

应用纪要

利用超高效亲水作用液相色谱串联四极杆质谱法测定贝类中的麻痹性贝类毒素和河豚毒素

Andrew D. Turner, Mike J. Boundy, Tim Harwood, Simon Hird

Cefas, Cawthron研究所, Waters Corporation



摘要

ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-S质谱仪联用，能够为检测、鉴定和定量分析贝类组织中的麻痹性贝类毒素和河豚毒素提供出色的灵敏度。本应用纪要报告了快速、单分散萃取、石墨化碳-SPE HILIC-MS/MS方法测定贝类中PST和TTX的验证结果。

优势

一种简单、快速、经济有效的方法，可用于测定贝类组织样品中的亲水性海洋生物毒素，能够在分析物浓度低于欧盟最大允许限值1.5%的情况下，满足高灵敏度、高准确度、高精密度和高重现性的检测要求。

简介

麻痹性贝类毒素(PST)是海洋生物毒素中的一类天然毒素，主要为石房蛤毒素，由某些种类的藻类和细菌产生，并存在于世界各地。这些藻类在海洋中经常以高细胞密度存在，可能蓄积在贻贝、牡蛎和蛤等双壳贝类中¹。河豚毒素(TTX)是另一种被认为由海洋细菌产生的生物毒素，研究发现其会在贝类组织中蓄积²。上述毒素均为强效神经毒素，人类食用受其污染的产品后可能会发生麻痹性贝类中毒(PSP)反应，因此需要对双壳贝类软体动物进行常规的官方控制检测和最终产品检测。在欧洲，法规(EC) No.854/2004已并入法规(EC) 2017/625作为官方控制规定修订版的一部分，其要求制定一份关于贝类分类生产区域的监测计划，作为主管当局官方控制措施的一部分，用于检查贝类肉中是否存在海洋生物毒素³。所有食品经营者必须确保仅将安全且符合相关要求的食品投放市场。

商业和法规检测实验室都需要一种简单、相对多个国家/地区的规定限值具有高灵敏度、能够轻松上手并且可提供高准确度、高精密度和高重现性结果的方法。世界各地大多数法规都将各PSP毒素作为一组化合物设定其最高允许浓度(MPL)，通常为每公斤贝类肉中含有相当于800 µg的STX。欧洲法规(EC) No.853/2004规定了欧洲贝类海洋生物毒素的法规限值⁴。

在欧盟(EU)内部，PST的官方参考方法是AOAC OMA 2005.06，该方法采用柱前氧化液相色谱(LC)与荧光检测联用进行分析⁵。该方法虽然能够提供出色的法规控制水平，但相当复杂而耗时，需要对每个样品进行多次净化、衍生化和分析运行，因此需要一种快速的单次运行方法来分析PST。

近年来，整个欧洲范围的贝类中都发现了TTX，而LC-FLD方法也无法检测这类毒素。因此，人们非常关注最近开发的亲水作用液相色谱与串联质谱检测(HILIC-MS/MS)联用法⁶。HILIC-MS/MS采用超高效液相色谱(UPLC)技术，经验证可用于测定PST⁷和TTX⁸，目前正通过合作研究接受进一步验证。

本应用纪要报告了快速、单分散萃取、石墨化碳-SPE HILIC-MS/MS方法测定贝类中PST和TTX的验证结果。

实验

样品萃取和净化

将样品与1%乙酸混合并在水浴中加热，提取贝类组织匀浆。冷却并进一步混合后，对提取物进行离心，然后取一份上清液进行中和，并使用碳SPE小柱进行净化。将提取物混合后置于聚丙烯自动进样器样品瓶中用乙腈进行稀释。提取方法的详细步骤如图1所示。



图1.提取和净化详情示意图

PSP毒素和TTX的毒素一级标准品购自加拿大国家研究委员会生物毒素计量研究所或西班牙Cifga公司。经认证

的标准品包括STX di-HCl、NEO、GTX1&4、GTX2&3、GTX5、dcSTX、dcNEO、dcGTX2&3、C1&2、GTX6和TTX。按相关比例并以等体积转移各种相关物质制备混合储备液。然后在空白贻贝提取物中用混合储备液制备至少六种基质匹配校准标准品，用于外标法定量分析。

UPLC-MS/MS

UPLC系统：ACQUITY UPLC I-Class with
FTN Sample Manger

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Amide,
1.7 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm (部
件号：186004802)

预柱：ACQUITY UPLC BEH Amide
1.7 μ m, 2.1 $\times$ 5 mm
VanGuard预柱 (部件号
：186004799)

