

# 海洋毒素的高效液相色谱分析\*(综述)

刘 宁 辽宁省食品卫生监督检验所 (110005)

李春盛 辽宁省大连市卫生防疫站 (116021)

由海洋浮游生物、海洋微生物分泌的海洋毒素(Marine Toxins, MT)所引起的海洋动物、人类中毒事件是与海洋环境直接相关的问题之一,这个问题涉及到海洋环保、卫生学、水产养殖等诸多领域,已引起了各方面专家的关注,探明并解决这个问题的基础是确定海洋毒素的化学结构并建立测试分析方法。尽管包括生物法、免疫法和高效液相色谱(HPLC)法在内的 MT 分析方法较多,<sup>(1)</sup>但生物法和免疫法对 MT 进行分子水平的研究已越来越不适宜,从发展方向来看,HPLC 可能会成为 MT 的最可靠分析手段。本文在着重概述了人们比较关注的几种海洋毒素的 HPLC 检测方法的同时,简要介绍了它们的化学结构及卫生危害。

1 河鲀鱼毒素 已发现的河鲀鱼毒素(Tetrodotoxin, TTX)有 7 种天然衍生物,它们因其高致死率、对细胞过敏膜钠通道特殊阻断功能而成为最重要的海洋毒素之一。HPLC 分离出的各个毒素单体在快电子轰击质谱(FABMS)上确定出的结构如图 1(a)所示,TTX 的经典分析测试方法是 Yasumoto 等人建立的液相色谱荧光检测法(LC/FLD),<sup>(2)</sup>此方法包括稀醋酸煮沸提取,提取物经滤膜过滤后在 ODS C<sub>18</sub>柱上用含七氟丁酸离子对试剂的流动相分离,柱后在碱的作用下生成的强荧光团再在(Ex 356 nm, Em 510 nm)荧光检测器(FLD)上检测,检测极限可达 5 ng。此方法对几种 TTX 的分离分析谱图见图 2。近年来的有关研究报道大都是在此基础上进行完善的。

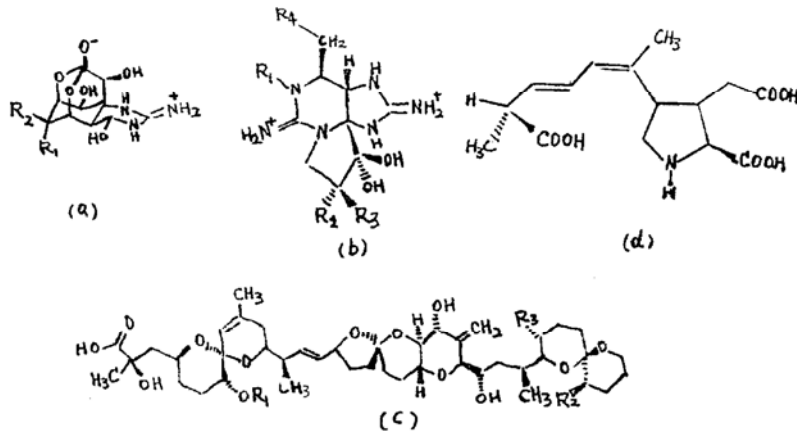


图 1 重要的海洋毒素的基本化学结构

2 石房蛤毒素及其天然衍生物 由石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)及天然衍生物(neoSTX 和 GTXn)所构成的麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisons, PSP),有很高的致死率、较大的中毒频次和广阔的分布区域,在所有的海产品中毒事件中,它们被公认对公共健康的冲击最大。<sup>(3)</sup>它们的基本结构见图 1(b)所示。化学分析包括毒素的提取和 LC/FLD 分析。作为水溶性毒素,它们的 AOAC 规范提取方法是用稀的 HCl 热溶液提取。<sup>(4)</sup>为了避免环境中荧光性物质的干扰,近几年在多数发表的分析方法中又进一步采用了固相分离(SPE)方法,对试样进行纯化。PSP 毒素的 HPLC 测定的基本原理是,所提取的毒素试样在氧化剂的作用下生成荧光性物质,并在(Ex 330 nm, Em 400 nm)的 FLD 上检测。在这些分析方法中,作者认为可分为两类:即柱前氧化法和柱后氧化法,其中柱后氧化法包括液相氧化法、固相氧化法和电化学氧化法。比起柱前氧化,柱后氧化法从总体上简化了操作步骤,更易进行自动操作。柱前氧化法所用的氧化剂主要是 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 0.03 mol/L 高碘酸溶液,James F L 等人<sup>(5)</sup>综合评价了这两种氧化剂对 PSP 毒素的氧化效果,从毒素异构体的氧化产物间的差别和标准品峰高上看,高碘酸比起 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 更优越一些。所以 Yasukasu Oshima 建立的 PSP 毒素柱后液相氧化分析仍采用高碘酸溶液作为氧化剂,<sup>(6)</sup>在他的方法中采用几组不同配比的流动相,成功地对十多种毒素单体进行了分离,分离谱图见图 3。最近 James F. L 等人又相继建立了柱后电化学氧化法<sup>(7)</sup>和固相氧化

