

三重四极杆质谱测定鱼类产品中的河豚毒素残留

LCMSMS-123

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定鱼类产品中河豚毒素的方法。样品经液相色谱分离、三重四极杆质谱仪外标法进行定量分析。河豚毒素在 5 ~ 120 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数可达 0.9995；对浓度为 10、50 和 100 ng/mL 标准溶液连续 6 次进样，其保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05 ~ 0.06% 和 1.19 ~ 3.95% 之间，仪器精密度良好；同时考察了空白鱼类产品基质加标结果，5 ng/mL 基质加标样品的回收率为 70.01%；在某鱼类产品样品中检出 5.7 ng/mL 河豚毒素。

关键词：河豚毒素 鱼类产品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

河豚毒素 (Tetrodotoxin, 简称 TTX)，是一种能麻痹神经的剧毒，通常只需氰化钾五分之一就可置人于死地的剧毒，中毒的人会因为神经麻痹而窒息而死。虽然河豚毒素属于剧毒品，但是其临床应用研究显示，河豚毒素可以用作消炎镇痛药物、还有局麻、治疗肌肉痉挛的功效，河豚毒素既可以治疗心血管疾病，又可以作为毒品的戒断药物。因此各个国家对其越来越关注。

目前河豚毒素的检测方法有：高效液相色谱紫外检测法、高效液相色谱荧光检测法、高效毛细管电泳法、液质联用、气质联用、酶联免疫法和小鼠法等。我国国家标准 GB/T 23217-2008《水产品中河豚毒素的测定 液相色谱-荧光检测法》采用了荧光法进行定量，三重四极杆质谱仪进行确证。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了快速准确测定鱼类产品中河豚毒素的方法，供相关检测人员参考。

图1 河豚毒素的结构

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：UHPLC Amide 3.0 mm I.D. × 150 mm L

流动相：A - 10 mM 甲酸铵 / 5 mM 甲酸水溶液；

B - 乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：20°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 70%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	70
1.00	50
4.50	50
5.00	70
8.00	Stop

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：50 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

编号	中文名称	英文名称 (简称)	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	河豚毒素	Tetrodotoxin (TTX)	4368-28-9	320.00	302.00*	-12	-41	-30
					161.95	-12	-25	-22

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：取适量单标储备液，用乙腈/水(50/50, v/v) 配制成为 10 mg/L 的混合标准溶液，用乙腈/水(50/50, v/v) 逐级稀释成浓度为 100、50、20、10、5 ng/mL 的标准工作液。

样品前处理方法：

参考国家标准 GB/T 23217-2008《水产品中河豚毒素的测定 液相色谱-荧光检测法》。最终样品浓缩 5 倍进样。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

50 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 2 所示。

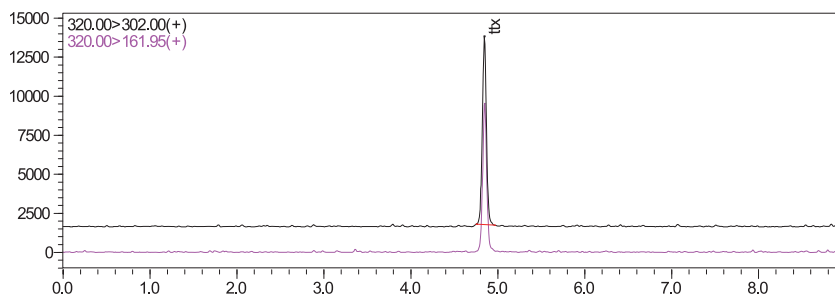


图2 50 ng/mL混合标准样品的MRM色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 5、10、25、50、75、100、120 ng/mL 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 3 所示。河豚毒素在检测浓度范围内线性良好。由软件计算得仪器检出限和定量限分别为 0.2 ng/mL 和 0.6 ng/mL。

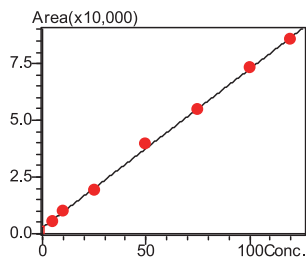


图3 TTX的标准工作曲线

$$Y = (698.977)X + (2676.72)$$

$$r = 0.9995$$

2.3 精密度实验

对 10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05 ~ 0.06% 和 1.19 ~ 3.95% 之间，仪器精密度良好。

表3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
TTX	0.05	3.95	0.06	1.79	0.06	1.19

2.4 回收率考察

以空白鱼类产品样配制 5 ng/mL 加标溶液，平行三次测试，三次加标平均回收率为 70.01%。色谱图如图 4 所示。

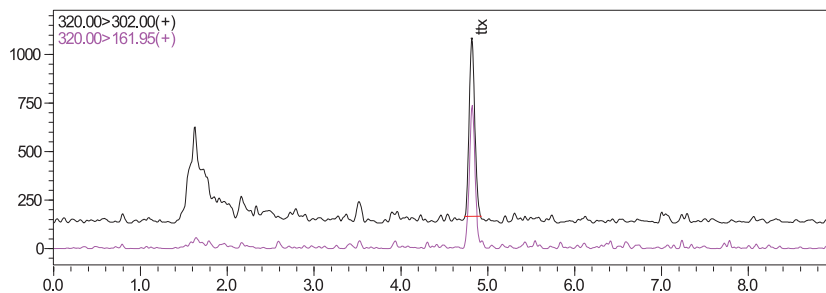


图4 基质加标样品的色谱图

2.5 鱼类产品样品分析

在某鱼类产品样品中检出 5.7 ng/mL 的 TTX，色谱图见图 5。

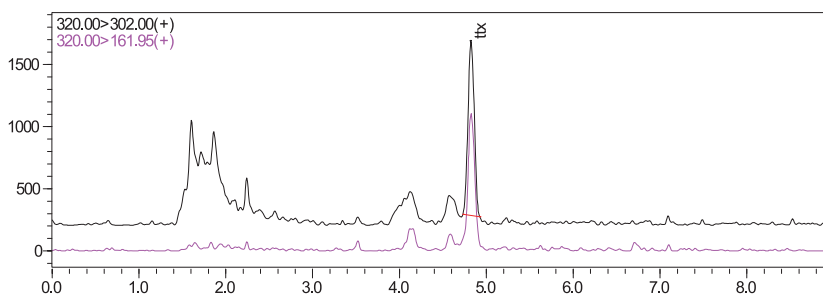


图5 鱼类产品样品的色谱图

结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定鱼类产品中河豚毒素的方法。河豚毒素在 5 ~ 120 ng/mL 浓度范围内线性良好，基质加标回收率良好；低、中、高 3 浓度的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.05 ~ 0.06% 和 1.19 ~ 3.95% 之间，仪器精密度良好；在某鱼类产品样品中检出河豚毒素，浓度为 5.7 ng/mL。