

河豚鱼中河豚毒素的气相色谱质谱法测定

吴平谷, 赵永信, 沈向红, 张晶, 王立媛, 谭莹, 冯靓

(浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310009)

[摘要] 目的:建立河豚鱼中河豚毒素的气相色谱-质谱法定性、定量测定方法。方法:河豚鱼肉、内脏等用 2%乙酸/甲醇提取出河豚毒素,正己烷脱脂,然后用碱将河豚毒素水解成 2-氨基-8-羟基-6-羟甲基-喹唑啉(C9碱),水解液经过 C₁₈、SLH 固相萃取柱净化、BSTFA 衍生,采用气相色谱-质谱法全扫描方式测定,定量离子 392。结果:样品添加 0.25、1.0、5.0 mg/kg 河豚毒素,方法回收率为 51.2%~87.0%,RSD 为 4.7%~6.6%,方法最低检测限为 0.05 mg/kg。结论:建立的方法灵敏度高,定性定量准确,完全满足样品检测要求。

[关键词] 河豚毒素;气相色谱-质谱法;测定

[中图分类号] O657.7⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2009)03-0549-03

Determination of tetrodotoxin in globefish by gas chromatography - mass spectrometry

WU Ping-gu, ZHAO Yong-xin, SHEN Xiang-hong, ZHANG Jing, WANG Li-yuan, TAN Ying, FENG Liang
(Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China)

[Abstract] **Objective:** A method of gas chromatography - mass spectrometry to determine tetrodotoxin in globefish was established. **Methods:** Extracted with 2% acetic acid/methanol, defatted using hexane. Then alkaline hydrolysis was performed to change tetrodotoxin into 2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazoline (C9-base). Further cleanup using C₁₈ cartridge and the purified residue was derivatized with BSTFA, the trimethylsilylated (TMS) C9-base quantified using scan mode by GC/MS. Quantified ion was 392. **Results:** In this way, the rates of recovery of tetrodotoxin were 51.2%~87.0%. The variation coefficients were 4.7%~6.6% when spiked with 0.25, 1.0, 5.0 mg/kg of the tetrodotoxin and the detection limit of tetrodotoxin was 0.05 mg/kg, respectively. **Conclusion:** The method of tetrodotoxin detection in globefish is simple, sensitive, accurate and it can be satisfactorily applied to the sample analysis.

[Key words] Tetrodotoxin; Gas chromatography - mass spectrometry; Determination

河豚毒素(Tetrodotoxin TTX)是一种毒性很强的神经毒素,作用于中枢及外周神经系统,使得神经肌肉呈麻痹状态,严重的引起死亡。浙江省及我国沿海地区时有发生误食河豚鱼、织纹螺等引起食物河豚毒素中毒事件;另外河豚毒素具有高毒性及在军事、医学等领域的应用,因此建立河豚毒素的检测非常重要。

河豚毒素的检测方法主要有生物测定法、免疫化学法和仪器分析法,沈晓书等^[1]对近几年河豚毒素的检测方法进行综述,其中仪器分析法主要有荧光分光光度法^[2]、气相色谱-质谱法(GC/MS)^[3]、高效液相色谱法^[4~6]、液相色谱质谱法^[7,8]。本研究采用酸性甲醇提取,将河豚毒素先水解成 C9 碱,然后用 C₁₈ 固相萃取柱净化、硅烷化衍生后,用 GC/MS 测定河豚鱼中河豚毒素,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

6890 GC - 5973MS 色质联用仪(美国 Agilent);旋转蒸发器;超声清洗器;匀浆机;混匀器;河豚毒素对照品(纯度大于

98%);甲醇、乙酸、盐酸、氢氧化钠、无水硫酸钠等均为分析纯;双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA):迪马公司;C₁₈、SLH 固相萃取柱规格 500 mg/6 ml 杭州福裕科技服务有限公司;河豚毒素标准储备溶液(0.1 mg/ml):取 1.0 mg 河豚毒素于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,存放在 -18℃ 冰箱中备用。

河豚毒素标准使用溶液(5 μg/ml):取 0.5 ml 河豚毒素标准储备溶液于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,存放在 4℃ 冰箱中备用。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:HP-5MS 5%苯基甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);进样口温度 300℃;柱温程序:初温 120℃,保持 3 min,然后以 10℃/min 升至 280℃保持 10 min;载气为高纯氮气(99.999%),流速 1.0 ml/min,不分流进样。

1.2.2 质谱条件 E 源 源温 230℃;电子能量 70 eV;接口温度 280℃;电子倍增器电压 1506 V;质量扫描范围 30~450 amu;选择离子监测方式(SM);监测离子(m/z):定量离子 392,溶剂延迟:10 min。

