

辛基功能化离子液体键合硅胶固相萃取海水中 贝类毒素的方法研究

孙晓杰¹ 丁海燕¹ 谭杰^{*1,2} 邢钧³ 郭萌萌¹ 邢丽红¹
李兆新^{*1} 翟毓秀¹

¹(农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

²(青岛海洋科学与技术国家实验室, 青岛 266000)

³(武汉大学化学与分子科学学院, 生物医学分析化学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘 要 贝类毒素 (Shellfish toxins) 是重点监控的海洋污染物。本研究通过将辛基功能化离子液体接枝到硅胶表面, 制备了一种混合模式的共价键合硅胶材料 (Silica-[SOIM][PF₆]), 利用红外光谱、核磁共振和元素分析进行了表征。采用自制材料填制固相萃取柱, 通过固相萃取-液相色谱-质谱联用 (SPE-LC-MS/MS) 技术对海水中贝类毒素 (大田软海绵酸毒素 (OA)、鳍藻毒素-1 (DTX-1) 和鳍藻毒素-2 (DTX-2)) 进行富集检测。研究发现, 此固相萃取材料与目标贝类毒素可能存在疏水作用和离子交换作用等多重相互作用。分别对进样溶液的体积和 pH 值、淋洗剂和洗脱剂的种类、用量以及 pH 值范围等因素进行了优化。结果表明, 此固相萃取材料对海水中 3 种贝类毒素具有良好的萃取效果, 优于或与商用化萃取材料性能相当, 检出限 (LOD) 为 0.01 μg/L, 定量限 (LOQ) 为 0.05 μg/L, 在 0.02 ~ 2.50 μg/L 范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.995$), 回收率在 93.0% ~ 116% 之间。同时, 材料具有良好的重现性, 批内和批间的相对标准偏差均小于 15%。本方法准确、灵敏、简便、可靠, 可用于实际样品中贝类毒素的萃取检测。

关键词 离子液体; 固相萃取; 混合模式; 贝类毒素; 海水

1 引言

我国是世界上最大的贝类养殖国。海洋中有毒微藻或微生物产生的贝类毒素, 可污染海洋水体和海洋生物, 并主要在双壳贝类中富集, 可经食物链浓缩放大上万倍, 最终危害人类的生存和健康^[1~5]。贝类毒素已成为发达国家制定贸易和技术壁垒的重要指标。欧盟指令 (EC) No. 15/2011 规定小鼠生物法测定贝类毒素含量作为官方标准于 2014 年以后停用, 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 作为取代方法, 可对单个组分分别进行定性和定量分析, 已成为监测贝类毒素的重点发展方法^[6~12], 并建立了相应的检测标准^[13]。然而, 由于贝类毒素结构复杂、种类较多, 提取富集等前处理技术成为限制其准确定量分析的主要瓶颈。为更好地评价贝类毒素对海洋生态的影响, 监控赤潮等有毒藻类爆发, 保障贝类等水产品的质量安全, 亟需开发更有效的前处理方法和更灵敏的检测技术。

固相萃取是复杂样品富集净化的常用前处理技术, 目前, 用于污染物富集纯化的商用固相萃取柱与萃取对象作用模式单一。针对复杂样品中的多种组分分别提取纯化, 步骤繁多, 耗时费力, 成本较高, 同时耗用大量有机试剂, 造成严重环境污染。因此, 亟需研发含多种官能团的混合模式固相萃取材料, 实现对样品中复杂多组分同时富集纯化, 提高分离检测效率。离子液体 (Ionic liquids, ILs) 是一种新型的萃取材料, 凭借良好的热稳定性、低可燃性、不易挥发及低毒性等优点被广泛用于色谱样品的前处理^[14,15]。经过多年研究, 离子液体色谱材料的选择性能得到了逐步改善。将离子液体键合固定到载体上, 可得到具有离子液体功能结构的固相萃取 (Solid phase extraction, SPE) 新材料。目前, 固定化的离子液体多用于液相色谱柱^[16~18]、气相色谱柱^[19,20] 及毛细管电色谱柱^[21,22] 的固定相, 极少作为固相萃取吸附剂使用。Tian 等^[23] 于 2009 年首先提出了离子液体固相吸附剂的研究方案, 与离子液体-液液萃取

2019-06-27 收稿; 2019-11-07 接受

本文系国家重点研发计划项目 (No. 2017YFC1600705)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目 (Nos. 20603022016007, 20603022017015) 和国家自然科学基金项目 (No. 21207162) 资助

* E-mail: tanj@ysfri.ac.cn; lizx@ysfri.ac.cn

相比,可有效克服离子液体粘度大、不易操作等缺点,同时增大了被分离物质与离子液体的接触面积,在痕量组分的分离富集中具有良好的应用前景。固定化离子液体的相关研究起步较晚,主要用于萃取分离常见有机污染物^[24,25]。离子液体固相萃取材料可在保留原有固相载体性质的基础上,同时发挥离子液体的特异选择性。另外,萃取材料可再生重复利用,将有效减少离子液体的使用量,增加萃取材料的使用率,降低前处理成本。因而,制备新型的离子液体固相萃取材料,是发展高效萃取技术的重要途径之一。

本研究通过接枝方法将辛基功能化离子液体固定到硅胶载体上,即形成离子液体共价键合硅胶材料,是具有混合模式的功能化萃取材料,可实现对样品中多性质组分分离纯化的目标。由于离子液体具有大体积的阳离子和小体积的阴离子,与偏酸性目标物可能存在阴离子交换作用。因此,选择 3 种弱酸性贝类毒素(大田软海绵酸毒素(Okadaic acid, OA)、鳍藻毒素-1(Dinophysistoxin-1, DTX-1)和鳍藻毒素-2(Dinophysistoxin-2, DTX-2))作为目标物,将 ILs-SPE 技术应用于海水样品中 OA、DTX-1 和 DTX-2 的富集和净化。优化了进样溶液的体积和 pH 值、淋洗剂和洗脱剂的种类、用量及 pH 值等条件,考察了各种因素对萃取效果的影响,评价了检测方法的可行性和重现性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

