

河豚毒素的检验

公安部物证鉴定中心(北京 100038) 孙 静 何 毅 胡春华 张继宗

摘 要 通过对食用河豚鱼干致死案例的系统毒物分析, 本文详细介绍了有关体内河豚毒素的固相萃取方法, 利用本方法成功地解决了一起因河豚毒素中毒案件的检验, 从死者胃内容、心血中均检出河豚毒素, 从死者吃剩的干鱼片中检出 $1.4\mu\text{g/g}$ 的河豚毒素。

关键词 河豚鱼 河豚毒素(TTX) 固相萃取

河豚毒素(Tetrodotoxin, 简称为 TTX) 是河豚鱼中所含的有毒物质, 为氨基全氢唑啉化合物, 分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{N}_3$ (分子量为 319.3)。河豚鱼含河豚毒素最多的部位是卵巢, 其次是肝脏、肠、血、肾和皮。如果在食用之前没有正确地除去这种毒素, 则极易发生食后中毒及死亡事件。

河豚毒素属剧毒物, 是毒性最强的非蛋白类神经毒素之一, TTX 对人的致死量为 $6\mu\text{g/kg} \sim 7\mu\text{g/kg}^{[1]}$, TTX 化学性质相当稳定, 日晒、盐腌及一般烹调手段均难以破坏, 中毒后也缺乏有效的解救措施。故而食用盐腌河豚、河豚鱼干均容易引起中毒, 且死亡率高^[2]。TTX 的毒性作用主要是对随意肌(包括呼吸肌)进行麻痹, 它能选择性地与神经和肌肉细胞膜表面的 Na^+ 的通道上的蛋白质结合, 阻断 Na^+ 影响神经肌肉间兴奋性的传导, 使神经肌肉呈麻痹状态。中毒症状主要表现为头晕、头痛、恶心、呕吐、腹泻、知觉麻痹、唇舌及肢端麻木、运动障碍、血压下降、言语不清、呼吸困难, 严重者可因呼吸衰竭而死亡^[3]。

河豚毒素精制品为白色无定形的粉末, 微溶于水, 易溶于酸, 几乎不溶于无水乙醇和其它有机溶剂, 中性或酸性条件下对热稳定, 在碱性条件下易分解生成 2-氨基-8-羟基-6-羟甲基-唑啉, 文献中一般称为 C_9 -碱基^[4]。

TTX 的分析检测方法目前国内比较成熟的是用“小白鼠”做动物实验和用“酶联免疫法”做筛选实验, 这两种实验的阳性结果, 只能表明有“鱼毒”成份存在, 不能确认就是河豚毒素。此外, 国外也曾报道过用液相色谱和气相色谱等方法分析河豚毒素^[5, 6] 国内陆惠民也有过相关报道(中国刑警学院教材)。本文报道的是用固相萃取法结合衍生化手段进行检验河豚毒素。

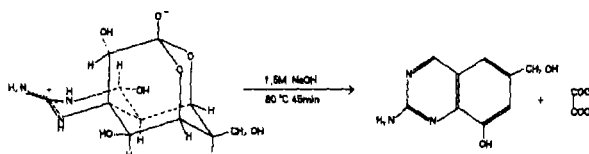
1 标样的制备及 C_9 碱基的制备

1.1 TTX 标样的配制

称取 2mg TTX 用 4ml 0.5% HAC 液溶解, 制得 0.5mg/ml 的 0.5% HAC 的 TTX 标准溶液。

1.2 C_9 碱基液的制备

取出 1ml 浓度为 0.5mg/ml 的 TTX 标液, 加入 1ml 1.5mol/L KOH, 在一定温度 ($80^\circ\text{C} \sim 90^\circ\text{C}$) 下加热 45min , 使 TTX 碱化为 C_9 碱基, 反应完成后将 C_9 碱液调为 $\text{pH}4$, 并用水稀至 5ml , 制得含 TTX 浓度为 0.1mg/ml 的 C_9 碱基标准液 ($\text{pH}4$) (称为 TTX- C_9 碱基液)。



TTX 在碱性条件下转化为 TTX- C_9 碱基

2 液液提取方法

取 1ml 空白水液两份, 在其中一份中添加 $25\mu\text{g}$ 的 TTX- C_9 碱基液, 另一份作为空白水样, 调 $\text{pH}4$ 后, 分别用 $1\text{ml} \times 2$ 正丁醇提取两遍, 合并正丁醇液, 在一定温度的空气流(或氮气流下)吹干, 然后加入 $100\mu\text{l}$ 衍生化试剂 (BSA: 吡啶 1:1), 60°C 下反应 20min , 进样 $1\mu\text{l}$, 供 GC/MS 分析。

3 固相萃取方法

因用正丁醇提取, 浓缩时间相当长, 为此又通过实验建立了固相萃取法。结果表明, 对 C_9 碱基固相萃取法远远优于液液提取法, 其主要优点是: (1) 不需很长的浓缩时间; (2) 浓缩液很干净; (3) 回收率约为液-液提取方法的二倍。

具体过程如下: 取 1ml 空白水液二份, 在其中一份中添加 $25\mu\text{g}$ 的 TTX- C_9 碱基, 另一份作为空白对照样品, 分别调 $\text{pH}4$ 后, 过已活化的 C_{18} 固相柱(活化过程是依次用 5ml 甲醇和 5ml 水洗柱), 控制流出液流速以滴状流出, 然后用 $5\text{ml} \sim 10\text{ml}$ 水洗涤小柱并将柱中残留水份抽干(可将固相柱放在离心机上离心数分钟), 再用 3ml 甲醇来洗脱, 收集洗脱液在 80°C 用 N_2 气流下吹干洗脱液, 加入 $100\mu\text{l}$ 衍生化试剂 (BSA: 吡啶 1:1), 60°C 下反应 20min , 进样 $1\mu\text{l}$, 供 GC/MS 分析。

