

## 固相萃取-超过滤-液相色谱/质谱联用法 测定织纹螺中的河豚毒素

骆和东, 贾玉珠, 朱宝平

(厦门市疾病预防控制中心, 福建 厦门 361021)

**摘要** :建立了液相色谱-质谱法测定织纹螺中河豚毒素的分析方法。匀质后的样品用 0.03 mol/L 乙酸溶液提取,水浴加热 10 min,用 Sep-Pak C<sub>18</sub> 固相萃取柱净化,再用截留相对分子质量为 3 000 的超滤管过滤。采用 Inertsil ODS-3 色谱柱分离,以含有 30 mmol/L 七氟丁酸的甲酸铵溶液(1 mmol/L)-甲醇(体积比为 99:1)为流动相,采用电喷雾离子源,选择离子监测模式检测。以保留时间和河豚毒素的二级质谱特征碎片离子予以定性确证。结果表明,在此分析条件下,可将河豚毒素及其衍生物分离,在 0.01 ~ 10.0 mg/L 范围内线性关系良好( $r^2 > 0.995$ ),检出限(以 3 倍信噪比为计)为 2  $\mu\text{g/L}$ ,平均加标回收率为 72.5% ~ 80.4%,相对标准偏差为 4.48% ~ 8.87%。将该方法用于实际样品检测,在赤潮后所采集的织纹螺样品中检出了河豚毒素。

**关键词** :液相色谱-质谱法;固相萃取;超过滤;河豚毒素;织纹螺

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)06-0917-05 栏目类别 :研究论文

## Determination of Tetrodotoxin in Nassarius by Solid-Phase Extraction, Ultrafiltration and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LUO Hedong, JIA Yuzhu, ZHU Baoping

(Xiamen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Xiamen 361021, China)

**Abstract** : A method for the determination and analysis of tetrodotoxin (TTX) in nassarius using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has been developed. The homogenized sample was extracted with 0.03 mol/L acetic acid by heating in a boiling water-bath for 10 min and then was cleaned up on a Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge column and filtered through a  $M_r$  3 000 cut-off ultrafree microcentrifuge filter. Chromatographic separation was performed on an Inertsil ODS-3 column using 30 mmol/L heptafluorobutyric acid in 1 mmol/L ammonia formate buffer-methanol (99:1, v/v) as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min. TTX was identified by retention time in positive mode with selected ion monitoring (SIM). The results showed that TTX and its analogs can be separated with the method. The linear range was 0.01 - 10.0 mg/L and the correlation coefficients were greater than 0.995 with a detection limit of 2  $\mu\text{g/L}$  ( $S/N = 3$ ). The average recoveries were in the range of 72.5% - 80.4% and the relative standard deviations were 4.48% - 8.87%. TTX of 0.04 - 0.50 mg/kg was found in nassarius that was collected from Fujian Province after red tide.

**Key words** : liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); solid-phase extraction (SPE); ultrafiltration; tetrodotoxin; nassarius

近年来,由织纹螺引发的食物中毒事件日趋增多<sup>[1-4]</sup>。织纹螺俗称麦螺、割香螺、甲锥螺,属软体动物门腹足纲织纹螺科,是一种生活在近海礁石附近和泥沙海底的螺类,盛产于我国东南沿海一带。有毒织纹螺体内常含有神经性毒素,人们食用后会发生神经麻痹中毒症状,死亡率高<sup>[4]</sup>。因此研究和

检测织纹螺中的毒素成分,防止食物中毒的发生具有重大意义。本实验采用液相色谱-质谱(LC/MS)联用法测定织纹螺中的河豚毒素,证实了有毒织纹螺中河豚毒素的存在。

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是目前自然界中的一种毒性最高的非蛋白性神经毒素<sup>[5]</sup>,广泛分布

