

反相离子对-高效液相色谱法测定河豚毒素

张 虹 柳正良¹ 黄蓓琳 王洪泉(上海 200065 同济大学医学院附属甘泉医院;¹ 上海 200433 第二军医大学药学院)

摘要 目的: 建立了反相离子对-高效液相色谱法测定河豚毒素含量的方法。方法: 选用 SHIMADZU ODS 色谱柱(150× 6 mm 5 μm), 以 0.2% (v/v) 醋酸液为流动相, 流速为 1.2 mL/min, 检测波长为 230 nm。结果: 河豚毒素线性范围 20~ 100 μg/mL, $r = 0.9960$ ($n = 5$); 回收率为 93.32%, $RSD = 5.41\%$ ($n = 5$); 日内精密度为 6.10%, 日间精密度为 7.42% ($n = 5$); 最低检测限 50 ng。结论: 方法准确、快速、简便, 可作为迅速确定河豚毒素含量的测定方法。

关键词 河豚毒素; 反相-离子对-高效液相色谱法

Determination of tetrodotoxin by RP-IP-HPLC

Zhang Hong (Zhang H), Liu Zheng-liang (Liu ZH), Huang Bei-lin (Huang BL), Wang Hong, Quan (Wang HQ) (Ganquan hospital, Medical College of Tongji University, Shanghai 200065; College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** A RP-IP-HPLC method was used to determine the content of tetrodotoxin. **METHOD:** The HPLC was performed on a SHIMADZU ODS Column (150× 6 mm 5 μm) with 0.2% (v/v) acetate solution as the mobile phase (flow rate 1.2 mL/min) and the detection wavelength was at 230 nm. **RESULTS:** The linear range of tetrodotoxin was 20 ~ 100 μg/mL ($r = 0.9960$, $n = 5$). The mean recovery was 93.32%, $RSD = 5.41\%$ ($n = 5$). The variation of within day was 6.10% and that of day to day was 7.42% ($n = 5$). The limit of detection was 50 ng. **CONCLUSION:** The method is simple, sensitive and accurate, and can be applied to the rapid determination of tetrodotoxin.

KEY WORDS tetrodotoxin, RP-IP-HPLC

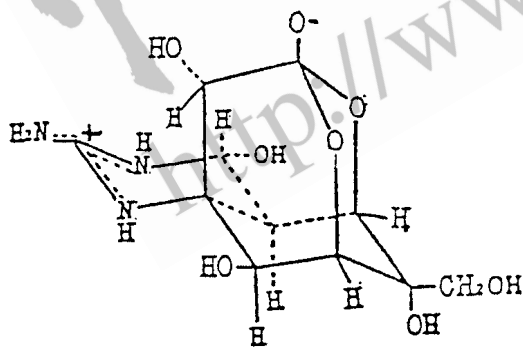


图 1 TTX 的分子结构式

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是豚毒鱼类及其他生物体内含有的一种生物碱,其分子式为 $C_{11}H_{17}O_8N_3$, 分子量为 319, 分子结构如图 1。

TTX 对兴奋膜的 Na^+ 离子通道具有高度专一性作用, 已成为神经生理学、药理学、肌肉生理学等方面广泛被应用的工具药。国内学者潘心富等已有报道对 TTX 药用开发的报道。但 TTX 生理活性极强, 毒性也极强, 安全域值也极低, 迄今尚无准确精密 TTX 含量的测定方法^[1], 从而限制了它在临床方面的应用。目前国内外对 TTX 的检测有小鼠生物检测法、核磁共振法、电泳法和液相色谱法等^[2], 其中 HPLC 应用较多, 但其方法为柱后衍生化法, 即在柱后加强碱, 在沸水或油浴中使 TTX 衍生成能发荧光的物质, 用荧光检测器

测定荧光强度间接定量。该法操作繁琐且在普通 HPLC 仪上较难实现。本文报道用醋酸与 TTX 结合形成离子对在 ODS 柱上采用紫外检测器直接测定 TTX 的含量,操作简单、快速、准确,为检测 TTX 含量提供一个现实可行的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

SHIMADZU 高效液相色谱仪 LC-9A(日本岛津)配有 SPD-6A 紫外可见检测器及 C-R4A 数据处理仪;SB2200 超声波清洗器(Shanghai Branson)。

1.2 试剂

河豚毒素标准品(> 99.5%)(河北省水产研究所),甲醇为高效液相色谱试剂,醋酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准贮备液的配制

精密称量 TTX 1.0 mg 置于一具塞离心管中,用移液管吸取 1.0 mL 的 H₂O,使其溶解后即得 1.0 mg/mL 的 TTX 贮备溶液,置于冰箱中保存。

2.2 色谱条件

分析柱为 ODS 柱(150×6 mm 5 μm),预柱为 ODS(10×4 mm 5 μm);流动相:0.2% (v/v) 醋酸液,流速:1.2 mL/min;检测波长:230 nm;TTX 的保留时间为 6.5 min;室温;AUFs=0.001。

