

毛细管电泳法分析贝类食品中的软骨藻酸

卫 锋¹ 王竹天²

(1. 辽宁出入境检验检疫局,大连 116001;2. 中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为监测贝类食品的食用安全,建立了毛细管电泳/紫外检测法定量测定贝类食品中软骨藻酸的分析方法。结果表明:软骨藻酸在 0.2~50 μg/mL 范围内具有良好的线性关系,相关系数 $r = 0.9990$; $RSD = 2.56\%$;方法检出限为 0.034 μg/g。在 3 个水平上对实际样品进行标准添加,回收率分别为 96.80%、97.10%和 96.85%。该方法简单、灵敏、高效、成本低,对记忆损失性贝类毒素的检测和监控具有重要意义。

关键词:海生毒素类;软骨藻酸;电泳;毛细管

Analysis of Domoic Acid in Shellfish Samples by Capillary Electrophoresis

Wei Feng, et al.

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, China, Dalian 116001)

Abstract: A capillary electrophoresis with UV method for determination of domoic acid, a main kind of amnesic shellfish toxin was established. The calibration curve of domoic acid showed good linearity in the range of 0.2~50 μg/mL with $r = 0.9990$ and $RSD = 2.56\%$. The detection limit of the method was 0.0034 μg/g. Spike with domoic acid standard at three levels, the recoveries were 96.80%, 97.10% and 96.85% respectively. The method was simple, convenient, sensitive, low cost and suitable for monitoring of amnesic shellfish toxin.

Key Words: Marine Toxins; Domoic acid; Electrophoresis, Capillary

记忆缺失性贝类毒素(Amnesic shellfish toxin 简称 ASP)主要成分软骨藻酸(Domoic acid 简称 DA)是一种氨基酸类的生理活性物质(图 1),因最早从红藻属的树枝软骨藻(*Chondria armata*)分离出来而被命名为软骨藻酸。自 1987 年加拿大首次发生集体贝类食品中毒事件后,人们从赤潮藻类中的硅藻属(Diatom)的多列尖刺菱形藻(*Nitzsch pungens f. multiseres*)中检测到了 DA,随后,美国、加拿大、北欧一些国家,澳大利亚、日本等国先后从紫贻贝(*Mytilus edulis*)、扇贝(*Pecten maximus*)、文蛤(*Callista chione*)等贝类体内以及鳗鱼、鲭鱼和石蟹的内脏中检测到了 DA。鱼、贝通过滤食毒藻,将 DA 富积在体内,人类因食用被 DA 污染的鱼、贝而中毒,中毒症状包括恶心、呕吐、腹痛、腹泻等,同时有昏眩、昏迷等类似神经性中毒症状,永久性丧失部分记忆是此类中毒的典型特征,因此它被称为记忆缺失性贝类毒素,美国 FDA 将它确定为四种主要海洋生物毒素之一。

加拿大首先制定了 DA 的安全剂量为 20 μg/g 贝肉,^[1]随后,欧洲、日本也相继将该种毒素列为贝类常规检测项目。

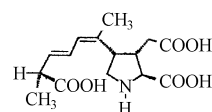


图 1 软骨藻酸的分子结构

小白鼠生物检测方法首先被应用于 ASP 的检测,随后酶联免疫、细胞毒性检测和受体检测等生物检测法相继建立起来。^[2]近年来,仪器分析法因其灵敏、准确、快速等特点而得到广泛应用。常用的仪器分析法有高效液相色谱法(HPLC)^[3~5]和毛细管电泳法(CE)^[6,7]。

在参考现有 CE 分离分析方法所采用的萃取技术的基础上,本文采用水、甲醇溶液作为提取液,结合阴离子交换柱和阳离子交换柱的净化,避免了基

基金项目:国家科技部基金资助(社会公益项目)
作者简介:卫峰 男 主任技师 硕士

This work was supported by the Special Funds of Ministry of Science and Technology, China.

体中色氨酸的干扰,样品回收率得到较大的提高。同时通过对分离分析条件的优化,将 DA 分析的线性范围由 1.5 ~ 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[7] 扩大到 0.2 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,为建立贝类体内 DA 的微量 CE/UV 常规分析提供了可行性。该方法简便、灵敏、成本低,是贝类体内 DA 含量常规检测较理想的方法。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

BioFocus 3000 全自动毛细管电泳仪 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 配有紫外检测器;JZ 型组织匀浆器(铁道部电气化设计研究院四方电器设备厂);TCL-16 型台式高速离心机(上海医用分析仪器厂);KQ-250 型超声波清洗器(昆山市淀山湖检测仪器厂);PHS-3C 精密 pH 计。