于自然界中,如脊椎动物中的河豚、虾虎鱼、蝾螈、青蛙,无脊椎动物中的腹足类、头足类、蟹类、海星以及海洋细菌<sup>[6]</sup>。目前对河豚毒素的检测主要有小鼠生物检测法<sup>[7,8]</sup>、薄层色谱法<sup>[9]</sup>、电泳法<sup>[9]</sup>、酶联免疫法<sup>[10]</sup>、柱后衍生液相色谱荧光检测法<sup>[11,12]</sup>、气相色谱/质谱联用法<sup>[13]</sup>、LC/MS 联用法<sup>[14,15]</sup>等。小鼠生物检测法虽然是公认的检测方法,但精度低,无法区别各种麻痹毒素,难以做到准确性<sup>[16]</sup>。液相色谱法和气相色谱/质谱联用法都必须进行衍生才能检测,操作繁琐,因此人们逐步研究应用 LC/MS 分析技术直接定性定量检测 TTX。本文采用乙酸溶液直接提取, Sep-Pak C<sub>18</sub> 小柱净化,经超滤后,在选择离子监测(SIM)模式下直接进行 LC/MS 测定,方法的灵敏度高,操作方便,可满足贝类产品中毒素成分的分析 and 中毒检测的需要。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 series LC/MSD Trap SL 高效液相色谱/质谱联用仪(包括二极管阵列检测器(DAD)、四元泵、柱温箱、自动进样器、电喷雾离子源(ESI)(美国 Agilent 公司);Sigma 3K30 冷冻高速离心机(美国 Sigma 公司);Ika Ultra Turrax T18 Basic 分散机(广州仪科实验技术有限公司);Turbo Vap® II 浓缩仪(美国 Zymark 公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

河豚毒素标准品晶体,购自厦门国家海洋第三研究所,纯度 99%,实验时用 0.03 mol/L 乙酸溶液稀释至所需浓度;实验用小白鼠是由厦门大学抗癌中心提供的 19~21 g 雄性昆明种小白鼠;Sep-Pak C<sub>18</sub> Cartridges (1 000 mg/6 mL, Waters 公司);截留相对分子质量为 3 000 的超滤管(美国 Pall 公司);七氟丁酸(HFBA,英国 Lancaster Synthesis 公司);甲酸铵(德国 Sigma-Aldrich 公司);甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司)。

### 1.2 实验材料

织纹螺样品采自福建省莆田、宁德、福鼎、厦门等地区流通市场,经鉴定为红带织纹螺(*Nassarius succinctus*)和西格织纹螺(*Nassarius siquinjorensis*),于 -20 °C 冷冻保存,供实验室检测。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品的处理

挑取织纹螺可食部分绞碎混匀后,称取 5 g 样品,加入 3 倍体积 0.03 mol/L 乙酸溶液混匀后,于 100 °C 水浴水解 10 min,冷却后离心,残渣再重复提取后合并提取液,浓缩后载入 C<sub>18</sub> 固相萃取柱(使用

前应先使用 10 mL 甲醇和 10 mL 水活化)。用 10 mL 0.03 mol/L 乙酸溶液洗脱,洗脱液经冻干后用 0.03 mol/L 乙酸溶液溶解并定容到 2.0 mL,用超滤管离心过滤,供 LC/MS 检测。

#### 1.3.2 LC/MS 检测条件

色谱柱:Insertsil ODS-3(5 μm, 2.1 mm × 150 mm, GL Science);流动相:1 mmol/L 甲酸铵溶液(含 30 mmol/L 七氟丁酸, pH 4.6)-甲醇(体积比为 99:1);流速 0.3 mL/min;进样量 10 μL;柱温 30 °C。

质谱采用正离子模式,离子扫描范围  $m/z$  50~400,雾化压力 241 kPa,干燥气流速 9.0 L/min,干燥温度 350 °C,毛细管电压 3 500 V,裂解电压 1.0 V。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱与质谱的条件选择

河豚毒素的分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>,相对分子质量为 319.27,是一种氨基过氢喹啉化合物,其结构如图 1 所示,含有一个碳环、一个胍基、六个羟基和一个半缩醛内酯官能团。因此 TTX 的极性较强,在酸性条件下易发生质子化,在正离子模式下([M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  320)灵敏度远远高于负离子模式([M-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  318),所以实验中我们选择 ESI 源和酸性流动相,采用反相色谱柱在正离子的模式下使用选择离子模式检测。

