

南海海域软骨藻酸 (DA) 贝类毒素的 HPLC 方法检测

吉薇, 郑洁莹, 曾雪萍, 蓝玉雪, 刘亚, 吉宏武, 卢虹玉

(广东海洋大学水产品深加工广东普通高校重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 采用高效液相色谱法测定南海海域多种水产品中软骨藻酸 (DA) 的含量。样品粗提液通过 LC-SAX 强阴离子柱固相萃取净化, 在乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液 (体积比为 19:81) 流动体系下进行定性分析, 以外标法进行定量。结果表明, DA 在 1 mg/L~25.0 mg/L 范围内有良好的线性关系, $R=1.0$, 平均回收率为 95.3%; 11 批次样品中有 9 批次被检出有 DA 累积, 扇贝和钝齿短桨蟹中的 DA 累积较高, 分别为 10.113 $\mu\text{g/g}$ 和 18.202 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 软骨藻酸; 高效液相色谱; 固相萃取

文章编号: 1673-9078(2011)1-120-122

HPLC Analysis of Domoic Acid Poisoning in South China Sea

JI Wei; ZHENG Jie-yin; ZENG Xue-ping; LAN Yu-xue; JI Hong-wu; LU Hong-yu

(Key Laboratory of Aquatic Product Advanced Processing of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The contents of domoic acid (DA) poisoning in various aquatic products from South China Sea were detected by HPLC. The samples were firstly purified with LC-SAX (strong anion exchange)-SPE (solid phase extraction) and eluted with the mobile phase of acetonitrile-0.1% trifluoroacetate acid (19:81) using external standard method. A good linear range was found within 1-25.0 mg/L ($r=1.0$). The average recovery was 95.3%. And DA accumulation was detected in nine of the eleven samples. Higher DA accumulation was found in *Chlamys farreri* and *Thalamita crenata*, being of 10.113 $\mu\text{g/g}$ and 18.202 $\mu\text{g/g}$ respectively.

Key words: domoic acid (DA); HPLC; solid phase extraction (SPE)

记忆缺失性贝类毒素 (amnesic shellfish poisoning, 简称 ASP) 的主要成分-软骨藻酸 (Domoic acid, DA) 是一种具有生理活性的氨基酸类物质^[1]。经食物链富集后, 使食用水产品内含有较高浓度的软骨藻酸, 最终引起人类中毒, 中毒症状包括胃肠道及神经系统症状, 会出现腹部痉挛、呕吐、失去方向感和记忆等现象。我国的海洋资源和淡水资源都非常丰富, 水产品亦越来越广泛地进入广大人民群众的生活。但由于水污染不断加剧, 赤潮频繁发生, 有可能伴随各种毒素的污染。为了了解南海海域水产品中软骨藻酸的污染情况, 保护人体健康, 有必要开展软骨藻酸污染状况的研究。

目前为止, 发展了多种软骨藻酸测定方法, 主要包括小白鼠生物分析法^[4-5], ELISA 免疫检测法^[6-7], 高效液相色谱法 (HPLC)^[8-11]、毛细管电泳法^[12-13]、质谱检测法等。本研究采用高效液相色谱法建立了新鲜水产品中软骨藻酸定量又定性的测定方法, 对提高

收稿日期: 2010-09-07

作者简介: 吉薇 (1989-), 女, 本科在读, 专业: 食品质量与安全

通讯作者: 卢虹玉, 博士, 研究方向: 海洋活性物质研究与开发

我国水产品质量安全检测具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

LC-20AD 型高效液相色谱仪配备 SPD-20A 紫外检测器 (日本 SHIMADZU 公司); HPLC 色谱柱 COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (日本 Nacalai Tesque 公司); HR1727 型搅拌机 (珠海飞利浦家用电器有限公司); QL-861 型旋涡混合器; SB-5200 型超声波清洗器 (上海新芝生物技术研究); CR22G2 型高速冷冻离心机 (HITACHI 公司); EYELA CVE-3100 型离心浓缩机 (托普仪器有限公司); LC-SAX 柱 (Supelco, 美国); 贝类毒素软骨藻酸 (北京伊普瑞斯科技有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 样品处理和供试液的准备

