

# 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定 贝类中3种短裸甲藻毒素

严忠雍<sup>1,2</sup>, 张小军<sup>1</sup>, 陈思<sup>1</sup>, 李佩佩<sup>1</sup>, 龙举<sup>1</sup>, 张虹<sup>2\*</sup>

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316021; 2. 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018)

**摘要:** 建立了同时测定贝类中3种短裸甲藻毒素的超高效液相色谱-串联质谱法。样品采用丙酮提取、C<sub>18</sub>固相萃取柱净化; 以5 mmol/L 乙酸铵(含0.1% 甲酸)-乙腈为流动相, ACQUITY™ UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱进行分离, 在多反应监测模式下进行测定, 外标法定量。结果表明, 3种目标物在1.0~100 μg/L 质量浓度范围内线性良好, 相关系数( $r^2$ )不小于0.996, 方法定量下限为3.0 μg/kg, 回收率为80.0%~87.5%, 相对标准偏差为1.3%~5.4%。该方法前处理简单, 灵敏度高, 稳定性好, 适用于贝类中3种短裸甲藻毒素的同时测定。

**关键词:** 固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS); 贝类; 短裸甲藻毒素

**中图分类号:** O657.7; F762.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)02-0224-05

## Determination of Three Brevetoxins in Shellfish by Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry with Solid Phase Extraction

YAN Zhong-yong<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-jun<sup>1</sup>, CHEN Si<sup>1</sup>, LI Pei-pei<sup>1</sup>, LONG Ju<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>2\*</sup>

(1. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China; 2. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** An ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (UPLC – MS/MS) method was developed for the determination of 3 kinds of brevetoxins (BTX) in shellfish. The samples were extracted with acetone, and purified on a C<sub>18</sub> solid phase extraction column. The separation of the analytes was performed on an ACQUITY™ UPLC BEH C<sub>18</sub> column with 5 mmol/L ammonium acetate containing 0.1% formic acid – acetonitrile as mobile phase, and detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The external standard method was used for quantitation. Results showed that there were good linear relationships for BTXs in the range of 1.0 – 100 μg/L with correlation coefficients ( $r^2$ ) not less than 0.996. The quantitation limits of the method were 3.0 μg/kg. The recoveries for the brevetoxins ranged from 80.0% to 87.5% with relative standard deviations of 1.3% – 5.4%. The method was suitable for the determination of brevetoxins in shellfish with advantages of simple processing, high sensitivity and good stability.

**Key words:** solid phase extraction; ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); shellfish; brevetoxin

短裸甲藻毒素 (Brevetoxin, BTX) 是一类聚醚类的脂溶性藻毒素, 主要是由双鞭甲藻及裸甲藻属部分藻类产生的赤潮藻毒素<sup>[1-3]</sup>。短裸甲藻毒素是由10~11个环状结构组成的大环多醚类物质, 为较强的钠通道激活毒素, 可与钠通道受体靶部位VI结合, 开启细胞膜上的钠通道, 使细胞膜对钠离子的通透性增强, 活化电压门控钠通道, 进而产生较强的细胞去极化作用, 引起神经肌肉兴奋的传导发生改变, 因此亦被称为神经性贝类毒素<sup>[4]</sup>。短裸甲藻毒素具有热稳定性, 其在贝类等生物体中的消除半衰期长达数十天甚至数月, 加热、微波等常规加工方式因降低了水产品的含水量而导致毒素浓度升高, 会使食用者产生恶心、呕吐、腹泻、麻痹、昏迷等中毒症状<sup>[5-6]</sup>。因此, 有必要加强水产品中短裸甲

收稿日期: 2018-08-22; 修回日期: 2018-09-29

基金项目: 浙江省科技计划项目(2017C37009)

\* 通讯作者: 张虹, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: hongzh1316@mail.zjgsu.edu.cn