\* 该项目获得辽宁省科委 98 年自然科学基金资助

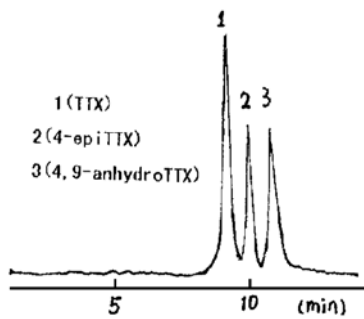


图2 几种河鲃鱼毒素的HPLC分离分析谱图

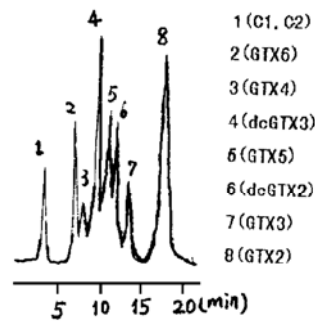


图3 几种麻痹性贝毒素HPLC分离分析谱图

法,<sup>(8)</sup> 本文将其流程描述为图4。

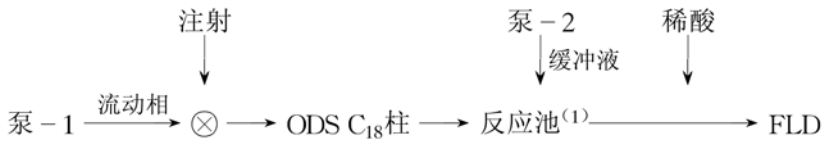
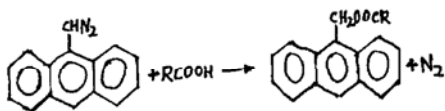


图4 PSP柱后氧化分析流程图

(1) 电化学氧化池: 碳电极电化学反应器, 反应电压 0.75 V, 反应时间 30 min<sup>(7)</sup>; 固相氧化池: 粒状二氧化锰柱。<sup>(8)</sup>

总之, 在满足检测极限和尽可能简化操作步骤的前提下, 这些方法不断发展的目的是: (1) 进一步探索 PSP 毒素中几种同分异构体的有效分离; (2) 促使同分异构体在氧化过程中产生有差别的、HPLC 便于鉴别的产物。这两点也是今后此方面研究的方向。

3 大田软海绵酸及鳍藻毒素 大田软海绵酸 (Okadaic Acid, OA) 及它的天然衍生物—鳍藻毒素 (Dinophysistoxin-n, DTX-n) 是一类重要的致泻性贝毒毒素 (Diarrhetic Shellfish Poison Toxins, DSP), 产毒藻在全球主要海域中几乎都有分布。<sup>(9)</sup> 由于中毒症状易与细菌性胃肠炎混淆, 所以从卫生角度上对它们进行检测特别重要。由于这类毒素是脂溶性的, 所以化学检测时对它们的提取要繁琐一些, Brit A 等人曾以贝类的肝胰腺为对象, 对不同的提取溶剂和纯化条件进行了优化,<sup>(10)</sup> 这为开展 DSP 毒素检测工作的实验室提供了参考依据。从它们的基本结构 (如图 1(c) 所示) 可见, 分子中都有一个羧基官能团, HPLC 测定就是利用这个羧基的活性与荧光标记试剂反应, 生成强荧光性物质, 再经柱分离和荧光检测, 从而达到 pg 级检测。近几年国外这方面的文献报道较多, 最早的荧光标记试剂是 J L Shen 等人提出的 9-蒽亚甲基氮 (9-anthryldiazomethane, ADAM),<sup>(11)</sup> 其反应是:



