

9种杀菌剂和氟虫腈。根据GB 2763—2014《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》^[10]对结果进行判定,3份样品的农药残留量均未超出国家规定的限量值。

3 小结

本试验前处理采用固相萃取、旋转蒸发浓缩的技术,质谱检测模式上应用分段ESI⁺与ESI⁻扫描方式,建立了水果中10种常用杀菌剂和杀虫剂(氟虫腈)同位素内标-液相色谱-串联质谱同时检测的方法。方法简便、灵敏度高,满足我国实验室农药残留的检测要求。

参考文献

- [1] 束放,王强,韩梅. 2013年我国农药生产与使用概况[J]. 中国植保导刊,2013,34(12):49-53.
- [2] 黄文雯. 浓缩果汁中苯并咪唑杀菌剂及其中间转化产物的液相色谱-串联质谱分析方法的研究[D]. 南宁:广西大学,2013.

- [3] 张廷勇. 蔬菜农药残留的检测方法[J]. 现代农业科技,2014(15):144.
- [4] 吴书博,余东林. 蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药的检测方法[J]. 农科研究,2014(1):47-48.
- [5] 周晓洁,赵良忠,夏湘,等. 在线净化/固相萃取-高效液相色谱法测定柑橘中多菌灵痕量残留量[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(11):3691-3698.
- [6] 马金凤. 凝胶渗透色谱-气相色谱质谱法测定花生中46种农药残留[D]. 济南:山东农业大学,2012.
- [7] 李培培,陈敏,王军. QuEChERS-高效液相色谱法检测红葡萄酒中多菌灵和甲霜灵杀菌剂残留[J]. 食品与发酵工业,2015,40(1):202-206.
- [8] 丁丽,曾绍东,魏晓奕,等. 超高效液相色谱-质谱法测定豆芽中多菌灵、2,4-二氯苯氧乙酸、恩诺沙星残留[J]. 食品科学,2014,35(22):169-175.
- [9] 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 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检验[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国农业部. GB 2763—2014 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. 北京:中国标准出版社,2014.

实验技术与方法

免疫亲和柱净化-高效液相色谱-串联质谱法 测定鱼肉和肝脏中河鲀毒素

岳亚军,张律,游杰,夏伟,陈戊申,张风雷

(深圳市罗湖区疾病预防控制中心,广东深圳 518020)

摘要:目的 采用免疫亲和柱净化鱼肉和肝脏中的河鲀毒素,建立高效液相色谱-三重四级杆质谱串联(LC-MS/MS)方法检测鱼肉和肝脏中的河鲀毒素,为水产品中的河鲀毒素检测提供方法依据。方法 选用 Zic-Hilic 色谱柱(150 mm×2.1 mm,5 μm),以10 mmol/L 甲酸铵-0.1% 甲酸-乙腈为流动相,采用梯度洗脱进行分离。样品用1% 乙酸-甲醇沉淀蛋白提取,上清液加入 PBS 缓冲液后经免疫亲和柱净化,将洗脱液氮吹至干定容后上机测定。多重反应监测(MRM)方式检测。结果 河鲀毒素的线性范围为1.0~1 000.0 ng/ml,鱼肉和肝脏中河鲀毒素的检出限分别为0.3和0.2 μg/kg,回收率在52.4%~72.6%之间。结论 本方法特异性强、提取效果好、无基质抑制效应,适用于鱼肉和肝脏中河鲀毒素的痕量检测。

关键词:河鲀毒素;鱼;肝脏;免疫亲和柱;液相色谱-串联质谱法;基质效应;检测

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0214-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.015

Immunoaffinity cartridge purification-determination of tetrodotoxin in fish organizations using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry

YUE Ya-jun, ZHANG Lv, YOU Jie, XIA Wei, CHEN Wu-shen, ZHANG Feng-lei

(Luohu Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518020, China)

