

[文章编号] 1007-7405(2015)04-0255-05

贝类产品中软骨藻酸的 HPLC 检测方法

高治昊, 林郑忠, 陈晓梅, 黄志勇

(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 建立了高效液相色谱测定贝类产品中软骨藻酸的检测方法, 具体过程为: 样品先经甲醇浸提后, 再用甲醇-水($V(\text{甲醇}): V(\text{水}) = 1: 1$)提取2次, 合并提取液后用 Zorbax SB300-C18 柱($2.1\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)进行分离, 以乙腈-0.2%磷酸水溶液(含0.1%三乙胺)($V(\text{乙腈}): V(\text{磷酸水溶液}) = 12: 88$)为流动相于室温下等度洗脱, 流速为 0.25 mL/min , 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$, 检测波长为 242 nm . 结果表明, 在建立的提取方法和色谱条件下, 软骨藻酸从复杂的样品基体中被分离出来, 在 $0.02 \sim 1.0\text{ mg/L}$ 质量浓度范围内具有良好的线性关系($r > 0.999$), 样品的平均加标回收率为 108%, 测量方法的 RSD 为 3.5% ($n = 6$), 检出限为 23.5 ng/g . 所建立的检测方法可适用于对贝类产品中软骨藻酸的快速检测.

[关键词] 软骨藻酸; 高效液相色谱; 贝类; 快速检测

[中图分类号] TS 207.3

[文献标志码] A

Rapid Detection of Domoic Acid in Shellfishes by HPLC

GAO Zhi-hao, LIN Zheng-zhong, CHEN Xiao-mei, HUANG Zhi-yong

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A rapid detection method by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed to determine the concentrations of domoic acid in different species of shellfish. After extraction by methanol and methanol-water ($1: 1$, V/V), the sample was separated using a Zorbax SB300-C18 chromatographic column ($2.1\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), and was eluted with acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (containing 0.5% triethylamine) ($12: 88$, V/V) at room temperature. The flow rate was set as 0.25 mL/min . $20\text{ }\mu\text{L}$ of sample was individually injected, and the detection wavelength was 242 nm . The results showed that domoic acid can be well separated from the sample matrix within 8 min with a linear range of $0.02 \sim 1.0\text{ mg/L}$ ($r > 0.999$). The average recovery as tested by adding standards was 108%, and the RSD was 3.5% ($n = 6$). The detection limit estimated with three folds of standard deviations was 23.5 ng/g . In conclusion, the established method can be used to detect trace domoic acid in shellfish samples rapidly without further purification treatment by SPE columns.

Key words: domoic acid; HPLC; shellfish; rapid detection

0 引言

软骨藻酸(Domoic Acid, DA)是一种由拟菱形藻所产生的天然氨基酸型神经毒素^[1], 其化学结

[收稿日期] 2014-10-29

[修回日期] 2014-11-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(21305050); 福建省科技计划重点项目(2012Y0052, 2014Y0045); 厦门市科技计划项目(3502Z20143018); 集美大学创新团队基金资助项目(2010A007)

[作者简介] 高治昊(1990—), 男, 硕士生, 主要从事食品安全检测技术研究. 通信作者: 黄志勇(1963—), 男, 教授, 从事食品安全分析研究, E-mail: zhyhuang@jmu.edu.cn.

构与红藻氨酸 (Kainic Acid, KA) 和谷氨酸相似^[2]. 当赤潮发生时易产生 DA 毒素, 通过贝类滤食性富集和食物链的传递危害人类健康^[3-4]. 例如, 1987 年加拿大发生了因人类食用受 DA 污染的蓝贻贝而导致 105 人急性中毒并造成 3 人死亡的事件^[3]. 为此, 美国食品药品监督管理局将 DA 列为 4 种主要海洋毒素之一, 加拿大首先制定了 DA 的安全限量为 20 $\mu\text{g/g}$, 欧洲、日本也相继将该种毒素列为常规检测项目^[4-5], 但我国尚未制定 DA 的安全限量标准. 近年来我国赤潮发生规模与频率呈上升趋势, 有毒藻类及生物毒素的危害不断增加^[6]. 因此, 研究贝类产品中软骨藻酸的快速检测方法有着十分重要的意义.

