

海产贝类脂溶性贝毒素的高效液相色谱-串联质谱分析方法及其食用安全性评价

申慧慧^{1,2} 陈军辉^{*2,3} 徐秀丽¹ 潘蕾² 何秀平² 王小如^{2,3}

¹(中国地质大学, 海洋学院, 北京 100083)

²(国家海洋局第一海洋研究所, 海洋生态研究中心, 青岛 266061) ³(厦门华夏学院, 厦门 361024)

摘 要 针对海产贝类存在多种脂溶性贝毒素复合污染的现状, 采用高效液相色谱-串联质谱联用技术 (HPLC-MS/MS) 对海产贝类中的常见脂溶性贝毒素进行同步检测, 结合多种毒素复合污染的风险评估方法, 用于市售海产贝类的食用安全风险评价。结果表明, 在选定的实验条件下, 8 种典型脂溶性贝毒素加标回收率在 63.2% ~ 88.8% 之间, 方法的精密度 (相对标准偏差 (RSD) $\leq$ 14.5%) 和灵敏度 (检出限为 0.5 ~ 2.7 ng/g) 良好, 能满足海产贝类样品的检测要求。在采集的 105 个市售海产贝类样品中, 42.86% 的样品中至少检出了一种脂溶性贝毒素, 其中鳍藻毒素-1 (DTX1) 的含量均值最高, 为 47.6 μ g/kg, 对海产贝类污染最严重。根据每日人均贝类摄入量 (TDI) 和各种脂溶性贝毒素的急性中毒参考剂量 (ARfD), 通过计算综合风险指数 Σ ERI 进行市售海产贝类食用安全性评价, 结果表明, 在所检测的样品中, 存在食用安全隐患和高风险的市售海产贝类比率为 19.05%, 其中扇贝的食用安全风险最大。本研究建立的基于海产贝类中脂溶性贝毒素物质组复合污染的风险评价方法, 与欧盟的海产品贝毒素限量标准评价方法 (单指标法) 相比更加严格, 可以使贝类食用者更好地规避中毒风险。

关键词 高效液相色谱-串联质谱; 海产贝类; 脂溶性贝毒素; 复合污染; 食品安全

1 引言

海产贝类种类繁多, 味道鲜美, 是人们餐桌上常见的海洋食品。由于近海环境富营养化加剧, 有害藻华时有发生, 加之海产贝类独特的滤食习性, 对海洋有害藻中的毒素具有很强的蓄积能力^[1,2]。因此, 世界各地的海产贝类消费者均不同程度地遭受染毒海产品带来的健康威胁。目前已发现的海洋贝毒素及其衍生物有 200 多种, 其中脂溶性贝毒素约占 90%^[3], 常见的脂溶性贝毒素主要包括大田软海绵酸 (OA) 及其衍生物鳍藻毒素-1 (DTX1)、虾夷扇贝毒素 (YTX)、原多甲藻毒素 (AZAs)、米氏裸甲藻毒素 (GYM)、螺环内酯毒素 (SPX1)、扇贝毒素-2 (PTX2) 等。食用脂溶性贝毒素污染的贝类而引起的中毒事件, 在全球范围内时有发生。我国海产贝类也正遭受不同种类脂溶性贝毒素的污染威胁^[4], 中毒事件屡有发生^[5,6]。因此, 需加强对市售海产贝类中脂溶性贝毒素的检测及其食用安全风险评价, 保护食用者的健康。

目前, 用于海产品中脂溶性贝毒素检测的方法主要包括小鼠生物法^[7]、酶联免疫吸附法^[8]、高效液相色谱法^[9]和液相色谱-质谱/多级质谱法^[10]等。与前几种方法相比, 液相色谱-串联质谱法具有检测速度快、准确性高、检出限低以及可以同时检测多种类型贝毒素的优点而被广泛应用^[10~12], 也是目前检测贝类中脂溶性贝毒素的最佳方法。然而, 仅凭海产贝类中几种主要脂溶性贝毒素的含量测定结果, 仍然无法准确评价贝类的食用安全风险, 特别是对于被多种脂溶性贝毒素复合污染的海产品, 仍需发展适用性较强的食用安全风险评价方法。

目前, 在国际上针对海产品中的几种常见脂溶性贝毒素, 基于其小鼠毒理实验数据^[13], 制定了相关的限量标准, 用于指导管理部门进行海产品食用安全性评价。例如, 欧盟食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 对贝类中的 OA、DTX、AZA、PTX 毒素的限量标准均设定为 160 μ g/kg, YTX 的限

2017-08-10 收稿; 2018-03-28 接受

本文系中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (Nos. 2018Q08, 2016S02) 和国家基金委-山东省联合基金项目 (Nos. U1706217, U1606404) 资助