Abstract: Objective To extract tetrodotoxin with immunoaffinity cartridge, develop an ultra fast liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) method for determination of tetrodotoxin in fish muscle and liver, and provide proof for detection TTX in aquatic products. **Methods** Tetrodotoxin was extracted by 1% acetic acid methanol, supernatant added with PBS buffer was loaded on immunoaffinity cartridge, the eluent was blow-dried by nitrogen and dissolved in constant volume. Then the sample was separated on a Zic-Hilic column with 10 mmol/L ammonium formate-0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phase by gradient elution. Detection was carried out by multiple reaction monitoring. **Results** Tetrodotoxin had a good linear result in the range of 1.0-1 000.0 ng/ml with detection limit of 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in muscle and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in liver respectively. The recovery was 52.4%-72.6%. **Conclusion** This method has excellent specificity, good effect of extraction and without matrix inhibition effect. The assay is suitable for trace detection of tetrodotoxin in fish muscle and liver.

Key words: Tetrodotoxin; fish; liver; immunoaffinity cartridge; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; matrix effect; detection

河鲀毒素(TTX)是一种毒性很强的神经毒素,它通过对钠离子通道的阻断作用而抑制神经冲动的传导,使感觉神经麻痹,四肢瘫痪,呼吸困难,最后因呼吸抑制而死亡。河鲀毒素对人的最小致死量约为0.5 mg/60 kg BW,毒性比氰化钠大1 000倍。河鲀鱼虽然含有剧毒,但肉味鲜美、营养丰富,被沿海地区的人们所喜爱,亚太沿海地区河鲀毒素食物中毒事件常有发生^[1-6]。

截至目前的研究表明:河鲀毒素除了主要存在于河鲀鱼体内,还广泛地分布于其他多种生物体内,包括毛颚类、腹足类、软体动物、棘皮类、两栖类、纽虫、海藻等生物,这些生物体内大都含有能分泌TTX的细菌^[7],所以通过食物链的传递使生物携带TTX的情况较为普遍,TTX对水产品及相关加工食品的污染已经引起了社会的广泛关注。从广东省进行过的调查结果来看,大部分样品没有检出TTX成分,个别有检出的样品TTX含量也很低,分析原因可能是:TTX的检测方法目前还存在不足,例如酶联免疫法定量不准确,回收率不高,稳定性不好;液相色谱-荧光检测法及GB/T 23217—2008《水产品中河豚毒素的测定 液相色谱-荧光检测法》^[8]检测效果并不理想,样品前处理回收率不高,基质抑制效应严重,对于含有痕量TTX的样品难以检出,因此要做好TTX的含量调查,首先必须要对检测方法进行优化,高效液相色谱-质谱联用法由于其检出限低、准确度高,可作为TTX检测的首选方法,但目前国内报道的关于检测鱼肉组织中TTX的高效液相色谱-质谱联用法中存在很多问题,例如回收率不高、基质抑制效应大、用工作曲线代替标准曲线虽能提高相对回收率,但对不同样品需做基质匹配,较为繁琐,且不利于TTX含量很低的样品检测^[9]。针对这些问题,本文采用1%乙酸-甲醇溶液对样品中的TTX进行提取,再利用免疫亲和柱进行净化,绝对回收率较高且稳定性好,并有效的消除

了基质的抑制效应,对于不同的样品无需再进行基质匹配,该方法灵敏可靠,适合鱼类水产品肌肉和肝脏组织中TTX的痕量检测。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品来自广东省惠来县沿海地区渔民打捞,包括暗鳍腹刺鲀、六斑刺鲀、白点凹鼻鲀、横纹东方鲀、星斑叉鼻鲀5种河鲀,每种样品各5份,样品于-20℃下保存于冰箱。

1.1.2 主要仪器与试剂

6410B Triple Quad 高效液相色谱-质谱联用仪(配有1200高效液相色谱仪和电喷雾离子源ESI,美国Agilent)、Zic-Hilic色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm ;德国Merck)、河鲀毒素免疫亲和柱(1000 ng, 3 ml;北京华安麦科)、高速低温离心机、GDX-271型全自动固相萃取仪(法国吉尔森)、Turbo Vap II定量浓缩仪(美国Biotage)。

