

基于高效液相色谱法的扇贝毒素-2 制备方法研究*

王 玉^{1,2} 彭吉星² 吴海燕² 郭萌萌² 佟蒙蒙^{1,3} 谭志军²

(1. 浙江大学海洋学院海洋生物研究所 舟山 316021; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 舟山市疾病预防控制中心 舟山 316021)

摘要 本文以渐尖鳍藻(*Dinophysis acuminata*)为实验原料,建立了基于高效液相色谱法(HPLC)的扇贝毒素-2(Pectenotoxin-2, PTX2)的制备方法。研究重点对鳍藻细胞的破碎、PTX2 毒素的提取及 HPLC 纯化等三个步骤的方法进行筛选和优化。结果表明,反复冻融与超声波细胞破碎相结合可获得最大的细胞破碎率和毒素提取率,分别为 99.2%和 81.5%。采用四种有机试剂(甲醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷)及三种固相萃取小柱(Solid Phase Extraction, SPE) (Oasis HLB SPE, Phenomenex Strata-X SPE, Sep-Pak C18 SPE)对 PTX2 毒素进行提取,其中乙醚-二氯甲烷的提取效率最高,达 78.2%。在 HPLC 对 PTX2 毒素的纯化实验中发现,流动相的 pH 会影响毒素组分的分离,其中在碱性流动相(含 6.7mmol/L 氨水的水溶液和乙腈溶液, pH=10.94)条件下,PTX2 的分离效果最佳,响应值最高。实验使用 Phenomenex Kinetex C18(4.8mm×250mm, 5 μ m)色谱柱,在上述碱性流动相条件下,分离得到纯度为 93.2%的 PTX2 毒素。本研究选定的藻细胞破碎、PTX2 毒素提取、及 HPLC 纯化方法简单快捷,高效易操作,为从大规模培养的鳍藻细胞中制备高纯度 PTX2 毒素提供了技术支持。

关键词 扇贝毒素-2; 鳍藻; 高效液相色谱; 萃取; 制备

中图分类号 O657.63 doi: 10.11693/hyhz20171000272

近年来,人类因误食沾染贝类毒素的海产品而造成中毒的现象屡见不鲜。贝类毒素主要由有毒藻类产生,通过滤食过程积累在海洋生物体内,被人类误食后影响身体健康(Hallegraef *et al.*, 2003; FAO, 2004; Reguera *et al.*, 2014)。扇贝毒素(Pectenotoxins, PTXs)是一种肝毒素,能诱导肝细胞快速坏死,是具有大环内酯结构的脂溶性聚醚类化合物,因常在贝类毒素中毒事件中与腹泻性贝毒大田海绵酸(Okadaic acid, OA)和鳍藻毒素(Dinophysistoxin, DTXs)共同大量检出而引起广泛关注(Suzuki *et al.*, 2009; Reguera *et al.*, 2014; 王艳龙等, 2016)。迄今已有 20 余种 PTXs 类组分及其衍生物被鉴定,其中尤以扇贝毒素-2(Pectenotoxin-2, PTX2)最为常见(Reguera *et al.*,

2014; Garcia *et al.*, 2016)(图 1)。自 1984 年 PTXs 在日本养殖的扇贝 *Patinopecten yessoensis* 中被首先鉴定出后,扇贝毒素陆续在全球其他海域被发现(Hallegraef *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2006; Reguera *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017)。鉴于 PTXs 潜在的细胞毒性(Miles *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008),欧盟规定了水产品可食用组织中 PTXs 的含量,与 OA 和 DTXs 之和不得超过 160 μ g/kg,且为防止按照此标准造成急性参考剂量(ARfD)超标,规定食用 400g 贝肉中 PTXs 含量不得超过 120 μ g/kg (Alexander *et al.*, 2009)。因此建立一套完整的 PTXs 监测和检测技术,自主制备 PTXs 毒素标准品,是实现海产品食用安全的必需手段。

* 科技部国家重点研发计划项目, 2016YFC1402104 号; 山东省重点研发计划项目, 2016GSF120018 号; 浙江省海产品健康危害因素关键技术重点实验室开放基金资助项目, 201606 号。王 玉, 硕士研究生, E-mail: motaxue@163.com

通讯作者: 佟蒙蒙, 博士生导师, 副教授, E-mail: mengmengtong@zju.edu.cn; 谭志军, 硕士生导师, 研究员, E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-24, 收修改稿日期: 2018-01-19

扇贝毒素, 特别是 PTX2, 主要由海洋甲藻中的鳍藻属 (*Dinophysis* spp.) 产生, 如倒卵形鳍藻 (*Dinophysis fortii*)、渐尖鳍藻 (*D. acuminata*)、尖锐鳍藻 (*D. acuta*)、具尾鳍藻 (*D. caudata*)、勇士鳍藻 (*D. miles*) 等 (Suzuki *et al*, 2009; Reguera *et al*, 2012; Nielsen *et al*, 2013; Tong *et al*, 2015)。但由于鳍藻的混合营养特性, 即鳍藻的生长和繁殖需要三级食物链 [鳍藻—红色中缢虫 (*Mesodinium rubrum*)—隐藻 (*Geminigera cryophila*)] 来完成 (Park *et al*, 2006), 这为从大规模培养的鳍藻中提取 PTX2 带来一定的困难。因此, 国际上一般是通过大量收集浓缩野外海水