1.3 样品处理

1.3.1 样品提取 称取绞碎试样 5.0 g 至 50 ml 离心管中,加 30 ml 0.1%乙酸甲醇溶液匀浆,60℃ 超声萃取 10 min,冷却

[作者简介] 吴平谷(1971-),男,硕士,副主任技师,主要从事食品安全、卫生检验工作。

后 4000 rpm 离心 5 min,分出上清液,上清液加入 20 ml正己烷充分振摇,4000 rpm 离心 5 min,吸出上层正己烷,下层有机相在 50℃真空旋转蒸至 5 ml左右,移入试管中,氮气吹到 2 ml,用 10%氢氧化钠溶液调节 pH至中性并读取体积待用。

1.3.2 样品水解、净化 按照体积,加入一定量氢氧化钠,使其浓度达到 6 mol/L,超声溶解,密封后放于 100℃烘箱内水解 30 min,取出冷却,用 20%盐酸溶液调节 pH至 9.0,4000 rpm 离心 5 min分出上清液,上清液过 C₁₈固相萃取柱(先经 5 ml甲醇和 5 ml水润洗),再加 5 ml水洗柱子,抽干水分,然后用 5 ml甲醇洗脱收集,氮气吹干,用 2 ml乙酸乙酯超声溶解,加到事先用 5 ml甲醇和 5 ml乙酸乙酯润洗的 SLH固相萃取柱上,待样液过柱后,用 5 ml乙酸乙酯淋洗除杂,最后用 5 ml甲醇洗脱收集,氮气吹干待用。

1.3.3 样品衍生 蒸发剩余物加 0.1 ml BSTFA + 1% (Φ) TMCS,加盖于旋涡混合器上震荡,在 100℃的烘箱中加热衍生 1.0 h,氮气吹干,加 0.2 ml甲苯溶解,取 1.0 μl甲苯溶液进行 GC-MS分析。吸取适量的河豚毒素标准溶液,加 2 ml蒸馏水,同 1.3.2水解、净化后进行衍生化。

2 结果与讨论

2.1 河豚毒素对照品水解物 C9碱的气相色谱质谱分析

河豚毒素本身没有紫外吸收也不能汽化,直接检测河豚毒素比较困难,但是河豚毒素通过碱水解后产生 C9碱(见图 1)和草酸,因此许多方法通过测定 C9碱^[4~6]和草酸^[10]来间接对河豚毒素进行定性、定量分析,C9碱的检测主要有 HPLC^[4~6]和 GC/MS^[3]方法,本研究采用 GC/MS方法测定 C9碱,C9碱本身不汽化,经过 BSTFA 衍生,其 2个羟基和 1个胺基被硅烷化,C9碱硅烷化物 GC/MS测定总离子流图见图 2,质谱图见图 3。

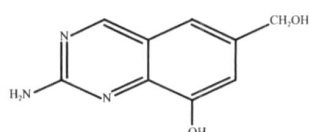


图 1 C9碱分子结构式

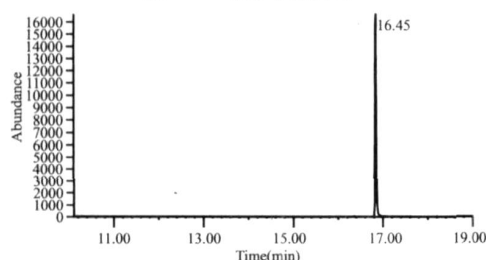


图 2 C9碱衍生物总离子流图

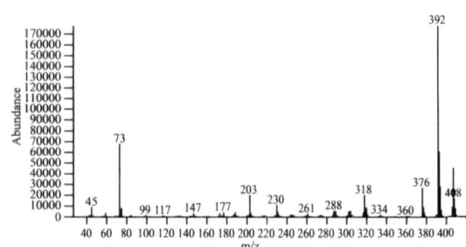


图 3 C9碱衍生物质谱图

由图 3分析,C₁₈碱分子量为 191,经过 BSTFA 衍生后形成分子量为 407分子离子峰,通过脱甲基形成 392的基峰,与 Asakawa^[3]等报道的相一致。由于河豚鱼肌肉、内脏中河豚毒素含量较高,特别是河豚鱼中毒样品,因此本研究采用 SCAN 全扫描方式检测河豚毒素,定量离子选择 392,对于含量低的样品如中毒病人血液等可以采用 SM方式,选择离子为 318、376、392、407,其样品净化、测定有待进一步研究。

