

文章编号: 1674 - 5566(2012)06 - 1058 - 06

## 河鲀毒素固相萃取-气相色谱-质谱法研究

黄清发, 孙振中, 戚隽渊, 孙建华, 黄德凤, 张玉平, 刘 琴

(上海市水产研究所, 上海 200433)

**摘要:** 建立了固相萃取-气相色谱-质谱法测定河鲀鱼中河鲀毒素的分析方法。河鲀鱼肉用2%乙酸甲醇溶液提取出河鲀毒素, 石油醚脱脂, 浓缩蒸干, 然后用强碱将河鲀毒素水解成2-氨基-8-羟基-6-羟甲基-喹啉(C9生物碱), 水解液经过MCX阳离子交换固相萃取柱净化、BSTFA衍生, 采用气相色谱-质谱法全扫描方式定性分析, 定性离子376, 392, 407, 选择离子扫描方式定量分析, 定量离子392。河鲀毒素在0.05~5.0 μg/mL范围内具有良好的线性, 相关系数 $R^2=0.9975$ , 样品添加浓度为0.02、0.10、0.50 mg/kg, 测定6次, 方法回收率为64.0%~92.8%, 相对标准偏差RSD为5.41%~8.63%, 方法检测限为5.0 μg/kg。实验结果表明, 建立的固相萃取-气相色谱-质谱法方法灵敏度高, 净化效果好, 定性、定量准确。

**研究亮点:** 本方法采用了固相萃取-气相色谱-质谱法测定河鲀鱼中河鲀毒素, 利用离子交换固相萃取有效地除去河鲀毒素的提取水解液中的极性杂质, 该方法较同类方法操作简单, 净化效果好, 选择离子扫描更加增加了河鲀毒素的选择性和灵敏度。

**关键词:** 河鲀毒素; C9生物碱; 固相萃取; 气相色谱-质谱法

**中图分类号:** O 653.63

**文献标志码:** A

河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)是鲀毒鱼类俗称河鲀鱼及其它生物体内含有的一种生物碱<sup>[1]</sup>。河鲀毒素是一种毒性很强的海洋神经毒素, 在自然界中分布广泛。其分子式为 $C_{11}H_{17}O_5N_3$ , 分子量为319。TTX为白色结晶, 无嗅无味, 微溶于水, 不溶于有机溶剂; 对酸作用稳定, 对碱极不稳定; 没有确定熔点, 220℃以上炭化。TTX的结构特征是有1个碳环, 1个胍基, 6个羟基, 在C-5和C-10位有一个半醛糖内酯连接着的分开的环。在碱水溶液中易分解, 在5%氢氧化钾溶液中90~100℃可分解成黄色结晶2-氨基-8-羟基-6-羟甲基-喹啉<sup>[2]</sup>。

河鲀毒素的检测方法主要有生物测定法、化学法、仪器分析法等。李世平等<sup>[3]</sup>应用小鼠生物试验和间接竞争抑制酶联免疫吸附试验(ELISA)同步检测17份河鲀鱼肝组织和20份河鲀鱼肌肉组织中的河鲀毒素含量。王小逸等<sup>[4]</sup>还利用蒸发光散射检测器进行TTX测定, 刘海新等<sup>[5]</sup>采用

柱后衍生高效液相色谱法检测水产品中的河鲀毒素含量。舒静等<sup>[6]</sup>研究建立了离子色谱法定量检测酒曲发酵液中的河豚毒素。吴平谷等<sup>[7]</sup>采用气相色谱-质谱法全扫描方式测定河鲀毒素, KURONO等<sup>[8]</sup>利用气相色谱-质谱法测定人体血液中河鲀毒素。郑雍怡等<sup>[9]</sup>建立大鼠腹腔注射给药后, 血浆中河鲀毒素(TTX)的高效液相色谱-质谱联用(LC-MS)定量检测方法。王洪允等<sup>[10]</sup>建立了LC-MS-MS测定血浆中河鲀毒素的检测方法。本研究采用酸化甲醇提取河鲀毒素, 石油醚除去脂溶性杂质, 将河鲀毒素水解成C9碱, 然后用MCX阳离子交换固相萃取柱除去极性杂质、硅烷化衍生后, GC-MS测定河鲀鱼中河鲀毒素。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