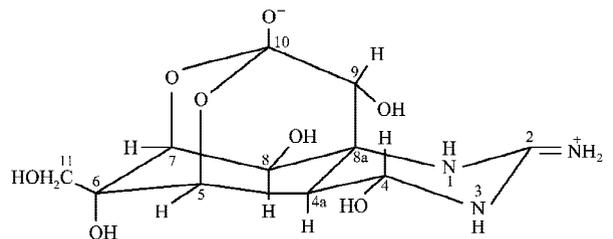


图 1 河豚毒素的结构式

Fig. 1 Structure of tetrodotoxin

TTX 对热稳定,但在 pH > 7 和 pH < 3 的条件下不稳定,在碱性条件下易分解<sup>[5]</sup>,其相关的衍生物有十余种<sup>[15]</sup>,如 4-epi-TTX、anh-TTX、河豚酸(TDA)等等。实验中发现,单独采用甲酸铵作流动相时无法将这些衍生物有效分离,为此我们在参考了文献[12,15]的基础上在流动相中引入了 HFBA 作为离子对试剂,这一方面提高了 TTX 在 C<sub>18</sub> 柱上的保留能力,同时也改善了 TTX 及其衍生物的分度,抑制了峰形拖尾(见图 2)。但 HFBA 浓度过高时会抑制 TTX 的离子强度,使灵敏度下降,所以在能够满足 TTX 及其衍生物分离的条件下应尽可能地降低 HFBA 的浓度。

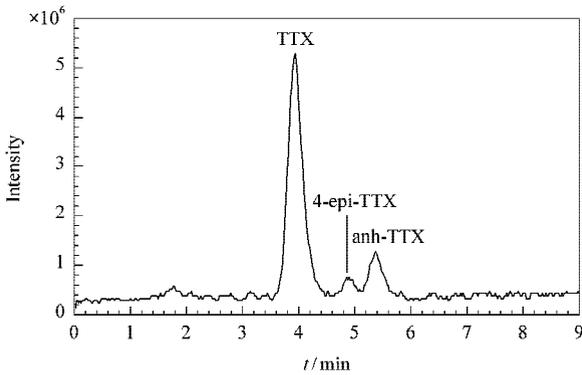


图 2 河豚毒素及其衍生物的总离子流色谱图  
Fig. 2 Total ion current chromatogram of TTX, 4-epi-TTX and anh-TTX

此外我们还考察了不同甲酸铵浓度及 pH 值对实验的影响。当甲酸铵浓度增大时, TTX 在色谱柱上的保留时间变短, 强度减弱, 因此在实验中选择甲酸铵浓度为 1 mmol/L, 调节 pH 在 4.6 左右进行检测。

为了提高离子化效率, 我们在流动相中引入甲醇来考察有机相对分离的影响。实验中当甲醇比例在 0% ~ 10% 变化时, 随着甲醇比例的提高, TTX 的保留减弱, TTX 与衍生物的分离效果逐渐变差。因此, 采用“1.3.2”节的色谱分析条件进行分离, 并调节各质谱参数以获得最强的 TTX 信号。在此条件下, TTX 在 4.0 min 左右出峰, 峰形良好, 并与其他衍生物完全分离。

