

亲水液相色谱-三重四极杆质谱检测 河豚鱼肝中的河豚毒素

陈晓¹, 文红梅^{1*}, 李伟¹, 张路¹, 赵继红²

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;

2. 泰州市康特生物工程有限公司, 江苏 泰州 225500)

[摘要] 目的: 建立河豚鱼肝中河豚毒素 (TTX) 的亲水液相色谱-三重四极杆质谱联用 (LC-MS-MS) 定量检测方法。方法: 样品经匀浆, 超声, 乙腈沉淀离心后, 取上清液进样测定。极性聚酰胺键合硅胶柱 InnovationTM HP Amide (100 mm × 3.0 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.3% 甲酸 (体积比为 70:30), 流速为 0.5 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C, 进样量 5 μL。选择正离子多反应监测 (MRM) 模式, [M + H]⁺, m/z 320.1162.1 进行定量分析。结果: TTX 的线性范围为 0.031 3 ~ 2.00 mg·L⁻¹ (r = 0.999 9); 检测限 (S/N = 3) 为 3.0 pg, 加样回收率在 96.3% ~ 103.0%。结论: 该法灵敏度高, 重复性好, 简便快速, 适用于河豚毒素的测定。

[关键词] 亲水液相色谱-三重四极杆质谱联用; 河豚毒素 (TTX); 河豚鱼; 肝脏

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0149-04

[doi] 10.11653/syjf2013080149

Determination of Tetrodotoxin in Fugu Liver Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole Mass Spectrometry

CHEN Xiao¹, WEN Hong-mei^{1*}, LI Wei¹, ZHANG Lu², ZHAO Ji-hong¹

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

[收稿日期] 20121119(017)

[第一作者] 陈晓, 硕士研究生, 从事中药化学研究, Tel:13813823404, E-mail: flymorning@126.com

[通讯作者] * 文红梅, 教授, 博士生导师, 从事药物分析和代谢研究, Tel:025-85811839, E-mail: njwenhm@126.com

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1234.
- [2] 中国药典委员会. 中国药典临床用药须知. 中药卷[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 26.
- [3] 薛晓倩, 黄学宽, 高宁, 等. 藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 224.
- [4] 白雁, 李雯霞, 王星, 等. 近红外光谱法测定道地产区生地黄中梓醇的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 46.
- [5] 刘建学. 实用近红外光谱技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 21.
- [6] 白雁, 史会齐, 龚海燕, 等. 近红外光谱法测定不同厂家六味地黄丸中丹皮酚[J]. 中国实验方剂学杂志,

2010, 16(17): 63.

- [7] 蔡佳良, 郭念欣, 黄洁燕, 等. 运用近红外光谱法建立广藿香中百秋李醇的定量模型[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2113.
- [8] 李晓明, 杨滨. 近红外光谱技术的研究进展及其在中药领域的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(12): 69.
- [9] 刘建学. 实用近红外光谱技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 21.
- [10] 石猛, 耿春贤, 叶彬, 等. 近红外光谱法快速测定消渴丸浓缩液中葛根素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 48.
- [11] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 2版. 北京: 中国石化出版社, 2007: 441.

[责任编辑 顾雪竹]

2. Taizhou Kaite Biological Engineering Co. Ltd., Taizhou 225500, China)

[Abstract] Objective: To develop a LC-MS-MS method for determination of tetrodotoxin (TTX) in *Fugu* liver. **Method:** The analyte was vortex-mixed, extracted with acetonitrile by ultrasound, and followed by centrifugation. The supernatant (5 μL) was injected into the LC-MS-MS system for analysis. The separation was performed on an Innovation HP Amide column (100 mm \times 3.0 mm, 5 μm) at 30 $^{\circ}\text{C}$ using acetonitrile-0.3% formic acid (70:30) as mobile phase at a flow rate of 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Quantification was through tandem-mass spectrometry with positive electro-spray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) at m/z [M + H]⁺ 320.1162.1 for TTX. **Result:** Calibration curve was linear over the TTX concentration range of 0.0313-2.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9999$). The lower limit of quantification of TTX was 0.300 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recovery of TTX was 96.3%-103.0%. **Conclusion:** The validated method was shown to be simple, sensitive, rapid, reproducible and suitable for the determination of TTX in *Fugu* liver.

