

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.07.004

HILIC-UPLC-MS/MS 在两起河豚中毒事件病因 确证和病情预测中的应用研究*

赵凌国¹, 孙 健^{1△}, 刘 勇², 雷 蕾¹, 尹江伟¹

1. 广东省深圳市宝安区疾病预防控制中心, 广东深圳 518100; 2. 南方医科大学深圳医院, 广东深圳 518100

摘要:目的 建立河豚毒素(TTX)亲水液相色谱串联质谱检测方法, 查明两起食物中毒事件原因, 根据 TTX 摄入量 and 体内残留量对患者病情进行预测, 并实施抢救, 为此类中毒事件处置提供参考。方法 运用亲水液相色谱串联质谱技术对食物和人体样本中的 TTX 进行检测, 评估患者毒素摄入量和体内残留量, 预测患者病情和预后情况。结果 方法准确性、重现性和灵敏度良好。TTX 在 10~200 ng/mL 水平, 线性相关系数 $r > 0.999$ 。血液中 TTX 回收率为 80%~103%, 鱼肉中 TTX 回收率为 75%~87%, 相对标准偏差为 5.3%~9.2%。血液和鱼肉中 TTX 检出限分别为 0.2 ng/mL 和 3.7 μ g/kg。案例 1 中患者 A 的 TTX 摄入量约为 0.28 mg, 患者 B 摄入量约为 0.04 mg。洗胃后, 二者血液中 TTX 降为摄入量的 10%, 远远低于致死剂量 (0.5 mg), 患者预后良好。相反, 案例 2 中, 洗胃后患者 C 血液中 TTX 残留量为 1.9 mg, 远远高于致死剂量 (0.5 mg), 患者死亡。结论 该研究建立的亲水液相色谱串联质谱技术不仅可以为河豚中毒的诊断提供定性确证依据, 还可以测定食品及人体中 TTX 水平, 为 TTX 摄入量、体内残留量判断以及病情和预后评估提供依据。

关键词: 河豚; 中毒; 液相色谱串联质谱; 河豚毒素

中图法分类号: R115

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)07-0880-04

Application of HILIC-UPLC-MS/MS in etiological confirmation and condition prediction in two cases of puffer fish poisoning*

ZHAO Lingguo¹, SUN Jian^{1△}, LIU Yong², LEI Lei¹, YIN Jiangwei¹

1. Baoan District Center for Disease Prevention and Control, Shenzhen, Guangdong 518100, China;

2. Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518100, China

Abstract: Objective To establish the detection method of HILIC-UPLC-MS/MS for tetrodotoxin (TTX), to find out the cause of two cases of food poisoning incidents, and to predict the patient's condition and implement the rescue according to TTX intake and in vivo residual quantity so as to provide reference for similar poisoning incidents disposition. **Methods** The TTX levels in food and human body samples were detected by HILIC-UPLC-MS/MS. TTX intake and residual amount in vivo were evaluated and the patients' condition and prognosis were predicted. **Results** The method had good accuracy, reproducibility and sensitivity. TTX ranged 10–200 ng/mL, and the linear correlation coefficient r was > 0.999 . The TTX recovery rate was 80%–103% in the blood and 75%–87% in the fish meat with RSD of 5.3%–9.2%. The detection limit was 0.2 ng/mL and 3.7 μ g/kg for the blood and fish meat respectively. In case 1, the TTX intake of the patient A was about 0.28 mg, and that of the patient B was about 0.04 mg. After gastric lavage, the TTX level in their blood was decreased to 10% of their intake, which was far lower than the lethal dose of 0.5 mg. The prognosis of the patients was good. In contrast, in case 2, the blood residual amount of TTX in the patient C was 1.9 mg after gastric lavage, which was higher than the lethal dose (0.5 mg), and the patient died. **Conclusion** HILIC-UPLC-MS/MS established in this study can not only provide qualitative evidence for the diagnosis of puffer fish poisoning, but also measure TTX level in food and human body, and provide the evidence for judging the TTX intake, residual amount in body and assessing the disease condition and prognosis.