TSQ Quantum AccessTM 液相色谱-串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Kinetex XB C₁₈ 色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 4 μm, 美国 Phenomenex 公司); XW-80A 型旋涡混合器(上海医大仪器厂); Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司); Thermo Sorvall Biofuge Primo 型离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Karlsruhe 红外光谱仪、Avance II spectrometer 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); Vario EL cube 元素分析仪(德国 Elementar 公司)。Oasis HLB 固相萃取(SPE)柱(3 mL, 60 mg, 美国 Waters 公司)和 C₁₈ 固相萃取柱(3 mL, 60 mg, 天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

OA 和 DTX-1 标准品(纯度 ≥ 95%, 台湾 Algal Science 公司); DTX-2 标准溶液((4.7 ± 0.3) μg/mL, 加拿大海洋生物科学研究所); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙腈(色谱纯, 德国 CNW 公司); 甲酸、甲酸铵(色谱纯, 德国 Fluka 公司); 1-苄基咪唑(色谱纯, Fluka 公司); 六氟磷酸钾(色谱纯, J&K Chemical 公司)。其余溶剂和试剂均为分析纯, 实验用水为来自 Milli-Q 超纯水系统的超纯水。

混合标准使用液:分别称取适量的 OA 和 DTX-1 标准品,用甲醇定容,配制成 10.0 μg/mL 的标准储备液,于-18℃避光保存。准确吸取适量的 OA、DTX-1 和 DTX-2 标准储备溶液,用甲醇配制 1.00 μg/mL 的混合标准溶液,于-18℃避光保存。

2.2 仪器条件和参数

柱温:35℃; 流速:0.3 mL/min; 进样量:10 μL; 流动相, A:2 mmol/L 甲酸铵溶液, B:乙腈-2 mmol/L 甲酸铵溶液(95:5, V/V), 梯度洗脱程序:0 min, 30% B; 0 ~ 3.00 min, 30% ~ 90% B; 3.00 ~ 6.00 min, 90% B; 6.00 ~ 6.01 min, 90% ~ 30% B; 6.01 ~ 8.00 min, 30% B。

电喷雾电离源(ESI), 多反应监测(MRM)离子模式; 负离子监测; 喷雾电压为 4000 V; 鞘气和辅助气体均为高纯氮气, 鞘气压力:36 L/min, 辅助气压力:10 L/min, 碰撞气为氦气; 离子传输杆温度为 350℃。碰撞能(Collision energy)及其它相关质谱条件见表 1。

表 1 贝类毒素的质谱扫描参数
Table 1 Mass spectroscopy (MS) parameters for analysis of shellfish toxins

化合物 Compound	扫描模式 Scanning mode	母离子 Parent ions (<i>m/z</i>)	子离子 Product ions (<i>m/z</i>)	碰撞能量 Collision energy (eV)
Okadaic acid (OA)	ESI ⁻	803.5	255.1 [*] , 563.4	45, 41
Dinophysistoxin-2 (DTX-2)	ESI ⁻	803.5	255.1 [*] , 563.4	45, 41
Dinophysistoxin-1 (DTX-1)	ESI ⁻	817.4	255.1 [*] , 151.0	47, 51

Note: * indicates quantitative ion; ESI, electrospray ionization.

2.3 辛基离子液体键合硅胶 (Silica-[SOIM][PF₆]) 的制备

离子液体及键合硅胶的制备过程参照图 1。

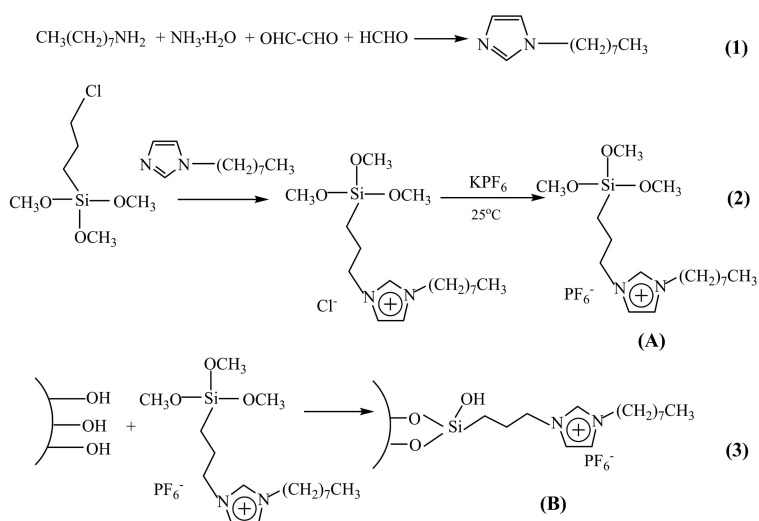


图 1 离子液体键合硅胶材料的合成路线

Fig. 1 Schematic for preparation of ionic liquid-modified silica

2.3.1 辛基咪唑的合成 将体积分数为 36% 甲醛 (8.35 g) 和体积分数为 32% 乙二醛 (18.1 g) 加入 250 mL 三口烧瓶中, 搅拌加热至 50℃ 回流, 然后分别将体积分数 28% 氨水 (6.05 g) 和辛胺的甲醇溶液 (12.9 g 溶于 50 mL 甲醇) 逐滴加入到三口烧瓶, 加完后继续回流反应 4 h, 纯化干燥得到淡黄色辛基咪唑产品。