样品或染毒贝类来获取 PTX2 标准品的制备原料。这样的工艺不仅制备过程复杂且工序繁琐, 更重要的是原料来源极不稳定, 无法满足常规监管及应急需要。

因此, 本研究以上述三级食物链为实验手段 (Gao *et al*, 2017), 成功大规模培养了来自中国大连海域的渐尖鳍藻 (DAYS01-E6 株), 为制备 PTX2 提供了充足的原料。并在此基础上, 重点研究了在纯种鳍藻细胞中提取、分离、HPLC 纯化 PTX2 的标准化方法, 同时采用高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 进行定量检测, 为建立高效快速的 PTX2 标准物质研制方法奠定基础。

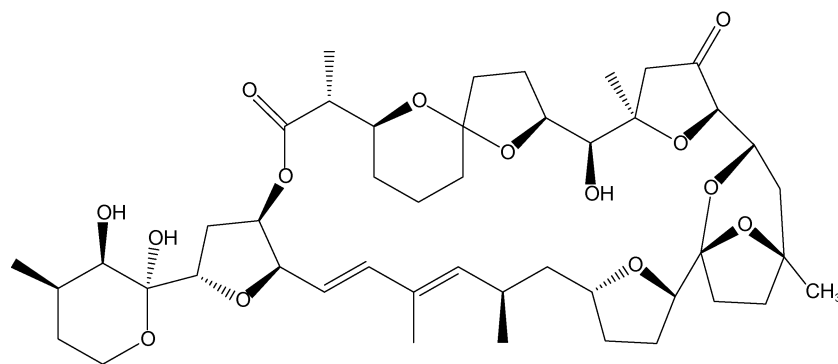


图 1 PTX2 的化学结构式 (James *et al*, 1999)

Fig.1 The chemical structure of PTX2 (James *et al*, 1999)

1 材料与方法

1.1 藻细胞的培养与收集

渐尖鳍藻 (DAYS01-E6 株) 于 2014 年单细胞分离于中国大连海域 (Gao *et al*, 2017), 红色中缢虫 (JAMR) 和隐藻 (JATA) 来自日本海域 (Nagai *et al*, 2008), 该三株藻样均在 15°C, 低光照 (~50 μmol photons/m²·s), 光暗周期比 14h : 10h 的环境下培养。

将 30mL (~4000 cells/mL) 的红色中缢虫和 2mL (~200000 cells/mL) 隐藻, 接种到 30mL f/6-Si 培养基中, 当隐藻全部被摄食后, 红色中缢虫可用来作为渐尖鳍藻的食物。取一定量的 DAYS01-E6 加入到含 800mL f/2-Si 培养基的锥形瓶中, 每周加入约 2 倍其细胞密度的红色中缢虫。当鳍藻密度达到 ~8000 cells/mL 时, 对藻细胞进行收集。收集时, 首先将藻液经 15 μm 筛绢过滤, 将收集到筛绢上的藻细胞用 f/2-Si 培养基冲洗到 15mL 离心管中, 置于 -80°C 冰箱冻存备用。

1.2 扇贝毒素-2 提取

1.2.1 细胞破碎方法 本研究从五种细胞破碎方

法中进行筛选, 分别是:

(a) 煮沸法: 取冰冻状态的藻液于 100°C 沸水浴中加热 10min;

(b) 反复冻融法: 冰冻状态的藻液于室温下解冻, 化冻完全后, 再次置于 -80°C 冰箱冷冻, 反复冻融 3 次;

(c) 超声破碎法: 取室温解冻状态藻液置于超声波清洗器中水浴超声破碎 15min (超声功率 300W, 频率 40kHz);

(d) 超声波细胞破碎法: 取室温解冻状态藻液, 在冰水浴条件下使用超声波细胞破碎机进行细胞破碎 (超声功率 325W、超声频率 25kHz、破碎时间/超声时间 5s/10s、持续时间 20min, 温度不超过 20°C, 仪器连续工作时间不超过 120min);

(e) 反复冻融结合超声波细胞破碎法: 结合 (b) 和 (d), 具体条件参上。显微镜观察破碎前后完整细胞的个数, 计数三次记录平均值, 其中破碎前细胞数 C_0 , 破碎后为 C_1 , 并用 $L = (1 - C_1/C_0) \times 100\%$ 计算细胞破碎率。

对上述细胞破碎方法进行比较, 选取最优方式用于毒素提取。

1.2.2 毒素提取方法 本研究比较了三种液液萃

取方法和三种固相萃取方式对破碎细胞中PTX2的提取效果,其中液液萃取选用的有机试剂为:

