

液相色谱-串联质谱法测定腌制河豚鱼中河豚毒素

俞莎, 徐美佳, 徐小民

浙江省疾病预防控制中心理化与毒理检验所, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 建立基于阳离子交换固相萃取(SPE)小柱净化,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测腌制河豚鱼中河豚毒素(TTX)的方法。**方法** 粉碎均匀的腌制河豚鱼样品,采用0.5%乙酸/50%甲醇/水超声提取,提取液经阳离子交换SPE小柱净化,0.3%盐酸/50%乙腈/水洗脱,洗脱液经氨水中和后采用XBridge™ BEH Amide色谱柱(150 mm×3.0 mm, 1.7 μm)分离,采用串联质谱多反应监测模式测定。**结果** TTX的基质效应为85.7%~92.4%,采用优化后的SPE方法净化,基质抑制效应得到有效控制。样品中TTX在2.0~4 000 μg/kg范围内线性关系良好,相关系数(r^2)为0.999 2;方法检出限和定量限分别为1.0 μg/kg和2.0 μg/kg。在2.0、200、2 200 μg/kg水平加标,平均回收率为81.2%~96.5%,相对标准偏差为4.3%~7.5%。质控样品中TTX的日内准确度为84.4%~95.6%,精密密度为4.9%~5.8%;日间准确度为86.1%~94.9%,精密密度为5.5%~8.5%。采用本方法测定38份市售腌制河豚鱼制品,TTX检出率为60.5%。**结论** 本研究建立的方法可以实现腌制河豚鱼中TTX的准确定量测定。

关键词: 腌制河豚鱼;河豚毒素;固相萃取;阳离子交换;液相色谱-串联质谱

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087(2023)07-0640-05

Determination of tetrodotoxin in salted pufferfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YU Sha, XU Meijia, XU Xiaomin

Department of Physicochemical and Toxicology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method with cation exchange-based solid phase extraction (SPE) for determination of tetrodotoxin (TTX) in salted pufferfish. **Methods** Evenly crushed salted pufferfish samples were subjected to ultrasound-assisted extraction with 0.5% acetic acid/50% methanol/water. The extract was cleaned with cation exchange-based SPE cartridge and eluted with 0.3% hydrochloric acid and 50% acetonitrile/water. The eluent was neutralized with ammonia and separated with a Waters XBridge™ BEH Amide column (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm), and determined using LC-MS/MS in a multiple reaction monitoring mode. **Results** The matrix effects of TTX were 85.7%–92.4%, and the matrix suppression effect was under effective control following clean-up procedures using the optimized SPE method. The TTX showed a good linear relationship at the range of 2.0 to 4 000 μg/kg, with a correlation coefficient (r^2) of 0.999 2. The limits of detection and quantitation for TTX in sample matrix were 1.0 μg/kg and 2.0 μg/kg, respectively. The mean spiked-recovery rates were 81.2% to 96.5% at spiked amounts of 2.0, 200 μg/kg and 2 200 μg/kg, with relative standard deviations (RSDs) of 4.3% to 7.5%. The intraday accuracy and precision of TTX were 84.4% to 95.6% and 4.9% to 5.8% in quality control samples, and the interday accuracy and precision of TTX were 86.1% to 94.9% and 5.5% to 8.5% in quality control samples. The detection of TTX was 60.5% in 38 market-sold salted pufferfish products using the established LC-MS/MS method. **Conclusion** The established LC-MS/MS method is effective for accurate quantitative determination of TTX in salted pufferfish.

