

实验技术与方法

免疫亲和柱净化-亲水液相色谱-串联质谱法测定水产食品中河鲀毒素

王智¹, 褚学军¹, 郭萌萌², 伦丽丽³, 谭燕¹, 王瑜¹, 赵春霞²

(1. 青岛市产品质量检验技术研究所 青岛市产品质量监督检验研究院, 山东 青岛 266061;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 江苏美正生物

科技有限公司, 江苏 无锡 214135)

摘要:目的 本文采用免疫亲和柱选择性吸附样品溶液中的河鲀毒素,建立了测定水产食品中河鲀毒素(TTX)的亲水液相色谱-串联质谱分析方法。方法 样品以含1%乙酸的甲醇溶液提取,磷酸盐缓冲溶液稀释,再经免疫亲和柱富集和净化后进样分析。目标物以TSK-gel Amide-80亲水色谱柱(150 mm × 2.0 mm, 5 μm)分离,乙腈-0.1%甲酸水溶液(含5 mmol/L乙酸铵)梯度洗脱,采用电喷雾离子源,选择反应监测(SRM)正离子模式检测,溶剂标准曲线校正,外标法定量。结果 TTX在1~1 000 μg/L范围内线性良好,方法的检出限为1 μg/kg,定量限为3 μg/kg,在3~300 μg/kg范围内加标回收率为73.6%~95.2%,相对标准偏差(RSD)为5.37%~10.7%。结论 该方法可有效消除复杂基质样品中普遍存在的基质抑制效应,操作简便,色谱保留时间稳定,灵敏度高,准确度和重复性好,适用于烤鱼片、风味鱼干等水产食品中河鲀毒素的测定。

关键词:河鲀毒素;水产品;免疫亲和柱;亲水液相色谱-串联质谱法;生物毒素;测定;食品安全

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)03-0306-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.006

Determination of tetrodotoxin in aquatic foods by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry after immunoaffinity column clean-up

WANG Zhi, CHU Xue-jun, GUO Meng-meng, LUN Li-li, TAN Yan, WANG Yu, ZHAO Chun-xia
(Qingdao Institute of Product Quality Inspection and Technical Research, Qingdao Product Quality Supervision and Testing Research, Shandong Qingdao 266061, China)

Abstract: Objective A method for the determination of tetrodotoxin (TTX) in aquatic foods using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was been established. **Methods** The samples were extracted by 1% acetic acid-methanol and diluted with phosphate buffer, followed by the purification and concentration process by immunoaffinity columns (IACs). The separation of TTX was carried out on a column of TSK-gel Amide-80, and detected by positive electrospray ionization tandem mass spectrometry in the SRM mode. The external solvent standard calibration curves were used for quantitative analysis. **Results** The calibration curves were linear in the range of 1-1 000 μg/L for TTX, with the detection limit of 1 μg/kg and the quantification limit of 3 μg/kg. The average recoveries were between 73.6% and 95.2% with relative standard deviations (RSD) ranged from 5.37% to 10.7%. **Conclusion** The matrix effect was substantially eliminated and the stability of retention time were improved obviously. The proposed method could be used to quantify and identify TTX in fish products with excellent sensitivity, accuracy and reproducibility.

Key words: Tetrodotoxin; aquatic foods; immunoaffinity column; hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry; biotoxin; test; food safety

河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)是小分子量非蛋

白神经毒素,为自然界中毒性最强的神经毒素之一,存在于河鲀和多种海洋脊椎动物及无脊椎动物体内,如织纹螺、蝶蛰和虾虎鱼等^[1]。TTX属氨基全氢喹啉型化合物,可高选择性和高亲和性地阻断神经兴奋膜上钠离子通道,阻碍神经传导,从而引起神经麻痹,严重者可导致死亡。TTX化学性质稳定,一般烹调手段难以破坏,中毒后也缺乏有效

收稿日期:2016-01-19

基金项目:食品安全国家标准整合项目(ZHENGHE-2014-356)