(1) 甲醇直接提取法:冻融后的藻细胞加入等体积80%甲醇,按(d)进行细胞破碎。离心3min(8000r/min),取出上清液旋转蒸发浓缩,待进一步纯化。

(2) 丙酮直接提取法:取收集的藻液反复冻融三次后摇匀。加入等体积丙酮溶液,按(d)进行细胞破碎。离心3min(8000r/min),取出上清液蒸发浓缩,待纯化。

(3) 乙醚-二氯甲烷萃取法:取破碎后的藻液,依次用等体积乙醚和二氯甲烷各萃取两次,萃取时充分震荡,合并萃取液,加入无水硫酸钠或无水硫酸镁除水后除去干燥剂,用35—40°C旋转蒸发浓缩后,待纯化(Miles *et al.*, 2004)。

固相萃取提取方式则比较了三种针对脂溶性毒素有良好吸附能力的固相萃取小柱,分别为:Waters Oasis HLB SPE (60mg/3mL, 美国Waters公司), Phenomenex Strata-X SPE (60mg/3mL, 美国Phenomenex公司), Waters Sep-Pak C18 SPE (60mg/3mL, 美国Waters公司),具体方法为:

(4) SPE固相萃取法:SPE柱先分别依次用3mL甲醇和3mL Milli-Q水进行活化平衡,然后直接加入10mL破碎的藻液,1mL纯水淋洗以去除极性物质,减压抽干后,用0.5mL甲醇洗脱两次,并收集洗脱液,过0.22 μ m有机相滤膜,待进一步纯化。三种SPE柱的处理方式和步骤相同。

毒素提取方法的选取,以毒素提取回收率的高低来决定。将一定量的PTX2毒素标准品 T_0 加入到冻融后的藻液样品中,作为实验组,不添加标准品的样品作为对照组,分别测定经上述提取方法后的PTX2毒素含量,其中对照组PTX2毒素含量为 T_1 ,实验组为 T_2 ,并用计算公式 $R=(T_2-T_1)/T_0$ 来计算回收率。

1.2.3 葡聚糖凝胶色谱柱分离 液液萃取后的PTX2粗提液选用葡聚糖凝胶柱净化。凝胶柱采用Sephadex LH20进行装填,凝胶材料经甲醇活化后,湿法装填入玻璃层析柱(60cm \times 1.2cm)。将经有机试剂提取后的扇贝毒素浓缩提取液(3mL)上样后,用甲醇洗脱,分段收集,每管收集液为10mL。从各管取1mL进行HPLC-MS/MS分析。根据该结果,收集含PTX2的组分(约为250—600mL)合并、浓缩,进行高效液相色谱纯化。

1.3 液相色谱纯化过程

采用配有光电二极管阵列检测器及Empower3数

据处理系统的Waters e2695高效液相色谱进行分析。制备色谱条件:色谱柱Phenomenex Kinetex C18 (4.8mm \times 250mm, 5 μ m);柱温:40°C;检测波长:235nm;流速:1mL/min;流动相A:纯水(含6.7mmol/L氨水);流动相B:色谱纯乙腈/水(90:10, v/v, 含6.7mmol/L氨水);梯度洗脱程序为:0—15.0min, 20% B; 15.0—20.0min, 20%—80% B; 20.0—20.1min, 80%—20% B; 20.1—25.0min, 20% B。根据PTX2在235nm处有较强吸收这一特点,采用二极管阵列检测器在紫外光区对其进行检测。总分析时间为26min,根据峰形收集15—17min流出液,40°C减压蒸发浓缩,甲醇稀释溶解后,HPLC-MS/MS分析PTX2纯度。

1.4 液相色谱-串联质谱分析条件

采用5500QTRAP四极杆-线性离子阱复合质谱(ESI源)进行分析。液相色谱条件:Phenomenex XB-C18色谱柱(2.1mm \times 100mm, 2.6 μ m);延迟柱:C18色谱柱(2.1mm \times 50mm, 5 μ m);柱温:40°C;流速:0.350mL/min;进样量:5 μ L;流动相:流动相A为水(含50mmol/L甲酸、2mmol/L甲酸铵),流动相B为95%乙腈水溶液(含50mmol/L甲酸、2mmol/L甲酸铵);梯度洗脱:0—7.0min, 20% B; 7.0—10.0min, 20%—90% B; 10.0—10.1min, 90%—20% B; 10.1—12.0min, 20% B。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),多反应监测(MRM),正负离子同时监测模式;气帘气:20psi;正负离子喷雾电压为:5.5kV和-4.5kV;离子源温度:550°C;离子源气1:345kPa;离子源气2:345kPa;其他监测参数见表1。PTX2及其常见伴生毒素OA、DTX2、DTX1、YTX、GYM、SPX1等毒素标准品购自于加拿大国家海洋生物研究中心,标准曲线采用五个不同梯度的浓度(10—200ng/mL)进行计算;以三倍信噪比(S/N=3)确定方法的检出限(LOD),以十倍信噪比(S/N=10)确定检测组分的定量限(LOQ),其中PTX2的检出限为6ng/mL,定量限为19.8ng/mL。