流动相A1：水/甲酸/氨水 (例如，500
mL+0.075 mL+0.3 mL)

流动相B1：乙腈/水/甲酸 (例如，700
mL+300 mL+0.1 mL)

溶剂A2：水/甲酸 (例如，200 mL+1
mL)

溶剂B2：甲醇

进样体积：2 μ L

柱温：60 $^{\circ}$ C

样品温度：4 $^{\circ}$ C

运行时间：11 min

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	% A1	% B1	曲线
0.00	0.4	2	98	–
5.00	0.4	2	98	6
7.50	0.4	50	50	6
9.00	0.5	50	50	6
9.50	0.5	2	98	6
10.0	0.8	2	98	6
10.6	0.8	2	98	6
10.61	0.4	2	98	6
11.0	0.4	2	98	1

尽管该方法已经过包含流速变化的梯度程序得到成功验证，但某些用户可能更喜欢始终使用恒定流速0.4 mL/min。请确保在每次进样之间留出足够的时间让色谱柱完成重新平衡。在分析每批样品之前对色谱柱进行活化，并在使用后进行冲洗（详见附录）。

MS仪器：Xevo TQ-S

离子源：电喷雾

极性：正离子和负离子模式

毛细管电压：+0.5 kV和-2.5 kV

脱溶剂气温度：	600 °C
脱溶剂气流速：	1000 L/h
离子源温度：	150 °C
锥孔气流速：	150 L/h
锥孔电压：	10 V
喷雾器气流：	7 bar
碰撞气体流速：	0.15 mL/min

表1汇总了MS/MS采集方法，包括正离子模式和负离子模式下采集的通道。为每种分析物使用选择性表现最佳的两个MRM通道。推荐的主要（定量）MRM在下表中以粗体显示。可使用选定的ESI-通道监测钠（以甲酸盐峰簇表示），从而清晰表明盐与先洗脱出C毒素的良好色谱分离结果。利用MassLynx软件4.1版采集数据，并用TargetLynx XS应用软件处理数据。采用Autodwell功能，按照“每个峰至少12个数据点”的标准自动设置最佳驻留时间。

类似物	ESI+通道	ESI-通道
STX	300.1 > 204.1,138.0	
NEO	316.1 > 126.1,,220.1	
dcSTX	257.1 > 126.1,222.0	
dcNEO	273.1 > 126.1,225.1	
doSTX	241.1 > 60.0,206.1	
TTX	320.1 > 302.1,162.1	
GTX2		394.1 > 351.1, 333.1
GTX3	396.1 > 298.1	394.1 > 333.1
GTX1		410.1 > 367.1,349.1
GTX4	412.1 > 314.1	410.1 > 367.1
GTX5	380.1 > 300.1	378.1 > 122
GTX6	396.1 > 316.1	394.1 > 122
dcGTX2		351.1 > 164.0,333.1
dcGTX3	353.1 > 255.1	351.1 > 333.1
dcGTX1		367.1 > 274.1,349.1
dcGTX4	369.1 > 271.1	367.1 > 349.1
C1		474.1 > 122.0,351.1
C2	396.1 > 298.1	474.1 > 122.0
C3	412.1 > 332.1	490.1 > 410.1
C ₄	412.1 > 314.1	490.1 > 392.1
钠盐*		452.7 > 133.0

表1.PSTs的MRM通道。

*钠以甲酸钠峰簇的形式进行监测。

方法验证

应执行实验室内方法验证，以证明某方法用于其目标用途。为使方法在应用于官方控制法规检测时符合要求，可通过重复分析加标贝类样品和天然产生的参比物质，评估方法性能。12个不含PST的贝类样品来自英国和新西兰，其中包括各种贻贝、牡蛎、蛤蜊、鸟蛤和扇贝。利用这些样品进行PST加标研究和方法专属性测定⁷，为评估方法测定TTX的性能，仅使用贻贝和牡蛎进行验证⁸，通过重复分析（n=32；三个月）包含已知浓度PST类似物的牡蛎组织CRM来评估方法准确度。在数天内重复分析加标样品提取物，测定在低浓度、中等浓度和高浓度毒素水平下各基质中的毒素回收率、方法精密度和重现性（表2）^{7,8}。

加标水平	C1	C2	dcGTX2	dcGTX3	GTX2	GTX3	GTX1	GTX4	GTX5	dcSTX	dcSTX	dcNEO	STX	NEO	TTX
低	0.4	1.3	8.5	4.8	17.0	9.7	22.5	5.1	2.4	1.0	24.2	4.4	24.7	24.4	20
中	1.7	5.0	33.9	19.1	68.0	38.8	89.9	20.5	9.7	4.0	96.8	17.5	98.7	97.7	100
高	4.2	12.6	84.9	47.6	170.0	96.9	224.8	51.3	24.2	10.1	241.9	43.8	246.8	244.2	200