作者简介:王智 男 工程师 研究方向为食品安全与质量检测

E-mail:253684746@qq.com

通信作者:郭萌萌 女 助理研究员 研究方向为水产品安全与质

量控制 E-mail:guomm@ysfri.ac.cn

的解救措施,导致 TTX 中毒事件时有发生。水产食品从外观上很难判断原料产品的种类和品质,一些不法商贩使用未正确处理的河鲀鱼或混入河鲀鱼的原料加工水产食品,使水产食品的 TTX 残留风险大大提高。近年来已出现多起因食用烤鱼片、调味鱼干等水产食品导致 TTX 中毒事件的报道^[2],因此建立一种准确度、灵敏度高的水产食品中 TTX 的检测方法,对于 TTX 监测和防控具有重要意义。

目前,河鲀毒素的检测方法以免疫分析法^[3]、液相色谱法^[4-5]和液相色谱-串联质谱法^[6-8]为主,其中液相色谱-串联质谱法因能对 TTX 进行定性、定量分析,可避免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,而成为目前使用最多的 TTX 分析方法。但由于水产食品的基质复杂,质谱分析时存在明显的基质抑制效应,使得现有水产食品中 TTX 的液相色谱-串联质谱检测法的灵敏度和准确度不高,需采用基质匹配标准曲线定量来校正回收率,但不同的水产食品基质空白较难获取且受基质成分的影响,TTX 分析的色谱保留时间不稳定,偏移较大,造成定性困难。

本文采用免疫亲和柱净化样品,优化了样品前处理条件和色谱分析条件,建立了适用于水产食品中 TTX 的液相色谱-串联质谱测定方法。本方法中 TTX 的保留时间稳定,消除了基质效应,无需基质匹配以标准溶液外标法即可准确定量,检出限低至 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,与目前水产食品中 TTX 测定方法相比^[9-10],灵敏度提高 1~2 个数量级,且精密度良好,操作简便,已应用于烤鱼片、鱼干等复杂基质样品中 TTX 的测定。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2015 年 3~10 月在青岛市的超市、海产品批发市场,随机采集水产食品样品共 100 份,其中烤鱼片 70 份、风味鱼干 30 份,密封冷藏保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

TSQ Quantum AccessTM液相色谱-串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific)、N-EVAP112 型氮气吹扫仪(美国 Organomation)、T18 basic 型均质机(德国 IKA)、24 通道固相萃取装置(美国 Supelco)、免疫亲和柱(柱容量 1 000 ng,3 ml,江苏美正生物科技有限公司)、高速离心机、旋涡混合器、pH 计、Milli-Q 超纯水仪。

河鲀毒素标准品(CAS: 4368-28-9,纯度 \geq 99.0%,美国 Sigma);甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,

冰乙酸(优级纯),超纯水(18.2 M Ω ·cm),磷酸盐缓冲溶液(PBS,0.05 mol/L,pH = 7.3),其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

提取:称取 2.0 g 粉碎后的烤鱼片或鱼干样品于 50 ml 离心管中,加入 8 ml 含 1% 乙酸的甲醇溶液,均质提取 2 min,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴超声提取 20 min,以 8 000 r/min 离心 5 min,转移上清液于 10 ml 比色管中,用含 1% 乙酸的甲醇溶液定容至 10 ml。移取 7 ml 提取液,加入 28 ml PBS 溶液以 1:4 的比例进行稀释后用玻璃纤维滤纸过滤,准确移取 25 ml 滤液,用 1 mol/L NaOH 调 pH 在(7.5 \pm 0.5)范围内,待上样。

净化:放出免疫亲和柱保存液,将样品溶液以 1 滴/s 的流速过免疫亲和柱,再用 10 ml 超纯水淋洗,抽干,用 3 ml 含 2% 乙酸的甲醇溶液洗脱,洗脱液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,加入 1.00 ml 0.1% 甲酸-乙腈溶液(1:1,V/V)溶解残渣,超声 1 min,过 0.2 μm 滤膜后,供液相色谱-串联质谱分析。

1.2.2 仪器条件

色谱:TSK-gel Amide-80 色谱柱(150 mm \times 2.0 mm,5 μm);流动相:A 为乙腈,B 为 0.1% 甲酸水溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵);洗脱梯度:0~2.0 min,30% B;2.1~6.0 min,90% B;6.1~8.0 min,30% B;流速 0.30 ml/min,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 20 μl 。