2.3.2 硅烷基辛基咪唑氯盐的合成 将 γ -氯丙基三甲氧基硅烷的甲苯溶液 (0.08 mol, 15.9 g, 溶于 25 mL 甲苯) 加入三口烧瓶中, 将 2.3.1 节制得的辛基咪唑 (0.08 mol, 14.4 g) 加入溶解并搅拌均匀, 在氮气气氛下回流 48 h, 产物纯化干燥得到粘稠状淡黄色液体, 即硅烷基辛基咪唑氯盐 ([SOIM][Cl])。

2.3.3 硅烷基辛基咪唑六氟磷酸盐的合成 将硅烷基辛基咪唑氯盐的甲醇溶液 (0.05 mol, 18.9 g, 溶于 25 mL 甲醇中) 加入圆底烧瓶中, 同时将等摩尔的 KPF₆ 溶于甲醇 (0.05 mol, 9.20 g, 溶于 10 mL 甲醇), 将两种溶液混合, 室温搅拌反应 24 h, 得到淡黄色沉淀; 纯化干燥得到粘稠状淡黄色液体, 即硅烷基辛基咪唑六氟磷酸盐 ([SOIM][PF₆])。

2.3.4 离子液体键合硅胶的制备 选择粒径 200~300 目的硅胶粉, 通过一定浓度的 HCl 或甲烷磺酸酸化, 使硅胶外表面带有羟基, 调节 pH 至中性后高温干燥, 备用。称取约 2 g 辛基离子液体 [SOIM][PF₆] 溶于 10 mL 乙腈, 再加入 HCl 处理的硅胶 (40~60 目) 约 4 g, 氮气保护下回流反应 24 h 后; 将反应液过滤, 用乙腈和去离子水冲洗去除残留物, 80℃ 真空干燥 5 h, 得到淡黄色离子液体键合硅胶 Silica-[SOIM][PF₆], 产率约 80%。

2.4 离子液体键合材料性能分析

通过多种仪器分析商用硅胶和离子液体键合硅胶的结构、构型以及二者的差异。首先通过红外光谱表征比较键合离子液体前后硅胶材料官能团结构的变化; 其次, 采用核磁共振技术于确定功能化离子液体的结构; 然后, 通过元素分析, 得到离子液体键合硅胶材料中 C、H、N 元素的百分含量, 并计算硅胶表面离子液体的键合含量。

2.5 固相萃取柱的制备

选用固相萃取柱的柱管体积为 3 mL, 柱管材料为聚丙烯, 进出口筛板选用高纯度聚乙烯材料 (直径 6.4 mm, 孔径 20 μm , 厚度 1.5 mm), 内部填充固相萃取填料选用自制的 Silica-[SOIM][PF₆] (50 mg, 粒径 40~60 μm)。先在空柱管底部放入出口筛板, 然后装入自制离子液体键合硅胶层, 轻轻敲打使其分布均匀, 其上垂直压入进口筛板, 最后用甲醇冲洗填实, 并保证所有小柱填充后, 填料高度保持 (5 $\pm$ 0.05) mm。

2.6 样品处理

海水水样用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 除去悬浮颗粒。固相萃取柱使用前, 分别用 $2.0\ \text{mL}$ 甲醇和 $2.0\ \text{mL}$ $50\ \text{mmol/L}$ 乙酸铵活化, 弃去流出液。取 $20\ \text{mL}$ 过滤后的海水样品, 以约 $5.0\ \text{mL/min}$ 流速通过活化的固相萃取小柱进行富集。用 $2.0\ \text{mL}$ $50\ \text{mmol/L}$ 乙酸铵淋洗, 减压抽干后, 用 $3.0\ \text{mL}$ 体积分数为 5% 的 NH_4OH -甲醇洗脱, 洗脱液在 40°C 下氮气吹干, 用 $0.5\ \text{mL}$ 初始流动相复溶, 充分涡旋溶解残渣, 滤液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

3 结果与讨论

3.1 红外光谱分析

红外光谱 (IR) 是提供结构和构象信息的有力工具^[26,27]。对离子液体 $[\text{SOIM}][\text{PF}_6]$ 的红外光谱表征发现, 3127 和 $3059\ \text{cm}^{-1}$ 对应于咪唑环上 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动, 2958 、 2932 和 $2868\ \text{cm}^{-1}$ 对应于甲基和亚甲基的伸缩振动, $1156\ \text{cm}^{-1}$ 对应于 $\text{Si}-\text{C}$ 的伸缩振动, $1083\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1023\ \text{cm}^{-1}$ 对应于 $\text{Si}-\text{O}$ 的伸缩振动, 证明存在硅烷基。

与未修饰的商用硅胶材料相比, 制备的离子液体键合硅胶在 $1570\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了一个弱峰 (图 2)。因为酰胺基的特征峰处于 $1500 \sim 1600\ \text{cm}^{-1}$ 之间^[28], 这说明一些带有 $\text{C}-\text{N}$ 基团的离子液体与商用硅胶有效的化学键合生成了新的物质。上述结果表明成功制备了功能化离子液体键合硅胶。

