

水产品中河鲀毒素的高效液相紫外测定法

岑剑伟, 李来好, 杨贤庆, 魏涯, 刁石强, 辛少平, 周婉君, 石红

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 以鲀科鱼类为研究材料, 采用超声波法提取, C_{18} -WCX联用固相萃取纯化, 使用高效液相色谱紫外检测方法测定水产品中河鲀毒素含量, 通过探索提取方法和色谱条件对检测结果的影响, 并确定和优化色谱分离和紫外检测条件, 建立了一种高效液相紫外检测测定水产品中河鲀毒素的方法。该检测方法稳定性好, 可操作性强, 加标回收率在75%~82%之间, 相对标准偏差小于15%, 检出限达到0.02 mg/kg。与现行河鲀毒素检测方法相比, 该方法具有对仪器要求低、操作简便的特点, 易于推广应用。[中国水产科学, 2010, 17(5): 1036-1044]

关键词: 河鲀毒素; 高效液相色谱; 固相萃取; C_{18} 小柱; WCX小柱; 紫外检测

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-1036-09

河鲀毒素(Tetrodotoxin, TTX)是一种氨基全氢唑啉丫啉(Aminoperhydroquinazoline)型化合物, 以半缩醛形式存在, 该物质是一种强烈的神经毒素, 毒力比氰化钠强1 250倍。鲀科鱼类是最常见的含河鲀毒素的水产品, 如铅点东方鲀(*Fugu alboplumbeu*)、兔头鲀(*Lagocephalus lagocephalus*)、横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*)等, 另外, 云斑裸颊虾虎鱼(*Yongeichthys criniger*)、织纹螺(*Nassarius* spp.)等也被证实含有河鲀毒素^[1-2]。河鲀毒素的化学性质稳定, 一般的烹饪手段难以将其完全破坏, 中毒后又缺乏特效的解毒药或抗毒血清, 救治难度高。河鲀自古以来就以肉质鲜美闻名, 导致河鲀毒素中毒事件屡有发生; 另外, 误食不明鱼种也是此类中毒事件发生的重要原因, 因而加强对水产品中河鲀毒素的监测显得尤为必要, 多省地方渔业局已将水产品中河鲀毒素作为例常检测项目。

目前, 河鲀毒素检测常用的方法有小鼠检测法、酶联免疫法、薄层色谱法、柱后衍生高效液相色谱检测法、气质联用法和液质联用等。国外较多地采用气质联用、液质联用的方法检测河鲀毒素^[3-5]。质谱设

备在国内普及程度不高, 因而相关的检测方法难以被采用。中国近年制定的《GB/T 5009.206-2007 鲜河鲀鱼中河鲀毒素的测定》采用酶联免疫法, 其试剂制备成本较高, 稳定性不足^[6]。《GB/T 23217-2008 水产品中河鲀毒素的测定 液相色谱-荧光检测法》使用高效液相色谱-柱后衍生荧光检测法测定, 该法必须要配备价格昂贵的柱后衍生装置, 这提高了对设备的要求, 同时柱后衍生装置使用频率较低, 一般实验室很少配备^[7]。由于目前尚无准确性高、简便易行、成本低的方法可供应用, 使得河鲀毒素的监测及调查工作难以深入开展。本研究拟采用超声波快速提取法提取水产品中河鲀毒素, 固相萃取纯化后, 应用反相高效液相色谱分离、紫外检测方法测定, 具有对设备的要求不高、可操作性强的特点, 为促进水产品中河鲀毒素的监测工作顺利开展提供适用的检测手段。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备和试剂

1.1.1 仪器设备 高效液相色谱仪, 配有DAD检测

收稿日期: 2009-11-17; 修订日期: 2010-02-08.

基金项目: 广东省省级财政专项资金专项.

作者简介: 岑剑伟(1976-), 男, 助理研究员, 从事水产品质量安全研究. Tel: 020-89108346; E-mail: genvex@163.com

通讯作者: 李来好(1963-), 男, 广东, 研究员, 从事水产品质量安全研究. Tel: 020-84195166; E-mail: laihaoli@163.com

器(AgiLent1100,美国安捷伦公司);旋转蒸发仪(N-1000,日本);固相萃取装置(SUPELCO,美国);自动平衡离心机(TDZ5-WS,湖南湘仪仪器公司);超声波清洗仪(Transsonic TI-H 10,德国);氮吹仪(N-EVAPTM 112,美国)。

1.1.2 实验耗材 SupeLcLeanTM LC-18 SPE Tubes, 3 mL (SUPELCO); CNWBOND WCX SPE Tubes, 3 mL/500 mg (CNW);

1.1.3 药品与试剂 河鲀毒素冻干标准品 1 mg (Sigma 公司);冰醋酸,甲醇,氨水,磷酸二氢铵,庚烷磺酸钠(以上试剂均为分析纯);试验用水符合 GB/T 6682 一级水的标准。