去离子水(美国Millipore Q),乙腈、甲醇、甲酸、甲酸铵均为色谱纯,冰乙酸、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl均为分析纯,TTX标准品(CAS:4368-28-9,纯度为99%,大连瑞芳生化物品有限公司)、玻璃纤维滤纸(MG 550-HA,美国VICAM)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准储备液:取TTX标准品1 mg于10 ml容量瓶中,用1%乙酸-甲醇溶液溶解并定容至刻度,即为标准储备液,于-20℃下保存。

标准使用液:取适当体积的标准储备液用初始流动相溶液(10 mmol/L甲酸铵-0.1%甲酸:乙腈=30:70, V/V)进行稀释,得到浓度范围在1.0~1 000 ng/ml的标准使用液。磷酸盐缓冲液(PBS, 0.05

mol/L, pH = 7.3): 称取 Na_2HPO_4 5.35 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.175 g, NaCl 8.5 g, 用去离子水溶解并定容至 1 000 ml。

1.2.2 样品处理

称取 2 g 匀质鱼肉或鱼肝脏样品于 50 ml 塑料离心管中, 加入 10 ml 1% 乙酸-甲醇溶液, 漩涡振荡 3 min; 40 °C 水浴中超声提取 15 min, 冷却室温后, 6 000 r/min 离心 5 min; 取上清液 7 ml 加入 28 ml PBS 溶液进行稀释, 玻璃纤维滤纸过滤, 取 25 ml 滤液过免疫亲和柱; 流速控制在 1 ~ 2 滴/s, 待液体排干后, 10 ml 蒸馏水清洗 1 次, 流速控制在 2 ~ 3 滴/s; 待液体流完后用空气彻底排干, 加入 4 ml 2% 乙酸-甲醇进行洗脱, 流速控制在 1 滴/s; 收集洗脱液于 55 °C 下氮吹至干, 用 1 ml 初始流动相定容, 过 0.2 μm 滤膜, 供上机测定。

1.2.3 仪器条件

质谱条件: 电离源 ESI^+ 、干燥气温度 350 °C、干燥气流量 11.0 L/min、雾化压力 262 kPa, 毛细管电压 4 000 V, 监测模式为 MRM, m/z 320.0/302.1 为定量离子对, m/z 320.0/162.1 为辅助定性离子对。

色谱条件: 色谱柱: Zic-Hilic (150 mm \times 2.1 mm, 5 μm), 流动相: A 为 10 mmol/L 甲酸铵-0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈, 流动相流速 0.2 ml/min、柱温 25 °C、进样量 10 μl , 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流速/(ml/min)
0	30	70	0.2
0.80	30	70	0.2
3.00	80	20	0.2
5.00	80	20	0.2
5.01	30	70	0.4
11.00	30	70	0.4

2 结果与分析

2.1 前处理方法的优化

本方法样品前处理采用的是 TTX 免疫亲和柱固相萃取, 由于 TTX 抗原和抗体结合的特异性, 只有 TTX 在免疫亲和柱上有保留, 其他在柱子表面被吸附的杂质通过清洗被除去, 然后 TTX 被洗脱液洗脱下来, 通过这样的净化过程, 样品中的 TTX 大部分被富集, 对于 TTX 含量极低的样品的提取效果更好。在使用免疫亲和柱时需要注意: 亲和柱应保存在 2 ~ 8 °C, 不能冷冻; 使用前应回至室温 (22 ~ 25 °C); 每种亲和柱都有自己的柱容量, 本方法所选用的柱容量为 1 000 ng, 对于 TTX 含量较高的样品, 要做适当的稀释, 然后再进行上样, 否则就会上样过载, 造成检测结果不准确; 上样溶液的 pH 要保持在

6 ~ 8 之间, 保证抗原和抗体发生结合的环境条件, 若偏离此范围需用盐酸或氢氧化钠调节 pH; 上样的流速要控制在 1 ~ 2 滴/s, 速度过快 TTX 来不及吸附, 速度过慢会影响富集效率; 洗脱液的乙酸浓度是影响洗脱效果的一个关键因素, 比较了从 0.5% ~ 5.0% 的乙酸浓度, 发现 2% 的乙酸浓度洗脱效果较好, 此外洗脱的流速要控制在 1 滴/s, 确保结合在柱子上的 TTX 全部被洗脱下来。