实验仪器包括6890 GC-5973MS气质联用仪(美国Agilent)、旋转蒸发仪、沙浴氮吹仪、涡动

收稿日期: 2012-05-09 修回日期: 2012-07-02

基金项目: 养殖河鲀鱼毒性检测技术研究[沪农科攻字(2010)第2-6号]

作者简介: 黄清发(1983—), 男, 硕士, 研究方向为水产品药残检测和水质理化分析。E-mail: hqf322@163.com

仪、冷冻离心机;甲醇、乙酸为色谱纯;盐酸、石油醚、氢氧化钾均为分析纯;双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)+四甲基硅烷(TMCS);Supelco公司的C18固相萃取柱规格为500 mg/3 mL、Waters公司的HLB、MCX固相萃取柱规格为60 mg/3 mL;河鲀毒素标准品,纯度为98%,购自大连瑞芳生物制品有限公司。

河鲀毒素标准储备溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):取1.02 mg河鲀毒素于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,存放在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

## 1.2 实验材料

实验对象主要是养殖河鲀鱼:暗纹东方鲀和菊黄东方鲀。

## 1.3 实验条件

### 1.3.1 色谱条件

色谱柱:DB-5MS柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ );进样口温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;恒流模式:流速1.0 mL/min,不分流进样;载气为高纯氦气(99.999%);柱温程序:初温 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,保持1 min,然后以 $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持10 min。

### 1.3.2 质谱条件

离子源:EI,电子轰击能量70 eV,离子化温度: $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;质量分析器:四级杆分析器,四级杆分析器温度为 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,接口温度为 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;电子倍增器电压1 535 V;质量扫描范围50~450 amu;全扫描(SCAN)/选择离子监测方式(SIM);监测离子质荷比( $m/z$ ):定性离子为376,392,407,定量离子为392,溶剂延迟为5 min。

## 1.4 样品制备

### 1.4.1 样品提取

称取绞碎试样5.00 g至50 mL离心管中,加20 mL 2%乙酸甲醇溶液 $2\ 000\text{ r}/\text{min}$ 涡动,60  $^{\circ}\text{C}$ 超声萃取30 min,冷却后 $8\ 000\text{ r}/\text{min}$ 离心5 min,移出上清液,上清液加入20 mL石油醚充分振荡,8 000  $\text{r}/\text{min}$ 离心5 min,弃去上层石油醚相,下层有机相在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空旋转蒸至2 mL左右,移入5 mL具塞试管中,氮气吹干。

### 1.4.2 样品水解、净化

加入0.3 mL 3 mol/L氢氧化钾溶液,涡动溶解,加盖后放于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内水解30 min,取出

冷却,用10%盐酸溶液调节pH至4.0, $5\ 000\text{ r}/\text{min}$ 离心5 min,上清液过MCX固相萃取柱(先经3 mL甲醇和3 mL水润洗),再加3 mL水洗柱子,3 mL甲醇洗去极性杂质,抽干,然后用3 mL 5%氨化甲醇洗脱收集,氮气吹干待用。

### 1.4.3 样品衍生

在吹干试管中加0.1 mL BSTFA + 1% ( $\varphi$ ) TMCS,涡动溶解后,放在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中衍生反应30 min,冷却后取1.0  $\mu\text{L}$ 上机进行GC-MS分析。吸取对应浓度的河鲀毒素标准溶液,氮气吹干,同1.4.2水解、净化后进行衍生化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 河鲀毒素的气相色谱质谱分析