[Key words] LC-MS-MS; tetrodotoxin (TTX); *Fugu*; liver

河豚鱼,属于鱼纲(Pisces)硬骨亚纲(Ossteichthyes),豚形目(Tetrodonliformes)。1909年,日本学者田原良纯从豚属鱼卵内提取到一种粗品毒素,命名为河豚毒素(tetrodotoxin,TTX)。其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$,相对分子量为319.1016,是非蛋白、低分子量、高活性的神经毒素,化学结构具有多羟基氢化5,6-苯吡啶母核结构,是1种氨基全羟基唑啉的生物碱。

目前,分析河豚毒素的方法主要有生物学方法^[1]和理化分析法^[2,4],河豚鱼肝脏中河豚毒素的分析方法文献报道的主要有反相离子对高效液相色谱法^[5],以缓冲盐作为流动相,方法灵敏度较低,基质干扰较大。近年来,随着高效液相-质谱联用法^[6-9]的应用,大大提高了检测灵敏度,但文献报道中,高效液相-质谱联用法^[10-14]用于河豚鱼肝脏中河豚毒素的检测,样品前处理复杂,往往需要经过加热、脱脂、过离子交换树脂或固相萃取小柱、氮气吹干等步骤,操作复杂、费时,且回收率不高。本研究应用亲水液相色谱-三重四级杆质谱联用系统(LC-MS-MS)测定河豚鱼肝脏中河豚毒素的含量,样品前处理简单,方法快速,灵敏度高,重现性好。

1 材料

LC-MS-MS系统:SHIMADZU UFLC XR超快速液相色谱仪(日本岛津公司,包括高压输液单元,全自动进样器,柱温箱),AB SCIEX QTRAP 5500型质谱仪(加拿大AB SCIEX公司),Analyst 1.5软件。

TGL-16B型高速台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司),KQ3200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),FA1104N型分析天平(上海精密科学仪器有限公司),F6/10超细匀浆器(Fluko公司)。

河豚鱼肝由扬中市渔政监督管理站提供,批号分别为20120326,20120405,20120411,为鲀科东方鲀属的鱼类野生横纹东方鲀 *Fugu oblongus* (Bloch)的新鲜鱼肝,由扬中市水产门市部朱康明鉴定。

河豚毒素标准物质(纯度 $\geq 99\%$,由泰州市康特生物工程有限公司提供),乙腈、甲酸、醋酸(HPLC级,德国Merck公司),甲酸铵(HPLC级,Fluka公司),水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取TTX对照品适量,用0.1%醋酸溶液溶解后,加流动相制成含TTX 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏保存。临用时,精密吸取储备液适量,用流动相溶液稀释至所需浓度。

2.2 样品的处理 取河豚鱼肝脏50 g,精密称定,加入1%醋酸水溶液至总质量为500 g,用超细匀浆机,制成匀浆液。精密称取匀浆液1 g,加入1%醋酸水溶液25 mL,称重,超声处理30 min(功率:120 W,频率:40 KHz),用1%醋酸水溶液补足减失的质量,精密量取1 mL,加入3倍量乙腈,充分振摇,离心(12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)3 min,取上清液,进样5 μL 。

2.3 LC-MS条件 液相色谱条件 InnovationTM HP Amide LC-MS-MS色谱柱(100 \times 3.0 mm, 5 μm) (Chrom-Matrix Boi-Technology CO., LTD.),流动相乙腈-0.3%甲酸(70:30),流速0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量5 μL ,柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件 电喷雾电离源ESI,正离子模式,电喷雾电压4 500 V;脱溶剂温度500 $^{\circ}\text{C}$;气帘气流量30.0 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$;碰撞气medium;DP 36.5 V, EP 8.0 V, CE 50.0 V, CXP 14.0 V。扫描方式多反应检测

(MRM),用于定量反应的监测离子对为 $[M+H]^+$, m/z 320.1~162.1。

2.4 线性范围与检出限、定量限 取对照品储备液适量,采用逐级稀释法,加流动相制成每 mL 含 2.00,1.00,0.500,0.250,0.125,0.062 5,0.031 3 μg 的河豚毒素溶液,按上述色谱条件进样。以峰面积 Y 为纵坐标,以 TTX 的浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) X 为横坐标进行线性回归,得回归方程。 $Y = 4.1 \times 10^6 X + 1.15 \times 10^3$ ($r=0.9999$)。