3.2 核磁共振谱分析

离子液体 $[\text{SOIM}][\text{PF}_6]$ 核磁共振分析结果如下: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO , 不含 TMS ; $400\ \text{MHz}$; $\delta\ \text{ppm}$): $9.16\ (\text{s}, 1\text{H})$, $7.78\ (\text{m}, 2\text{H})$, $4.15\ (\text{m}, 4\text{H})$, $3.47\ (\text{m}, 9\text{H})$, $1.85\ (\text{m}, 4\text{H})$, $1.25\ (\text{m}, 10\text{H})$, $0.86\ (\text{t}, 3\text{H})$, $0.54\ (\text{m}, 2\text{H})$ 。其中, 9.16 和 7.78 对应咪唑环上的 H 的位移, 4.15 对应与咪唑环相连的两个亚甲基上 H 的位移, 3.47 对应硅烷基上 H 的位移, 1.85 对应与咪唑环相连的第二个亚甲基 H 的位移, 1.25 对应辛基取代基上 5 个亚甲基 H 的位移, 0.86 对应辛基取代基上甲基 H 的位移, 0.54 对应于与硅烷基相连的亚甲基 H 的位移。结果表明, 成功制备了辛基功能化离子液体。

3.3 元素分析

对修饰前后的硅胶材料进行元素分析, 未修饰硅胶中只测得 H 元素的含量 (0.983%), 辛基功能化离子液体修饰后, N 、 C 和 H 元素的质量百分含量分别为 2.73% 、 9.65% 和 2.07% , 说明离子液体成功修饰到硅胶上, 并可根据 N 元素的含量推算出 $1\ \text{g}$ 硅球表面有机基团键合量, 对应辛基功能化离子液体的键合量为 $1.95\ \text{mmol}$ 。

3.4 固相萃取条件优化

采用制备的辛基离子液体键合硅胶 $\text{Silica}-[\text{SOIM}][\text{PF}_6]$ 填制固相萃取柱 ($3\ \text{mL}$, $50\ \text{mg}$), 用于富集净化水中 3 种贝类毒素 OA 、 DTX-1 和 DTX-2 。采用空白基质加标方式 ($0.5\ \mu\text{g/L}$), 对影响萃取效率和回收率的参数进行优化, 包括样品预处理条件、样品溶液进样条件、杂质淋洗条件和目标物洗脱条件, 每个条件下做 6 个平行实验。

3.4.1 进样溶液体积的影响 固相萃取填料有载样上限, 超负荷进样, 会影响目标物的回收率和净化效果。取适量贝类毒素 (OA 、 DTX-1 和 DTX-2) 混合加标浓度为 $0.5\ \mu\text{g/L}$ 的海水进行分析, 研究不同进样体积 (5 、 10 、 20 、 30 和 $50\ \text{mL}$) 对萃取效果的影响 (本研究部分均采用 $2.0\ \text{mL}$ 纯水淋洗, $2.0\ \text{mL}$ 甲醇洗脱), 结果见图 3。

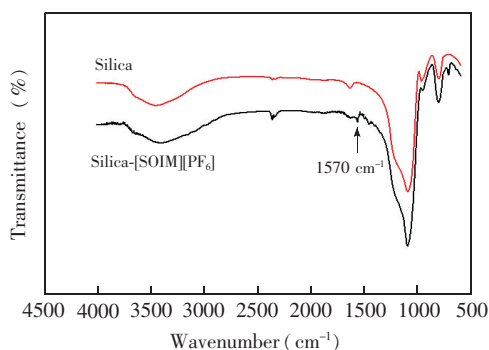


图2 商用硅胶 (Silica) 和离子液体修饰硅胶 ($\text{Silica}-[\text{SOIM}][\text{PF}_6]$) 的红外光谱图

Fig. 2 Infrared (IR) spectra of silica and silica- $[\text{SOIM}][\text{PF}_6]$

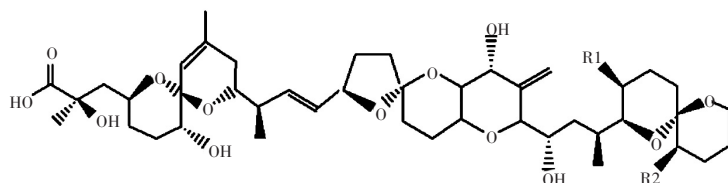
根据公式(1)计算富集倍数(EFs):

$$EFs = C_i/C_0 = (n_i/V_i)/C_0 \quad (1)$$

其中, C_i 为最终样品溶液中目标物浓度, C_0 为初始样品溶液中目标物浓度, n_i 为目标物最终摩尔量, V_i 为最终定容溶液体积。

当最终定容溶液体积 V_i 和初始样品溶液浓度 C_0 确定后, 进样量越大, 对应最终摩尔量 n_i 越大, 富集倍数越高, 方法灵敏度越好。然实验中发现, 随着进样体积增大, 引入杂质增多, 对目标物的干扰增大, 且进样速度变缓, 50 mL 整体进样时间超过 0.5 h, 增大了净化难度。综合考虑方法的前处理效率和灵敏度, 最终选择进样体积为 20 mL。

3.4.2 进样溶液 pH 值的影响 辛基离子液体键合硅胶 Silica-[SOIM][PF₆] 含有阴阳离子基, 可能与目标贝类毒素发生疏水作用、离子交换作用和静电作用等多种模式作用。如图 4 所示, 3 种贝类毒素的结构中都含有羧基, 在不同 pH 值条件下稳定态不同, 可能影响其回收率。分别通过甲酸和氨水调整进样海水 pH 值, 取 20 mL 海水进样, 比较了 pH 5.5 (5% 甲酸)、pH 10.5 (5% 氨水)、pH 7.0 和 8.0 (常规海水 pH 值为 7.5 ~ 8.3) 的贝毒加标海水样品 (0.5 μg/L) 的回收率 (均采用 2.0 mL 纯水淋洗, 2.0 mL 甲醇洗脱)。结果表明, 当进样液 pH 值为 7.0 和 8.0 时, 目标贝类毒素的回收率均大于 80% (图 5), 明显高于弱酸 (pH 5.5) 和弱碱 (pH 10.5) 条件, 说明离子交换作用可能不是 Silica-[SOIM][PF₆] 型小柱与贝类毒素间的主要作用力。为操作方便和方法的可重复性, 海水样品可采取直接萃取富集, 不调整 pH 值的方式。