2.2 河豚鱼中河豚毒素的测定

2.2.1 样品提取、水解、净化 河豚毒素易溶于酸性溶剂,且河豚鱼肌肉、内脏含有大量蛋白质、脂肪等,因此先 2%乙酸/甲醇提取除去蛋白质,然后用正己烷脱脂,然后蒸发除去甲醇;沈晓书^[2]等通过比较报道了河豚毒素加入一定量的 NaOH 后,在 80℃冰浴加热 45 min可得到最高的 C9碱产率;笔者同样采用河豚毒素碱水解,发现在 6 mol/L 氢氧化钠溶液中 100℃烘箱内保温 30 min C9碱产率最高,因此按照提取液体积计算,直接加入氢氧化钠进行水解可以得到较高 C9碱产率;样品水解液经过 C₁₈固相萃取柱净化,起到很好的提取浓缩效果,但是洗脱物仍很杂,特别是含有很多脂肪酸,经过 SLH固相萃取柱进一步净化,获得较佳净化效果。样品测定总离子流图见图 4、5。

2.2.2 河豚毒素的添加回收率、精密度 采用 SCAN方式,取 5.0 μg/ml河豚毒素标准使用溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、2.5、5.0 ml,氮气吹干后按照方法水解测定,以 392作为定量离子,制定浓度 X(μg/ml)与面积(Y)标准曲线为 Y = 1905.5X + 13702, r²为 0.969。

由于未找到不含河豚毒素的河豚鱼肌肉、内脏,且本人收集的河豚鱼,河豚毒素含量均很高(几十 mg/kg),无法进行低浓度标准添加回收实验,因此采用不含河豚毒素的草鱼肌肉、内脏进行河豚毒素添加实验,结果见表 1、2。

表 1 草鱼肌肉中河豚毒素的添加回收率、精密度和检测限

名称	添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	RSD (%)	检出限 (mg/kg)
草鱼肌肉	0.25	0.153, 0.135, 0.172	61.2, 54.0, 68.8	59.3	6.0	0.05
		0.142, 0.159, 0.132	56.8, 62.4, 52.8			
	1.0	0.634, 0.725, 0.596	63.4, 72.5, 59.6	67.1	5.1	
		0.658, 0.693, 0.719	65.8, 69.3, 71.9			
	5.0	4.15, 3.65, 3.86	83.0, 73.0, 77.2	79.2	4.7	
		4.25, 4.08, 3.78	85.0, 81.6, 75.6			

表 2 草鱼内脏中河豚毒素的添加回收率、精密度和检测限

名称	添加水平 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	RSD (%)	检出限 (mg/kg)
草鱼内脏	0.25	0.132, 0.128, 0.138	52.8, 51.2, 55.2	57.9	6.3	0.05
		0.155, 0.146, 0.170	62.0, 58.4, 68.0			
	1.0	0.574, 0.675, 0.723	57.4, 67.5, 72.3	65.7	5.5	
		0.645, 0.623, 0.704	64.5, 62.3, 70.4			
	5.0	4.35, 4.26, 3.56	87.0, 85.2, 71.2	78.2	6.6	
		3.75, 3.92, 3.62	75.0, 78.4, 72.4			

由表 1、2可知,样品添加 0.25、1.0、5.0 mg/kg河豚毒素,

回收率为 51.2%~87.0%之间, RSD 为 4.7%~6.6%, 按照 S/N 为 5 计算, 采用 SCAN 监测方式, 样品中河豚毒素的最低检出浓度为 0.05 mg/kg。另外河豚鱼毒性即河豚毒力一般以 MU/g (mouse unit) 表示, 1MU 相当于 0.22 μ g TX, <2.2 μ g TX/g 的河豚鱼为无毒、<22.0 μ g TX/g 为弱毒、<220 μ g TX/g 为强毒、>220 μ g TX/g 为剧毒, 毒性 >2.2 μ g TX/g 的河豚鱼为带毒^[9], 因此本方法完全可以满足河豚鱼中河豚毒素的检测。对于检测限要求很高的样品, 如中毒病人血液等等, 对其样品前处理等有待下一步研究。

2.2.3 河豚鱼中河豚毒素的检测 浙江省卫生监督所上半年从市场收缴的河豚鱼, 送到本实验室检测, 河豚鱼肌肉和内脏检测质量离子流图见图 4、5, 质谱图见图 6, 其中肌肉中河豚毒素含量为 15.3 μ g TX/g, 内脏为 54.5 μ g TX/g, 分别属于弱毒和强毒。