Key words: puffer fish; poisoning; liquid chromatography tandem mass spectrometry; tetrodotoxin河豚毒素(TTX)分子式为 $C_{11}H_{17}N_3O_8$, 相对分子质量为 319.1016, 是毒性最强的非蛋白类神经毒

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2021416)。

作者简介: 赵凌国, 男, 副主任技师, 主要从事卫生检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 314245295@qq.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1167.R.20230215.1455.002.html\(2023-02-15\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1167.R.20230215.1455.002.html(2023-02-15))

素,属于选择性极高的快速 Na^+ 通道阻断剂^[1-2],通过影响动作电位传导,产生神经和呼吸系统衰竭等症状,甚至可致死亡^[3-4]。1 g TTX 毒性是 1 g 氰化物的 1 万倍,是砒霜的 1 250 倍,有研究报道 0.5 mg TTX 足以让一个体质量为 70 kg 的人致命^[2]。TTX 最先在河豚中发现,20 世纪 80 年代日本每年因食用河豚中毒死亡人数占同期食物中毒死亡人数的 70% 以上^[2]。在我国,河豚中毒主要集中于沿海地区及长江、珠江等河流入海口附近。深圳作为珠江口东岸人口超过千万的超大沿海城市,河豚中毒时有发生。2019 年和 2021 年,笔者所在宝安区发生两起集体食用河豚导致的中毒事件,并有患者死亡。

TTX 尚无特效解毒剂,关键在于早发现、早诊断、早抢救。TTX 毒性剧烈,但其在人体血清中代谢很快,通常 24 h 后就很难在血清中检测出^[2]。如抢救及时,帮助患者度过体内毒素浓度高峰期,病程超过 8~9 h 未死亡者多能恢复^[3]。因此,病因确证和病情评估,尤其是毒素摄入量和体内残留量评估对抢救十分重要。但是,河豚中的 TTX 水平随河豚品种和季节变化,河豚不同器官和组织的毒性强弱也有差异,从大到小依次为卵巢、肝脏、脾脏、血管、鳃、皮、精巢^[2,4]。因此,很难从现场资料判断哪些河豚有毒,以及患者是否进食了有毒部位。在本文案例 2 中,8 人进食河豚,仅 1 人中毒。因此,毒素的定性和定量检测是病情评估的重要依据。

TTX 的定量检测方法有小鼠生物法、酶联免疫吸附试验、高效液相色谱法、液相色谱串联质谱等。其中液相色谱串联质谱具有定性准确、灵敏度高、重现性好等优点。本研究利用亲水液相色谱串联质谱(HILIC-UPLC-MS/MS)技术,建立食品和人体样本中 TTX 的测定方法,并运用于两起中毒事件的病因确证以及病情评估,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样品来源 案例 1 样品:2021 年 5 月 19 日,患者 A 在市场购买并烹饪河豚与患者 B 聚餐。18:00,患者 B 进食一小块河豚鱼肝。18:10,患者 A 进食 1 条河豚鱼肉及 1 块鱼肝。18:30,患者 B 出现腹痛、头晕及手麻症状,意识到自己可能中毒,即刻用手抠喉主动催吐 1 次,后饮用 1 瓶纯牛奶后继续抠喉催吐 2 次;18:40,患者 A 亦开始出现口唇麻木症状,但未采取任何自救措施。随后二人症状加重,20:08 送医院抢救,两位患者经洗胃、催吐、导泻、利尿等治疗后仍出现血氧饱和度、呼吸频率降低等,遂采取经口气管插管,呼吸机辅助通气等措施并转院继续抢救,经治疗后症状好转,全部治愈出院。现场采集患者 A 血液、患者 B 血液、二者洗胃液(混合)、残留河豚鱼肉(食物)、残留河豚鱼肝(食物),送实验室检测。

