

doi: 10.12452/j.fxcsxb.24042502

# ASE/UPLC-MS/MS测定海产品中17种海洋脂溶性藻毒素

李静<sup>1</sup>, 麦艳玲<sup>2</sup>, 肖陈贵<sup>3</sup>, 沈金灿<sup>3</sup>, 李文涛<sup>1</sup>, 郭建宁<sup>1</sup>,  
钟润生<sup>1</sup>, 李杨<sup>1\*</sup>

(1. 深圳信息职业技术学院 交通与环境学院, 广东 深圳 518172; 2. 香港城市大学 海洋污染国家重点实验室, 香港 999077; 3. 深圳海关食品检验检疫技术中心 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 广东 深圳 518026)

**摘要:** 建立了快速溶剂萃取/超高效液相色谱-串联质谱(ASE/UPLC-MS/MS)同时检测17种海洋脂溶性藻毒素(MLPs)的方法。鱼贝类海产品采用甲醇在高温高压下进行快速萃取, 再依次采用反相Agilent Bond Elut C<sub>18</sub> (500 mg/6 mL)和Waters Sep-Pak (500 mg/6 mL)正相硅胶固相萃取小柱进行净化; 以含有0.1%甲酸和2 mmol/L甲酸的95%乙腈和水为流动相, 使用Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub>色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)进行分离, 在电喷雾电离多反应监测模式下同时检测, 17种MLPs在6 min内全部被洗脱并检测。17种MLPs的相关系数为0.9949~0.9999, 定量下限为0.020~30 pg/g湿重(ww)。在6种海产品中, 17种MLPs的加标回收率为67.3%~116%, 相对标准偏差(RSD)不大于15%。采用该方法对采自我国南海的11个鱼类、21个甲壳动物、19个软体动物样品进行测定, 共检出12种MLPs, 总含量为316~20300 pg/g ww, 主要为大田软骨酸毒素(OA)、鳍藻毒素(DTXs)和虾夷扇贝毒素(YTXs)。该方法具有优良的准确度和精密度, 满足实际海产品中17种MLPs的同时检测要求。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱; 快速溶剂萃取; 固相萃取; 海洋脂溶性藻毒素; 海产品

**中图分类号:** O657.7; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2024)12-1952-07

## Determination of 17 Marine Lipophilic Phycotoxins in Seafood Using Accelerated Solvent Extraction Combined with Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Jing<sup>1</sup>, MAK Yim-ling<sup>2</sup>, XIAO Chen-gui<sup>3</sup>, SHEN Jin-can<sup>3</sup>, LI Wen-tao<sup>1</sup>, GUO Jian-ning<sup>1</sup>,  
ZHONG Run-sheng<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Transportation and Environment, Shenzhen Institute of Information Technology, Shenzhen 518172, China; 2. State Key Laboratory of Marine Pollution (SKLMP), City University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China; 3. Key Laboratory of Detection Technology R&D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Technology Center of Shenzhen Customs, Shenzhen 518026, China)

**Abstract:** A method was established for the simultaneous detection of 17 marine lipophilic phycotoxins (MLPs) by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) combined with accelerated solvent extraction (ASE), including azaspiracids (AZAs), brevetoxins (BTXs), ciguatoxins (CTXs), dinophysistoxins (DTXs), gymnodimine (GYM), okadaic acid (OA), spirolides (SPXs), pectenotoxins (PTXs) and yessotoxins (YTXs). Seafood was extracted by accelerated solvent extraction with methanol, and then purified by reverse phase (Agilent Bond Elut C<sub>18</sub>, 500 mg/6 mL) and normal phase solid phase (Waters Sep-Pak, 500 mg/6 mL) extraction cartridges subsequently. Mobile phase was water and 95% acetonitrile (95:5, volume ratio), both of which contained 0.1% formic acid and 2 mmol/L ammonium formate. A Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> LC column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was performed to separate the lipophilic phycotoxins in six minutes and then the target analytes were detected by UPLC-MS/MS in multiple reaction monitoring

收稿日期: 2024-04-25; 修回日期: 2024-07-09

基金项目: 深圳科技创新稳定支持计划(KJ2024C006)

\* 通讯作者: 李杨, 博士, 讲师, 研究方向: 多介质环境污染修复, E-mail: linziyi\_ly@163.com

mode. The correlation coefficients of standard curves were 0.994 9–0.999 9 and the method quantification limits of 17 MLPs ranged from 0.020 to 30 pg/g ww. The matrix-spiked recoveries of 17 MLPs ranged from 67.3% to 116% with the relative standard deviations below 15%. Twelve lipophilic phycotoxins were detected in seafood from South China Sea, with the total concentration ranging from 316 to 20 300 pg/g ww. This method presents good sensitivity and precision, which can satisfy the requirements for simultaneous determination of 17 MLPs in seafood.