1.1.4 实验材料 铅点东方鲀、弓斑东方鲀(*Fugu ocellatus*)、横纹东方鲀,采捕于广东汕头达濠港。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制 2%乙酸甲醇溶液(10 mL冰醋酸与490 mL甲醇混合);0.75%氨水(3 mL 25%氨水与97 mL水混合);0.2%醋酸水溶液;氨甲醇[25%氨水与甲醇1:9(V/V)混合];WCX小柱洗脱液:2%乙酸甲醇-水(80:20);流动相:50 mmol/L磷酸二氢铵-10 mmol/L庚烷磺酸钠(称取5.72 g磷酸二氢铵、2.02 g庚烷磺酸钠加水溶解定容到1 L,过0.22 μm滤膜);100 μg/mL标准储备溶液(取TTX冻干标准品1.00 mg加入超纯水定容到10 mL,4℃贮存);取标准储备液,加水配置成浓度为0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL的梯度标准工作液。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:GraceSmart RP-18 5 μm, 250 mm×4.6 mm;流动相:50 mmol/L磷酸二氢铵-10 mmol/L庚烷磺酸钠;进样量20 μL;流速1.0 mL/min;柱温25℃;检测波长200 nm。

1.2.3 样品前处理 参照国家标准GB/T 23217-2008的提取方法^[7],略有改动:取约5 g鱼肉置于100 mL带旋盖离心管中,加入15 mL 2%乙酸-甲醇溶液均质,再用10 mL 2%乙酸-甲醇溶液清洗均质机刀头,与原匀浆液合并,加盖后60℃水浴超声

提取15 min(35 kHz,强度100%)。4 500 r/min离心5 min,将上清转入100 mL蒸馏瓶。再向离心管中加入25 mL提取液,振荡使沉淀悬浮,重复超声提取1次。合并上清,65℃减压浓缩至近干。向蒸馏瓶中加入5 mL水和10 mL二氯甲烷充分振荡洗瓶,转移至离心管中4 500 r/min离心5 min。取1 mL上层清液过C₁₈小柱(使用前依次用3 mL甲醇、3 mL 0.2%乙酸活化),1.5 mL 0.2%乙酸洗柱,收集全部流出液,加入1 mL 0.75%氨水,混合后立即将其全部加载到WCX小柱(使用前用3 mL氨甲醇溶液活化),过柱,5 mL水淋洗后,用6 mL洗脱液分2次洗脱,收集洗脱液,65℃减压浓缩或80℃氮气吹干后1 mL水溶解,过0.22 μm过滤器,进样分析。

1.2.4 计算公式 样品中河鲀毒素的含量按以下公式计算:

$$X = \frac{5 \times C}{m}$$

式中:X-样品中河鲀毒素的含量(mg/kg);C-提取液中河鲀毒素的含量,即液相色谱仪测定的值(μg/mL);m-样品的称取量(g)。

2 结果与分析

2.1 萃取条件的确定

样品经2%乙酸甲醇提取,减压旋转蒸干,加水溶解,离心去除固形物,过小柱纯化后上机分析,发现仍残留较多杂质,TTX目标峰被杂质覆盖;实验过程中发现,在过柱之前对样品液进行液液萃取纯化,有利于去除干扰杂质。因河鲀毒素不溶于二氯甲烷、乙酸乙酯、三氯甲烷、乙醚等有机溶剂,本研究比较了这4种有机溶剂的反萃取除杂效果(表1)。经比较得出二氯甲烷的除杂效果最佳,蛋白质遇二氯甲烷变性凝固,离心后被除去,且二氯甲烷密度较大,TTX分布在上层的水层中,便于吸取分离。摸索得出,用2倍体积二氯甲烷萃取后样品再经固相萃取纯化,色谱图较为干净,目标峰可以与杂质峰分离开,因此选择二氯甲烷进行去杂处理。

表1 不同萃取液的对比试验
Tab. 1 The effect comparison of different extract solution

萃取液 Extract solution	萃取现象 Extract phenomenon	评价 Evaluation
二氯甲烷 Dichloromethane	充分混匀后离心分为3层,中层为析出的沉淀物质,将水层和二氯甲烷分隔开,界面明显,水层处于上方,便于吸出。	析出固形物多,除杂效果最佳;二氯甲烷具毒性
氯仿 Chloroform	离心后分为3层,中层为析出的沉淀物质,将水层和氯仿分隔开,界面明显,水层处于上方,便于吸出。	析出固形物多,除杂效果较好;氯仿毒性强
乙醚 Aether	充分混匀后离心分为2层,界面上有一层薄的固形物,水层处于下方,吸出水层时需穿破界面,固形物附着在移液枪头上。	样品液黏稠,含杂质量多,过柱困难,去杂效果不明显
乙酸乙酯 Ethyl acetate	离心后分为2层,离心管底部有少量沉淀,水层处于下方,水层不便于吸取出。	样品液黏稠,过柱困难,杂质去除效果不明显