案例 2 样品:2019 年 7 月 9 日,某公司厨房购买 8~9 条河豚(约 750 g),当日宰杀后存放于冰箱。7

月 11 日 11:40 取出加工,水煮 25 min 后出锅成品,供患者 C 与另外 8 名管理人员食用,其中 1 人未食用。12:35,患者 C 开始出现不适,表现为头晕、呕吐、口周麻木、乏力,随即送医院对症治疗。其余 7 名共同食用河豚者未出现身体不适症状。13:58 患者 C 出现呼吸、心搏骤停。16:45 转重症监护室,患者神志昏迷,呼吸机辅助呼吸,后病情恶化为植物人,长期昏迷后死亡。现场采集患者 C 洗胃液 1 份、抗凝血 1 份、非抗凝血 1 份送实验室检测。由于河豚全部食用,残渣已清理,未采集到河豚样品。

1.2 仪器与试剂 AB QTRAP 5500 超高效液相色谱-复合线性离子阱串联质谱(美国 AB SCIEX 公司),配有岛津 LC-20AD 液相色谱仪(日本岛津公司),Sigma 3-18KS 离心机(德国 Sigma 公司),seQuant™ Zic-Hilic 色谱柱(德国 Merck 公司),IKA T25 组织匀浆机(德国 IKA 公司),KQ-700E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),N-EVAP112 氮吹浓缩仪(美国 Organomation 公司)。TTX 标准品(北京美证检测技术有限公司)、甲醇和乙腈为色谱纯(美国 Fisher),乙酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 血液及洗胃液前处理 取血液或洗胃液 0.2 mL,加入 3% 乙酸甲醇溶液 0.6 mL,振荡 30 s,离心后取上清液,氮气吹至接近干燥,0.1% 乙酸 1.0 mL 复溶,加 0.5 mL 正己烷振荡,离心后取水相过 0.2 μm 滤膜,上机测定。

1.3.2 鱼肉和鱼肝前处理 取鱼肉或鱼肝约 3 g,加 3% 乙酸甲醇溶液 7.0 mL,均质,振荡 30 s,离心取上清液,氮气吹至接近干燥,0.1% 乙酸 1.0 mL 复溶,加 0.5 mL 正己烷振荡 30 s,离心后取水相过 0.2 μm 滤膜,用 0.1% 乙酸稀释 400 倍,上机测定。

1.3.3 仪器条件 色谱条件:德国 seQuant™ Zic-Hilic 色谱柱(150.0 mm×2.1 mm,5 μm ,200 Å);流动相为 0.1% 甲酸和乙腈;梯度:0~1 min,乙腈比例维持至 70%;1~5 min,乙腈比例下降至 20%;5~8 min,乙腈比例维持至 20%;8~10 min,乙腈比例上升至 70%;10~15 min,乙腈比例维持至 70%。流速:300 $\mu\text{L}/\text{min}$;柱温:30 °C;进样体积:10 μL ;

质谱条件:电喷雾正离子模式(ESI+);多反应监测模式(MRM);气帘气压力:35 psi;碰撞气:流速中等;喷雾电压:4 500 V;离子源温度:550 °C;源内气:55 psi;辅助气:55 psi;监测离子对为 320.1/302.1*、320.1/284.2、320.1/256.2、320.1/200.1、320.1/178.2、320.1/174.1、320.1/162.1。

1.3.4 方法验证 取空白血液和鱼肉按 1.3.1 和 1.3.2 方法处理获得基质溶液,用空白基质溶液绘制标准曲线。向空白血液和鱼肉中分别加入 200 ng/mL TTX 标准溶液 50、200、500 μL ,按 1.3.1 和

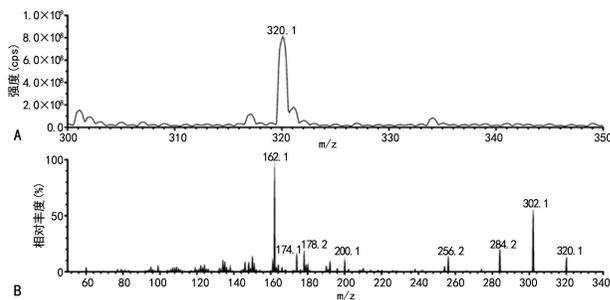
1.3.2 方法处理后上机检测,每个水平平行操作 3 次,计算加标回收率(用于反映准确性)和重现性(以相对标准偏差反映)。以 3 倍信噪比计算检出限,以 10 倍信噪比计算定量限。灵敏度以检出限和定量限来反映。