2 结果与讨论

2.1 分析质谱条件的选定

本研究利用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法对上述脂溶性毒素进行定性和定量检测,用于对毒素提取和纯化方法的筛选。

首先,纯种渐尖鳍藻藻液的PTXs毒素分析。针对实验室前期建立的OA、DTXs和PTXs等脂溶性贝

表 1 11 种脂溶性毒素的质谱分析参数
Tab.1 Transitions and mass spectrometry parameters for 11 marine lipophilic toxins

化合物	检测离类型(m/z)	定量离子对	碰撞能(eV)	定性离子对	碰撞能(eV)	去簇电压(v)
大田软海绵酸 (okadaic acid, OA)	[M-H] ⁻	803.5/255.1	-61	803.5/563.4	-55	-40
鳍藻毒素-2 (dinophysistoxin-2, DTX2)	[M-H] ⁻	803.5/255.1	-61	803.5/563.4	-55	-40
鳍藻毒素-1 (dinophysistoxin-1, DTX1)	[M-H] ⁻	817.5/255.2	-65	817.5/563.3	-60	-20
虾夷扇贝毒素 (yessotoxin, YTX)	[M-H] ⁻	1141.5/1061.7	-50	1141.5/855.5	-102	-30
扇贝毒素-2sa (pectenotoxin-2SA, PTX2sa)	[M-H] ⁻	875.5/137.2	-61	875.5/179.2	-61	-50
扇贝毒素-2 (pectenotoxin-2, PTX2)	[M+NH ₄] ⁺	876.5/212.7	50	876.4/823.0	30	40
扇贝毒素-11 (pectenotoxin-11, PTX11)	[M+NH ₄] ⁺	892.5/212.7	50	892.5/839.5	30	40
扇贝毒素-12 (pectenotoxin-12, PTX12)	[M+NH ₄] ⁺	874.5/212.7	50	874.5/821.5	30	40
扇贝毒素-1 (pectenotoxin-1, PTX1)	[M+NH ₄] ⁺	892.5/213.2	50	892.5/839.5	40	40
环亚胺毒素 (gymnodimine, GYM)	[M+H] ⁺	692.5/444.4	50	692.5/674.4	40	50
螺环内酯毒素 (spirolides-1, SPX1)	[M+H] ⁺	508.3/490.3	35	508.3/136.1	50	60

类毒素检测方法(Wu *et al.*, 2014)进行优化, 以确定提取物中是否含有除 PTX2 外的其他扇贝毒素(Suzuki *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2008)。具体操作为: 采用 QTRAP 系统 MIM(多粒子监测)作为预扫描模式, 建立非目标物筛查方法。采用 MIM-ER-EPI 工作模式, 电喷雾离子源(Turbo Ion Spray)作为离子源, 正离子模式检测, 其中四级杆 Q3 和 Q1 设置为相同质荷比的方法, 设定选择的离子为[M+NH₄]⁺, 扫描离子质荷比(m/z)范围为 655—1055 的离子。为避免母离子在 Q2 碰撞池碎裂, 将碰撞能设为 5V。每对离子驻留和停顿时间设为 1ms, 该方法一个周期为 1.3s。根据理论质量数的选定, 在 m/z 为 876.5(图 2b)、892.5(图 2c)、894.5 和 874.5(图 2d)(Miles *et al.*, 2004, 2006; Gerssen *et al.*, 2009)处检测到色谱峰, 且峰形良好, 初步判断为 PTX12(874.5)、PTX2(876.5)、PTX11、PTX1、PTX12sa(892.5)和 PTX2sa(894.5), 在 m/z 为 906.5 处没有色谱峰检出, 初步判断没有 PTX6 和 PTX7(图 2e)。

为进一步确定渐尖鳍藻中 PTXs 毒素的种类, 本研究结合 IDA-EPI 采集模式, 以多反应监测+正负离子监测模式重点优化检测到的 PTXs 毒素的子离子和碰撞能, 增加了 PTX2sa、PTX11、PTX12 和 PTX1

的 MRM 扫描离子(表 1); 检测过程中, 通过预设条件对疑似检测结果触发 EPI 增强子离子扫描, 获得未知化合物的增强二级质谱图, 该质谱图可与在线质谱谱库进行匹配辅助定性。研究结果显示, 实验培养的渐尖鳍藻(DAYS01-E6 株)产毒种类除 OA、DTX2 和 DTX1 外, PTXs 包括 PTX2、PTX11, 且 PTX2 含量远高于其他四种毒素(图 5), 适用于毒素制备。