* E-mail: jhchen@fio.org.cn

量标准为 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[14,15]; GYM 和 SPX 毒素目前还没有设定限量标准。但是,我国仅针对 OAs 系列脂溶性贝毒素设定了限量标准,其它脂溶性贝毒素均未设定限量标准。然而,采用 EFSA 制定的限量标准法,仅适用于评价受一种或少数几种高含量(超过限量值)毒素污染海产品的食用安全性,对于被低浓度或中等浓度的多种脂溶性贝毒素复合污染的海产品,则无法给出可靠的食用安全性评价结果。因此,针对海产贝类存在多种脂溶性贝毒素复合污染的现状,发展基于多种脂溶性贝毒素污染综合评价的海产贝类食用安全风险方法极为紧迫。本研究采用高效液相色谱-多级质谱分析海产贝类中多种脂溶性贝毒素,建立一种基于多种脂溶性贝毒素污染综合评价的海产贝类食用安全风险评估新方法,并用于市售海产贝类的食用安全风险评价。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有四元泵、可变波长检测器、自动进样器等; 6320 型离子阱质谱仪(美国 Agilent 公司),配有电喷雾(ESI)离子源; FSH-2A 可调高速匀浆机(金坛市城西峰嵘实验仪器厂); KQ-400KDE 型高功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司); Himac CR22GII 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司); BSA224S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司); Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

氨水和甲酸(质谱纯,Fluka 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯,美国 TEDIA 公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$); OA 和 DTX1 毒素标准品(北京伊普瑞斯科技有限公司); YTX、AZA1、AZA2、GYM、SPX1、PTX2 毒素(全称见表 1)标准品(加拿大国家研究委员会海洋生命科学研究所)。

2.2 对照品溶液的配制

毒素标准溶液用甲醇稀释,配成混合标准溶液。各组分的浓度分别为:OA($15.00 \mu\text{g}/\text{L}$)、YTX($24.58 \mu\text{g}/\text{L}$)、DTX1($25.00 \mu\text{g}/\text{L}$)、AZA1($6.48 \mu\text{g}/\text{L}$)、AZA2($6.12 \mu\text{g}/\text{L}$)、GYM($12.50 \mu\text{g}/\text{L}$)、SPX1($35.29 \mu\text{g}/\text{L}$)和 PTX2($11.02 \mu\text{g}/\text{L}$)。

2.3 样品采集及前处理

2017 年 3 月,从青岛市 5 个行政区内具有代表性的水产品市场(市北区南山水产品市场(SB)、市南区小港水产品市场(SN)、城阳水产品市场(CY)、崂山区沙子口水产品市场(LS)和黄岛区水产品市场(HD))共采集 105 份海产贝类样品,包括菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、扇贝(*Vere pectines*)、缢蛏(*Sinonovacula constrzeta*)、毛蛤(*Scapharca subcrenata*)、牡蛎(*Ostrea gigas thunberg*)、海螺(*Busycon canaliculatu*)、贻贝(*Mytilidae*)共 7 种海产贝类。

准确称取 2.00 g 经匀浆处理的贝类组织样品,置于离心管中,加入 6.0 mL 甲醇,超声振荡提取 15 min , $6000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min ,移出上清液并重复提取一次,合并 2 次所得提取液。取上清液 1.2 mL ,加入 2.8 mL 超纯水,过 Waters HLB 200MG HLB 固相萃取柱(预先用 1.0 mL 甲醇和 1.0 mL 30% (V/V) 甲醇活化处理),再用 1.0 mL 20% (V/V) 甲醇淋洗,用 2.0 mL 甲醇(含 0.3% 氨水)洗脱,收集洗脱液,过 $0.22 \mu\text{m}$ 的尼龙微孔滤膜,滤液待测。

2.4 色谱-质谱条件

2.4.1 色谱条件 ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱($150 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$, 美国 Agilent 公司),流动相 A 为水,流动相 B 为 90% 乙腈(流动相 A 和 B 均含有 $6.7 \text{ mmol}/\text{L}$ 氨水)。梯度洗脱程序: $0 \sim 15 \sim 20 \sim 45 \sim 48 \text{ min}$, $20\% \sim 30\% \sim 47.5\% \sim 100\% \sim 20\%$ 流动相 B。流速 $0.4 \text{ mL}/\text{min}$; 进样体积为 $5 \mu\text{L}$; 柱温:室温($20 \pm 2^\circ\text{C}$)。停止时间: 48 min ; 平衡时间: 8 min 。

2.4.2 质谱条件 电喷雾电离源(ESI); OA、AZA1、AZA2、GYM、SPX1 和 PTX2,采用 ESI⁺模式检测; YTX 和 DTX1 采用 ESI⁻模式检测,扫描范围 m/z $100 \sim 1300$ 。雾化气(N_2)压力 275.79 kPa ; 干燥气(N_2)流速 $11 \text{ L}/\text{min}$; 干燥气温度 350°C ; 毛细管电压 4000 V 。根据各组分的色谱保留时间和一级、二级质谱特征优化参数,按时间分段选用多反应离子监测(MRM)模式对各组分进行质谱检测。各目标化合物的保留时间、MRM 选择的母离子以及各化合物定性与定量离子、碰撞能量等参数见表 1。

表 1 8 种脂溶性贝毒素质谱分析(MRM 模式)参数
Table 1 MS/MS parameters in multi-reaction monitoring (MRM) mode for detection of 8 kinds of lipophilic shellfish toxins