表2.用于验证的低、中等和高浓度加标贝类提取物的浓度(nmol/kg)。

在对阳性对照实验室参比物质(LRM)进行历时五个月的重复分析后，计算实验室内的长期重现性。根据回收率数据计算出的信噪比(S/N)，计算方法灵敏度，以检测限和定量限（LOD和LOQ）表示。具体而言，LOD和LOQ分别等于信噪比为3和10时主要MRM峰的平均浓度。计算报告限(LOR)时，需将浓度四舍五入至最接近的有效数字，使主要MRM的S/N达到10，次要MRM的S/N达到3⁷。

结果与讨论

方法验证结果表明，在研究的12种贝类基质中，PST类似物和TTX的鉴定和定量分析均获得了出色的性能。图2展示了所有分析物的分离和检测结果，在分析高浓度校准标准品之后利用HILIC-MS/MS方法获得。需要重点考虑每对差向异构体的分离，包括膝沟藻毒素母体与双氨基甲酰基类似物的分离，将后者的碎片归属于源内膝沟藻毒素母体。分析不含PST的贝类提取物所得数据表明，不存在与PSP分析物具有相同MRM和保留时间特性的色谱峰。基质匹配校准标准品在所需的校准范围内表现出优异的线性($r^2 < 0.996$)。