**Key words:** ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry; accelerated solvent extraction; solid phase extraction; marine lipophilic phycotoxins; seafood

海洋脂溶性藻毒素(MLPs)是海洋有害藻华所产的一类次级代谢产物,其结构稳定不易降解,易在海洋食物网生物体内蓄积、转化及传递,对海洋生态系统、渔业及人类健康造成了严重危害<sup>[1-2]</sup>。迄今为止,已发现了300多种MLPs,主要有大田软骨酸毒素(OA)、鳍藻毒素(DTXs)、扇贝毒素(PTXs)、原多甲藻酸贝类毒素(AZAs)、裸藻毒素(BTXs)、雪卡毒素(CTXs)、米氏裸甲藻贝类毒素(GYMs)、螺环内酯毒素(SPXs)及虾夷扇贝毒素(YTXs)等<sup>[3-5]</sup>。据统计,每年有5万~50万例患者因食用含MLPs的海产品而引起中毒,其中因雪卡鱼类中毒引起的死亡率高达1.5%<sup>[6-7]</sup>。欧盟规定每千克海产品中各MLPs不应超过:10 ng CTX1B 当量(equivalent, eq.)、160 μg OA eq.、160 μg AZA1 eq.、800 μg BTX2 eq.、1 000 μg YTX eq.<sup>[8-16]</sup>,以上MLPs我国与欧盟执行标准基本一致(但我国暂未制定YTXs的相关限量标准);尽管针对SPXs和GYMs尚未颁布管制文件,但欧盟食品安全局强烈建议应警惕其风险。

目前,超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)已被广泛应用于海水、沉积物、藻类、鱼类、贝类中MLPs的分析<sup>[17-20]</sup>。例如,李静等<sup>[21]</sup>建立了测定海水、悬浮颗粒物及沉积物中18种藻毒素的反相固相萃取/UPLC-MS/MS法;麦艳玲等<sup>[22]</sup>开发了平行振荡萃取结合反相固相萃取/高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定鳗鱼中3种CTXs的方法;Wang等<sup>[23]</sup>采用QuEChERS法结合UPLC-MS/MS分析了鱼肉及贝肉中的9种MLPs。因生物样品含丰富的脂质、蛋白质、色素等干扰物,诸多研究者选择反相固相萃取进行样品净化,然而脂质易与MLPs发生共洗脱,导致UPLC-MS/MS分析存在强基质效应(增强或抑制作用超过20%)。如Lewis等<sup>[24]</sup>建立的快速萃取结合液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定鱼肉中CTX1B的方法,呈现出75%的离子抑制作用;García-Altares等<sup>[25-26]</sup>利用LC-MS/MS分析贝类中MLPs时,观察到OA及DTXs的信号增强超过100%。不少研究采用基质曲线进行样品定量分析以校正基质效应的影响<sup>[22-23]</sup>,但实际生物样品种类丰富,其脂质、色素组成成分存在较大差异,故难以用单一基质曲线对所有样品进行定量分析。此外,多种MLPs存在的现状及全球范围有害藻华的扩张,使得我们亟需建立一种同时分析多种MLPs的可靠、有效的前处理方法以降低基质效应,提高样品分析的准确性及定量的便捷性,为我国海洋生态系统、渔业管理及人类健康风险评估提供技术支持。

本研究建立了一种快速溶剂萃取结合固相萃取净化的同时测定海产品中17种MLPs的UPLC-MS/MS法,包括高毒性的MLPs(OA、DTXs、PTXs、AZAs、CTXs、SPXs、GYMs、YTXs及BTXs),并对前处理条件进行了优化,以降低基质效应,提高方法准确度及灵敏度。该方法适用于检测各类生物样品中的17种MLPs。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1290型超高效液相色谱仪(美国Agilent公司),API5500型三重四极杆质谱仪配电喷雾离子源(美国AB Sciex公司);Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub>色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国Phenomenex公司);ASE 200快速溶剂萃取仪(美国dionex公司);20位固相萃取装置(美国Waters公司);旋涡振荡混合器(美国Thermo公司);冷冻离心机(最大转速14 000 r/min, 美国Sigma公司);TurboVap LU型氮吹浓缩仪(Caliper lifeSciences公司);Eppendorf移液器(可调范围:10~100 μL、20~200 μL、10~1 000 μL、1 000~5 000 μL, 德国Eppendorf公司);固相萃取小柱:Waters Oasis WAX(500 mg/6 mL)、Waters Oasis MAX(500 mg/6 mL)、Waters Oasis MCX(500 mg/6 mL)、Agilent Bond Elut C<sub>18</sub>(500 mg/6 mL)、Waters Oasis HLB(500 mg/6 mL)、Phenomenex Strata-X(500 mg/6 mL)、Waters Sep-Pak(500 mg/6 mL);Whatman玻璃纤维滤纸(英国Whatman公司)。

大田软骨酸毒素(OA)、鳍藻毒素(DTX1和DTX2)、扇贝毒素(PTX2)、米氏裸甲藻贝类毒素(GYM)、螺环内酯毒素(SPX1)、原多甲藻酸贝类毒素(AZA1、AZA2及AZA3)、虾夷扇贝毒素(homoYTX和YTX)标准品购自加拿大国家海洋研中心;太平洋雪卡毒素(P-CTX-1、P-CTX-2及P-CTX-3)标准品购自澳大利亚昆士兰大学;裸藻毒素(BTX2、BTX3及BTX9)标准品购自美国LKT实验室。甲醇和乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸、氯化钠、甲酸铵、乙酸铵(色谱纯,美国Sigma公司);正己烷(农残级,美国Anaquea™公司);氯仿(分析纯,泰国RCI LabScan公司);丙三醇和氨水(分析纯,美国Sigma公司);Milli-Q超纯水处理系统(美国Millipore公司)。

