

实验技术与方法

高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定鱼体中河豚毒素

梁素丹¹,陈剑刚¹,张瑰¹,朱炳辉²

(1. 珠海市疾病预防控制中心,广东 珠海 519000; 2. 广东省疾病预防控制中心,广东 广州 511430)

摘要:目的 建立高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪多反应监测技术(MRM)测定鱼体中的河豚毒素(TTX)含量的方法。方法 海鱼样品用80%酸化甲醇水溶液(含0.1%乙酸)超声提取,二氯甲烷脱脂净化,超滤管离心,取滤液过膜后进行分析。目标物TTX以pH=3.5的乙腈-0.06%甲酸铵溶液(65:35,V/V)为流动相,经HILIC色谱柱(100 mm×2.1 mm,3 μm)等梯度洗脱分离,采用电喷雾离子源,选择质谱多反应监测正离子模式,以保留时间和河豚毒素的二级质谱特征碎片离子予以双定性确证,基质标准曲线校正,外标法定量。结果 河豚毒素与杂质能良好分离,在0.10~2.0 mg/kg范围内线性关系良好($r=0.997$),方法检出限为0.012 mg/kg,定量限为0.041 mg/kg,加标回收率为75.7%~108.1%,相对标准偏差为1.4%~5.1%。应用该方法对20份实际样品进行检测,均未检出TTX。结论 本方法准确、快捷、简便,可应用于食物中毒因子识别与鉴定。

关键词:高效液相色谱-串联四级杆质谱;河豚毒素;鱼;食品安全

中图分类号:R155;R155.3⁺2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)01-0027-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.01.007

Determination of tetrodotoxin in fish by liquid chromatography tandem mass spectrometry

LIANG Su-dan, CHEN Jian-gang, ZHANG Gui, ZHU Bing-hui

(Zhuhai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhuhai 519000, China)

Abstract: Objective To establish a method of multiple reaction monitoring technology (MRM) by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) to detect tetrodotoxin (TTX) content in fish. **Methods** Fish samples were ultrasonic extracted by 80% acidified methanol solution (containing 0.1% acetic acid), and purified by dichloromethane, centrifuged by ultrafiltration, and analyzed after membrane filtration. TTX was separated on a HILIC column, with acetonitrile-0.06% ammonium formate solution (V/V = 65:35, pH = 3.5) as the mobile phase for equal gradient elution. Multiple reaction monitoring (MRM) in positive ion mode was used, and qualitative confirmation was achieved from retention time and secondary mass characteristic ions of TTX. The matrix-matched external standard calibration curves were used for quantitative analysis. **Results** Tetrodotoxin and impurity could be well separated, and it showed good linearity in the range of 0.10-2.0 mg/kg ($r=0.997$). The detection limit of the method was 0.012 mg/kg, the limit of quantification was 0.041 mg/kg, the average recovery was 75.7%-108.1%, and the precision was 1.4%-5.1%. The method was applied to 20 fishes, while TTX was not detected. **Conclusion** The method was accurate, efficient and simple, and could be applied to the recognition and identification of factors of food poisoning.

Key words: High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; tetrodotoxin; fish; food safety

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是鲉鱼类及其他生物体内含有的一种氨基全氢喹啉型化合物,是毒性最强的非蛋白类神经毒素之一,对人体的致死量为6~7 μg/kg^[1]。其化学性质稳定,一般烹调手段难以破

坏,很多海洋食品中毒事件都与TTX有关。2013年广东省湛江雷州市22人发生河豚鱼中毒,2014年上海市食品安全风险监测中发现3件烤鱼片检出TTX。

目前对河豚毒素的检测方法主要有小鼠生物法^[2-3]、酶联免疫法^[4]、化学法。前两种方法只适合做初筛试验,不适合中毒快速应急检测。无论对未知毒素的定性还是对已知毒素的定量,化学分析法均以其灵敏、准确及自动化等显示出强大的优势,尤其是液-质联用法,既可避免生物法、免疫法在特异性和准确性方面的欠缺,也可弥补色谱法定性困难的不足。骆和东等^[5]用固相萃取-超过滤-液相色谱

