

【技术与方法】

麻痹性贝类毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 的提取与纯化

金 薇^{1,2,3}, 姚敬元^{1,2,3}, 贾宝林^{2,3}, 梁玉波^{2,3}, 吕颂辉¹

(1.暨南大学, 广东 广州 510632; 2.国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 3.大连市藻毒素重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘 要: 麻痹性贝类毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 是我国近海危害最严重的藻毒素。本研究以染毒紫贻贝为原料, 贝肉均质后以 0.18 mol/L 甲酸溶液超声提取, 提取液先用乙酸乙酯和氯仿洗涤, 然后用大孔吸附树脂 SP700 净化, 亲水型高效制备液相色谱分离纯化, 得到麻痹性贝类毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 组分, 为麻痹性贝类毒素标准物质的研制提供了可靠的技术方法。

关键词: 麻痹性贝类毒素; 膝沟藻毒素; 贻贝; 提取; 纯化

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2021)03-0425-05

Extraction and purification of paralytic shellfish toxins GTX1/4 and GTX2/3

JIN Wei^{1,2,3}, YAO Jing-yuan^{1,2,3}, JIA Bao-lin^{2,3}, LIANG Yu-bo^{2,3}, LV Song-hui¹

(1.Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2.National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 3.Dalian key laboratory of algal toxin, Dalian 116023, China)

Abstract: GTX1/4 and GTX2/3 are the most harmful algal toxins in the coastal waters of China. The paralytic shellfish toxins from mussel samples were extracted with 0.18 mol/L formic acid aqueous solution, cleaned up with ethyl acetate and trichloromethane. Then, the crude PSTs solutions were separated by macroporous adsorption resin SP700 and purified by preparative high performance liquid chromatographic (PHPLC) coupled with Hillic column. It developed an effective method for the preparation of paralytic shellfish toxins reference materials.

Key words: paralytic shellfish toxins; gonyautxins; mussel; extraction; purification

麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish toxins, PST)主要是一类由海洋甲藻产生的神经毒素。随着全球气候变暖、海水酸化、陆源污染及氮、磷营养盐比例失调加重等, 麻痹性贝类毒素在全球近海污染呈逐年加重趋势, 是全球性危害最大的海洋生物毒素之一^[1-2]。

麻痹性贝类毒素是一类四氢嘌呤的生物碱(图 1), 易溶于水, 不溶于绝大多数有机溶剂, 在

弱酸和低温条件下较稳定, 碱性条件下易发生氧化, 较难形成结晶^[3]。目前已报道的麻痹性贝类毒素共有 58 种类似物^[3], 其中, 膝沟藻毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 在中国近海检出率最高^[4]。麻痹性贝类毒素的中毒症状主要包括: 麻木、肌肉无力、运动不协调和呼吸效率下降等, 严重时还会致人死亡^[5]。麻痹性毒素主要是作用于神经细胞和肌肉细胞的钠通道, 阻断钠离子的流入, 阻碍动

收稿日期: 2019-12-18, 修订日期: 2020-07-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFF0201104, 2017FYC1404303); 国家自然科学基金项目(41576120, 41276099); 国家海洋局海洋赤潮灾害立体监测技术与应用重点实验室开放基金项目(MAYTHAB201605); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室开发基金项目(201613)

作者简介: 金 薇(1982—), 女, 辽宁大连人, 博士, 主要从事海洋生物毒素研究, E-mail: weijin@nmemc.org.cn

通讯作者: 梁玉波(1962—), 男, 研究员, 博士, 主要从事海洋生物毒素研究, E-mail: ybliang@nmemc.org.cn

吕颂辉(1963—), 男, 教授, 博士, 主要从事海洋赤潮生态研究, E-mail: lusonghui1963@163.com

作电位的形成^[6]。全球每年发生麻痹性贝类毒素中毒事件 2000 余次,造成约 300 人死亡^[7]。近十几年来,我国近海动物体中麻痹性贝类毒素污染问题十分突出,2013—2015 年的调查结果表明,我国近海动物体中麻痹性贝类毒素超标率为 17.4%。2016 年 4 月和 2017 年 6 月分别在河北秦皇岛和福建漳州发生麻痹性贝类毒素中毒事件^[4]。