## 1.2 标准溶液的配制

准确取适量的17种MLPs标准物质,用甲醇配制成1.0 μg/mL的单标储备液,再用80%甲醇水配制成100 ng/mL的17种MLPs混合标准工作溶液,并逐级稀释成标准溶液(现配现用),置于-20 °C下保存备用。

## 1.3 色谱-质谱条件

色谱条件:Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub>色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A为水+2 mmol/L甲酸铵(含0.1%甲酸),B为95%乙腈+2 mmol/L甲酸铵(含0.1%甲酸)。流速为200 μL/min,柱温为35 °C,进样体积为5 μL。线性梯度洗脱程序:0~1 min, 20% B; 1~6 min, 20%~80% B; 6~8 min, 80% B; 8~10 min, 80%~100% B; 10~14 min, 100% B; 14~14.1 min, 100%~20% B; 14.1~19 min, 20% B。

质谱条件:电喷雾电离源(ESI);P-CTX-1、P-CTX-2、P-CTX-3、PTX2、GYM、SPX1、AZA1、AZA2、AZA3、BTX2、BTX3及BTX9采用多反应监测(MRM)正离子模式(ESI<sup>+</sup>)检测,喷雾电压为5 500 V;OA、DTX1、DTX2、YTX、homoYTX采用MRM负离子模式(ESI<sup>-</sup>)检测,喷雾电压为-4 500 V;雾化气压力为207 kPa,去溶剂气压力为276 kPa,碰撞气压力为69 kPa,离子源温度为400 °C。17种MLPs的分子式、色谱保留时间、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)和碰撞室出口电压(CXP)见表1。

表1 17种海洋脂溶性藻毒素的分子式、保留时间及质谱参数

Table 1 Molecular formulae, retention times and mass spectrometric parameters for 17 marine lipophilic phycotoxins

MLPs	Formula	t <sub>R</sub> /min	Precursor ion	Precursor ion (m/z)	Fragment ion(m/z)	DP/V	CE/eV	CXP/V
GYM	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>4</sub>	4.46	[M + H] <sup>+</sup>	508.4	490.3 <sup>*</sup> , 120.2	75, 75	35, 117	20, 8
SPX1	C <sub>42</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>7</sub>	4.90	[M + H] <sup>+</sup>	692.5	674.3 <sup>*</sup> , 444.4	75, 75	45, 55	42, 24
P-CTX-1	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> O <sub>19</sub>	6.78	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1 128.4	1 075.5 <sup>*</sup> , 1 093.5, 1 057.5	51, 51, 51	29, 27, 31	24, 28, 16
YTX	C <sub>55</sub> H <sub>82</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	6.80	[M - H] <sup>-</sup>	1 141.5	855.7 <sup>*</sup> , 713.4	-50, -50	-110, -107	-49, -47
homoYTX	C <sub>56</sub> H <sub>84</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>	6.83	[M - H] <sup>-</sup>	1 155.6	1 075.6 <sup>*</sup> , 869.6	-100, -100	-46, -100	-18, -10
OA	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>	7.21	[M - H] <sup>-</sup>	803.5	255.2 <sup>*</sup> , 113.1	-70, -70	-60, -68	-12, -12
DTX2	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>	7.47	[M - H] <sup>-</sup>	803.5	255.2 <sup>*</sup> , 113.1	-70, -70	-60, -68	-12, -12
PTX2	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	7.68	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	876.4	823.5 <sup>*</sup> , 805.5	40, 40	37, 40	36, 35
AZA3	C <sub>46</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>12</sub>	7.79	[M + H] <sup>+</sup>	828.5	810.5 <sup>*</sup> , 792.5	50, 50	45, 55	44, 52
BTX3	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	7.81	[M + H] <sup>+</sup>	897.5	725.5 <sup>*</sup> , 879.7	80, 80	30, 25	10, 10
BTX9	C <sub>50</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>	7.97	[M + H] <sup>+</sup>	899.5	863.6 <sup>*</sup> , 881.5	60, 60	35, 30	10, 10
DTX1	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	8.20	[M - H] <sup>-</sup>	817.5	255.2 <sup>*</sup> , 113.1	-110, -110	-68, -94	-17, -12
P-CTX-2	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> O <sub>18</sub>	8.30	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1 112.7	1 077.8 <sup>*</sup> , 1 059.8, 1 041.8	51, 105, 105	25, 30, 30	20, 20, 20
AZA1	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> NO <sub>12</sub>	8.31	[M + H] <sup>+</sup>	842.5	824.6 <sup>*</sup> , 806.4	40, 40	41, 53	54, 48
AZA2	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>12</sub>	8.68	[M + H] <sup>+</sup>	856.5	838.6 <sup>*</sup> , 820.6	55, 55	43, 57	36, 42
BTX2	C <sub>50</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	8.88	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	912.4	895.4 <sup>*</sup> , 877.4	111, 111	17, 27	16, 16
P-CTX-3	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> O <sub>18</sub>	8.95	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1 112.7	1 077.8 <sup>*</sup> , 1 059.8, 1 041.8	51, 105, 105	25, 30, 30	20, 20, 20