收稿日期:2014-10-22

基金项目:珠海市科技计划项目(2013D0401990022)

作者简介:梁素丹 女 主管技师 研究方向为食品理化检验

E-mail:lsudan@126.com

通讯作者:陈剑刚 男 主任技师 研究方向为食品违禁药物及环

境污染物分析 E-mail:davidchenjg@sina.com

谱/质谱法测定织纹螺中的河豚毒素,结果回收率偏低,重复性稍差。金玉娥等^[6]用高效液相色谱-质谱法测定鲜鱼中河豚毒素,检出限低,重复性好,回收率高。添加高浓度的加标水平可以得到高回收率,但样品的处理过程很复杂。

本文采用80%酸化甲醇水溶液(含0.1%乙酸)超声提取样品,二氯甲烷脱脂净化,经超滤后,在质谱多反应监测(MRM)正离子模式下直接进行高效液相色谱-串联四级杆质谱法(HPLC-MS/MS)测定,方法灵敏度和准确度高,精密度和重现性好,可应用于食物中毒因子识别与鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

空白鱼样取自新鲜鲈鱼,从市场购买,挑取鱼可食用部分绞碎混匀。

1.1.2 主要仪器与试剂

高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪(2695-Quattro Premier XE,美国Waters)、低温高速离心机、漩涡混合器、Milli-Q超纯水系统、0.5 ml离心超滤管(截留相对分子量3 000)。

TTX标准品(Must-12121802,纯度>99%,厦门国家海洋第三研究所),乙腈、甲醇均为色谱纯,冰乙酸(优级纯),二氯甲烷(高效液相色谱纯,德国CNW),超纯水(18.2 MΩ·cm),80%酸化甲醇水溶液(含0.1%乙酸):移取160 ml甲醇,0.2 ml冰乙酸,用纯水稀释至200 ml。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

精密称量TTX 1.0 mg置于10 ml容量瓶中,用0.05 mol/L乙酸定容至刻度,使其溶解后即得100 mg/L的TTX储备溶液,置于冰箱4℃保存。TTX储备液用0.05 mol/L乙酸溶液稀释后作为标准使用液,用于基质标准曲线的配制。

1.2.2 样品前处理

称取1.0 g样品于50 ml的聚丙烯离心管中,加入4 ml 80%酸化甲醇水溶液(含0.1%乙酸)混匀后,漩涡器振摇2 min,50℃超声5 min,静置分层后,4℃10 000 r/min离心10 min,取上清液,加4 ml提取剂对残余物进行二次提取,4℃10 000 r/min离心10 min后合并上清液。上清液在50℃氮吹仪吹至近干,用0.05 mol/L的乙酸溶解并定容至2.0 ml。加3 ml二氯甲烷,振荡2 min,4 000 r/min离心10 min,收集上清液,加入3 ml二氯甲烷进行二次脱脂,4 000 r/min离心10 min后吸取0.5 ml上清液,装入

超滤离心管中,4℃13 000 r/min离心20 min,滤液过0.22 μm滤膜,供HPLC-MS/MS检测。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:采用Atlantis[®]HILIC Silica色谱柱(100 mm×2.1 mm,3 μm),流动相:乙腈-0.06%甲酸铵水溶液(V/V=65:35,pH=3.5),流速0.2 ml/min,柱温40℃,进样体积10 μl。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),多反应监测(MRM)正离子模式。毛细管电压3.50 kV,锥孔电压45 V,离子源温度120℃,脱溶剂温度350℃。其他参数见表1。

表1 河豚毒素的质谱参数

母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
320.00	162.10(定性)	45.00	46.00
320.00	302.10(定量)	45.00	30.00

