

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

李 军, 黄莲芝, 孙铭英, 徐 静, 曹际娟*

(辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘要: **目的** 建立快速、准确检测红鳍东方豚中河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)的分析方法。**方法** 样品用 0.1%乙酸水溶液超声提取, C₁₈ 固相萃取柱净化, 用亲水性色谱柱 ZIC[®]-cHILIC(150 mm×2.1 mm, 3 μm)洗脱, 乙腈-0.1%甲酸水为流动相。选择正离子多反应监测(MRM)模式, [M+H]⁺, *m/z* 320.3/302.2 为定量离子, 进行 HPLC-MS/MS 测定, 外标法定量。**结果** 河豚毒素在 5~100 ng/mL 的范围内呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9997, 回收率为 82%~91%, 相对标准偏差 RSD 为 5.3%~15.7%, 方法的定量限为 5 ng/mL。**结论** 该方法快速准确, 灵敏度高, 适用于红鳍东方豚中河豚毒素的测定。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 红鳍东方豚; 河豚毒素

Determination of tetrodotoxin in *Fugu rubripes* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with ultrasonic extraction and solid phase extraction

LI Jun, HUANG Lian-Zhi, SUN Ming-Ying, XU Jing, CAO Ji-Juan*

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To establish an accurate, rapid analytical high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of tetrodotoxin (TTX) in the *Fugu rubripes*. **Methods** TTX was extracted from sample by 0.1% acetic acid-water, and then purified by solid-phase extraction with C₁₈ sorbent. The separation was performed on the ZIC[®]-cHILIC (150 mm×2.1 mm, 3 μm) at 35 °C using acetonitrile-0.1% acetic acid-water(90:10, v:v) as mobile phase. Samples were analyzed by HPLC-MS/MS and quantified with the external standard method. Quantification was carried out through tandem mass spectrometry with positive electro-spray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) at *m/z* [M+H]⁺ 320.3 302.2 for TTX. **Results** Calibration curve was linear over the TTX concentration range of 5~100 ng/mL (*r*=0.9997), with the limit of quantification of 5 ng/mL. The recoveries were between 82% and 91% with the relative standard deviations (RSD) ranging from 5.3% to 15.7%. **Conclusion** The method was shown to be sensitive, rapid and suitable for the determination of TTX in *Fugu rubripes*.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Fugu rubripes*; tetrodotoxin

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201310141)

Fund: Supported by the Special Scientific Research Fund of AQSIQ Public Welfare Profession of China (201310141)

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要从事食品安全检测的研究。E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Researcher, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.60, Changjiang East Road, Dalian 116001, China. E-mail: cjj0909@163.com

1 引言

红鳍东方豚主要分布于北太平洋西部, 在我国的各大海区都有捕获, 已见的最大体长为 750 mm。红鳍东方豚的肉质鲜美, 营养丰富, 自古以来人们便有食用河豚鱼的习俗。河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是鲀鱼类(俗称河豚鱼)及其他生物体内含有的一种生物碱, 广泛分布于河鲀等多种海洋脊椎动物、无脊椎动物及海底沉积物中, 是一种剧毒的非蛋白神经毒素。河豚毒素与钠离子通道受体结合, 阻断电压依赖性钠通道, 从而阻滞动作电位, 阻止神经肌肉兴奋的产生, 导致与之相关的生理活动障碍, 甚至引起死亡^[1]。我国每年都有十几人因误食河豚中毒身亡的事件发生。

河豚毒素的定量检测方法有小鼠生物法^[2-4]、酶联免疫吸附法^[5,6]、高效液相色谱法^[7,8]、液质联用法^[9-12]等, 这些方法前处理过程复杂, 消耗时间长, 检测成本高。本研究利用高效液相色谱-串联质谱, 建立定量测定红鳍东方豚中的河豚毒素的方法。该方法灵敏度高、重现性好, 适合检测红鳍东方豚中的河豚毒素。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