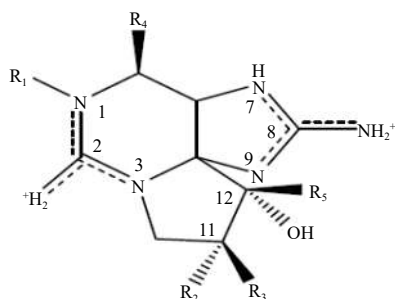


图 1 麻痹性贝类毒素的结构

Fig. 1 The structure of paralytic shellfish toxins

目前,国际上针对麻痹性贝类毒素分析检测的方法主要有:小白鼠生物毒性检测法(mouse bioassay, MBA)^[8-9]、高效液相色谱荧光检测法(high performance liquid chromatography-fluorescence detection, HPLC-FLD)^[10-11]、亲水作用色谱-液相色谱串联质谱法(hydrophilic interaction chromatography liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HILIC-LC-MS/MS)^[12-13]和酶联免疫检测法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[14]。

贝类毒素标准物质是开展相关毒素检测的基础,但目前全球仅有加拿大和西班牙两家公司可提供麻痹性贝类毒素相关标准物质,存在到货周期长及出入境限制严格等诸多问题。因此,开展高纯麻痹性贝类毒素尤其是膝沟藻毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 的制备研究,对研发毒素标准物质保障海产品食用安全具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

染毒贻贝于 2019 年 5 月采自河北省秦皇岛市附近海域。采集到的贻贝送至实验室后先用清水洗净贻贝外壳,切断闭壳肌,开壳,蒸馏水淋

洗内部去除泥沙及其他异物,取出贝肉分散置于筛子上沥水 5 min,捞出碎壳、石子等杂物,沥水结束后将贝肉均质备用。

1.2 试剂与仪器

试剂:麻痹性贝类毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 标准物质购自加拿大海洋生物研究所(NRCC);色谱纯的甲醇、乙腈购自德国默克公司;分析纯的甲酸、盐酸、乙酸购自天津市科密欧化学试剂公司;大孔吸附树脂 HP20 和 SP700 购自日本三菱公司;色谱仪器用水为蒸馏水,购自屈臣氏公司;0.22 μm 滤膜购自上海兴亚净化材料厂。

仪器:高效液相色谱(Ultimate 3000, Thermo)-三重四级杆质谱(API4000, AB)联用仪;半制备型高效液相色谱仪(Agilent 1260-6120, 单四级杆质谱检测器,安捷伦);制备型高效液相色谱仪(P2100, 紫外检测器,辽宁谱道);旋转蒸发仪(I-300, BUCHI);冷冻干燥机(Scientz-18N, 宁波新芝);温控型超声波细胞粉碎机(Xinchen);高速冷冻离心机(2-16 KL, Sigma);制备型反相液相色谱柱(Ultimate Hillic Amide, 50×250 mm, 10 μm, 120 Å, 上海月旭);半制备型反相液相色谱柱(Ultimate Hillic Amphion II, 10×250 mm, 5 μm, 上海月旭);反相液相色谱柱(Luna C18, 4.6×250 mm, 5 μm, 100 Å, phenomenex)。

1.3 实验方法

1.3.1 麻痹性贝类毒素的提取

称取均质后的贝肉,加入其质量 1.2 倍体积的酸溶液,混匀后超声提取 10 min 或煮沸 5 min, 10000 r/min 离心 10 min,倒出上清液,残渣继续用等量的酸重复提取,合并提取液,依次用乙酸乙酯和氯仿洗涤,收集水相浓缩,得到麻痹性贝类毒素的粗提液,用 HPLC 检测其中 GTX1/4 和 GTX2/3 的含量。

