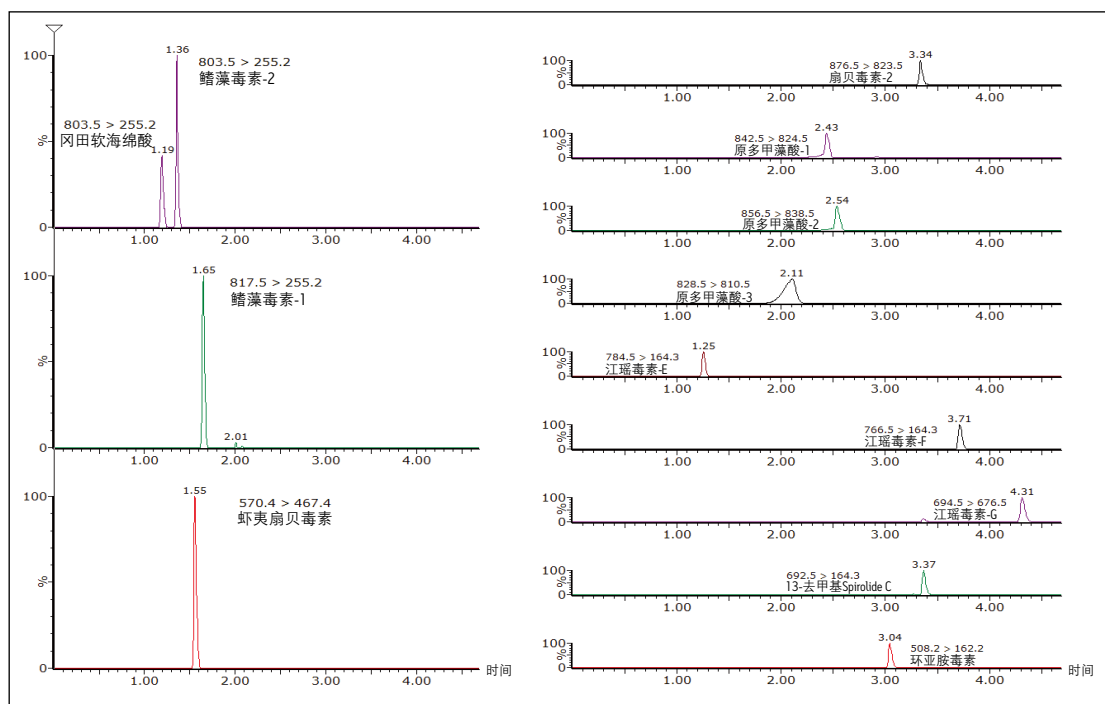


图2. 贻贝基质中1.0倍验证浓度的基质匹配标准品的MRM色谱图。

对于每种化合物，存在两个优化的MRM：一个用于确证，而另一个用于定量。两个MRM结果之间的离子比率可作为分析标准之一，用于确定生物毒素是否确认为阳性。另一个监管标准是化合物最大残留量（MRL）。使用TargetLynx处理软件能够自动标记规定范围内的参数，当这些参数超过限制浓度时，分析人员能够非常容易地观察到。

各种毒素的检测灵敏度良好，甚至在浓度为验证浓度（管制毒素的规定浓度）的0.125倍时，仍可获得大于3的信噪比。目前，部分受管制毒素的标准品仍无法获得（PTX1、45OH YTX、homoYTX和45OH homoYTX）。为测定这些毒素，MRM通道也包含在根据现有毒素标准品（即PTX2和YTX）结构而得到的方法中。此外，其它非管制亲脂性毒素的MRM也包括在内，可利用该确证方法对其进行筛选，如图2所示。这些实验中确定的方法参数现已整合到Quanpedia数据库中，此系统的所有用户均可获取该方法规程。

单日验证

在单日验证中，对不同方法的性能参数进行了评估，如线性、回收率、重复性、实验室内重现性、选择性和CCα，如表3所示。

化合物名称	验证浓度 (µg/kg)	回收率 (%)	RSDr (%)	RSDrl (%)	CCα (µg/kg)
OA	160	99	2.7	4.1	171
DTX1	160	99	7.6	12.2	192
DTX2	160	102	2.6	4.1	171
YTX	1000	100	2.5	4.0	1070
AZA1	160	98	1.3	2.1	166
AZA2	160	98	1.9	3.0	168
AZA3	160	99	1.9	3.0	168
PTX2	160	103	8.7	13.9	197
GYM	200	99	3.9	6.3	221
SPX1 ¹	100	108	14.6	23.4*	141
SPX1 ²	100	104	12.8	20.4	135
PinE	200	122	23.1	36.9*	347
PinF	200	91	5.1	8.1	224
PinG	50	102	3.9	4.8	54

表3. 单日验证试验结果。¹包含ensis基质，²不含ensis基质，*重现性较差。

对于所有毒素，基质加标校准曲线在所用的浓度范围（0.125-1.5 × PL）内表现出良好线性（ $R^2 > 0.990$ ）。各种毒素的回收率结果良好，均介于91%-104%的范围内。PnTx-E除外，其回收率达到122%。与其它分析物相比，如果是采用甲醇制备提取物，这一先洗脱的化合物（保留时间为1.2 min）易于形成甲酯，这恰好解释了回收率较预期高但重复性较差（RSDr 23.1%）的原因。据观察，所有受管制化合物的重复性良好。而在非管制毒素中，只有PnTx-E和SPX1略高于预期值。对于SPX1，出现上述情况是由蛭类基质引起的，如果去除蛭类的结果并重新计算，则重复性结果符合要求，在含蛭类基质和不含蛭类基质的情况下，重复性分别为14.6%和12.8%。若要确定一份样品是否不符合规定，那么毒素浓度应等于或高于判断限（CC α ）。判断限是这样一种浓度，在该浓度下能够以1- α 或95%（ $\alpha=5\%$ ）的概率推断样品超出允许的浓度，从而判定该样品不符合规定。

结论

通过利用UPLC系统与串联四极杆MS (Xevo TQ-S), 开发了一种用于分析贝类中管制和非管制亲脂性海洋生物毒素的快速、可靠方法。与传统的HPLC/MS/MS方法相比, 其分析速度提高了4倍, 每次分析所用时间由20 min缩短至5 min。本方法还能够满足规定的检测水平, 可用于代替小鼠生物检测法。

IntelliStart技术的应用能够使用户快速、自动化地确定最佳参数设置, 并且在可以获得更多的毒素标准品时, 这种方法还能进一步扩展。该方法(以及所有仪器设置)现已收录到Quanpedia数据库中, 以便在其他实验室中展开应用。

参考文献

1. European Commission. 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. Off J Eur Commun L 2005; 338:40-41.
2. European Commission. Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011, amending Regulation (EC) No. 2074/2005 as regards recognized testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. Off. J. Eur. Commun. 2011; L6:3-6.
3. Gerssen A, Mulder PPJ, McElhinney MA, De Boer J. Liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. J Chromatogr A. 2009; 1216:1421-1430.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, UPLC, Xevo和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。IntelliStart、QUANPEDIA和TargetLynx是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国
2013年2月 720004601ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010-5209 3866
上海: 021-6156 2666
广州: 020-2829 6555
成都: 028-6554 5999
香港: 852-2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com