6430 型三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司); 1290 型高效液相色谱(美国 Agilent 公司); ELIX5&Synergy UV 超纯水仪(法国 Millipore 公司); KH-500DV 超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器公司); 高速离心机(北京医用离心机厂); 高速均质机; RE52 型旋转蒸发器(日本 YAMATO 公司)。河豚毒素标准品: 纯度 $\geq 99.0\%$ (美国 Sigma 公司), 冷藏保存。河豚毒素标准溶液 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 称取河豚毒素标准品 10 mg 于 100 mL 容量瓶中, 用 0.1%甲酸水溶解并定容至刻度, 乙酸、乙腈(色谱纯, 北京迪马公司); 实验用水为 Millipore 制备的超纯水。

2.2 样品前处理

称取样品 5 g 于 50 mL 的聚四氟乙烯离心管中, 加入 0.1%乙酸水溶液 10 mL, 涡旋振荡 2 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴超声波振荡提取 20 min, 然后 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液。离心后的残渣中再加入 10 mL 的

0.1%乙酸水溶液, 重复上述的步骤, 将两次得到的上清液合并, 过滤加入到鸡心瓶中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸浓缩至近干, 加入 20 mL 0.1%乙酸水溶液洗涤鸡心瓶, 将所得溶液过 C_{18} 固相萃取柱净化(不加压, 自然流速), 流出液过 0.22 μm 滤膜, 滤液上 HPLC-MS/MS 测定, 外标法定量。

2.3 液相质谱条件

2.3.1 色谱条件

色谱柱: ZIC[®]-cHILIC(150 mm \times 2.1 mm, 3 μm); 流动相: 0.1%甲酸水(B): 乙腈(A)(10: 90, v:v)。梯度洗脱程序见表 1。流动相流速: 0.3 mL/min。柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。进样体积: 10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.0~2.0	10	90
2.0~4.0	60	40
4.0~4.1	10	90
4.1~7.0	10	90

2.3.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI), 正离子扫描的多反应监测(MRM)模式。前级真空: 2.01 Torr, 高真空: 6.01×10^{-6} Torr, 干燥气温度: 300 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流速: 3.0 L/min, 离子源电压: 3500 V。

3 结果

3.1 河豚毒素的全扫描质谱图

河豚毒素的分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$, 相对分子质量为 319.3。从图 1 中可以看到河豚毒素母离子的分子离子峰 m/z 320.2, 出现的主要碎片有 m/z 162.1 及 m/z 302.3。根据子离子的丰度和基质对它们的干扰, 本研究选择 m/z 302.3 作为河豚毒素的定量离子。

3.2 精密度和回收率

称取不含 TTX 的空白样品 5 g, 分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTX 标准溶液 10、20、50 μL , 相当于样品中分别含有 20、40、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的河豚毒素, 按照本文“2.2、2.3”操作方法进行测定, 平均回收率及精密度实验结果见表 2。标准溶液、样品空白及样品添加见图 2。