1.3.2 麻痹性贝类毒素的净化

称取活化后的大孔吸附树脂 1 kg,装入带有砂板的玻璃层析柱中,稳定后用蒸馏水冲净。粗提液用 0.1 mol/L 的乙酸溶液或蒸馏水稀释后以 2.0 L/h 的流速通过大孔吸附树脂。上样结束后,吸附 2~3 h。然后用 0.1 mol/L 的乙酸或蒸馏水和乙醇的混合溶液淋洗树脂柱, HPLC 检测洗脱液中 GTX1/4 和 GTX2/3 的含量,收集相应组分。

1.3.3 麻痹性贝类毒素的定性分析

采用柱后衍生液相色谱荧光检测法检测麻痹性贝类毒素^[15]。液相色谱条件: 色谱柱为 Luna C18(4.6×250 mm, 5 μm); 荧光检测激发波长为 330 nm; 荧光检测发射波长为 390 nm; 进样量为 10 μL; 柱温为 40 ℃; 流动相 A 为 3.0 mmol/L 庚烷磺酸钠, 8.5 mmol/L H₃PO₄, pH=7.1; 流动相 B 为 4.0 mmol/L 庚烷磺酸钠, 45.0 mmol/L H₃PO₄, pH=7.1; 流动相 C 为乙腈。流动相洗脱梯度详见表 1。

表 1 高效液相色谱检测麻痹性贝类毒素的条件

Tab.1 The analysis condition of paralytic shellfish toxins by HPLC

时间/ min	流动相A/ (%)	流动相B/ (%)	流动相C/ (%)	流速/ mL·min ⁻¹
0	100	0	0	1.0
20	100	0	0	1.0
20.5	0	93.5	6.5	0.9
45	0	93.5	6.5	0.9
45.5	100	0	0	1.0
60	100	0	0	1.0

柱后衍生条件, 柱后衍生的反应液为氧化液和酸液的混合溶液, 氧化液为 10.0 mmol/L 高碘酸和 50.0 mmol/L K₂HPO₄, pH=9.0; 酸液为 1.0 mol/L 乙酸; 反应温度: 75 ℃; 反应液的流速: 0.4 mL/min。

1.3.4 麻痹性贝类毒素的纯化

首次制备: 色谱柱为 Ultimate Hillic Amide (50.0×250 mm, 10 μm, 120 Å); 柱温为室温; 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈; 流速为 40.0 mL/min; 进样量为 10 mL; 馏分收集器为 1 min/管; 等度洗脱为 40%A 相, 60%B 相。

再次制备: 色谱柱为 Ultimate Hillic Amphion II(10×250mm, 5 μm); 柱温为 40 ℃; 流动相 A 为 0.1% 的甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈; 流速为 4.0 mL/min; 进样量为 100 μL; 等度洗脱为 40%A 相, 60%B 相。

2 结果与讨论

2.1 麻痹性贝类毒素的提取条件

2.1.1 不同提取方式对麻痹性贝类毒素提取的影响

麻痹性贝类毒素在弱酸性条件下稳定, 提取时多用酸, 目前已报道的酸有甲酸^[16]、盐酸^[17]和

乙酸^[18]等酸的水溶液, 此外超声和煮沸常用于辅助提取贻贝中的麻痹性贝类毒素。本研究先用 0.18 mol/L 的甲酸、乙酸和盐酸作为提取液, 在提取过程中, 辅以超声 10 min 或煮沸 5 min, 比较了不同酸和不同提取方式的提取效果。结果表明, 不同酸和不同提取方式得到的提取液中毒素的浓度存在较大差异: 甲酸(超声)>盐酸(煮沸)>乙酸(煮沸)>甲酸(煮沸)>乙酸(超声)>盐酸(超声)。其中, 甲酸溶液超声 10 min 效果最好, 提取液中麻痹性贝类毒素 GTX1-4 的总含量为 1227 ng/mL; 以盐酸或是乙酸作为提取溶剂时, 煮沸 5 min 的效果明显好于超声 10 min (图 2)。在规模化提取毒素过程中, 从操作简便性考虑, 采用超声辅助提取毒素。