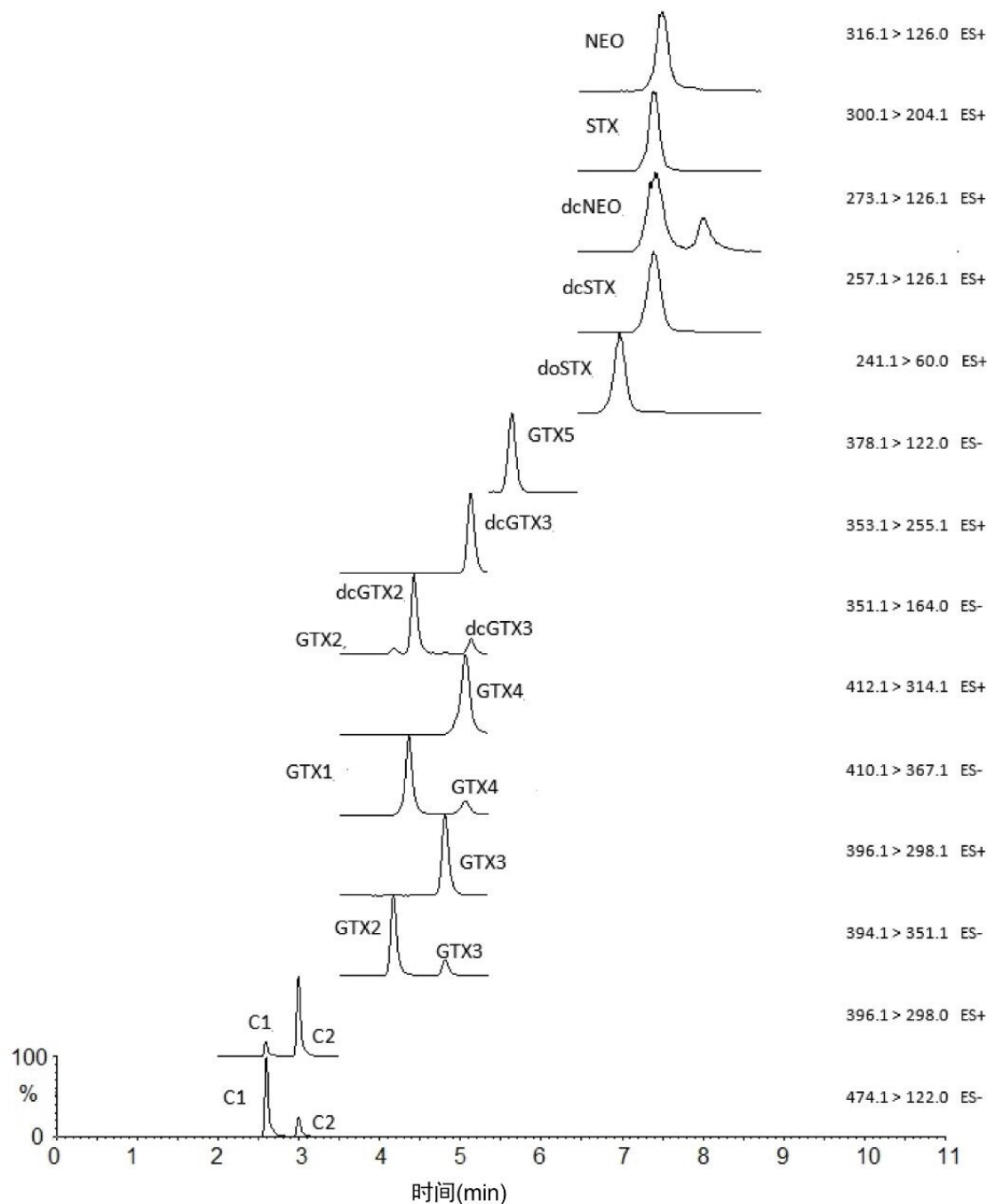


图2.显示主要通道的峰的色谱图，根据高浓度PST校准标准品分析所得（浓度见表2）。

加标样品分析中检出的MRM峰响应表现出优异的灵敏度。表3列出了在所有贝类基质中计算出的平均LOD、LOQ和LOR，它们的结果较低，表明该方法适用于检查PST是否符合欧盟规定的MPL (800 µg STX eq/kg)，并且能够用于在更低的分析物浓度（低于MPL的1.5%）下进行筛查和定量分析，大多数类似物的定量浓度可低于10 µg STX eq/kg。TTX的LOD/Q低于1.0µg/ kg，方法LOR四舍五入为2.0µg/ kg，与EFSA指导限值44 µg

g/kg相比，表现出良好的灵敏度⁹。

	C1	C2	dcGTX2	dcGTX3	GTX2	GTX3	GTX1	GTX4	GTX5	dcSTX	dcNEO	dcSTX	STX	NEO	TTX
LOD	0.03	0.09	0.69	0.51	0.59	1.19	2.25	1.57	0.16	0.29	0.56	0.02	0.16	1.19	0.25
LOQ	0.11	0.31	2.32	1.70	1.96	3.97	7.50	5.24	0.54	0.96	1.88	0.05	0.54	3.98	0.78
LOR	0.2	0.5	4.0	3.5	4.0	10	15	7.5	1.0	1.5	2.5	0.1	1.0	8.0	2.0

表3.所有贝类基质中PST类似物($\mu\text{g STX eq/kg}$)和TTX ($\mu\text{g/kg}$)的平均LOD、LOQ和LOR浓度

在两年内对PST基质CRM进行重复分析($n=45$)，结果表明该方法用于分析所选的PST类似物时，其长期准确度在可接受范围内。CRM中所含PST类似物的平均回收率百分比为85~127%，总PST平均浓度为646 $\mu\text{g STX eq/kg}$ ，相当于总PST的平均回收率为97%（表4）。

	C1	C2	dcGTX2	dcGTX3	GTX2	GTX3	GTX1
CRM值	2.46 ± 5.6	27.5 ± 3.3	-	-	29.8 ± 3.0	51.4 ± 0.2	152.6 ± 18.6
平均值	2.7 ± 0.5	24.2 ± 3.6	-	-	25.4 ± 3.1	45.5 ± 6.1	143.3 ± 17.7
%回收率	109%	88%	-	-	85%	89%	94%

	GTX4	GTX5	dcSTX	dcSTX	STX	NEO	总PST
CRM值	86.0 ± 1.4	-	-	-	81.9 ± 7.5	238.2 ± 33.2	668 ± 57.0
平均值	78.2 ± 12.2	-	-	-	103.8 ± 10.8	222.5 ± 27.6	645.7 ± 59.3
%回收率	91%	-	-	-	127%	93%	97%

表4.使用该方法在两年内($n=45$)测得的CRM中PST类似物的浓度($\mu\text{g STX eq/kg}$)以及相关的平均回收率百分比

表5汇总了在三个浓度水平下测得的方法回收率。所有浓度下的回收率非常接近，且所有贝类基质中的总PST平均浓度回收率在97~100%之间。除少数分析物外，大多数单个PST类似物和TTX的回收率在65~125%之间。12种基质的平均批次内重复性和批次间重复性也汇总于表5中。三个浓度水平之间的变异性一致，平均批次间重复性结果的HorRat值均在可接受范围内，其中所有结果的HorRat值均小于2.0，且大多数小于1.0。总体而言，结果表明该方法对大多数分析物均具有可接受的回收率和重复性。