2.2 前处理方法的优化

2.2.1 破碎方法对制备的影响

细胞的充分破碎有利于 PTXs 的释放和提取(Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015)。本研究采用了五种细胞破碎的方法, 其破碎程度及 PTX2 提取效率如图 3 所示。这五种破碎方法均可对藻细胞进行不同程度的破碎, 其中反复冻融和超声波细胞破碎法对毒素提取率最高, 为 81.51% ($n=5$), 其次是超声波细胞破碎法(78.24%)、超声破碎法(60.23%)和反复冻融法(45.27%)(图 3)。煮沸法的毒素提取效率最低(21.45%), 这可能与 PTXs 在高温环境下易变性或转化有关(García *et al.*, 2016)。冰水浴超声细胞破碎的过程在较低的温度下进行, 适用于对 PTX2 等热敏性物质的提取, 并得到相对较高的毒素提取率。同时, 实验发现冻融对细胞破碎也有一定的

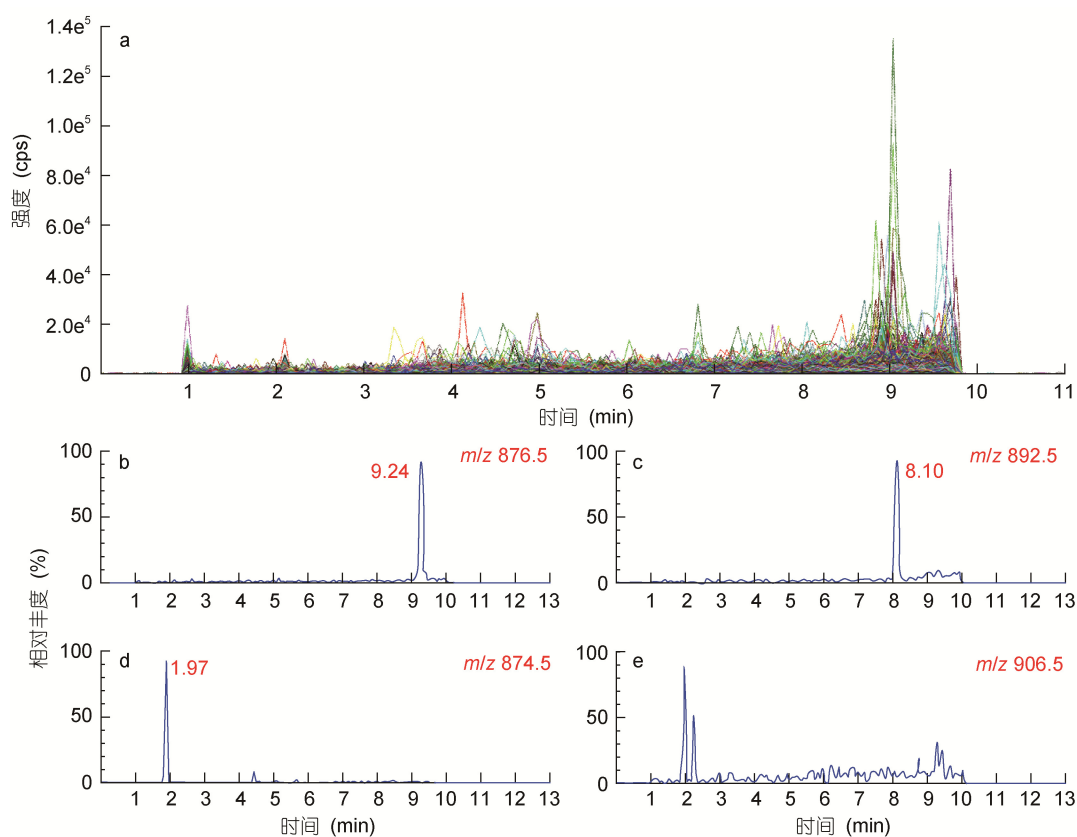


图 2 MIM 扫描模式的总离子流图(a)与特定离子提取图(b, c, d, e)

Fig.2 Chromatography in MIM scanning mode on total ion (a) and selected ion (b, c, d, e)

注: b: m/z 876.5; c: m/z 892.5; d: m/z 874.5; e: m/z 906.5

效果, 如一次冻融后的细胞破碎率不高(22.30%), 但多次冻融其破碎率显著提高。为避免多次冻融过程的耗时低效问题(钟韵山等, 2014), 本研究结合了超声波等辅助方法。超声波破碎具有耗能较低、破碎均匀、易于操作以及处理时间短(Halim *et al.*, 2012)等优点, 在对超声波破碎法和超声细胞破碎法的选择中, 该细胞破碎率分别达到 90.24%和 94.24%, 同时, 对 PTX2 毒素的提取, 超声细胞粉碎机也优于超声清洗器(81.51%>78.24%)。反复冻融与超声波细胞破碎相结合可获得最大的细胞破碎率和毒素提取率, 分别为 99.2%和 81.5%。因此, 实验最终采用反复冻融结合超声波细胞破碎法对鳕藻细胞破碎。

2.2.2 提取方法对制备的影响 实验采用液相萃取(LPE)和固相萃取(SPE)法对 PTX2 的提取效率进行分析, 并采用加标回收进行验证(图 4)。从图 4 中可以看出, 有机试剂能更高效地提取藻细胞中的 PTX2 毒素, 提取效率随有机试剂种类和浓度的变化而改变。PTX2 是脂溶性物质, 本研究选择的三种试剂均

