

LC-MS/MS 法测定血液中河豚毒素

LCMSMS-843

摘要：依据 SF/Z JD0107011-2011《司法鉴定技术规范 生物检材中河豚毒素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，建立了使用岛津三重四极杆液质联用技术测定血液中河豚毒素的方法。采用外标法建立校准曲线，在 1~40 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数 r 为 0.998。在 1、5、40 $\mu\text{g/L}$ 三个浓度下，河豚毒素保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.15~0.18% 和 1.11~7.58% 之间，仪器精密度良好。对空白血液样品进行了检出限浓度的加标回收实验，回收率在 82.8~88.6% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，定性准确，可用于血液中河豚毒素的快速检测。

关键词：三重四极杆液质联用仪 血液 河豚毒素

技术特点：

- ❖ 河豚毒素灵敏度高于标准 SF/Z JD0107011-2011 的要求。
- ❖ 使用 Shim-pack Velox HILIC 色谱柱，4.5 分钟完成分析，优于标准方法。

河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 是一种强神经毒素，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。河豚毒素对人的最小致死量约为 0.5 mg/60 kg 体重，毒性比氰化钠大 1000 倍。河豚鱼虽然含有剧毒，但味道鲜美，营养丰富而久为沿海地区的人们所喜爱，因误食有毒河豚鱼或加

工不当引起的食物中毒甚至死亡的事件时有发生。因此建立一种准确测定血液中河豚毒素的方法对司法鉴定和临床诊治十分必要。

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪，参考 SF/Z JD0107011-2011《司法鉴定技术规范 生物检材中河豚毒素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》中的方法，建立了一种快速准确测定血液中河豚毒素的方法。

实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A 5R
输液泵：	LC-30AD×2	柱温箱：	CTO-20AC
自动进样器：	SIL-30AC	质谱仪：	LCMS-8050
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.118		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	Shim-pack Velox HILIC (100 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm , 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-32025-03)		
流动相：	A-0.1% 甲酸水溶液; B- 乙腈		
进样体积：	5 μL	柱温：	40°C
流速：	0.8 mL/min	洗针液：	甲醇 / 水 = 1:1 (v:v)
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相起始浓度为 90%，时间程序如表 1 所示。		

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
0.50	泵	B Conc	90
1.50	泵	B Conc	10
2.00	泵	B Conc	10
2.10	泵	B Conc	90
4.50	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式：	ESI+	雾化气流速：	3.0 L/min
接口电压：	4 kV	干燥气流速：	10.0 L/min
接口温度：	300 °C	加热气流速：	10.0 L/min
D L 温度：	250 °C	碰撞气：	氩气
加热模块温度：	400 °C	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
MRM 参数：	见表 2		

表 2 MRM 参数

中文名称	英文名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
河豚毒素	Tetrodotoxin	4368-28-9	320.15	302.1*	-10.0	-25.0	-19.0
				162.1	-10.0	-42.0	-29.0