OA: R1=CH₃, R2=H; DTX-1: R1=CH₃, R2=CH₃; DTX-2: R1=H, R2=CH₃

图 4 贝类毒素 OA、DTX-1 和 DTX-2 的分子结构

Fig. 4 Molecular structures of shellfish toxins OA, DTX-1 and DTX-2

3.4.3 淋洗溶剂的影响 对复杂基质样品, 为排除基质干扰及提高检测灵敏度, 洗脱目标物之前需增加淋洗步骤。由于硅胶表面修饰了离子液体, 同时检测对象为海水样品, 沸点高且盐含量较高, 为避免对质谱仪器造成污染, 固相萃取过程的第一步淋洗剂采用纯水, 可去除大量水溶性干扰物。取 20 mL 贝类毒素 (OA、DTX-1 和 DTX-2) 混合加标浓度为 0.5 μg/L 的海水进样, 分别评价了 30% 甲醇、纯水和 50 mmol/L 乙酸铵溶液作为淋洗液的净化效果和回收率 (2.0 mL 甲醇洗脱)。结果发现, 30% 甲醇和纯水淋洗时, 3 种贝类毒素都有不同程度损失, 说明离子交换作用可能不是自制 Silica-[SOIM][PF₆] 柱与目标贝类毒素间的主要作用力。当使用 50 mmol/L 乙酸铵作为淋洗液时, 目标贝类毒素的回收率最高、损失最小。此外, 为确定淋洗液的用量, 考察了不同体积 (1.0 ~ 6.0 mL) 淋洗液的效果, 当体积小于 2.0 mL 时, 随淋洗液用量增加, 洗出液的干扰量逐渐增大; 当淋洗液大

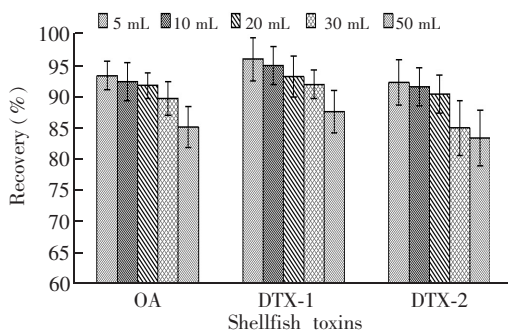


图 3 进样溶液体积对萃取效果的影响

Fig. 3 Effect of volume of sample solution on recovery

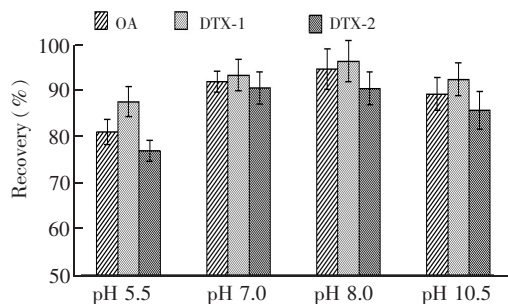


图 5 进样溶液 pH 值对萃取效果的影响

Fig. 5 Effect of pH values of sample solutions on recovery

于 2.0 mL 后,不再出现干扰峰。因此,选择 2 mL 50 mmol/L 乙酸铵作为后续研究的淋洗剂。

3.4.4 洗脱溶剂的影响 如图 4 所示,3 种目标贝类毒素结构中都含有羧基基团,属于弱酸性物质。考虑到 Silica-[SOIM][PF₆]₃ 上咪唑基的弱碱性,适当 pH 值的洗脱溶剂可使辛基离子液体键合硅胶 Silica-[SOIM][PF₆]₃ 或目标贝类毒素变为中性,从而可能打破吸附剂与目标分子间的相互作用力。因此,洗脱溶剂 pH 值可能是影响贝类毒素从 Silica-[SOIM][PF₆]₃ 柱上洗脱效果的重要因素。以 5% NH₄OH-甲醇、2% HAc-甲醇和纯甲醇作为洗脱溶剂进行了初步测试。结果表明(表 2),采用纯甲醇洗脱时,3 种贝类毒素的回收率均大于 85%,推测 Silica-[SOIM][PF₆]₃ 材料的保留性能同反相 C₁₈ 小柱相似,与目标贝类毒素间存在疏水作用力;另外,5% NH₄OH-甲醇洗脱不仅能得到无色、澄清的流出液体,而且回收率优于 2% HAc-甲醇和纯甲醇,推测 Silica-[SOIM][PF₆]₃ 材料与 3 种贝类毒素间同时存在阴离子交换作用,部分以阴离子状态存在的贝类毒素转化成分子形式被洗脱下来。因此,选择含有 NH₄OH 的甲醇溶剂洗脱分析物。在此基础上,考察甲醇中 NH₄OH 含量(0%、2%、5% 和 10%)对回收率的影响。结果表明,NH₄OH 含量从 0 增加到 5%,3 种分析物的回收率迅速增加,当浓度进一步增加到 10% 时,回收率增大幅度变慢。因此,选择 5% NH₄OH-甲醇作为洗脱溶剂。对洗脱剂体积进行了优化,结果表明,3 mL 5% NH₄OH-甲醇即可充分洗脱分析物,过量会延长氮吹浓缩时间。因此,选择洗脱体积为 3 mL。