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.07.020

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划(2021KY615)

作者简介: 俞莎, 本科, 主任技师, 主要从事卫生理化检验工作

通信作者: 徐小民, E-mail: chemxum@163.com

Keywords: salted pufferfish; tetrodotoxin; solid phase extraction; cation exchange; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 是一种具有强效神经毒性的致命海洋生物毒素, 导致 TTX 中毒的海洋生物主要为野生河豚鱼^[1]。野生河豚鱼即使经过腌制、烹饪等加工处理, 仍然会有部分 TTX 残留, 食用腌制河豚鱼中毒事件时有报道^[2]。我国没有腌制河豚鱼 TTX 的限量标准, 开展腌制河豚鱼中 TTX 污染的安全性评估和相关中毒事件的快速处置, 需以痕量水平和中毒高含量水平 TTX 的快速准确检测技术为支撑。

TTX 的检测方法包括小鼠生物法^[3]、酶联免疫法^[4]、气相色谱-质谱法^[5]、液相色谱-荧光检测器法^[6]和液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[7]等。LC-MS/MS 因其高灵敏度和高选择性, 是定性、定量测定海产品中 TTX 的首选方法^[7-8]。亲水相互作用色谱柱可以在没有离子对试剂的情况下良好地分离极性物质, 解决 LC-MS/MS 检测 TTX 的色谱分离难题, 其中首选含酰胺官能团的色谱柱^[8-10]。利用酸性条件下净化材料中的磺酸基与 TTX 的离子交换原理, 阳离子交换固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 方法已经被应用于新鲜海产品中 TTX 的测定, 但基质抑制效应不容忽视^[7]。本研究拟通过优化样品提取和净化条件, 建立快速定量测定腌制河豚鱼中 TTX 的方法。

1 材料与方法

1.1 样品来源

腌制河豚鱼样品购自浙江市场, 包括腌制后晒干的干制品和未晒干的湿样。高浓度腌制河豚鱼样品 (20 318 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 来自于某起 TTX 中毒事件。

1.2 仪器与试剂

LCMS-8060 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪 (日本岛津公司); 超纯水装置 (美国 Millipore 公司); DFY-1000 高速粉碎机 (浙江温岭林大机械有限公司); HC-3018 高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 J.T. Baker 公司); 甲酸、乙酸 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 盐酸 (分析纯, 上海国药化学试剂公司); 氨水 [分析纯, >28%, 赛默飞世尔科技 (中国) 公司]; TTX (100 mg/L, 上海安谱公司); Oasis MCX 阳离子交换 SPE 小柱 (60 mg/3 mL, 美国 Waters 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

50% 乙腈/水逐级稀释 TTX 储备液, 配制质量浓度为 10.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准使用液。移取适量标准使用液, 用 50% 乙腈/水配制质量浓度为 0.05~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准溶液。

1.3.2 分析条件

色谱条件: XBridge™ BEH Amide 柱 (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm , 美国 Waters 公司); 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水; 流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 75%B; 1~5.0 min, 75%B~40%B; 5.0~7.0 min, 40%B; 7.0~7.5 min, 40%B~75%B; 7.5~10.0 min, 75%B。流速为 0.4 mL/min; 进样量为 4.0 μL 。

质谱检测: 电喷雾离子源正离子模式监测 (ESI⁺); 离子源接口电压为 4.5 kV; 雾化气为氮气, 3.0 L/min; 干燥气为氮气, 10 L/min; 加热气为空气, 10 L/min; 碰撞气为氩气; 脱溶剂管温度为 250 $^{\circ}\text{C}$; 加热块温度为 400 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$; 多反应监测 (MRM) 模式, 320 >302 (23 eV, 定量离子对), 320 >162 (37 eV, 定性离子对)。

1.3.3 样品前处理

用力拍打鱼干表面去除盐颗粒, 然后将鱼肉撕成细条状, 剪成 1 cm 长小段, 高速粉碎机磨碎, -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