2.2 固相萃取条件探索

根据TTX呈弱碱性性质,先使用C₁₈小柱除去样品液中带正电荷同时具有强非极性基团的物质,再利用WCX小柱将带正电荷的TTX从经C₁₈小柱纯化的样品液中提取出来,以达到纯化的目的。关于C₁₈小柱使用的方法较多,但存在较大差异;用WCX小柱纯化TTX的研究未见有报道,本研究探索了这2种固相萃取小柱的使用条件。

2.2.1 C₁₈小柱的使用条件 加载1 mL 10 μg/mL TTX标准溶液到C₁₈小柱上(使用前依次用3 mL甲醇、3 mL 0.2%乙酸活化),控制流速约为1 mL/min,立即收集滤过液,待加载的标准溶液全通过后,抽干小柱,再用0.2%乙酸洗涤小柱,每次0.5 mL,分别收集洗涤液,测定滤过液和洗涤液中TTX的含量。经计算得出,1 mL滤过液中TTX总含量为4.36 μg,前3次的淋洗液中含含量分别为4.21 μg、1.37 μg、0.00 μg,表明用1 mL 0.2%乙酸可将TTX完全洗脱下来,回

收率达99.7%。为确保高回收率,本方法使用1.5 mL的洗涤用量。用提取的河鲀毒素样品作同样处理后上机分析,色谱图杂质多、干扰峰强度高,将目标峰覆盖,表明单独使用C₁₈小柱纯化不能达到直接用紫外检测器分析检测的要求,需进一步纯化。

2.2.2 WCX小柱的使用条件 WCX小柱具有吸附带正电荷离子的作用,可将TTX从样品液中提取出来。加载2 mL 10 μg/mL TTX标准溶液到WCX小柱上(使用前3 mL 10%氨甲醇溶液活化),控制流速为约2 mL/min,待加载的标准溶液完全通过后,分别用不同配比的2%乙酸甲醇-水溶液分次洗脱,洗脱液用量依次为3 mL、4×1 mL,分次收集洗脱液,氮气吹干,加1 mL水溶解,测定其中TTX的含量,分析各种配比洗脱液的洗脱效果。由表2可见,洗脱液配比为80:20时,洗脱效果最好,6 mL洗脱液即可保证将TTX从WCX小柱上完全洗脱下来,回收率高达97.2%。

表2 不同洗脱液比对WCX小柱洗脱效果影响
Tab. 2 Effect of different eluent ratios on WCX cartridge elutiton

2% 乙酸甲醇: 水 2% Acetic acid-methanol solution: distilled water	洗脱次数 Elution time					回收率/% Recovery rate
	1	2	3	4	5	
100: 0	12.50	2.91	2.33	0.80	0.00	92.7
80: 20	15.37	3.64	0.42	0.00	0.00	97.2
60: 40	10.13	7.42	1.31	0.00	0.00	94.3
40: 60	0.00	0.00	0.00	0.00	2.81	14.5

注: 第1-5次洗脱的洗脱液用量依次为3 mL、1 mL、1 mL、1 mL、1 mL; 表中数字表示洗脱液中河鲀毒素的含量(μg/mL)。
Note: The eluent volume of 1-5 elution are 3 mL, 1 mL, 1 mL, 1 mL and 1 mL, respectively. Figures in the table donate TTX content in the corresponding eluent (μg/mL).

对样品操作时,加载样液后经过淋洗后再进行洗脱操作,才能达到有效除杂的作用。试取空白样品提取液1 mL,过C₁₈小柱后,添加入一定量的TTX标准溶液,再过WCX小柱,用5 mL不同溶液淋洗小柱。然后用6 mL 2% 乙酸甲醇-水溶液(80:20)洗脱,氮气吹干后,加1 mL水溶解上机检测,计算回收

率并比较评价色谱图峰型。结果表明,用纯水洗涤小柱即可有效去除杂质并且保持较高的回收率(表3)。甲醇与水的混合液在淋洗过程中,随着甲醇所占比例的提高,回收率下降,说明甲醇会使TTX流失。此外,氨水淋洗也会造成部分TTX损失,说明碱性水溶液也不宜用作淋洗液。

表3 不同淋洗液淋洗WCX小柱效果的比较
Tab. 3 Effect of different rinse solution on WCX cartridge elution

项目 Item	淋洗液 Rinse solution				
	甲醇-水(1:1) Methanol: water (1:1)	甲醇-水(1:4) Methanol: water (1:4)	甲醇-水(1:9) Methanol: water (1:9)	蒸馏水 Distilled water	0.25% 氨水 0.25% ammonia
回收率/% Recovery rate	84.0	90.7	91.8	93.0	86.7
评价 Evaluation	色谱图杂质峰较少,不干扰目标峰	色谱图杂质峰较少,不干扰目标峰	色谱图杂质峰较少,不干扰目标峰	色谱图杂质峰较少,不干扰目标峰	色谱图最干净,杂峰强度较小