* 代表定量离子对。

■ 样品前处理

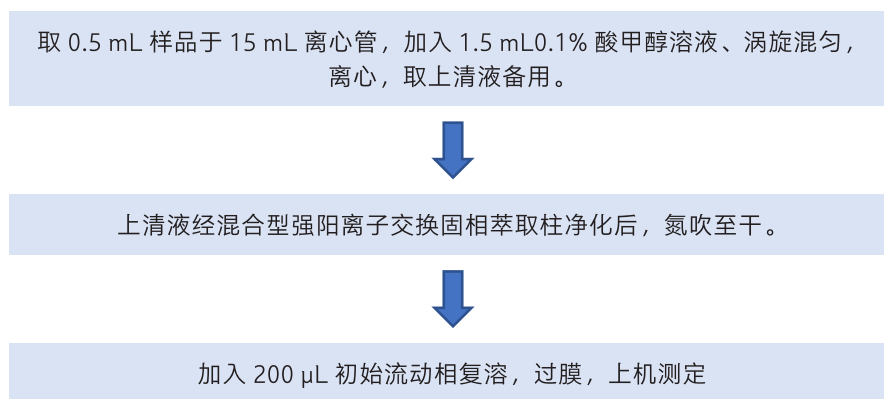


图 1 样品前处理步骤图

■ 结果与讨论

3.1 标准溶液谱图

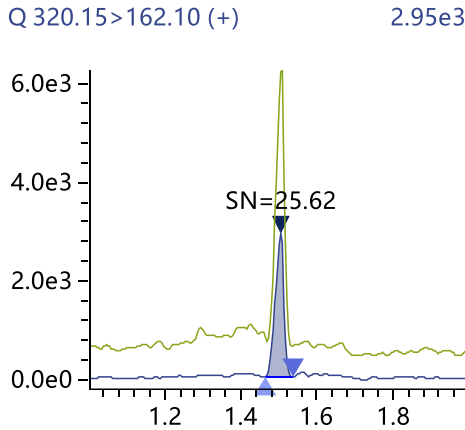


图2 血液基质匹配标准溶液 MRM 色谱图 (1 ng/mL)

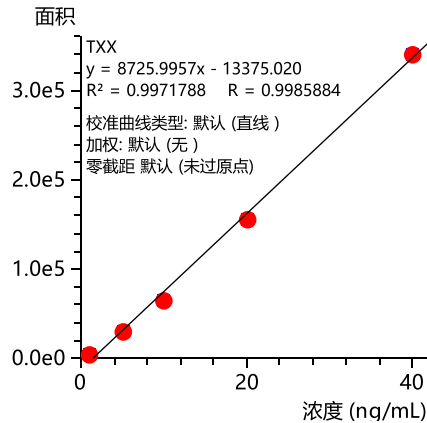


图3 校准曲线

3.2 校准曲线和灵敏度

分别配制 1、5、10、20、40 ng/mL 的河豚毒素血液基质匹配标准溶液，取 1 μ L 进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标做标准曲线，校准曲线如图 3 所示。根据 1 ng/mL 基质标样数据，以 3 倍信噪比计算仪器检出限为 0.117 ng/mL，10 倍信噪比计算定量限为 0.390 ng/mL。

3.3 重复性实验

取 1、5 和 40 μ g/L 河豚毒素血液基质匹配标准溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物	RSD% (1 μ g/L)		RSD% (5 μ g/L)		RSD% (40 μ g/L)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
河豚毒素	0.18	7.58	0.16	6.73	0.15	1.11

3.4 定性测试

依照标准中定性测定要求，在血液空白样品添加河豚毒素标准品，制备成浓度为 2 ng/mL 的加标样品，按照上述前处理方法处理后上机，重复测定 4 次，样品中均出现响应的河豚毒素色谱峰，平均回收率在 82.8~88.6% 之间，说明仪器灵敏度高，定性结果可靠。

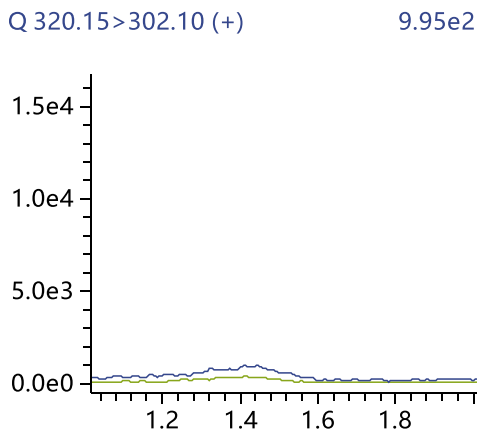


图4 空白样品 MRM 色谱图

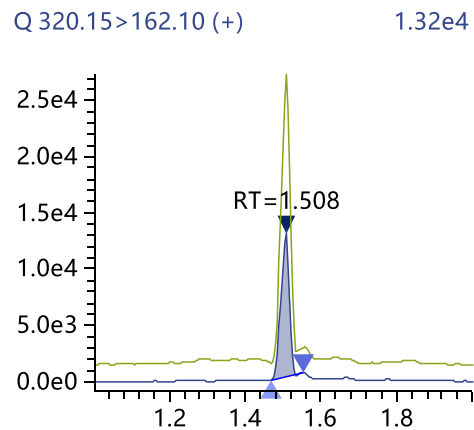


图5 加标样品 MRM 色谱图

■ 结论

本文参考 SF/Z JD0107011-2011《司法鉴定技术规范 生物检材中河豚毒素的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪检测血液中河豚毒素残留量的方法。在 1~40 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 为 0.998。加标浓度为 2 ng/mL （检出限）的样品，回收率在 82.8~88.6% 之间。该分析方法灵敏度高，重复性好，准确度高，稳定可靠。可供相关行业检测人员参考使用。

岛津应用云

