

QuEChERS 法联合高效液相色谱法快速检测扇贝中的软骨藻酸

王 婵^{1,2}, 赵永拓³, 彭心婷⁴, 孙兴权², 刘慧颖², 张 或¹, 曹际娟^{2*}

(1. 大连工业大学, 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001;

3. 鲅鱼圈出入境检验检疫局, 营口 115000; 4. 塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700)

摘要: **目的** 利用 QuEChERS 样品制备结合高效液相色谱法建立测定扇贝中记忆缺失性贝类毒素—软骨藻酸(domoic acid, DA)残留的检测方法。**方法** QuEChERS 样品制备法进行样品前处理, 即样品经甲醇:乙腈:水=6:3:1(v:v:v)提取, C18 粉末净化, 反相高效液相色谱分离, 242 nm 波长下检测, 基质匹配校准曲线外标法定量。**结果** 方法的检测下限(limit of quantitation, LOQ)为 1.8 $\mu\text{g/g}$, DA 在 0.72~30.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性良好(相关系数 $r=0.9998$), 在 1.8~6.0 $\mu\text{g/g}$ 添加浓度范围内, 平均回收率为 90%左右, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 5%。**结论** 本实验建方法检测下限完全满足 DA 20 $\mu\text{g/g}$ 的限量要求, 且步骤简单、可操作性强、节省时间、试剂用量少、准确度高、精密度好, 具有快速高效的特点。

关键词: 软骨藻酸; QuEChERS 样品制备法; 高效液相色谱法; 快速检测

Rapid detection of domoic acid in scallops by QuEChERS method coupled with high performance liquid chromatography

WANG Chan^{1,2}, ZHAO Yong-Tuo³, PENG XIN-Ting⁴, SUN Xing-Quan², LIU Hui-Ying²,
ZHANG Yu¹, CAO Ji-Juan^{2*}

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 3. Bayuquan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yingkou 115000, China; 4. Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng 834700, China)

ABSTRACT: Objective To established a method to detect domoic acid residues in scallops by the sample processing method of QuEChERS in combination with high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were cleaned up by QuEChERS with extracting by methanol : acetonitrile : water = 6:3:1 (v:v:v), and purified by C18 powder, separated by reversed phase high performance liquid chromatography and detected at wave length of 242 nm, and quantified by the matrix matching calibration curve external standard method of matrix matching calibration curve at last. **Results** The limit of quantitative was 1.8 $\mu\text{g/g}$, working curve correlation coefficient was 0.9998 at the linear range of 0.72~30.00 $\mu\text{g/mL}$, the recovery rate was higher than 90% at the spiking concentration range of 1.8~6.0 $\mu\text{g/g}$, and relative standard deviation (RSD) was less than 5%. **Conclusion** This method with a fast speed and a high sensitivity and exactitude can satisfy the limit

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201310141)

Fund: Supported by the Special Scientific Research Fund of AQSIQ Public Welfare Profession of China (201310141)

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测, E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Researcher, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.60, Changjiang East Road, Dalian 116001, China. E-mail: cjj0909@163.com

of detection of DA 20 $\mu\text{g/g}$.

KEY WORDS: domoic acid; QuEChERS extraction; high performance liquid chromatography; rapid detection

1 引 言

贝类毒素是贝类摄入毒性海藻或与藻类共生时, 由这些藻类合成并蓄积在贝类体内的多种毒素, 按照毒性机制可分为麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poison, PSP)、腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisons, DSP)、神经性贝类毒素(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)和记忆丧失性贝类毒素(amic shellfish poisoning, ASP)4 种。其中 ASP 的主要成分是软骨藻酸(domoic acid, DA)及其衍生物, 自 1987 年加拿大的中毒事件^[1]后开始被认识。近年来, DA 中毒事件时有发生, 美国、加拿大、法国、英国、西班牙、爱尔兰和葡萄牙均有报道^[2-4]。贝类毒素危害具有突发性和广泛性, 由于其毒性大、反应快、无适宜解毒剂, 给防治带来了许多困难。

