

SCIEX Triple Quad系统测定血液和尿液中的河豚毒素

Determination of Tetrodotoxin in Blood and Urine by SCIEX Triple Quad System

张小刚¹, 周志刚², 张小军³, 陈思³, 杨总¹, 刘冰洁¹

Zhang Xiaogang¹, Zhou Zhigang², Zhang Xiaojun³, Chen Si³, Yang Zong¹, Liu Bingjie¹

¹SCIEX (中国); ²舟山市公安局刑事科学技术研究所; ³浙江省海洋水产研究所;

¹SCIEX China; ²Institute of Criminal Science and Technology of Zhoushan Public Security Bureau; ³Zhejiang Marine Fisheries Research Institute;

Key words: LC-MS/MS, Tetrodotoxin, Blood and Urine

引言

河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 是一种毒性极强的天然神经毒素。其主要来源于河豚鱼, 也在一些海洋细菌、藻类以及其他海洋生物中被发现。河豚毒素能够选择性地阻断神经细胞膜上的钠离子通道, 从而干扰神经冲动的传导。人类一旦误食含有河豚毒素的食物, 会在短时间内出现中毒症状, 如口唇和舌尖麻木、呕吐、呼吸困难、肌肉麻痹等, 严重时可导致死亡。由于河豚毒素中毒发病迅速且致死率高, 准确快速地检测生物样本中的河豚毒素至关重要。液质联用技术因其具有高灵敏度、高选择性和强大的定性定量能力, 能够从复杂的生物样本 (如血液和尿液) 中精确地识别和定量河豚毒素。基于此, 本文在以SF/Z JD0107011-2011《生物检材中河豚毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》的前处理方法为基础进行优化, 并采用SCIEX 质谱仪建立了生物样本中河豚毒素的液质测定方法, 达到中毒早期快速确认毒素的种类及含量的目的, 为临床诊断和治疗提供关键依据, 对及时挽救中毒患者的生命具有重要意义。

该方法的优势和特点:

- 1、灵敏度高:** 灵敏度达到皮克级别以下, 完全满足标准要求 (SF/Z JD0107011-2011中的检出限为2.0 ng/mL)。
- 2、分析速度快:** 一针进样6 min即可满足河豚毒素的快速检测。

- 3、方法学通过验证:** 在0.1-5 ng/mL浓度范围内线具有较好的线性, 线性相关系数大于0.999, 血液和尿液的回收率在60.7%-93.5%之间, 相对标准偏差小于5%。

1 实验方法

1.1 前处理条件

提取: 取0.1 mL血样或者尿液样品于2 mL离心管中, 加入1 mL 0.1%乙酸甲醇, 涡旋振荡2 min, 12000 r/min 离心 5min, 上清液待净化;

活化: PCX固相萃取柱(Agela, 60 mg/3 mL)使用前依次用 3 mL 甲醇、3 mL超纯水活化;

上样: 上清液全部过柱

淋洗: 3 mL 0.3%乙酸水、3 mL 0.3%乙酸/50%乙腈水

洗脱: 3 mL 0.3%盐酸/50%乙腈水, 而后压干

洗脱液中加入5 μ L氨水溶液, 涡旋混匀, 12000 r/min 离心 5min, 取上清液至进样瓶中, 待测定。

1.2 液相色谱条件

色谱柱: Amide (100 \times 2.1 mm, 1.7 μ m)

流动相: 0.1%甲酸水溶液 (水相) 和乙腈 (有机相)

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40 $^{\circ}$ C

梯度洗脱条件：见表1

表1. 液相梯度洗脱

| 时间(min) | 水相 (%) | 有机相 (%) |
|---------|--------|---------|
| 0 | 15 | 85 |
| 0.5 | 15 | 85 |
| 2 | 50 | 50 |
| 4 | 50 | 50 |
| 4.1 | 15 | 85 |
| 6 | 15 | 85 |

1.3 质谱条件

扫描模式：ESI源，正离子模式；化合物参数见表2

离子源参数：

气帘气CUR (psi) : 25 温度TEM (°C) : 650
碰撞气CAD (psi) : 8 雾化气GS1 (psi) : 45
喷雾电压IS (V) : 5500 辅助雾化气GS2 (psi) : 55