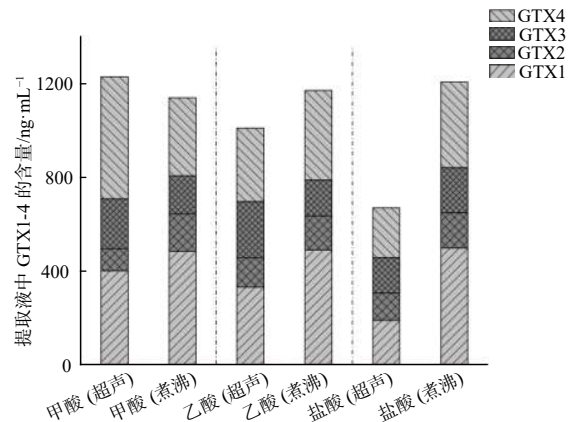


图 2 不同提取方式对麻痹性贝类毒素提取的影响

Fig. 2 The effect of different methods on the extraction of PST

2.1.2 提取次数对麻痹性贝类毒素提取的影响

均质后的贝肉用酸提取一次后, 再用同样的酸提取两次, 同时辅以超声破碎。结果表明: 不论是用甲酸、乙酸或是盐酸超声提取贻贝中的毒素, 两次提取即达到最佳效果, 第三次提取液中未检测到麻痹性贝类毒素(表 2)。尽管用乙酸和盐酸第二次提取的效果要好于甲酸, 但综合比较两次提取毒素总效果, 甲酸最好。

2.1.3 酸的浓度对麻痹性贝类毒素提取的影响

为考察甲酸浓度对提取效果的影响, 改变提取麻痹性贝类毒素所用酸的浓度, 分别用 0.18 mol/L、0.10 mol/L 和 0.05 mol/L 的甲酸提取等量的贝肉, 结果表明: 降低酸的浓度, 提取到的麻痹性贝类毒素含量随之降低(图 3)。

表 2 提取次数对贻贝中麻痹性贝类毒素提取的影响 (ng/mL)

Tab.2 The effect of different times on the extraction of PST

化合物	甲酸		乙酸		盐酸	
	第一次	第二次	第一次	第二次	第一次	第二次
GTX1	400	165.4	331	214.9	189	191
GTX2	95	48	125	62.8	117	69.2
GTX3	212	95.8	239	93.2	151	118.5
GTX4	520	114.8	313	188.3	212	145.1
合计	1,227	424	1,008	559.2	669	523.8

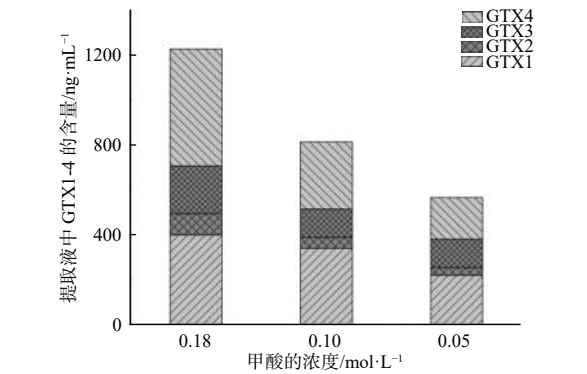


图 3 酸的浓度对麻痹性贝类毒素提取的影响
Fig. 3 The effect of different methods on the extraction of PST

2.2 麻痹性贝类毒素的净化

麻痹性贝类毒素的粗提液用乙酸乙酯和氯仿去除蛋白,减压浓缩后,用大孔吸附树脂初步净化。大孔吸附树脂在固相吸附毒素跟踪技术 (solid phase adsorption toxin tracking, SPATT) 中常用于监测水体中的毒素变化,最早由新西兰学者 Mackenzie 提出^[19]。麻痹性贝类毒素易溶于水,不溶于常见的有机溶剂,在用大孔吸附树脂净化时,需考察不同类型的大孔吸附树脂的吸附净化效果^[20-21]。