目前软骨藻酸的检测方法主要有生物分析法^[7-8]、免疫分析法^[9-10]、毛细管电泳法^[11-12]和高效液相色谱法^[13-15]等. 生物分析法是生物毒素通用的检测方法, 主要是对小白鼠进行毒素腹腔注射, 观察其存活情况以确定毒性大小, 一般用半致死剂量来表示. 但该法检测时间长, 无法确定毒素种类, 且因不同小鼠的品系、批次等差异造成检测灵敏度波动较大^[16]. 免疫分析法是利用抗原-抗体反应来确定毒素的类型及含量, 包括酶联免疫分析法、放射免疫分析法和胶体金免疫分析法^[17]等, 虽具有快速、准确等优点, 但目前对高特异性抗体的制备仍较困难, 易出现假阳性结果^[18]. 毛细管电泳和高效液相色谱法操作简便、灵敏度高, 可进行定性和定量分析, 是目前 DA 检测中应用最为广泛的分析手段, 已被许多国家列为标准的检测方法^[19]. 但这两种检测方法通常需要对样品提取液进行复杂的萃取和净化处理, 如使用 SAX 柱和 SCX 柱净化以排除样品基体中色氨酸等杂质对 DA 检测的干扰, 不仅操作繁琐且技术难度高^[14-15]. 鉴于此, 本文拟对提取方法与色谱条件进行改进和优化, 使样品提取液能够直接进样分析, 为贝类产品中 DA 的快速检测提供实验基础.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

安捷伦 1260 高效液相色谱仪 (配备 DAD 检测器), 美国安捷伦公司; FS-1 电动匀浆机, 金坛市富华仪器有限公司; 5417R 小型高速离心机, 德国艾本德公司; KQ-500 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 滤膜, 天津津腾.

软骨藻酸标准品 (纯度 > 90%), 加拿大 Sigma 公司; 甲醇 (色谱纯), 美国 Sigma 公司; 乙腈 (色谱纯), 美国 Tedia 公司; 三乙胺 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸 (分析纯), 汕头市西陇化工厂; 花蛤、海蛰均购于厦门集美区农贸市场.

1.2 标准溶液的配制

软骨藻酸标准品用超纯水溶解配制标准储备液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用. 临用前用超纯水稀释配制成 0.02 ~ 1.0 mg/L 的系列标准工作液.

1.3 样品处理

取 50 g 新鲜贝肉, 匀浆 3 min, 从中取出 0.5 g 匀浆液, 放入 2.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 纯甲醇混匀后静置 30 min, 随后 12000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至 5 mL 离心管中. 残渣分别用 0.5 mL 体积分数 50% 甲醇水溶液超声提取 2 次, 每次 10 min, 经离心后, 合并所有上清液并定容至 3 mL. 上清液过 0.45 μm 滤膜后进样分析.

1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB300-C18 柱 (2.1 $\text{mm} \times 250 \text{ mm}$, 5 μm), 美国安捷伦公司; 柱温为室温; 流速 0.25 mL/min ; 进样量 20 μL ; 检测波长 242 nm.

为考察不同流动相组成对软骨藻酸分离的影响, 实验设计了以下 3 种流动性体系: 流动相 A 为乙腈-0.1% 三氟乙酸水溶液 ($V(\text{乙腈}):V(\text{三氟乙酸})=13:87$); 流动相 B 为乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (含体积分数 0.2% 三乙胺) ($V(\text{乙腈}):V(\text{磷酸})=12:88$); 流动相 C 为乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (含体积分数 0.1% 三乙胺) ($V(\text{乙腈}):V(\text{磷酸})=12:88$). 其中, 0.1% 三氟乙酸水溶液和 0.2% 磷酸

水溶液均为体积分数.

2 结果与讨论

2.1 提取条件的优化

与其他的贝类毒素(如麻痹性贝毒素)提取法相似,传统的DA提取一般在酸性水溶液中进行^[13],但在实际操作中发现,DA在酸性介质中久置易分解^[20],严重影响DA的准确定量.此外,目前对贝类DA的提取通常还采用甲醇-水($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$)进行一次性浸提^[14],而后粗提液经SAX柱和SCX柱净化处理,再浓缩后用HPLC检测,但由于需要过柱,操作步骤繁琐、耗时,且技术难度高,不利于DA的快速检测.而如果仅采用甲醇-水($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$)提取后直接进样,则由于样品提取液基体浓度高,且提取不完全,易造成色谱柱压力不稳定、回收率低等问题.