2 结果与分析

2.1 仪器条件选择

2.1.1 色谱条件的选择

TTX是强极性化合物,在反相C₁₈色谱柱上不保留,而HILIC亲水色谱柱能改善TTX在反相色谱中保留差的缺点,该柱子在应用HPLC-MS进行极性化合物分析方面表现出强大的优势^[7-8],故本方法选择Atlantis[®]HILIC Silica色谱柱作为分析柱。

TTX的分子结构中含有胍基团,在酸性条件下易发生质子化,因此本方法选择酸性流动相,并考察乙腈-0.1%甲酸水溶液和乙腈-0.06%甲酸铵水溶液(pH=3.5)两种流动相对分析物离子化效率和色谱峰形的影响。试验发现,乙腈-0.06%甲酸铵水溶液为流动相时,TTX离子化效率高,峰形好,与杂质分离效果较好,故本方法选择乙腈-0.06%甲酸铵水溶液为流动相。通过改变流动相比比例,发现两者比例在65:35(V/V)时TTX峰型最佳。见图1。

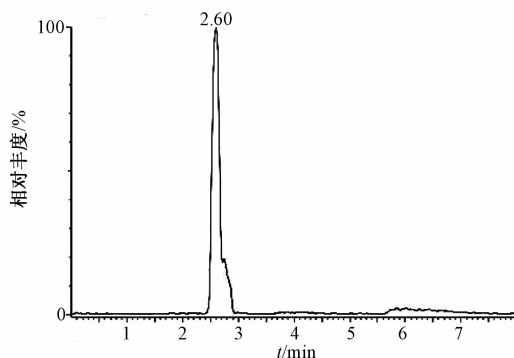


图1 TTX基质加标溶液MRM色谱图(0.6 mg/L)

Figure 1 MRM chromatogram of TTX matrix standard solution

2.1.2 MRM质谱条件的选择

选择正离子模式进行一级质谱扫描确定 TTX 的分子离子 ($[M + H]^+$, m/z 320.00), 然后以其分子离子为母离子进行相应的子离子扫描, 得到 m/z 为 302.10、162.10、284.09 等碎片离子, 其中 m/z 302.10 的丰度最高, 其次是 m/z 162.10, 因此选取 m/z 302.10 作为定量离子, m/z 162.10 为定性离子, 最后以多反应监测模式优化毛细管电压, 离子源温度等质谱参数, 结果见表 1, TTX 的二级质谱图见图 2。

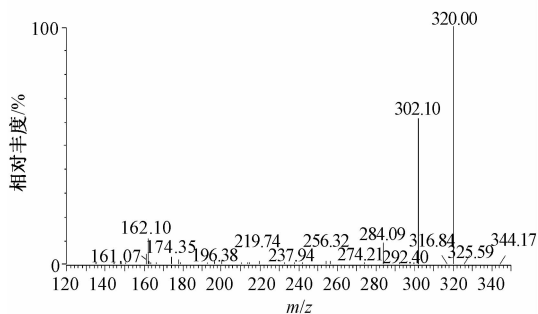


图 2 TTX 的二级质谱图

Figure 2 Secondary mass spectrometry of TTX

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取剂的选择

TTX 具有较强极性, 不溶于有机溶剂, 只溶于 pH = 3 ~ 7 的弱酸性水溶液。常用的提取剂为酸性甲醇或酸性水溶液。鱼体基质成分复杂, 为了提高 TTX 的提取效率, 用乙酸提取时需沸水浴加热去除蛋白质, 操作较为费时; 而乙酸甲醇溶液沉淀蛋白效果好^[9-10], 不需要加热, 但同时有许多脂溶性物质被提取出来, 因此提取后仍需要进一步净化^[11]。故本试验分别比较了 0.1% 乙酸甲醇、80% 甲醇水溶液 (含 0.1% 乙酸) 和 0.2% 乙酸水溶液三种提取剂, 结果用 80% 甲醇水溶液 (含 0.1% 乙酸) 提取的鱼体中 TTX 噪声水平低, 基质效应小, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的基质加标回收率达 90% 以上。