DA 是一种天然神经性非蛋白氨基酸, 主要由某些拟菱形藻属和菱形藻属的海洋硅藻产生, 易溶于水, 微溶于甲醇, 其结构如图 1 所示。DA 是谷氨酸的一种同分异构体, 并能够与谷氨酸受体牢固结合的一种兴奋性神经传递素, 其作用机制是通过与控制细胞膜 Na^+ 通道的神经递质谷氨酸结合, 开启细胞膜的 Na^+ 通道, 提高 Ca^{2+} 的通透性, 使得神经细胞长时间处于兴奋状态, 最终导致细胞死亡, 也可能引起部分中枢神经系统区域以及与记忆有关区域损伤, 进而导致记忆丧失^[5]。欧盟对 DA 的限量标准为 20 $\mu\text{g/g}$, 我国尚未规定其限量标准^[6]。

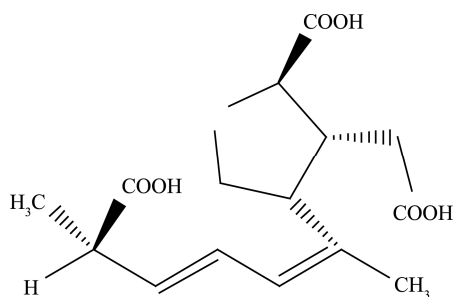


图 1 软骨藻酸结构图

Fig. 1 Structure of domoic acid

目前检测贝类中 DA 的方法主要有小鼠生物法、毛细管电泳法^[7]、酶联免疫吸附法^[8,9]、高效液相色谱

法^[10,11]、液相色谱串联质谱法^[12,13]等。色谱技术检测软骨藻酸一般用甲醇提取, 后经阴离子小柱净化后上机^[14-16], 但固相萃取柱一般价格较贵, 且操作时间较长。QuEChERS(quick, eqsy, cheap, effective, rugged and safe)法是近些年发展起来的一种样品制备方法, 因具有快速、简单、便宜、有效、耐用和安全可靠等特点而被广泛应用于食品安全检测领域, 目前, 其在贝类 DA 检测分析中的应用尚未见报道。QuEChERS 法一般采用以乙腈或酸化乙腈为提取剂, 通过加入氯化钠或乙酸钠等缓冲盐减少极性杂质的干扰。加入无水硫酸镁在提取步骤中促进溶剂分配并提高样品分布, 在净化步骤中可去除有机相中的多余水分, 加入伯仲胺(primarysecondary amine, PSA)去除糖类和脂肪酸、有机酸、脂类和一些色素等杂质。本实验利用 QuEChERS 法作为前处理操作方法, 结合高效液相色谱法来测定扇贝中的 DA, 尝试开发一种贝类样品中 DA 的快速检测方法。

2 材料和方法

2.1 仪器及试剂

高效液相色谱仪: Agilent 1260(美国 Agilent 公司); 涡旋混合器(美国 Scientific industries 公司); 电子天平(德国 Sartorius 公司); 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

软骨藻酸标准品(纯度 > 90%, 美国 Sigma 公司); 乙腈、甲醇、丙酮(高效液相色谱纯, 德国 Meker 集团); 氯化钠、无水硫酸镁(纯度 > 98%, 国药集团化学试剂有限公司); C18 吸附剂粉末(上海安普科学仪器有限公司); 超纯水(Milli-Q 超纯水仪制备得到); 0.22 μm 滤膜(美国 Thermo 公司); 提取剂: 甲醇:乙腈:水=6:3:1 (v:v:v)。DA 标准储备溶液配制: 吸取一定量的 10%乙腈, 溶解适量的 DA 标准品, 使其浓度为 1500 $\mu\text{g/mL}$; 基质校正标准曲线工作液配制: 取 5 份空白试样, 分别加入适量 DA 标准溶液, 按本文“2.3.2”步骤处理, 制成 DA 浓度为 0.72、1.50、3.00、10.00、30.00 $\mu\text{g/mL}$ 的基质校正标准系列工作液, 过 0.22 μm 滤膜后备用。

