

文章编号:1000-0615(2008)06-0950-07

## 液相色谱-串联质谱法测定贝类毒素软骨藻酸的残留

宋琍琍<sup>1</sup>, 张海琪<sup>1</sup>, 侯镜德<sup>2</sup>, 何欣<sup>1</sup>

(1. 浙江省水产质量检测中心, 浙江 杭州 310012;

2. 浙江大学分析测试中心, 浙江 杭州 310027)

**摘要:** 建立了液相色谱-串联质谱测定贝类毒素软骨藻酸残留的检测方法。样品经50%甲醇提取, LC-SAX柱净化, 然后选用电喷雾离子源(ESI), 在正离子、多反应监测方式(MRM)模式下进行定性, 以外标法进行定量。该方法的定量限为 $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 工作曲线的线性范围为 $0.02\sim 8.00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在添加浓度为 $0.02\sim 4.00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 内, 软骨藻酸的平均回收率为80.2%~92.2%, 相对标准偏差(RSD)为4.42%~9.46%。

**关键词:** 贝类; 软骨藻酸; 液相色谱串联质谱; 多反应监测

**中图分类号:** O 657.7

**文献标识码:** A

软骨藻酸(Domoic acid, DA)是一种由硅藻属中的 *Pseudonitzschia* 所产生的氨基酸型神经毒素<sup>[1]</sup>, 同时又是记忆缺失性贝类毒素(amnesic shellfish toxin, 简称 ASP)的主要成分。其分子量为311.4 u, 属氨基酸类化合物, 呈现典型的酸性氨基酸特征, 易溶于水。当硅藻大量繁殖时会产生毒素, 并会在某些水产生物如贻贝、扇贝、文蛤等中蓄积, 再经过海洋食物链影响相关的高等动物。于1989年加拿大最先报道了首起因食用受软骨藻酸污染的贻贝而导致3人死亡的事件, 在此以后又发生多起因海洋受软骨藻酸污染而导致群体性动物死亡<sup>[1-2]</sup>。因此软骨藻酸也就成为海洋环境污染监测和公共水产品安全监测的一个重要指标。美国食品药品监督管理局(FDA)等将其作为主要监测的海洋生物毒素项目, 同时限定其在水产品中的安全限量为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[3]</sup>。有关软骨藻酸的测定方法主要为色谱测定方法, 如液相色谱法<sup>[3-5]</sup>、液相色谱柱后衍生法<sup>[2]</sup>、液质联用法<sup>[6-8]</sup>、毛细管电泳法<sup>[9]</sup>等, 目前尚未有液相色谱-串联质谱方法的报道。本研究应用液相色谱-串联质谱技术建立了水产品中软骨藻酸残留的测定方法, 既可定量又可定性测定,

对提高我国水产品质量安全检测及海洋环境监测技术具有重要意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

API3000型液相色谱-串联四极杆质谱仪, 配有 Agilent1100型液相色谱仪、自动进样器、电喷雾离子源(美国应用生物系统公司); 固相萃取装置(美国 Supelco 公司); 纯水器(法国 Milli-Q 公司)。

标准物质软骨藻酸(纯度90%, Sigma Chemical, Co.); 甲醇、乙腈为色谱纯; 3 mL LC-SAX柱(Supelco, USA);  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸溶液(pH 3.2); 40.4 g 一水柠檬酸和 14.00 g 柠檬酸三铵溶解于 400 mL 水中, 调节 pH 成 3.2, 加入 50 mL 乙腈, 完全混合溶解后, 以水定容至 500 mL。软骨藻酸样品添加溶液: 称取固体软骨藻酸以乙腈/水(1:9, v/v)配成约  $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溶液。

#### 1.2 样品

实验用贝类于2007年3月-11月采自浙江沿海, 由中心实验室提供。鲜活样品运至实验室后用水冲洗干净, 撬开贝壳后取内脏团进行匀浆处理, 四分法制样后保存于 $-75^\circ\text{C}$ 低温冰箱中

收稿日期: 2008-05-07

资助项目: 浙江省重点科研社会发展项目(2007C23081)

作者简介: 宋琍琍(1963-), 女, 浙江杭州人, 高级工程师, 从事水产品质量安全、加工技术的研究。E-mail: songlili8168@163.com

