

## 腹泻性贝类毒素（大田软海绵酸）的 LC/MS/MS 检测分析

## Analysis of Diarrhetic shellfish toxin okadaic acid analogues by LC/MS/MS

贝类毒素是贝类摄取有毒浮游生物后，有毒成分在体内累积而产生。致病毒素根据中毒症状分为腹泻性贝类毒素、麻痹性贝类毒素以及失忆性贝类毒素等，其中腹泻性贝类毒素包括大田软海绵酸（Okadaic acid）、扇贝毒素（Yessotoxin）群、蛤毒素（Pectenotoxin）等。之前，贝类毒素的分析一直采用小鼠毒性实验方法，但近年来液相色谱-串联质谱法开始逐渐被用于检测腹泻性贝类毒素。日本自 2015 年 3 月厚生劳动省发布通知（2015 年 3 月 6 日食品安全部基准审查科发 0306 号第 1 号）后，LC/MS/MS 法被采纳为官方检测方法。此外，将可食用部分的大田软海绵酸限量从 0.05 MU/g 修改为 0.16 mg（OA 当量）/kg。

中国国家卫生计生委在 2017 年 1 月发布了 127 项新的食品安全国家标准，其中 GB 5009.212-2016

贝类中腹泻性贝类毒素的测定中也新增了液相色谱-串联质谱的检测方法。

本报告采用了参照日本通知法的前处理法以及分析法，以蛤作为模型样品，对大田软海绵酸的分析实例进行介绍。

分析对象包括下述 3 种，即采用通知法中收录的前处理（碱水解）时产生的大田软海绵酸（OA）、鳍藻毒素-1（DTX1）、鳍藻毒素-2（DTX2）。各分析对象的结构式如图 1 所示。分析柱采用 TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m (2.0 mm I.D. x 75 mm, 3  $\mu$ m)，用含有甲酸铵和蚁酸的水/乙腈作为流动相，梯度洗脱进行分离。由于 OA 和 DTX2 仅甲基位置不同，而监测离子相同，故选择合适的分析柱很重要。在本报告的分析条件下，OA 和 DTX2 的分离度为 1.6，可完全分离。

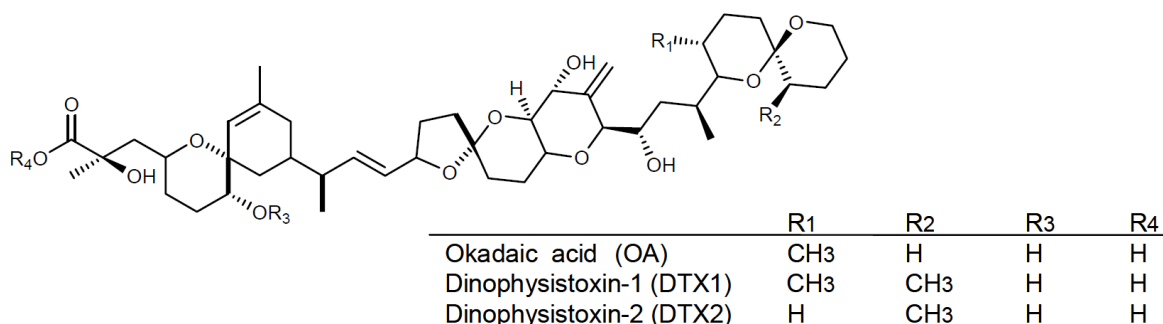


图 1 大田软海绵酸的结构式

表 1 分析条件

|          |  |         |  |
|----------|--|---------|--|
| 色谱柱:     | TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m (2.0 mm I.D. x 75 mm, 3 $\mu$ m)   |         |  |
| 流动相:     | A: 2 mmol/L HCOONH <sub>4</sub> + 50 mmol/L HCOOH<br>B: 2 mmol/L HCOONH <sub>4</sub> + 50 mmol/L HCOOH in (CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (95/5)) |         |  |
| 梯度:      | B conc(0-2.5 min) 40 % → (7.5-15 min) 100 % → (15.1 min) 40 %  |         |  |
| 流速:      | 0.2 mL/min   |         |  |
| 柱温:      | 40°C   |         |  |
| 进样量:     | 5 $\mu$ L  |         |  |
| MS:      | API-4000 (SCIEX)   |         |  |
| 离子源:     | ESI(-)   |         |  |
| 模式:      | SRM  |         |  |
| 母离子/子离子: | OA   | 803/255 |  |
|          | DTX1   | 817/255 |  |
|          | DTX2   | 803/255 |  |