2.3 色谱条件的确定

2.3.1 流动相的确定 目前TTX的液相分离所采用的流动相有磷酸钠缓冲液体系、醋酸水溶液体系、庚烷磺酸钠体系等^[8-13],本实验比较了几种流动相分离TTX的效果,比较条件及分离现象见表4,得出磷酸二氢铵-庚烷磺酸钠作为流动相时,基线稳定,TTX峰型较好。庚烷磺酸根作为离子对试

剂与TTX相结合,中和其上所带的电荷,延后出峰时间,有助于TTX的分离。通过比较不同磷酸二氢铵和庚烷磺酸钠离子对浓度对样品分离效果的影响,发现以50 mmol/L磷酸二氢铵-10 mmol/L庚烷磺酸钠溶液作为流动相时,TTX峰型对称、峰宽度较窄,分离效果最好,可以将目标峰与杂质分离开,确定使用该配比。

表4 不同性质流动相对河鲀毒素标准品的分离现象的比较
Tab. 4 Effect of different mobile phases on chromatography of standard tetrodotoxin

流动相 Mobile phase	浓度或配比 Proportion	检测波长/nm Detection wavelength	现象 Phenomenon
水-醋酸-四氢呋喃 Water-acetic acid-THF	1000:1.5:5 (V/V/V)	205,210,230	基线不稳,噪音较大,不适合作为流动相
磷酸钠缓冲液 Sodium phosphate buffer	100 mol/L	205	pH 6.8时有目标峰,但pH 6.3时却未出目标峰
醋酸水溶液 Acetic acid	0.2% (V/V)	210,230	基线稳定,但是30 min内检测不到TTX目标峰
100 mol/L磷酸钠缓冲液(pH6.8): 10 mmol/L庚烷磺酸钠 100 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 6.8)-10 mmol/L sodium heptanesulfonate	50:50 (V/V)	205	TTX目标峰拖尾,半峰宽大,基线噪音较大
10 mmol/L庚烷磺酸钠水溶液-乙腈 10 mmol/L sodium heptanesulfonate-acetonitrile	90:10 (V/V)	205	基线平稳,峰宽大,峰型差,拖尾
120 mmol/L磷酸二氢铵-20 mmol/L 庚烷磺酸钠 120 mmol/L ammonium dihydrogen phosphate-20 mmol/L sodium heptanesulfonate	50:50 (V/V)	196-205	基线平稳,峰型好,检测波长向196 nm靠近时,基线噪音增大

2.3.2 检测信号的确定 通过紫外波长扫描确定TTX最大吸收波长在197 nm附近,在不同波长下信噪比不同,本研究选取了196 nm、198 nm、200 nm、204 nm、205 nm波长作对比,198 nm时信噪比最高,200 nm时

次之。另外比较各波长下样品色谱图(图1),200 nm、204 nm、205 nm下色谱图较好,目标峰积分准确。检测波长为200 nm时信噪比较高,样品色谱图较好,色谱峰积分准确,因此将200 nm确定为本方法检测波长。

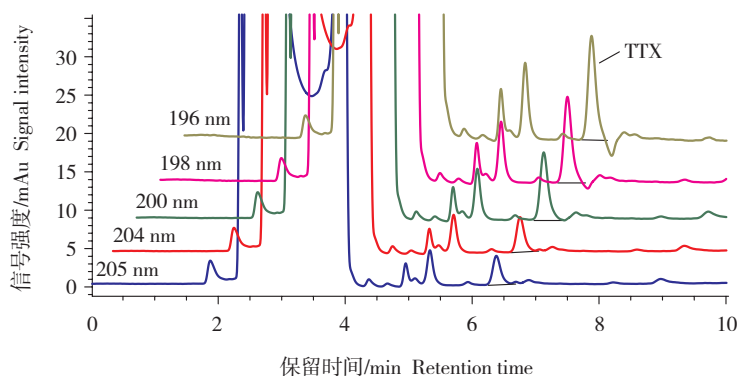


图1 各检测波长下河鲉毒素样品色谱图的比较

Fig. 1 Comparison of tetrodotoxin samples' chromatogram under different detection wavelength

2.3.3 柱温的确定 在流动相、流速和检测波长确定的情况下,考察柱温对色谱柱分离河鲉样品效果的影响。柱温较显著地影响目标物质的出峰时间和分离度,在38~20℃区间,随着柱温的降低分离度升高(图2),但同时随着温度降低柱压升高,单个样品的分析时间延长。柱温为25℃时,TTX目标峰能与杂质分离的较好,且柱压合理,单个样品分析时间仅需15 min。综合利弊,柱温设为25℃较为合理。