化合物 Compound	分子式 Molecular formula	保留时间 Retention time (min)	母离子 Precursor ions (<i>m/z</i>)	定性和定量离子 Qualitative and quantitative ions (<i>m/z</i>)	Fragmentation Ampl
大田软海绵酸 Okadaic Acid (OA)	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	10.6	[M+Na] ⁺ 827.4	809.3/723.3	1.0
虾夷扇贝毒素 Yessotoxin (YTX)	C ₃₅ H ₈₂ O ₂₁ S ₂	18.0	[M-H] ⁻ 1141.5	1123.4/1061.4	1.5
鳍藻毒素-1 Dinophysistoxin 1 (DTX1)	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃	19.2	[M-H] ⁻ 817.4	799.3/563.1	1.5
原多甲藻酸贝毒-1 Azaspiracids (AZA1)	C ₄₇ H ₇₁ NO ₁₂	24.8	[M+H] ⁺ 842.4	824.4/806.4	0.9
原多甲藻酸贝毒-2 Azaspiracids (AZA2)	C ₄₈ H ₇₃ NO ₁₂	25.5	[M+H] ⁺ 856.5	838.4/820.5	1.1
米氏裸甲藻毒素 Gymnodimine (GYM)	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄	31.5	[M+H] ⁺ 508.3	490.5/392.5	1.0
螺环内酯毒素 13-Desmethyl Spirolide C (SPX1)	C ₄₂ H ₆₁ NO ₇	34.7	[M+H] ⁺ 692.4	674.4/656.4	1.1
扇贝毒素-2 Pectenotoxin (PTX2)	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄	35.5	[M+NH ₄] ⁺ 876.4	805.7/823.4	1.0

2.5 海产贝类食用安全风险评价方法

根据海产贝类消费者脂溶性贝毒素每日人均摄入量(TDI)和各种脂溶性贝毒素急性中毒参考剂量(ARfD)^[16],通过计算脂溶性贝毒素物质组产生的综合食用安全性风险指数ΣERI(ΣERI=Σ(TDI/ARfD)),进行市售海产贝类食用安全性评价。当0≤ΣERI<0.1时,海产贝类食用非常安全;当0.1≤ΣERI<1时,海产贝类食用存在安全隐患;当ΣERI≥1时,海产贝类食用风险高。

依据 WHO/FAO 推荐的《食品中化学物质膳食暴露评价》方法中“点评估法”,基于一个体重为 60 kg 的成年人每日分别消费 100 g^[17]、250 g^[18]或 380 g^[13] 贝肉。根据公式(1)计算 TDI[μg/(kg·d)]:

$$TDI = C_i CQ / BW / 1000 \tag{1}$$

其中,C_i为海产贝类样品中脂溶性贝毒素的含量(μg/kg);C 为海产贝类日消费量(g/d);Q 为海产贝类毛重与可食部分重量的比值;BW 为人体体重(Body weight, kg)。

各种脂溶性贝毒素均采用 EFSA 规定的 ARfD(表 2),对于 EFSA 未规定的环亚胺类贝毒素(SPX1 和 GYM 等),参考现有脂溶性贝毒素小鼠毒理实验数据,例如,OA、SPX1 和 GYM 的腹腔注射染毒方式对小鼠的半数致死剂量 LD₅₀ 分别为 204 μg/kg(BW)^[19]、6.9 μg/kg(BW)^[20]和 96 μg/kg(BW)^[21],OA 系列贝毒素的化学急性中毒参考剂量 ARfD 为 0.3 μg/(kg·bw),采用“毒素归一法”计算 SPX 系列和 GYM 贝毒素的化学急性中毒参考剂量 ARfD 分别为 0.01 和 0.14 μg/(kg·bw)(表 2)。“毒素归一法”是指基于小鼠生物毒理实验的毒性参数,按照其毒性比例,根据已知急性参考剂量的毒素计算未知急性参考剂量毒素的方法。

表 2 8 种脂溶性贝毒素的急性中毒参考剂量
Table 2 Acute reference dose(ARfD) of 8 kinds of lipophilic shellfish toxins

脂溶性贝毒素物质组 Lipophilic shellfish toxin groups	OA 贝毒素组 (OA 和 DTX1)	AZA 贝毒素组 (AZA1 和 AZA2)	PTX 贝毒素组 (PTX2)	YTX 贝毒素组 (YTX)	SPX 贝毒素组 (SPX1 和 GYM)
急性中毒参考剂量 ARfD[μg/(kg·bw)]	0.3 OA	0.2AZA1	0.8PTX2	25YTX	0.01SPX1/0.14GYM

3 结果与讨论

3.1 色谱-质谱条件确定及方法学考察

在前期研究^[22~24]中,采用 HPLC-MS/MS 对海水、海水悬浮颗粒物和沉积物中多种脂溶性贝毒素进行同步分离、检测。在此基础上,依据文献中贝类组织中脂溶性贝毒素的样品处理方法^[25~28],通过对样品处理方法的优化,实现了对海产贝类组织中 8 种典型脂溶性贝毒素构成物质组的有效提取,添加脂溶性贝毒素标准品的空白贝类组织样品中 8 种脂溶性贝毒素检测提取离子图见图 1,可以看出,在优化的条件下,各化合物实现了良好分离和检测。