本实验首先对0.5 g样品匀浆液用1 mL甲醇静置提取30 min,离心后残渣再用0.5 mL甲醇-水($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$)重复提取2次,合并所有提取液即可直接进样检测.由于提取液不需使用固相萃取柱进行净化和浓缩处理,因而大大缩短了样品前处理时间,而且样品在检测时色谱柱压力稳定、回收率高,为实现DA的快速检测奠定了基础.

2.2 色谱条件的选择

由于色氨酸与DA的分子结构有一定的相似性,在HPLC检测中,样品中共存的色氨酸对DA将产生严重干扰.如图1B所示,采用Quilliam等^[13]报道的流动相体系即乙腈-0.1%三氟乙酸($\text{pH}=2.16$),样品中软骨藻酸的HPLC组分峰(即峰2)受基体的干扰严重.这是由于提取液未经固相萃取柱净化,样品中色氨酸等杂质对软骨藻酸的色谱峰产生了干扰^[21].因此,本实验采用乙腈-磷酸洗脱体系^[22],并发现通过添加三乙胺可以使DA与色氨酸的色谱峰分开,从图1C和图1D可以看出,采用乙腈-0.2%磷酸流动相体系,在流动相中添加适量的三乙胺均可以使软骨藻酸与基体中色氨酸达到基线分离.但当流动相中三乙胺的添加量达到水相体积的0.2%时(图1C),虽然软骨藻酸与色氨酸的分离度达到了4.0,但软骨藻酸峰形较差,拖尾严重.而当流动相中三乙胺的体积分数为0.1%时(图1D),软骨藻酸峰形较好,与色氨酸的分离度也达到3.4,完全满足检测的要求.因此,本实验采用乙腈-0.2%磷酸(含体积分数为0.1%三乙胺)($V(\text{乙腈}):V(\text{磷酸})=12:88$)作为软骨藻酸分离的流动相体系.

2.3 线性关系

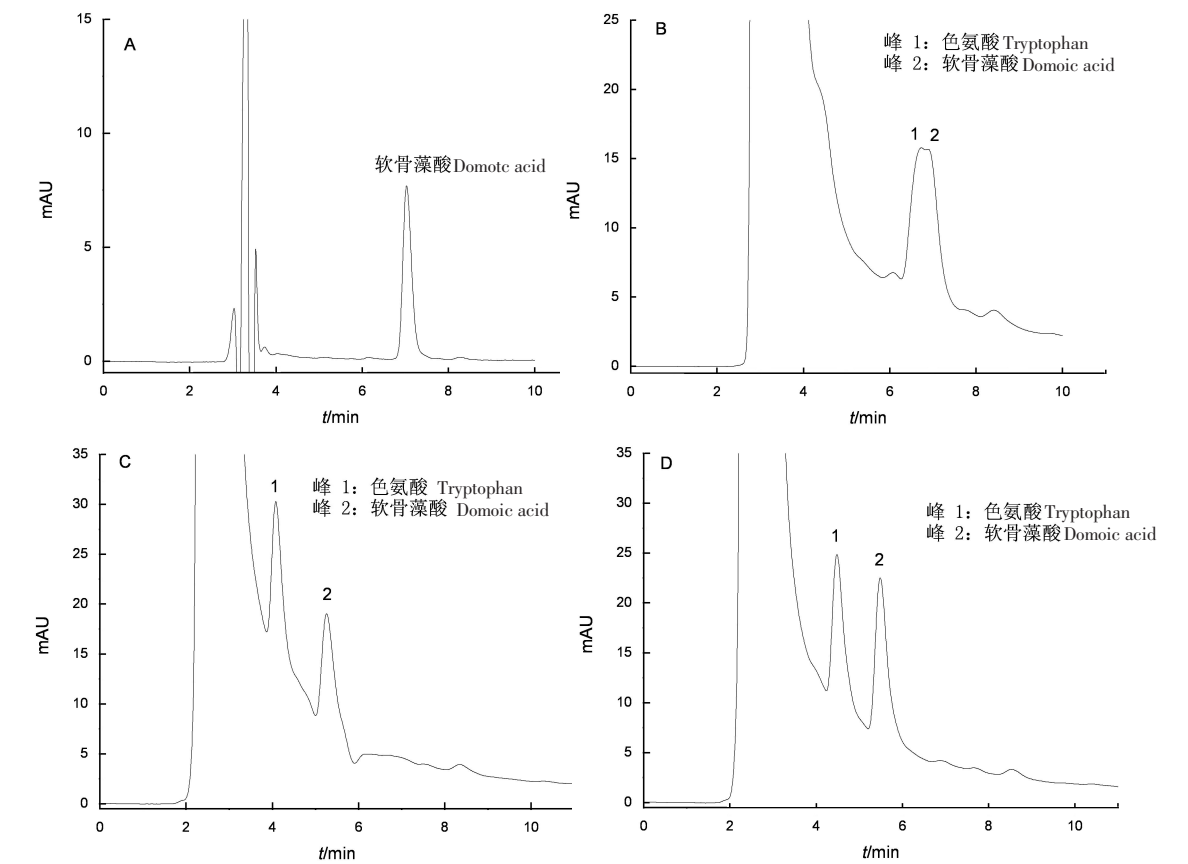
在优化的色谱条件下,分别测定软骨藻酸系列标准工作液,以相应的色谱峰面积(y)对其质量浓度(x , mg/L)进行线性回归.结果表明,软骨藻酸在质量浓度为0.02~1.0 mg/L范围内线性关系良好($r>0.999$),线性方程为 $y=246.65x-0.3521$.