为常用的脂溶性物质溶剂(Miles *et al.*, 2004, 2006; Matsushima *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017), 其中乙醚-二氯甲烷的提取效率最高, 达到 78.2% ($n=5$), 其次是丙酮(51.6%), 甲醇的提取效率最低(46.6%)。同时, 乙醚和二氯甲烷的毒性均小于丙酮与甲醇, 且具有价格优势, 因此被选定为 PTX2 毒素最优的液液萃取试剂。然后利用葡聚糖凝胶色谱柱分离去除粗提物中的大量藻类色素和脂肪酸等杂质, 最后进行 HPLC-MS/MS 分析。

固相萃取操作简单, 三种 SPE 小柱吸附填充物均为反相吸附剂, 过程包括活化、上样、淋洗和洗脱四步, 将藻液中的脂溶性毒素提取出来, 同时能去除样品中大量的亲水性杂质。根据 SPE 填充物的孔径、材质等特征, 脂溶性毒素的吸附效率不同(Wu *et al.*, 2014)。本研究发现 Phenomenex Strata-X SPE 和 Sep-Pak C18 SPE 对 PTX2 毒素的吸附效率相似(44%), 且优于 Oasis HLB SPE 柱(40%)。相对液相萃取的方法, 固相萃取方法可明显减少基质成分, 降低藻类基

质效应对质谱分析的影响,但其回收率较低。

综合考虑提取方法的稳定性、操作便捷性、毒素的提取效率等,本方法选用乙醚-二氯甲烷作为提取剂,通过凝胶色谱减少基质杂质的影响,对鳍藻破碎细胞中 PTX2 毒素进行提取。

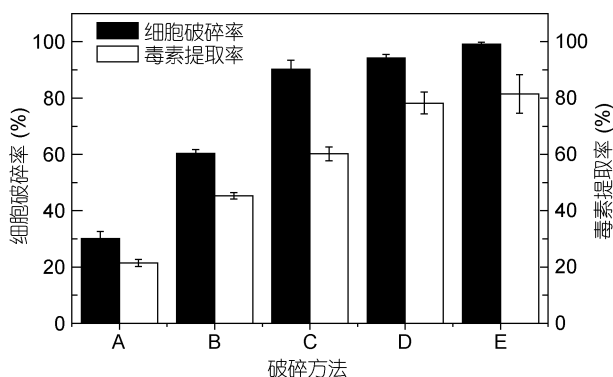


图 3 破碎方法对细胞破碎率和毒素提取率的影响($n=5$)

Fig.3 Responses of different cell disruption methods on cell disruption rate and toxin extraction efficiency ($n=5$)

注: A: 煮沸法; B: 反复冻融法; C: 超声破碎法; D: 超声波细胞破碎法; E: 反复冻融结合超声波细胞破碎法

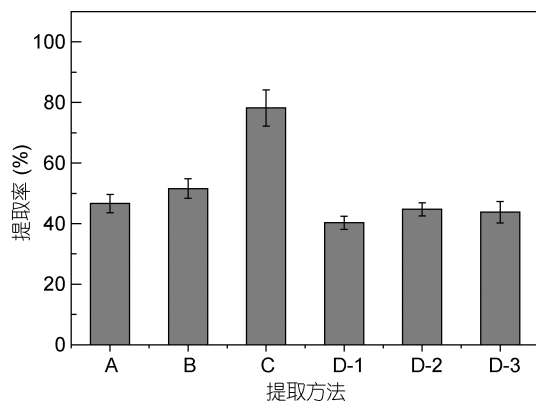


图 4 提取方法对 PTX2 毒素提取回收率的比较($n=5$)

Fig.4 PTX2 toxin extraction efficiency from *Dinophysis* spp by different extraction methods ($n=5$)

注: A: 甲醇直接提取法; B: 丙酮直接提取法; C: 乙醚-二氯甲烷萃取法; D-1: 固相萃取小柱 Waters Oasis HLB; D-2: 固相萃取小柱 Phenomenex Strata-X; D-3: 固相萃取小柱 Waters Sep-Pak C18

2.3 色谱制备条件的优化

采用制备型 HPLC, 利用化合物在反相柱上的不同保留能力进行分离。由于不同条件下藻液中不同毒素的电荷状态不同, 其洗脱顺序随流动相的变化而改变(Gerssen *et al.*, 2009), 且流动相的 pH 值对毒素的分离有重要影响。由于 OA 和 DTXs 含有羧基, 因此其在酸性条件下处于中性状态, 在碱性条件下会失去氢离子而带有负电荷。而 PTXs 不含有可电离的基