为了评价贝类样品基质对 8 种目标毒素定量测定的影响,采用空白贝类组织样品的粗提液配制

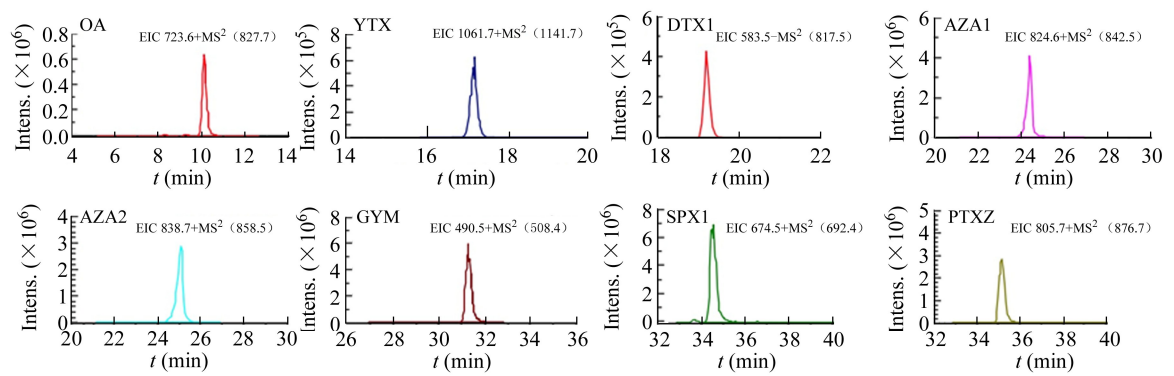


图 1 加标空白贝类组织样品 HPLC-MS/MS 分析 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of blank shellfish tissue spiked with eight lipophilic shellfish toxin standards for HPLC-MS/MS analysis

8 种脂溶性贝毒素混合标准溶液,以甲醇配制的同一浓度水平的混合标准溶液作为对比,通过 MS/MS 分析测得各目标化合物的峰面积,基质效应 (ME) 按公式(2) 计算:

$$ME(\%) = (A_s - A_x) / A_s \times 100$$

(2)

式中, A_x 为空白贝类组织提取液配制毒素混合标准中目标化合物的峰面积; A_s 表示相同浓度水平甲醇配制标准样品中毒素的峰面积。实验结果表明(表 3),贝类组织提取液中的基质组分对各目标化合物的质谱信号有一定程度的增强作用,增强率在 1.65% ~ 7.45% 范围内,说明基质效应对检测结果的准确度影响不大。因此,采用甲醇溶液逐级稀释 8 种毒素混合标准溶液外标法,对目标化合物进行测定,以各目标化合物测得的峰面积 y 为纵坐标,所测目标化合物的质量浓度 x 为横坐标,绘制定量测定标准曲线。将 HPLC-MS/MS 检测信噪比 (S/N) 为 3 时对应的各目标化合物的质量浓度作为方法的检出限 (LOD), $S/N=10$ 时对应的质量浓度为定量限 (LOQ)。8 种脂溶性贝毒素检测的回归方程、相关系数、线性范围、检出限及定量限如表 3 所示,8 种脂溶性贝毒素的相关系数 (R^2) ≥ 0.995 ,表明每种毒素在其定量线性范围内线性关系好,各种毒素的检出限和定量限均远低于欧盟对海产贝类中脂溶性贝毒素限量规定,说明本方法能够满足海产贝类中 8 种脂溶性贝毒素的定量分析要求。

表 3 本方法的线性范围、灵敏度和基质效应实验结果

Table 3 Linear range, sensitivity and matrix effects of the developed method

化合物 Compound	线性范围 Linear range (ng/g)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	检出限 LOD (ng/g)	定量限 LOQ (ng/g)	基质效应 Matrix effects (%)
大田软海绵酸 (OA)	1.7 ~ 172	$y = 10.193x + 287388$	0.9963	1.3	1.7	+2.80
虾夷扇贝毒素 (YTX)	2.4 ~ 238	$y = 2.5794x + 44980$	0.9975	1.4	2.4	+7.36
鳍藻毒素-1 (DTX1)	2.6 ~ 258	$y = 24.098x - 65949$	0.9999	1.6	2.6	+1.65
原甲藻酸贝毒-1 (AZA1)	2.2 ~ 216	$y = 59.656x + 67476$	0.9985	0.5	2.2	+5.07
原甲藻酸贝毒-2 (AZA2)	2.9 ~ 289	$y = 54.925x + 476523$	0.9999	0.7	2.9	+4.67
米氏裸甲藻毒素 (GYM)	1.8 ~ 185	$y = 96.638x + 793914$	0.9994	0.9	1.8	+3.85
螺环内酯毒素 (SPX1)	3.4 ~ 340	$y = 118.61x + 2000000$	0.9992	1.7	3.4	+5.00
扇贝毒素-2 (PTX2)	3.6 ~ 358	$y = 4.1032x + 5877.4$	0.9997	2.7	3.6	+7.45