2.2 色谱柱的优化

基质效应在液相色谱-质谱联用法中普遍存在, 它是影响目标物检测效果的一个重要因素; 如果样品前处理方法不当, 目标分析物和有抑制效应的内源性组分在离子源上共流出, 将影响目标物的离子化效率, 所以需要采取适当的前处理方法避免基质效应。消除基质效应可以通过优化样品前处理、同位素内标、合适的色谱分离方法来降低甚至消除^[10]。由于 TTX 没有内标物, 这就要求样品前处理尽可能的富集目标物和除去抑制 TTX 响应的杂质, 这样才可能获得较好的回收率。色谱柱选用两性离子的亲水性色谱柱 (Zic-Hilic), 对 TTX 这种极性较强的化合物有很好的保留, 同时两性离子的色谱柱耐酸碱范围更宽, 保留时间和峰型的重现性较好。样品前处理主要是通过固相萃取 (SPE) 来富集目标物, 所尝试过的 SPE 柱的类型有 C_{18} 、MCX、免疫亲和柱, C_{18} 柱对弱极性的杂质有保留, 但处理后的基质效应太大, MCX 阳离子交换柱在酸性环境下能够较好地与 TTX 进行离子选择而保留在柱上, 但样品回收率不高, 免疫亲和柱在保证了较高的回收率的前提下, 很好地消除了基质效应, 而且对痕量 TTX 的样品提取效果良好, 回收率也较稳定。

2.3 定性和定量结果

TTX 的精确分子量为 319.1, 在电离源 ESI^+ 下电离形成 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 母离子为 320.0, 经过能量碰撞形成特征碎片, 选取 m/z 320.0/302.1 作为定量离子对, m/z 320.0/162.1 为辅助定性离子对, TTX 的二级质谱图见图 1。

2.4 方法特异性

取空白鱼肉和肝脏样品按 1.2.2 处理后与空白基质加标样品进行分析, 结果空白鱼肉和空白肝脏基质中在 TTX 出峰位置上无响应, 说明空白基质无干扰, 方法特异性较好, 见图 2。

2.5 方法的线性方程、检出限和定量限结果

用初始流动相将 TTX 标准储备液进行稀释, 得到浓度范围为 1.0 ~ 1 000 ng/ml 的标准使用液。以 TTX 的浓度为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y) 进行