2.2 色谱条件

色谱柱: Purospher STAR RP-18 (150 mm \times 4.6

mm×3 μm, 德国 Merck 公司); 柱温: 35 °C; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 242 nm; 进样量: 10 μL; 流动相: 0.1%乙酸:乙腈(87:13, v:v)。

2.3 实验方法

2.3.1 试样制备

洗净贝类样品外壳泥沙后, 开壳, 再清洗干净内部, 确保样品无海水和泥沙等异物。取贝类组织可食部分, 沥干水分后经充分搅碎、均质, 分出不少于 100~150 g 作为试样, 于-18°C 以下避光保存。

2.3.2 提取与净化

取 4 g 样品于 50 mL 具塞离心管中, 加入 10 mL 甲醇:乙腈:水=6:3:1(v:v:v)提取溶剂、2 g 无水硫酸镁和 1 g 氯化钠, 涡旋振荡 1 min, 超声提取 5 min, 以 10000 r/min 于 4 °C 超高速离心 10 min, 取 4 mL 上清液, 加入 0.2 g C18 粉末, 0.4 g 无水硫酸镁, 涡旋振荡 1 min, 8000 r/min 于 4 °C 超高速离心 10 min, 取 1 mL 上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 上机测定。

试样中被测物含量利用 $X=cV/m$ 公式计算, 其中 X 为试样中 DA 含量($\mu\text{g/g}$); c 为从标准工作曲线得到的 DA 浓度($\mu\text{g/mL}$); V 为试样溶液最终定容体积(mL); m 为试样溶液所代表试样的质量(g)。

3 结果与讨论

3.1 提取条件的选择

3.1.1 提取溶剂的优化

DA 为水溶性非蛋白质类氨基酸, 在以往 DA 的检测方法中, 依据 DA 易溶于水, 微溶于甲醇的理化性质, 多采用甲醇:水=1:1(v:v)为提取溶剂, 阴离子小柱净化, 但固相萃取柱一般价格较贵, 且操作时间较长, 耗费溶剂多。本实验也基于 DA 的这一理化性质, 采用 QuEChERS 法进行样品提取与净化。在实际应用中, QuEChERS 法具有很高的灵活性, 可以根据

实际需要采用不同提取剂、吸附剂组合进行样品处理。在提取溶剂选择方面, 本实验分别研究了甲醇:乙腈:水=8:1:1、7:2:1、6:3:1、5:4:1(v:v:v)、甲醇:水=1:1(v:v)、甲醇:丙酮=9:1(v:v)、乙腈:水=17:83(v:v) 等溶剂对样品进行提取, 实验结果如表 1 所示, 结果表明在 1.8 $\mu\text{g/g}$ 添加水平上, 甲醇与乙腈、水的组合回收率较高, 其中甲醇:乙腈:水=6:3:1(v:v)的组合回收率最高, 故本实验选取甲醇:乙腈:水=6:3:1(v:v)为提取溶剂。0.72 $\mu\text{g/mL}$ DA 标准品谱图见图 2, 低浓度水平(1.8 $\mu\text{g/g}$)添加谱图见图 3。

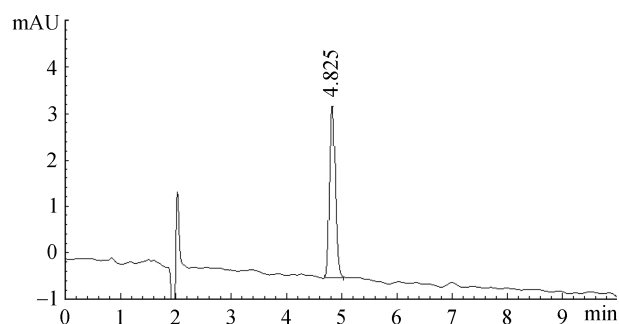


图 2 软骨藻酸标准品色谱图(0.72 $\mu\text{g/mL}$)