2.2.2 净化方法的选择

鱼组织经提取后的样液中所含杂质主要为蛋白质和脂肪, 而净化脂肪的方式主要有固相萃取和有机溶剂萃取两种, 其中 MCX SPE 柱和 C_{18} SPE 柱在 TTX 的检测中被广泛应用。本文对 MCX SPE 柱、 C_{18} SPE 柱和二氯甲烷有机溶剂的净化能力做了比较。200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 TTX 基质标准溶液经酸化甲醇水溶液提取后, 分别过 MCX SPE 柱和 C_{18} SPE 柱, 用 0.3% 乙酸作为洗脱液, 而过 MCX SPE 柱的滤液在 HPLC-MS/MS 没有检出目标峰 TTX, 有文献^[6,10]提出用 2% 三氟乙酸水溶液或含 0.2 mol/L HCl 的 20% 甲醇溶液洗脱, 通过试验发现, 净化效果不佳, 基质抑制很严重, 且强腐蚀性三氟乙酸及难挥发性氯离子对液质仪器系统有损坏。用 C_{18} SPE 柱净化,

洗脱液经冷冻干燥复溶超滤后进行分析, 回收率在 80% 左右。而用二氯甲烷按 1.2.2 进行脱脂处理后分析, 噪声明显降低, 基质干扰小, 回收率达 90% 以上。结果表明, 经二氯甲烷净化处理回收率最高, 净化效果最好, 也免去过柱的繁琐和耗时, 本文最后选用二氯甲烷进行脱脂净化。

2.3 方法的线性范围、检出限、回收率及精密度

为了消除基质效应对 TTX 定量造成的误差, 采用基质加标法配制工作曲线。称取空白鱼样 1.0 g, 分别加入 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μg 标准物质, 配制 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/kg 的基质样品工作曲线, 按 1.2.2 方法处理, 以定量离子的峰面积对 TTX 浓度进行线性回归, 线性方程为 $y = 16.3069x - 286.704$, 相关系数 r 为 0.997, 表明 TTX 在 0.10 ~ 2.00 mg/kg 范围内线性关系良好, 以 3 倍信噪比计, 方法检出限为 0.012 mg/kg, 定量限为 0.041 mg/kg。

取 1.0 g 空白鱼样, 分别加入 0.10、0.40、0.80 μg TTX 标准溶液, 每个加标水平进行 6 次平行测定, 加标回收率为 75.7% ~ 108.1%, 相对标准偏差为 1.4% ~ 5.1%, 见表 2。

表 2 方法的回收率和精密度 ($n = 6$)

Table 2 Recoveries and precisions of determination			
加标水平 /(mg/kg)	测定值 /(mg/kg)	回收率 /%	精密度 /%
0.10	0.076	75.7	5.1
0.40	0.432	108.1	1.4
0.80	0.820	102.5	4.4

2.4 实际样品测定

应用该方法对市场上随机抽查的 20 份海鱼进行检测, 均未检出 TTX。

3 小结

TTX 的检测最大的难度是基质效应对检测结果准确性的影响, 按国家标准 GB/T 23217—2008 《水产品中河豚毒素的测定 液相色谱-荧光检测法》^[12] 进行实际测定, 回收率低, 基质效应大, 离子响应被抑制。很多学者用液-质检测 TTX, 但基质效应问题没有引起重视, 方法开发中少有评价, 只通过将加标量加大而使回收率变高, 但不适用于痕量的毒素分析。本方法通过基质外标法可以排除大部分的基质干扰, 用酸化甲醇水溶液去除蛋白质, 二氯甲烷脱脂净化, 超滤管过滤等改善基质抑制效应造成的定量误差, 结果更可信, 改善了峰型的同时又能降低了方法的检出限。

参考文献

[1] 乔红. 河豚毒素研究概况[J]. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(1): 50.