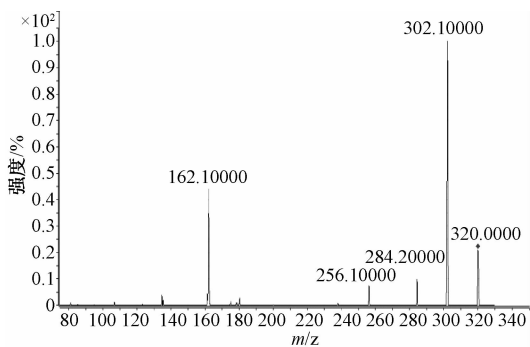
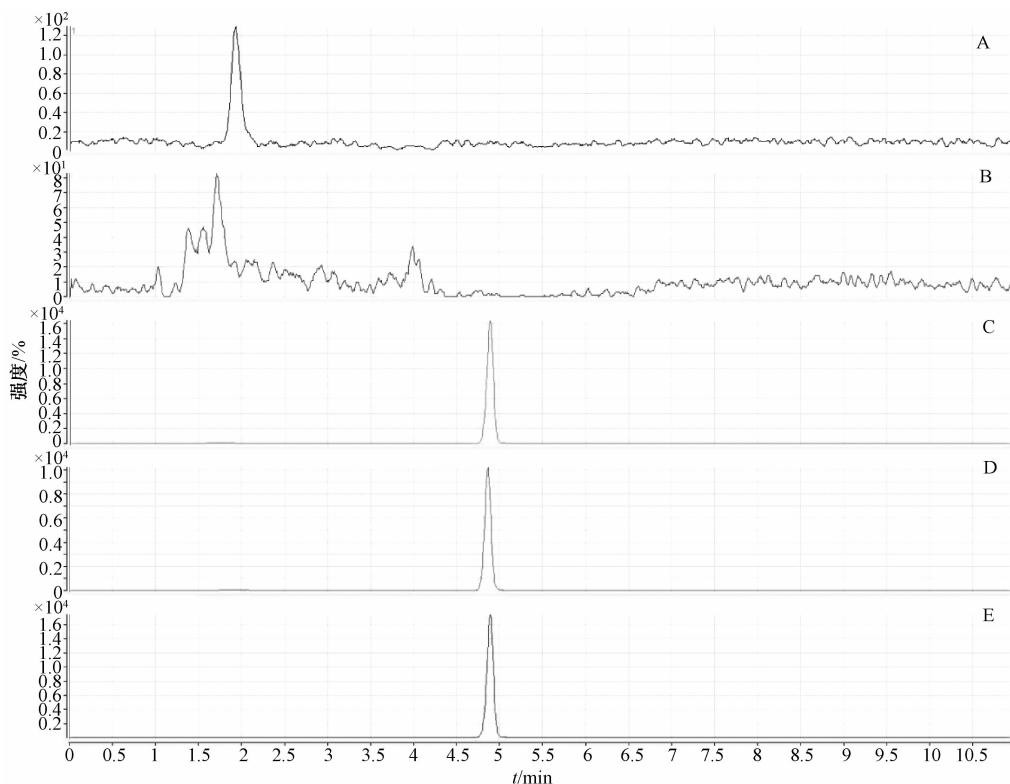


图1 TTX 的二级质谱图

Figure 1 Secondary mass spectrum of TTX



注:A 为空白鱼肉样品;B 为空白肝脏样品;C 为空白鱼肉加标样品(25 µg/kg TTX);D 为空白鱼肝脏加标样品(25 µg/kg TTX);E 为 20 ng/ml TTX 标准品

图2 MRM 质谱结果

Figure 2 Results of MRM chromatogram

表2 TTX 在鱼肉和肝脏中的线性范围、检出限、定量限

Table 2 Linear range, LOD, LOQ of TTX in fish muscle and liver

样品	线性方程	r	LOD/(µg/kg)	LOQ/(µg/kg)	线性范围/(ng/ml)
鱼肉	$y = 2828.3144x - 5802.6765$	0.999 9	0.3	1.0	1.0 ~ 1 000.0
鱼肝脏	$y = 2586.8950x + 6155.2676$	0.999 6	0.2	0.6	1.0 ~ 1000.0

理后进行分析。以当日标准曲线计算各样品中 TTX 的含量,计算 6 份质控样品的相对标准偏差(RSD),作为批内精密度。同法重复测定 6 天,计算 RSD 值,作为批间精密度,结果见表 3。

2.7 实际样品检测

本课题组对暗鳍腹刺鲀、六斑刺鲀、白点凹鼻鲀、横纹东方鲀、星斑叉鼻鲀共 5 种河鲀鱼的鱼肉

线性回归。以 TTX 在空白鱼肉和肝脏基质中响应值的 3 倍信噪比($S/N \geq 3$)对应的浓度作为检出限(LOD),以 10 倍信噪比($S/N = 10$)对应的浓度作为定量限(LOQ)。鱼肉和鱼肝脏中 TTX 在线性范围内线性良好, $r > 0.999$,检出限和定量限均低于 GB/T 23217—2008 中的值,能够满足 TTX 的痕量检测要求,见表 2。

2.6 方法的回收率结果

在空白鱼肉和鱼肝脏中添加适量的 TTX 标准溶液,配制成含 TTX 高、中、低 4 个浓度(1.0、25、100、250 µg/kg)的质控样品各 6 份,按照 1.2.2 处