3.5 与商用萃取柱比较

贝类毒素的相关研究多采用 HLB 柱、C₁₈ 柱等净化材料。本研究通过空白海水加标方式(0.50 μg/L),分别对比了最优条件下自制离子液体键合硅胶柱(Silica-[SOIM][PF₆]₃)和两种商用化固相萃取柱(HLB 柱和 C₁₈ 柱(3 mL,60 mg))的净化效果和回收率。加标海水进样体积均为 20 mL。两种商用固相萃取小柱预先用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化,进样后用 2 mL 水淋洗、2 mL 甲醇洗脱。相应条件下做 6 个平行,回收率见表 3。结果表明,自制离子液体键合硅胶柱回收效果与商用 HLB 柱相当,均优于 C₁₈ 柱。自制的离子液体键合硅胶柱(Silica-[SOIM][PF₆]₃)与商用 C₁₈ 柱相比,不仅具有辛基疏水基团,与目标物间还可能存在离子交换作用等多种混合作用力,萃取效果明显改善。同时,自制小柱填料量(3 mL,50 mg)少于商用 HLB 柱(3 mL,60 mg),说明其萃取性能与同时具有亲脂亲水性能的 HLB 柱相当。

3.6 方法评价

3.6.1 方法的检出限及定量限 取 0.02 ~

2.50 μg/L 的混合贝类毒素海水进样,以色谱峰面积与贝毒混合标准溶液浓度绘制校正曲线,3 种贝类毒素线性相关方程分别为:OA, $y = -2.96676 + 2944.44x$ ($R^2 = 0.9969$);DTX-2, $y = 622.875 + 904.353x$ ($R^2 = 0.9995$);DTX-1: $y = 20.3688 + 2463.97x$ ($R^2 = 0.9997$)。3 种贝毒的检出限(LOD, $S/N > 3$)为 0.01 μg/L,定量限(LOQ, $S/N > 10$)为 0.05 μg/L,表明制备的离子液体键合硅胶具有较好的萃取效果。

3.6.2 方法的精密度及萃取材料的重现性 在优化条件下,通过贝类毒素加标水样(0.50 μg/L),考察方法的日内($n = 5$)和日间($n = 3$)精密度。在不同时间,测得 3 种贝类毒素的 RSD 在 2.8% ~ 12.3% 之间,表明此方法精密度较好。对同一批次和不同批次制备材料的萃取效果进行重现性评价,同一批次萃取材料($n = 5$)在同一时间对 3 种贝类毒素的 RSD 在 3.8% ~ 9.5% 之间,不同批次萃取材料($n = 3$)在同一时间测得结果 RSD 为 6.2% ~ 11.6%,说明此萃取材料的制备重现性良好。

3.7 实际应用

参照本研究 2.2 和 2.6 节的仪器检测方法和样品处理方法,按最优的萃取方法对取自青岛沙子口的海水样品进行处理,如图 6A 所示,海水样品中不含贝类毒素。为评价方法的富集净化效果,以此样

表 2 不同洗脱溶剂对贝类毒素各组分回收率的影响
Table 2 Recoveries of shellfish toxins eluted by different elution solutions ($n = 6$)

化合物 Compound	回收率 Recovery (%)		
	5% NH ₄ OH-MeOH	2% HAc-MeOH	MeOH
OA	108	94.5	88.4
DTX-1	116	92.3	96.8
DTX-2	93.0	85.4	86.2

表 3 不同固相萃取柱对贝类毒素各组分回收率的影响
Table 3 Effect of solid phase extraction cartridges on recoveries of shellfish toxins ($n = 6$)

化合物 Compound	回收率 Recovery (%)		
	Silica-[SOIM][PF ₆] ₃	HLB	C ₁₈
OA	108.0	103.0	68.4
DTX-1	116.0	98.3	69.8
DTX-2	93.0	95.0	96.2

品作为空白样品,添加两个浓度水平(0.2 和 1.0 $\mu\text{g/L}$)的贝类毒素,测定方法的回收率。贝类毒素加标海水样品的多反应监测(MRM)图见图 6B,经离子液体键合硅胶柱处理后,贝类毒素得到了有效富集净化,根据公式(1)计算富集倍数约为 40。如表 4 所示,3 种贝类毒素的加标回收率在 93.0% ~ 116.0% 之间,RSD 均小于 12%。结果表明,自制离子液体键合硅胶固相萃取材料及相关前处理方法适用于海水中贝类毒素的萃取检测。

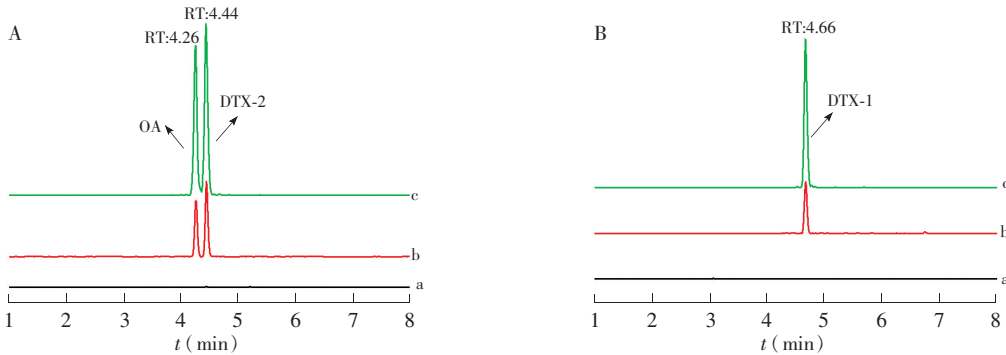


图 6 海水中贝类毒素多反应监测模式色谱图: (A) OA 和 DTX-2; (B) DTX-1
a. 空白海水经固相萃取柱富集; b. 贝类毒素加标海水经固相萃取柱富集; c. 贝类毒素标准溶液

Fig. 6 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of shellfish toxins: (A) OA and DTX-2; (B) DTX-1
a. blank seawater extracted by silica-[SOIM][PF₆] cartridge; b. shellfish toxins spiked seawater extracted by silica-[SOIM][PF₆] cartridge (0.20 $\mu\text{g/L}$); c. standard solution of shellfish toxins (20 ng/mL)