## 2.2 LC/MS/MS 定性分析

在优化的 LC/MS 条件下, 本研究对 TTX 进行了二级质谱分析。通过全离子扫描, 找出准确的分子离子峰  $[M+H]^+$  ( $m/z$  320.2), 并选择合适的裂解电压对此母离子进行轰击, 以获得其碎片离子信息, 进行准确的定性分析。实验中在 0.8 ~ 2.0 V 内选择不同的裂解电压进行轰击, 发现所得的碎片离子及其强度变化不大。图 3 为 TTX 在裂解电压为 1.0 V 时的二级质谱谱图, 可以看出, TTX 的  $[M+H]^+$  ( $m/z$  320.2) 母离子裂解后, 主要得到 4 个碎片离子  $m/z$  302、 $m/z$  284、 $m/z$  256 和  $m/z$  162, 与文献 [15] 相似, 但在碎片离子强度上与文献有所差别, 以  $m/z$  302 子离子最强 (100%), 其余 3 个碎片离子的相对强度分别为 12%、4%、5%。这主要是因为文献中采用的是串联质谱而本研究采用的是离子阱质谱分析。进一步解析 TTX  $[M+H]^+$  离子的二级质谱裂解特征可以发现,  $m/z$  302 是母离子丢失一个水分子而得 ( $[M+H-H_2O]^+$ ),  $m/z$  284 是母离子丢失二个水分子而得 ( $[M+H-2H_2O]^+$ ),  $m/z$  256 是  $[M+H-2H_2O]^+$  离子在  $C_9-C_{10}$  键断裂后丢失一个 CO 所得,  $m/z$  162 是  $C_{8a}-C_9$  和

$C_6-C_{11}$  键断裂后连续丢失水分子而得到的一个 2-氨基氢化喹啉化合物<sup>[15]</sup> (见图 3 中  $m/z$  162 的结构式)。因此利用目标峰的保留时间及一级、二级质谱的特征碎片离子, 就能进行准确的定性定量分析。

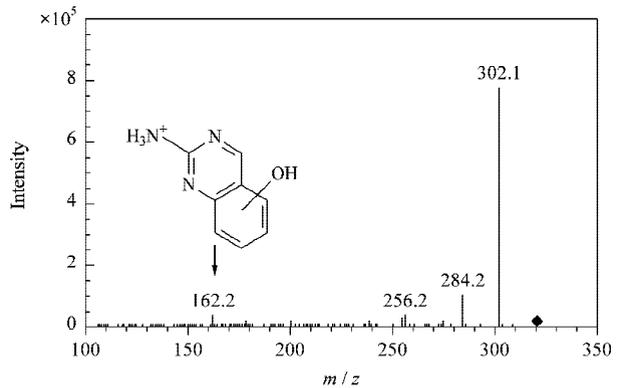


图 3 TTX 的二级质谱图  
Fig. 3 MS/MS spectrum of TTX  
Fragmentation amplitude, 1.0 V.

## 2.3 样品前处理条件的优化

TTX 不溶于水及一般有机溶剂, 但在无机酸或有机酸存在的条件下, 可溶于水和乙醇中<sup>[16]</sup>。文献 [17] 比较了乙酸、甲醇、乙醇、水 4 种溶剂的提取效果, 以乙酸的提取率最高; 文献 [18] 报道采用 0.1% ~ 0.5% 乙酸提取时无明显区别。小鼠生物检测法<sup>[7,8]</sup> 也均采用乙酸提取。本研究采用 0.03 mol/L 乙酸提取, 提取的粗毒原液即可以供小鼠生物法进行毒力测定, 同时经净化后又可供 LC/MS 检测。

为了去除基质干扰, 本研究采用  $C_{18}$  固相萃取小柱净化, 截留相对分子质量为 3 000 的超滤管过滤。  $C_{18}$  小柱能保留疏水性物质, 不吸附 TTX。研究中将 1.0 ~ 10  $\mu$ g 等不同浓度的 TTX 过  $C_{18}$  小柱, 按“1.3.1”方法直接洗脱并测定 TTX 的含量变化, 回收率在 91.3% 与 99.9% 之间, 说明  $C_{18}$  小柱对 TTX 基本不吸附。因此实验中将乙酸提取液直接过柱, 以去除有机基质的干扰, 并用超滤管过滤除去相对分子质量大于 3 000 的干扰物质来进一步净化。