样品取自南海海域 (部分样品通过市场购买, 并向卖主了解原产地)。样品采集后, 清洗后立即在实验室对样品进行预处理或将其冷冻保存。样品开壳取出沥水 5 min, 匀浆。处理方法参照文献^[9], 简述如下: 取 4.0 g 匀浆贝组织, 加入 16 mL 的甲醇/水 (1:1, V/V),

经涡旋振荡充分混合后(约 5 min), 超声提取 10 min, 4500 r/min 离心 15 min, 取 1/4 体积上清移入依次经甲醇、水、甲醇/水(1:1, V/V)活化的 LC-SAX 柱上, 待液体流出后, 依次用 5 mL 稀释液(乙腈 V: 水 V=1: 4)、0.5 mL 柠檬酸洗脱液(40.4 g 柠檬酸和 14.0 g 柠檬酸三铵溶解于 400 mL 水中, 加入 50 mL 乙腈, 定容至 500 mL, pH=3.2)以 1 滴/秒的流出速度淋洗柱子, 弃去液体, 再用 2 mL 柠檬酸洗脱液将吸附在柱上的 DA 洗脱下来并收集, 定容至 2 mL, 0.22 μm 膜过滤, 作为 HPLC-UV 分析液, 每个样品重复 3 次。

1.3 色谱条件

色谱柱: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II; 进样量: 10 μL; 检测波长: 242nm; 柱温: 常温。比较乙腈—水系统(含 0.1%的三氟乙酸)和甲醇—水系统(含 0.1%的三氟乙酸)对 DA 的分离效果及峰形影响情况, 两种流动相系统的配比分别设置为 13:87、16:84、19:81、22:78、25:75、27:73、30:70; 比较不同流速(0.6、0.8、1.0mL/min)对检测结果的影响。检测样品所用条件根据实际检测中所得到的最佳条件来确定。

1.4 标准曲线制定

称取固体软骨藻酸 0.55 mg 溶解于稀释液中, 配成 110 mg/L 的 DA 储备液, 再配成 55 mg/L 的标准使用液, 将此溶液稀释到原来的 1/55、3/55、7/55、9/55、11/55、13/55、15/55、19/55、21/55、23/55、25/55, 配制成一系列不同浓度标准溶液进样测定, 绘制标准曲线。最低检出限的测定参照文献的方法进行^[7]。

1.5 精密度试验和加样回收率

精密吸取同一标准品溶液重复进样 6 次, 每次 10 μL, 测定峰面积, 计算 RSD。取已知 DA 含量的贝类样品 3 份, 各 1 g, 分别加入一定量的 DA 标准溶液, 按上述试样处理方法制备, 进行测定, 计算回收率。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

通过比较不同的流动相系统, 结果表明, 以乙腈-水(含 0.1%的三氟乙酸)和甲醇-水(含 0.1%的三氟乙酸)作为流动相体系, 前者效果较好, 分离后峰形尖, 对称性好, 响应值高, 出峰时间理想, 因此选择乙腈-水(含 0.1%的三氟乙酸)作为流动相比较理想(图 1)。通过比较不同配比的乙腈-水(含 0.1%的三氟乙酸)流动体系, 最终确定乙腈-水(含 0.1%的三氟乙酸)配比为 19: 81 为本方法的流动相, 与陈西平等研究中所采用的流动相体系较为一致^[9]。

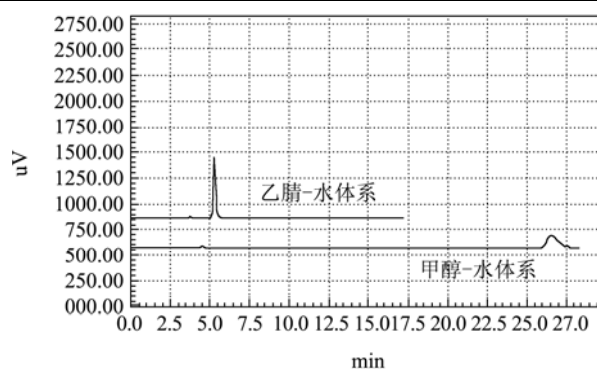


图 1 两种流动体系下 DA 标准的色谱峰形比较

Fig.1 Comparison of the peak shape of DA standard in different mobile phase systems

