

## 扇贝中麻痹性毒素的提取与分离纯化

林华娟<sup>1\*</sup>, 秦小明<sup>1</sup>, 章超桦<sup>1</sup>, 长岛裕二<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025;

2. 日本东京海洋大学, 日本 东京 1088477)

**摘要:**为了获得麻痹性毒素标准品,以毒化扇贝为试验材料,对扇贝中的麻痹性毒素(PSP毒素)进行了提取和分离纯化。以酸性80%乙醇溶液反复提取麻痹性毒素,得到了总毒性为6170 MU的毒素粗提液。毒素粗提液经过超滤、Bio-Gel P-2凝胶柱层析和Bio-Rex 70离子交换柱层析等二次层析柱分离纯化后得到以膝沟藻毒素群(GTXs)为主的纯化PSP毒素。HPLC分析结果显示,扇贝中主要含有膝沟藻毒素 GTX3、GTX1、GTX2、GTX3、和 GTX4 的组成比例约为2:4:14:1(以HPLC上的峰面积比例计)。纯化后的毒素可以作为标准物质用于 GTX1-4 的 HPLC 分析。

**关键词:**扇贝;麻痹性毒素(PSP毒素);分离纯化;膝沟藻毒素(GTXs)

**中图分类号:**R 996.3; Q 959.215

**文献标识码:**A

贝类麻痹性毒素(paralytic shellfish poison, PSP)是由毒甲藻或产毒微生物产生,通过食物链蓄积于贝类或一些鱼类的以石房蛤毒素(saxitoxin)为基本骨架的一类衍生化合物。目前已发现的PSP毒素多达20种以上,是目前世界分布最广、发生频率最高的一类神经性毒素,因此PSP毒素作为贝类的重要安全隐患被列入贝类安全监控的常规检测指标<sup>[1]</sup>。

根据化学结构特征,PSP毒素主要分为石房蛤类毒素(saxitoxins, STXs)、膝沟藻类毒素(gonyautoxins, GTXs)和磺酰甲氨酰基类化合物(ctoxins, CTXs)<sup>[2]</sup>。目前PSP毒素的检测方法主要有小鼠生物法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[4]</sup>和酶联免疫法等<sup>[5]</sup>。由于小鼠生物法灵敏度不高,个体差异大,再现性差等原因,高效液相色谱法(HPLC)等检测方法以其灵敏度高、快速、再现性好等优点逐渐成为世界PSP毒素检测的主要方法之一。但是由于这些方法均需要毒素标准品,因此毒素标准品的获得是推广以上方法的前提条件<sup>[2]</sup>。另一方面,由于PSP毒素在国际条约中已被列入化学武器名单,因此PSP毒素

不能和其他普通商品一样进行贸易往来。在这种形势下,自主制备和纯化PSP标准物质成为我国保证贝类PSP毒素检测顺利实施的前提。

由于PSP毒素是低分子带电荷物质(250~500),物理化学性质与许多非毒素成分相似,导致PSP毒素的分离纯化比较困难。在毒素的提取和分离纯化过程中不仅要考虑毒素的提取率,不破坏毒素理化性质,还要考虑毒素的纯化效果。比毒性(以每毫克样品中含有的毒性单位计)作为毒素纯化效果的一个重要指标经常用来判断毒素的纯度。

我国在麻痹性毒素方面的研究起步比较晚,在毒素分离纯化方面的文献报道比较少<sup>[6]</sup>,在分析调查方面的文献报道比较多<sup>[7-9]</sup>。王云峰等<sup>[10]</sup>以塔玛亚历山大藻为毒原料,探讨了麻痹性毒素的提取和分离纯化方法,并确定了以0.1 mol/L乙酸提取毒素,然后利用Sephadex柱层析去除色素杂质,再经过Bio-Gel和Bio-Rex进行多级柱层析的分离纯化。但是其研究过程中仅以荧光检测方法跟踪毒素的分离效果,没有分析毒素样品的比毒性,不能很好反映毒素的纯化效果。

江涛等<sup>[11]</sup>通过比较不同浓度的盐酸和乙酸提取液以及提取温度对贝类体内麻痹性毒素成分变化的影响,探讨了毒素的提取方法。以上研究均以酸溶液作为毒素提取剂,一方面会导致大量蛋白质等高分子物质溶解于提取剂中,另一方面会促进结合态物质游离,从而增加了毒素纯化的难度。因此毒素的提取与分离纯化方法仍有待进一步改进。