准确称取 2 g 粉碎均匀的样品于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 15 mL 0.5% 乙酸/50% 甲醇/水, 涡流振荡 5 min, 室温水浴超声 20 min, 用上述提取剂定容至 20 mL, 混匀, 1 574×g 离心 5 min。取 0.5 mL 上清液, 加入 0.5 mL 甲醇和 0.5 mL 乙腈, 涡流混匀 0.1 min, 于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 静置 20 min, 然后 1 574×g 离心 5 min。将上清液转移到 Oasis MCX 阳离子交换 SPE 小柱 (使用前依次用 3 mL 甲醇和水活化), 快流干时依次用 3 mL 0.3% 乙酸水、3 mL 0.3% 乙酸/50% 乙腈/水淋洗除杂, 并抽干 0.1 min, 弃去所有淋洗液; 用 2 mL 0.3% 盐酸/50% 乙腈/水洗脱, 并抽干 0.1 min; 收集全部洗脱液, 加入 5 μL 氨水, 涡旋混匀 0.1 min, 过 0.22 μm 滤膜后待 LC-MS/MS 检测。

1.3.4 提取条件的优化

以含量分别为 2 699、1 067、143 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的阳性样品, 以及 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 阴性加标样品为研究对象,

每个样品分别采用 0.5% 乙酸/100% 甲醇、0.5% 乙酸/80% 甲醇、0.5% 乙酸/60% 甲醇、0.5% 乙酸/50% 甲醇和 0.5% 乙酸水提取，比较 TTX 回收率。

1.3.5 蛋白质沉淀条件的优化

选择 TTX 阴性的低盐干制品（样品表面盐粒较少）、高盐干制品（样品表面有大量盐粒）和湿样为研究对象，采用 0.5% 乙酸/50% 甲醇提取后，每毫升提取液中加入 10 ng TTX，然后按表 1 所示的 6 个条件分别在提取液中加入甲醇和乙腈沉淀蛋白质，比较蛋白质等干扰基质对 TTX 过柱净化回收率的影响。

表 1 提取液蛋白质沉淀条件

Table 1 Protein precipitation conditions of extract

编号	提取液/mL	甲醇/mL	乙腈/mL
1	0.5	0	0
2	1.0	0	0
3	0.5	0	0.5
4	0.5	0.5	0.5
5	0.5	0.5	1.0
6	0.5	0.5	1.5

1.3.6 基质效应

分析基质效应，基质效应=样品基质中被测物的峰面积/纯溶剂中的峰面积。>100% 表示基质增强效应，<100% 表示基质抑制效应。

1.3.7 阳性质控样品制备

市售样品按 1.3.3 处理后测定，筛选不同浓度的阳性样品，以及某中毒事件剩余的高浓度样品，分别充分粉碎、混合均匀后，按照最佳检测条件重复测定 6 次，取平均值，获得含量分别为 5.8、143、1 067、2 699、20 318 μg/kg（中毒样品）的阳性质控样品。

1.3.8 方法学验证

以 TTX 浓度为 0.05~100 μg/L 的系列标准溶液浓度为横坐标，经 LC-MS/MS 测定的相应色谱峰峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。以基质中响应值较弱的定性离子 3 倍信噪比对应的含量计算检出限，定量例子 10 倍信噪比对应的含量计算定量限。采用低盐干制品、高盐干制品和湿样 3 种阴性基质，分别添加 3 个浓度水平（2.0、200、2 200 μg/kg）的 TTX，每个水平做 6 个平行试验，测定方法的回收率。对 TTX 含量分别为 5.8、143、2 699、20 318 μg/kg 的质控样品分别测定日内（n=6）和日间（连续 3 d，n=3）回收率，分析准确度和精密度。

2 结果

2.1 样品提取优化结果

不同提取条件下的回收率见图 1。采用 100% 甲醇提取时，TTX 回收率为 45.5%~63.0%，随着提取液中甲醇比例降低、含水量上升，TTX 回收率逐渐增加，当采用 0.5% 乙酸/50% 甲醇为提取液时，TTX 回收率最高，超过 90%。为保证提取回收率，尽可能降低提取液中盐含量，本研究采用 0.5% 乙酸/50% 甲醇作为提取液。