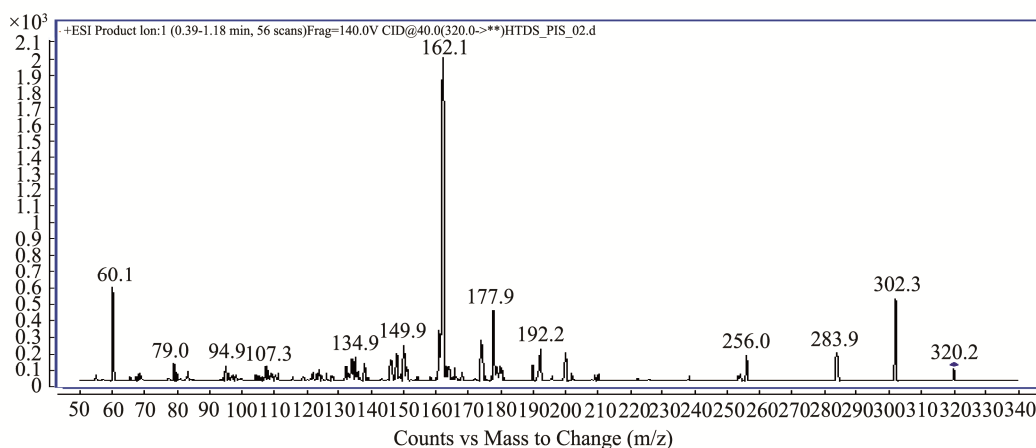


图 1 TTX 的全离子扫描质谱图

Fig. 1 Full scan product ion spectrum of TTX

表 2 回收率及精密度试验结果($n=6$)Table 2 The results of recovery and precision test ($n=6$)

添加水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率(%)	RSD(%)
20	18.1	90.5	5.3
40	36.1	90.3	12.2
100	82.6	82.6	15.7

3.3 检出限和线性范围

为了消除基质效应对河豚毒素定量造成的误差,实验选用基质标准曲线校正,外标法定量。将一定量河豚毒素标准液分别加入阴性红鳍东方豚样液中,配制成浓度分别为 5、10、20、50、100 和 200 ng/mL 的标液,按本研究所建立的 HPLC-MS/MS 方法进行测定,建立河豚毒素标准工作曲线,以定量离子的峰面积对河豚毒素的浓度进行线性回归,线性回归方程为 $Y=1200.699297X-5543.865413$, 相关系数 $r=0.9997$, 表明河豚毒素在 5~100 ng/mL 范围内线性关系良好。信噪比 $S/N \geq 10$, 且有较好的回收率,即确定 TTX 的定量限(LOQ)为 5 ng/mL。

4 讨论

4.1 前处理条件优化

4.1.1 提取溶剂优化

河豚毒素在强酸或强碱条件下不稳定、易分解,但是可存在于弱酸条件下,可溶于酸性水和醇溶液中。本实验用乙酸水作为提取剂,采用 0.1%、0.5%、1.0% 不同浓度的乙酸水,考察提取效率,结果无明

显差异,鉴于酸性溶液对色谱柱的损害,浓度越大损害越大,最终选择了 0.1% 乙酸水作为提取溶剂。

4.1.2 提取方法优化

在传统的河豚毒素检测方法中,河豚毒素的溶出,大多采用沸水浴 10 min,然而,本实验研究发现,传统方法的提取效率偏低,影响到回收率。如果采用 50 °C 水浴超声振荡提取 20 min,提取效率明显增加,回收率均达到 80% 以上,结果较为满意,所以本研究选择了水浴超声振荡的提取方法。

4.1.3 固相萃取条件优化

由于河豚毒素的极性非常强,本研究选用 SPE C_{18} 柱作反相萃取,样液中含有的蛋白质、脂肪等弱极性物质会在柱上保留而被吸附,但河豚毒素基本上不被吸附,净化效果会更好,并且简单快捷。

4.2 色谱条件优化

河豚毒素的极性强,采用 C_{18} 色谱柱难以保留,液相色谱测定时,需要采用离子对色谱或柱后衍生化荧光检测,方法繁琐、费时。HPLC-MS/MS 测定时流动相中需加入七氟丁酸、庚烷磺酸、三甲胺等离子对试剂,对质谱检测干扰较大。