TTX 浓度在 0.031 3~2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。该色谱条件下,TTX 对照品检测限为 0.300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N=3$),即 3.0 pg ;样品定量限为 1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N=10$),即 10.0 pg 。

TTX 对照品、肝脏中 TTX 的谱图见图 1。

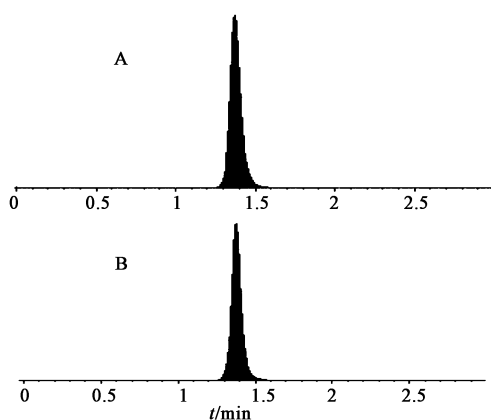


图 1 TTX 对照品(A)和肝脏中 TTX(B)的色谱

2.5 重复性试验 取河豚鱼肝脏(批号为 20120411)50 g,共 6 份,精密称定,按上述处理方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,样品平均含量为 354.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,其相对标准偏差(RSD)为 2.62%,说明该方法具有较好的重复性。

2.6 精密度试验 日内精密度 按上述处理方法分别制备 1 份河豚鱼肝脏样品(批号为 20120411)和 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品,按上述色谱条件进样,每份连续测 5 次,其峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.94%,0.99%。

日间精密度 按上述处理方法每天分别制备 1 份河豚鱼肝脏样品(批号 20120411)和 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品,连续 3 天,按上述色谱条件进样,每天测 1 次,其峰面积的 RSD 分别为 0.92%,1.55%。

2.7 稳定性试验 按上述处理方法制备 1 份河豚鱼肝脏样品(批号为 20120411),按上述色谱条件,

在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样,测定,考察其稳定性,其峰面积的 RSD 分别为 0.56%。

2.8 回收率试验 取河豚鱼肝脏(批号 20120411)50 g,精密称定,加入 1% 醋酸水溶液至总质量为 500 g,用超细匀浆机,制成匀浆液。精密称取匀浆液 1 g,共 9 份,分别加入河豚毒素对照液(1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)25,30,39 μL 各 3 份,加入 1% 的醋酸水溶液使成 25 mL,称重,超声处理 30 min,补足减失的质量,精密量取适量,加入 3 倍量乙腈,充分振摇,离心(12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)3 min,取上清液,进样 5 μL 。

按 2.2 项和 2.3 项进行提取和测定,回收率结果见表 1。

表 1 河豚鱼肝脏回收率试验

No.	实测值 / μg	样品量 / μg	加标浓度 / μg	加标回收率 /%	RSD /%
1	59.53	35.5	25	96.3	0.81
2	60.50	35.5	25	100.1	
3	59.90	35.5	25	97.7	
4	65.18	35.5	30	99.1	0.93
5	65.54	35.5	30	100.3	
6	66.37	35.5	30	103.0	
7	74.66	35.5	39	100.5	0.49
8	73.93	35.5	39	98.6	
9	74.29	35.5	39	99.6	

2.9 样品测定 按 2.2 项方法处理 20120326, 20120405,20120411 3 批河豚鱼肝脏样品,按 2.3 项进行测定,TTX 的含量分别为 319.5,452.7,354.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 分别为 0.77%,0.55%,2.62%。

3 讨论

3.1 样品处理方法优化 TTX 极性很强,不溶于多数有机溶剂,并在强酸、强碱下不稳定,生物样品的处理困难。河豚鱼肝脏的成分复杂,过去报道的处理方法一般需经过脱脂,离子交换树脂,固相萃取小柱,过滤膜等,操作繁琐、耗时,造成组分的回收率偏低。本研究采用酸水超声,乙腈沉淀的方法,并对酸水的浓度和超声时间进行了考察,采用 0.5%,1.0%,2.0% 的醋酸溶液,15,30,45 min 的超声时间进行考察,最终确定为 1% 的醋酸溶液,30 min 的超声时间进行样品的处理,该方法简单,快速,回收率令人满意 96.3%~103.0%。