备用。

### 1.3 样品前处理

**提取** 称取均质样品 5.00 g 于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 50% 甲醇水溶液,旋涡混匀  $1 \text{ min} \cdot \text{L}^{-1}$ ,超声提取  $5 \text{ min} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $15 \text{ min} \cdot \text{L}^{-1}$ ,使固液两相彻底分离。移取上清液至 25 mL 容量瓶中,再用 5 mL 50% 甲醇水溶液重复提取残渣 2 次,上清液并入容量瓶中,以水定容至刻度,混匀。

**净化** 取上述粗提取液 5.0 mL 移入经 6 mL 甲醇,3 mL 水和 3 mL 50% 甲醇水溶液处理过的 LC-SAX 柱上,以滴速流出后再依次用 5 mL 10% 乙腈水溶液,0.5 mL 柠檬酸洗脱液以每秒 1 滴的速度过柱,弃去流出液,最后用 2 mL 柠檬酸洗脱液洗脱吸附在柱上的软骨藻酸,供 HPLC-

MS/MS 测定。

### 1.4 液相色谱-串联质谱测定

**色谱条件** 色谱柱: Zorbax XDB C<sub>18</sub> 柱 (2.1 mm × 150 mm × 5 μm); 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C; 流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.1% 乙酸水溶液, A<sub>v</sub>: B = 20 + 80, 流速为  $250 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 保持 6 minL。

**质谱条件** 离子化模式为 + ESI, 质谱分辨率为单位分辨率, 电喷雾电压 (IS) 为 +5 250 V, 辅助气流速 (AUX) 为  $7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离子源温度 (TEM) 为 475 °C, 去簇电压 (DP) 为 100 V, 聚焦电压 (FP) 为 325 V, 雾化气 (NEB): 8, 气帘气 (CUR): 11, EP: 8, 碰撞气 (CAD): 10, CXP: 17, 其它条件见表 1。

表 1 DA 的参考保留时间和优化质谱条件

Tab. 1 LC reference retention time and optimized parameters of MS-MS conditions for DA

| 名称<br>name | 参考保留时间<br>reference retention time<br>(min) | 母离子<br>parent ion<br>(m/z) | 子离子<br>daughter ion<br>(m/z) | 碰撞能量<br>CE(V) | 相对丰度比*<br>relative intensity ratio<br>(%) |
|------------|---|----------------------------|------------------------------|---------------|---|
| DA         | 2.56  | 312.1                      | 161.4                        | 33            | 18.9                                      |
|            |   |                            | 266.4(定量用)                   | 22            | 100                                       |

注: \* 指定性离子对的峰面积与定量离子对的峰面积之比

Notes: \* means the ratio of area of qualitative ion to area of quantitative ion

## 2 结果与讨论

### 2.1 HPLC-MS/MS 测定参数的选择

用 DA 的标准溶液以流动注射的方式在正离子模式下进行母离子全扫描, 确定 DA 的  $m+1$  离子为  $m/z$  312.1。然后以所得的  $m/z$  数为母离子, 对其子离子进行全扫描 (图 1)。从 DA 子离子扫描图中选取两个特征性子离子 312.1/266.4 和 312.1/161.4, 进行多反应监测 (MRM), 优化去簇电压 (DP)、聚焦电压 (FP)、碰撞气 (CAD)、碰撞能量 (CE) 等质谱参数, 其中以 CE 对离子对的丰度影响最大 (图 2)。接着用 FIA 方式优化雾化气 (NEB)、气帘气 (CUR)、电喷雾电压 (IS)、辅助气温度 (TEM) 等参数, 从而获得上述 LCMSMS 测定条件。

### 2.2 样品前处理方法的比较

在样品提取过程中, 选择适合的提取溶液既能提取出目标化合物, 又能消除一些不必要的干

扰物。根据软骨藻酸的结构特性, 我们研究了不同配比的甲醇水溶液对贝类中软骨藻酸的提取影响, 发现纯甲醇提取会导致样品中蛋白质的沉淀, 使软骨藻酸被沉淀包裹而不能释放到提取液中, 减低了回收率; 而用纯水提取则导致大量水溶性杂质, 如组织纤维、水溶蛋白等进行提取液中, 给净化工作带来很大难度。参考卫峰等<sup>[5]</sup>的方法, 我们选用了 50% 甲醇水溶液作为提取液, 加标回收率在 70% 以上。