2.4 方法评价

2.4.1 方法线性范围与检测限 取TTX标准储备液,用水稀释配制成浓度为0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL的梯度系列,以峰面积(A)为纵坐标,以TTX上机浓度(C)为横坐标,绘制面积—浓度工作曲线。实验结果表明,TTX在0.2 μg/mL~100 μg/mL范围内线性良好,线性方程式为: $A=19.32 \times C+0$,相关系数 $R^2=0.9999$,标准品的校正曲线及色谱图见图3及图4。当浓度低于0.2 μg/mL时,线性变差,因此,确定本方法的线性范围为0.2 μg/mL~100 μg/mL,即0.2 mg/kg~100 mg/kg。浓度为0.2 μg/mL时,信噪比为32.4,按照噪音的3倍计算检测限,本方法检出限

为0.02 mg/kg。

2.4.2 方法准确度 称取切碎的,经确认无毒鱼肉5.00 g,分别加入100 μg/mL TTX标准品溶液10 μL、50 μL、100 μL、500 μL,混匀静置60 min。加标量分别相当于200 μg/kg、1 000 μg/kg、2 000 μg/kg、10 000 μg/kg浓度,每个浓度做3个平行,按照上述样品处理方法和检测方法检测。另外做1份空白对照。结果如表5所示,本方法回收率在75%~82%之间,相对标准偏差小于15%。另外,对含毒素的河鲉样品测定结果如表6所示,铅点东方鲀肝脏和性腺中含有河鲉毒素,肌肉和皮肤未检出毒素;弓斑东方鲀毒性相对较低,毒素在皮肤、肌肉、肝脏、性腺中均有分布;横纹东方鲀肝脏含毒素量较高,皮肤、肌肉中未检出毒素,未对横纹东方鲀性腺做测定。

3 讨论

3.1 提取液的选择

TTX不溶或微溶于水,不溶于无水乙醇、乙醚、苯等有机溶剂,在含有稀酸的水溶液中极易溶解。在利用纯溶剂提取河鲉毒素的研究中,杨春等^[14]比较了甲醇、乙醇、乙酸、水4种溶剂的提取率(60℃水