4 检液的制备

第一步:使 TTX 原体转化为 TTX - C₉ 碱基。

(1)取空白水样 20ml,添加 25 μ g 的 TTX,加冰乙酸 2ml ~ 3ml,调水样 pH 为 2 ~ 3,加热 40min 后,挥至约 5ml,转至试管中,加入 2ml 1.5N KOH,在碱性条件下加热 45min,取下立即用冷水冷却后,再调 pH4。(2)取死者呕吐物水液 20ml,加冰乙酸 2ml ~ 3ml 调为 pH2 ~ 3,以下操作同(1)。(3)取死者胃内容液 20ml,以下操作同(1)。(4)取死者吃剩的干鱼片 2g,用 20ml 0.5% HAC 液温浸 40min,过滤后挥至约 5ml,转至试管中,以下操作同(1)。

第二步:过固相柱富集净化。

将上述制备 pH4 的各检液,分别用 C₁₈ 固相柱富集净化,以下操作同(1),然后衍生化。

5 GC/NPD、GC/MS 分析条件

5.1 GC/NPD 条件

仪器:HP5890/NPD

色谱柱:HP - 1 (30m \times 0.32mm \times 0.25 μ m)

进样口/检测器温:280 $^{\circ}$ C

柱温:200 $^{\circ}$ C (1min) 10 $^{\circ}$ C/min 280 $^{\circ}$ C (5min)

N₂:1ml/min

分流比:10:1

GC/NPD 色谱图见图 1。

5.2 GC/MS 条件

仪器:岛津 QP - 5000GC/MS/EI

色谱柱:HP - 5MS (30m \times 0.32mm \times 0.25 μ m)

进样/接口温:280 $^{\circ}$ C

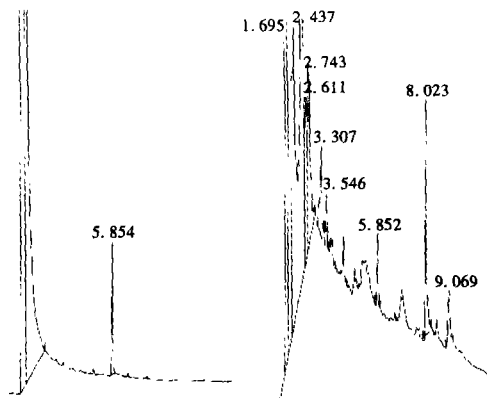
柱温:160 $^{\circ}$ C (1min) 20 $^{\circ}$ C/min 280 $^{\circ}$ C (13min)

N₂:1ml/min

从死者吃剩的鱼片中检出 TTX - C₉ 碱基的质谱图见图 2。

参考文献

1. 乔红. 河豚毒素研究概况. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(1): 50
2. 陈龙, 等. 河豚中毒死亡的法医学鉴定. 法医学杂志, 1998, (3): 15
3. 杨平, 等. 海洋生物毒素研究现状. 国外医学卫生学分册, 1995, 22(2): 112
4. Kazuyuki Suenage. Verification of Tetrodotoxin by Instrumental



1-1. 纯品 TTX - C₉ 碱基 - TMS

1-2. 干鱼片中提取的 TTX - C₉ 碱基 - TMS

图 1 TTX - C₉ 碱基 - TMS 保留时间的 GC/NPD 色谱图

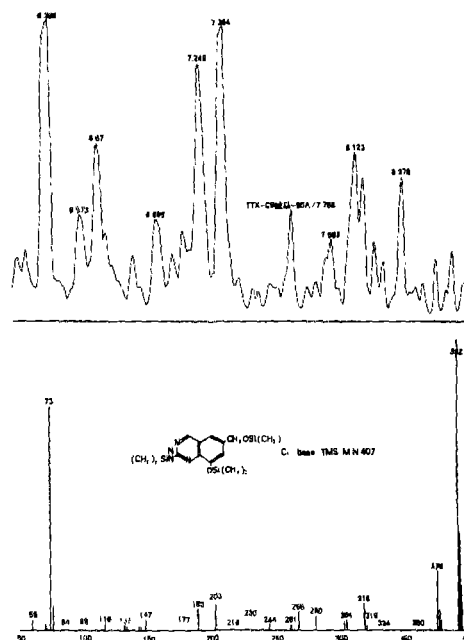


图 2 干鱼片中提取的 TTX - C₉ 碱基 - TMS 总离子流图和干鱼片中提取的 TTX - C₉ 碱基 - TMS 的质谱图

Analysis. Jpn. J. Legal Med., 1978, 32: 97-111

5. Fumio Moriya, etc. The use of mass fragmentography for the detection of tetrodotoxin in human body fluids. Jpn. J. Legal Med, 1992, 46 (2): 117-120

6. J. Ikebuchi, etc. Thin - Layer chromatography with flame ionization detection for the determination of tetrodotoxin in biological fluids. J. of chromatography. 1998, 432: 401-406

编辑: 周 静 收稿日期: 1999 - 11 - 29

DETECTION OF TETRODOTOXIN BY GC AND GC/MS

Sun Jing, He yi, Hu Chunhua, et al.

Institute of Forensic science, Ministry of public security. Beijing 100038

Abstract: This paper described the method for extracting tetrodotoxin from human stomach content and heart blood samples. we havesolved a case with this methdsuccess fully.

Key words: tetrodotoxin, globe fish, solid phase extraction