藻毒素的检测工作, 以利于海洋生态环境监测和水产品质量安全保障。

目前, 短裸甲藻毒素的分析方法主要有小鼠生物法<sup>[7]</sup>、细胞毒性实验<sup>[8]</sup>、放射免疫法<sup>[9]</sup>、酶联免疫法<sup>[10-11]</sup>和液相色谱-串联质谱法<sup>[12-15]</sup>。其中, 小鼠生物法发展最早、应用最广泛, 但无法精确定量; 酶联免疫法检测时间短, 但易出现交叉反应; 而高效液相色谱-串联质谱法因分离能力强、灵敏度高而成为短裸甲藻毒素的首选分析方法。贝类除了含有脂肪、蛋白质、色素等杂质外, 通常还含有分泌黏液, 导致液相萃取过程中常出现乳化现象, 同时也使一部分目标物被吸附, 造成回收率低。因此, 液相色谱-串联质谱法测定贝类中短裸甲藻毒素主要以固相萃取法为前处理净化手段, 包括硅胶 SPE 柱<sup>[13]</sup>、聚合物 SPE 柱<sup>[15]</sup>等。硅胶 SPE 柱虽能有效净化贝类样品, 但仅测定了 BTX-C; 聚合物 SPE 柱能同时测定 3 种短裸甲藻毒素, 但前处理耗时长。本实验以 BTX 类的基础结构 BTX-A 和 BTX-B, 以及 BTX 类中毒性最强的 BTX-C 为研究对象, C<sub>18</sub>固相萃取柱为净化手段, 优化了样品提取及萃取条件, 缩短了前处理时间, 并结合液相色谱-串联质谱的高灵敏性和精确性, 应用于贝类中 BTX-A、BTX-B、BTX-C 3 种短裸甲藻毒素的同时测定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

ACQUITY™ I-Class 超高效液相色谱 Xevo TQ-S 质谱仪(美国 Waters 公司); SPE-24 固相萃取装置(美国 Supelco 公司); MS3 Digital 旋涡混合器(德国 IKA 公司); Centrifuge5810 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); N-EVAP-112 氮吹仪(美国 Organomation 公司); Sep-Pak Vac C<sub>18</sub>固相萃取柱(6 mL/1 000 mg, 美国 Waters 公司)。

BTX-A、BTX-B、BTX-C 标准品(均为 100 μg, 台湾 Algalchem 公司); 甲酸、乙酸铵(色谱纯, 美国 Sigma 公司); 乙腈、甲醇、丙酮(色谱纯, 德国 Merck 公司); 实验用水为经 Millipore 系统处理的超纯水。

BTX 混合标准储备液(10 mg/L): 用甲醇溶解 BTX-A、BTX-B、BTX-C 标准品, 混合后定容至 10 mL, 于 -20 °C 保存, 有效期 6 个月。

BTX 混合标准使用液(1 mg/L): 取 1 mL BTX 混合标准储备液, 用甲醇稀释配成 1 mg/L 的混合溶液, 于 -20 °C 保存, 有效期 1 个月。

### 1.2 样品前处理方法

称取 1.00 g(准确至 0.01 g)均质的待测样品, 置于 15 mL 离心管中, 加入 4 mL 丙酮, 涡旋振荡 2 min, 常温下超声振荡 10 min, 以 5 000 r/min 离心 6 min, 将上清液转移至 50 mL 离心管后加入 16 mL 水, 超声振荡 0.5 min, 待净化。

移取上述混合液加至已用 10 mL 20% (体积分数)丙酮水溶液活化的 C<sub>18</sub>固相萃取柱。上样结束后, 用 5 mL 20% (体积分数)甲醇水溶液淋洗, 抽干柱内残留液, 并弃去全部流出液, 再用 3 mL 乙腈洗脱, 洗脱液收集于 15 mL 离心管中, 旋涡振荡 1 min, 过 0.22 μm 有机相微孔滤膜后, 待分析。

### 1.3 色谱及质谱条件

色谱条件: ACQUITY™ UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 进样体积为 10 μL; 样品室温度为 4 °C; 柱温为 40 °C; 流速为 0.2 mL/min; 流动相: A 为含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液, B 为乙腈。梯度洗脱: 0~0.5 min, 50% A; 0.5~1.5 min, 50%~35% A; 1.5~9.0 min, 35% A; 9.0~10 min, 35%~50% A; 10~11 min, 50% A。

表1 短裸甲藻毒素的质谱参数

Table 1 Mass parameters of BTX

Compound	Retention time (min)	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Collision energy (eV)
BTX-A	8.20	867.5	849.5*, 831.5	12, 18
BTX-B	6.92	895.5	877.5*, 859.5	15, 18
BTX-C	4.66	897.5	725.5*, 751.5	18, 20

\* quantitative ion

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子扫描 (ESI<sup>+</sup>); 检测方式: 多反应监测模式 (MRM); 毛细管电压: 3.0 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气温度: 450 °C; 锥孔气流量: 150 L/h; 脱溶剂气流量: 600 L/h; 短裸甲藻毒素的母离子及子离子等质谱条件如表 1 所示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 液相色谱条件的优化