质谱:电喷雾离子源(ESI),选择反应监测(SRM),喷雾电压 4 800 V,鞘气压力 12 L/min,辅助气压力 2 L/min,离子传输管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,源内碰撞诱导解离电压 10 V。TTX 的质谱定量、定性离子对分别为 m/z 320.0/162.0 和 m/z 320.0/302.2,相应碰撞能分别为 39 和 25 eV。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

TTX 属强极性化合物,在反相 C₁₈ 色谱柱上不保留,因此本方法选用亲水色谱柱进行分析。比较了 Atlantis HILIC Silica 和 TSK-gel Amide-80 柱的色谱分离效果,发现 TSK-gel Amide-80 柱对 TTX 的保留能力较强,与杂质分离效果更好,故本方法选择 TSK-gel Amide-80 色谱柱作为分析柱。同时考虑到河鲀毒素的分子结构中含有胍基基团,在酸性条件下易发生质子化,因此本方法选择酸性流动相,分别考察了乙腈-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-0.1% 甲酸水溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)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-0.1%甲酸水溶液(含5 mmol/L 乙酸铵)作为流动相与乙腈-0.1%甲酸水溶液相比,前者的 TTX 离子化效率更高,灵敏度提高 2 倍以上,并减小拖尾,从而改善峰形,提高与杂质的分离度,故本方法选择乙腈-0.1%甲酸水溶液(含5 mmol/L 乙酸铵)为流动相,按照 1.2.2 洗脱程序,获得了保留时间稳定,且峰形对称无杂质干扰的色谱图,见图 1。

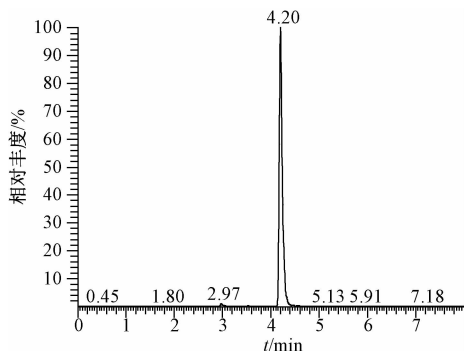


图 1 TTX 标准溶液色谱图(10 µg/L)

Figure 1 Chromatogram of TTX standard

2.2 样品前处理方法的优化

2.2.1 提取剂的选择

TTX 的极性较大,且具有胍基基团,在碱性条件下不稳定,因此常用方法以酸性试剂作为提取剂^[11-12]。本试验分别选择含 0.1%、0.3%、1% 乙酸的水溶液和含 0.1%、0.3%、1% 乙酸的甲醇溶液作为提取剂进行回收率比较,结果见图 2。试验发现以含乙酸的水溶液作为提取剂时,随着乙酸浓度的增加,提取出的共萃物增加,当乙酸浓度增至 1% 时,提取液浑浊、粘稠,无法进行下一步净化操作;乙酸浓度为 0.3% 时,过柱净化较困难,且回收率不足 50%;乙酸浓度为 0.1% 时,易于净化,但提取效果不理想,回收率仅为 60% 左右。以上结果说明,以乙酸水溶液为提取剂时,可能由于水产食品的基质复杂,共萃取出的脂类、蛋白质等杂质成分较多,影响了免疫亲和柱对目标物的吸附能力而导致回收率偏低。而以含乙酸的甲醇溶液作为提取剂时,甲醇有沉淀蛋白质的作用,提取液澄清,易于下一步净化操作,且回收率随着乙酸浓度的增加而升高,含 1% 乙酸的甲醇溶液的回收率达 90% 以上,因此,本方法选用含 1% 乙酸的甲醇溶液作为提取试剂。

2.2.2 净化方法的选择

水产食品基质复杂,需要有效的净化步骤以去除杂质干扰。检测 TTX 的净化方法主要有 C₁₈ 固相萃取法^[13]、QuEChERS 法^[10] 和免疫亲和柱^[14] 等,其中免疫亲和柱能选择性吸附样品溶液中的 TTX,特