## 2.4 线性范围及检出限

配制 0.01、0.05、0.10、0.50、1.0、10.0 mg/L 的 TTX 标准溶液按“1.3.2”节条件进样, 以 SIM 模式测定  $m/z$  320 离子的峰面积, 以峰面积 ( $Y$ ) 对质量浓度 ( $X$ , mg/L) 做工作曲线, 线性方程为  $Y = 7.14 \times 10^5 X + 1.79 \times 10^5$ , 相关系数 ( $r^2$ ) 为 0.997 7, 表明 TTX 在 0.01 ~ 10.0 mg/L 这一范围内具有较好的线性关系。以 3 倍信噪比确定 TTX 的检测限为 2  $\mu$ g/L。

## 2.5 方法的精密度和准确度

分别取 0.5 和 10.0 mg/L 两个不同浓度的

TTX 溶液进行日内和日间重现性实验,在一日内不同时间测定 6 次计算日内误差,其峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 2.55% 和 1.53%。在 7 日内连续每天测定计算日间误差,其峰面积的 RSD 分别为 4.94% 和 3.30%,可见日内和日间的 RSD 均小于 5%,说明采用  $[M + H]^+$  模式测定具有很好的重复性和稳定性。

在无毒的织纹螺中分别添加浓度水平为 1.0 mg/L 和 10.0 mg/L 的 TTX 进行加标回收实验,回收率为 72.5% ~ 80.4%,RSD 为 4.48% ~ 8.87%。

2.6 实际样品的测定

从我省各地市流通市场采集的织纹螺样品共 12 份,按小鼠生物检测法进行毒力试验并同时采用 LC/MS 方法测定 TTX,结果有 4 份样品中检出 TTX,其含量范围为 0.04 ~ 0.50 mg/kg。图 4 为织纹螺样品中  $m/z$  320 的选择离子色谱图,从保留时间来看,该样品中可能含有 TTX 及少量 4-epi-TTX。对  $m/z$  320 进一步进行 MS/MS 分析,发现同样产生  $m/z$  302、 $m/z$  284、 $m/z$  256、 $m/z$  162 碎片离子(图 5-a)且离子强度与 TTX 标准品相同;与自建的 TTX 标准谱库对比,匹配率大于 900(图 5-b),因此可以确证为 TTX。

我们还对同一阳性样品的 LC/MS 检测结果与小鼠生物法进行了比较。按照 1 MU = 0.22  $\mu$ g TTX 的换算关系<sup>[7]</sup>对小鼠生物法的结果进行折算,结果发现,当 LC/MS 检测结果分别为 0.50 mg/kg 和 0.38 mg/kg 时,相对应的小鼠生物法检测结果分别为 0.73 mg/kg 和 0.58 mg/kg,显然 LC/MS 检测结果偏低,这可能是该方法的回收率较低造成的。

本次织纹螺样品是在我省海域发生赤潮后采得的,从检测结果看,虽未超过有关标准规定的不得超过 10 MU/g 的限量范围<sup>[7]</sup>,但也为我们敲响了警钟。由于有毒织纹螺中毒症状与麻痹性贝类毒素(PSP)相似,长期以来国内学者普遍认为织纹螺中

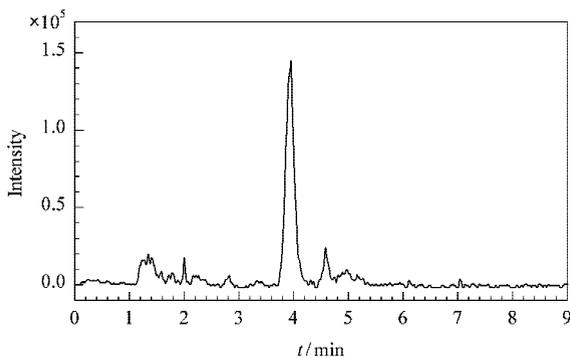


图 4 织纹螺样品的选择离子色谱图 ( $m/z$  320)

Fig. 4 SIM chromatogram of nassarius sample ( $m/z$  320)

