

超高效液相色谱-串联质谱法检测河鲀毒素

王丽英¹, 任贝贝¹, 杨立新^{1,2}, 刘印平¹, 常凤启¹, 路杨^{1*}

(1. 河北省疾病预防控制中心, 石家庄 050021; 2. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘要: **目的** 建立准确、快速检测河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)的超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)的分析方法, 了解市售烤鱼片、鱿鱼干制品和鱼丸中河鲀毒素污染状况。**方法** 样品经2%乙酸/甲醇溶液超声离心提取后, 通过MCX固相萃取柱进行净化处理, 采用液相色谱串联质谱法进行检测。**结果** 市售的107份样品中, 鱿鱼干制品和鱼丸中没有检出TTX; 64份烤鱼片样品中检出16份含有TTX, 检出率为25.0%。**结论** 部分烤鱼片中TTX呈阳性, 建议生产厂家严把原料关, 监管部门应加强对市售烤鱼片标签标识的监管。

关键词: 河鲀毒素; 烤鱼片; 鱿鱼干制品; 鱼丸; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of tetrodotoxin by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Li-Ying¹, REN Bei-Bei¹, YANG Li-Xin^{1,2}, LIU Yin-Ping¹, CHANG Feng-Qi¹, LU Yang^{1*}

(1. Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050021, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of tetrodotoxin (TTX) by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) and to elucidate the contamination situation of TTX in grilled fillet, shredded squid and fish ball. **Methods** TTX was extracted from samples by 2% acetic acid-methanol, and then purified by solid-phase extraction with MCX. The samples were detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Results** TTX was not detected in shredded squid and fish ball. Sixteen grilled fillet samples were detected TTX and the detection rate was 25.0%. **Conclusion** TTX is detected in some grilled fillet. The raw materials should be strictly controlled by manufacturers and the regulatory authorities should increase the regulation standards for the grilled fillet products.

KEY WORDS: tetrodotoxin; grilled fillet; shredded squid; fish ball; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 引言

河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)是鲀鱼类和其他生物体内含有的一种生物碱, 其分子量为319.3, 是一

种小分子量非蛋白质的神经性毒素。TTX中毒潜伏期短, 死亡率高, 毒素吸收后迅速作用于末梢神经和中枢神经系统, 使神经传导产生障碍, 首先感觉神经麻痹, 而后运动神经麻痹, 严重者脑干麻痹导致呼吸

*通讯作者: 路杨, 硕士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: lyxy00357@163.com

*Corresponding author: LU Yang, Chief Technician, Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: lyxy00357@163.com

循环衰竭。TTX 是特异性强的 Na^+ 通道阻断剂。当其位于膜外侧与 Na^+ 通道受体部位结合, 能阻止 Na^+ 进入细胞, 从而阻止神经冲动的发生和传导, 使神经肌肉丧失兴奋性, 抑制与之相关的生理活动^[1]。国内外学者对 TTX 的来源进行了一系列的研究后发现, 河鲀毒素不仅存在于河鲀鱼体内, 而且广泛分布于其他动物体内, 同时, 发现多种细菌也可产生 TTX^[2-4]。TTX 对热稳定, 于 100 °C 处理 24 h 或 120 °C 处理 20~60 min 方可使毒素完全破坏。在烹调过程中 TTX 很难除去。中国 TTX 中毒事件最高为 1993 年, 死亡 147 人。2012 年 7 月, 温州的织纹螺中 TTX 中毒事件, 8 人中毒。2013 年, 即食海产品中(鱼干)发现高浓度 TTX 污染。因此加强河鲀鱼知识宣传, 了解毒性, 避免误食或贪其美味但处理不当而中毒。由于 TTX 毒性强, 染毒生物种类多, 有必要加强对 TTX 的检测工作, 以避免中毒事件的发生。

目前, 国内外 TTX 的分析法主要有酶联免疫吸附法^[5]、荧光分光光度法^[6]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[7-8]、气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[9]、液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS/MS)^[10-15]。国标方法酶联免疫吸附法^[16], 其方法前处理过程复杂, 消耗时间较长, 检测成本较高; HPLC-荧光方法^[17]测定时需要将河鲀毒素进行衍生化处理, 实验步骤较为复杂。本研究参考 GB/T 23217-2008, 对方法进行了改进, 采用固相萃取(solid phase extraction, SPE)技术作为前处理技术, 以超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)作为检测技术, 对市售的 107 份烤鱼片、鱿鱼干制品和鱼丸中的 TTX 污染状况进行研究, 通过检测结果可以了解加工可食用的海产品中的 TTX 污染情况, 有效避免中毒事件的发生。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品