Fig. 2 Chromatography of domoic acid(0.72 $\mu\text{g/mL}$)

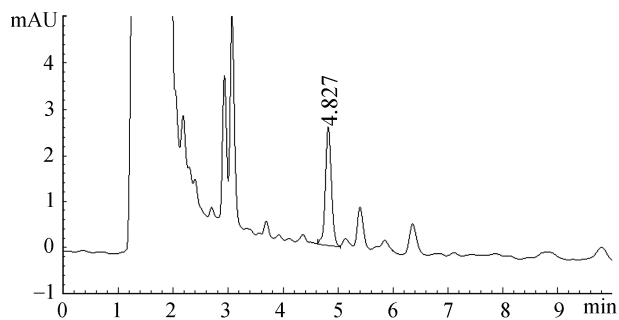


图 3 扇贝中添加低浓度水平(1.8 $\mu\text{g/g}$)DA 的高效液相色谱图

Fig. 3 Chromatography of domoic acid at the low spiking concentration of 1.8 $\mu\text{g/g}$ in scallops

表 1 不同提取溶剂对 DA 回收率的影响

Table 1 Effects of different extraction solvent on recovery of domoic acid

提取溶剂	甲醇:乙腈:水(v:v:v)			甲醇:水(v:v)	甲醇:丙酮(v:v)	乙腈:水(v:v)	
	8:1:1	7:2:1	6:3:1	5:4:1	1:1	9:1	17:83
回收率(%)	72.1	70.4	85.4	80.3	74.2	89.3	50.2
	80.2	82.2	87.9	77.1	72.4	80.7	62.4
	79.2	74.3	82.1	70.5	82.7	74.9	58.0
平均回收率(%)	77.1	75.6	85.1	75.9	76.4	81.6	56.9
相对标准偏差(%)	5.7	7.9	3.4	6.6	7.2	8.9	10.8

3.1.2 超声时间的选择

考虑到实际样品中 DA 的提取效果, 本实验研究了水浴超声提取 5、10、15 min 对回收率的影响, 结果表明超声时间长短对结果影响差异不大, 因此本实验最终选择超声时间为 5 min, 具体实验结果见图 4(添加浓度为 1.8 $\mu\text{g/g}$)。

3.2 净化条件的选择

鉴于 DA 是一种酸性物质, 在净化步骤中本实验未采用 QuEChERS 法常用的 PSA 粉末进行净化, 而是利用 C18 粉末为净化剂以去除蛋白等杂质, 同时结合低温高速离心的方式进行样品净化处理。QuEChERS 法在净化方面与传统的固相萃取相比还有一定的差距, 新净化体系和新净化材料还有待进一步研究开发^[17]。在利用 QuEChERS 法净化处理后,

本实验的回收率可达 70%左右, 为减少由于净化不足对检测分析的影响, 本实验在外标法定量时采用了基质匹配标准曲线法, 进而使回收率达 90%左右, 结果如表 2 所示。此外, 由于 DA 在酸性条件下不稳定, 整个样品处理和检测分析过程中还应注意样品溶液的酸碱度不可为酸性, 以防 DA 降解。

3.3 方法检测低限、线性范围、回收率、精密度

以 10 倍信噪比(S/N)确定 DA 的检测低限为 1.8 $\mu\text{g/g}$; 在 0.72~30.00 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内, 相关系数 r 为 0.9998。按 1.8、3.6、6.0 $\mu\text{g/g}$ 3 个浓度水平向扇贝样品中添加 DA, 用 QuEChERS 法进行样品提取和净化, 每个样品重复 6 次, HPLC 检测, 回收率及相对标准偏差统计结果见表 3。