本文以毒扇贝为材料,在消化吸收日本相关关键技术的基础上,探讨了麻痹性毒素的提取与分离纯化方法,开拓了毒素提取与分离纯化新思路,为我国麻痹性毒素的分离纯化技术提供可靠的科学理论依据和技术经验。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本实验所用的扇贝由日本广岛大学浅川教授提供,将扇贝的中肠腺取出后置于  $-30^{\circ}\text{C}$  冷冻保存直至用于实验。GTX1-4 标准品由东京海洋大

学生体物质化学研究室提供。

### 1.2 实 验 方 法

**贝类麻痹性毒素的提取** 贝类麻痹性毒素的提取参考长岛等<sup>[12]</sup>的方法进行。如图 1 所示,将扇贝中肠腺样品(360 g)切碎后,加入 3 倍量的酸性 80% 乙醇(pH 3.3),用组织捣碎机捣碎后于超声波槽中提取 15 min。然后通过离心分离( $18\ 000 \times g$ , 5 min)将提取液分成上清液和沉淀。对于沉淀,再用酸性 80% 乙醇溶液按照上述操作反复提取两次。3 次提取得到的上清液合并,减压浓缩去除乙醇后,用二氯甲烷进行脱脂处理,即得到贝类麻痹性毒素提取液。提取液进一步通过超滤膜(切除分子量 5 000 u, Amico USA)进行超滤,回收超滤外液,得到 PSP 粗毒素溶液。

**贝类麻痹性毒素的分离纯化** 贝类麻痹性毒素的分离纯化参考长岛等<sup>[12]</sup>的方法进行。贝类麻痹性毒素溶液首先采用 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析进行层析分离后,再利用 Bio-Rex 70 阳离子交换柱层析进行进一步的分离纯化。

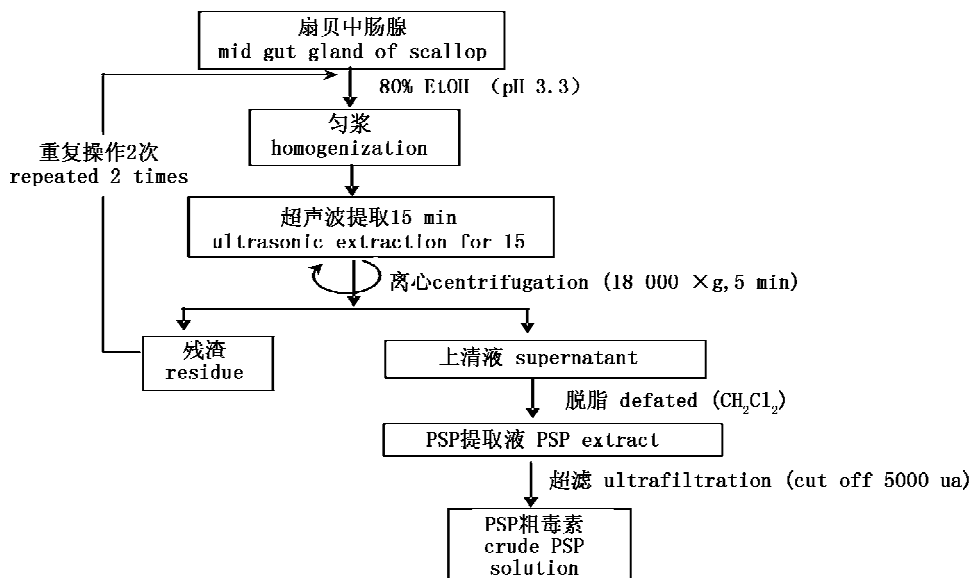


图 1 扇贝中肠腺中 PSP 毒素的提取流程图

Fig.1 Scheme for PSP extraction from mid gut gland of scallop

Bio-Gel P-2 凝胶柱层析( $2 \times 95\text{ cm}$ )中,用蒸馏水充分平衡层析柱后,通过送液泵将 PSP 粗毒素溶液装上层析柱,然后先约 800 mL 蒸馏水冲洗层析柱,再用约 1 200 mL 0.1 mol/L 醋酸进行洗脱。层析柱的流速约为 30 mL/h,洗脱液以每瓶 200 ~ 250 mL 进行收集,收集的洗脱液通过