2.4 检出限

以0.3 $\mu\text{g/g}$ 软骨藻酸标准溶液,在花蛤和海蛰的实际样品中进行9次加标平行试验,用峰面积的3倍标准偏差进行估算,测得方法的检出限为23.5 ng/g,不仅远远低于国标GB/T 5009.198—2003^[23]中软骨藻酸的检出限(1.0 $\mu\text{g/g}$),而且与同类研究中软骨藻酸的检出限34 ng/g^[14]、63 ng/g^[11]、200 ng/g^[22]相比,本方法具有更低的检出限水平,说明本方法具有很高的检测灵敏度.

2.5 精密度与回收率

实验选取花蛤与海蛰作为实际测量样品,在测定其本底值为未检出的基础上,分别对其进行了3个水平的加标回收率试验,结果如表1所示.其中,花蛤的回收率为93.5%~99.8%,海蛰的加标回收率为116%~120%.以加标水平为0.3 $\mu\text{g/g}$ 的实际样品进行6次平行试验,其相对标准偏差(RSD)为3.5%,说明方法的精密度良好.



说明:A、B—乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液($V(\text{乙腈}):V(\text{三氟乙酸})=13:87$);C—乙腈-0.2%磷酸水溶液(含0.2%三乙胺)($V(\text{乙腈}):V(\text{磷酸水溶液})=12:88$);D—乙腈-0.2%磷酸水溶液(含0.1%三乙胺)($V(\text{乙腈}):V(\text{磷酸水溶液})=12:88$).
Notes:A and B—acetonitrile–water($V(\text{acetonitrile}):V(\text{TFA})=13:87$)containing 0.1% TFA;C—acetonitrile–water($V(\text{acetonitrile}):V(\text{phosphoric acid})=12:88$) containing 0.2% phosphoric acid and triethylamine;D—acetonitrile–water ($V(\text{acetonitrile}):(\text{phosphoric acid})=12:88$)containing 0.2% phosphoric acid and 0.1% triethylamine.

图 1 贝类样品中软骨藻酸在不同流动相体系中的分离色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of DA in shellfish samples with different mobile phases

表 1 贝类中软骨藻酸的加标回收率试验

Tab. 1 Recovery tests of domoic acid by adding standards in *Venerupis philippinarum* and razor clam ($n = 3$)

样品 Samples	加标水平 Adding standards/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			测得值 Measuring value/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			平均加标回收率 Average recovery by adding standards/%
	A	B	C	A	B	C	
花蛤 <i>Venerupis philippinarum</i>	0.3	1.0	1.6	0.27 ± 0.03	0.97 ± 0.01	1.60 ± 0.02	96.5
海蛸 Razor clam	0.3	1.0	1.6	0.33 ± 0.02	1.21 ± 0.05	1.87 ± 0.03	119.0