\*: quantitative ion

## 1.4 生物样品前处理

将市售海鳗鱼或石斑鱼、绿唇贻贝等海产品表面清洗干净,取其肌肉并充分匀浆,准确称取5.00 g湿重(ww)样品进行冷冻干燥,冻干后的样品保存于-20 °C。预先在ASE不锈钢萃取池(22 mL)底部放置两片玻璃纤维滤纸,将冻干的鱼肉或贝肉样品与硅藻土混匀后,转至萃取池。ASE条件为:75 °C和10 MPa下加热5 min,在60%冲洗体积和100 s吹扫时间下静态时间为5 min,进行两个提取周期的提取,合并萃取液并氮吹浓缩至近干。

将上述萃取液复溶于20 mL的25%甲醇/水(1:3, 体积比)中, 将复溶萃取液加入预先用15 mL 0.3%氨水甲醇、15 mL甲醇和10 mL超纯水活化的Agilent Bond Elut C<sub>18</sub>固相萃取小柱(500 mg/6 mL)中, 弃去流出液, 并用6.5 mL 25%甲醇/水(1:3)淋洗后抽干, 用4 mL甲醇和4 mL 0.3%氨水甲醇洗脱。洗脱液中加入2 mL水后, 再加入8 mL正己烷进行液液萃取, 弃去正己烷层, 再加入10 mL 1 mol/L氯化钠溶液和8 mL氯仿进行液液萃取, 收集氯仿层并氮吹浓缩至近干。用6 mL 5%甲醇/氯仿(5:95, 体积比)复溶样品, 并加入预先用30 mL氯仿活化的Waters Sep-Pak 硅胶固相萃取小柱(500 mg/6 mL)中, 弃去流出液后抽干, 再用8 mL 10%甲醇/氯仿和8 mL 30%甲醇/氯仿分别洗脱, 合并洗脱液并氮吹浓缩至近干, 最后溶于100  $\mu$ L 80%甲醇/水(4:1), 待测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理条件的优化

**2.1.1 快速溶剂萃取条件优化** ASE因具备有机溶剂用量少、快速、自动化程度高及萃取效率高等优点而被广泛应用于生物样品, 为减少水分对萃取效率的影响, 样品需进行冷冻干燥处理<sup>[27]</sup>。萃取压力通常是影响ASE效率的一个微小变量, 萃取过程中使萃取溶剂保持为液态即可, 在整个优化过程中, 其参数设置为10 MPa。已有报道采用纯甲醇或甲醇/正己烷混合溶液提取海产品中的MLPs<sup>[24,28]</sup>, 但因样品脂质及成分含量差异, 故考察了不同体积比(3:1、1:1、1:3和0:1)的正己烷/甲醇混合溶液(H:M)对6种海产品(鳗鱼、石斑鱼、红杉鱼、青口、文蛤、花螺)中MLPs提取效率的影响。结果表明, MLPs的萃取效率随着萃取剂中甲醇比例的增加而升高, 例如石斑鱼中17种MLPs的回收率由38.4%~73.1%增至81.0%~105% (图1)。尽管正己烷可除去海产品中的脂溶性干扰物质<sup>[29-31]</sup>, 但在ASE高温条件下, 采用正己烷与甲醇混合萃取剂会导致更多的脂溶性物质产生共干扰作用(如油脂、色素等)。因此, 选用纯甲醇作为最佳溶剂。

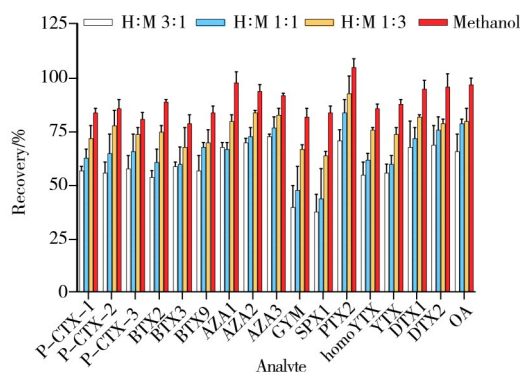


图1 不同萃取溶剂对17种MLPs回收率的影响( $n=3$ )  
Fig. 1 Effects of different solvent on the recoveries of 17 MLPs( $n=3$ )

考察了萃取温度(75、95、115  $^{\circ}$ C)对6种海产品(鳗鱼、石斑鱼、红杉鱼、青口、文蛤、花螺)中MLPs回收率的影响, 结果表明随着温度升高鱼肉中MLPs的提取效率相当。例如在上述温度下石斑鱼肉中17种MLPs的回收率分别为83.1%~99.3%、81.8%~104%及80.2%~97.2%, 但随着温度升高, ASE的粗提取溶液中黄色悬浮物增多且颜色变暗, 提取到的干扰物增多, 故选择75  $^{\circ}$ C作为ASE萃取温度。此外, 考察了萃取周期数(2、3次)以及静态时间(5、10 min, 2个循环)的影响, 发现6种海产品中目标MLPs的提取效率差异可以忽略。综合考虑, 优化的提取条件为: 甲醇作为提取溶剂, 在75  $^{\circ}$ C、10 MPa、60%冲洗体积和100 s吹扫时间下静态时间为5 min, 进行2个提取周期提取。