注: +; 信号增强 (Signal enhancement)。

采用标准加入法测定方法的回收率,分别将 100、200 和 300 μ L 的 8 种毒素混合标准溶液加入到 2.00 g 空白贝类组织样品中,每个添加水平平行处理 3 份,按照样品溶液制备方法处理样品,同时以相同未加标空白贝类组织样品作为对照。8 种毒素的回收率测定结果及其相对标准偏差 (RSD) 如表 4 所示,在空白样品中添加不同含量的 8 种脂溶性贝毒素的回收率在 63.2% ~ 88.8% 之间,相对标准偏差 (RSD) 均 $\leq 14.5\%$,说明测定结果具有良好的重现性和准确性,能够实现海产贝类样品中各种脂溶性贝毒素的准确定量分析。

3.2 市售海产贝类中脂溶性贝毒素污染物质组检测

对本批次 105 个青岛市售海产贝类样品进行脂溶性贝毒素污染物检测(结果见电子版文后支持信息表 S1),在 45 个样品中至少检出了 1 种脂溶性贝毒素,其检出率为 42.86%;在检出的所有样品中,均未检出 GYM 贝毒素,而其它 7 种脂溶性贝毒素均不同程度地被检出。其中,OA 的检出率最高(24.76%),含量范围为 $\leq$ LOQ $\sim$ 39.61 $\mu\text{g/kg}$;DTX1 含量均值最高,为 47.60 $\mu\text{g/kg}$,其中一个样品中 DTX1 的含量达到了 202.54 $\mu\text{g/kg}$,超出欧盟对 DTX1 的限量标准(160 $\mu\text{g/kg}$)^[11]。贝类样品中检出 AZA1 和 AZA2 的含量均未达到方法的 LOQ,说明受这两种毒素污染较轻。YTX、PTX2 和 SPX1 的检出率相当,均不超过 10.0%,其中 PTX2 的含量均值高于 YTX 和 SPX1,达到 13.13 $\mu\text{g/kg}$ 。本研究结果与文献[29]中对青岛市售贝类中毒素检测结果相比,本实验在青岛市售贝类中还检测到 DTX1、AZA1、AZA2 和 SPX1 等毒素,并且 DTX1 的检出率和含量较高。不同种类海产贝类中脂溶性贝毒素含量存在明显差异(电子版文后支持信息表 S2),在本批次青岛市售的 7 种海产贝类样品中,扇贝污染脂溶性贝毒素种类最多,包括 OA、DTX1、AZA1、AZA2、SPX1 和 PTX2,其中 DTX1 含量均值最高,为 72.90 $\mu\text{g/kg}$ 。按照贝毒素染毒率高低评价不同贝类被毒素的污染程度,将其分成 4 类,扇贝染毒率 $>60.00\%$,污染最严重,毛蛤染毒率介于 40.0% $\sim$ 60.0%之间,菲律宾蛤仔、缢蛏和牡蛎染毒率在 20.0% $\sim$ 40.0%范围内,海螺和贻贝的染毒率均 $<20.0\%$,污染最轻。

表 4 加标回收率和精密度实验结果
Table 4 Results of recovery and precision

脂溶性贝毒素 Lipophilic shellfish toxins	添加水平 Added level					
	100(μL)		200(μL)		300(μL)	
	回收率 Recovery (%)	RSD (%, $n=3$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, $n=3$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, $n=3$)
大田软海绵酸(OA)	87.3	5.2	88.5	7.9	88.8	6.3
虾夷扇贝毒素(YTX)	86.1	4.7	83.9	10.3	84.8	7.1
鳍藻毒素-1(DTX1)	85.3	9.3	87.4	6.4	82.4	4.8
原多甲藻酸贝毒-1(AZA1)	78.3	10.4	80.0	8.1	81.5	4.6
原多甲藻酸贝毒-2(AZA2)	71.3	12.5	73.3	9.7	72.2	8.3
米氏裸甲藻毒素(GYM)	73.3	6.4	78.3	8.4	80.9	4.4
螺环内酯毒素(SPX1)	69.3	13.6	73.6	10.6	71.1	8.3
扇贝毒素-2(PTX2)	65.5	14.5	68.4	12.4	63.2	9.8

3.3 市售海产贝类食用安全风险评价

基于本批次青岛市售海产贝类中脂溶性贝毒素物质组的检测结果(电子版文后支持信息表 S1),计算市售染毒贝类的 Σ ERI,结果如表 5 所示。在本批次青岛市售海产贝类样品中,存在安全隐患和高风险的贝类是扇贝、毛蛤、缢蛏和贻贝,分别在各自种类的样品中的风险百分率为 73.33%、33.33%、20.00% 和 6.67%;根据表 5 中 Σ ERI 的计算结果,基于贝类消费者每天摄入海产贝类 250 g,对存在安全隐患和高风险的市售海产贝类进行同种毒素贡献率计算(结果见电子版文后支持信息表 S3),在各种脂溶性贝毒素中,DTX1 的 ARfD 总贡献率最高,达到了 53.72%,所以 DTX1 是本批次青岛市售海产贝类最主要的食用风险因子。扇贝和毛蛤中 DTX1 的 ARfD 贡献率分别为 69.02% 和 85.46%,是导致本批次这两种海产贝类食用风险高的主要原因。