选择河北省 11 个地级市为采样点。样品从每个分采样点辖区的超市和农贸市场分别随机进行采样。全省共采集 64 份烤鱼片、15 份鱿鱼干制品和 28 份鱼丸样品。样品采集后粉碎机打碎, 置于塑料自封袋内, 编号并记录, 于 -20 °C 冰箱冷冻保存。

2.1.2 仪器

Waters TQS 高效液相色谱串联三重四级杆质谱(美国 waters 公司); 电子天平(JJ600); 粉碎机(德国 Retsch); 超声仪(昆山市超声仪器有限公司); 高速台式离心机(Sigma 公司); 氮吹仪(美国 Organomation 公司); MCX 固相萃取柱(60 mg/3 mL)(美国 waters 公司)。

2.1.3 试剂及标准溶液

乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 甲酸(色谱纯, 德国默克公司); 甲酸铵(色谱纯, 天津科密欧); TTX 标准品(纯度 98%, 美国 Sigma 公司); 实验用水均为屈臣氏蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 液相色谱条件

色谱柱为: Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 液相色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流速为 0.4 mL/min; 进样量 5 μL, 柱温 30 °C; 流动相: A: 10 mmol/L 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵缓冲液; B: 乙腈; 洗脱梯度 0~3.0min: 85%B 到 55%B; 3.0~5.0 min: 55%B; 5.0~5.5 min: 55%B 到 85%B; 5.5~8.0 min: 85%B。

2.2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 ESI+; 检测方式: 多反应离子监测(MRM); 毛细管电压: 3.0 kV; 离子源温度: 150 °C; 锥孔反吹气流速 150 L/h; 脱溶剂气温度 350 °C; 脱溶剂气流速 800 L/h; 碰撞气为氩气; 碰撞气流量 0.16 mL/min。锥孔电压、反应离子对、碰撞能量、扫描模式见表 1。

表 1 目标物的反应离子对、碰撞能量、锥孔电压及扫描模式

Table 1 Qualitative ion pair, quantitative ion pair, collision energy, cone voltage and ionization mode of the aimed compounds

化合物	母离子(m/z)	特征离子(m/z)	碰撞能量/eV	锥孔电压/V	离子化模式
TTX	320.2	162.2	37	30	ESI+
		284.3	26	30	
		302.3	25	30	

2.2.3 样品前处理

将样品粉碎后,称取约 1 g(精确到 0.01 g)置于 10 mL 试管中,加入 10 mL 2%乙酸/甲醇溶液,涡旋振荡 2 min, 50 °C 水浴超声提取 20 min, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL 待净化。将所得的提取液 1 mL 以约 1 mL/min 的流速过 MCX 固相萃取柱,依次用 2 mL 的 1%甲酸/甲醇溶液、2 mL 的 1%甲酸/水溶液和 1 mL 的 1%甲酸/甲醇溶液淋洗除杂,最后用 2 mL 的 0.1 mol/L 盐酸/甲醇溶液洗脱,洗脱液于 50 °C 氮气吹干,用 0.2%甲酸/60%乙腈/水溶液溶解残渣,过 0.2 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

2.2.4 基质标准曲线

称取阴性样品 1 g,按 2.2.3 操作,洗脱液用氮气吹干后加入 1 mL 0.2%甲酸/60%乙腈/水溶液溶解残渣。

基质标准工作液:移取一定体积的浓度为 1000 ng/mL 标准使用液于进样瓶中,然后用空白基质溶液配制成 200 ng/mL 的标准溶液,分别移取一定体积的浓度为 200 ng/mL 标准溶液于进样瓶中,然后用空白基质溶液配制成浓度分别为 5、10、20、50、100 ng/mL 的标准溶液。