由于贝类样品基体复杂, 提取液中往往含有一些蛋白质、颗粒、组织纤维等, 这对色谱柱、分离等会产生一定的影响, 因此需要选择进行合适的净化方式。固相萃取净化方式是目前最为常用的净化方式之一, 本实验根据以往的经验, 选用 LC-SAX 柱进行净化方式的优化, 结果表明 0.5 mL 柠檬酸洗脱液没有将软骨藻酸洗脱下来, 而用 1 mL 柠檬酸洗脱液则有软骨藻酸洗脱下来, 增加柠檬酸洗脱液的体积至 2.5 mL 后也未见结果有

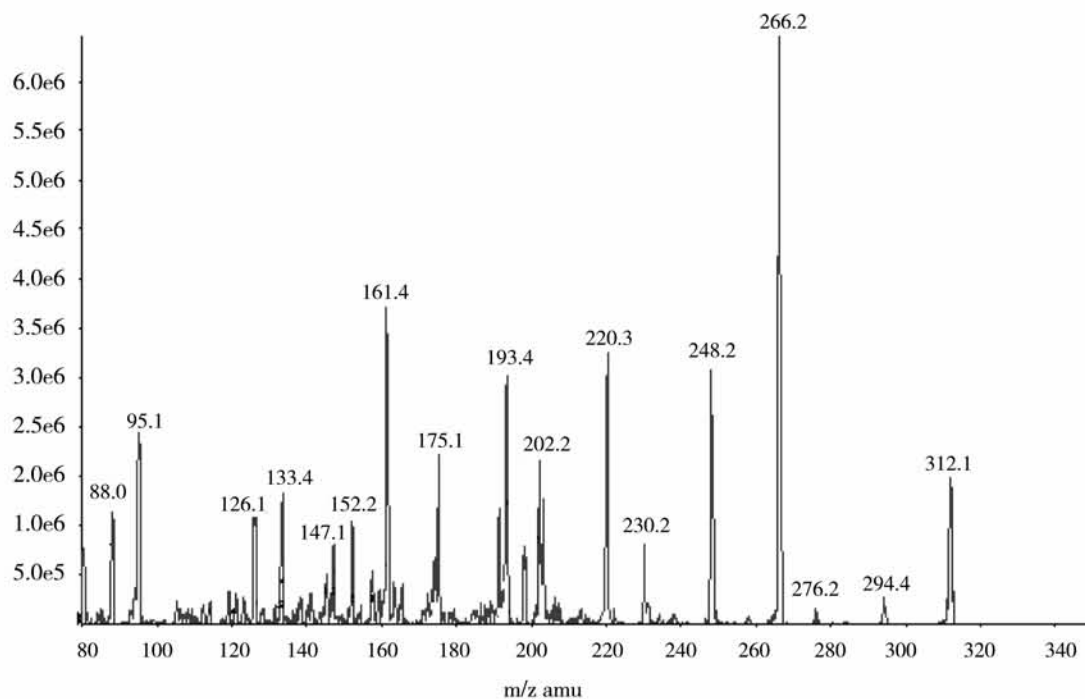


图1 软骨藻酸DA的子离子扫描图  
Fig. 1 Daughter ion scan spectrum of DA

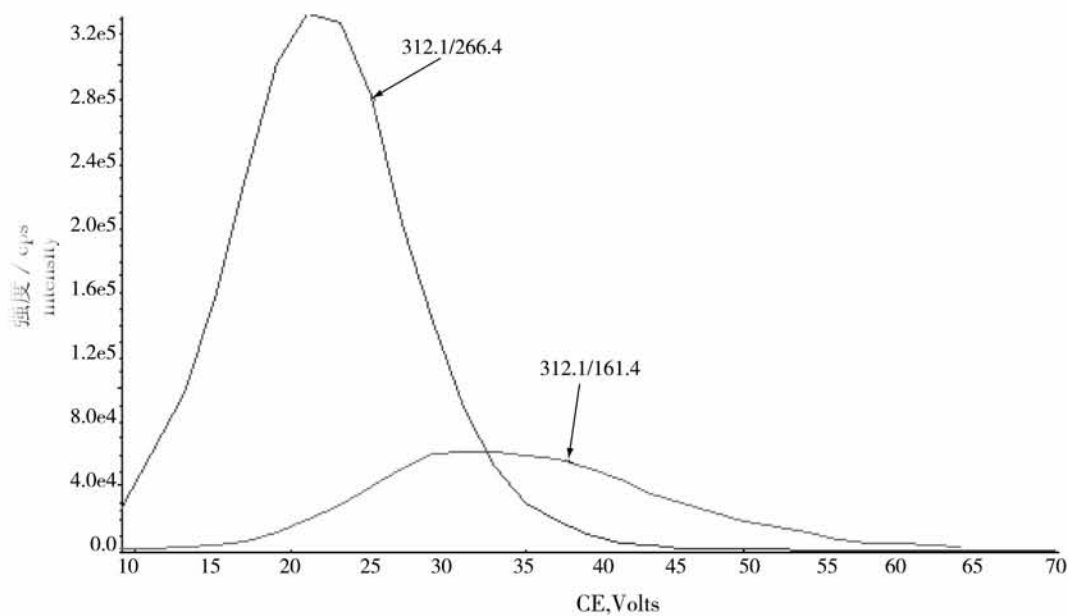


图2 碰撞能量CE对DA子离子峰强度的影响  
Fig. 2 Effect of CE on the intensity of DA daughter ions