本批次 105 个贝类样品食用风险评估结果见表 5,存在食用安全风险的样品占总样品比率为 19.05%,其中存在食用安全隐患和高食用风险的样品比率分别为 6.67% 和 12.38%;而根据欧盟的限量标准进行评估,食用安全风险率仅为 0.95%;与欧盟的限量标准评估方法(单指标法)相对比,本研究发展的基于脂溶性贝毒素污染物质组的评估方法,综合计算多种脂溶性贝毒素复合污染造成的食用安全风险,特别适合用于被多种毒素同步污染的贝类产品的食用安全性评价,虽然评估结果较欧盟的限量标准法更为严格,但是能更好地降低贝类消费者中毒的风险。在 2009 年的欧洲食品安全局 EFSA 科学观点报告中,建议研究发展含有多多种贝毒素的贝类食用风险评估方法^[30]。因此,发展基于多种脂溶性贝毒素复合污染的海产贝类食用安全风险评价方法是非常必要的,为海产品质量管理部门进行海产

贝类食用安全风险评价提供科学依据。

表 5 市售海产贝类食用安全风险评估结果

Table 5 Results of food safety risk assessment for commercially available marine shellfishes

海产贝类 Marine shellfishes	C=100 g/d		C=250 g/d		C=380 g/d	
	Σ ERI	风险评估 Risk assessment	Σ ERI	风险评估 Risk assessment	Σ ERI	风险评估 Risk assessment
SB 扇贝 1#(SB Scallop 1#)	0.32	HD	0.80	HD	1.12	HR
SB 扇贝 2#(SB Scallop 2#)	0.42	HD	1.06	HR	1.49	HR
SB 扇贝 3#(SB Scallop 3#)	0.34	HD	0.84	HD	1.18	HR
SB 毛蛤 1#(SB Hiattula chinensis 1#)	0.23	HD	0.57	HD	0.80	HD
SN 毛蛤 1#(SN Hiattula chinensis 1#)	0.24	HD	0.59	HD	0.83	HD
SN 毛蛤 2#(SN Hiattula chinensis 2#)	0.21	HD	0.54	HD	0.76	HD
CY 缢蛏 1#(CY Sinonovacula constricta 1#)	2.11	HR	5.30	HR	7.40	HR
CY 缢蛏 2#(CY Sinonovacula constricta 2#)	2.51	HR	6.31	HR	8.80	HR
CY 缢蛏 3#(CY Sinonovacula constricta 3#)	1.80	HR	4.50	HR	6.30	HR
CY 扇贝 1#(CY Scallop 1#)	1.97	HR	4.94	HR	6.85	HR
CY 扇贝 2#(CY Scallop 2#)	2.06	HR	5.10	HR	7.23	HR
LS 扇贝 1#(LS Scallop 1#)	1.53	HR	3.82	HR	5.35	HR
LS 扇贝 2#(LS Scallop 2#)	1.91	HR	4.87	HR	6.70	HR
LS 扇贝 3#(LS Scallop 3#)	1.73	HR	4.33	HR	6.05	HR
LS 毛蛤 1#(LS Hiattula chinensis 1#)	3.58	HR	8.85	HR	12.38	HR
LS 毛蛤 2#(LS Hiattula chinensis 2#)	0.13	HD	0.32	HD	0.45	HD
LS 贻贝 1#(LS Mussel 1#)	0.12	HD	0.31	HD	0.44	HD
LS 贻贝 2#(LS Mussel 2#)	0.002	VHS	0.0059	VHS	0.008	VHS
LS 贻贝 3#(LS Mussel 3#)	0.003	VHS	0.008	VHS	0.01	VHS
HD 扇贝 1#(H Scallop 1#)	0.50	HD	1.25	HR	1.75	HR
HD 扇贝 2#(H Scallop 2#)	0.61	HD	1.51	HR	2.14	HR
HD 扇贝 3#(H Scallop 3#)	0.43	HD	1.08	HR	1.51	HR
所有样品中安全样品占比 The percentage of VHS samples(%)	80.95		80.95		80.95	
所有样品中存在隐患样品占比 The percentage of HD samples (%)	10.48		6.67		4.76	
所有样品中高风险样品占比 The percentage of HR samples (%)	8.57		12.38		14.29	

注:HR:高风险(High risk); HD: 存在隐患(Hidden dangers); VHS:非常安全(Very high safety)