2.2.5 未检出数据的处理

按照 WHO 全球环境监测系统/食品污染监测与评估规划第二次会议“食品中低水平污染物可信评鉴”中对未检出数据的标准对数据进行处理^[18]。根据上述规定,对于样品中毒素含量的实测值小于 LOD 的比例≥60%时,则采取对所有低于 LOD 的检测结果,赋予 LOD 值后统计处理。

3 结果与分析

3.1 TTX 实验条件优化

TTX 分子式为 $C_{11}H_{17}N_3O_8$, 相对分子质量为 319.3。TTX 是水溶性毒素,采用 C_{18} 色谱柱难以保留,因此选用 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 亲水型色谱柱进行分析。TTX 的极性较强,并且含有胍基团,在酸性条件下极易发生质子化,而且在正离子模式下的灵敏度要远高于负离子模式,在电喷雾正离子模式下对质谱测定条件进行优化。为了减少基质效应对实验结果的影响,采用 MCX 固相萃取柱对 1 mL 提取液进行净化。本实验选定 m/z 302.3 作为河鲀毒素的定量离子。TTX 基质加标的标准溶液、空白样品和阳性样品的色谱图如图 1 所示。a 为样品溶液为

10 ng/mL 基质标准溶液, b 为空白样品, c 为样品浓度为 4.5 ng/mL 的阳性样品色谱图。

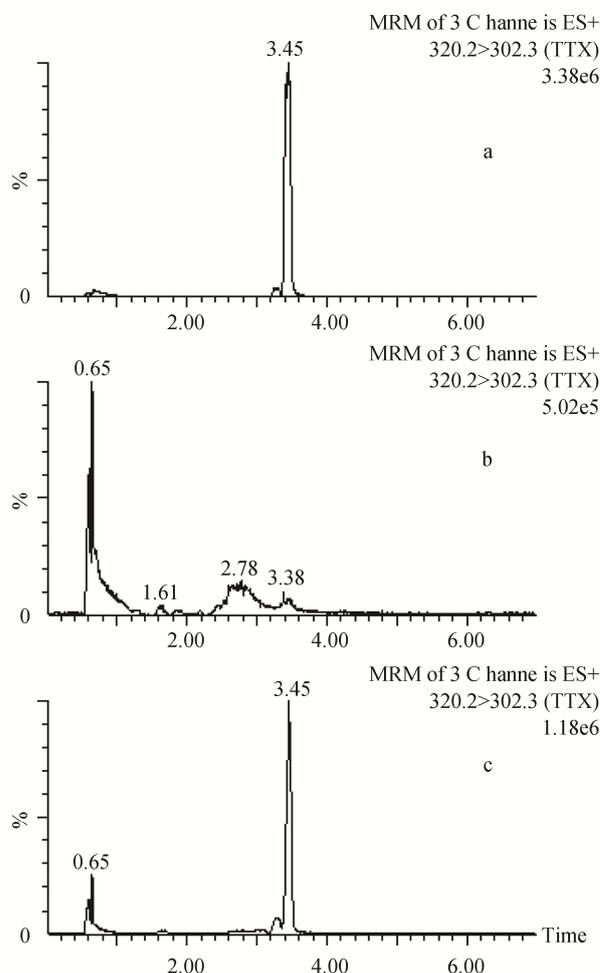


图 1 基质标准溶液(10 ng/mL)(a), 空白样品(b)和阳性样品(4.5 ng/mL)(c)的色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of standards (10 ng/mL) (a), blank sample (b) and positive sample of 4.5 ng/mL TTX (c)

3.2 方法的回收率和精密度

为了减少基质效应对 TTX 定量造成的误差,实验选用基质标准曲线校正,外标法定量。结果表明,在所考察的物质的量范围内,线性良好, r 为 0.9998;以信噪比 $S/N=3$ 计算得到被测产品中目标化合物的检出限为 5 μg/kg。以阴性样品为加标基质,分别在高、中、低三个水平进行加标实验,每个加标水平平行测定 6 次,计算目标化合物的回收率和相对标准偏差(RSD)。表 2 的分析结果表明,方法回收率为

表 2 TTX 在烤鱼片、鱿鱼干制品、鱼丸样品中添加水平、回收率及 RSD ($n=6$)
Table 2 The spiked levels, recovery and RSD of TTX in grilled fillet, shredded squid, and fish ball samples ($n=6$)