BTX-A、BTX-B、BTX-C 属亲脂性化合物，其结构相似，常规的  $C_{18}$  色谱柱即能满足 BTX 液相色谱分析的需要。对 3 种 BTX 标准溶液进行色谱分离时发现，以含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液为水相，乙腈为有机相时，采用 50 mm 长的  $C_{18}$  色谱柱在 5 min 内可有效分离 3 种分析物，且峰形尖锐对称；但采用相同条件对样品进行分析时，目标峰无法有效积分，信噪比低。因此改用长色谱柱，延长分析时间，并调试流动相的最佳梯度，最终确定最佳色谱分离条件如“1.3”所示。在此条件下，目标峰可在 11 min 内实现分离，且峰形尖锐，基线平稳(图 1)。

### 2.2 进样试剂的优化

在液相色谱分析领域，通常采用初始流动相溶解分析物以去除溶剂效应，但 3 种 BTX 均为脂溶性毒素，分析时需溶于乙腈中，因此不能采用初始流动相。对比了 3 种 BTX 在不同体积分数乙腈中的响应值，结果显示，在 0~50% 范围内随着乙腈体积分数的增大，3 种 BTX 的响应值显著增强；乙腈超过 50% 后响应值增加缓慢，乙腈比例为 100% 时达到最大值。因此，选择纯乙腈为定容试剂，未将固相萃取洗脱液(3 mL 乙腈)浓缩，而选择直接上机分析；不仅提高了目标物响应值，同时省去了浓缩步骤，缩短了前处理时间，提高了实验效率。

### 2.3 质谱条件的确定

比较了正、负离子模式下 3 种 BTX 的响应信号，并对锥孔温度、脱溶剂气流量等质谱参数进行优化。结果表明：3 种 BTX 在  $ESI^+$  模式下的响应值较  $ESI^-$  模式高，可产生稳定的  $[M+H]^+$  特征离子，将其确定为分析物的准分子离子峰，并优化毛细管电压和锥孔电压。通过对准分子离子峰的二级质谱裂解进行分析，根据碎片离子的丰度强弱，对定量定性离子和碰撞能量进行优化，最终确定的定量定性离子和碰撞能量见表 1，3 种 BTX 的二级离子质谱图见图 2。

### 2.4 提取条件的优化

分别比较了丙酮、甲醇、乙腈 3 种提取剂对 BTX 的提取效率。结果表明，甲醇虽能沉淀蛋白质，但对 3 种 BTX 的提取效率较低；乙腈为极性非质子溶剂，对 3 种 BTX 的提取率较高，但乙腈毒性较大；而丙酮对 3 种 BTX 的提取率最高，因此对丙酮用量进行了进一步优化，最终选择 4 mL 丙酮作为提取剂。

### 2.5 固相萃取条件的优化

BTX 结构中大量存在的碳氢键能与  $C_{18}$  官能团上的碳氢键产生非极性作用力，适合采用  $C_{18}$  固相萃取柱富集净化。提取剂丙酮的非极性作用力较大，易与固相萃取柱的官能团相结合，导致丙酮中的 BTX 不能有效富集，因此将 4 mL 丙酮与 16 mL 水混合作为上样液，以增强上样液的极性，提高目标物的富集效率。实验选择 20% 甲醇水作为淋洗液，能有效去除柱内的残留杂质，且不影响目标物的化学状态。根据洗脱液和目标物的极性，分别考察了采用乙腈、甲醇作为洗脱液时目标物的分离效果。结果表明：甲醇虽能有效洗脱 BTX，但色谱基线干扰较大，信噪比低；而用 3 mL 乙腈即能有效洗脱目标物，且色谱基线较稳，信噪比和灵敏度较高，因此选择 3 mL 乙腈为洗脱液。

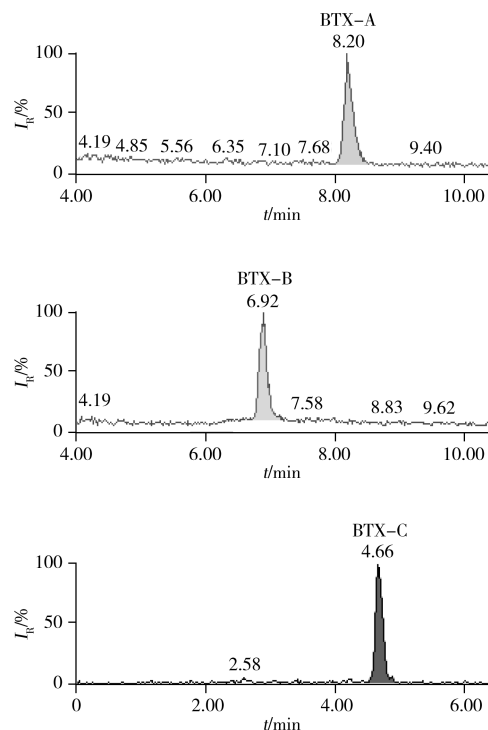


图 1 液相色谱优化条件下的贻贝样品 MRM 图  
Fig. 1 MRM chromatograms of mussel sample with optimized liquid phase conditions