4 结论

制备了一种混合模式辛基功能化离子液体共价键合硅胶萃取材料,并应用于海水中贝类毒素的萃取分析。研究表明,此固相萃取材料可能通过疏水作用、离子交换作用等多种模式与目标贝类毒素(OA、DTX-1 和 DTX-2)作用,结合液相色谱-串联质谱,对海水中 3 种贝类毒素的检测显示了良好的灵敏度和准确性。优化的萃取条件为:进样 20 mL 海水,用 2 mL 50 mmol/L 乙酸铵溶液淋洗、3 mL 5% NH_4OH -甲醇洗脱。结果表明,本方法的萃取效果优于商用 C_{18} 柱,与 HLB 柱性能相当,表明本方法是一种测定海水中贝类毒素含量的可行的替代方法。同时,此离子液体功能化硅胶材料具有良好的重现性,可通过淋洗再生,反复使用,降低了检测成本。另外,可灵活设计制备具有多个不同基团的离子液体,通过键合硅胶作为功能化萃取材料,实现对环境 and 食品不同基质中污染物的富集净化,具有良好的应用前景。

表 4 实际海水加标样品中 3 种贝类毒素各组分的回收率
Table 4 Recoveries of three kinds of shellfish toxins spiked in real seawater samples

化合物 Compound	加标浓度 Spiked ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%, $n=5$)
OA	0.2	97.0	6.7
	1.0	108	10.8
DTX-2	0.2	93.0	7.9
	1.0	102	4.3
DTX-1	0.2	95.2	11.3
	1.0	116	5.7

References

1 Harwood D T, Selwood A I, Ginkel R V. *Toxicon*, **2014**, 90: 213–225
2 Pérez-Gómez A, Ferrero-Gutierrez A, Novelli A. *Toxicol. Sci*, **2006**, 90(1): 168–177
3 Shepeck J E, Gauss C M, Chamberlin A R. *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, 5(9): 1739–1750
4 Valdiglesias V, Méndez J, Pásaro E, Cemeli E, Anderson D, Laffon B. *Mutat. Res.*, **2010**, 689(1-2): 74–79
5 Dominguez H J, Paz B, Daranas A H, Norte M, Franco J M, Fernández J J. *Toxicon*, **2010**, 56: 191–217
6 Cho Y, Ozeki R, Yotsu-Yamashita M. *Harmful Algae*, **2013**, 25: 47–53
7 Cho Y, Tsuchiya S, Yoshioka R. *Harmful Algae*, **2015**, 49: 58–67
8 Mattarozzi M, Milioli M, Bianchi F, Cavazza A, Pigozzi S, Milandri A, Careri M. *Food Control*, **2016**, 60: 138–145

- 9 YAO Jian-Hua, TAN Zhi-Jun, ZHOU De-Qing. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(12): 1714–1720
姚建华, 谭志军, 周德庆. 分析化学, **2010**, 38(12): 1714–1720
- 10 YAO Jian-Hua, TAN Zhi-Jun, ZHOU De-Qing, GUO Meng-Meng, XING Li-Hong, YANG Shou-Guo. *Chinese Journal of Chromatography*, **2010**, 28(4): 363–367
姚建华, 谭志军, 周德庆, 郭萌萌, 邢丽红, 杨守国. 色谱, **2010**, 28(4): 363–367
- 11 YANG Xiao, HUANG Hua-Wei, WU Yuan-An, WAN Yi-Wen, LI Xiao-Ling, HUANG Xiang-Rong. *Chinese Journal of Chromatography*, **2019**, 37(5): 505–511
杨霄, 黄华伟, 伍远安, 万译文, 李小玲, 黄向荣. 色谱, **2019**, 37(5): 505–511
- 12 Berre M L, Kilcoyne M, Kane M. *Toxicon*, **2015**, 103: 169–175
- 13 GB 5009. 212-2016, *Detection of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Shellfish*. National Standards of the People's Republic of China
食品安全国家标准贝类中腹泻性贝类毒素的测定. 中华人民共和国国家标准. GB 5009. 212-2016
- 14 Poole C F. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1037(1-2): 49–82
- 15 Sun X J, Tan J, Ding H Y, Tan X J, Xing J, Xing L H, Zhai Y X, Li Z X. *J. Anal. Methods Chem.*, **2018**: 3765682
- 16 Liu S J, Zhou F, Zhao L, Xiao X H, Liu X, Jiang S X. *Chem. Lett.*, **2004**, 33(5): 496–497
- 17 Qiu H D, Jiang S X, Liu X. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103(2): 265–270
- 18 Wang Q, Baker G A, Baker S N. *Analyst*, **2006**, 131(11): 1000–1005
- 19 Sun X J, Zhu Y L, Wang P, Li J, Wu C Y, Xing J. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(6): 833–841
- 20 Sun X J, Wu C Y, Xing J. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33(20): 3159–3167
- 21 Qin W D, Li S F Y. *Electrophoresis*, **2002**, 23(24): 4110–4116
- 22 Qin W D, Li S F Y. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1048(2): 253–256
- 23 Tian M L, Yan H Y, Row K H. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877(8/9): 738–742
- 24 Qiu H D, Jiang Q, Wei Z, Wang X S, Liu X, Jiang S X. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1163(1-2): 63–69
- 25 Qiu H D, Jiang S X, Liu X. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103(2): 265–270
- 26 Gremlich H, Yan B. *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. New York: Marcel Dekker Press, **2000**: 1
- 27 ZHU Nan-Nan, SUN Zhi-Rong, QU Ji-Xu, HE Yu-Xin, MA Fang, SUN Su-Qin. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2018**, 38(11): 3407–3413
朱南南, 孙志蓉, 曲继旭, 贺雨馨, 马芳, 孙素琴. 光谱学与光谱分析, **2018**, 38(11): 3407–3413
- 28 Kilimann K, Doster W, Vogel R, Hartmann C, Gnäzle M. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1764(7): 1188–1197