基质	添加水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)			高水平		中水平		低水平	
	高	中	低	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
烤鱼片	500	100	20	90.1	5.8	86.5	5.3	75.5	5.1
鱿鱼干制品	500	100	20	92.2	4.8	90.1	3.6	85.6	4.5
鱼丸	500	100	20	88.9	6.8	86.5	5.8	82.3	5.6

75.5%~92.2%, 相对标准偏差(RSD)为 3.6%~6.8%。同一标准溶液在一天内重复进样 7 次测定日内精密度, 在 3 d 内重复测定 7 次测定日间精密度, 日内和日间的 RSD 均小于 5%。

3.3 样品中 TTX 含量的测定

本研究采用上述方法测定了市售的 15 份鱿鱼干制品、28 份鱼丸和 64 份烤鱼片样品中的 TTX。烤鱼片中包括: 鱼种类不详的烤鱼片 44 份, 鳕鱼 11 份, 马面鱼 3 份, 龙头鱼、墨鱼、鳗鱼、鲛鳕鱼、鲳鱼、金枪鱼各 1 份。其中, 鱿鱼干制品和鱼丸中没有检出 TTX; 64 份烤鱼片样品中检出 16 份含有 TTX。检出的 16 份阳性样品中包括鱼种类不详的烤鱼片 13 份、马面鱼 1 份、烤龙头鱼 1 份和金枪鱼 1 份。结果表明, 鱿鱼干制品和鱼丸比较安全, 可以放心食用; 烤鱼片中鳕鱼所占比例较大, 在检测的 11 份鳕鱼中都没有检出 TTX。检出的马面鱼中 TTX 的含量为 0.014 mg/kg; 金枪鱼的含量为 0.394 mg/kg; 烤龙头鱼的含量为 1.914 mg/kg; 其余鱼种类不详的 13 份烤鱼片中检出的最小值为 0.013 mg/kg, 最大值为 1.806 mg/kg。64 份烤鱼片样品中 TTX 的浓度范围和所占比例如表 3 所示。

表 3 烤鱼片样品中 TTX 检测结果
Table 3 The detected results of TTX in grilled fillet samples

烤鱼片		
浓度范围(mg/kg)	样品数	所占比例 (%)
0.005	48	75.0
0.005~0.1	6	9.4
0.1~1.0	6	9.4
>1.0	4	6.2

检测结果表明, 大部分被测产品中不含有 TTX, 但是在一些烤鱼片中, TTX 检测值较高, 存在食品安全问题。欧盟和日本有关 TTX 限量标准是以麻痹性贝毒的限量标准($\leq 0.8 \text{ mg}/\text{kg}$ 和 $2.0 \text{ mg}/\text{kg}$)作为参考进行制定的。我国目前还没有海产品中 TTX 的限量标准。被检出的烤鱼片样品中大部分为鱼种类不详的烤鱼片样品, 其成分可能为不同种类的鱼加工而成, 也有可能混杂了河鲀鱼。因此建议监管部门应加强对市售海产品标签标识的监管, 通过标签能够识别不同的烤鱼片中所含鱼的种类, 尽量减少食用可能含有 TTX 的鱼类, 减少 TTX 的中毒几率, 保障食品的安全及人民身体健康。

4 结论

本文对鱿鱼干制品、鱼丸和烤鱼片中 TTX 的污染状况进行研究, 了解了市场上海产品中 TTX 污染状况。结果表明大部分产品中不含有 TTX, 但是在一些烤鱼片中, TTX 检测值较高。值得关注的是, 我国目前尚缺乏 TTX 的限量标准, 而该类污染物中毒现象时有发生。监管部门应加强对市售可食用海产品的监管力度, 保障食品的安全及人民身体健康。

参考文献

- [1] Goldin AL, Resurgence of sodium channel research [J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 71-94.
- [2] Tanu MB, Mahmud Y, Tsuruda K, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin in the skin of a rhacophorid frog *Polypedates* sp. from Bangladesh [J]. *Toxicon*, 2001, 39: 937-941.
- [3] Pires OR Jr, Sebben A, Schwartz EF, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae) [J]. *Toxicon*, 2002, 40, 761-766.
- [4] Ali AEI, Arakawa O, Noguchi T, *et al.* Tetrodotoxin and related