增多现象,因此弃去最先的0.5 mL 柠檬酸洗脱液后,接2 mL 洗脱液就可。

### 2.3 液相色谱—串联质谱图

在上述测定条件下,软骨藻酸DA标准品、空

白贝类样品及空白贝类样品添加标准品后测定的典型色谱图见图3~5。将空白水产样品质谱图与空白样品加入DA得到的质谱图进行比较,表明LC-SAX柱能有效去除基体的干扰,贝类样品

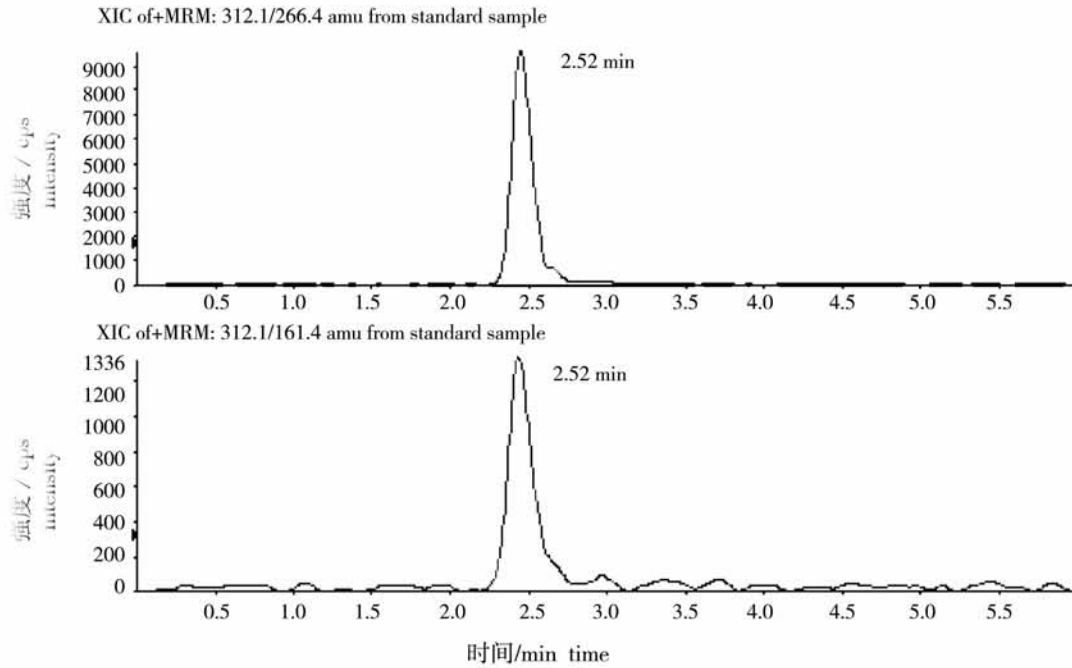
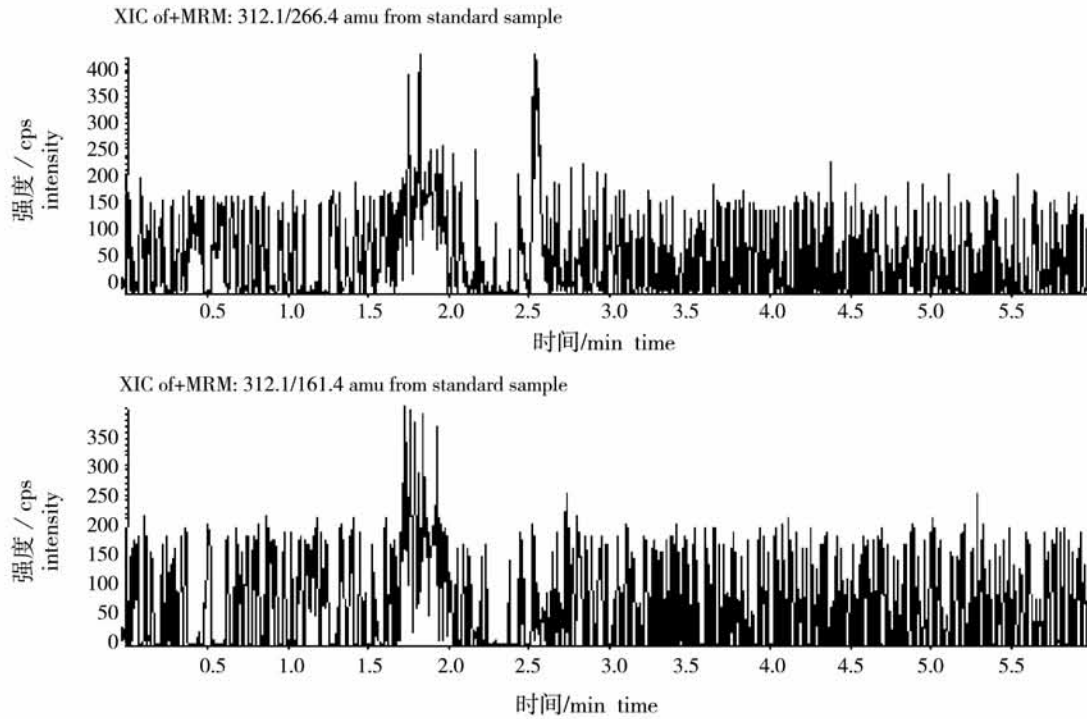
图3 DA标准溶液( $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的质谱图Fig. 3 MRM chromatogram of standard sample( $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