小鼠生物检测法进行毒性追踪检测。各洗脱溶液洗脱得到的有毒组分分别合并后,减压浓缩,冻结干燥得到毒素组分。对于醋酸洗脱得到的有毒组分,再利用 Bio-Rex 70 阳离子交换柱层析进行进一步纯化。

Bio-Rex 70 阳离子交换柱层析( $0.8 \times 95$

cm)中,用蒸馏水平衡层析柱后,用少量蒸馏水将毒素溶解,装上层析柱。先用 100 mL 蒸馏水充分冲洗层析柱后,再依次用 450 mL 0.03 mol/L 醋酸和 300 mL 0.01 mol/L HCl 溶液洗脱。蒸馏水的洗脱流速约为 30 mL/h,0.03 mol/L 醋酸以及 0.01 mol/L HCl 溶液的洗脱流速约为 60 mL/h。约以每瓶 100 mL 收集洗脱液,然后用小鼠生物检测法进行毒性追踪检测。另外,将同种洗脱液洗脱得到的有毒组分合并,减压浓缩,冻结干燥即得到 PSP 纯化毒素。

**小鼠生物法毒性试验** 小鼠生物法毒性试验参考 AOAC 麻痹性毒素生物法(2000)进行<sup>[31]</sup>。小鼠为体重 18~22 g 的 ddy 系小鼠(三协实验服务会社,东京)。毒性单位,以体重 20 g 的 ddy 系小鼠在腹腔注射后 15 min 死亡的致死量规定为 1 个鼠单位(MU)。

**高效液相色谱法(HPLC)分析** 高效液相色谱的分析条件参考长岛等方法进行<sup>[13]</sup>。将 PSP 毒素浓度调整至 0.01 MU/ $\mu$ L,然后进行 HPLC 分析。PSP 毒素的检测采用柱后衍生的方法进行,即 HPLC 的洗脱液与过氧化碘酸反应生成荧光衍生物,再利用荧光检测器跟踪检测荧光衍生物。

**色谱柱:** Ultrasphere ODS(4.6 mm  $\times$  25 cm)(Beckman coulter Inc. Fullerton, CA, USA)

**柱温:** 室温

**流动相:** 含有 2 mmol/L 1-庚基磺酸钠的 0.05 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.3)与甲醇按照 99:1 的比例混合而成的溶液

**流速:** 0.8 mL/min

**反应液:** 0.07 mol/L 过氧化碘酸

**反应浓度:** 65  $^{\circ}$ C

**荧光检测波长:** 激发波长,336 nm,荧光波长 394 nm

## 2 结果

### 2.1 扇贝麻痹性毒素的提取

采用酸性 80% 乙醇溶液(pH 3.3)提取扇贝中肠腺中的贝类麻痹性毒素,经过脱脂、浓缩后得到 PSP 提取液。小鼠生物法毒性试验结果显示,PSP 提取液的总毒性为 6 170 MU。以每克扇贝中肠腺样品中的毒素含量计(共 360 g 样品),扇贝中肠腺的毒性达 17.1 MU/g。这个数值为

AOAC 规定的食用安全标准(4 MU/g)的 4 倍以上,表明该扇贝中肠腺富集有大量 PSP 毒素。对于 PSP 提取液,为了进一步去除提取液中的高分子杂质,采用超滤方法( $<5$  ku)对 PSP 提取液进行了初步纯化,得到 PSP 粗毒素溶液。小鼠毒性试验结果显示,PSP 粗毒素溶液的总毒性为 5 700 MU。相对于 PSP 提取液,PSP 粗毒素的得率高达 92.4%,表明超滤可以达到较好的初步纯化效果。