2.2 线性关系与检出限

在上述方法所确定的实验条件下, 以 DA 的浓度 Y (mg/L) 为横坐标, 以其峰面积 X 为纵坐标绘制标准曲线(图 2), 得回归方程 $Y=1E-05X+0.0425$, $R^2=1$, 按照 1.2 节的样品处理步骤, 进样量为 10 μL 时, 样品中 DA 的方法检出限为 55ng/g, 表明本方法检测结果具有良好的线性关系和较低的检出限。

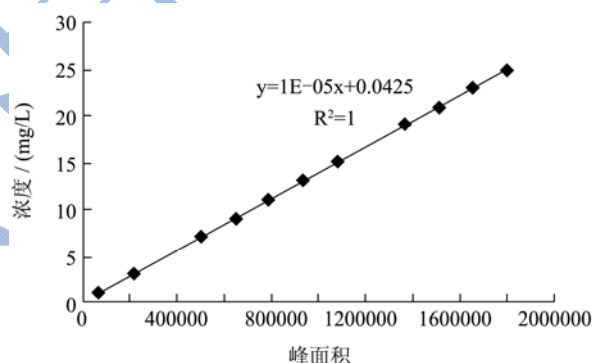


图 2 DA 浓度与峰面积的线性关系图

Fig.2 Linear relationship between DA concentration and peak area

2.3 回收率与精密度试验

表 1 样品中 DA 加样回收率和精密度结果

Table 1 Results of the recovery of DA and the measurement precision

样品 DA 含量(μg/g)	添加量 (μg/g)	测定值(μg/g)	回收率 /%	平均 值/%	RSD /%
6.135	2.2	8.296±0.057	98.2	95.3	0.2
6.011	5.5	11.225±0.056	94.8		
5.988	8.8	14.153±0.1	92.8		

本试验共进行 3 个添加水平, 添加量分别为 2.20 μg/g、5.5 μg/g、8.8 μg/g, 回收率为 92.8%~98.2%, 平均回收率为 95.3% (表 1)。精密度试验结果表明, 测得标准液的峰面积 RSD 为 0.2%, 表明进样精密度良

好。

2.4 样品分析

2.4.1 样品净化

SPE 技术是目前纯化样品最常用的方法之一。根据 DA 的结构和理化特性,使用 LC-SAX 阴离子交换柱可以很好的将 DA 与样品中杂质分离,大大提高了检测灵敏度。本研究中,样品经过净化处理后,在上述色谱条件下,样品中的 DA 与配制洗脱液时加入的柠檬酸成分可以完全分离,不对样品峰分离产生干扰,并有一个较低检测限(图 3)。Lawrence 等^[14]以前的研究表明,未经净化前处理的粗提取样品实际最低检测限约为 1 μg/g,而且检测过程存在干扰,比如由于样品中存在的色氨酸及其类似物质会造成检测假阳性的结果。Quilliam 等^[7]通过强阴离子固相萃取方法对样品进行净化后,可以消除干扰,最低检测限为 55 ng/g,而且样品中 DA 更加稳定,具有更高的回收率。

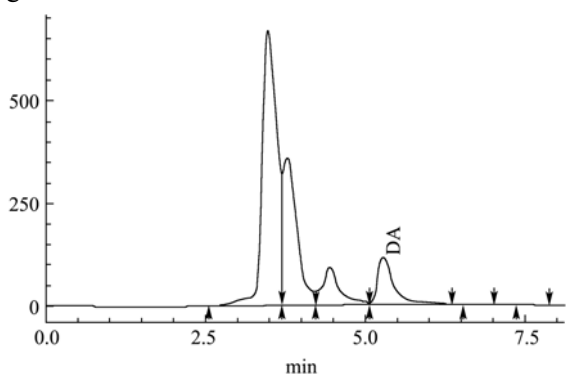


图 3 SPE 净化后样品的色图谱

Fig.3 HPLC Chromatogram of sample purified with SPE

2.4.2 样品测定

表 2 软骨藻酸含量分析结果

Table 2 The results of DA content detected in samples

贝类名称	采样地点	软骨藻酸浓度/(μg/g)
文蛤	遂溪	未检出
织纹螺	海南	0.464
波纹巴非蛤	东海岛	未检出
尖紫蛤	北海	0.312
栉孔扇贝 1	海康	6.011
栉孔扇贝 2	海康	10.113
日月贝	东海岛	0.571
翡翠贻贝	东海岛	0.686
钝齿短桨蟹	徐闻	18.202
平分大额蟹	徐闻	0.498
火红皱皮蟹	徐闻	0.315