2 结果

2.1 TTX 检测方法验证

2.1.1 TTX 质谱参数 从母离子扫描(Q1 Scan)得到 TTX 一级质谱(图 1A),准分子离子峰 320.1 [质荷比(m/z)]与该化合物加氢峰[M+H]⁺理论值一致。此外,一级质谱中 m/z 为 320.1、321.1、322.1 的离子峰高比例也与 TTX 同位素分布比例一致(100.0% : 11.9% : 1.6%)。

TTX 二级质谱如图 1B 所示,母离子[M+H]⁺(m/z 为 320.1)裂解出来的主要碎片离子 m/z 为 302.1、284.2、256.2、200.1、178.2、174.1、162.1。其中 m/z 为 302.1 的离子丰度大且稳定,因此选择其为候选定量离子,其他为候选的定性离子,供进一步线性关系考察。



注:A 为一级质谱;B 为二级质谱。

图 1 TTX 质谱

2.1.2 TTX 线性关系 TTX 在亲水液相色谱中峰形较好,且能够实现较好地保留。对 7 个子离子进行考察,水平在 10~200 ng/mL,线性关系良好,线性相关系数 $r > 0.999$ 。选择 320.1/302.1 为定量离子,其余为定性离子。

2.1.3 TTX 准确性、重现性、灵敏度 对空白鱼肉和血液样品进行 3 个水平的加标回收实验,每个加标水平平行测定 3 次,结果如表 1 所示,血液中 TTX 回收率为 80%~103%,鱼肉中 TTX 回收率为 75%~87%,相对标准偏差为 5.3%~9.2%。血液中 TTX 检出限为 0.2 ng/mL,鱼肉中 TTX 检出限为 3.7 μg/kg。

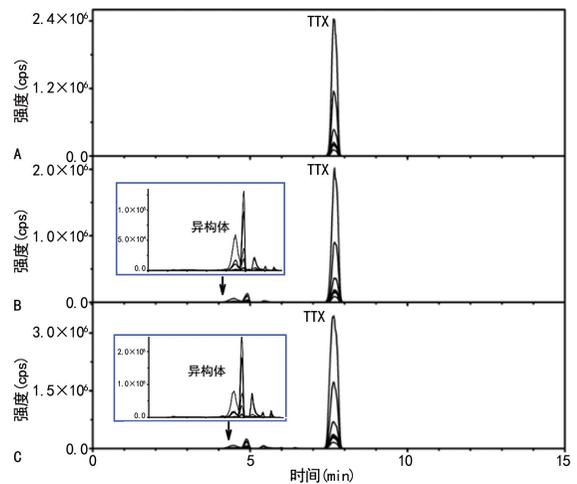
2.2 中毒样品检测

2.2.1 河豚样品检测及摄入量评估 TTX 标准溶液图谱如图 2A 所示。案例 1 中患者 A 和 B 均在 30 min 内出现症状,留下未食用的鱼肉和鱼肝。检测结果显示,鱼肉 TTX 水平为 6.93 mg/kg,鱼肝 TTX 水平为 12.3 mg/kg。患者 B 进食 1 块鱼肝,患者 A 进食 1 条鱼及 1 块鱼肝。对图 2B 和 2C 中剩余的肉和鱼肝称质量,约 35.0 克/条和 3.1 克/块。据此估算,

患者 A 摄入量约为 0.28 mg,患者 B 摄入量约为 0.04 mg。

表 1 方法准确性、重现性和灵敏度

样品	添加水平 (ng/mL)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)	检测限	定量限
血液	10	80	9.2	0.2 ng/mL	0.7 ng/mL
	40	96	5.3		
	100	103	6.1		
鱼肉	10	75	8.5	3.7 μg/kg	12.2 μg/kg
	40	81	7.9		
	100	87	7.2		



