

腹泻性贝毒素—软海绵酸的 HPLC 检测方法*

李春盛¹ 刘宁² 陆守政² 徐峰¹ 刘敏¹ 郭万春¹ 庄严³

提 要 提出一种腹泻性贝毒素—软海绵酸的检测方法。贝类组织经甲醇水溶液浸提后,经多氯甲烷提取,9-亚甲基重氮葱衍生化和固相净化后,在 HPLC 的 C_{18} 柱上得以分离,并能在 $E_x=254\text{nm}$, $E_m=412\text{nm}$ 的荧光检测器上灵敏的检测。该方法对样品的最低检测浓度为 1ng/g , 衍生化及固相净化的回收率 $>95\%$, 重复检测的相对标准差 $<6\%$ 。

关键词 贝毒素 软海绵酸 高效液相色谱

软海绵酸 (Okadaic Acid, OA) 是海洋毒素中腹泻性贝毒 (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP) 的主要毒素。由它引起的食物中毒事件几乎遍布全球^[1]。能产生腹泻性贝毒素的微小藻类在我国海域分布广泛,最近渤海湾赤潮的二种引发藻之一就是能产生 DSP 的倒卵形鳍藻。但我国目前对 DSP 的检测除了半定性的小白鼠法外,还没有针对毒素的准确检测方法报道。我们在参照了国外相关文献的基础上,建立了一种完善的软海绵酸的高效液相色谱—荧光检测方法 (HPLC/FLD)。此法应用到贝类样品的检测中,其最低检测浓度可达 1ng/g , 对高、低含量的样品进行重复检测,精密度良好。

1 实验材料和方法

1.1 实验器材 JJ-2 电动搅拌组织捣碎机 (江苏国华仪器厂); LD4-2 离心机 (北京医用离心机厂); XW-80 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); Mode 1500DG 微量移液管 (Nidhiyo Co Ltd, Japan); HP1050 系列高效液相色谱配备 HP 1046A 荧光检测器和 HP 工作站 (Hewlett-Packard Palo Alto CA); $250\text{mm} \times 4.6\text{mm}$ 的 Techsphere ODS 5u C_{18} 高效液相色谱柱 (Macclesfield Cheshire Skill UK)。

1.2 实验试剂 (1) 溶剂: Milli-Q 重蒸馏水; 色谱纯甲醇、乙腈; 经重蒸馏、硅胶过滤的正乙烷、氯仿、二氯甲烷; (2) 标准软海绵酸 (OA) 及溶液: 软海绵酸 (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Japan), 配成 $12.5\mu\text{g/ml}$ 的标准储备液和 $5.0\mu\text{g/ml}$ 的工作溶液, -20°C 储备; (3) 9-亚甲基重氮葱 (ADAM) 及荧光标记溶液: 9-亚甲基重氮葱 (Funakoshi Co Ltd, Japan) 分装成 2mg 在避光氮瓶中 -80°C 储存; 用 1ml 甲醇溶解成 0.2% 的 ADAM 溶液, 使用当天配制。

1.3 样品处理 生鲜带壳或者冷冻后在室温下半解冻的样品,用刀切开闭壳肌开壳取出贝肉,将可食部与中肠腺分离,放在网眼细小的金属网上,沥水 5min , 沥水后的组织在组织捣碎机中彻底匀浆,装瓶冷冻保存。

1.4 软海绵酸的提取: 取 4.0g 匀浆贝组织,加入一定量的甲醇/水 (8:2), 经涡旋振荡充分混合后 (约 5min), 再用 8:2 的甲醇/水定容至 20ml , 再振荡混合 3min , 将混合液移入离心管中,在不低于 4000r/min 的条件下离心 10min 以上,使固

液两相彻底分开,移出上清液,冷冻保存。取上述粗提取液 5.0ml 先用 5.0ml 正己烷分 2 次提取,弃去正己烷相,水相继续分别用 6.0ml 氯仿 (或二氯甲烷) 提取 2 次,弃去水相,合并 2 次氯仿提取物并在氮气流下 37°C 水浴蒸干,残留物用 1.0ml 甲醇超声溶解,在低温下密封储存,此提取液每 ml 相当于 1.0g 样品。

1.5 ADAM 衍生化和 SPE 固相净化 根据 OA 的含量,取一定量 ($V\mu\text{l}$) 的提取液,移入 1.5ml 的避光密闭氮瓶中,加入 $100\mu\text{l}$ 0.2% 的 ADAM 溶液, 37°C 超声混合 10min 后,在 37°C 温度下反应 2h 后,再在 N_2 流下蒸干,残留物用 $30\mu\text{l}$ 氯仿/正己烷 (1:1) 溶解。将溶解物移入经氯仿、氯仿/正己烷 (1:1) 活化后的硅胶 SPE 柱 (NO 51900 Watets Co) 上,依次用 5ml 氯仿/正己烷 (1:1) 和 5ml 含 1.15% 乙醇的氯仿溶液以 $1\text{d}/\text{s}$ 的流出速度洗柱,弃去液体,再用 5ml 甲醇/氯仿 (1:9) 洗脱 OA 的衍生化产物 (OA-AM), 将收集的洗脱液在 N_2 流下 37°C 蒸干,并用 $500\mu\text{l}$ 甲醇溶解,作为 HPLC/FLD 分析液。