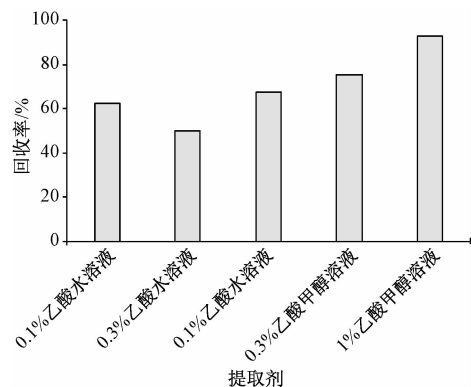


图 2 不同提取剂对 TTX 回收率的影响

Figure 2 Effect of different extraction solvent on TTX recovery

异性强,已较好地应用于生物样品的净化^[15],而上述其他方法均为非特异性方法,不能较好地去除杂质,存在一定的基质抑制效应,方法的灵敏度和准确度不高。试验考查了不同净化方法处理后的烤鱼片样品溶液中基质效应对目标物测定结果的影响。移取 1 ml 100 µg/L 的 TTX 标准溶液,于 45 °C 氮气吹干,分别加入按 C₁₈ 固相萃取法^[13]、QuEChERS 法^[10] 和本文 1.2.1 净化处理的阴性烤鱼片基质溶液溶解并定容于 1 ml,则各样品溶液中 TTX 的含量均为 20 µg/kg(作为考察定量结果的理论值),将样品溶液用 TTX 标准系列溶液外标法校正,定量结果见表 2,谱图见图 3。结果表明,由于样品溶液中共萃物对离子化效率的抑制,用非特异性方法净化的样品溶液中基质抑制效应明显,定量结果仅为理论值的 16.1% ~ 37.5%,而用免疫亲和柱净化样品,定量结果与理论值较吻合,基本消除基质效应,且从图 3 的信噪比看出本方法净化效果优于其他净化方法,明显提高了目标物检测的灵敏度,且保留时间更为稳定。

表 2 不同净化方法处理的样品基质中 TTX 的定量结果
(n = 3, µg/kg)

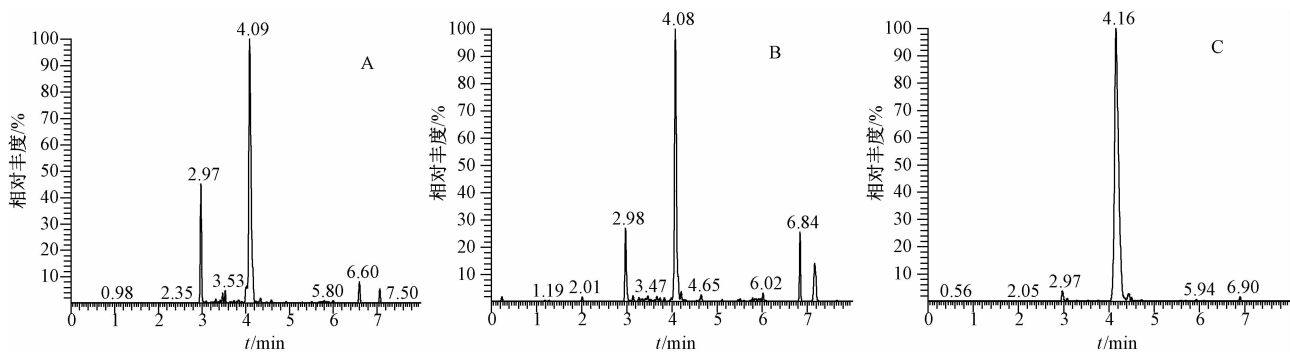
Table 2 Quantitative results in the different purified extracts

净化方法	理论值	定量结果		
		1	2	3
C ₁₈ 固相萃取净化方法	20	3.22	3.47	3.80
QuEChERS 净化方法	20	7.70	7.29	7.45
本文净化方法	20	18.68	19.23	18.46

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系和灵敏度

取适量 TTX 标准溶液进行稀释后配制成一一系列浓度梯度的标准工作液,在 1.2.2 条件下依次测定,以定量离子的峰面积对 TTX 浓度进行线性回归,线性方程为 $y = 40314.2x - 2272.52$,相关系数(r^2)为 0.999 6,线性范围为 1 ~ 1 000 µg/L。采用空白样品添加低浓度的标样,按 1.2 方法进行测定,



注:A为C₁₈固相萃取净化方法;B为QuEChERS净化方法;C为本文净化方法

图3 不同净化方法处理的样品基质中TTX的色谱图(20 μg/kg)

