

贝类食物中膝沟藻毒素快速筛选方法研究

周秀锦, 周向阳, 王淑娜, 徐君辉, 邵宏宏

(舟山出入境检验检疫局, 浙江 舟山 316000)

摘要: 为了建立了一种贝类食物中膝沟藻毒素快速筛选方法。将样品用 0.05 mol/L 的盐酸提取膝沟藻毒素, 阴离子柱净化提取液, 柱前衍生化反应后在波长为 310 nm 的紫外灯下观察有无荧光产生, 快速筛选贝类食物中的膝沟藻毒素。结果表明, 衍生化产物在避光条件下 30 min 内保持稳定, 当膝沟藻毒素添加量为 0.8 mg/kg 时, 荧光现象明显。与高效液相色谱分析的检测结果有较好的一致性。该方法快捷、准确, 可用于贝类食物中的膝沟藻毒素快速筛选。

关键词: 贝类食物; 膝沟藻毒素; 衍生化; 快速筛选

中图分类号: S944.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)02-0153-04

Development of A Method for Rapid Screening Gonyautoins in Shellfish

ZHOU Xiu-jin, ZHOU Xiang-yang, WANG Shu-na, XU Jun-hui, SHAO Hong-hong

(Zhoushan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316000, China)

Abstract: A method for rapid screening the gonyautoins in shellfish was developed in this study. Gonyautoins in the shellfish samples were extracted with 0.05 mol/L hydrochloric acid, the supernatant was cleaned up by passing through SPE anion exchange cartridge and derived by derivatization reagent. The derivatives were inspected by UV lamp at 310 nm. The fluorescence signal of the samples spiked at 0.8 mg/kg with gonyautoins were obviously observed and kept stable in 30 minutes. The results showed consistent credibility and accuracy as compared to the method with HPLC. The method of extraction and derivation of gonyautoins from shellfish samples were established.

Key words: Shellfish; Gonyautoins; Derivatization; Rapid screening

麻痹性贝类毒素(PSP)是最早发现的一类贝类毒素, 是到目前为止分布最广、通过食物链传递对人类危害最严重的毒素之一。许多国家制订了贝类中PSP的限量标准。美国、欧盟、我国质监总局发布水产品中PSP的法规限量, 要求其毒性总和不高于0.8 mg/kg。

PSP 是一类烷基氢化嘌呤化合物, 目前已知有 20 多种毒素, 其中石房蛤毒素(STX)、新石房蛤毒素(neoSTX)、膝沟藻毒素 1-4(GTX 1-4)最常见, 对

于它们的研究也最为广泛^[1]。江天久等^[2]、胡颖琰等^[3]对舟山海域的麻痹性贝类毒素进行调查后发现, 舟山渔场主要存在的贝毒成分为 GTX1-4 和 STX。目前国内外建立了多种方法检测贝类毒素, 主要有生物法、理化分析方法、免疫化学法。然而, 生物法灵敏度低, 在标准程序中不同小鼠的品系、批次、损伤程度和大小对毒素的灵敏度有很大的波动性^[4-5]。理化分析方法主要是液相色谱法, 包括 Oshima95及改进方法^[6-8]的柱后衍生和 Lawrence

收稿日期: 2010-07-15

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目(2008F70067)

作者简介: 周秀锦(1974-), 女, 河南商水人, 工程师, 硕士, 主要从事理化分析与食品安全研究。E-mail: zxsj@zsj.zj.gov.cn

等^[9-11]柱前衍生方法等,但是麻痹性贝类毒素类似物的毒性种类都是唯一的,很多类似物很容易相互转化,对样品中的原始或潜在总毒性作出判断较困难,且存在 PSP 分析标准品全球缺乏的普遍问题。免疫化学法目前缺乏合适的结合物与所有的 PSP 特异性结合。目前,快速筛选海产品中贝类毒素的方法少有报道。鉴此,采用便携式紫外灯筛选,研究了固相萃取、柱前衍生的快速衍生反应机制,检测了衍生化产物的检测灵敏度及其稳定性,以探寻缩短样品前处理的技术与方法,为贝类食品质量安全的日常监管、安全预警的决策提供技术保障。

1 材料和方法

1.1 试剂和设备

试剂:盐酸、冰醋酸、氨水、氢氧化钠、乙醇、乙酸乙酯、乙酸异戊酯、甲酸铵、磷酸铵、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、过氧化氢、高碘酸等为分析纯;乙腈为色谱纯;衍生化试剂 01、衍生化试剂 02、阴离子交换柱(自填;3mL);膝沟藻毒素标准品: GTX1-4、GTX2-3;试验用水为去离子水;样品为新鲜贻贝,购于舟山水产品批发市场。