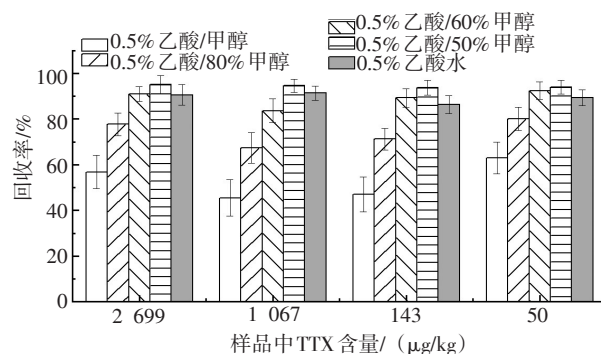


图 1 不同提取条件下腌制河豚鱼样品 TTX 回收率 (n=3)

Figure 1 Recoveries of TTX in salted pufferfish extracted with different solvents (n=3)

2.2 样品净化结果

0.5 mL 提取液直接过柱，高盐干制品（条件 1）回收率低于 80%；1 mL 提取液直接过柱，3 类样品回收率均低于 80%，且高盐干制品回收率低于 50%（条件 2）。在提取液中加入蛋白沉淀剂甲醇和乙腈后（条件 3~6）可以改善回收率，最佳比例为 0.5 mL 提取液中加入 0.5 mL 甲醇和 0.5 mL 乙腈（条件 4）。见图 2。

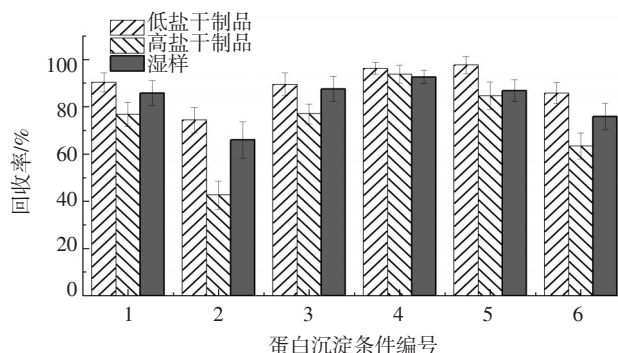


图 2 MCX 小柱净化时不同蛋白沉淀条件下腌制河豚鱼样品 TTX 回收率 (n=3)

Figure 2 Effects of the amount of protein precipitant on TTX recoveries during MCX cartridge purification (n=3)

2.3 基质效应

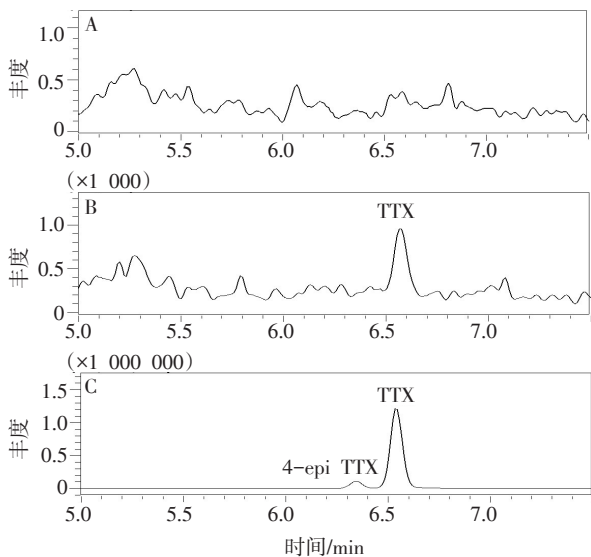
腌制河豚鱼样品中不同 TTX 含量时的基质效应为 85.7%~92.4%。采用优化后的提取净化方法检测,基质抑制效应不明显,可以采用纯溶剂标准定量校正样品基质中的结果。

2.4 方法的检出限和定量限

TTX 在 0.05~100 $\mu\text{g/L}$ (相当于样品中 2.0~4 000 $\mu\text{g/kg}$) 浓度范围内的线性关系良好,相关系数 (r^2) 为 0.999 2。样品 TTX 的检出限为 1 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.5 方法的特异性