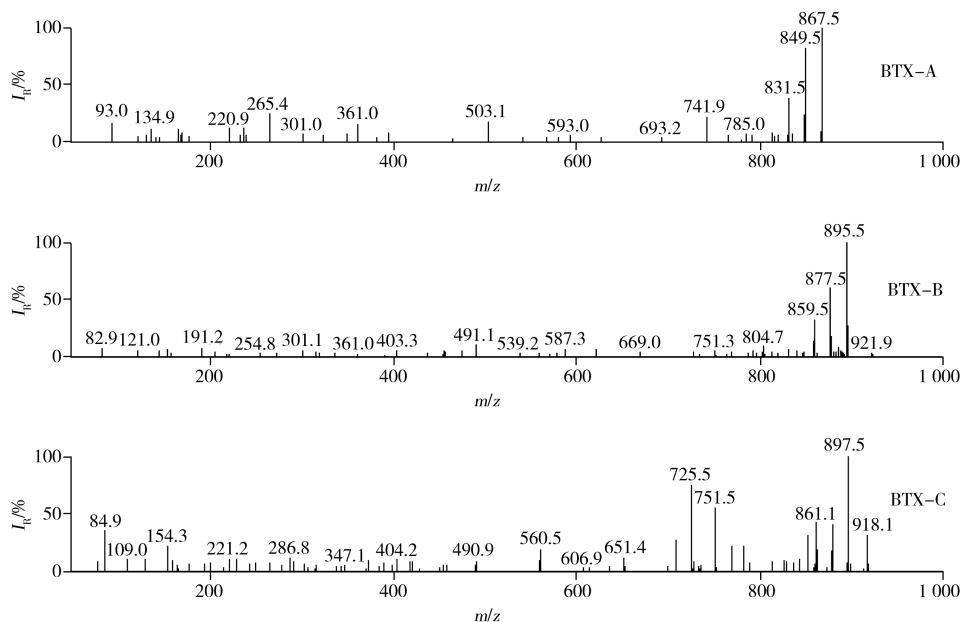


图2 3种BTX的二级离子质谱图

Fig. 2 Secondary ion mass spectra of 3 BTX

## 2.6 方法的基质效应、线性关系及定量下限

基质效应(Matrix effect, ME)是指基质中除分析物以外的其他成分对分析物测定值的影响。实验通过在处理过的空白基质中添加BTX标准溶液,以空白基质中BTX的响应值与纯溶剂中BTX的响应值之比为ME值,计算得到本方法的ME值为94.6%~103.5%,表明不存在明显的基质效应影响。

移取适量3种BTX混合标准使用液,配制质量浓度分别为1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100  $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液,以BTX的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,制作标准曲线。3种BTX均在1.0~100  $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系,相关系数( $r^2$ )为0.996~0.997。以3倍信噪比确定本方法的检出限(LOD)为1.0  $\mu\text{g/kg}$ ,以10倍信噪比确定本方法的定量下限(LOQ)为3.0  $\mu\text{g/kg}$ 。

## 2.7 方法回收率与相对标准偏差

准确称取1.00 g阴性贻贝、缢蛏和青蛤样品,添加5.0、20、50  $\mu\text{g/kg}$  3个浓度水平的3种BTX标准溶液,每个浓度水平重复6次,计算方法回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明,在3个加标水平下3种BTX的平均回收率为80.0%~87.5%;RSD为1.3%~5.4%(见表2)。

表2 3种短裸甲藻毒素的平均回收率及相对标准偏差( $n=6$ )Table 2 Average recoveries and RSDs for 3 BTX( $n=6$ )