团, 因此在任何状态下都处于中性状态。为使 PTX2 能够最大程度的与其他毒素的分离, 实验首先使用相同的洗脱程序, 比较酸性、中性、碱性等三种流动相条件下的洗脱结果。其中, 酸性条件(pH=2.74): 流动相 A 为纯水(含 50mmol/L 甲酸、2mmol/L 甲酸铵), 流动相 B 为 90%乙腈水溶液(含 50mmol/L 甲酸、2mmol/L 甲酸铵); 近中性条件(pH 6.07): 流动相 A 为纯水(含 2mmol/L 甲酸铵), 流动相 B 为 90%乙腈水溶液(含 2mmol/L 甲酸铵); 碱性条件(pH 10.94): 流动相 A 为纯水(含 6.7mmol/L 氨水), 流动相 B 为 90%乙腈水溶液(含 6.7mmol/L 氨水)。分析发现, 酸性条件下(图 5a), PTX2 可与其他毒素基线分离, 但分离度较低; 在中性条件下(图 5b), PTX2($t_R=15.09\text{min}$)与 DTX1($t_R=15.11\text{min}$)共流出(检出时间几乎相同, 不易分离)。这种条件不会影响 PTX2 和 DTX1 的定量分析, 是因为在 HPLC-MS/MS 检测过程中, 由于毒素的电荷状态不同, DTX1 易在负离子模式下检出, PTX2 则易在正离子模式检出, HPLC-MS/MS 可以进行快速的正负离子模式转换, 或者通过进样两次, 分别进行正、负离子的检测来实现。但在制备过程中, 毒素检出时间相近会导致 DTX1 与 PTX2 同时流出或流出时间差异较小, 而使得 PTX2 被 DTX1 污染。在碱性条件下, OA 和 DTXs 的保留时间明显缩短($t_R < 7\text{min}$), PTX2 洗脱时间增加($t_R=15.77\text{min}$), 且与 PTX11 检出时间($t_R=14.57\text{min}$)有差异(图 5c), 可实现 PTX2 与其他脂溶性毒素的分离。

实验结果同时表明, 本实验检测出的毒素(OA+DTX2、DTX1、PTX2 和 PTX11)在碱性条件下均有较高的响应值, 这可能与碱性条件下 PTXs 电离效率提高(Gerssen *et al.*, 2009), 同时毒素分子中酸性基团与色谱柱填充物的亲和作用减少有关(García-Altare *et al.*, 2013)。此外, 实现本实验流动相碱性条件所用的氢氧化铵, 比 Gerssen 等(2009)的验证毒素稳定性实验中要少得多(6.7mmol/L 与 591mmol/L), 能确保 PTX2 处于稳定状态(Gerssen *et al.*, 2009), 同时, 本研究可达到超过 90%的 PTX2 回收率。

综上, 使用含有氨水(6.7mmol/L)的碱性流动相促进了 PTX2 与其他毒素的分离, 同时提高了毒素的响应值, 因此被选定为 PTX2 毒素检测和制备的流动相(图 6)。