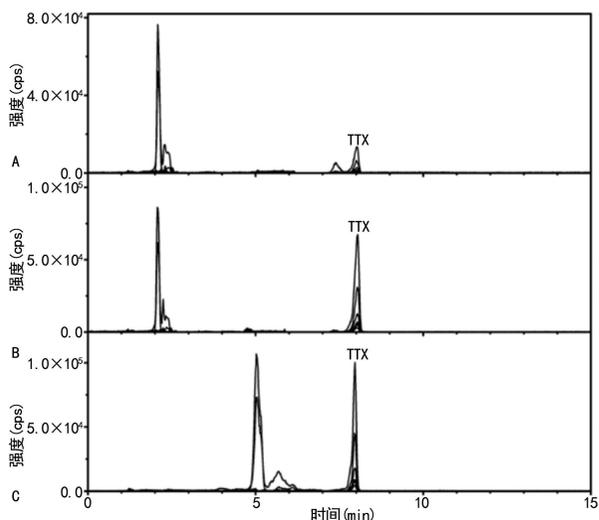
注:A 为 TTX 标准溶液;B 为鱼肉;C 为鱼肝。

图 2 各样品的 HILIC-UPLC-MS/MS 图谱

2.2.2 TTX 体内残留量及病情评估 患者 A 和患者 B 血液及洗胃液结果如图 3 所示。患者 B 摄入量少(0.04 mg),且有自救措施,用手抠喉主动催吐 3 次,因此其血液中 TTX 水平(1.1 ng/mL)明显低于患者 A(6.1 ng/mL)。按成人 4 000 mL 血液量估算,患者 A 和 B 血液中 TTX 残留量约为 0.020 mg 和 0.004 mg,仅为摄入量的 10%,远远低于致死量 0.5 mg,预估患者病情较轻。因而患者 A 和 B 迅速康复出院。

案例 2 现场采集到患者 C 血样和洗胃液,患者 C 抗凝血中 TTX 水平高达 467 ng/mL,按成人 4 000 mL 血液量估算,仅患者血液中 TTX 残留量已达 1.9 mg,超过致死剂量(0.5 mg)。此外,患者洗胃液中 TTX 水平达到 920 ng/mL,非抗凝血结果中 TTX 水平为 453 ng/mL,预估患者病情危重。尽管全力抢救,患者 C 脑死亡后昏迷 2 年,最终死亡。

2.2.3 TTX 异构体检测 在鱼肉和鱼肝实际样品中,除了标准品 TTX,还有另外 5 个互相分离的化合物。如图 2 所示,它们有相同的母离子和子离子,但各化合物的离子比率和保留时间不同,因此可以相互区分。



注:A为患者B血液;B为患者A血液;C为患者A和B混合洗胃液。

图3 患者A、B血液及混合洗胃液的HILIC-UPLC-MS/MS图谱

3 讨论

目前,我国暂未设定水产品 TTX 限量。日本、韩国规定河豚可食部分 TTX 限量为 2 mg/kg^[5]。欧盟禁止河豚流入市场,规定贝类组织 TTX 水平应低于 44 μg/kg^[6]。如表 1 所示,本方法鱼肉中 TTX 定量限为 12.2 μg/kg,完全可以满足上述检测需求。此外,本方法血液中 TTX 定量限达到 0.7 ng/mL,灵敏度良好。TTX 回收率为 75%~103%,准确性较好。不同添加水平 3 次提取测定,相对标准偏差小于 10%,说明本方法具有良好的重现性。与多壁碳纳米管固相萃取^[7]、超声-固相萃取^[8]、免疫亲和柱净化^[9]等复杂的前处理方法比较,本方法还具有简便和快速的优点。