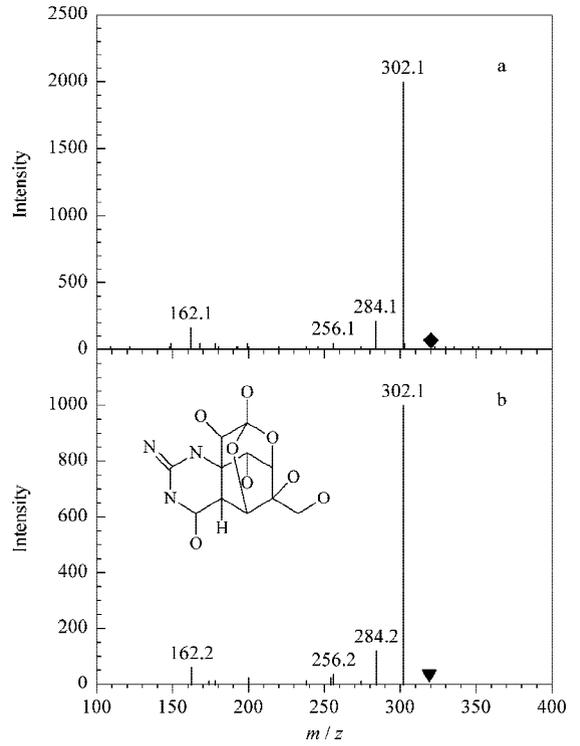


图 5 织纹螺样品中  $m/z$  320 的二级质谱图

Fig. 5 MS/MS spectra of Nassarius sample ( $m/z$  320)

a. MS/MS spectrum of  $m/z$  320 in nassarius sample; b. search result from library.

的神经毒素是 PSP<sup>[19-21]</sup>,但很少通过实验去研究和确认毒素成分。我们通过 LC/MS/MS 分析发现赤潮后的织纹螺中所含有的主要是 TTX,这与台湾及日本学者的研究相类似<sup>[22-24]</sup>。因此此方法的应用对研究贝类产品中的毒素成分、防止食物中毒的发生具有重大意义。

致谢:本实验得到了台湾海洋大学食品科学系黄登福教授及其实验室同仁的悉心指导和帮助,在此表示衷心感谢!

参考文献:

[1] Bulletin of Ministry of Health of P R China (中华人民共和国卫生部公告(2007 年第 10 号)). [06-27-2007]. <http://www.moh.gov.cn/newshtml/18848.htm>

[2] Jin L J, Hong R T, Ao Z X, Li J. Strail Journal of Preventive Medicine (金乐君,洪荣涛,敖志雄,李杰.海峡预防医学杂志), 2002, 8(6):64

[3] Lin X T, Zhang M S, Zhang Y Y, Wang Z J, Sun X F, Xing J, Pang Z Q. Jiangsu Journal of Preventive Medicine (林祥田,张明生,张元瑛,王志坚,孙雪峰,邢军,庞中全.江苏预防医学), 2005, 16(2):5

[4] Xu J Y, Xu G Z, Chen Y R, Qin P Z, Yu M, Ye L M, Yan P, Jin C G. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (徐景野,许国章,陈耀荣,秦品章,于梅,叶鹿鸣,闫鹏,金春光.中国卫生检验杂志), 2007, 17(1):63

[5] Jiang P Z. Foodborn Disease and Health. Beijing:Chemical Industry Press (姜培珍.食源性疾病与健康.北京:化学工