设备:高效液相色谱仪(Agilent HPLC 1100)、Gemini C18 reversed-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Phenomenex, Manchester, UK)水浴锅、恒温水浴锅、离心机、UV-II 型紫外灯等。

1.2 测定条件

1.2.1 紫外灯检测条件 根据 Turner 等^[12]的研究结果,衍生产物在激发波长为 340nm 时,发射的蓝紫色荧光波长为 390nm,强度最大;激发波长增大和减小都使发射的荧光有一定程度的减弱。由于受到紫外灯规格的限制,只选取接近的 312nm 的紫外灯。

1.2.2 色谱条件 色谱柱: Gemini C18 reversed-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Phenomenex, Manchester, UK);流动相: 0.1 mol/L 的甲酸铵(用 0.1 mol/L 的乙酸调 pH=6.0)和 0.1 mol/L 的甲酸铵(用 0.1 mol/L 的乙酸调 pH=6.0)+5% 的乙腈等比例洗脱;流速: 1 mL/min;检测波长: 激发波长: 340 nm, 发射波长: 395 nm。进样量: 30 μL。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的快速衍生 用 0.003 mol/L 的盐酸溶液将 GTX1-4 和 GTX2-3 标准品稀释到不同的质量浓度。分别取 200 μL 质量浓度为 0.5、1.0 g/L 的 GTX1-4 和 GTX2-3 加入 200 μL 衍生化试

剂 01 和 50 μL 氨水溶液,在 40 °C 条件下衍生 5 min,取出加入 50 μL 0.05 mol/L 醋酸溶液,摇匀后静置 10 min;加入 200 μL 衍生化试剂 02,在 60 °C 水浴中反应 50 min。取出,加到白色点滴板上,在波长 310nm 紫外灯下观察。每个质量浓度 5 次重复,同时做试剂空白试验。

另取一组质量浓度为 0.5、1.0 g/L 的 GTX1-4 和 GTX2-3 标准工作液,按照 1.3.1 的步骤进行衍生化,以试剂空白加标为对照,衍生化产物过 0.45 μm 滤膜,高效液相色谱待测。

1.3.2 贝类样品的前处理方法

1.3.2.1 样品提取和净化 取匀质的贝肉 5.0 g,加入 6 mL 0.05 mol/L 的盐酸溶液,漩涡混匀后沸水浴 5 min。取出冷却,4000 r/min 离心 5 min,吸取全部上清液,用氨水溶液调节 pH 为 8.0,过脱脂棉柱管(不需要活化),抽干柱管,收集滤液过离子交换柱(5 mL 甲醇活化,5 mL 蒸馏水平衡),控制流速为 1~2 滴/s,弃去流出液并抽干柱体;在交换柱中加入 0.5 mL 的 0.05 mol/L 的醋酸溶液洗脱,收集洗脱液。

1.3.2.2 样品衍生 取 200 μL 洗脱液,加入 200 μL 衍生化试剂 01 和 50 μL 氨水溶液,在 40 °C 条件下衍生 5 min,取出加入 50 μL 0.05 mol/L 的醋酸溶液,摇匀后静置 10 min;加入 200 μL 衍生化试剂 02,在 60 °C 水浴中反应 50 min。取出,加到白色点滴板上,在波长 310nm 紫外灯下观察荧光,根据有无产生荧光进行结果判定。

1.4 衍生化产物稳定性试验

膝沟藻毒素添加量分别为 0.8、1.2 mg/kg,平行测定 5 次。按 1.3.2 步骤进行样品前处理,提取液进行 2 组衍生化反应,一组在衍生化后 1 min、5 min、10 min、25 min、50 min、100 min 分别观察荧光现象,另一组衍生后过 0.45 μm 滤膜,高效液相色谱待测。

1.5 检测灵敏度试验

在空白贝肉样品添加 0.8、1.2 mg/kg 的膝沟藻毒素标准溶液,各做 12 个平行,设空白贝肉为对照,按照 1.3.2 方法快速提取和衍生,测定检测灵敏度。

1.6 液相色谱(HPLC)对比验证试验

在空白贝肉样品中添加膝沟藻毒素标准溶液,使其最终质量浓度为 0.8、1.6、3.2、5.0 mg/kg,每个样品重复 6 次,按照 1.3 步骤进行样品前处理,样液过 0.45 μm 微孔滤膜,分别用便携式紫外灯 UV-II 与高效液相色谱仪测定,分析 2 种检测方法的相符性。