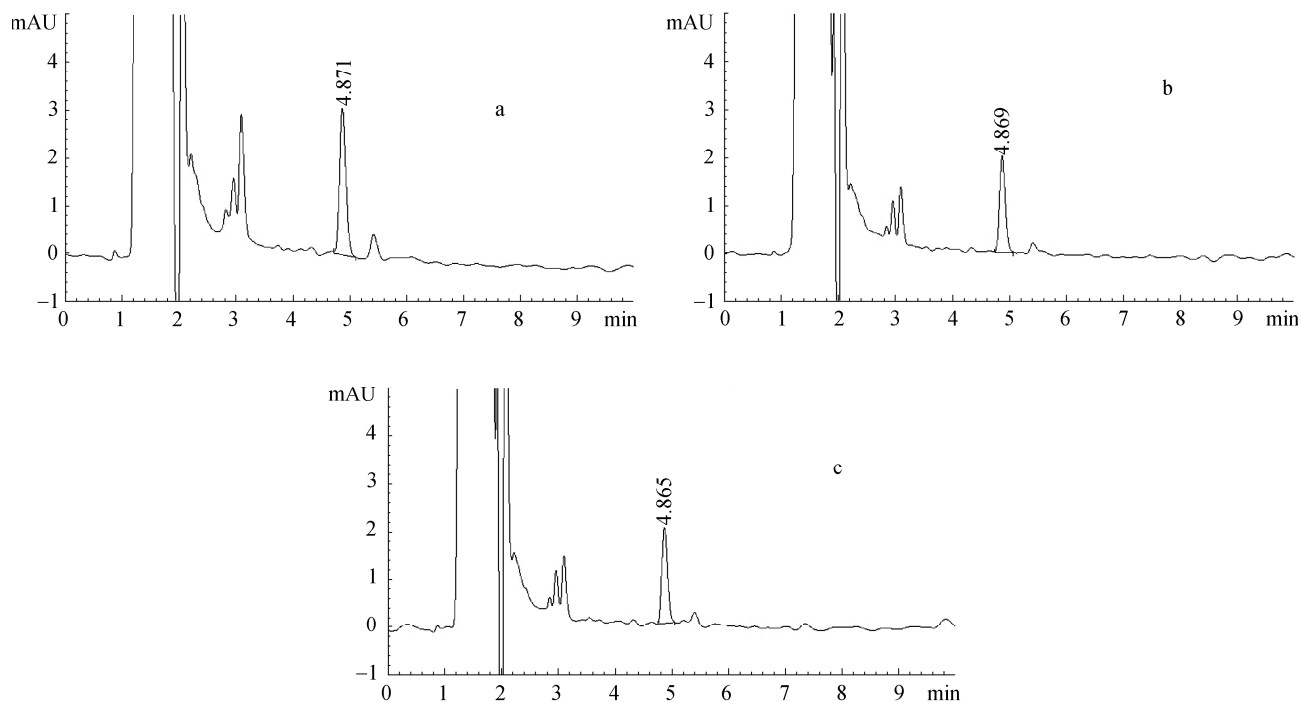


图 4 超声时间对 DA 回收率的影响

Fig. 4 Effects of different ultrasonic time on recovery of domoic acid
a: 5 min; b: 10 min; c: 15 min

表 2 基质匹配标准曲线法对 DA 回收率的影响

Table 2 Effects of matrix-matched calibration standard on recovery of domoic acid

基质匹配	回收率(%)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)		
基质配标前	85.4	87.9	82.1	85.1	3.4
基质配标后	98.4	93.4	92.5	94.8	3.3

表 3 扇贝中 DA 加标回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Recovery and precision of domoic acid spiking in scallops ($n=6$)

样品基质	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率(%)						平均回收 率(%)	相对标准 偏差(%)
		1	2	3	4	5	6		
扇贝	1.8	87.2	93.2	96.6	90.8	93.7	86.4	91.3	4.3
	3.6	91.6	87.3	93.2	90.9	94.6	92.2	91.6	2.7
	6.0	92.1	88.8	96.5	94.3	94.7	90.3	92.8	3.1

4 结 论

本实验采用改进的 QuEChERS 法与高效液相色谱技术, 测定了扇贝样品中的 DA, 所建方法检测下限完全满足 DA 20 $\mu\text{g/g}$ 的限量要求, 且步骤简单、可操作性强、节省时间、试剂用量少、准确度高、精密度好, 具有快速高效的特点, 是对日常贝类样品中的 DA 检测方法的有益尝试和补充。