Figure 3 Chromatograms of TTX in the different purified extracts

以信噪比 $S/N \geq 3$ 确定 TTX 的检出限 (LOD) 为 1 μg/kg,以信噪比 $S/N \geq 10$ 确定 TTX 的定量限 (LOQ)为 3 μg/kg。试验结果表明,方法中 TTX 的线性良好,灵敏度较高,适用于 TTX 的定量分析。

2.3.2 准确度和精密度

选用阴性的烤鱼片和调味鱼干样品为空白测

试基质,分别添加 3 个浓度的 TTX 标准溶液,每个浓度做 6 个平行样品,按本方法进行准确度和精密度试验,分析结果见表 3。由表 3 看出,TTX 的回收率在 73.6% ~ 95.2% 范围内,相对标准偏差小于 15%。方法的准确度和精密度均满足 TTX 的日常监测要求。

表 3 方法的加标回收率和精密度结果(n = 6)

Table 3 Recoveries and RSDs of determination

分析物	添加水平 (μg/kg)	烤鱼片		调味鱼干	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
TTX	3	75.2,78.6,82.5,90.7,76.0,86.2	7.48	91.8,76.3,80.4,79.5,87.0,85.1	6.80
	30	80.7,90.2,76.8,95.2,94.3,82.6	8.84	97.5,96.1,73.6,83.7,86.9,80.4	10.7
	300	88.1,82.7,96.6,80.5,86.9,79.2	7.46	90.2,86.3,92.6,81.0,94.2,87.9	5.37

2.4 方法的实际应用

应用本方法对烤鱼片、风味鱼干等 100 份水产食品进行分析,发现 3 份样品含 TTX,分别为 2 份烤马面鱼片(含量分别为 7.95 和 22.3 μg/kg)和 1 份河鲀鱼干(含量为 282 μg/kg),其中 1 份烤马面鱼片阳性样品的色谱图见图 4。试验结果说明方法适用于鱼片、鱼干等水产食品中 TTX 的定量和定性分析,同时也发现烤鱼片在加工过程中可能掺入河鲀鱼原料而引入 TTX 残留风险,需在食品安全监控中重点关注。

3 小结

建立了测定水产食品中河鲀毒素的亲水液相色谱-串联质谱分析方法。色谱条件的优化使目标组分和杂质得到良好分离,保留时间稳定,有助于准确定量和定性;免疫亲和柱的应用有效净化了水产食品的复杂基质成分,消除了共流出组分对离子化效率的抑制;方法操作简便,适用于烤鱼片、风味鱼干等实际样品的测定,方法的应用为市场流通的水产食品中 TTX 含量检验提供了有效的技术手段。

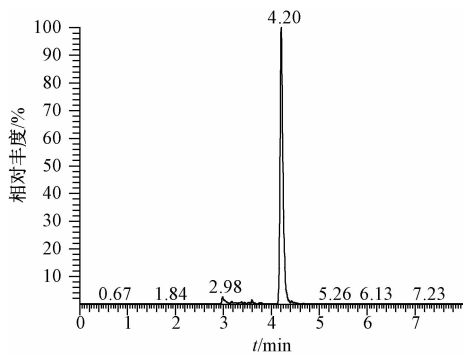


图 4 阳性烤鱼片样品(22.3 μg/kg)的色谱图

Figure 4 Chromatogram of a positive roasted fish fillets

参考文献

[1] Chau R, Kalaitzis J A, Neilan B A. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 104 (1/2):61-72.

[2] Hsieh C H, CHANG W T, CHANG H C, et al. Puffer fish-based commercial fraud identification in a segment of cytochrome b region by PCR-RFLP analysis [J]. Food Chemistry, 2010, 121 (4), 1305-1311.