河鲀毒素没有紫外吸收和热不稳定的性质,决定了色谱法直接检测河鲀毒素比较困难,但是河鲀毒素通过强碱 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水解后可得水解产物C9生物碱(图1)和草酸,本研究主要采用GC-MS方法测定C9生物碱,由于C9生物碱极性大,不易被气化,所以将C9生物碱经BSTFA衍生后,其2个羟基和1个胺基被硅烷化(图1)。C9生物碱硅烷化物GC-MS测定总离子流图见图2,全扫描质谱图见图3,选择离子色谱图见图4,选择离子质谱图见图5。

经过BSTFA衍生后形成C9生物碱硅烷化物的分子量为407,而图3中的407离子峰为该化合物失去一个电子形成的分子离子峰,即为该化合物的分子量,与理论分析一致。392的基峰由硅烷上甲基断链形成,318的离子峰是C9生物碱硅烷化物脱去一个三甲基硅氧烷所形成的碎片峰,符合质谱的断链机理。为了确保检测结果的可靠性,本研究采用GC-MS全扫描做定性分析,采用选择离子扫描作定量分析,选择离子扫描大大提高灵敏度和检出限,更加适用于低含量的河鲀毒素。由全扫描的质谱可以看出,可选择318、376、392和407四种离子进行扫描,但实验后发现,样品基体中318本底高,影响灵敏度和准确性,故最终选择376、392和407三种离子进行选择离子扫描,离子丰度比为:15:100:30,定量离子一般选择基峰离子392。

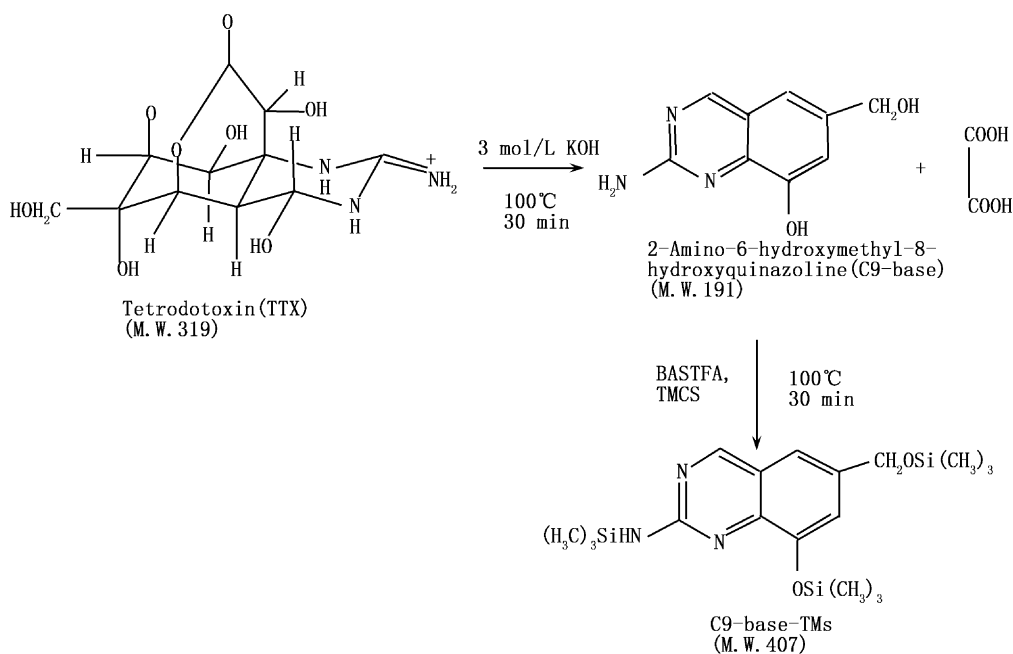
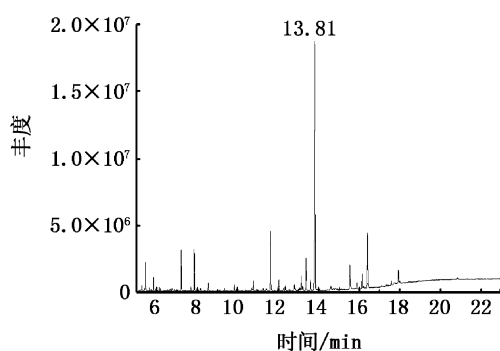
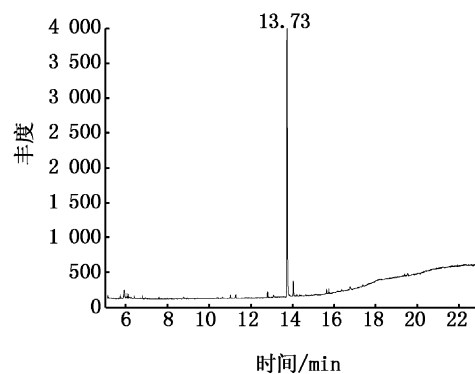
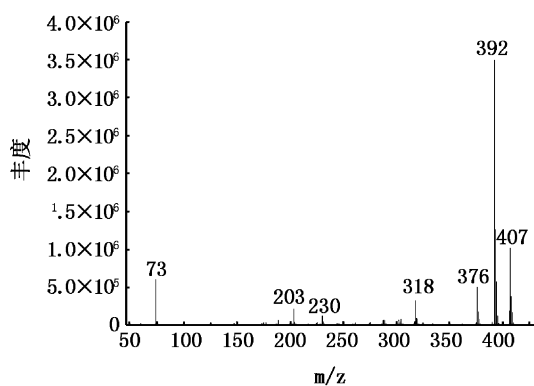
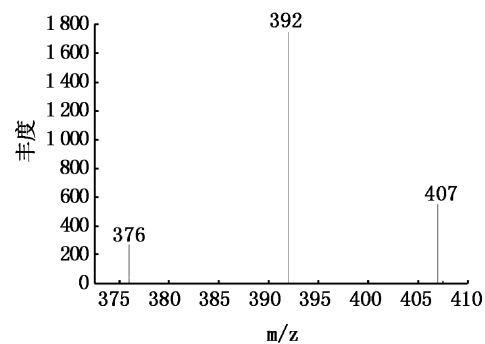