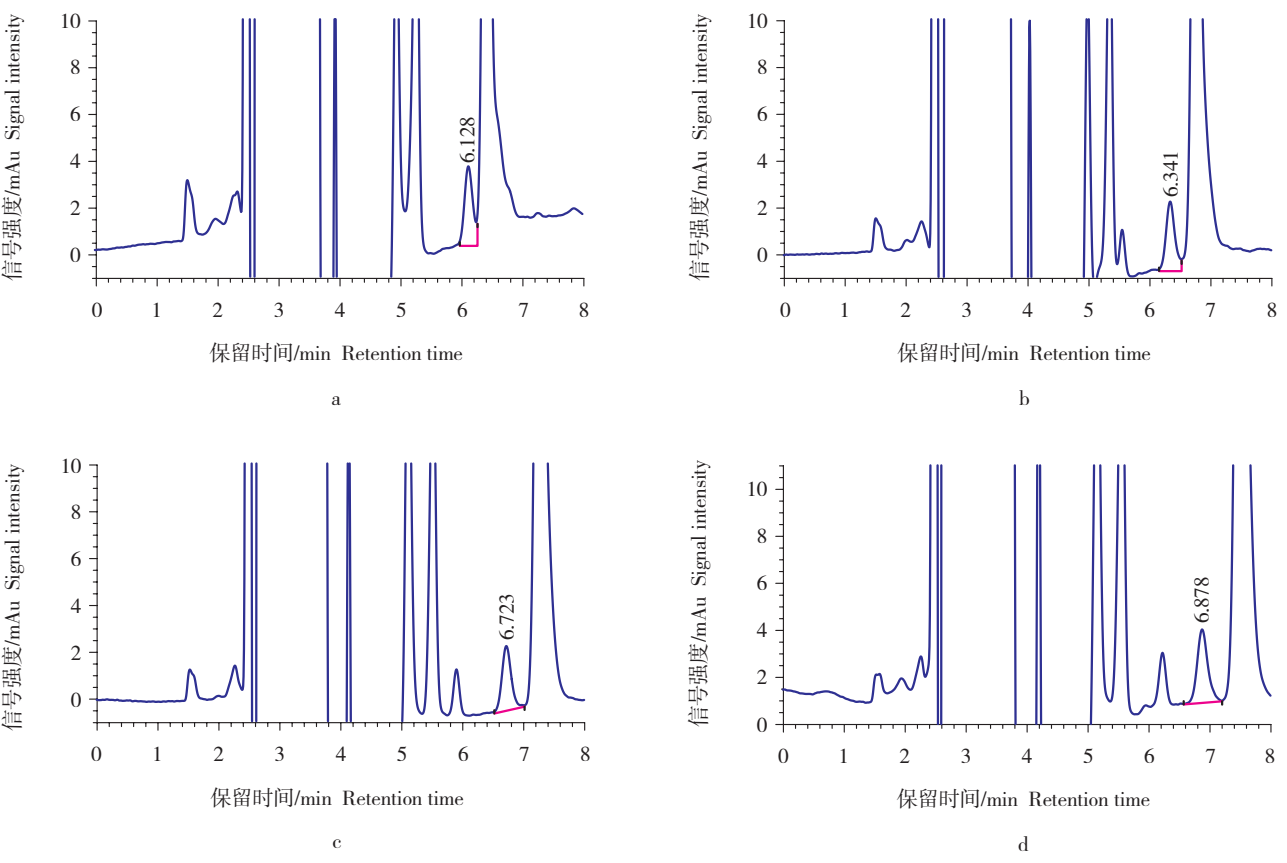


图2 柱温对色谱柱分离的影响
a. 38 °C ; b. 30 °C ; c. 25 °C ; d. 20 °C .
Fig. 2 Impact of column temperature on chromatography separation
a.38 °C ; b.30 °C ; c.25 °C ; d.20 °C .

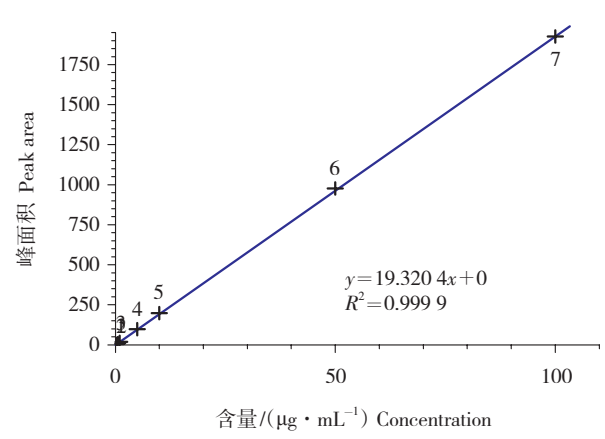


图3 河鲀毒素标准品校正曲线
Fig. 3 Calibration curve of standard tetrodotoxin

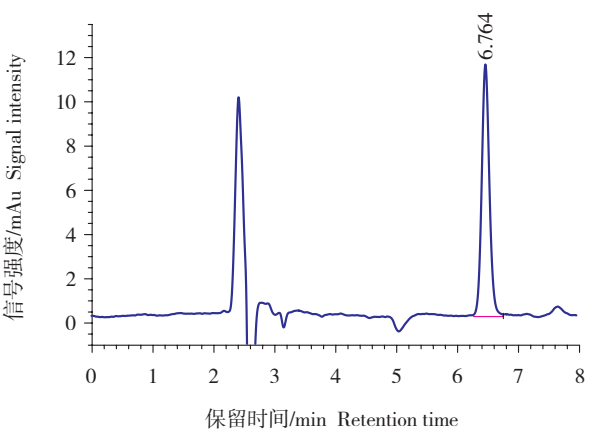


图4 河鲀毒素标准色谱图
Fig. 4 Standard chromatogram of tetrodotoxin

表5 对样品中加标河鲀毒素的回收率
Tab. 5 Recovery rate of added standard tetrodotoxin in samples

空白/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Blank	添加量/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Addition	测定值/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Determined content	回收率/% Recovery rate	相对标准偏差/% RSD
0	200	158 ± 6.9	79.0	4.4
0	1000	799 ± 90.9	79.9	11.4
0	2000	1514 ± 84.2	75.7	5.6
0	10000	8115 ± 88.4	81.2	1.1

表6 含毒河鲀样品中河鲀毒素含量
Tab. 6 Tetrodotoxin content in fish samples $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

样品 Sample	组织 Tissue			
	皮肤 Skin	肌肉 Muscle	肝脏 Liver	性腺 Gonad
铅点东方鲀 <i>Fugu alboplumbeu</i>	0.00	0.00	29.55	55.60
横纹东方鲀 <i>Takifugu oblongus</i>	0.00	0.00	403.59	—
弓斑东方鲀 <i>Fugu ocellatus</i>	0.37	0.28	2.40	13.87

浴8 h),发现乙酸的提取率最高;在现有的关于TTX提取和检测的方法当中,较多采用乙酸水溶液或乙酸甲醇溶液对鱼肉中河鲀毒素进行提取,乙酸甲醇溶液提取率较高^[15]。本研究利用乙酸甲醇溶液提取TTX与乙酸水溶液相比具有容易浓缩的优点,且浓缩后前者的杂质也比后者明显少,因此选择乙酸甲醇溶液作为提取液。