软骨藻酸标准品(DA,纯度 95%)购于 Sigma 公司,于 -18℃ 保存至使用;MUS-1 标准物质(贝类组织参考物质,DA 的质量比为 98 $\mu\text{g}/\text{g}$,购自 National Research Council Canada);四硼酸钠(50 mmol/L, pH 值 9.3)分析纯;乙腈(色谱纯);甲醇(色谱纯);甲酸(分析纯);实验用水为自制二次去离子水;3 mL 阴离子交换柱(SAX: part NO. 1210-2044, lot NO. 182639, Varian)和阳离子交换柱(SCX: part NO. 1211-3039, lot NO. 171069)。非涂渍石英毛细管柱(内径 50 μm ,检测窗口距出口端 4.5 cm,柱 1 的有效柱长 40 cm,柱 2 的有效柱长为 34.5 cm)河北永年光导纤维厂生产。

1.2 试样的制备和分离分析

1.2.1 试样的萃取

4.0 g 贝类组织加入 16.0 mL 甲醇+水(1+1,体积之比)匀浆 3 min,450 r/min 离心 10 min,将上清液通过 0.45 μm 滤膜(Millex-HV)过滤后放入冰箱储存备用。

1.2.2 试样的洗脱

参考 Zhao^[7] 的方法进行改进 a:取 5.0 mL 上述粗提取液,移入依次经甲醇、水和甲醇+水(1+1,体积之比)预处理过的 SAX 柱,待液体以每秒一滴的速度流出后,再依次用 5 mL 乙腈+水(1+9,体积之比)洗脱液以每秒 1 滴的流出速度过柱,弃去流出液,最后用 2 mL 甲酸洗脱液洗脱吸附在柱上的 DA。b:将 a 中得到的提取物移入预先依次经甲醇、水和 0.01 mol/L 甲酸、5 mL SAX 洗脱液预处理的 SCX 柱,柱子先分别用 5 mL 0.01 mol/L 甲酸和 0.5 mL 25 mmol/L 的硼酸钠(pH 9.2)+乙腈(9+1,体积之比)溶液冲洗,弃去流出液,再用 2 mL 25 mmol/L 的硼酸钠(pH 9.2)+乙腈(9+1,体积之比)溶液分 3 等份洗脱,DA 在第三次洗脱液中开始出

现,取洗脱液进行 CE 分析。

1.2.3 DA 的 CE-UV 分析

非涂渍石英毛细管柱,检测波长 242 nm,分离电压 15.0 kV,柱温 25℃,压力进样每秒 6 psi,冲洗及运行缓冲液为 25 mmol/L 硼砂溶液。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

常用 DA 萃取溶剂的选择是基于其水溶性特点,用酸性水溶液提取,^[7] 实验表明 DA 在酸性条件下易分解,本实验采用水、甲醇溶液作为提取液,结合 SAX 和 SCX 柱的净化,避免了基体中色氨酸的干扰,得到了 96.93% 的回收率。

2.2 CE 检测条件的优化

DA 为 ASP 的主要成分,它含有 3 个羧基和 1 个氨基基团,具有很强的电离能力(图 1)。根据溶液 pH 值的不同,DA 具有 5 种荷电状态,其 pK_a 值为 2.10, 3.72, 4.97 和 9.82,因此,我们可以采用不同运行模式或电泳条件对其进行检测。

根据 Pineiro 等的研究,^[6] 硼酸是 DA 分析的最适缓冲液,我们用不同浓度的缓冲液(12.5、25、50 mmol/L)和不同的运行电压(18.0、15.0、12.0 kV)进行 DA 标准物质的检测,以便找到最佳分离效率和分辨率的毛细管电泳条件。当使用高浓度缓冲液(50 mmol/L)时,由于缓冲液中的高盐度,会出现电流增大、峰展宽的现象,毛细管中出现 Joule 热效应,这种效应会导致溶剂蒸发和电泳分离前试样的损失,同时离子强度的增加会延长迁移时间,使 DA 检测时间延长。使用低浓度缓冲液(12.5 mmol/L)时,虽然 DA 的迁移时间缩短,但检测噪音增大,导致 DA 检出限的降低。而使用 25 mmol/L 的硼酸盐溶液则可以克服上述两种缓冲液的不足,提高了电泳的选择性和分辨率,同时峰形更尖锐,电泳分离效率更高,因此 25 mmol/L 的硼酸盐缓冲液是 CE 分离 DA 的最佳缓冲液(图 2)。在选择电压时,使用较高的分离电压(18.0 kV)可以使 DA 迁移时间缩短,但同样会出现电流增大和 Joule 热效应等缺点,而低电压(12.0 kV)又导致 DA 迁移时间延长,实验证明 15.0 kV 的电压时电流不大且迁移时间在合适的范围内,是毛细管电泳测定 DA 的最佳分离电压(图 3)。

2.3 线性关系

经优化后,分别配置 50、35、20、10、1、0.4、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DA 标准溶液,以 DA 标准溶液为横坐标,以各浓度 DA 的峰面积(毛细管柱 2)为纵坐标($n=3$),结果表明,DA 在 0.2 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内

其峰面积与浓度具有非常好的线性关系 ($r = 0.999\ 0$), 回归方程 $y = 555\ 31 + 102\ 414x$ 。其峰面积的相对偏差 (RSD) 为 1.90% (日内)、3.60% (日间), 迁移时间的相对标准偏差为 1.60% (日内)、1.86% (日间)。