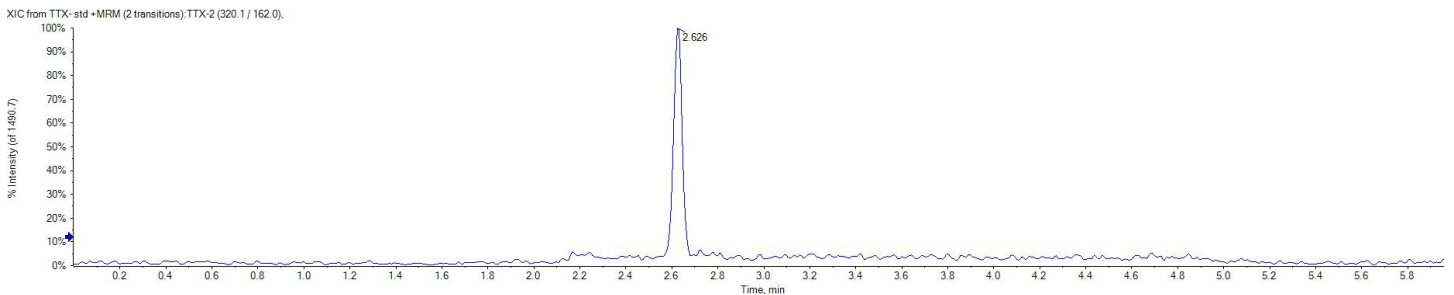


图1. 河豚毒素的提取离子流图

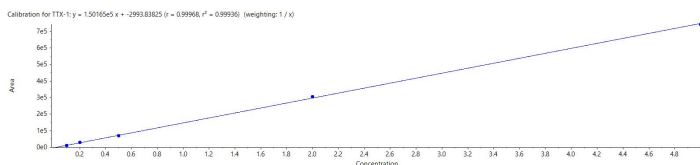


图2a. 血液中河豚毒素的基质匹配标准曲线

表2. 离子对参数

| 化合物 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | 去簇电压 (V) | 碰撞能 (eV) |
|-------|-----------|-----------|----------|----------|
| TTX 1 | 320.1 | 302.1 | 115 | 34 |
| TTX 2 | 320.1 | 162 | 115 | 52 |

2 实验结果

2.1 色谱质谱条件优化

通过优化乙腈、甲酸、甲酸铵等试剂的浓度组合，确定0.1%甲酸和乙腈作为本实验的流动相具有较好的灵敏度；并对源参数用流动注射分析 (FIA) 优化，得到合适的源参数。河豚毒素的提取离子流图见图1。

2.2 线性回归方程

该方法采用基质匹配标准曲线，在0.1-5 ng/mL浓度范围内线性良好，回归系数达到0.999以上，见图2。

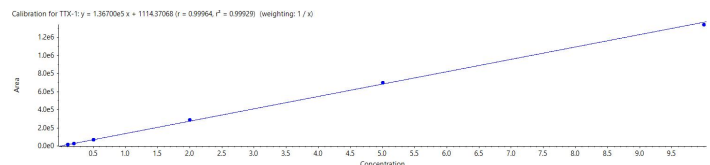


图2b. 尿液中河豚毒素的基质匹配标准曲线

2.3 回收率与精密度

在空白基质上分别添加1.0 ng、5.0 ng、10.0 ng的河豚毒素标样，每个浓度6个平行，提取回收率及相对标准偏差（RSD）如表3所示。

表3. 河豚毒素回收率与精密度

| 添加量(ng) | 血液回收率 (%) | 血液 RSD(%) (n=6) | 尿液回收率 (%) | 尿液 RSD(%) (n=6) |
|---------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|
| 1.0 | 65.7 | 2.7 | 93.5 | 1.9 |
| 5.0 | 61.4 | 1.6 | 88.2 | 3.6 |
| 10.0 | 60.7 | 2.0 | 89.4 | 1.7 |

3 小结

本文建立了生物检材中河豚毒素的液质测定方法，前处理简单快捷，节省了样品处理时间和人员成本。河豚毒素在0.1-5 ng/mL浓度范围内线性良好，回归系数达到0.999以上，加标回收高于60%，6个平行样的精密度在5%以内，满足检验需求，为生物检材中河豚毒素的测定提供参考。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-34450-A



The power of precision

SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China