这种荧光物质可在反相 C<sub>18</sub> 柱上得到很好的分离并在荧光检测器上 (Ex. 365 nm, Em. 412 nm) 有强烈的响应。图 5 是 M A Quilliam 等人在液相色谱 ODS 柱上经

MeCN/H<sub>2</sub>O 分离出色谱图。<sup>(12)</sup>

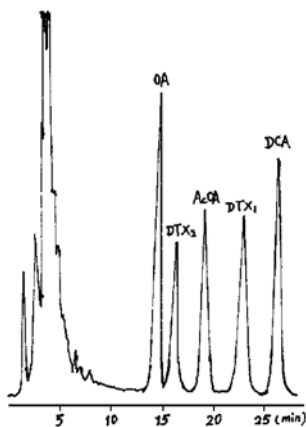


图5 软海绵酸及鳍藻毒素的HPLC分离谱图

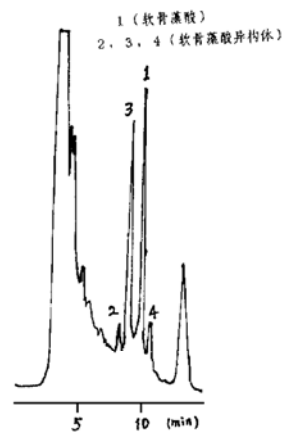


图6 软骨藻酸的HPLC分离谱图

尽管这种方法被逐步完善并广泛地应用到染毒贝和有害藻的分析中,然而由于 ADAM 有毒性很大、不易购买、合成困难、很不稳定(需保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的干冰中)、且操作条件苛刻等缺陷,所以探索其它荧光标记试剂的研究一直不断,K Akasaka 等人受 HPLC 在检测其它含羧基化合物的启发,使用 2-(2,3-蒽酰胺)乙基-三氟甲基磺酸酯(2-(2,3-Anthracedimethylcarboximido)ethyl trifluoromethanesulfonate, AE-OTF)替代 ADAM,使 HPLC 测定 OA 和 DTX 获得了成功,<sup>(13)</sup>AE-OTF 可在一般实验室里合成出来,<sup>(14)</sup>此方法对 OA 的检测极限是 0.8 pg,对 DTX-1 是 1.3 pg。最近 J L Shen 等人又建立了使用荧光性香豆素作标记试剂的检测方法,<sup>(13)</sup>所使用的 4-Br-7-甲基香豆素在许多试剂公司都可购买到,保存温度为 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ ,不太苛刻,只是对 OA 的检测灵敏度稍低(检测极限可达 0.04 ng)。这几种方法那种更适合于我国的实验室现状,作者正拟作一些比较性工作。总之,今后这方面的进一步研究将集中在更易应用普及的方法探索上。

4 软骨藻酸 软骨藻酸(Domoic Acid, DA)和它的天然异构体构成了一类新的贝毒—遗忘性贝毒(Amnesic Shellfish Poisons, ASP),DA 的结构如图 1(d)所示。虽然这类贝毒发现的较晚,但 HPLC 对其进行分析测试却很成功,HPLC 法已被澳洲规范为国家标准方法。在所发表的有关文献中,Michael A Q 等人的方法论述的较详细,他们采用了 AOAC 中对 PSP 的规范提取方法提取 ASP 毒素,经 SPE 纯化后,利用一般 $\text{C}_{18}$ 反相柱以乙腈/水/四氢呋喃作流动相,紫外检测器(UV)检测,<sup>(16)</sup>在 242 nm 处的分离分析谱图见图 6,此方法的检测极限为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,最低回收率为 93%。

5 西加鱼毒 尽管西加鱼毒(ciguatera, CTX)主要发生在热带和亚热带的珊瑚礁地区,但随着旅游业及贸易的发展,它们对公共卫生的危害也变成了全球性问题。它们的结构可参见文献(17)。利用分子中的羟基,CTX 毒素可与 1-蒽羧化青(1-anthrylcarbocyanide, AN)反应生成荧光性衍生物,经荧光检测(Ex 365 nm, Em 465 nm),检测浓度可达 3.5 ng/kg,并有较好的线性关系。用乙腈/水作流动相在 ODS  $\text{C}_{18}$ 柱上的分离分析谱图见图 7。<sup>(1)</sup>