3.2 固相萃取小柱使用的探讨

河鲀毒素检测方法的难点在于上机前的样品纯化,多年来一直没有取得重大突破。本研究采用了C₁₈和WCX固相萃取小柱纯化TTX。因TTX呈弱碱性, pKa=8.7,在低pH下带正电荷,不保留在C₁₈小柱上,可以被阳离子固相萃取小柱吸附。经过多次摸索发现C₁₈小柱和WCX弱阳离子小柱组合使用可有效去除样品中杂质。C₁₈小柱除去样品液中带正电荷同时具有强非极性基团的杂质,利用WCX小柱的离子交换吸附作用将带正电荷的TTX从样品液中萃取出来。在C₁₈小柱的使用上,相关报道中的做法不一,郭柏坤等^[8,16]、刘海新等^[9]、Margaret等^[17]认为TTX在小柱上完全无保留,样品液过柱后不需洗涤C₁₈小柱;骆和东等^[2]、崔建洲等^[10]、Tsai等^[18]认为小柱上残留严重较难洗脱,需使用大量的溶液去洗涤,出现这种分歧可能是由于活化条件不同、样

品液pH差异以及C₁₈小柱生产厂家不同引起的。在本实验条件下,样品液过柱后TTX在柱子上有残留,使用0.2%醋酸作为洗涤液,较少的洗涤用量即可完全洗脱。对于WCX小柱用于TTX样品液的纯化目前尚未有报道,WCX是羧酸小柱, pH大于4.8时具有吸附阳离子的作用,当溶液pH小于4.8时,小柱失去对阳离子的吸附作用。本研究中,样品液过C₁₈小柱后加入1 mL 0.75%氨水, pH在5.6~7.0之间。结果表明,WCX小柱萃取TTX的效率高,回收率稳定,具有富集浓缩作用。WCX小柱有效纯化了样品液,并达到采用紫外检测器检测的要求,提取条件同样适用于其他色谱检测方法的样品提取步骤,该发现对于TTX的检测方法的完善具有较大的指导意义。

3.3 几种主要TTX检测方法的比较

检测方法中,酶联免疫法的原理是TTX与酶标抗体的反应,特异性强,对样品提取液的纯化要求不高,因此,样品的处理过程简单,然而测定准备过程和测定过程却较为复杂,需要配制和使用10种以上的试剂,测定过程容易引入人为误差,且酶标板制作过程需时长、难度大、稳定性难以保证、成本较高^[6]。柱后衍生高效液相色谱检测法样品经过提取后再经过C₁₈小柱除杂就可上机分析,其原理是把TTX碱解成发荧光的物质,以与其他杂质区分,然后用荧光

检测器测定,但是需要配备昂贵的柱后衍生装置^[7]。气质联用和液质联用检测法灵敏度高,定性定量准确,但是仪器贵不利于推广使用,且样品处理过程也需要过柱等过程^[2-3],尤其气质联用检测还需要碱解硅烷化处理,样品处理更为复杂。本研究采用超声波法提取, C₁₈-WCX联用固相萃取纯化,使用高效液相色谱紫外检测方法检测水产品中河鲀毒素含量,测定稳定性好,方法的精密度及回收率和检测限均达到检测要求。与其他检测方法比较,本方法具有可操作性强、对设备要求不高、检测成本低的优点,所有检测工作可在1个工作日内完成,可以满足大批量、快速测定的要求,适合在各类型检测中心推广使用。

参考文献:

- [1] 伍汉霖,陈永豪,牟阳,等. 中国有毒及药用鱼类新志[M]. 北京: 中国农业出版社,2002: 79-146.
- [2] 骆和东,贾玉珠,朱宝平. 固相萃取-超过滤-液相色谱/质谱联用法测定织纹螺中的河豚毒素[J]. 色谱,2007, 25(6): 917-921.
- [3] Suzuki O, Watanabe K. Drugs and poisons in humans. A handbook of practical analysis[M]. Heidelberg: Springer Berlin,2005: 481-490.
- [4] Hwang D F. Research on marine toxins in taiwan[J]. Toxin Rev,2003,22(4): 663-678.
- [5] Nagashima Y, Tanaka N, Shimakura K, et al. Occurrence of tetrodotoxin-related substances in the nontoxic puffer *Takifugu xanthopterus*[J]. Toxicon,2001,39: 415-418.
- [6] GB/T 5009.206 - 2007,鲜河鲀鱼中河鲀毒素的测定[S]. 北京: 中国标准出版社,2008.
- [7] GB/T 23217 - 2008,水产品中河鲀毒素的测定液相色谱荧光检测法[S]. 北京: 中国标准出版社,2009.
- [8] 郭柏坤,宫庆礼,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鲀毒素[J]. 中国海洋药物杂志,2006,25(5): 34-37.
- [9] 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豚毒素含量[J]. 水产学报,2006,30(6): 812-817.
- [10] 崔建洲,申雪艳,宫庆礼,等. 高效液相色谱-紫外/荧光检测方法测定河鲀毒素[J]. 色谱,2006,24(3): 317.
- [11] 张虹,柳正良,黄蓓琳,等. 反相离子对-高效液相色谱法测定河鲀毒素[J]. 中国现代应用药学杂志,2001,18(3): 197.
- [12] 赵惠兰,辛修明,单国强,等. 反相高效液相色谱法(HPLC)测定河鲀毒素的研究方法[J]. 中国卫生检验杂志,1994,4(5): 263-266.
- [13] 黄海龙. 河豚毒素提取及检测[D]. 青岛: 青岛海洋大学,2002: 19-22.
- [14] 杨春,苏秀榕,李太武,等. 低毒河鲀鱼毒素的提取和检测[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(5): 398.
- [15] 林文鑫,黄惠莉,陈少欣. 河鲀毒素的提取研究[J]. 华侨大学学报,1999,20(4): 412-414.
- [16] 郭柏坤. 反相高效液相-PDA法测定虫纹东方鲀(*Takifugu vermicularis*)肝脏中的河鲀毒素[D]. 青岛: 中国海洋大学,2006: 32-33.
- [17] Margaret A O, Jennifer J S, Geoffrey K I. Use of high performance liquid chromatography to measure tetrodotoxin in serum and urine of poisoned patients[J]. Toxicon, 2004,44: 549-553.
- [18] Tsai Y H, Ho P H, Hwang C C, et al. Tetrodotoxin in several species of xanthid crabs in southern Taiwan[J]. Food Chem,2006,95: 205-212.