图1 河鲀毒素 (TTX) 的水解及衍生化过程示意图

Fig. 1 Reaction pathways from TTX to C9-base-TMS

图2 C9生物碱硅烷化物 GC-MS 总离子流图  
Fig. 2 Total ion current of C9-base-TMS图4 C9生物碱硅烷化物 GC-MS 选择离子色谱图  
Fig. 4 SIM chromatograms of C9-base-TMS图3 C9生物碱硅烷化物 GC-MS 质谱图  
Fig. 3 Mass spectrum of C9-base-TMS图5 C9生物碱硅烷化物 GC-MS 选择离子质谱图  
Fig. 5 SIM Mass spectrum of C9-base-TMS

## 2.2 河鲀鱼中河鲀毒素的提取、水解、净化

河鲀毒素易溶于酸性溶剂,因此选用 2% 乙酸/甲醇提取,然后用石油醚脱去脂溶性杂质,蒸干,加入 3 mol/L 的 KOH 溶液 0.3 mL,100 °C 水解 30 min,样品水解液调 pH 至 4.0 后,经 MCX 阳离子交换固相萃取柱净化,一方面可以去除杂质,净化样品;另一方面则是把样品洗脱在有机溶剂体系中,便于衍生化,样品选择离子流图见图 4、5。

研究发现 pH 调至 4.0 操作起来有些困难,因为水解液体积只有 0.3 mL,故采取 pH 试纸测定,若经过多次试纸测定势必会损失河鲀毒素的含量,因此,采用平行定体积试验法,进行 pH 的调节。选取同一样品做平行,在调 pH 值时,用其中之一进行,每加 0.1 mL 即测定其 pH,一直调节至 pH = 4 时,确定 10% 盐酸的所用准确体积,另一份则直接加已知量的盐酸调节即可。