4 结 论

采用本研究建立的基于脂溶性贝毒素物质组 HPLC-MS/MS 分析的海产贝类食用安全风险评价方法,可以得出多种脂溶性贝毒素复合污染造成的总和食用安全风险,与欧盟食品安全局的限量标准法相比,能够更严苛地评价市售海产品的食用安全质量,降低消费者食用海产贝类的中毒风险,更好地保障贝类消费者的健康。在后续研究中可以采用液相色谱-高分辨率质谱联用技术,对市售海产贝类中有文献报道的所有贝毒素进行筛查分析,将更多种类的贝毒素及其衍生物纳入到海产贝类食用安全性评价指标体系中。

References

1 LJia-Wen, JIANG Tao, WU Feng, JIANG Tian-Jiu. *J. Jinan U.*, **2014**, 35(3): 228-234
李嘉雯, 江 涛, 吴 锋, 江天久. 暨南大学学报, **2014**, 35(3): 228-234

2 LIU Ren-Yan, GAO Chun-Lei, LIANG Yu-Bo, ZHANG Fang, LIU Yong-Jian, XU Dao-Yan. *Acta Oceanol. Sin.*, **2008**, 30(6): 171-176
刘仁沿, 高春蕾, 梁玉波, 张 芳, 刘永健, 许道艳. 海洋学报, **2008**, 30(6): 171-176

3 Gerssen A, Mulder P P, De B J. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 685(2): 176-185

- 4 LIU Ren-Yan, LIU Lei, LIANG Yu-Bo, YU Ji, XU Dao-Yan, WEI Ning, YANG Lin, GUO Hao. *Marine. Environ. Sci.*, **2016**, 35(5): 787-800
刘仁沿, 刘磊, 梁玉波, 于姬, 许道艳, 韦宁, 杨琳, 郭浩. 海洋环境科学, **2016**, 35(5): 787-800
- 5 Li A F, Ma J G, Cao J J, McCarron P. *Toxicon*, **2012**, 60(3): 420-425
- 6 ZHONG Yuan-Fang, JIANG Hai-Tang, LI Yun-Feng, CHEN Rong-Kai, LIN Wei. *Chinese. Prim. Heal. Care*, **2014**, 28(2): 104-105
钟苑芳, 江海棠, 李云峰, 陈荣凯, 林维. 中国初级卫生保健, **2014**, 28(2): 104-105
- 7 Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1978**, 44(11): 1249-1255
- 8 ZHAO Qian-Cheng, LAI Peng, QIN Cheng, WANG Chong, WU Bin, LIU Di, CHANG Ya-Qing. *Food. Sci. Technol.*, **2009**, (11): 287-292
赵前程, 来鹏, 秦成, 王翀, 吴斌, 刘迪, 常亚青. 食品科技, **2009**, (11): 287-292
- 9 Lee J S, Yanagi T, Kenma R, Yasumoto T. *Agr. Biol. Chem.*, **1987**, 51(3): 877-881
- 10 Gerssen A, Mulder P P, Mcelhinney M A, De B J. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(9): 1421-1430
- 11 Regueiro J, Rossignoli A E, Alvarez G, Blanco J. *Food Chem.*, **2011**, 129(2): 533-540
- 12 CHEN Jian-Gang, ZHU Bing-Hui, LIANG Su-Dan, ZHANG Gui, WU Xi-Mei. *Chinese J. Food Hygiene*, **2015**, 27(6): 624-629
陈剑刚, 朱炳辉, 梁素丹, 张瑰, 吴西梅. 中国食品卫生杂志, **2015**, 27(6): 624-629
- 13 TAN Zhi-Jun, WU Hai-Yan, GUO Meng-Meng, YANG Fan, WANG Lian-Zhu, LI Zhao-Xin, ZHAI Yu-Xiu. *J. Fishery Sci.*, **2013**, 20(2): 467-479
谭志军, 吴海燕, 郭萌萌, 杨帆, 王联珠, 李兆新, 翟毓秀. 中国水产科学, **2013**, 20(2): 467-479
- 14 Commission decision 2002/225/EC of 15 March 2002 laying down detailed rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echino-derms, tunicates and marine gastropods. *Off. J. Eur. Communities*, **2002**: 62-63
- 15 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. *Off. J. Eur. Union*, **2004**, L226: 22-82
- 16 YU Hong, LI Xiao-Jing, LIU Miao, XIE Jin, PENG Rong-Fei. *Chinese J. Health. Lab. Technol.*, **2014**, (18): 2702-2704
于鸿, 李晓晶, 刘苗, 谢进, 彭荣飞. 中国卫生检验杂志, **2014**, (18): 2702-2704
- 17 Munday R, Reeve J. *Toxins*, **2013**, 5(11): 2109-2137
- 18 Lawrence J, Loreal H, Toyofuku H, Hess P, Iddya K, Ababouch L. Assessment and Management of Biotoxin Risks in Bivalve Molluscs. *FAO Fisheries and Aquaculture. Technical Paper No. 551*, Rome: FAO, **2011**: 43-44
- 19 Henshilwood K, Deegan B, McMahon T, Cusack C, Keaveney S, Silke J, Ocinneide M, Lyons D, Hess P. *Proceedings of the 5th International conference on Molluscan Shellfish Safety*, Ireland: Galway, **2006**: 464-468
- 20 Munday R, Aune T, Rossini G P. *Toxicology of the Yessotoxins*, Florida: Taylor & Francis, **2008**: 329-339
- 21 Munday R, Towers N R, Mackenzie L, Beuzenberg V, Holland P T, Miles C O. *Toxicon*, **2004**, 44(2): 173-178
- 22 Li X, Li Z Y, Chen J H, Shi Q, Zhang R T, Wang S, Wang X R. *Chemosphere*, **2014**, 111: 560-567
- 23 WANG Yan-Long, CHEN Jun-Hui, GAO Li-Yuan, WANG Shuai, ZHENG Xiao-Ling, SUN Cheng-Jun, WANG Xiao-Ru. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(3): 335-341
王艳龙, 陈军辉, 高莉媛, 王帅, 郑晓玲, 孙承君, 王小如. 分析化学, **2016**, 44(3): 335-341
- 24 Wang Y L, Chen J H, Li Z Y, Wang S, Shi Q, Cao W, Zheng X L, Sun C J, Wang X R, Zheng L. *Mar. Pollut. Bull.*, **2015**, 101(2): 954-960
- 25 MU Qing-Lin, FANG Jie, WAN Han-Xing, WANG Xiao-Hua, CAO Liu-Yan, ZHANG Qing-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(1): 111-114
母清林, 方杰, 万汉兴, 王晓华, 曹柳燕, 张庆红. 分析化学, **2011**, 39(1): 111-114
- 26 GB 5009.212-2016, *Determination of Lipophilic Shellfish Toxins 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. GB 5009.212-2016
- 27 YAO Jian-Hua, TAN Zhi-Jun, ZHOU De-Qing. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(12): 1714-1720
姚建华, 谭志军, 周德庆. 分析化学, **2010**, 38(12): 1714-1720