和鱼肝脏样品进行了检测,检测结果见表 4。从表中结果来看,暗鳍腹刺鲀、六斑刺鲀、白点凹鼻鲀这 3 种河鲀鱼鱼肉中 TTX 的含量高于鱼肝脏中的含量,可能与品种、采样季节有关;横纹东方鲀的肌肉中 TTX 的含量和肝脏中的含量相差不大,星斑叉鼻鲀鱼肝脏中的 TTX 含量是鱼肉中的 4 倍多。

表3 鱼肉和鱼肝脏中 TTX 的回收率和精密度

(n=6)

Table 3 Recovery and RSD of TTX in fish muscle and liver

样品	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	批间		批内	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
鱼肉	1.0	65.5	3.5	61.2	1.9
	25	63.4	1.2	52.4	2.6
	100	62.9	3.3	57.4	1.8
	250	63.6	0.4	58.3	1.5
鱼肝脏	1.0	64.4	3.8	63.3	1.8
	25	68.3	9.1	65.5	1.7
	100	62.5	4.2	65.8	1.5
	250	59.9	8.5	72.6	1.1

表4 5种河鲀鱼的鱼肉和鱼肝脏中河鲀毒素的含量

Table 4 TTX content of muscle and liver in five kinds of fugu

品种	肌肉/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	肝脏/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
暗鳍腹刺鲀	61.0	23.9
六斑刺鲀	36.2	8.9
白点凹鼻鲀	25.4	19.3
横纹东方鲀	274.2	274.4
星斑叉鼻鲀	26.6	114.0

3 小结

本文所采用 LC-MS/MS 技术建立的鱼肉和肝脏中的河鲀毒素检测方法,样品前处理方法特异性好、无基质抑制效应、检出限低,适用于鱼肉和肝脏等组织中的河鲀毒素检测,为河鲀毒素的食物中毒检测提供了科学的参考依据。

参考文献

- [1] Akaki K, Hatano K. Determination of tetrodotoxin in puffer-fish tissues, and in serum and urine of intoxicated humans by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. 食卫誌, 2006, 47(2): 46-50.
- [2] Tsai Y H, Hwang D F, CHENG C A, et al. Determination of tetrodotoxin in human urine and blood using C_{18} cartridge column, ultrafiltration and LC-MS [J]. J Chromatogr B, 2006, 32(1): 75-80.
- [3] Kanchanapongkul J. Puffer fish poisoning: clinical features and management experience in 25 cases [J]. Journal of the Medical Association of Thailand, 2001, 84(3): 385-389.
- [4] Kan S K, Chan M K, David P. Nine fatal cases of puffer fish poisoning in Sabah, Malaysia [J]. The Medical Journal of Malaysia, 1987, 42(3): 199-200.
- [5] Diener M, Christian B, Ahmed M S, 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(6): 1997-2002.
- [6] 岳亚军, 张风雷, 赖少阳, 等. 应用液质联用技术诊断两起河鲀毒素食物中毒 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(3): 673-676.
- [7] 黄军, 严美姣, 陈国宏. 河鲀毒素的起源及研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2006, 17(6): 998-1000.
- [8] 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.
- [9] 吴佳俊, 黄文雯, 肖陈贵, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测河鲀毒素的方法研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3529-3536.
- [10] 向平, 沈敏, 卓先义. 液相色谱-质谱分析中的基质效应 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 753-756.

· 资讯 ·

欧盟修订食品添加剂标准, 将婴幼儿食品单列

2016年3月7日, 欧盟发布委员会实施条例(EU)2016/324, 修订欧洲议会和欧盟委员会条例(EU)No 1333/2008 食品添加剂法规附件2A部分和E部分的有关内容。

在附件2中A部分表格1增加“13EU609/2013提到的婴幼儿食品, 包括特殊医学用途的婴幼儿食品”类别。E部分食品类别由“所有食品允许的食品添加剂”修改为“所有食品允许的食品添加剂, 但不包括特供以外的婴幼儿食品”; 同时规定二氧化碳等11种添加剂在婴幼儿食品中的使用标准。

本法规自发布之日起第20天生效。(来源: 中国饮料工业协会网)

(相关链接: <http://www.chinabeverage.org/news.php?id=7779>)