参考文献

- [1] Miles CO, Wilkins AL, Samdal IA, *et al.* A novel pectenotoxin, PTX-12, in Dinophysis spp. and shellfish from Norway [J]. Chem Res Toxicol, 2004, 17(11): 1423-433.
- [2] Fux E, McMillan D, Bire R, *et al.* Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins [J]. J Chromat A, 2007, 1157(1-2): 273-280.
- [3] Stobo LA, Lacaze JPCL, Scott AC, *et al.* Liquid chromatography with mass spectrometry-detection of lipophilic shellfish toxins [J]. J AOAC Int, 2005, 88(5): 1371-1382.
- [4] McNabb P, Selwood AI, Holland PT, *et al.* Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: single-laboratory validation and interlaboratory study [J]. J AOAC Int, 2005, 88(3): 761-772.
- [5] 马景刚. 液相色谱—质谱联用 (LC-MS/MS)同步分析多种脂溶性贝毒的方法及应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Ma JG. Study on the simultaneous detection for multiple lipophilic toxins in shellfish using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [D]. Qindao: Ocean University of China, 2012.
- [6] Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual on harmful marine microalgae [R]. UNESCO, 1995.
- [7] Nguyen A, Luong J, Massona C. Capillary electrophoresis for detection and quantitation of domoic acid in mussels [J]. Anal Lett, 1990, 23(9): 1621-1634.
- [8] Jennifer M. Maucher, John. Ultrasensitive detection of domoic acid in mouse blood by competitive ELISA using blood collection cards [J]. Toxicol, 2005, 45(5): 607-613.
- [9] Dubois M, Demoulin L, Charlier C, *et al.* Development of ELISAs for detecting domoic acid, okadaic acid, and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010, 27(6): 859-868.
- [10] Vera-Avila LE, Deny Y, Marín-Pérez, *et al.* Trace level determination of domoic acid in seawater by off-line/on-line solid-phase extraction coupled to HPLC-UV [J]. J Mex Chem Soc, 2011, 55(2): 65-71.
- [11] Maroulis M, Monemvasios I, Vardaka E, *et al.* Determination of domoic acid in mussels by HPLC with post-column derivatization using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl) and fluorescence detection [J]. J Chromat B, 2008, 876(2): 245-251.
- [12] McCarron P, Wright E, Quilliam AM. Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra [J]. J AOAC Int, 2014, 97(2): 316-324.
- [13] Furey A, Lehane M, Gillman M, *et al.* Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2001, 938(1-2): 167-174.
- [14] 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.
Zhou XJ, Zhou XY, Zheng B, *et al.* HPLC method of rapid detecting domoic acid in shellfish [J]. J Zhejiang Ocean Univ: Nat Sci, 2012, 31(3): 211-214.
- [15] 吴映璇, 林峰, 林海丹, 等. 快速高分离度液相色谱法测定贝类中软骨藻酸残留量[J]. 分析试验室, 2008, 27(S): 173-175.
Wu YX, Lin F, Lin HD, *et al.* Rapid determination of domoic

acid residues in amnesic shellfish by rapid resolution liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Lab*, 2008, 27(S): 173–175.

- [16] 吉薇, 郑洁莹, 曾雪萍, 等. 南海海域软骨藻酸(DA)贝类毒素的 HPLC 方法检测[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(1): 120–122, 116.
Ji W, Zheng JY, Zeng XP, *et al.* HPLC analysis of domoic acid poisoning in south China sea [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2011, 27(1): 120–122, 116.
- [17] 朱坚. 食品中有害物质的检测新技术[J]. *检验检疫学刊*, 2012, 22(5): 1–7.
Zhu J. The new technology in analysis of harmful substances in food [J]. *J Inspect Quarant*, 2012, 22(5): 1–7.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王 婵, 硕士, 主要研究方向为食品安全色谱检测。

E-mail: wangachan37@163.com



曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: cjj0909@163.com