### 2.2 Bio-Gel P-2 凝胶层析柱分离纯化 PSP 粗毒素

图 2 为 PSP 粗毒素溶液在 Bio-Gel P-2 凝胶层析柱上的洗脱曲线。虽然大部分 PSP 毒素吸附于 Bio-Gel P-2,并被 0.1 mol/L 醋酸溶液洗脱出来(AF 组分),但是仍然有部分 PSP 毒素没有吸附于 Bio-Gel P-2,而直接被水洗脱出来(WF 组分)。小鼠毒性试验结果显示,WF 和 AF 组分的总毒性分别为 1 400 MU 和 2 850 MU。这个结果说明约有三分之一的 PSP 毒素(WF 组分)没有吸附于 Bio-Gel P-2。为了分析毒素不吸附原因,对 WF 组分的 pH 值进行了测定。测定结果显示,WF 组分的 pH 值为 3.3,推测酸性条件可能不利于毒素的吸附作用。因此尝试将 pH 值调至 6.0 后,然后再次进行 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析。结果如图 3 所示,经过 pH 值调整后,几乎所有的 PSP 毒素吸附于 Bio-Gel P-2,并被 0.1 mol/L 醋酸溶液洗脱出来。这个结果表明 pH 值对 Bio-Gel P-2 吸附 PSP 毒素有较大影响,采用凝胶柱层析纯化 PSP 毒素,需要将 pH 值控制在中性范围,才能达到有效纯化目的。

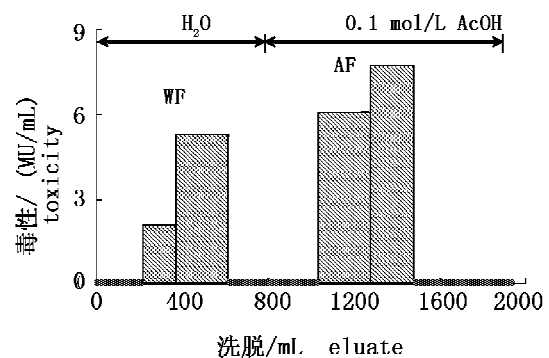


图 2 PSP 粗毒素在 Bio-Gel P-2 层析柱(2  $\times$  95 cm)上的洗脱曲线

Fig. 2 Elution profile of the crude PSP toxins on a Bio-Gel P-2 column(2  $\times$  95 cm)

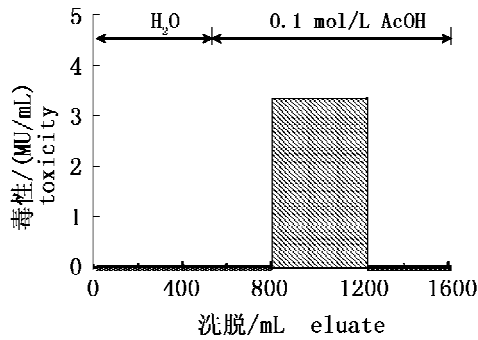


图3 图2中的WF组分在Bio-Gel P-2层析柱(与图2同等洗脱条件)上的洗脱曲线

Fig. 3 Elution profile of WF obtained from Fig. 2 on the same Bio-Gel P-2 column as the same condition in Fig. 2

### 2.3 Bio-Rex 70 柱层析分离纯化 AF 毒素组分

由于 Bio-Gel P-2 凝胶层析柱纯化只能去除大部分非 PSP 毒素杂质,不能分离不同种类 PSP 毒素 (CTXs, GTXs 和 STXs),因此还需要对 AF 毒素组分进行进一步的分离纯化。图 4 为 AF 组分在 Bio-Rex 70 阳离子交换层析柱上的分离纯化曲线。从图 4 可以看出,水洗脱液中几乎没有 PSP 毒素出现,说明 PSP 毒素几乎全部吸附于 Bio-Rex 70,这个结果说明扇贝 PSP 毒素中 CTXs 毒素含量很少<sup>[14]</sup>。从图 4 还可以看出,几乎所有的 PSP 毒素都在 0.03 mol/L 醋酸溶液处被洗脱出来 (AFP 组分),而 0.1 mol/L HCl 处基本上未检出毒性。这个结果说明 GTXs 毒素是扇贝 PSP 毒素的主要组成成分,而石房蛤毒素含量很少<sup>[14]</sup>。小鼠毒性试验结果显示,AFP 组分的总毒