对南海海域的贝类、蟹类等部分水产品按上述方法进行了 DA 累积的分析,结果表明,织纹螺、尖紫

蛤、栉孔扇贝、日月贝、翡翠贻贝和 3 种蟹中均检出 DA 的存在,其中栉孔扇贝和钝齿短桨蟹中的 DA 累积较高,分别为 10.113 μg/g 和 18.202 μg/g。我国目前还没有关于水产品中 DA 含量的统一安全卫生标准,加拿大规定贝类中 DA 的含量不得大于 20 μg/g。虽然我们检测的样品中 DA 均未超过此限,但从近年来对水产品中 DA 检测的报道结果来看,海水污染的日益严重导致水产品中毒素累积程度提高。宋利利等^[15]从 34 批次样品中检出一个 DA 残留,陈西平等^[11]在 14 批次样品中检出 7 个样品含有 DA,最高含量为 8.14 μg/g。因此,应加强对水产品中软骨藻酸的监测,进一步了解记忆缺失性贝类毒素对人体的毒害作用,为我国的统一安全卫生标准的制定提供参考。

3 结论

高效液相色谱法结合固相萃取净化测定南海海域多种水产品中 DA 的含量。首先优化了 DA 的 HPLC 检测条件:流动体系乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液的最佳体积比为 19:81,流速为 0.8 mL/min 时效果最好;建立了 DA 检测的标准曲线,DA 在 1 mg/L~25.0 mg/L 范围内有良好的线性关系, R=1.0,平均回收率为 95.3%;样品粗提液通过 LC-SAX 强阴离子柱固相萃取净化后,有一个较低的检出限,为 55ng/g;通过对 11 批次样品的检测,其中 9 批次检出有 DA 累积,扇贝和钝齿短桨蟹中的 DA 累积较高,分别为 10.113 μg/g 和 18.202 μg/g。

此法灵敏度高,特异性好,方便快捷,可以应用于定量检测 DA。

参考文献

- [1] Wright J L C, Boyd R K, De Freitas A S W, et al. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island [J]. Can J Chem, 1989, 67: 481-490
- [2] 董雪,钟青萍,黄安诚,等.河豚毒素直接竞争ELISA检测方法的研究[J].现代食品科技,2009,25(8):977-981
- [3] 陈嘉文,秦小明,林华娟,等.波纹巴非蛤净化中试研究[J].现代食品科技,2009,25(7):764-766
- [4] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Virginia, USA: Arlington, 1990
- [5] Tasker R A R, Connell B J, Strain S M. Pharmacology of systematically administered domoic acid in mice [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1991, 69(3): 378-382
- [6] Smith D S, Kitts D D. Enzyme Immunoassay for the

- determination of domoic acid in mussel extracts [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 367-371
- [7] Garthwaite I, Ross K M, Miles C O, et al. Polyclonal antibodies to domoic acid and their use in immunoassays for domoic acid in seawater and shellfish [J]. *Nat Toxins*, 1998, 6: 93-104
- [8] Hummert C, Reichelt M, Luckas B. Automatic HPLC-UV determination of domoic acid in mussels and algae [J]. *Chromatographia*, 1997, 45: 284-288
- [9] Quilliam M A, Xie M, Hardstaff W R. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted food [J]. *J AOAC Int*, 1995, 78(2): 543-554
- [10] James K J, Gillman M, Lehane M, et al. New fluorimetric method of liquid chromatography for the determination of the neurotoxin domoic acid in sea food and marine phytoplankton [J]. *J Chromatogr*, 2000, 871: 1-6
- [11] 陈西平,王成斌,胡俊明,等.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
- [12] 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
- [13] Nguyen A L, Luong J H and Masson C. Capillary electrophoresis for detection and quantitation of domoic acid in mussels [J]. *Anal Lett*, 1990, 23, 1621-1634
- [14] Lawrence J F, Charbonneau C F, Ménard C, et al. Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of official analytical chemists [J]. *J Chromatogr*, 1989, 462: 349-356
- [15] 宋利利,张海琪,侯镜德,等.液相色谱-串联质谱法测定贝类毒素软骨藻酸的残留[J].*水产学报*,2008,32:950-95