Sample	Compound	Added( $\mu\text{g/kg}$ )	Average recovery(%)	RSD(%)
Mussel	BTX-A	5.0, 20, 50	82.6, 82.4, 83.8	3.0, 2.7, 3.0
	BTX-B	5.0, 20, 50	85.9, 83.6, 84.2	3.1, 2.8, 3.3
	BTX-C	5.0, 20, 50	84.3, 82.5, 82.9	4.2, 5.2, 3.8
Sinonovacula constricta	BTX-A	5.0, 20, 50	82.9, 83.4, 81.6	3.0, 2.7, 3.8
	BTX-B	5.0, 20, 50	85.4, 86.7, 85.5	3.5, 2.3, 1.3
	BTX-C	5.0, 20, 50	82.6, 85.2, 86.2	3.7, 4.3, 3.0
Cyclina sinensis	BTX-A	5.0, 20, 50	81.2, 82.2, 80.0	3.6, 4.0, 1.9
	BTX-B	5.0, 20, 50	82.8, 83.2, 84.8	2.2, 3.8, 2.4
	BTX-C	5.0, 20, 50	84.0, 86.8, 87.5	5.4, 3.2, 3.8

## 2.8 实际样品分析

为确证方法的有效性和实用性,采用本方法对养殖和海捕的青蛤、泥蚶、贻贝、牡蛎、扇贝、缢蛏6个品种共30份贝类样品进行检测。结果显示,被测样品中均未检出此3种BTX。

## 3 结论

本文以丙酮为提取剂,建立了固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱定量分析贝类中3种BTX的

方法。在最佳实验条件下,方法检出限为 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量下限为 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,平均回收率为 80.0%~87.5%,RSD 为 1.3%~5.4%。该方法稳定可靠,灵敏度高,满足目前对 BTX 的检测需要,具有推广应用价值,有利于海洋生态环境监测和污染源的调查追踪。

#### 参考文献:

- [1] Chen C Y, Feng S, Ding X Q. *Acta Chim. Sin.* (陈常英,冯珊,丁晓琴.化学学报), **2000**, 58(7): 799-804.
- [2] Bie C C, Li F M, Li Y Y, Wang Z Y. *Environ. Sci.* (别聪聪,李锋民,李媛媛,王震宇.环境科学), **2012**, 33(2): 442-447.
- [3] Li F M, Zhao W, Li Y Y, Tian Z J, Wang Z Y. *Environ. Sci.* (李锋民,赵薇,李媛媛,田志佳,王震宇.环境科学), **2012**, 33(1): 233-238.
- [4] Li Y Y. *The Effect of Allelochemicals on Brevetoxin B Content of Gymnodinium breve*. Qingdao: Ocean University of China (李媛媛.化感物质对短裸甲藻产生毒素的影响.青岛:中国海洋大学), **2012**.
- [5] Zhang J H, Zhou Y, Zhang Y Y, Li Z H, Wang X R, Liu J Q. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*(张俊辉,周玉,张媛媛,李兆辉,王心蕊,刘静秋.畜牧与兽医), **2009**, 41(10): 5-7.
- [6] Tian R Y. *Screening and Preliminary Application of a ss DNA Aptamer for Detection of Brevetoxin - 2*. Changchun: Jilin University(田瑞云.短裸甲藻毒素-2适配子的制备及在检测中的初步应用.长春:吉林大学), **2014**.
- [7] GB/T 5009.261-2016. *Determination of Neurotoxic Shellfish Poisons in Shellfish*. National Standards of the People's Republic of China(贝类中神经性贝类毒素的测定.中华人民共和国国家标准).
- [8] Dickey R W, Plakas S M, Jester E L E, El Said K R. *Harmful Algae*, **2002**, 1(3): 300-302.
- [9] Wu H Y, Guo M M, Tan Z J, Li Z X, Zhai Y X. *Chinese Fishery Quality and Standards*(吴海燕,郭萌萌,谭志军,李兆新,翟毓秀.中国渔业质量与标准), **2011**, 1(1): 31-39.
- [10] Wang L Q. *Preparation of Monoclonal Antibody Against Brevetoxin and Establishment of ELISA Detected Method*. Changchun: Jilin University(王里奇.短裸甲藻毒素单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立.长春:吉林大学), **2011**.
- [11] Zhou Y, Pan F G, Li Y S, Zhang Y Y, Zhang J H, Lu S Y, Ren H Y, Liu Z S. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(8): 2744-2747.
- [12] Hua Y S, Cole R B. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(2): 376-383.
- [13] Nozawa A, Tsuji K, Ishida H. *Toxicon*, **2003**, 42(1): 91-103.
- [14] Ishida H, Nozawa A, Hamano H, Naoki H, Fujita T, Kaspar H F, Tsuji K. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45(1): 29-33.
- [15] Shin C, Hwang J Y, Yoon J H, Kim S H, Kang G J. *Food Control*, **2018**, 91(9): 365-371.

(责任编辑:丁岩)