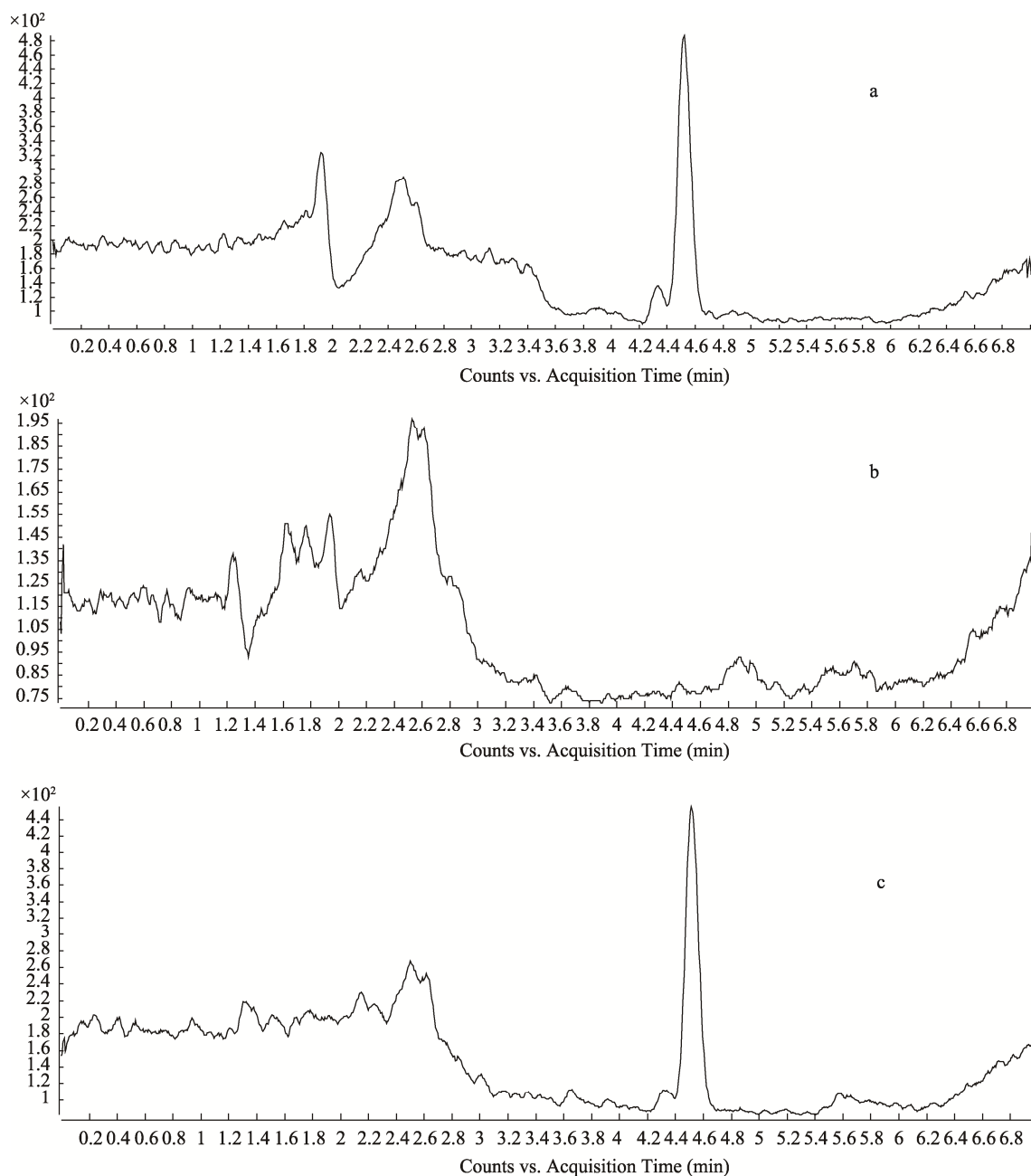


图 2 标准品(5 ng/mL)(a), 空白样品(b)和加标样品(20 µg/kg)(c)的色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of standards (5 ng/mL) (a), blank sample (b) and sample spiked with 20 µg/kg TTX (c)

本实验使用 ZIC[®]-cHILIC 色谱柱, ZIC[®]-cHILIC 可以改变极性或亲水性化合物的分离性, 从而提高分析物的峰的分离。ZIC[®]-cHILIC 削弱了带电分析物与中性的两性离子固定相之间的静电作用, 形成了一个特殊的分离, 更适合分离在反相色谱柱中保留差的物质。ZIC[®]-cHILIC 表现出了更强的保留能力和更好的分离效果。实验中使用甲酸水-乙腈体系作为流动相, 最终选用流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液, 流