**2.1.2 固相萃取条件优化** 由于海产品中含有丰富的油脂、蛋白质、色素等干扰物, 需采用有效的前处理手段去除干扰物质, 降低基质效应。17种目标藻毒素均为脂溶性, 但其理化性质略有不同。因此, 考察了3种不同离子交换固相萃取柱(弱阴离子交换柱(WAX)、混合模式强阴离子交换柱(MAX)、混合模式强阳离子交换柱(MCX))以及3种反相固相萃取柱(C<sub>18</sub>、二乙烯苯共聚物Strata-X及Oasis HLB)对目标MLPs的萃取效率, 并优化了其洗脱及淋洗条件。

对于WAX和MAX小柱, 先用4 mL 0.3%甲酸甲醇洗脱酸性化合物后, 再用4 mL甲醇洗脱碱性和中性化合物; 而MCX小柱, 先用4 mL甲醇洗脱中性和酸性化合物, 再用4 mL 0.3%氨水甲醇洗脱碱性化合物。结果显示(图2A), 3种离子交换固相萃取柱上, 除YTXs外其余15种MLPs的回收率在WAX上为81.1%~109%, MAX上的回收率为21.4%~116%, MCX上为0%~102%, 且MCX上AZAs、SPX1、GYM无保留。YTXs含有2个磷酸基团, 结果表明MCX对其萃取效果远高于MAX和WAX小柱; 而具有羧酸官能团的OA、DTX1和DTX2在3种离子交换固相萃取柱上均显示出良好的回收率(95.7%~

116%); AZAs 具有羧基和胺部分的独特螺旋组装体, 它们在阴离子交换柱(WAX 和 MAX)上的保留程度高于阳离子交换柱 MCX, 我国行业标准 SN/T 4251-2015 的前处理方法亦采用 WAX 小柱<sup>[16]</sup>, 扇贝、牡蛎和杂色蛤中 AZA1-3 的回收率分别为 76.2%~104%、71.2%~105%、71.5%~108%; SPX1 和 GYM 为亲脂环亚胺化合物, 在 MCX 小柱上的保留程度更高, 以上表明在阴离子交换固相萃取柱上羧基的结合能力高于胺基。与离子交换柱相比, 3 种反相萃取柱(C<sub>18</sub>、Strata-X 及 Oasis HLB)对 17 种目标 MLPs 展现了良好的保留, 其回收率分别为 82.3%~101%、70.9%~109% 及 67.6%~103%(图 2B)。由于 C<sub>18</sub> 小柱能更有效地去除黄色共洗脱杂质, 且上样过程中耗时少, 故选择 C<sub>18</sub> 小柱进行萃取。

实验表明, 在高浓缩倍数的样品前处理过程中, C<sub>18</sub> 小柱及液液萃取净化后, 增加 Sep-Pak 正相硅胶固相萃取小柱的净化步骤可降低背景干扰, 大大降低基质效应, 同时为低水平脂溶性藻毒素目标分析物检测提供了良好的性能<sup>[32]</sup>, 故考察了 10%、20% 和 30% 甲醇氯仿对 17 种目标藻毒素的洗脱效率。结果表明(图 2C), 以 10% 甲醇氯仿为洗脱溶剂, 除 YTXs 外, 其余目标 MLPs 的回收率为 81%~98%, 而 20% 及 30% 甲醇氯仿洗脱下 17 种 MLPs 的回收率分别为 58.5%~108% 和 84.6%~102%; 说明 YTXs 的洗脱效率随洗脱液中甲醇比例的增加而增大, 但黄色的脂溶性干扰物也被更多的共洗脱。为减少共洗脱造成的基质效应, 最终确定分步洗脱, 先用 10% 甲醇氯仿洗脱除 YTX 以外的 16 种 MLPs, 再用 30% 甲醇氯仿洗脱 YTX。

在优化实验条件下, 17 种 MLPs 可在 6 min 内全部被洗脱, 其色谱图见图 3。

## 2.2 分析方法评价

### 2.2.1 基质效应

在进行 LC-MS/MS 分析时, 生物样本中的内源性物质(蛋白质、脂肪、磷脂等)以及样品处理过程中引入的外源性物质(抗凝剂、缓冲液中的添加剂等), 在质谱 ESI 源中可能与目标化合物竞争电荷或中和离子化过程, 从而导致基质效应。采用经“1.4”方法前处理后的 6 种空白海产品(鳗鱼、石斑鱼、红杉鱼、青口、文蛤、花螺)提取液配制 17 种 MLPs 的基质标准溶液, 再以 80% 甲醇水配制标准溶液, 以上述 2 种标准溶液绘制的标准曲线斜率(分别记为  $k_{\text{matrix}}$  和  $k_{\text{standard}}$ )之比作为基质效应(ME), 公式如下:  $ME = k_{\text{matrix}}/k_{\text{standard}}$ 。结果表明(表 2), 经本方法处理后, 鳗鱼、石斑鱼、红杉鱼、青口、文蛤、花螺 6 种海产品对 17 种藻毒素呈现出不同程度的抑制(ME<1)或增强(ME>1)作用, 除 GYM、P-CTX-1 及 BTX9 外的 MLPs 均显示出弱基质效应(0.80~1.20), 6 种海产品中 MLPs 的 ME 分别为 0.70~1.15、0.78~1.16、0.80~1.11、