性为 2 100 MU。相对于 AF 组分,AFP 组分的毒素得率为 73.7%,说明大部分 PSP 毒素得到了分离纯化。

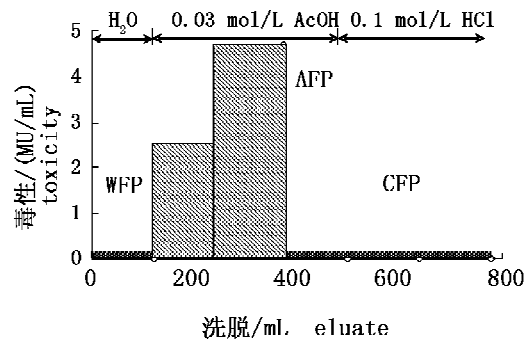


图4 图2中的AF组分在Bio-Rex 70层析柱(0.8×95 cm)上的洗脱曲线

Fig. 4 Elution profile of AF obtained from Fig. 2 on a Bio-Rex 70 column (0.8 × 95 cm)

表 1 列出了纯化各阶段 PSP 毒素的毒性情况。从表 1 可以看出,扇贝 PSP 粗毒素经过 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析和 Bio-Rex 70 离子交换柱层析分离纯化后,虽然毒素的得率逐渐降低,但是毒素的比毒性逐渐升高。与 AF 组分的比毒性相比,AFP 组分的比毒性升高了 3 倍以上。这个结果表明 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析和 Bio-Rex 70 离子交换柱层析可以有效分离纯化 PSP 毒素。但是,AFP 组分的比毒性明显低于长岛等<sup>[14]</sup>报道的数值(比毒性约 350 MU/mg),表明经过 Bio-Rex 70 离子交换柱层析后仍未能彻底去除 AF 组分中的一些非毒素杂质。因此要获得高纯度 PSP 毒素,还需进一步分离纯化。

表 1 扇贝中肠腺 PSP 粗毒素的分离纯化过程汇总表

Tab.1 Purification of crude PSP from mid gut gland of scallop

纯化阶段 step	总毒性(MU) total toxicity	干重(mg) dry weight	比毒性(MU/mg) specific toxicity	得率(%) yield
PSP 粗毒素 crude PSP	5 700			100
Bio-Gel P-2				
WF	1 460			25.6
AF	2 850	1 020	2.79	50.0
Bio-Rex 70				
AFP	2 100	219	9.59	36.8

### 2.4 HPLC 分析扇贝 PSP 毒素成分组成

为了进一步分析 AFP 组分中 GTXs 毒素成分的组成情况,取少量 AFP 样品,用 0.1 mol/L HCl 溶解后放入沸水浴中加热 5 min 进行酸分

解,然后对处理前后的 AFP 组分进行了 HPLC 分析(图 5),与标准物质的 HPLC 相比较(图 5-A),AFP 组分的 HPLC 图谱中的 1、2、3、4 峰分别被归属于 GTX4、GTX1、GTX3 和 GTX2(图 5-B)。从

图5还可以看出,经过酸处理后 AFP 组分的 HPLC 图谱(图 5-C)与未进行酸处理的 AFP 组分的 HPLC 图谱没有明显差异,说明 AFP 组分中的 GTXs 成分在酸性条件下比较稳定,这与 Nagashima 等<sup>[12]</sup>报道基本一致。

另外,从图 5-B 的峰面积还可以看出,在 AFP

组分中, GTX3 的含量比例最高,其次是 GTX2、GTX1 和 GTX4。根据峰面积比例进行计算, GTX1、GTX2、GTX3、和 GTX4 的组成比例约为 2:4:14:1。这个结果表明 GTX3 是 AFP 的主要毒素组成成分,其次是 GTX2、GTX1 和 GTX4。