## 2.3 固相萃取柱的选择

探讨不同填料的固相萃取柱对河鲀毒素保留与净化功能影响,选用 C18, HLB、MCX 3 种固相萃取柱进行实验。由于 3 种柱填料的结构不

一样,直接决定了柱子的保留分离功能,柱填料结构单元见图 6。而 C9 生物碱具有一个氨基,一个羟基和一个酚羟基具有很强的极性,分子结构式如图 6。由于 C18 柱能非常好的保留非极性化合物,对于极性很强的 C9 生物碱没有保留,实验证明 C18 柱不能很好地去掉样品中的极性杂质。HLB 柱填料中镶嵌了亲水性单体和硅羟基进行了封端,增加了 C9 生物碱的保留,并能除去部分杂质,但也不能很好地除去样品乙酸甲醇提取液中的极性化合物。MCX 柱填料中加入了负电性很强的苯磺酸基,其在 pH 为 1 ~ 12 范围均带有负电性,而 C9 生物碱上的氨基和氮杂环有共轭效应,氨基上的氮元素表现出一定的正电性,在酸性条件下显正电性,通过这种离子间的作用力,使得 C9 生物碱在 MCX 柱上得到了很好地保留,同时用甲醇洗去样品提取液中的极性杂质,而不会影响目标化合物保留,最后用氨化甲醇洗脱 C9 生物碱,因为碱性条件下 C9 生物碱正电性消失,甲醇就把 C9 生物碱给洗脱下来,因此选择 MCX 柱是样品进化的最佳选择。

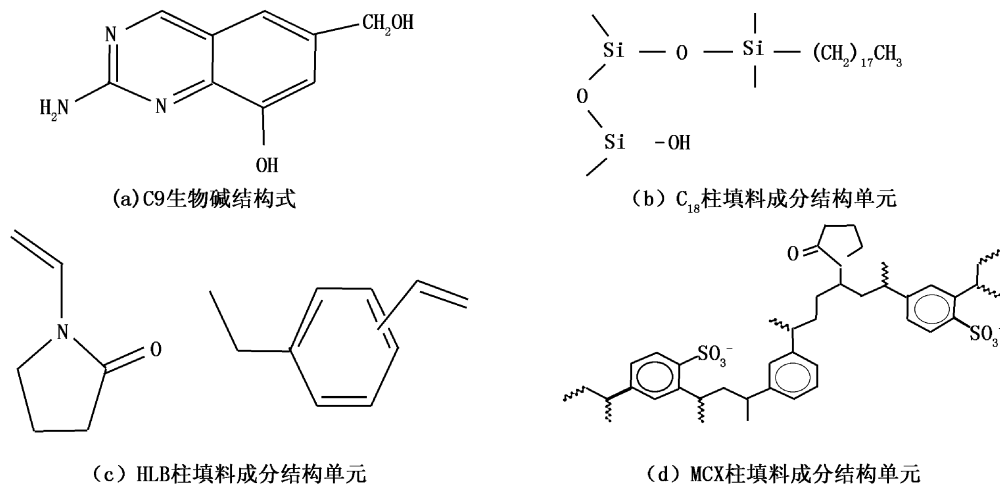


图 6 C9 生物碱结构图与柱填料结构单元图

Fig. 6 Structure of the C9-base and the column packing

## 2.4 与液相色谱方法的比较

目前液相色谱法主要是柱后衍生荧光检测法,由于需要强碱将河鲀毒素水解成 C9 生物碱进行测定,需要柱后衍生系统,强碱在整个衍生和检测系统中,对于仪器的清洗比较困难,容易发生盐析现象,长时间使用会减少仪器使用寿命。

此外,液相色谱方法灵敏度没有气相色谱-质谱高,刘海新等<sup>[5]</sup>采用柱后衍生高效液相色谱法检测水产品中的河鲀毒素含量,方法定量限为 1 μg/g。而气相色谱-质谱法定量限可达到 5 μg/kg。液相色谱只有保留时间定性,而气相色谱-质谱除保留时间定性外,还有质谱离子碎片定性,