图4 空白文蛤样品质谱图

Fig. 4 MRM chromatogram of blank sample

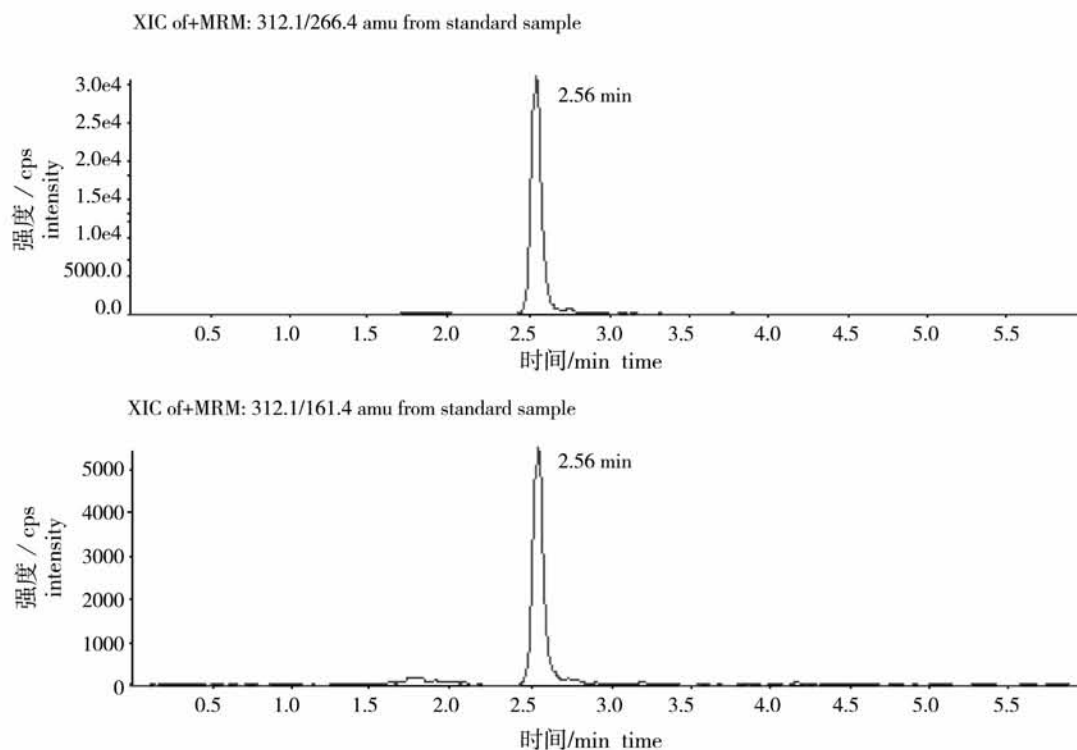


图5 空白文蛤添加 DA 成  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  后得到的质谱图  
Fig. 5 MRM chromatogram of spiked sample ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )