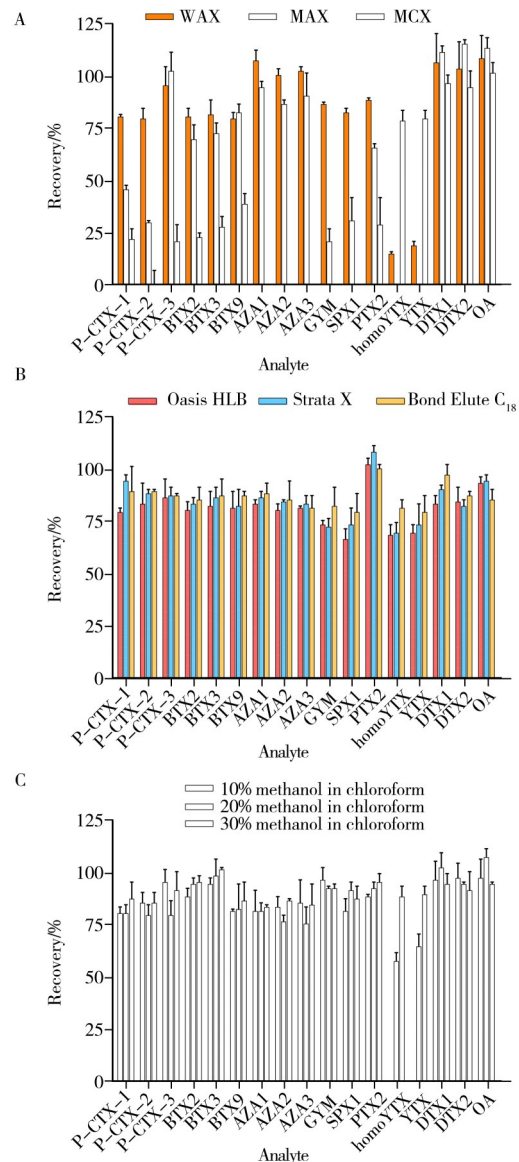


图 2 不同固相萃取条件下 17 种 MLPs 的回收率( $n=3$ )  
Fig. 2 Recoveries of 17 MLPs under different solid phase extraction conditions( $n=3$ )

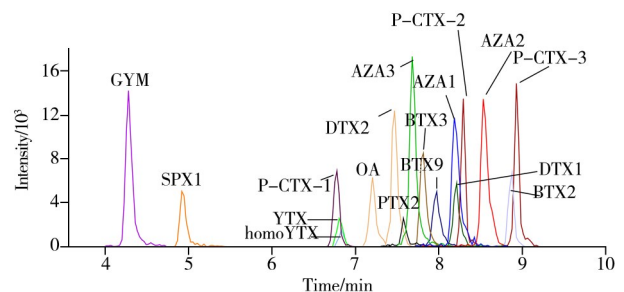


图 3 17 种海洋脂溶性藻毒素的总离子流图  
Fig. 3 Total ion chromatogram of 17 MLPs

0.81 ~ 1.13、0.83 ~ 1.14 和 0.86 ~ 1.16。

**2.2.2 线性范围、检出限与定量下限** 用 80% 甲醇水配制质量浓度分别为 0.0、10、50、100、500、1 000、2 000、5 000、10 000、20 000、50 000 pg/mL 的标准溶液, 采用本方法进行测定, 以各 MLPs 的定量离子峰面积为纵坐标, 对应质量浓度为横坐标进行线性回归计算。17 种 MLPs 在一定质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.994 9 ~ 0.999 9。以 3 倍信噪比确定 MLPs 的方法检出限 (LOD), 以 10 倍信噪比确定 MLPs 的方法定量下限 (LOQ), 17 种 MLPs 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.050 ~ 10 pg/g ww 和 0.20 ~ 30 pg/g ww (表 2)。

表 2 海产品中 17 种 MLPs 的线性范围、相关系数、方法检出限、定量下限及基质效应

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients ( $r^2$ ), LODs, LOQs and matrix effects for 17 lipophilic phycotoxins in seafood