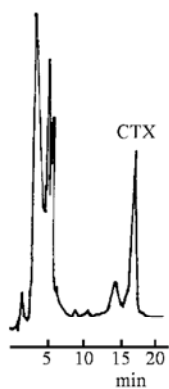


图 7 西加鱼毒素 HPLC 分离分析谱图

## 6 总结

(1)到目前为止,在暴发率较高的 MT 中,只有神经性贝毒(Neurologic Shellfish Poisoning, NSP)未见 HPLC 测定方法报道,其它毒素基本上都有人进行过 HPLC 测定方法的研究,至于蛤毒素(Pectenotoxins, PTX)等其它发生频次较低、卫生危害不大的毒素的检测方法,本文不再赘述。

(2)海洋毒素毒性大,含量极微即可使海产品染毒,HPLC 要对其进行有效的分离检测,大都需要将其转化成 FLD 响应强的荧光性物质。

(3)HPLC 不仅是毒素检测的有力工具,而且还是毒素标准品制备<sup>(18)</sup>的必备工具,以及新发现毒素进行 LC/MS 结构确定的辅助工具。<sup>(9)</sup>

## 7 参考文献

- 1 Takaeshi Y, et al. Determinations of marine toxins in foods. J AOAC 1995, 78(2): 574
- 2 Takaeshi Y, et al. Fluorometric determination of tetrodotoxin in puffer fish by HPLC. Agric Biol Chem. 1989; 53: 893
- 3 Soames Mraci C P. Shellfish Poisoning: public health risk, quality assurance and analytical detection. Chem in Aust. 1995, 62 (12): 22
- 4 Williams S(ed). Official methods of AOAC, 14th INC: Arlington, Virginia 22209 USA, 1984, sec. 18089~18090
- 5 James F L, et al. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. J AOAC 1995, 78(2): 514
- 6 Yasukatsu O. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J AOAC 1995, 78(2):

- 7 James F L, et al. Evaluation of postcolumn electrochemical reactor for oxidation of paralytic shellfish poison toxins. J AOAC 1995, 78(3): 698
- 8 James F L, et al. Development of a manganese dioxide solid – phase reactor for oxidation of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. J. Chromatogr A. 1996, 755: 227
- 9 Takaishi Y, et al. Marine toxins. Chem Rev, 1993, 93: 1897
- 10 Brit A, et al. Optimization of sample cleanup procedure for determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins by use of experimental design. J Chromatogr A. 1997, 764: 223
- 11 Jiulin S, et al. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. Agric Biol Chem. 1987, 51: 877
- 12 Michael A Q. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. J AOAC, 1995, 78(2): 555
- 13 Kazuaki A, et al. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high – performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 1996, 729: 381
- 14 Johnny L H, et al. Synthesis of naphtho(f)ninhydrin. J Org Chem, 1991, 56: 6243
- 15 Jiulin S, et al. Sensitive HPLC – Fluorometric and HPLC – MS determination of diarrhetic poisoning toxins as 4 – bromomethyl 1 – 7 – methoxycodmarin esters. Fresenius. J Anal Chem, 1997, 357: 101
- 16 Michael A Q. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. J AOAC, 1995, 78(2): 543
- 17 Murata M, et al. Structures of ciguatoxin and its congener. J Am Chem Soc, 1989, 111: 8929
- 18 Usagawa T, et al. Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge halichondria okadae. Toxicol, 1989, 27: 1323

## 卫生部司(局)文件 卫法监食发[1999]第7号

### 关于“饼干喷涂专用油”查处中有关法律适用问题的批复

天津市卫生局:

你局1月18日“关于查处广东顺达饼干厂含有矿物油饼干有关问题的请示”收悉,现批复如下:

一、天津市汉沽区副食品糖酒总公司赛上副食商场经销广东顺达饼干厂生产的含有矿物油的系列饼干,其行为违反了《中华人民共和国食品卫生法》第九条第十一项、第十一条之规定,对此,应根据本法第四十二条、第四十四条之规定予以处罚。采取罚款的行政处罚时,其罚款额度由你局结合案件的实际情况,根据《食品卫生行政处罚办法》第三条和卫生部卫法监发[1998]第12号文件的规定,在法定幅度内具体裁量。

二、《中华人民共和国食品卫生法》所称“销毁”,系指卫生行政部门对禁止生产经营的食品采取火烧、掩埋、碾压及其他方式,改变该食品的外观、形态、性状和原有用途的行政强制措施。对已查封之食品,采取何种方式销毁,由你局自定。

卫生部卫生法制与监督司  
一九九九年一月二十一日