本研究分别探讨了大孔吸附树脂 HP20 和 SP700 对麻痹性贝类毒素粗提液的净化效果。为了达到大孔树脂的最佳吸附性能,前述得到的浓缩液在用大孔吸附树脂净化前需稀释。分别用 0.1 mol/L 乙酸和超纯水稀释浓缩液,考察大孔吸附树脂的吸附性能。实验结果表明:对于大孔吸附树脂 HP20,无论是用 0.1 mol/L 乙酸还是蒸馏水稀释,上样液中的麻痹性贝类毒素都无法在树脂上吸附,同时上样液中的杂质也未在树脂

上吸附,净化效果不明显。对于大孔吸附树脂 SP700,当用 0.1 mol/L 的乙酸稀释时,上样液中的毒素和绝大部分杂质都无法在树脂上吸附,没有净化作用;当用蒸馏水稀释时,尽管麻痹性贝类毒素无法在树脂上吸附,但提取液中的大部分杂质可被树脂吸附,上样液呈棕黑色,流出液呈淡黄色。继续用不同比例的乙醇-水溶液淋洗树脂柱,发现 50% 的乙醇-水溶液可将树脂吸附的大部分杂质冲出,此时流出液呈黑色。因此,用 SP700 对毒素提取液进行净化,尽管树脂无法吸附毒素,但可以吸附其中的杂质,同样可以达到净化的目的。实验结束后,用 95% 的乙醇冲洗树脂柱,然后依次用 0.1 mol/L 的盐酸和 5% 的氢氧化钠对树脂柱进行再生。

2.3 麻痹性贝类毒素的纯化

麻痹性贝类毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 是一类特殊的水溶性物质,在用制备型高效液相色谱 (PHPLC) 对其进行分离纯化时,毒素在常规的 C18 色谱分离柱上无法保留,只能在亲水的 Hillic 柱上保留^[12]。本研究先用 Hillic 柱对毒素的提取液进行初步纯化,流出液的检测结果表明: GTX1/4 和 GTX2/3 在首次制备时无法分离,但可以除去提取液中的大部分杂质,达到初步纯化的目的(图 4)。

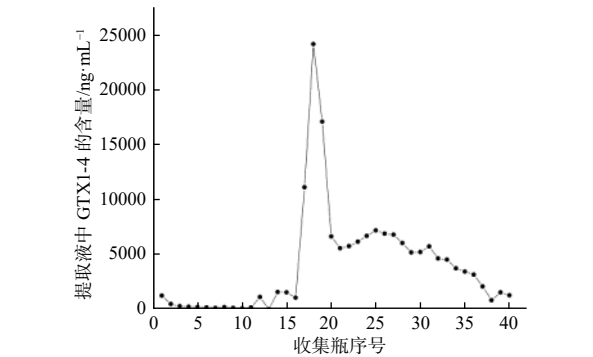


图 4 不同收集瓶中麻痹性贝类毒素的含量
Fig. 4 The content of PST in different retention time via PHPLC

再次制备时,用配有质谱检测器的半制备型高效液相色谱系统,实时监测流出液中的毒素组成的荷质比(m/z)。对首次制备得到的 GTX1/4 和 GTX2/3 的混合物进行多次反复制备,分别收集含有 GTX1/4 和 GTX2/3 的流出液。流出液经

浓缩干燥后分别得到 4.5 mg 的 GTX1/4 和 2.2 mg GTX2/3 的白色固体粉末。

3 结 论

(1) 本研究以染毒贻贝为原料, 经过提取、萃取、树脂净化、制备液相纯化, 最终得到高纯麻痹性贝类毒素 GTX1/4 和 GTX2/3 组分。

(2) 提取贻贝中麻痹性贝类毒素的最佳条件为: 1.2 倍体积的 0.18 mol/L 的甲酸超声提取两次, 每次 10 min。

(3) 用大孔吸附树脂 SP700 可实现毒素粗提液的净化, 去除大部分的杂质。

(4) 经过亲水性制备型高效液相色谱多次制备纯化后, 可获得高纯的 GTX1/4 和 GTX2/3。

参考文献:

- [1] DAGUER H, HOFF R B, MOLOGNONI L, et al. Outbreaks, toxicology, and analytical methods of marine toxins in seafood[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 24: 43-55.
- [2] RUTKOWSKA M, PLOTKA-WASYLKA J, MAJCHRZAK T, et al. Recent trends in determination of neurotoxins in aquatic environmental samples[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 112: 112-122.
- [3] WIESE M, D'AGOSTINO P M, MIHALI T K, et al. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(7): 2185-2211.
- [4] 梁玉波, 李冬梅, 姚敬元, 等. 中国近海藻毒素及有毒微藻产毒原因种调查研究进展[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(3): 511-524.
- [5] LIU Y, YU R C, KONG F Z, et al. Paralytic shellfish toxins in phytoplankton and shellfish samples collected from the Bohai Sea, China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 115(1/2): 324-331.
- [6] 王 烨. 连云港地区贝类食源性中毒的调查[J]. *职业与健康*, 2008, 24(19): 2065-2067.
- [7] WANG D Z, ZHANG S F, ZHANG Y, et al. Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 135: 132-140.
- [8] BURRELL S, CRUM S, FOLEY B, et al. Proficiency testing of laboratories for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by QUASIMEME: A review[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 75: 10-23.
- [9] Commission Regulation (EC) No. 1664/2006 of 6 November 2006, Amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and repealing certain implementing measures[S].
- [10] ROURKE W A, MURPHY C J, PITCHER JG, et al. Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue[J]. *Journal of AOAC International*, 2008, 91(3): 589-597.
- [11] VALE R. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1195(1/2): 85-93.
- [12] MATTAROZZI M, MILIOLI M, BIANCHI F, et al. Optimization of a rapid QuEChERS sample treatment method for HILIC-MS² analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in mussels[J]. *Food Control*, 2016, 60: 138-145.
- [13] D'AGOSTINO P M, BOUNDY M J, HARWOOD T D, et al. Re-evaluation of paralytic shellfish toxin profiles in cyanobacteria using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Toxicon*, 2019, 158: 1-7.
- [14] JAWAID W, CAMPBELL K, MELVILLE K, et al. Development and validation of a novel lateral flow immunoassay (LFIA) for the rapid screening of paralytic shellfish toxins (PSTs) from shellfish extracts[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(10): 5324-5332.
- [15] OSHIMA Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins[J]. *Journal of AOAC International*, 1995, 78(2): 528-532.
- [16] 于慧娟, 蔡友琼, 黄宣运, 等. 10种麻痹性贝类毒素的固相萃取及液相色谱-串联质谱测定法[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(4): 364-371.
- [17] 高春蕾, 庞 敏, GINKEL V R, 等. 采用改良的方法从贻贝肝胰腺中提取与净化麻痹性贝毒[J]. *海洋科学进展*, 2011, 29(S1): 95-102.
- [18] 郭萌萌, 彭吉星, 吴海燕, 等. 麻痹性贝类毒素 GTX1&4 和 GTX2&3 标准样品的制备技术[J]. *中国渔业质量与标准*, 2019, 9(2): 62-70.
- [19] MACKENZIE L, BEUZENBERG V, HOLLAND P, et al. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves[J]. *Toxicon*, 2004, 44(8): 901-918.
- [20] RODRÍGUEZ P, ALFONSO A, TURRELL E, et al. Study of solid phase adsorption of paralytic shellfish poisoning toxins (PSP) onto different resins[J]. *Harmful Algae*, 2011, 10(5): 447-455.
- [21] 宿志伟, 赵 峰, 姜 雪, 等. 桑沟湾养殖牡蛎中贝类毒素监测及预警[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 303-309.