MLPs	Linear range /( $10^3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$r^2$	LOD /( $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ww}$ )	LOQ /( $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ww}$ )	Matrix effect					
					Moral eel	Grouper	Snapper	Green-lipped mussel	Asiatic hard clam	Babylon shell
GYM	0.01~50	0.998 8	0.10	0.40	0.70	0.78	0.83	0.81	0.83	0.89
SPX1	0.01~50	0.997 2	0.10	0.30	0.86	0.84	0.89	1.03	0.84	0.86
P-CTX-1	0.05~50	0.998 9	0.30	1.0	0.72	0.78	0.80	0.86	0.89	0.87
YTX	0.1~50	0.997 6	0.20	0.80	1.15	1.04	1.11	1.12	1.04	0.99
homoYTX	0.1~50	0.998 8	0.30	1.0	1.05	0.98	0.92	1.05	0.98	0.92
OA	0.1~50	0.999 8	0.10	0.40	1.12	1.15	1.03	1.04	1.05	0.98
DTX2	0.1~50	0.999 8	0.10	0.40	1.02	1.14	0.98	1.10	1.14	1.02
PTX2	0.01~50	0.995 5	0.050	0.20	0.87	1.16	1.06	1.09	1.14	1.16
AZA3	0.01~50	0.999 1	0.20	0.70	0.90	0.97	1.02	0.98	0.97	0.99
BTX3	0.1~50	0.994 9	0.50	2.0	0.87	0.88	0.89	0.87	0.89	0.86
BTX9	0.5~50	0.995 1	10	30	0.70	0.82	0.90	0.83	0.90	0.89
DTX1	0.1~50	0.999 5	0.05	0.20	1.00	1.13	0.99	1.13	1.10	1.07
P-CTX-2	0.05~50	0.998 6	0.30	1.0	0.82	0.80	0.86	0.89	0.84	0.89
AZA1	0.01~50	0.999 9	0.20	0.80	0.91	0.93	0.95	0.96	0.93	0.95
AZA2	0.01~50	0.999 6	0.10	0.40	0.99	1.01	0.95	1.02	1.10	0.95
P-CTX-3	0.05~50	0.996 3	0.30	1.0	0.83	0.84	0.90	0.84	0.85	0.90
BTX2	0.5~50	0.995 9	0.50	2.0	0.81	0.82	0.88	0.89	0.83	0.88

**2.2.3 准确度及精密度** 在空白的鳗鱼、石斑鱼、红杉鱼、青口、文蛤、花螺 6 种海产品中分别添加 50、200、1 000 pg/g 3 个浓度水平的 17 种 MLPs 混合标准溶液, 每个水平做 6 个平行, 考察方法的准确度和精密度。结果表明, 在 6 种海产品中, 17 种 MLPs 的回收率为 67.3% ~ 116%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.0% ~ 15%。本方法的准确度和精密度良好, 能满足实际海产品中 17 种 MLPs 的测量要求。

### 2.3 实际样品检测

采用本方法对我国南海海洋生物样品进行分析, 共采集 17 种海洋生物, 包括 7 种软体动物 ( $n=19$ )、5 种甲壳类动物 ( $n=21$ ) 和 5 种鱼类 ( $n=11$ )。结果共检出 12 种目标 MLPs, 分别为 OA、DTX1、DTX2、homoYTX、YTX、AZA1、AZA2、AZA3、PTX2、GYM、BTX3 和 SPX1, 总含量为 316 ~ 20 300 pg/g ww (表 3), 在生物体内最主要的 MLPs 为 OA、DTXs 和 YTXs。所有检出的 MLPs 含量均低于我国最大残留水平的监管限度 (SPX1 和 GYM 目前不受监管)。尽管在我国南海水域已发现潜在产雪卡毒素的冈比甲藻属 (*Gambierdiscus* spp.) 和福冈属 (*Fukuyoa* spp.), 在所调查的生物样品中未发现 P-CTXs 的蓄积。此外, 对软体动物、甲壳动物和鱼类的脂溶性藻毒素组成进行了分析, 结果表明, 软体动物和甲壳动物的脂溶性藻毒素主要为 OA、DTXs 和 YTXs, 而鱼类的 MLPs 主要为 OA 和 DTXs。不同物种生物样品检出的 MLPs 成分各不相同, 这可能是由于摄取、生物累积、生物转化作用和消除方面的差异所致。

表 3 实际样品中脂溶性藻毒素的含量 (pg/g ww)

Table 3 Contents of MLPs in fishes, crustaceans and mollusks (pg/g ww)

MLPs	Fishes	Crustaceans	Mollusks
GYM	4.86 ~ 49.3	5.38 ~ 167	34.2 ~ 13 200
SPX1	ND	ND ~ 14.3	ND ~ 416
YTX	ND ~ 244	ND ~ 335	ND ~ 1 280
homoYTX	79.5 ~ 573	32.4 ~ 4 820	350 ~ 15 100
OA	219 ~ 690	47.0 ~ 567	254 ~ 6 380
DTX2	ND ~ 411	42.6 ~ 367	ND ~ 1 790
PTX2	ND ~ 113	ND ~ 50.9	ND ~ 345
AZA3	ND	ND ~ 1.79	ND ~ 11.0
BTX3	ND	ND ~ 159	ND ~ 326
DTX1	ND ~ 135	ND ~ 603	ND ~ 1 540
AZA1	ND	ND ~ 12.4	ND ~ 22.0
AZA2	ND ~ 15.0	0.591 ~ 170	ND ~ 298
Total	461 ~ 1 920	316 ~ 6 030	2 000 ~ 20 300

ND: not detected

### 3 结 论

本文通过优化 ASE 条件以及固相萃取条件,建立了基于 ASE 提取、固相萃取净化的同时测定海产品中 17 种 MLPs 的 UPLC-MS/MS 法。结果表明,本方法适用于多种生物样本的分析,且呈现出弱基质效应,可用纯标准曲线进行快速准确定量,方法灵敏度和精密度高,回收率良好,能够满足实际样品中 17 种目标藻毒素同时测定的要求。此外,对采自中国南海的 51 个生物样品进行了检测,共检出 12 种藻毒素,说明我国南海海洋环境中分布着藻毒素并蓄积在海洋生物体内,需要警惕其风险。