- [2] 王静,杨丽君,李兆杰,等. 昆明系小鼠生物法定量测定水产品中河豚毒素[J]. 食品科学,2011,32(4):181-184.
- [3] 林蔚,林健,黄宗绣. 用 ICR 小鼠生物法测定烤鱼片河豚毒素的研究[J]. 海峡预防医学杂志,2008,14(4):49-50.
- [4] Stokes A M, Williams B L, French S S. An improved competitive inhibition enzymatic immunoassay method for tetrodotoxin quantification[J]. Biological Procedures Online,2012,14:3.
- [5] 骆和东,贾玉珠,朱宝平. 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[J]. 色谱,2007,25(6):917-921.
- [6] 金玉娥,马佳鸣,熊丽蓓,等. HPLC-MS 法测定鲜鱼中的河豚毒素[J]. 中国司法鉴定,2012(2):22-25.
- [7] Dell' Aversano C, Eaglesham G K, Quilliam M A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1028(1):155-164.
- [8] Dell' Aversano C, Hess P, Quilliam M A. Hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins[J]. J Chromatogr A, 2005,1081(2):190-201.
- [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(3):549-551.
- [10] 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.
- [11] 李爱峰. 液-质联用技术分析海洋生物毒素的研究[D]. 山东:中国科学院研究生学院,2005.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 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]. 北京:中国标准出版社,2008.

实验技术与方法

微波萃取-反相高效液相色谱法测定钙片中维生素 D₃ 的含量

赵飞,高广慧,王凤娇

(辽宁省食品检验检测院,辽宁 沈阳 110000)

摘要:目的 建立微波萃取-反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定钙片中维生素 D₃ 含量的分析方法。方法 以甲醇为萃取溶剂,微波萃取保健食品中的维生素 D₃。甲醇为流动相,检测波长 264 nm,流速 1 ml/min,经 C₁₈ 反相高效液相色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)分离分析,测定钙片中维生素 D₃ 的含量。结果 采用本方法的线性范围为 0~4 μg/L ($r=0.9998$),检出限为 0.02 μg/L,回收率为 98.8%~100.0%,RSD 为 0.4% ($n=9$)。结论 本文建立的方法具有操作简单、快速,准确度高,稳定性好等优点,适用于实验室测定钙片中维生素 D₃ 的含量。

关键词:微波萃取;反相高效液相色谱法;钙片;维生素 D₃

中图分类号:R155; Q565⁺.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)01-0030-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.01.008

Determination of vitamin D₃ in calcium tablet with microwave extraction by RP-HPLC

ZHAO Fei, GAO Guang-hui, WANG Feng-jiao

(Liaoning Institute for Food Control, Liaoning Shenyang 110000, China)

Abstract: Objective To develop a RP-HPLC method for determination of vitamin D₃ in calcium tablet with microwave extraction. **Methods** Vitamin D₃ was extracted by microwave in the ethanol. The HPLC analysis was carried out on a C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with ethanol at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 264 nm. **Results** The calibration curves were linear within the range of 0-4 μg/L ($r=0.9998$), and the detection limit was 0.02 μg/L. **Conclusion** The recoveries for vitamin D₃ were between 98.8%-100.0%, and RSD was 0.4%. This method was simple, accurate and practical for the detection of vitamin D₃ in health food.

Key words: Microwave extraction; reversed phase high-performance liquid chromatography; calcium tablet; vitamin D₃

维生素 D₃ 是一种人体必须的脂溶性维生素。自

然状态下,紫外线照射和食物性补充是人体维生素 D₃ 的主要来源。维生素 D₃ 能参与钙和磷代谢,促进其吸收并对骨质的形成具有重要的作用^[1]。

当前,样品中的维生素 D₃ 主要采用正相高效液相色谱法紫外检测器检测^[2-3],灵敏度高、特异性和