更加确保了结果的准确性。

## 2.5 方法的线性关系

吸取河鲀毒素标准储备液 1.0 mL, 甲醇定容至 10 mL, 此溶液浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 分别吸取 0.05, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0 mL, 甲醇定容至 10 mL, 各溶液浓度分别为 0.05, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以河鲀毒素的浓度为横坐标, 定量离子 392 的峰面积为纵坐标作标准曲线见图 7, 线性回归方程为:  $Y = 58318X - 731.56$ , 相关系数  $R^2 = 0.9975$ , 表明河鲀毒素在 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度之间有良好的线性关系。

## 2.6 方法回收率, 精密度和检出限

由于人工养殖暗纹东方鲀和菊黄东方鲀肌肉河豚毒素均未检出 ( $< 5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), 因此选取人工养殖河鲀鱼肌肉为空白样品, 分别添加浓度为 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准中间液 0.01 mL、0.05 mL、0.25 mL, 则样品添加浓度分别为 0.02 mg/kg、

0.10 mg/kg、0.50 mg/kg, 采用选择离子扫描方式 (SIM), 进行添加回收率实验, 实验结果见表 1, 空白样品图谱见图 8, 加标样品图谱见图 9。

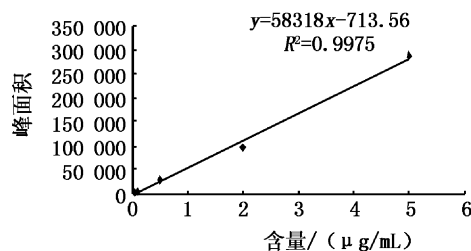


图 7 河鲀毒素标准曲线

Fig. 7 The standard curve of tetrodotoxin

由表 1 可以看出, 加标回收率在 64.0% ~ 92.8%, 精密度 RSD 在 10% 之内, 样品中河鲀毒素与其他物质有很好的分离度, 表明本方法所得结果可靠。在上述实验条件下, 以 3 倍信噪比 (S/N) 计算方法的检出限 (LOD) 为 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 1 河鲀鱼肌肉中河鲀毒素加标回收率和精密度 (n=6)

Tab. 1 Recoveries and their RSDs for the spiked globefish sample (n=6)

添加浓度/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.02	0.0152, 0.0155	76.0, 77.5	72.2	8.63
	0.0131, 0.0157	65.0, 78.5		
	0.0128, 0.0144	64.0, 72.0		
0.10	0.0775, 0.0820	77.5, 82.0	81.2	5.41
	0.0850, 0.0875	85.0, 87.5		
	0.0780, 0.0770	78.0, 77.0		
0.50	0.4175, 0.4300	83.5, 86.0	84.2	6.26
	0.3980, 0.4280	79.6, 85.6		
	0.4640, 0.3900	92.8, 78.0		