1.6 LC-FLD 分析条件 甲醇/乙腈/水 = $55:30:15$ (V/V/V); 流速 1.0ml/min ; 柱温: 35°C , 荧光检测器波长为 $E_x=254\text{nm}$, $E_m=412\text{nm}$, 进样量 $10\mu\text{l}$ 。

2 结果和讨论

2.1 方法原理及反应条件选择 软海绵酸 (OA) 是一种毒性很强的天然物质 ($\text{LD}_{50}=192\mu\text{g/kg}$), 对它进行超痕量测定,首先必需将其转化为 HPLC 检测器有很强响应值的物质。到目前为止,国外报道的 OA-HPLC 检测方法主要有 3 种,其代表分别为 ADAM 衍生化转化成 OA-AM 法^[2]、共轭大 π 键上的溴甲基衍生化法^[3,4] 和 A-E-OTF 衍生化法^[5]。在这几种方法中,虽然 ADAM 不易保存,但由于衍生化效果最好,衍生化反应易于操作且检测的灵敏度最高,而被广泛应用。它的反应原理是:利用分子 (结构见图 1) 中的羧基官能团与活泼的亚甲基重氮反应,使分子与荧光性葱甲基联在一起生成 OA-AM, OA-AM 的荧光性使 OA 可以在超痕量得以检测。具体反应如下:

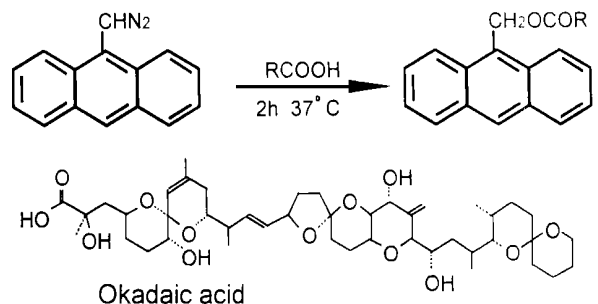


图 1 软海绵酸结构图

虽然此反应可以在常温下进行,但我们通过实验发现低温及较短的反应时间,难以保证实际测定中有较好的精密度,利用超声波清洗使反应物质充分混合,并将反应温度提高到

* 本项目得到辽宁省科委 98 自然科学基金资助

1 大连市卫生防疫站 (116021)

2 辽宁省食品卫生监督检验所

3 丹东市卫生防疫站

37℃, 反应时间延长到 2h, 能使反应的回收率达 95% 以上。

2.2 提取方法的优化 OA 是种脂溶性物质, 对它进行超痕量的提取, 既要保证方法的准确性, 又要尽可能剔除提取物中可能与 ADAM 发生反应的小分子游离脂肪酸, 需要进行多步繁琐的操作, 其中包括甲醇溶液对样品进行浸提, 正己烷对脂肪类剔除, 多卤代烃对 OA 的两相分配提取, Brit A ase 等人^[6]曾采用交叉实验方法对这些条件进行了优化, 我们的实验采用了他们的优化条件, 但实际操作中发现氯仿在两相分配中极易产生乳化现象, 造成两相不能彻底分层, 且很难破乳, 将氯仿改用毒性较小的二氯甲烷, 大多数情况下分层都较好, 即使发生个别分层不好的现象, 在氯仿相中加入少许甲醇或者在水相加入少许氯化钠饱和水溶液, 可在瞬间破乳。实验结果表明二氯甲烷和氯仿对同一样品的检测结果无差别。

2.3 样品净化方法的选择 由于衍生化反应中加入过量的 ADAM, 以及提取液中残留的分子量较小的游离脂肪酸, 对荧光检测势必造成干扰。为了解决这个问题, 多数报道方法都采用了硅胶柱进行 SPE 固相提取。实际操作中装柱很繁琐, 我们采用了 Waters 公司的 SEP-PAK 硅胶柱, 并对冲洗溶剂、洗脱溶剂及柱的使用寿命等进行了筛选发现: (1) 冲洗液中适量加入 < 2% 的无水乙醇有利于提高分析的回收率; (2) 由于 OA-AM 最后由甲醇/氯仿洗脱出来, SEP-PAK 柱对标准品可重复利用 8 次, 但在实际样品分析中为防止残留在柱内的干扰物质对下一次实验的干扰, 每次 OA-AM 洗脱后需用一定量 (约 5ml) 甲醇对柱进行彻底洗净。