业出版社),2006:144

- [ 6 ] Hwang D F, Chueh C H, Jeng S S. *Toxicon*, 1990, 28( 1 ): 21
- [ 7 ] Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare of Japan. *Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation( Chemistry)*. Tokyo: Japan Food Hygiene Association, 1991: 296
- [ 8 ] Huang D F, Jeng S S. *Journal of Chinese Biochemistry Society*, 1991, 20: 80
- [ 9 ] Narita H, Noguchi T, Maruyama J, Ueda Y, Hashimoto K, Watanabe Y, Hida K. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1981, 47: 935
- [ 10 ] Wang J W, Luo X Y, Ji R, Zhang D, Zhang J. *Journal of Hygiene Research* (王健伟, 罗雪云, 计融, 张镡, 张靖. 卫生研究), 1997, 26( 2 ): 106
- [ 11 ] Nagashima T, Maruyama J, Noguchi J, Hashimoto K. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, 53: 819
- [ 12 ] Yasumoto T, Fudui M, Sasaki K, Sugiyama K. *J AOAC Int*, 1995, 78( 2 ): 574
- [ 13 ] Suenaga K, Kotoku S. *Arch Toxicol*, 1980, 44: 291
- [ 14 ] Dell'Aversano C, Eaglesham G K, Quilliam M A. *J Chromatogr A*, 2004, 1028: 155
- [ 15 ] Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyazawa T, Yasumoto T. *Anal Biochem*, 2001, 290: 10
- [ 16 ] Pharmaceutical Society of Japan. *Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists-With Commentary*. Zhang H X, transl. Beijing: Huawen Press (日本药学会编著. 卫生试验法·注解. 张洪祥, 译. 北京: 华文出版社), 1995: 336
- [ 17 ] Yang C, Su X R, Li T W, Jiang S. *Natural Product Research and Development* (杨春, 苏秀榕, 李太武, 蒋双. 天然产物研究与开发), 2003, 15( 5 ): 398
- [ 18 ] Liu H X, Zhang N, Dong L M, Li L F. *Journal of Fisheries of China* (刘海新, 张农, 董黎明, 李庐峰. 水产学报), 2006, 30( 6 ): 812
- [ 19 ] Huang P C. *Modern Preventive Medicine* (黄浦昌. 现代预防医学), 1999, 26( 4 ): 441
- [ 20 ] Lin X J, Xu W P, Jiang X G. *Chinese Journal of Food Hygiene* (林香娟, 徐卫平, 蒋贤根. 中国食品卫生杂志), 2000, 12( 1 ): 53
- [ 21 ] Huang S G. *Practical Preventive Medicine* (黄曙光. 实用预防医学), 2003, 10( 1 ): 85
- [ 22 ] Hwang D F, Cheng C A, Tsai H T, Shih D Y C, Ko H C, Yang R Z, Jeng S S. *Fish Sci*, 1995, 61( 4 ): 675
- [ 23 ] Hwang P A, Tsai Y H, Deng J F, Cheng C A, Ho P H, Hwang D F. *J Food Prot*, 2005, 65( 1 ): 1696
- [ 24 ] Noguchi T J, Maruyama J, Narita H, Hashimoto K. *Toxicon*, 1984, 22: 219

## 书 讯

### 《样品前处理仪器与装置》

由中山大学李攻科教授等编著的《样品前处理仪器与装置》已于 2007 年 5 月由化学工业出版社出版。

本书是“分析仪器使用与维护丛书”的分册之一。书中全面系统地介绍了目前国际上各种先进的样品前处理技术,着重介绍了样品前处理装置及仪器的结构、原理、使用维护方法及应用领域等,同时阐述了各种样品前处理装置或仪器与各类分析仪器的联用技术。内容包括:固相萃取、固相微萃取、微波消解及微波辅助萃取、超临界流体萃取、加速溶剂萃取、膜分离、凝胶渗透色谱、热解吸、吹扫捕集、流动注射、薄层扫描、液相微萃取、高速逆流色谱等样品前处理仪器与装置及其应用。

本书力图反映样品前处理仪器与装置的基本原理、结构及国内外有关新成就、新技术,可供科研院所、大专院校、工矿企业、分析测试部门从事科学研究和分析测试的工作者参考,也可作为大专院校和科研院所相关专业师生的教学参考书。

“分析仪器使用与维护丛书”由中国仪器仪表学会分析仪器学会组织编写,丛书已出版的其他分册还有《分析仪器与仪器分析概论》、《高效液相色谱仪器系统》、《气相色谱仪器系统》、《离子色谱仪器》、《热分析仪器》、《傅里叶变换红外光谱仪》、《原子吸收光谱仪》、《紫外可见光光度计》、《物性分析仪器》等。

《样品前处理仪器与装置》采用 B5 开本,319 页,书号 978-7-122-00060-6,定价 45.00 元。

详情可登录化学工业出版社网站查询(www.cip.com.cn)。