Detection of tetrodotoxin by HPLC-UV in aquatic product

CEN Jianwei , LI Laihao, YANG Xianqing, WEI Ya, DIAO Shiqiang, XIN Shaoping, ZHOU Wanjun, SHI Hong
(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Occurrence of poisoning caused by tetrodotoxin (TTX) is frequently reported in recent years. The establishment of a good detection method should be helpful to promote the monitoring work of TTX in aquatic product. Impact of extraction method and chromatographic conditions on TTX detection were studied, and a stable, cost-effective detection method was developed in this study. Puffer fishes were selected as the main research material. After ultrasonic extraction, the extracted solution were purified by C₁₈ and WCX solid-phase extraction cartridge in sequence, then they were separated by reverse phase ion-pair liquid chromatography and detected by UV-detector. The recovery rates were 75%–82%. Relative standard deviations (RSDs) were less than 15%, and the detection limit was 0.02 mg/kg. The stability, sensitivity and operability of this method is better than other detection methods, and its application would be carried out more easily. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (5): 1036–1044]

Key words: TTX; HPLC; SPE; C₁₈–cartridge; WCX–cartridge; UV–detector

Corresponding author: LI Laihao. E-mail: laihaoli@163.com

.....《科技论文规范写作与编辑》订购通知.....

由《机械工程学报》编辑部梁福军博士撰写的《科技论文规范写作与编辑》一书,已于2010年6月由清华大学出版社出版发行。该书旨在帮助科技论文作者和编辑在较短时间内掌握科技论文规范写作和编辑的知识、技能和方法,提高科技论文的写作水平和科技书刊的出版质量。

本书是作者在总结长期工作实践经验的基础上,以有关国家标准、规范以及现代汉语语法等为依据,并结合大量实例撰写而成,有很强的针对性、指导性和实用性。

全书共分8章。内容包括科技论文的基础理论和知识,科技论文各组成部分及其中量、单位、插图、表格、公式、数字、字母、词语等的规范使用与表达,现代汉语书面语的使用及科技论文的常见语病,英文规范表达的原则及英文标点符号的正确使用等。

本书适合科研、工程技术人员等科技工作者和科技期刊、图书、网络出版编辑参考,也可作为高等学校教师、学生的论文写作参考或自学用书,以及科技写作、编辑的培训教材或学习材料。

如需购买此书,请填写“订购信息反馈单”并以邮件或传真的方式返回,同时邮寄购书款,每册45元,款到寄书。

联系人: 卞波 Tel: 010-88379907 李楠 Tel: 010-88379909 传真: 010-88379504 E-mail: fjliang2002@sohu.com

邮局汇款 通信地址: 北京百万庄大街22号《机械工程学报》编辑部 邮编: 100037

银行汇款 户名: 机械工业信息研究院 开户银行: 工行北京百万庄支行 帐号: 0200001409014473834

✂.....

订购信息反馈单

订购书名	《科技论文规范写作与编辑》				
订购单位			发票抬头		
寄书地址			邮 编		
联 系 人		电 话		E-mail	
订购册数		金额合计	¥	汇款方式	☐ 银行 ☐ 邮局

注: 1. 是否开具发票 ☐是 ☐否 (如果不开发票,表中“发票抬头”不填)
2. 邮局汇款请在“备注”或“附言”栏目中注明: 机工学报订书款