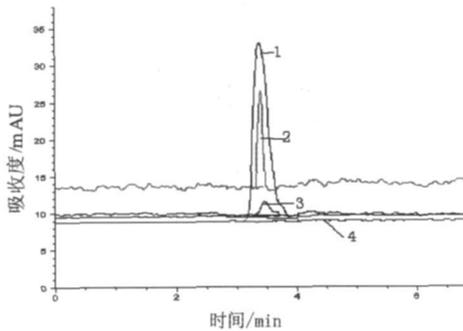
2 结果与分析

2.1 样品前处理的最优条件

2.1.1 pH 对柱保留效率的影响 取5份贝肉,提取处理后取滤液,用氨水—氯化铵溶液调节 pH 分别为 7、8、9、10、12,各自吸取 3 mL 过离子交换柱,收集流出液并挤干柱体;加入 0.5 mL 0.05 mol/L 的醋酸溶液于柱子中洗脱,收集洗脱液。按照 1.3.2 步骤进行衍生化,以试剂空白加标为对照,使用高效液相色谱—荧光检测器检测离子交换柱在不同 pH 值下的保留效率,从而选择最佳的 pH 值。结果表明, pH 值为 7 时,无明显色谱峰; pH 值 ≥ 9 时,有杂质干扰;而 pH 值为 8 时,交换柱的保留效率最好。

2.1.2 pH 值对衍生化效果的影响 取过柱后的洗脱液,调节 pH 值分别为 6、7、8、10、12,按照 1.3.2 的步骤进行衍生化,采用高效液相色谱—荧光检测器检测不同 pH 值下的衍生化效果,从而选择最佳的衍生化 pH 值。结果表明, pH 值为 6 时,未出现目标色谱峰; pH 值 ≥ 10 时,有其他物质或分解产物的干扰;而 pH 值为 8 左右时,衍生效果最为理想。

2.1.3 衍生反应温度、时间的确定 膝沟藻毒素在常温下即可进行衍生化反应,为防止衍生物的分解,采用 40 °C 水浴条件进行试验。由于衍生化产物在碱性条件下不够稳定,易分解,将时间控制在 5 min 效果较好,当衍生时间大于 5 min 以后,高效液相色谱峰响应值明显降低(图 1)。后续的衍生化反应在酸性条件下进行,但要注意避光。



1. 衍生5 min 的色谱峰; 2. 衍生10 min 的色谱峰;
3. 衍生2 min 的色谱峰; 4. 空白试剂对照

图 1 不同衍生时间的高效液相色谱

2.2 贝类样品中膝沟藻毒素的检测结果

在 UV-II 紫外灯下观察,膝沟藻毒素标准物质衍生物呈明显的蓝紫色荧光,且随着毒素含量的增加荧光强度增强,空白对照则不显荧光。当膝沟藻毒素标准质量浓度为 0.5 g/L 时,其衍生物在反应孔呈蓝紫色荧光。同时,将该衍生物进行高效液相

色谱测定,它在色谱柱上的保留时间为 (3.415 ± 0.2) min,色谱峰分离较好(图 2)。

被检贝类样品中,阳性样品的衍生化产物在 UV-II 紫外灯下呈现蓝紫色荧光,阴性样品无荧光,阴性样品和阳性样品的紫外筛查二者差别明显,另外,使用该方法的检测结果与高效液相色谱法的检测结果有较好的一致性,也证实了此方法是可行的。

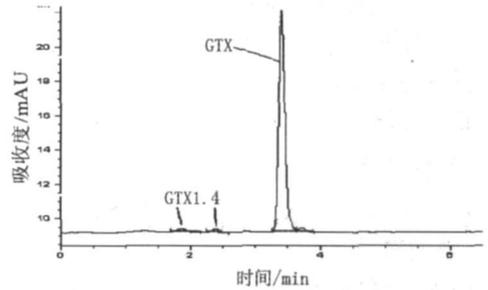


图 2 0.5 g/L 的 GTX 混标衍生物高效液相色谱

2.3 衍生化产物稳定性试验结果

膝沟藻毒素添加至贝肉样品中,按照 1.3.2 步骤进行样品前处理,分别在 1 min、5 min、10 min、30 min、50 min、100 min 时观察荧光。试验结果表明,在避光条件下,衍生化产物在 30 min 时相对稳定,在 UV-II 紫外灯光下的荧光现象明显,说明衍生化产物的稳定时间可以满足日常筛选所需时间的要求。