- substances in a ribbon worm *Cephalothrix linearis* (Nemertean) [J]. *Toxicon*, 1990, 28(9): 1083–1093.
- [5] Tanua MB, Mabmud Y, Arakawa O. Immunoenzymatic visualization of tetrodotoxin (TTX) in *Cephalothrix* species (Nemertea: Anopla: Palaeonemertea: Cephalotrichidae) and *Planocera reticulata* (Platyhelminthes: Turbellaria: Polycladida: Planoceridae) [J]. *Toxicon*, 2004, 44(5): 515–520.
- [6] 沈晓书, 郭磊, 顾明松, 等. 微波辅助碱解荧光分光光度法快速测定河豚毒素含量[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(12): 2264–2267.
Shen XS, Guo L, Guo MS, *et al.* Rapid determination of tetrodotoxin using microwave assisted alkaline hydrolysis and spectrofluorometric [J]. *Spectr Spect Anal*, 2006, 26(12): 2264–2267.
- [7] 崔建洲, 沈雪艳, 宫庆礼, 等. 高效液相色谱-紫外/荧光检测方法测定河豚毒素[J]. *色谱*, 2006, 24(3): 317.
Cui JZ, Shen XY, Gong QL, *et al.* Determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography-UV/fluorescence [J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, 24(3): 317.
- [8] 刘海新, 张农, 董黎明, 等. 柱后衍生高效液相色谱法测定水产品种河豚毒素的含量[J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 812–817.
Liu HX, Zhang N, Dong LM, *et al.* Determination of tetrodotoxin in aquatic products by post column derivation high performance liquid chromatography [J]. *J Fish China*, 2006, 30(6): 812–817.
- [9] 吴平谷, 赵永信, 沈向红, 等. 河豚鱼中河豚毒素的气相色谱质谱法测定[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19: 549–551.
Wu PG, Zhao YX, Shen XH, *et al.* Determination of tetrodotoxin in globfish by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19: 549–551.
- [10] Jen HC, Lin SJ, Tsai YH, *et al.* Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871: 95–100.
- [11] Fong BMW, Tam S, Tsui SH, *et al.* Development and validation of a high-throughput double solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of tetrodotoxin in human urine and plasma [J]. *Talanta*, 2011, (83): 1030–1036.
- [12] Chen XW, Liu HX, Jin YB, *et al.* Separation, identification and quantification of tetrodotoxin and its analogs by LC-MS without calibration of individual analogs [J]. *Toxicon*, 2011, 57, 938–943.
- [13] 吴佳俊, 黄文雯, 肖陈贵, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测河豚毒素的方法研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5 (11): 3529–3536.
Wu JJ, Huang WW, Xiao CG, *et al.* Determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(11): 3529–3536.
- [14] 李军, 黄莲芝, 孙铭英, 等. 超声-固相萃取高效液相色谱-串联质谱法测定红鳍东方豚中的河豚毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(1): 60–64.
Li J, Huang LZ, Sun MY, *et al.* Determination of tetrodotoxin in *Fugu rubripes* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with ultrasonic extraction and solid phase extraction [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(1): 60–64.
- [15] 张秀尧, 蔡欣欣. 亲水液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测尿液和血浆中河豚毒素 [J]. *分析化学*, 2009, 12(37): 1829–1833.
Zhang XY, Cai XX, Rapid Determination of tetrodotoxin in Human Urine and Plasma Using Hydrophilic Interaction liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 12(37): 1829–1833.
- [16] GB/T 5009.206-2007 鲜河豚鱼中河豚毒素的测定[S].
GB/T 5009.206-2007 Determination of tetrodotoxin in fresh pufferfish [S].
- [17] GB/T 23217-2008 水产品中河豚毒素的测定液相色谱-荧光检测法[S].
GB/T 23217-2008 Determination of tetrodotoxin in aquatic products-HPLC-fluorescence detection method [S].
- [18] 王绪卿, 吴永宁, 陈君石. 食品污染物监测低水平数据处理问题[J]. *中华预防医学杂志*, 2002, 36(4): 278–279.
Wang XQ, Wu YN, Chen JS. The low data processing problems in food contaminants monitoring [J]. *Chin J Prev Med*, 2002, 36(4): 278–279.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王丽英, 博士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: wangliying2011@163.com



路杨, 硕士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: lyxyx00357@163.com