3.2 质谱条件的优化 由于 TTX 具有胍基基团,且具有多个羟基,极性较强,在酸性条件下极易发生

质子化,在正离子模式下($[M+H]^+$, m/z 320)灵敏度远高于负离子模式($[M-H]^-$, m/z 318),因此选择酸性流动相,在正离子模式下检测。TTX 的二级碎片离子中 $[M+H]^+$, m/z 98.8, 162.1, 260.0, 302.0 为其特征碎片离子,对 DP, EP 进行优化后, $[M+H]^+$, m/z 162.1 的离子强度较高,所以选择 $[M+H]^+$, m/z 320.1 ~ 162.1 为监测离子对,并对 CE, CXP 进行了优化,最终确定为 DP 36.5 V, EP 8.0 V, CE 50.0 V, CXP 14.0 V。

3.3 色谱条件的优化 TTX 极性大,水溶性好,无紫外吸收, C_{18} 色谱柱难保留,一般需采用离子对色谱或柱后衍生化荧光法检测,方法繁琐、耗时,且灵敏度较低。本文以乙腈-0.3% 甲酸水体系为流动相,考察了不同亲水性色谱柱对 TTX 的保留行为,结果表明: InnovationTM TX LC-MS-MS 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 5 μm) TTX 的保留性能差,出峰快,且峰展宽较大;二醇基硅烷键合柱 BETASIL Diol-100 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 5 μm) 色谱峰拖尾,不对称,且峰展宽大;硅胶柱 ZORBAX RX-SIL 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 所需保留时间较长,且峰不对称;氨基硅烷键合柱 InnovationTM HP Amide LC-MS-MS 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 5 μm) TTX 的色谱峰形对称,展宽适中。

[参考文献]

[1] Shimojo R Y, Iuaoka W T. A rapid hemolysis assay for the detection of sodium channel-specific marine toxins [J]. Toxicology, 2000, 154(13):1.

[2] 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 spectrometry and its application [J]. Forensic Sci Int, 2012, 217(1/3):76.

[3] Man C N, Noor N M, Harn G L, et al. Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatography A. 2010, 1217(47):7455.

[4] Fong B M, Tam S, Tsui S H, et al. Development and validation of a high-throughput double solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass

spectrometry method for the determination of tetrodotoxin in human urine and plasma [J]. Talanta, 2011, 83(3):1030.

[5] 郭柏坤, 官庆礼, 吴韶菊, 等. 反相离子对高效液相-PDA 法测定虫纹东方鲀肝脏中的河豚毒素 [J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(5):34.

[6] 马玉凤, 胡方弟, 李文, 等. LC-MS-MS 方法测定大鼠血浆中蝉翼素的药代动力学及代谢物 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):112.

[7] 张锐, 李青, 刘芳, 等. LC-MS-MS 法研究甘草对雷公藤内酯酮药代动力学及组织分布与排泄的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):151.

[8] 马芳, 赵东, 吴晓霞, 等. LC-MS-MS 法检测附子水提液中新乌头碱、次乌头碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):95.

[9] 解军波, 张彦青, 吴国娇, 等. LC-MS-MS 法测定独一味中木犀草素 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):64.

[10] Jun H J, Jong S L, Mari Y Y. LC-MS analysis of tetrodotoxin and its deoxy analogs in the marine puffer fish *fugu niphobles* from the southern coast of korea, and in the brackishwater puffer fishes *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* from southeast Asia [J]. Mar Drugs. 2010, 8:1049.

[11] Marc D, Bernd C, M S A, 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: 1997.

[12] Monrat C, Nitat S, Potjane S, et al. Toxic marine puffer fish in thailand seas and tetrodotoxin they contained [J]. Toxins, 2011, 3: 1249.

[13] Junho J, Mari Y Y. Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis* [J]. Toxicon, 2006, 48: 980.

[14] Yuki S, Mari Y Y, Teruo M, et al. Electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs: liquid chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Analytical Biochemistry, 2001, 290:10.

[责任编辑 顾雪竹]