- 28 SUN Xing-Quan, ZHENG Qiu-Yue, PANG Yan-Hua, LI Yi-Chen, XIAO Shan-Shan, XU Jing, CAO Ji-Juan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(9): 1423–1427
孙兴权, 郑秋月, 庞艳华, 李一尘, 肖珊珊, 徐静, 曹际娟. 分析化学, **2013**, 41(9): 1423–1427
- 29 DENG Shuo, YU Wei-Sen, LYU Xiao-Jing, TAN Zhi-Jun. *Prev. Med. Trib.*, **2017**, (1): 11–16
邓硕, 于维森, 吕晓静, 谭志军. 预防医学论坛, **2017**, (1): 11–16
- 30 Alexander J, Benford D, Boobis A, Ceccatelli S, Cravedi J P, Domenico A D, Doerge D, Dogliotti E, Edler L, Farmer P, Filipic M, Fink-Gremmels J, Furst P, Guerin T, Knutsen H K, Machala M, Mutti A, Schlatter J, Leeuwen R, Verger P. *The EFSA J.*, **2009**, 1306: 1–23

Development of A High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Lipophilic Toxins in Marine Shellfishes and Edible Safety Evaluation

SHEN Hui-Hui^{1,2}, CHEN Jun-Hui^{*2,3}, XU Xiu-Li¹, PAN Lei², HE Xiu-Ping², WANG Xiao-Ru^{2,3}

¹(School of Ocean Sciences, China University of Geosciences, Beijing 100083, China)

²(Research Center for Marine Ecology, the First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

³(Xiamen Huaxia University, Xiamen 361024, China)

Abstract In view of the present situation that edible marine shellfishes are combinedly contaminated by different kinds of lipophilic toxins, common lipophilic shellfish toxins in marine shellfishes were simultaneously detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the safety risk of commercial marine shellfish was evaluated using the risk assessment method based on combined contamination of various toxins. Under the optimum conditions, satisfactory recoveries (63.3%–88.8%), precision (relative standard deviations $RSD \leq 14.5\%$) and sensitivity (limit of detection in the range of 0.5–2.7 ng/g) of the method were achieved for all the analytes. Among the 105 commercially available shellfish samples, 42.86% of the samples had at least a kind of toxin. The highest average content was 47.6 $\mu\text{g/kg}$ of DTX1, which was the most serious contaminant for marine shellfishes. The total Expose Risk Index (ΣERI) was calculated based on Tolerable Daily Intake (TDI) and Acute Reference Dose (ARfD) of each toxin to evaluate the safety risk of commercial marine shellfish. The results showed that the ratio of commercially available marine shellfish with safety risk was 19.05% and the food safety risk of scallop was the highest. In summary, a new method based on the combined contamination of lipophilic shellfish toxins was successfully developed for risk assessment of the commercial marine shellfish. The proposed method is more harsh compared with the European Food Safety Authority (EFSA) regulation and can make shellfish consumers better to avoid the risk of poisoning.

Keywords Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Marine shellfishes; Lipophilic shellfish toxins; Combined contamination; Food safety

(Received 10 August 2017; accepted 28 March 2018)

This work was supported by the Basic Scientific Fund for National Public Research Institutes of China (Nos. 2018Q08, 2016S02) and the NSFC-Shandong Joint Fund for Marine Ecology and Environmental Sciences (Nos. U1706217, U1606404).