Research on Octyl-functionalized Ionic Liquid Bonding Silica Gel for Solid Phase Extraction of Shellfish Toxins in Seawater

SUN Xiao-Jie¹, DING Hai-Yan¹, TAN Jie^{*1,2}, XING Jun³,
GUO Meng-Meng¹, XING Li-Hong¹, LI Zhao-Xin^{*1}, ZHAI Yu-Xiu¹

¹(Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

²(Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266000, China)

³(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Biology and Medicine (Ministry of Education), College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract Shellfish toxins are a kind of important marine pollutant. In this study, a novel ionic liquid bonded silica gel material (silica-[SOIM][PF₆]) was prepared by grafting octyl-functionalized ionic liquid onto silica gel, which was characterized and analyzed by infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), and elemental analysis. Solid phase extraction cartridge of silica-[SOIM][PF₆], coupled with LC-MS/MS technique was used to extract and determine the concentration of shellfish toxins [Okadaic acid (OA), Dinophysistoxin-1 (DTX-1) and Dinophysistoxin-2 (DTX-2)] in seawater for the first time. It was

found that the solid phase extraction material silica-[SOIM][PF₆] had multiple interactions with the 3 kinds of shellfish toxins, such as hydrophobic and ion-exchange. The method was optimized in aspects of volume and pH of the loaded sample solution, as well as the usage of rinsing and eluting reagents. Results indicated that the silica-[SOIM][PF₆] had good extraction effect on target shellfish toxins in seawater, which was better than or equivalent to the performance of commercial extraction materials. The method had a good linearity ($R^2 > 0.995$) in the concentration range of shellfish toxins from 0.02 $\mu\text{g/L}$ to 2.50 $\mu\text{g/L}$, with limit of detection (LOD) of 0.01 $\mu\text{g/L}$ and limit of quantification (LOQ) of 0.05 $\mu\text{g/L}$. The average recoveries for 3 kinds of shellfish toxins were 93.0%–116.0% at different spiking levels in blank seawater. Simultaneously, the material had good reproducibility, with the relative standard deviation (RSD) of less than 15% intra- and inter-batch. This method was accurate, sensitive, simple and reliable, and could be used for the extraction and detection of shellfish toxins in actual samples.

Keywords Ionic liquid; Solid phase extraction; Multiple mode; Shellfish toxins; Seawater

(Received 27 June 2019; accepted 7 November 2019)

This work was supported by the National Key R&D Program of China (No. 2017YFC1600705), the Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (Nos. 20603022016007, 20603022017015) and the National Natural Science Foundation of China (No. 21207162).

樊春海教授团队发展出基于 DNA 折纸技术的新型分子加密系统

近日,上海交通大学化学与化工学院樊春海教授团队发展了一套以 DNA 折纸技术为基础的分子加密系统。该系统超越了基于硅基计算机的常规加密体系,且同时具有保护信息完整性和访问控制的功能。相关论文以“DNA origami cryptography for secure communication”为题发表于 Nature Communications (2019)10:5469。张祎男博士和王飞博士为共同第一作者,同济大学化学科学与工程学院柳华杰教授为共同通讯作者。

信息安全的三个要素 CIA,包括了机密性(Confidentiality)、完整性(Integrity)和可用性(Availability),在当今社会信息安全中起到了关键作用。为了适应日益提高的 CIA 需求,基于硅基计算机的体系采用了越来越复杂的加密算法。而基于生物分子的加密则采用热动力学控制的生物分子反应来执行加密过程,具有很高的特异性,有可能避免来自计算机的攻击。其中,基于 DNA 分子反应的文本信息隐写术得到了很大关注。

樊春海教授团队在长期从事 DNA 自组装研究的基础上,提出应用 DNA 折纸技术来编码信息,以充分挖掘 DNA 在多维度加密应用上的潜力。

DNA 折纸技术的原理为通过几百条短链对于一条长骨架链的任意折叠,以得到不同形状的 DNA 结构。利用 DNA 折纸术可以构建任意图案且可以实现完全的物理可寻址。

他们以此为基础,开发出一套安全有效的 DNA origami cryptography(DOC)加密系统。在该系统中,发送者首先将文本信息加密为类似盲文图案的点阵排列,然后以骨架链的折叠作为密钥将点阵排列进一步加密为杂交若干生物素化短链的骨架链。接收者通过共享骨架链折叠的密钥可以生成对应的订书链,将骨架链折叠为正确的形状。在该形状中生物素位点的排列与加密图案相同,可通过结合链霉亲和素进行识别,最终接收者将图案解密得到文本信息。

该方法实现了加密术与隐写术的整合,采用一条长 7000 碱基左右的骨架链可实现约 700 位的理论密钥长度,远超过经典 AES 算法的强度。而通过对 DNA 折纸不同区域位点的定义以及 DNA 折纸间的特异性识别,该系统还可实现完整性保护和访问控制的功能。该团队采用该系统进行了包括文本、音符、图片等多种形式的信息传递,并模拟战争环境实现了对战役时间地点信息的保密传递。该 DNA 加密系统为信息安全的发展提供了一种具有巨大潜力的生物分子解决方案。

该工作得到了国家重点研发计划项目(2018YFA0902600)、国家自然科学基金项目(21834007, 21675167, 21603262)、上海交通大学王宽诚基金等资助。

原文链接:<https://www.nature.com/articles/s41467-019-13517-3>