阴性样品、阴性样品检出限水平 (1.0 $\mu\text{g/kg}$) 加标、阳性样品 (2 142 $\mu\text{g/kg}$) 中 TTX 色谱图见图 3。除阳性样品 TTX 之前有 4-epi-TTX 的异构体峰^[7],未见其他干扰,方法具有较高的特异性。



注: A 表示阴性样品; B 表示阴性样品检出限水平 (1.0 $\mu\text{g/kg}$) 加标; C 表示 2 142 $\mu\text{g/kg}$ 的阳性样品。

图 3 腌制河豚鱼样品 TTX 色谱图

Figure 3 Chromatograms of TTX in salted pufferfish

2.6 加标回收率

低盐干制品、高盐干制品和湿样的加标回收率分别为 82.9%~93.6%、81.2%~93.3% 和 84.2%~96.5%,相对标准偏差 (RSD) 分别为 4.8%~6.3%、4.3%~7.5% 和 4.4%~7.3%。

2.7 准确度和精密度

质控样品中 TTX 的日内准确度为 84.4%~95.6%,精密度为 4.9%~5.8%; 日间准确度为 86.1%~94.9%,精密度为 5.5%~8.5%。

2.8 样品检测结果

检测市售腌制河豚鱼样品 38 份,检出 TTX 23 份,检出率为 60.5%。TTX 含量超过 1 000 $\mu\text{g/kg}$ 的样品 3 份,分别为 1 067、2 142、2 699 $\mu\text{g/kg}$; 超过 SC/T 3124—2019《鲜、冻养殖河豚鱼》^[11] 限量 2 200 $\mu\text{g/kg}$ 的样品 1 份。

3 讨论

本研究通过优化样品提取和 Oasis MCX 阳离子交换 SPE 小柱净化条件,建立了腌制河豚鱼中 TTX 的快速准确测定方法。

海产品中 TTX 的提取主要包括乙酸水^[12] 和乙酸甲醇^[13] 2 种方法。腌制河豚鱼大部分为干制品,需在提取液中加入适量水提高提取效率;同时,样品中含有大量的盐会影响 MCX 小柱净化的回收率,需要在提取液中加入适量的有机溶剂尽可能降低无机盐含量。本研究优化了提取条件,发现采用 0.5% 乙酸/50% 甲醇可实现上述目的。

即使是采用优化后的最佳提取剂,提取液中仍含有较高浓度的蛋白质和无机盐,会竞争吸附阳离子交换活性点位,导致 TTX 在上样和淋洗阶段被冲洗下来,回收率降低^[14]。在提取液中加入甲醇和乙腈可以起到沉淀蛋白质和无机盐的效果,保证样品基质中 TTX 阳离子交换净化的回收率。

MCX 柱净化后的 TTX 多采用 1~2 mL 的 0.1 或 0.2 mol/L 的盐酸甲醇 (约 1% 或 2% 盐酸甲醇) 洗脱^[13, 15]。此类洗脱液洗脱强度大,TTX 的基质抑制效应强烈^[16]。本研究发现,采用与色谱初始流动相接近的乙腈水 (50%) 作为洗脱液,可在降低洗脱液中盐酸浓度的条件下获得良好的回收率并改善基质效应。本研究发现最佳洗脱条件为 2 mL 的 0.3% 盐酸/50% 乙腈/水。洗脱液中加入 5 μL 氨水,可使其 pH 值大于 3,满足 XBridge™ BEH Amide 柱的最佳 pH 使用要求,实现洗脱液不经氮吹直接进样的目的。