2.4 仪器条件的选择 考虑到峰的分离效果、柱压的大小及检测周期等综合因素, 我们选定检测流动相为 CH₃OH / CH₃CN H₂O = 55/30/15 (V/V/V), 尽管以往的国外文献对 ADAM 衍生化方法的 FLD 条件都选为 E_x = 365nm, 但我们在实验中发现 E_x = 254nm, OA-AM 的响应值最大, 所以 FLD 的波长选择为 E_x = 254nm, E_m = 412nm。在以上仪器条件下, 标准品 OA 和实际样品的分离分析谱图为图 2 和图 3 从图 3 可见 OA-AM 的出峰时间 (12.393min), 此处没有干扰峰出现。对于另外几个大峰 (15.225min, 17.697min, 22.223min), 与文献比较怀疑是 OA 的天然衍生物— 鳍藻毒素 DTX1~ DTX3, 对它们的确定需借助于 LC-MS 实验和标准品, 受实验室条件局限。此工作需进一步完善。

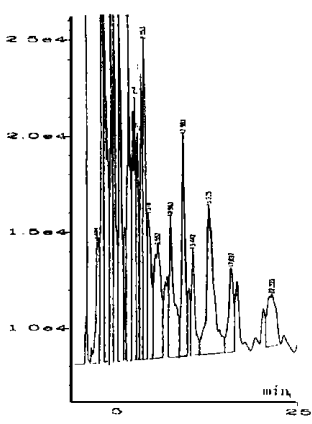
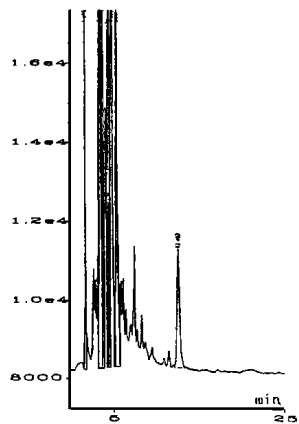


图 2 软海绵酸 ADAM 衍生化 图 3 赤潮污染贻贝 ADAM 衍生物 HPLC/FLD 谱图

2.5 方法的评价及实际样品测定 为了节省标准品, 我们在方法的评价中重点进行了标准曲线的线性范围、衍生化反应和衍生化产物的净化效果、方法的精密度等研究。对于提取方法

的回收率, Brit A ase 等人^[6]在他们的报道中已作了细致的研究, 我们的研究没有重复。

分别取 2.0ng, 5.0ng, 10.0ng, 20.0ng, 30.0ng, 40.0ng 的标准 OA 进样分析, 所得浓度和峰高的回归曲线为 $y = 161.67x + 169.69, r = 0.9987$

对于实际样品测定, 设定取提取液 V₁ 进行衍生化和 SPE 净化, 吹干后 V₂ (10 μ l) 的进样量在 HPLC/FLD 检测出峰的峰高相当于 W_{ng} 则样品中 OA 含量为:

$$OA (\mu g/g) = \frac{W \times V_2}{10 \times V_1}$$

以赤潮污染海区贻贝和文蛤, 无污染区的贻贝为标本进行重复分析测定, 测定结果见表 1

表 1 实际样品测定的精密度

样品	采样地点	时间 (年.月)	检测次数	检测结果 ($\mu g/g$) (浓度 \pm SD)	RSD (%)
贻贝	兴城芷锚湾	98.11	6	24.42 \pm 0.79	3.23
文蛤	兴城芷锚湾	98.11	6	8.64 \pm 0.41	4.74
贻贝	大连棉花岛	98.11	6	0.68 \pm 0.04	5.88

以文蛤为标本, 经浸提、氯仿提取及浓缩后, 分别添加相当于样品量的 5.0 $\mu g/g$ 和 10.0 $\mu g/g$ 的标准 OA, 而后进行 ADAM 衍生化、SPE 固相净化及 HPLC/FLD 测定, 测定结果见表 2

表 2 衍生化和 PSE 净化的回收率

添加量 ($\mu g/g$)	重复次数	测定值 ($\mu g/g$) (C \pm SD)	回收率 (%)
0	6	8.64 \pm 0.41	-
0.5	3	13.46 \pm 0.52	96.4
10.0	3	18.33 \pm 0.71	98.9

本方法对 OA 进行分析, 在进样量 2~ 40ng 范围内线性较好, 实际样品测定的精密度和回收率能满足检测的要求。

(以上工作得到了丹东市卫生防疫站李力军、管兆军等同志的大力协助, 谨表谢意。)

参 考 文 献

- 1 C P Soames M. Shellfish Poisoning Public Health Risks quality assurance and analytical detection Chemistry in Australia 1995 12 22
- 2 Michael A Q. Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Tissue by liquid Chromatography with Fluorometric and Mass Spectrometric Detection. JAOAC 1995 78(2): 555
- 3 Shen J et al Sensitive HPLC- fluorometric and HPLC-MS determination of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins as 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin esters. Fresenius J Anal Chem 1997 357: 101
- 4 Camody E P, et al Diarrhetic Shellfish Poisoning Evaluation of Enzyme-linked immunosorbent Assay Methods For Determination of Dinophysistoxin-2 JAOAC 1995 78(6): 1403
- 5 Kaguaki A, et al Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography. J Chromatography A 1996 729: 381
- 6 Brit A, et al Optimization of sample clean up procedure for determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins by use of experimental design. J Chromatography A 1997 764: 223