		C1	C2	dcGTX2	dcGTX3	GTX2	GTX3	GTX1	GTX4	GTX5	dcSTX	dcSTX	dcNEO	STX	NEO	总计	TTX
低水平	平均值	45%	76%	75%	68%	81%	64%	80%	66%	78%	90%	98%	131%	118%	155%	100%	77%
	RSDr	21%	13%	16%	17%	14%	25%	16%	28%	12%	18%	18%	36%	20%	27%	16%	15%
	RSDR	28%	15%	18%	20%	17%	28%	18%	35%	15%	21%	21%	39%	22%	32%	17%	16%
	HorRat	0.60	0.37	0.59	0.60	0.61	0.94	0.68	1.07	0.41	0.51	0.80	1.18	0.84	1.24	n/a	0.34
中等水平	平均值	45%	71%	74%	63%	82%	65%	79%	59%	74%	87%	95%	124%	115%	151%	97%	75%
	RSDr	23%	11%	12%	10%	12%	11%	13%	15%	11%	13%	17%	33%	20%	26%	16%	7.5%
	RSDR	30%	12%	13%	12%	13%	12%	14%	20%	11%	18%	20%	35%	22%	30%	17%	12%
	HorRat	0.78	0.38	0.54	0.45	0.60	0.50	0.67	0.74	0.38	0.54	0.95	1.32	1.04	1.44	n/a	0.31
高水平	平均值	45%	72%	75%	64%	84%	66%	80%	60%	76%	88%	95%	123%	115%	152%	98%	70%
	RSDr	24%	12%	14%	11%	11%	11%	11%	13%	11%	14%	19%	36%	20%	26%	16%	11%
	RSDR	31%	14%	16%	14%	12%	13%	13%	18%	12%	18%	21%	38%	22%	31%	18%	13%
	HorRat	0.94	0.51	0.73	0.59	0.64	0.63	0.68	0.77	0.45	0.61	1.15	1.65	1.20	1.72	n/a	0.38

表5.在三种不同的加标浓度下，所有贝类基质中各种加标毒素的平均毒素回收率百分比以及相关联的日内和日间重复性与HorRat值

结论

ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-S质谱仪联用，能够为检测、鉴定和定量分析贝类组织中的麻痹性贝类毒素和河豚毒素提供出色的灵敏度。该方法可用于贝类食品安全检测的筛选和确认。进行石墨碳填充柱固相萃取之前，先用弱乙酸对贝类组织进行简单的一步萃取，即可为目标化合物提供良好的回收率，并有效去除共提取物和盐类，这些共提取物和盐类是质谱法分析贝类时重要的基质抑制来源。Xevo TQ-S具有出色的灵敏度和稳定性，而同样的方法也可以轻松转移至其它Xevo串联四极杆MS/MS仪器上，满足相同的性能标准，或将提取物进一步稀释后进行UPLC-MS/MS分析。

参考文献

1. Hallegraef, G. Harmful Algal Blooms: A Global Overview.in *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Hallegraef, G et al (Eds), 2003, UNESCO, Paris, France, pp 25–49.
2. Turner, A.; et al.Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013–2014.*Eurosurveillance* 2015, 20 (2):pii=21009.
3. Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending

Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC (Official Controls Regulation).

4. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*. L139, p55.
5. Regulation (EC) No 2074/2005 of 5th December 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. L 338 p27.
6. Boundy, M.; et al. Development of a sensitive and selective HILIC-UPLC-MS/MS method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitic carbon solid phase extraction. *J. Chromatogr. A* 2015, 1387, 1–12.
7. Turner, A.; 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. *Journal of AOAC International* 2015, 98 (3), 609–621.
8. Turner, A.; et al. Single laboratory validation of a LC-MS/MS method for quantitation of Tetrodotoxins in mussels and oysters. *Journal of AOAC International* 2015, 100 (5), 1–14.
9. EFSA CONTAM Panel. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J.* 2017; 15:4752.

附录

时间 (min)	流速 (mL/min)	% A1	% B1	曲线
0.00	0.3	50	50	–
4.00	0.3	50	50	6
6.00	0.5	50	50	6
15.0	0.5	50	50	6
16.0	0.5	2	98	6
17.0	0.4	2	98	6
17.5	0.4	2	98	6

色谱柱活化

时间 (min)	流速 (mL/min)	% A2	% B2	曲线
0.00	0.3	100	0	–
4.00	0.3	100	0	6
8.00	0.3	0	100	6
9.0	0.3	0	100	6
11.0	0.6	0	100	6
15.0	0.6	0	100	6

使用后冲洗色谱柱

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S <<https://www.waters.com/10160596>>

MassLynx质谱软件 <<https://www.waters.com/513164>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720006709ZH, 2019年10月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.