[3] ZHOU Y, LI Y S, LU S Y, et al. Gold nanoparticle probe-based immunoassay as a new tool for tetrodotoxin detection in puffer fish tissues [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, 146 (1): 368-372

- [4] O'Leary M A, Schneider J J, Isbister G K. Use of high performance liquid chromatography to measure tetrodotoxin in serum and urine of poisoned patients[J]. *Toxicol*, 2004, 44(5): 549-553.
- [5] 戴月, 陶宁萍, 刘源, 等. 基质固相分散高效液相色谱法检测河豚毒素[J]. *光谱实验室*, 2012, 29(3): 1601-1604.
- [6] Nzoghuet J K, Campbell K, Barnes P, et al. Comparison of sample preparation methods, validation of an UPLC-MS/MS procedure for the quantification of tetrodotoxin present in marine gastropods and analysis of pufferfish [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1584-1589.
- [7] Cho H E, Ahn S Y, Son I S, et al. Determination and validation of tetrodotoxin in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectroscopy and its application [J]. *Forensic Science International*, 2014, 217(1/3): 76-80.
- [8] 梁素丹, 陈剑刚, 张瑰, 等. 高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定鱼体中河豚毒素[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(1): 27-30.
- [9] 阮丽萍, 蔡梅, 刘华良, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定烤鱼片中的河豚毒素[J]. *江苏预防医学*, 2014, 25(2): 7-9.
- [10] 曹文卿, 林黎明, 吴振兴, 等. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法测定红鳍东方豚肉中河豚毒素[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(5): 588-593.
- [11] Rodriguez P, Alfonso A, Otero P, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry method to detect tetrodotoxin and its analogues in the puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(2): 1103-1111.
- [12] Nakagawa T, Jang J, Yotsu-Yamashita M. Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 352(1): 142-144.
- [13] 骆和东, 贾玉珠, 朱宝平. 固相萃取-超过滤-液相色谱/质谱联用法测定纹织螺中的河豚毒素[J]. *色谱*, 2007, 25(6): 917-921.
- [14] ZHANG X J, YAN Z Y, WANG Y, et al. Immunoaffinity chromatography purification and ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of tetrodotoxin in marine organisms[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(12): 3129-3134.
- [15] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 免疫亲和柱净化-超高效亲水色谱-三重四级杆质谱联用法测定人尿液和血浆中河豚毒素[J]. *分析化学*, 2014, 42(11): 1611-1616.

实验技术与方法

免疫亲和柱层析-超高效液相色谱法测定动物性食品中6种黄曲霉毒素

李可, 梁肇海, 曾胜波, 温权

(深圳市福田区疾病预防控制中心, 广东深圳 518040)

摘要:目的 建立一种快速、灵敏的超高效液相色谱法, 同时测定动物性食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁ 和 M₂。方法 甲醇-水(80:20, V/V)提取粉碎或匀浆动物性食品中的黄曲霉毒素, 取部分样液经过免疫亲和柱层析净化, 经 C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 50 mm, 1.7 μm)分离, 荧光检测器检测。保留时间定性, 峰面积定量。结果 5 min 内完成分离, 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁ 和 M₂ 检出限分别为 0.038、0.010、0.062、0.010、0.110、0.016 μg/kg。标准曲线线性范围分别为 AFB₁: 1.28 ~ 20.4 μg/L; AFB₂: 0.32 ~ 5.08 μg/L; AFG₁: 1.26 ~ 20.2 μg/L; AFG₂: 0.31 ~ 5.00 μg/L; AFM₁: 1.25 ~ 20.0 μg/L; AFM₂: 1.25 ~ 20.0 μg/L, 相关性在 0.999 7 ~ 0.999 9 之间。不同浓度水平 6 种黄曲霉毒素平均加标回收率在 73.2% ~ 94.1% 之间, 精密度在 0.2% ~ 3.8% 之间。结论 该方法可同时、快速、高效、准确测定动物性食品中 6 种黄曲霉毒素的含量。

关键词: 黄曲霉毒素; 超高效液相色谱; 动物性食品; 免疫亲和柱; 真菌毒素; 食品污染物; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)03-0310-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.03.007

Determination of six kinds of aflatoxins in animal foodstuff by immunoaffinity column-ultra-performance liquid chromatography

LI Ke, LIANG Zhao-hai, ZENG Sheng-bo, WEN Quan

(Disease Control and Prevention of Futian in Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518040, China)

Abstract: Objective A simple and rapid method for determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in animal

收稿日期: 2016-01-19

基金项目: 广东省科学技术厅公益研究与能力建设项目(2015A030302008); 深圳市福田区卫生科研项目(FTWS2014059); 中山大学水产品安全教育部重点实验室开放基金项目

作者简介: 李可 女 副主任医师 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: like06@163.com