根据标准样品制成的校准曲线结果显示，所有分析物质在 0.5~10 µg/L 的浓度范围内，均可得到相关系数  $r^2=0.999$  以上的良好线性关系。定量下限值 (LOQ) 均为 0.5 µg/L，采用通知法中收录的前处理 (图 2) 时相当于 5 µg/kg 可食用部分。此外，采用 5 µg/L 的标准样品测定时，RSD (n=6) 为 1.1~1.3%，重现性良好。

在蛤的可食用部分添加 OA、DTX1 以及 DTX2 标准样品，使各浓度为 50 µg/kg (大约为大田软海绵酸限量的 1/3)，然后参照通知法规定的前处理方法测定，色谱图如图 3 所示。各分析对象的加标回收率分别为：OA-107.1%、DTX1-106.4%、DTX2-103.1%，均取得良好结果。

样品 2g  
 + 甲醇 9 ml, 甲醇和水的混合液 (9:1) 9 mL 萃取 (均质器、旋涡混合器)  
 定容 20 mL  
 分取 2 mL  
 + 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液 0.25 mL  
 水解 (76°C, 40 min)  
 中和 + 2.5 mol/L 盐酸 0.25 mL  
 液-液分离 + 2.5 mL 乙烷 2 次  
 下层  
 + 水 2.5 mL  
 固相萃取微型柱提纯 (十八烷基硅烷键硅胶)  
 +清洗: 甲醇和水的混合液 (2:3) 2 mL 2 次  
 +清洗: 水 3 mL  
 +清洗: 甲醇和水的混合液 (2:3) 3 mL  
 +洗脱: 甲醇和水的混合液 (9:1) 3 mL  
 洗脱液  
 + 1% 醋酸 0.3 mL  
 固相萃取微型柱提纯 (阳离子交换)  
 +洗脱: 甲醇和 1% 醋酸的混合液 (9:1) 2 mL  
 洗脱液  
 减压浓缩干燥  
 + 甲醇 2 mL  
 LC/MS/MS

图 2 蛤样品的前处理

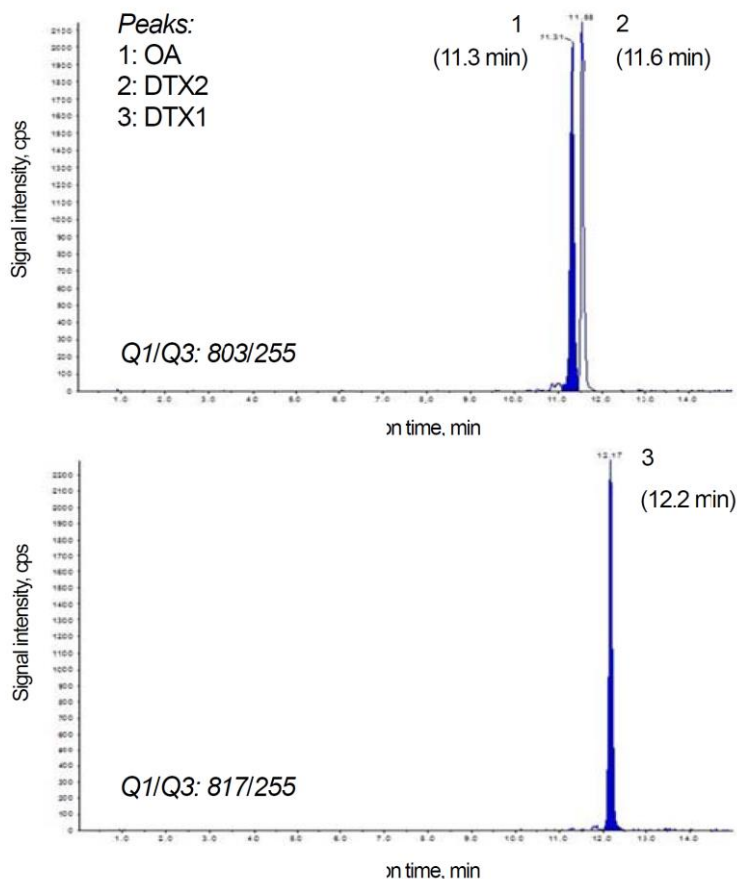


图 3 蛤的碱水解物(50 µg/kg 添加样品)的色谱图