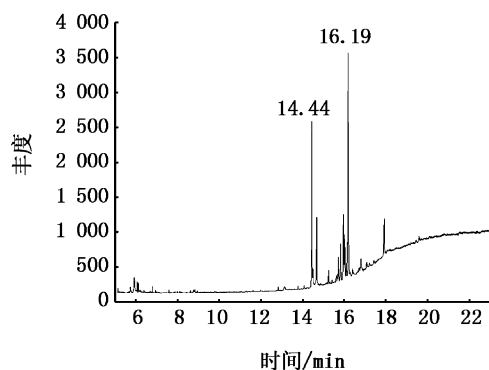


图 8 河鲀肌肉空白样品选择离子色谱图

Fig. 8 SIM chromatogram of the globefish sample

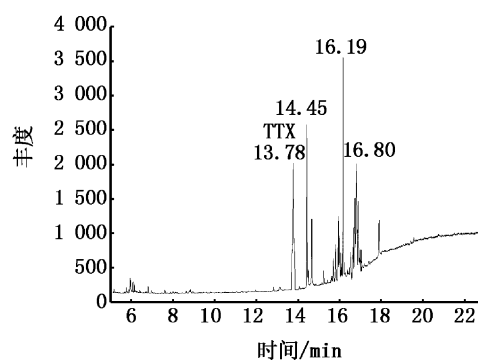


图 9 河鲀肌肉加标样品选择离子色谱图

Fig. 9 SIM chromatogram of the spiked globefish sample

### 3 结论

河鲀毒素经腹腔注射对小鼠的  $LD_{50}$  为  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[11]</sup>,对于河鲀毒素检出限要求就越来越低。采用 MCX 阳离子交换固相萃取柱能很好地去极性杂质,GC-MS 测定河鲀鱼中河鲀毒素,大大提高了分析结果的准确性,采用保留时间和质谱图的双重保障,同时采用选择离子扫描大大地降低了基体杂质的干扰,提高了灵敏度。不足之处在于样品前处理过程的繁琐,但随着前处理技术的飞跃发展,膜分离、超声辅助、超临界萃取等现代分离技术,将是河鲀毒素提取的研究方向。

#### 参考文献:

- [1] 姜培珍. 食源性疾病与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 144.
- [2] 刘亚萍. 河鲀毒素的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(11): 691-692.
- [3] 李世平, 焦新安, 黄金林, 等. 河鲀毒素两种定量检测方法的比较研究[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2004, 25(2): 58-60.
- [4] 王小逸, 付宏征, 林文翰. 蒸发光散射检测器检测河鲀毒素[J]. 中国海洋药物, 1998(4): 13-14.
- [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鲀毒素含量[J]. 水产学报, 2006, 30(6): 812-817.
- [6] 舒静, 李柏林, 欧杰. 离子色谱法定量检测酒曲发酵液中的河豚毒素[J]. 色谱, 2011, 29(2): 187-190.
- [7] 吴平谷, 赵永信, 沈向红, 等. 河鲀鱼中河鲀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.
- [8] KURONO S, HATTORI H, SUZUKI O, et al. Sensitive analysis of tetrodotoxin in human plasma by solid phase extractions and gas chromatography/mass spectrometry [J]. Analytical Letters, 2001, 34(14): 2439-2446.
- [9] 郑雍怡, 王彦, 张计, 等. LC-MS 法测定大鼠血浆中河鲀毒素的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(9): 1450-1453.
- [10] 王洪允, 江冀, 胡蓓. LC-MS-MS 测定血浆中河鲀毒素[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 18-19.
- [11] 王健伟. 河豚毒素的定量检测方法研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 1995, 22(2): 86-87.

## A method to determine tetrodotoxin (TTX) in globefish by solid-phase extractions and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

HUANG Qing-fa, SUN Zheng-zhong, QI Jun-yuan, SUN Jian-hua, HUANG De-feng, ZHANG Yu-ping, LIU Qin

(Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** A method to determine tetrodotoxin (TTX) in globefish by solid-phase extractions and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is described. TTX in globefish sample was extracted with 2% acetic acid/methanol, defatted by petroleum ether, evaporated to dryness under reduced pressure. Then the compound was converted to 2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazoline (C9-base) under alkaline conditions and extracted by use of an MCX extraction cartridge. The C9-base was analyzed after trimethylsilyl derivation (TMS) C9-base by GC-MS- scan mode, the qualified ions are 376, 392, 407. (TMS) C9-base is quantified by GC-MS-selected ion monitoring. The quantified ion was 392. The calibration curve was linear in the range of  $0.05 - 5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  and linear relationship  $R^2 = 0.9975$ . For the 0.02, 0.1, 0.5 mg/kg spiked samples, the recovery rate were 64.0% - 92.8%, RSDs were 5.41% - 8.63% for six times, and the limitation of quantification was  $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ . From the results of above, detection of TTX in aquatic products by solid-phase extractions and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) is sensitive, accurate and feasible.

**Key words:** tetrodotoxin; C9-base; solid phase extraction; gas chromatography-mass spectrometry