动相 B 为乙腈。

4.3 质谱条件优化

河豚毒素的极性较强, 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。所以在点喷雾正离子模式下对质谱测定条件进行优化, 使其灵敏度达到最大, 优化后的测定条件见表 3。

表3 质谱的MRM参数

Table 3 MS parameters for multiple reaction monitoring

Mass Transitions (m/z)	Fragment	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Detal EMV(+)
320.2/302.3	140	26	3	400
320.2/162.1	140	42	3	400

5 结论

我国针对河豚鱼检测尚无国家标准,虽然已经有几种方法来检测河豚鱼毒素,但是消耗时间较长,成本高。本研究采用了酸液、超声和固相萃取的提取方法,以默克公司 ZIC[®]-cHILIC 色谱柱为分离柱,建立了液相色谱-串联质谱检测红鳍东方豚中的河豚毒素含量的方法。本方法前处理操作简便、快速,测定准确灵敏度高,结果能满足红鳍东方豚中河豚毒素的测定要求,可以为相关质检部门提供技术支持,也为标准的建立和完善提供了更多的数据。

参考文献

- [1] 黄军, 严美姣, 陈国宏. 河豚毒素的起源及其研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(6): 998-1000.
Huang J, Yan MJ, Chen GH. The origin and advancement of investigation in tetrodotoxin [J]. Lett Biotechnol, 2006, 17(6): 998-1000.
- [2] Shimojo RY, Iuaoka WT. A rapid hemolysis assay for the detection of sodium channel - specific marine toxins [J]. Toxicology, 2000, 154(13): 1-7.
- [3] Cho HE, Ahn SY, Son IS, *et al.* Determination and validation of tetrodotoxin in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography—tandem mass spectrometry and its application [J]. Forensic Sci Int, 2012, 217(1/3): 76-80.
- [4] Man CN, Noor NM, Ham GL, *et al.* Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(47): 7455-7459.
- [5] 郭柏坤, 官庆礼, 吴韶菊, 等. 反相离子对高效液相——PDA 法测定虫纹东方纯肝脏中的河豚毒素[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(5): 34-37.
GUO BK, GONG QL, WU AJ, *et al.* Inverting ions measured grain insects pure oriental liver tetrodotoxin on HPLC method—PDA [J]. Chin J Marine Drugs 2006, 25(5): 34-37.
- [6] 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) Toxicon, 2004, 44(5): 515-520.
- [7] 郑雍怡, 王彦, 张计, 等. LC-MS 法测定大鼠血浆中河豚毒素的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, (9): 1450-1453
Zheng YY, Wang Y, Zhang J, *et al.* LC-MS method for the determination of tetrodotoxin in rat plasma [J]. J Pharm Anal, 2008, (9): 1450-1453.
- [8] Nagashima Y, Maruyama J, Noguchi T, *et al.* Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53(5): 819-823.
- [9] Jun HJ, Jong SL, Mari YY. LC-MS analysis of tetrodotoxin and its deoxy analogs in the marine puffer fish fugu niphobles from the southern coast of korea, and in the brackishwater puffer fishes Tetraodon nigroviridis and Tetraodon biocellatus from southeast Asia [J]. Mar Drugs, 2010, 8(4): 1049-1058.
- [10] Marc D, Bernd C, M. Ahmed MS, *et al.* Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish Takifugu oblongus from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass - spectrometric detection [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(11): 1997-2002.
- [11] Monrat C, Nitat S, Potjane S, *et al.* Toxic marine puffer fish in thailand seas and tetrodotoxin they contained [J]. Toxins, 2011, 3(10): 1249-1262.
- [12] Junhc J, Mari YY. Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the pufferfish Fugu pardalis [J]. Toxicon, 2006, 48: 980-982.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



李 军, 高级工程师, 主要从事农兽药残留及毒素检测工作。
E-mail: lj666623@sina.com



曹际娟, 研究员, 主要从事食品安全检测的研究。
E-mail: cjj0909@163.com