基体不干扰测定。

#### 2.4 定性和定量测定

在相同试验条件下,样品中待测物与同时检测的标准物质具有相同的保留时间,并且相对丰度比值也一致,则可判定为样品中存在该残留。

采用外标法对定量离子对进行定量计算,以 312.1/266.4 计算 DA 的浓度。以待测物浓度为横坐标,以待测物峰面积为纵坐标,建立线性关系(图 6)。在  $10\sim 4\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度内(相当于样品浓度  $0.02\sim 8.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),面积与浓度关系线性良好。

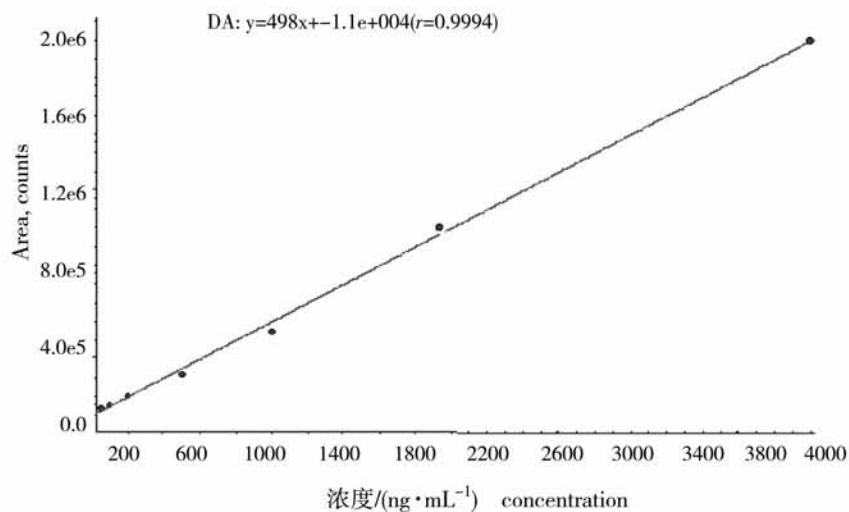


图6 软骨藻酸浓度与峰面积的线性关系图  
Fig. 6 Linear curve of DA concentration and area

## 2.5 回收率、精密度和灵敏度

称取文蛤空白样品 30 份作为方法回收率与精密度试验材料,向空白样品中添加标准品,添加浓度水平分别为  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  和  $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,每个水平设 6 个重复,混匀静置 30 min 后按照上述方法进行提取、净化、测定,以外标法计算来验证方法的回收率。方法的回收率和精密度列于表 2。从表 2 可以看出,方法的回收率为  $80.5\% \sim 92.2\%$ ,RSD 为  $4.42\% \sim 9.46\%$ 。

理论上规定 3 倍信噪比 ( $S/N = 3$ ) 为方法的检出限,10 倍信噪比 ( $S/N = 10$ ) 为方法的定量限。在  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  的浓度下,软骨藻酸的信噪比  $S/N$  远大于 10,由于尚未对更低的浓度进行测定,考虑到  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  的浓度远低于国内外的  $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  的限量要求,因此本方法以  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  为定量限。

表 2 方法的回收率与相对标准偏差  
Tab. 2 Recoveries and relative standard deviations of DA in blank shellfish samples ( $n=6$ )

| 添加物质<br>name | 加标浓度<br>added conc.<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 测定浓度<br>detected conc.<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 回收率<br>recovery<br>(%) | RSD<br>(%) |
|--------------|--|---|------------------------|------------|
| DA           | 0.02   | 0.0182  | 91.0                   | 4.42       |
|              | 0.1  | 0.0922  | 92.2                   | 4.90       |
|              | 0.2  | 0.160   | 80.0                   | 9.46       |
|              | 2.0  | 1.61  | 80.5                   | 8.50       |
|              | 4.0  | 3.40  | 85.0                   | 5.76       |