2.3 标准曲线的制备

由上述标准贮备液用 H₂O 经适当的稀释使配制 20, 30, 40, 50, 60, 100 μg/mL 系列标准 TTX 溶液,按上述色谱条件各进样 5 μL,以峰高为纵坐标,浓度为横坐标,由 C-R4A 计算机回归计算得回归方程: $Y = -86.6 + 13.16C$ ($r = 0.9960$, $n = 5$)

式中 Y: 标准溶液的峰高,单位: mV

C: 标准溶液的浓度,单位: μg/mL

结果显示: TTX 在 20~100 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.4 回收率

于提取空白液中加入 20, 50, 100 μg/mL 的 TTX 各 5 份,通过加样回收率试验计算其平均回收率为: $\bar{X} \pm RSD = 93.32\% \pm 5.41\%$ ($n = 5$)。

2.5 精密度

配置浓度为 20, 50, 100 μg/mL TTX 各 5 份,于同一天不同时间和不同日间按 2.2 色谱条件进行测定,并求得平均日内精密密度为 6.1%,平均日间精密密度为 7.42%。

2.6 最低检测限

由于信号线与噪音线之比为 2 时的最低进样量是 50 ng,所以该法的最低检测限是 50 ng。

2.7 样品的测定

运用上述测定方法检测酸水提取法^[3]所得样品中得 TTX 含量,测定结果见图 2。

3 讨论

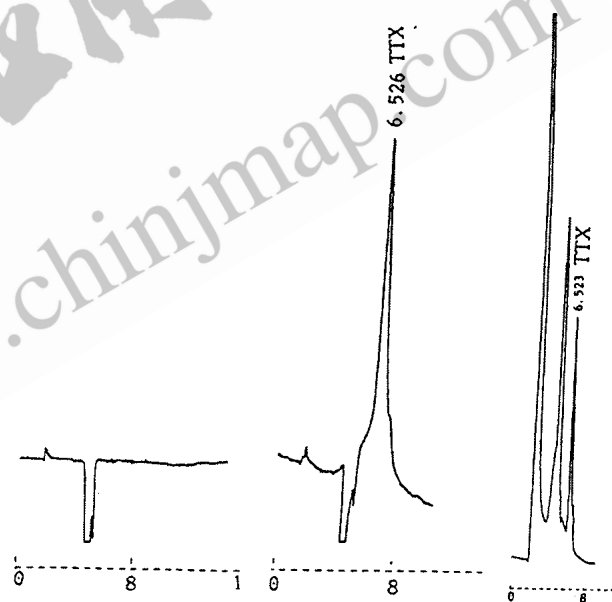
3.1 TTX 纯品无紫外吸收,因此在使用 HPLC 分离测定 TTX 时,通常采用柱后衍生化^[2],但该法繁琐、且在普通仪

器室中较难实现。根据国外文献报道,可用醋酸作离子对试剂,采用紫外检测器于 230 nm 处对 TTX 进行检测。

另外,若流动相中无醋酸溶剂,TTX 在反相柱上是不被洗脱的,而流动相中加入醋酸(0.2%, v/v)后,TTX 可迅速从反相柱上洗脱下来。

3.2 流动相的选择 曾试图调整甲醇与 0.2% (v/v) 醋酸之间不同的比例来实现控制 TTX 的保留时间,发现纯的 0.2% (v/v) 醋酸液作流动相基线稳定,甲醇的加入会使 TTX 峰形出现拖尾现象,因此选择纯的 0.2% (v/v) 醋酸液作流动相。可通过调整流速来控制 TTX 的保留时间。当流速为 1.2 mL/min 时,TTX 的保留时间为 6.5 min,且无其它成分干扰,故流速定为 1.2 mL/min。

3.3 目前检测 TTX 的方法虽有一定报道,但评价不一。小鼠生物检测法简便,但费时费力,耗费较多小白鼠,且重复性差,缺乏特异性;电泳法灵敏性低,且需与薄层层析联合运用;核磁共振法、GS-MS、HPLC 的柱后衍生化法由于受仪器的限制,较难在普通实验室推广;本文建立的离子对反相高效液相色谱法不仅可检测 TTX 纯品,而且兼分离、测定于一体,快速、灵敏、准确,可作为提取、生产 TTX 过程的监测手段。



A 空白提取液 B TTX 标准品(50 μg/mL) C 提纯品
图 2 TTX 及其提取液的色谱图

参考文献

- 1 张豁中,温玉麟.动物活性成分化学.天津科学技术出版社,1995:848.
- 2 Tamao N, Abdallah EA, Osamu A, et al. Tetrodonic acid-like substance: a possible precursor of tetrodotoxin. Toxicon, 1991, 29(7): 845.
- 3 陈成添.国产树脂纯化 TTX 的探讨.广东医学院学报,1993, (2): 556.

收稿日期: 2000-06-18