3 结论

本文建立了贝类中软骨藻酸的高效液相色谱检测方法，通过对提取方法的改进及色谱条件的优化，有效解决了样品中复杂基质对软骨藻酸检测的影响，通过甲醇浸提再用 0.5 mL 甲醇-水 ($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$) 进行重复提取，提取液可直接进样检测；通过对流动相体系乙腈-0.2%磷酸(含体积分数为0.1%三乙胺) ($V(\text{乙腈}):V(\text{磷酸水溶液})=12:88$)的优化，解决了基体中色氨酸对软骨藻酸检测干扰的问题。样品的平均加标回收率为 108%，检出限为 23.5 ng/g，完全可以满足贝类产品软骨藻酸的检测要求。

[参考文献]

- [1] LEFEBVRE K A, POWELL C L, BUSMAN M, et al. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event [J]. *Natural Toxins*, 1999, 7(3): 85-92.
- [2] 王萍亚, 赵华, 陈皓, 等. 水产品中赤潮毒素残留的风险评价 [J]. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 2008, 27(2): 144-150.
- [3] BATES S S, BIRD C J, FREITAS A S W, et al. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1989, 46(7): 1203-1215.
- [4] 吴多加, 李凤琴. 软骨藻酸与人类健康关系研究进展 [J]. *卫生研究*, 2005, 34(3): 378-381.
- [5] LAWRENCE J F, LAU B P Y, CLEROUX C, et al. Comparison of UV absorption and electrospray mass spectrometry for the high-performance liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish and biological samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 659(1): 119-126.
- [6] 张青田. 中国海域赤潮发生趋势的年际变化 [J]. *中国环境监测*, 2013, 29(5): 98-102.
- [7] TASKER R A R, CONNELI B J, STRAIN S M. Pharmacology of systemically administered domoic acid in mice [J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1991, 69(3): 378-382.
- [8] GRIMMELT B, NIJJAR M S, BROWN J, et al. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel and toxicity in mice [J]. *Toxicon*, 1990, 28(5): 501-508.
- [9] SMITH D S, KITTS D D. Enzyme immunoassay for the determination of domoic acid in mussel extracts [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(2): 367-371.
- [10] MICHELI L, RADOI A, GUARRINA R, et al. Disposable immunosensor for the determination of domoic acid in shellfish [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(2): 190-196.
- [11] 李大志, 祝文君, 宋文斌, 等. 记忆缺失性贝类毒素的主要成分: 软骨藻酸的毛细管电泳分析 [J]. *色谱*, 2002, 20(2): 125-128.
- [12] ZHAO J Y, THIBAUT P, QUILLIAM M A. Analysis of domoic acid isomers in seafood by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(2): 268-276.
- [13] QUILLIAM M A, SIM P G, MCCULLOCH A W, et al. High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1989, 36(3): 139-154.
- [14] 卫锋, 程方. 高效液相色谱法测定贝类中的软骨藻酸 [J]. *色谱*, 2001, 19(3): 248-250.
- [15] 陈西平, 陈小东. HPLC 方法检测水及水生动物中软骨藻酸 [J]. *卫生研究*, 2001, 30(4): 247-248.
- [16] 马嵩, 彭福, 张天峰, 等. 天然水域中贝毒素及检测方法综述 [J]. *生命科学仪器*, 2014, 12: 18-23.
- [17] 高利利, 程金平, 刘元嫒, 等. 软骨藻酸胶体金免疫层析检测试纸条的研制 [J]. *环境科学*, 2011, 32(8): 2492-2496.
- [18] 郭皓. 免疫方法在藻毒素及贝毒素检测中的应用 [J]. *卫生研究*, 1999, 28(2): 122-124.
- [19] EUROPEAN UNION. DIN EN 14176—2004 Foodstuffs-determination of domoic acid in mussels by HPLC [S].
- [20] IVERSON F, TRUELOVE J, TRYPHONAS L, et al. The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates [J]. *Canada Diseases Weekly Report*, 1990, 16: 8-15.
- [21] LÓPEZ-RIVERA A, SUÁREZISLA B A, EILERS P P, et al. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of domoic acid and analogues in shellfish: effect of pH [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381(8): 1540-1545.
- [22] 周秀锦, 周向阳, 郑斌, 等. HPLC 法快速检测记忆缺失性贝毒软骨藻酸 [J]. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 2012, 31(3): 211-214.
- [23] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.198—2003 贝类 记忆丧失性贝类毒素软骨藻酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.