此外,天然存在的 TTX 种类超过 40 种^[6]。在王冠男等^[10]的报道中,[M+H]⁺为 320 m/z 的 TTX 有 4 种,分别是 TTX、4-表河豚毒素(4-epiTTX)、6-表河豚毒素(6-epiTTX)、河豚酸。此外,TTX 自身在溶液中也存在 TTX、内酯型 TTX 和半缩醛型 TTX 3 种结构的动态平衡^[11]。在优化的色谱柱^[8]、流动相^[12]以及丰富的离子对信息条件下,本方法检测到多种 TTX 衍生物或异构体。在样品中检出了标准品中不存在的异构体,可以有效排除标准品污染带来的假阳性,同时也说明本方法具有同时检测多种 TTX 异构体的能力。

TTX 毒性大^[13],发病迅速,致死率高^[14],重症患者会出现本方案例中心搏、呼吸骤停现象^[15-17],非常凶险,对病情严重程度进行预判有重要意义。但是不同品种河豚及河豚不同器官组织 TTX 水平差异很大,仅凭现场资料很难判断患者中毒的严重程度。本研究建立的方法具有离子对信息丰富,分离能力强,准确性和重现性好的特点,不仅可以为快速查明中毒

原因提供确证,还可以提供 TTX 摄入量及患者体内 TTX 残留量数据,对病情判断和预后评估具有重要意义。

参考文献

- [1] 李学闻,张翔宇.河豚毒素中毒死亡法医学鉴定 1 例[J].中国法医学杂志,2018,33(1):106-107.
- [2] 达情.河豚毒素的中毒、检测及评价[D].苏州:苏州大学,2012.
- [3] 崔青梅,陈爱英,胡秋辉.河豚毒素中毒机制和防止的研究进展[J].食品科学,2003,24(8):179-182.
- [4] 卢义博,曾军杰,陈思,等.河豚毒素在暗纹东方鲀体内的转移分布规律及相关代谢酶活性分析[J].现代食品科技,2021,37(6):129-135.
- [5] BLANCO L,LAGO J,GONZÁLEZ V,et al. Occurrence of tetrodotoxin in bivalves and gastropods from harvesting areas and other natural spaces in Spain[J]. Toxins, 2019,11(6):331.
- [6] 王兴龙,蔡强,诸寅,等.直接稀释/超高效液相色谱-串联质谱法测定河豚鱼与织纹螺中 2 种河豚毒素[J].分析测试学报,2020,39(5):640-645.
- [7] 孙博伦,王旭峰,李来好,等.多壁碳纳米管固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定织纹螺中河豚毒素[J].南方水产科学,2018,14(5):103-108.
- [8] 崔悦,曹冬.免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定烤鱼片中河豚毒素[J].中国卫生检验杂志,2017,27(18):2606-2608.
- [9] 张秀尧,蔡欣欣.亲水液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测尿液和血浆中河豚毒素[J].分析化学,2009,37(12):1829-1833.
- [10] 王冠男,谢丽萍,张荣庆.河豚毒素的分布及动物对它的拮抗作用[J].海洋通报,2007,26(1):107-113.
- [11] 李军,黄莲芝,孙铭英,等.超声-固相萃取高效液相色谱-串联质谱法测定红鳍东方鲀中的河豚毒素[J].食品安全质量检测学报,2015,6(1):60-64.
- [12] 吴佳俊,黄文雯,肖陈贵,等.高效液相色谱-串联质谱法检测河豚毒素的方法研究[J].食品安全质量检测学报,2014,5(11):3529-3536.
- [13] 田良良,叶洪丽,席寅峰,等.养殖河豚中河豚毒素的暴露评估及安全限量值探讨[J].农产品质量与安全,2022,20(4):79-84.
- [14] 陈文,毛素玲,兰真,等.四川首例食用鱼干引起河豚毒素食物中毒的调查[J].预防医学情报杂志,2016,32(2):153-155.
- [15] KATIKOU P,GOKBULUT C,KOSKER A R,et al. An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities[J]. Marine Drugs,2022,20(1):47.
- [16] 林春光,何积源,邓立海,等.38 例急性河豚中毒临床分析[J].右江民族医学院学报,2012,34(1):29-30.
- [17] 王敏,臧奎,尚福泰,等.河豚毒素中毒致心跳呼吸骤停 1 例[J].临床急诊杂志,2014,15(1):54-55.