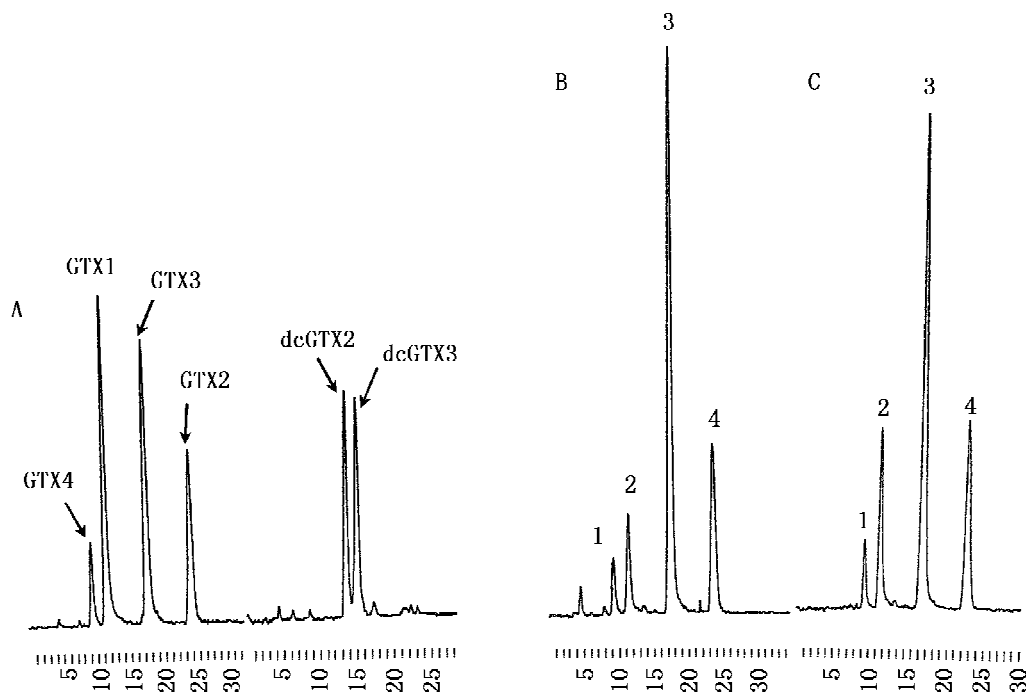


图5 GTXs 的 HPLC 色谱图

A. GTX1-4 标准物质; B. 未处理的 AFP; C. 经过酸处理的 AFP (0.1 mol/L HCl, 加热 5 min)。

Fig.5 HPLC analysis of GTXs

A. standard of GTX1-4; B. native AFP; C. AFP treated with 0.1mol/L HCl in a boiling water bath for 5 min.

### 3 讨论

研究所用的扇贝中肠腺的 PSP 毒性高达 17.1 MU/g, 严重超过了安全食用标准。同时, 这些样品是提取和纯化 PSP 毒素的珍贵材料。目前毒源材料可以从产毒藻类、产毒微生物或者大量富集毒素的鱼类中获取。有实验尝试通过培养有毒藻类方式来保证毒源, 但是由于藻类的含毒量受生长环境影响非常显著, 存在毒素得率不稳定甚至不产毒等问题<sup>[2]</sup>。以毒素严重超标的鱼类作为毒素材料则存在毒源不稳定等缺点。因此需要寻找更加有效、稳定的毒源途径。

本研究以毒扇贝中肠腺样品为试验材料, 成功提取并得到了总毒性约为 5 700 MU 的 PSP 粗

毒素, 粗毒素经过 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析和 Bio-Rex 70 离子交换柱层析后得到比毒性约为 9.6 MU/mg 的 PSP 毒素。本研究利用酸性乙醇溶液提取毒素, 既不改变毒素的理化性质, 还可以有效抑制蛋白质等高分子物质的溶解, 不需经过 Sephadex 层析柱的过滤除杂。在柱层析分离纯化中, 首先利用麻痹性毒素在适当的条件下可以与 Bio-Gel P-2 树脂吸附结合的性质, 通过 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析可以有效去除不被树脂吸附的色素等杂质。然后利用不同种类麻痹性毒素的化学性质, 通过 Bio-Rex 70 离子交换柱层析可以将磺酰甲氨酰基类毒素 (CTXs)、膝沟藻毒素群 (GTXs) 和石房蛤毒素 (STXs) 有效分离。本试验结果表明, 扇贝 PSP 毒素中主要含有 GTXs 毒素,

几乎不含有 CTXs 和 STXs 毒素。HPLC 分析结果显示,GTX3 为扇贝 PSP 毒素的主要组成成分,GTX1、GTX2、GTX3、和 GTX4 的组成比例约为 2:4:14:1。另外,与王云峰等<sup>[15]</sup>研究比较可见,本试验纯化毒素的 HPLC 色谱图和标准品一样几乎没有其他杂峰(图 5),表明本研究纯化得到的 GTXs 毒素完全可以作为标准物质用于 GTXs 毒素分析。