## 2.6 方法的应用

对浙江沿海的 34 批次的文蛤、贻贝、泥蚶等贝类按上述方法进行软骨藻酸残留的测定,结果有 1 个样品检出有软骨藻酸残留 ( $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),但含量远低于安全卫生标准值。

## 参考文献:

- [1] Lefebvre K A, Powell C L, Busman M, *et al.* Detection of domoic acid in Northern Anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event[J]. *Natural toxins*, 1999, 7: 85-92.
- [2] Dhoot J S, Appel B R, Rosario A R, *et al.* Confirmation of domoic acid in seafood using reverse phase liquid chromatography with hydriin post-column derivatization[J]. *Int J Environ Anal Chem*, 1993, 53: 269-279.
- [3] Manual on harmful marine microalgae [R]. Intergovernmental Oceanographic Commission (of UNESCO), 1995.
- [4] Quilliam M A, Thompson B A, Scott G T, *et al.* High performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton[J]. *Int J Environ Anal Chem*, 1989, 36: 139-154.
- [5] 卫峰,程昉,宫静宏,等. 高效液相色谱法测定贝类中软骨藻酸[J]. *色谱*, 2001, 19(3): 248-250.
- [6] Lawrence J F, Lau B P, Cleroux C, *et al.* Comparison of UV absorption and electrospray mass spectrometry for the high-performance liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish and biological samples[J]. *J Chromatogr A*, 1994, 21: 659(1): 119-126.
- [7] Hess P, Gallacher S, Bates L A, *et al.* Determination and confirmation of the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, in shellfish from Scotland by liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2001, 84: 1657-1667.
- [8] 卫峰,赵守成,李大志. 液相色谱电喷雾离子阱质谱法测定贝类中软骨藻酸[J]. *分析测试学报*, 2004, 23(3): 248-250.
- [9] 卫峰,王竹天. 毛细管电泳法分析贝类食品中软骨藻酸[J]. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15(2): 107-109.

## High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of residue of domoic acid in shellfish

SONG Li-li<sup>1</sup>, ZHANG Hai-qi<sup>1</sup>, HOU Jing-de<sup>2</sup>, HE Xin<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Fishery Products Quality Testing Center, Hangzhou 310012, China;

2. Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** Contamination of shellfish products by different biotoxins is one of the most important issues leading to the concern of food safety, which directly related to the health of seafood consumers. Even miniscule doses of some algal toxins, such as domoic acid (DA) or saxitoxin, can cause severe illness or death in humans. Therefore, it's important to carry on the reseaches on biotoxins contamination in shellfish, especially in China, where the shellfish mariculture industry has become more and more important. Detection method targeted on domoci acid biotoxin has been developed using liquid chromatography in China but little information is available on its Confirming Method. In this study, a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method was established for the determination of residue of domoic acid in shellfish. Shellfish samples were collected from Zhejiang Province from March to Novermber in 2007. DA were extracted from homogenized samples with 50% methanol solution, followed by clean-up of the extracts with LC-MAX column, and eluted by citrate solution. Two daughter ions ( $m/z$  803.5/255.1,  $m/z$  803.5/563.1) were scanned, analyte identification were performed by electrospray ionization(ESI) in positive mode using MRM and the quantification were performed using external standard method. The conditions of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry were as follows: positive ion electrospray ionization (+ESI) mode, IS + 5250V, TEM 475 °C, DP100V, FP325V, NEB8, CUR11, EP8, CAD10, CXP17, CE23( $m/z$  312.1/266.4), CE34( $m/z$  312.1/161.4). The mobile phase of HPLC was the acetonitrile: 0.1% acetic acid water solution (vol/vol: 20:80) and the chromatographic column was Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (2.1 mm×150 mm×5 μm). The result showed that the limit of detection was 0.02 μg·g<sup>-1</sup>, and the linear range was 0.02 μg·g<sup>-1</sup> - 8.00 μg·g<sup>-1</sup>. At spiked level of 0.02 μg·g<sup>-1</sup> - 4.00 μg·g<sup>-1</sup>, the average recoveries of DA were 80.2% - 92.2%, RSD were 4.42% - 9.46%, respectively. A batch of main aquaculture shellfishes collected along the Zhejiang coast was evaluated using the above method. The results showed that the LCMSMS method is sensitive, reliable, selective and specific for the determination of domoic acid.

**Key words:** shellfish; domoic acid; high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; multiple reaction monitoring(MRM)