2.4 检测灵敏度试验结果

在空白贝肉样品中添加膝沟藻毒素标准溶液,以空白贝肉为对照,按照 1.3.2 方法快速提取和衍生,测定检测灵敏度。当膝沟藻毒素添加量分别为 0.8、1.0 mg/kg 时,均可观察到明显的荧光,而阴性样品无荧光出现。结果表明,该方法的灵敏度检测特性可以满足国内外贝类毒素的法规限量为 0.8 mg/kg 的检测要求。

2.5 液相色谱(HPLC)对比验证试验结果

膝沟藻毒素在 0.8 ~ 5.0 mg/kg 范围内进行测定,以膝沟藻毒素添加量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制膝沟藻毒素标准曲线,线性方程为 $Y = 0.49 \times 10^3 x + 0.47$, $R^2 = 0.9978$,保留时间为 (3.415 ± 0.2) min。同系列毒素添加量的贝肉样品用便携式紫外灯 UV-II 检测,均可观察到明显的荧光现象,表明经该方法快速处理样品,形成特异性的膝沟藻毒素衍生化产物,并在 UV-II 紫外灯下有好的荧光性质,可用于膝沟藻毒素的快速筛查。

3 结论与讨论

贝类样品采用盐酸溶液提取,离子交换柱净化

富集, 醋酸溶液洗脱; 在弱碱性条件下进行第一步衍生化, 酸性条件下第二步衍生化; 310 nm 紫外光激发荧光进行检测; 衍生化产物在 30 min 内保持相对稳定, 与高效液相色谱检测方法有较高的相符性, 可满足贝类食品中膝沟藻毒素的快速筛查。生物测定法虽然易掌握, 不需要专门的仪器设备, 但缺点是专一性差, 操作繁琐, 且小鼠的品系、大小和损伤程度等因素均可影响到该法的灵敏度。黄宗锈等^[13]在生物法数据分析中对表达 PSP 毒性结果准确度的中位数法提出了质疑, 建议进行更多数据的总结和分析进行论证。本试验建立的方法与高效液相色谱法^[9-12] (HPLC) 相比, 虽然原理基本一致, 都是基于毒素在碱性条件下氧化生成荧光物质, 进行荧光检测; 二者的区别在于该方法无需昂贵的仪器设备和专业操作人员, 只需配备简易的设备便可用于现场操作, 样品前处理比较简单, 检测成本较低, 可大力推广使用。该方法可结合实验室高效液相色谱或液质联用确证方法, 形成联合技术体系, 为贝类食品质量安全的日常监管、安全预警的决策提供技术保障。

参考文献:

- [1] 林燕堂, 贾晓平, 杨美兰, 等. 中国沿海染毒贝类的麻痹性毒素[J]. 热带海洋, 1999, 1(18): 1-21.
- [2] 江天久, 陈菊芳, 邹迎麟, 等. 中国东海和南海有害赤潮高发区麻痹性贝毒素研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1156-1160.
- [3] 胡颢琰, 唐静亮, 黄备, 等. 舟山渔场及其相邻赤潮高发区麻痹性贝类毒素研究[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(5): 475-480.
- [4] Sommer H, Meyer K F. Paralytic shell-fish poisoning [J]. American Medical Association Archives of Pathology, 1984, 24: 560-598.
- [5] Ravn H. Toxicological and chemical aspects of paralytic shellfish poisoning (PSP) [M]. Vigo: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1995.
- [6] Oshima Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins [J]. J AOAC Int, 1995, 78: 528-532.
- [7] Leo J M, Gago A, Rodríguez-Vázquez J A, et al. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography procedures for the analysis of paralytic shellfish toxins [J]. J Chromatogr, 1998, 798: 131-136.
- [8] Bire R, Krysz S, Fremy J M, et al. Improved solid phase extraction procedure in the analysis of paralytic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 6386-6390.
- [9] Lawrence J F, Menard C. Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation [J]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1991, 74: 1006-1012.
- [10] Lawrence J F, Menard C, Charbonneau C F, et al. A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1991, 74: 404-409.
- [11] Lawrence J F, Ménard C, Cleroux C. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish [J]. J AOAC Int, 1995, 78: 514-520.
- [12] Turner A D, Norton D M, Hatfield R G, et al. Refinement and extension of AOAC method to include additional toxins in mussels: single laboratory validation [J]. J AOAC Int, 2009, 92: 190-207.
- [13] 黄宗锈, 林健, 陈冠敏, 等. 麻痹性贝类毒素小鼠生物法检测中位数法与均数法差异性比较 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2): 369-370.