#### 参考文献:

- [1] 野口玉雄. フグはなぜ毒をもつのか[M]. 東京: 日本放送出版社協会, 1998.
- [2] 今井一郎, 福代康夫, 广石伸互. 貝毒研究の最先端[M]. 東京: 恒星社厚生閣, 2007.
- [3] AOAC Official Method 959.08, Paralytic Shellfish Poison Biological Method [S]. 2000.
- [4] Oshima Y, Machida M, Sasaki K. Liquid chromatographic-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins [J]. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(7): 1707 - 1711.
- [5] Kawatsu K, Hamano Y, Sugiyama A, et al. Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins [J]. *J Food Protection*, 2002, 65: 1304 - 308.
- [6] 王焕玲, 梁玉波, 刘仁沿, 等. 我国麻痹性贝毒的研究现状[J]. *水产科学*, 2008, 27(7): 374 - 378.
- [7] 林燕棠, 贾晓平, 杨美兰, 等. 贝类麻痹性毒素的昆明小鼠测定法若干问题探讨[J]. *热带海洋学报*, 2001, 20(2): 88 - 91.
- [8] 江天久, 江涛, 谢丽琪, 等. 一种麻痹性贝毒的高效液相色谱法[J]. *分析化学*, 2006, 6(5): 625 - 628.
- [9] 颜天, 傅萌, 李钧, 等. 麻痹性贝毒 PSP 在紫贻贝体内的累积、转化与排出[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(4): 420 - 426.
- [10] 王云峰. 麻痹性毒素的制备和活性研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2001.
- [11] 江涛, 江天久. 贝类体内麻痹性毒素的提取方法研究[J]. *分析化学*, 2008, 36(11): 1460 - 1464.
- [12] Nagashima Y, Sato Y, Noguchi T, et al. Paralytic shellfish poison in the "hiogi" scallop *Chlamys nobilis* [J]. *Marine Biology*, 1988, 98: 243 - 246.
- [13] Nagashima Y, Maruyama J, Noguchi T, et al. Analysis of paralytic poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, 53: 819 - 823.
- [14] Nagashima Y, Noguchi T, Maruyama J, et al. Occurrence of paralytic shellfish poisons in an ascidian *Holocynthia roretzi* [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1984, 50(2): 331 - 334.
- [15] 王云峰, 于仁诚, 李钧, 等. 麻痹性贝毒毒素研究. 麻痹性贝毒毒素纯化产品的高效液相色谱和质谱分析[J]. *海洋科学*, 2003, 45(5): 138 - 152.

## Extraction and purification of paralytic shellfish poison from scallop

LIN Hua-juan<sup>1\*</sup>, QIN Xiao-ming<sup>1</sup>, ZHANG Chao-hua<sup>1</sup>, NAGASHIMA Yuji<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo 1088477, Japan)

**Abstract:** HPLC analysis for paralytic shellfish poison (PSP) in shellfish foods has now become a current method in the world, in which PSP standard is necessary. Unfortunately, commercial PSP standard has now become difficult for handling in china, as some purification technique of PSP has not been still breached, and the PSP substance has now been recognized into the list of chemical weapons. Preparing independently some PSP standard is necessary and will be a good way for solving the standard substance problem in china.

In this paper, extraction and purification of PSP was discussed, using a poisoned scallop sample as a material. The total toxicity of the crude PSP extract solution was 6 170 MU, while using acid 80% ethanol as an extractant. From the crude extract, PSP was purified via ultrafiltration, Bio-Gel P-2 column chromatography and Bio-Rex 70 column chromatography, and a purified toxin with amount of 2 100 MU was obtained. The result of chromatography showed the toxin mainly contained gonyautoxin group (GTX1-4). HPLC analysis showed that all of the peaks is very sharp and clear, in which the ratio of GTX1, GTX2, GTX3 and GTX4 was 2:4:14:1 (calculated as the ratio of peak area on HPLC), indicating that GTX3 is the major PSP composition in the poisoned scallop sample, and the purified toxin is available using as a standard for HPLC analysis. From the results of experiments, the technique for preparing PSP standard is effective and successful. In the other hand, the stability of the purified toxin was discussed, through comparing the HPLC analysis between the native toxin and that of the one treated with 0.1 mol/L HCl.

**Key words:** scallop; paralytic shellfish poison (PSP); purification; gonyatoxins (GTXs)

**Corresponding author:** LIN Hua-juan. E-mail: huajuanlin@163.com, linhj@gdou.edu.cn