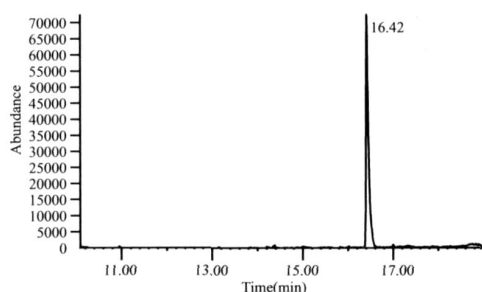


图 4 河豚鱼肌肉测定质量离子流图

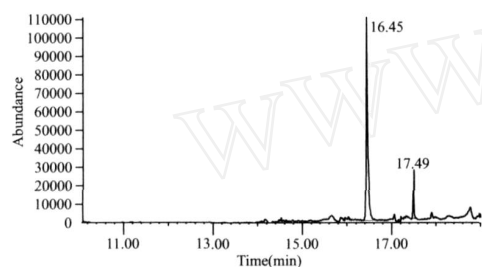


图 5 河豚鱼内脏测定质量离子流图

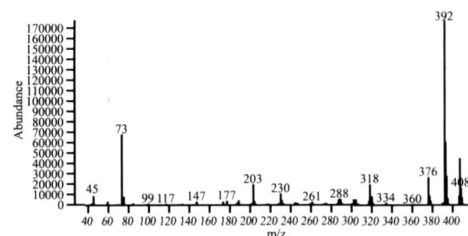


图 6 河豚鱼样品中河豚毒素测定质谱图

[参考文献]

- [1] 沈晓书, 顾明松, 谢剑炜. 河豚毒素分析检测方法研究进展 [J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30 (3): 295 - 298.
- [2] 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.
- [3] Asakawa M, Toyoshima T, Shida Y, et al. Paralytic toxins in a ribbon worm cephalothrix species (Nemertean) adherent to cultured oysters in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan [J]. Toxicon, 2000, 38 (6): 763 - 773.
- [4] 崔建洲, 申雪艳, 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.
- [5] 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中河豚毒素含量 [J]. 水产学报, 2006, 30 (6): 812 - 817.
- [6] Chih - Yu Chen, Hong - Nong Chou. Detection of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography in lined - moon shell and puffer fish [J]. Acta Zoologica Taiwanica, 1998, 9 (1): 41 - 48.
- [7] Hayashida M, Hayakawa H, Wada K. A column - switching LC/MS/ESI method for detecting tetrodotoxin and aconitum alkaloids in serum [J]. Leg Med (Tokyo), 2003, 5 (Suppl 1): 101 - 104.
- [8] 李爱峰, 于仁成, 周名江. 液相色谱电喷雾离子阱质谱联用分析河豚毒素 [J]. 分析化学, 2007, 35 (3): 397 - 400.
- [9] 杨晓东, 邓峰, 刘子文, 等. 广东省常见河豚鱼含毒状况研究 [J]. 广东卫生防疫, 1997, 23 (4): 4 - 8.
- [10] 李德昆, 林洪, 江洁, 等. 利用固定化草酸氧化酶快速检测河豚毒素 [J]. 中国水产科学, 2005, 12 (5): 638 - 642.

(收稿日期: 2008 - 12 - 08)

(上接第 538 页)

表 1 加标回收试验和精密度 (n=5)

婴幼儿配方奶粉				纯牛奶			
测得值	加入量	回收率	RSD*	测得值	加入量	回收率	RSD
(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
ND**	1.0	95	2.7	0.37	2.0	90	3.0
	5.0	96	2.7		5.0	87	0.8
	25.0	92	3.4		25.0	89	1.2
	50.0	89	2.3		50.0	95	1.5

注: * 相对标准偏差 (%); ** 未检出

3 小结

本文建立了自动固相萃取-高效液相色谱法测定乳及乳制品中三聚氰胺的方法, 方法准确、灵敏、自动化程度高,

应用于实际样品的测定获得满意结果。

[参考文献]

- [1] GB/T22388 - 2008. 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法 [S].
- [2] 宫小明, 董静, 孙军, 等. HPLC 法测定植物性原料中三聚氰胺 [J]. 食品科学, 2008, 29 (4): 321 - 323.
- [3] Tumipseed S, Casey C, Nochetto C, et al. Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC - MS/MS. FDA Laboratory Information Bulletin, 2008: 24: 4421. <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4421.html>
- [4] 张静, 张朋杰, 张宪臣, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联三重四级杆质谱法测定宠物食品中的三聚氰胺 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18 (10): 1950 - 1952.

(收稿日期: 2008 - 10 - 28)