文献报道的免疫亲和柱净化法可以实现低水平的准确定量^[17],但对于含量超过柱容量 (一般为 1 000 ng) 的样品 (如 2 200 $\mu\text{g/kg}$),需要尝试多次稀释和多次过柱后才能准确定量。本研究建立的阳离子交换 SPE 小柱净化-LC-MS/MS 法可以实现腌制河豚鱼中痕量水平 TTX (检出限 1 $\mu\text{g/kg}$) 的测定,且线性范围为 2.0~4 000 $\mu\text{g/kg}$,涵盖了鲜、冻养殖河豚鱼限量值 (2 200 $\mu\text{g/kg}$)。同时,对于 TTX 含量超过线性范围的样品也只要 1 次过柱,适当稀释洗脱液使 TTX 含量处于线性范围内就能准确定量。

参考文献

- [1] GUARDONE L, MANESCHI A, MEUCCI V, et al. A global retrospective study on human cases of tetrodotoxin (TTX) poisoning after seafood consumption [J]. *Food Rev Int*, 2020, 36 (7): 645-667.
- [2] 杨双喜, 张立军, 朱永平, 等. 宁波市售鲜活海产品河豚毒素污染现状及评价 [J]. *浙江预防医学*, 2014, 26 (10): 1007-1009.
- [3] KATIKOU P, GOKBULUT C, KOSKER A R, et al. An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities [J/OL]. *Mar Drugs*, 2022, 20 [2023-05-31]. <https://doi.org/10.3390/md20010047>.
- [4] LI Y, XU X, LIU L, et al. A gold nanoparticle-based lateral flow immunosensor for ultrasensitive detection of tetrodotoxin [J]. *Analyt*, 2020, 145 (6): 2143-2151.
- [5] MAN C N, NOOR N M, HARN G L, et al. Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217 (47): 7455-7459.
- [6] YASUMOTO T, TOORU M. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography [J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49 (10): 3077-3080.
- [7] HU C, ZHANG Y, ZHOU Y, et al. Tetrodotoxin and its analogues in food: recent updates on sample preparation and analytical methods since 2012 [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70 (39): 12249-12269.
- [8] HORT V, ARNICH N, GUERIN T, et al. First detection of tetrodotoxin in bivalves and gastropods from the french mainland coasts [J/OL]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12 (9) [2023-05-31]. <https://doi.org/10.3390/toxins12900599>.
- [9] 张晓艺, 张秀尧, 蔡欣欣, 等. 温州市织纹螺麻痹性贝类毒素和河豚毒素检测结果分析 [J]. *预防医学*, 2019, 31 (9): 936-939.
- [10] TURNER A D, DHANJI-RAPKOVA M, FONG S Y T, et al. Ultra-high-performance hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the determination of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin in mussels, oysters, clams, cockles, and scallops: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2020, 103 (2): 533-562.
- [11] 中华人民共和国农业农村部. 鲜、冻养殖河豚鱼: SC/T 3124-2019 [S]. 2019.
- [12] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 二维超高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱联用法快速测定水产品及其制品中河豚毒素 [J]. *食品科学*, 2020, 41 (18): 311-316.
- [13] XU X M, YU X W, LU M, et al. Study of the matrix effects of tetrodotoxin and its content in cooked seafood by liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38 (19): 3374-3382.
- [14] REVERTE L, RAMBLA-ALEGRE M, LEONARDO S, et al. Development and validation of a maleimide-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of tetrodotoxin in oysters and mussels [J]. *Talanta*, 2018, 176: 659-666.
- [15] JEN H C, LIN S J, TSAI Y H, et al. Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871 (1): 95-100.
- [16] 达情, 刘伟, 沈保华, 等. 液相色谱-串联质谱法分析生物检材中的河豚毒素 [J]. *法医学杂志*, 2010, 26 (6): 432-435.
- [17] 严忠雍, 张小军, 李奇富, 等. 免疫亲和柱净化-液相色谱-串联质谱法测定海洋生物中河豚毒素 [J]. *分析化学*, 2015, 43 (2): 277-281.

收稿日期: 2023-04-17 修回日期: 2023-05-31 本文编辑: 吉兆洋

欢迎广大卫生健康科技工作者向《预防医学》投稿

www.zjfyxzz.com