#### 参考文献:

- [1] Berdalet E, Fleming L E, Gowen R, Davidson K, Hess P, Backer L C, Moore S K, Hoagland P, Enevoldsen H. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **2016**, 96(1): 61-91.
- [2] Gobler C J. *Harmful Algae*, **2020**, 91: 101731.
- [3] Solino L, Costa P R. *Toxicon*, **2018**, 150: 124-143.
- [4] Chen J, Li X, Wang S, Chen F, Cao W, Sun C, Zheng L, Wang X. *Chemosphere*, **2017**, 168: 32-40.
- [5] Gerssen A, Mulder P P J, De Boer J. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 685(2): 176-185.
- [6] Visciano P, Schirone M, Berti M, Milandri A, Tofalo R, Suzzi G. *Front. Microbiol.*, **2016**, 7: 1051.
- [7] Wang D Z. *Mar. Drugs*, **2008**, 6(2): 349-371.
- [8] GB5009.274-2016. Determination of Ciguatoxins in Shellfish. National Standards of the People's Republic of China(水产品中西加毒素的测定. 中华人民共和国国家标准), **2016**.
- [9] European Food Safety Authority. *EFSA J.*, **2008**, 589: 1-62.
- [10] European Food Safety Authority. *EFSA J.*, **2009**, 7(6): 1109.
- [11] European Food Safety Authority. *EFSA J.*, **2010**, 8(6): 1627.
- [12] European Food Safety Authority. *EFSA J.*, **2010**, 8(6): 1628.
- [13] European Food Safety Authority. *EFSA J.*, **2010**, 8(7): 1677.
- [14] GB5009.212-2016. Determination of Diarrhetic Shellfish Poison Residues in Shellfish. National Standards of the People's Republic of China(贝类中腹泻性贝类毒素的测定. 中华人民共和国国家标准), **2016**.
- [15] GB5009.261-2016. Determination of Neurotoxic Shellfish Poison Residues 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), **2016**.
- [16] SN/T 4251-2015. Determination of Azaspiracid Shellfish Poison Residues in Shellfish. Industry Standards of the People's Republic of China Entry-Exit Inspection and Quarantine(出口贝类中原多甲藻酸类贝类毒素的测定 液相色谱-质谱/质谱法. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准), **2015**.
- [17] Liu Y, Zhang P, Du S, Lin Z, Zhou Y, Chen L, Yu R, Zhang L. *Chemosphere*, **2020**, 243: 125352.
- [18] Liu C, Ji Y, Zhang L, Qiu J, Wang Z, Liu L, Zhuang Y, Chen T, Li Y, Niu B. *J. Hazard. Mater.*, **2021**, 418: 126285.
- [19] Li J, Ruan Y, Wu R, Cui Y, Shen J, Mak Y L, Wang Q, Zhang K, Yan M, Wu J, Lam P K S. *Environ. Pollut.*, **2022**, 310: 119875.
- [20] Wu H, Chen J, Peng J, Zhong Y, Zheng G, Guo M, Tan Z-J, Zhai Y, Lu S. *Environ. Sci. Technol.*, **2020**, 54: 12366-12375.
- [21] Li J, Yan M, Shen J C, Xiao C G, Mak Y L, Li Y, Guo J N, Zhong R S. *J. Instrum. Anal.* (李静, 晏萌, 沈金灿, 肖陈贵, 麦艳玲, 李杨, 郭建宁, 钟润生. 分析测试学报), **2023**, 42(2): 181-188.
- [22] Mak Y L, Lin S S, Xiao C G, Yue Z F, Wu J J, Kang H N, Lin Q S, Chan L. *J. Food Saf. Qual.* (麦艳玲, 林珊珊, 肖陈贵, 岳振峰, 吴佳俊, 康海宁, 林群声, 陈荔. 食品安全质量检测学报), **2014**, 5(11): 3520-3528.
- [23] Wang L, Shi X, Zhao Q, Sun A, Li D, Zhao J. *Food Chem.*, **2019**, 272: 427-433.
- [24] Lewis R J, Yang A J, Jones A. *Toxicon*, **2009**, 54(1): 62-66.
- [25] Regueiro J, Rossignoli A E, Alvarez G, Blanco J. *Food Chem.*, **2011**, 129(2): 533-540.
- [26] García-Altares M, Diogene J, de la Iglesia P. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1275: 48-60.
- [27] Carabias-Martinez R G E, Revilla-Ruiz P, Hernandez-Mendez J. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1089: 1-17.
- [28] Stewart I, Eaglesham G K, Poole S, Graham G, Paulo C, Wickramasinghe W, Sadler R, Shaw G R. *Toxicon*, **2010**, 56(5): 804-812.
- [29] Draisci R M C, Palleschi L, Cammarata P, Cavalli S. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 753: 217-223.
- [30] Poerschmann J C R. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1127: 18-25.
- [31] Poerschmann J T U, Biedermann W, Truyen U, Lucker E. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1127: 26-33.
- [32] Mak Y L, Wai T C, Murphy M B, Chan W H, Wu J J, Lam J C, Chan L L, Lam P K. *Environ. Sci. Technol.*, **2013**, 47(24): 14070-14079.