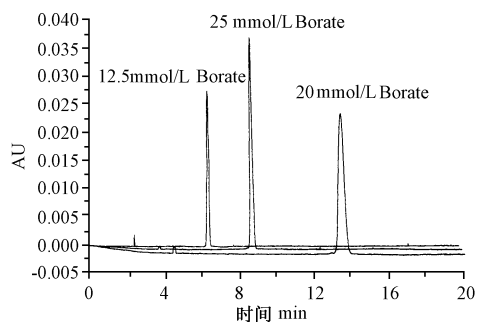


图2 不同浓度的硼酸盐缓冲液对 DA 响应的影响

条件:未涂渍柱 1, 硼酸盐缓冲液 (pH 9.3), 15 kV, 从正到负, 压力进样每秒 6 psi, 紫外检测 242 nm。

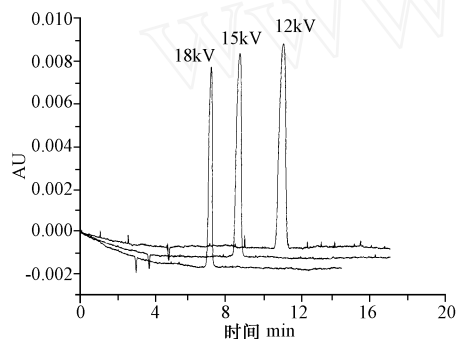


图3 不同运行电压时 DA 响应的影响

条件:未涂渍柱 2, 25 mmol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 9.3), 从正到负, 进样每秒 6 psi, 紫外检测 242 nm。

2.4 回收率、精密度和最低检测限

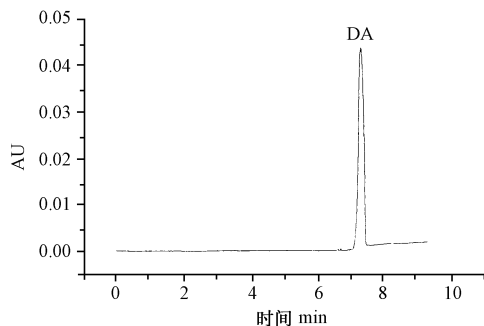
本实验进行 3 个添加水平的实验, 分别加入 DA 标准品 5.00、10.00 和 20.00 $\mu\text{g/g}$, 空白试样加标后同样按“1.2”节方法处理, 每一水平测定 6 次, 平均回收率为 96.93%, RSD 为 2.56% 结果见表 1。本方法的试样最低检出限为 0.034 $\mu\text{g/g}$ ($S/N > 3$)。

表 1 方法的回收率和精密度 ($n = 6$)

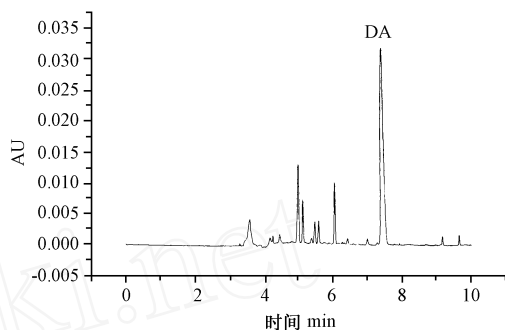
添加量 $\mu\text{g/g}$	测定值 $\mu\text{g/g}$	平均回收率 %	RSD %
5.00	4.84 \pm 0.14	96.80	2.91
10.00	9.71 \pm 0.25	97.10	2.65
20.00	19.37 \pm 0.39	96.85	2.13
平均值		96.93	2.56

2.5 试样检测

用该方法对参考标准物质 (MUS - 1) 进行了分析, 分析结果见图 4。



(a) 软壳藻酸标准物质



(b) MUS-1参考标准物质

图4 毛细管电泳/紫外分析

条件:未涂渍柱 2; 25 mmol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 9.3), 15 kV, 从正到负运行, 压力进样每秒 6 psi, 紫外检测 242 nm。

参考文献:

- [1] Lawrence JF, Lau BP, 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]. J Chromatogr A, 1994, 21:659(1):119-126.
- [2] Grimmelt B, Nijjar MS, Brown J, et al. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice[J]. Toxicol, 1990, 28(5):501-508.
- [3] Lawrence JF, Charbonneau CF, Menard C. Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure: collaborative study[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1991, 74(1):68-72.
- [4] Quilliam MA. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection[J]. J AOAC Int, 1995, 78(2):555-570.
- [5] 卫锋, 程昱, 宫静宏, 等. 高效液相色谱法测定贝类中丧失记忆性贝毒素 - 软骨藻酸[J]. 色谱, 2001, 19(3):248-250.
- [6] N Píñero J M, Leão A, Gago Martiñez J A, et al. Analysis of domoic acid in shellfish by Capillary Electrophoresis[J]. J. Chromatogr A, 1999, 847(1/2):223-232.
- [7] Zhao JY, Thibault P, Quilliam MA. Analysis of domoic acid and isomers in seafood by capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1997, 18(2):268-276.

[收稿日期:2003-01-02]