2.4 PTX2 的纯化效果

PTX2 的纯化效果用最终得到的 PTX2 纯度来表

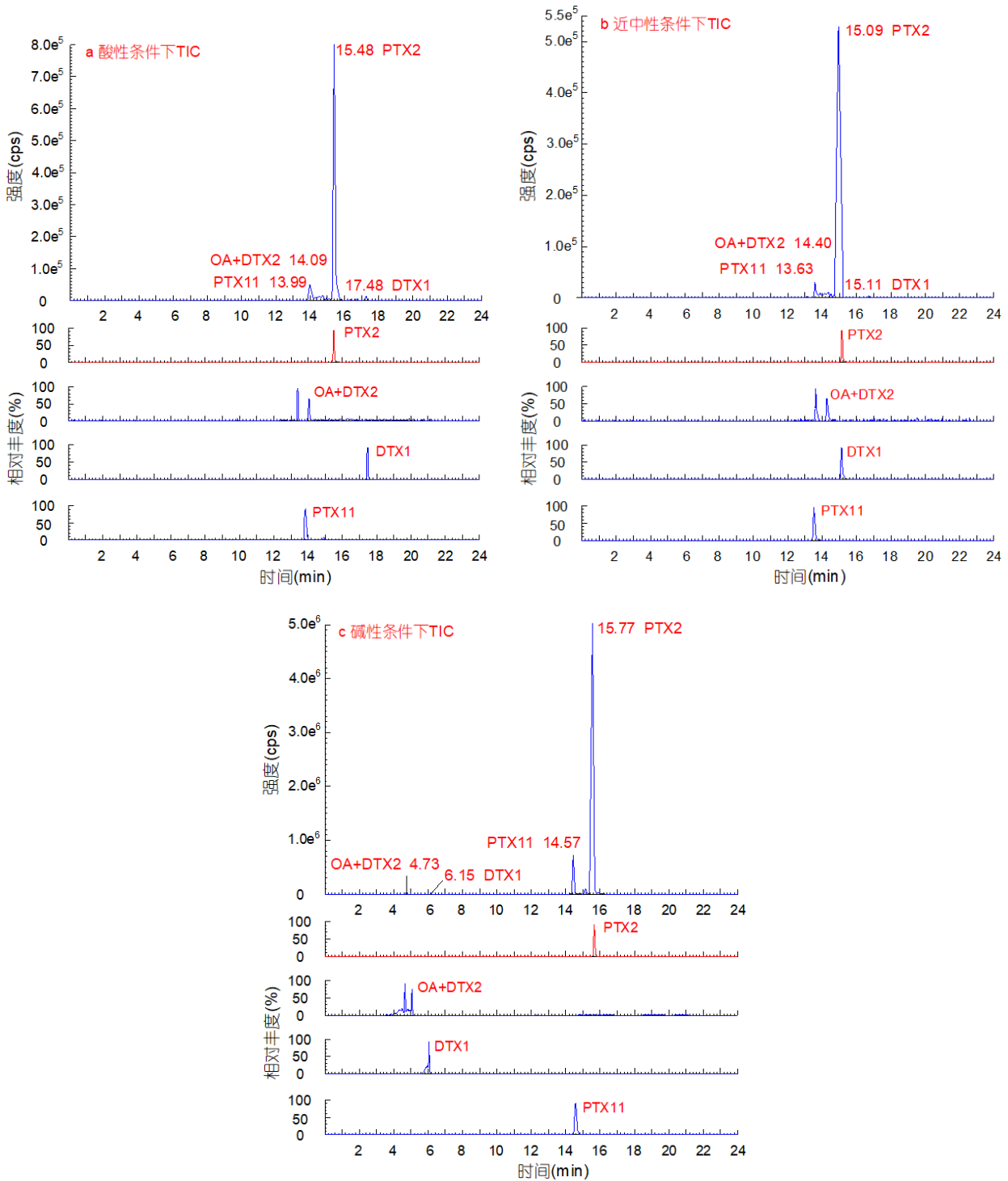


图5 三种流动相条件下 HPLC-MS/MS 检测的鳍藻中毒素粗提物的总离子流色谱图和提取离子色谱图

Fig.5 TIC and XIC chromatograms of toxin extractions from *Dinophysis* spp. by HPLC-MS/MS in three types of mobile phase
注: TIC: total ion chromatography, 总离子流色谱图; XIC: extracted ion chromatography, 提取离子色谱图

示。将收集到的实验室培养的渐尖鳍藻细胞, 经选用最优的细胞破碎方法(反复冻融结合超声波破碎法)、PTX2 提取(乙醚和二氯甲烷萃取法)、葡聚糖凝胶色谱柱分离和 HPLC 纯化后, 将色谱分离收集的 PTX2

粗提液减压蒸发浓缩, 最终溶解于甲醇中。其中, 凝胶柱净化得率为 78.5%, 与采用的乙醚-二氯甲烷萃取法的毒素回收率(78.2%)相乘后, 毒素的总得率为 $61.4\% \pm 5.5\%$ 。由 HPLC-MS/MS 测得 PTX2 毒素峰面

积 A , 与测得的未经 HPLC 纯化的 PTX2 毒素(PTX2 和杂质)总峰面积 B 的比例, 得到 PTX2 的纯度。结果表明本实验采用的 HPLC 纯化后纯度值约为 93.2% ($n=5$), 该流程能够有效的从渐尖鳍藻细胞中收集得到高纯度的 PTX2。

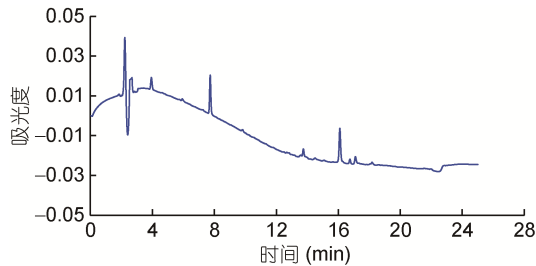


图 6 HPLC 分离的 PTX2 色谱图
Fig.6 HPLC chromatogram of PTX2

2.5 实际样品测定应用

采用上述优化的 HPLC-MS/MS 分析方法对多种脂溶性毒素进行定量分析。其中 OA、DTX2、DTX1、YTX、GYM 和 SPX1 毒素依然采用购买的标准毒素溶液, 并用购买的 PTX2 和本方法提取纯化出的 PTX2 溶液分别作为标准毒素溶液, 做标准曲线, 检测方法中 PTX2 的检出限为 $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $1.98\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实验对 2016—2017 年广西北部湾海域贝类养殖区采集的贝肉样品($n=3$)和 2015—2016 年于青岛黄海海域流清湾贝类养殖区采集的贝肉样品($n=3$)进行分析, 发现部分样品中 DTX2、PTX2、PTX2sa、GYM、SPX1 均有检出, 以购买的 PTX2 和本方法提取纯化出的 PTX2 为标准品, 检出的 PTX2 范围分别为 $1.98\text{—}13.23\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $2.01\text{—}13.31\mu\text{g}/\text{kg}$, 检出率都为 20.19%。检测结果与使用加拿大生物研究所购置的 PTX2 标准品没有显著性差异($P<0.05$)。

因此, 本研究制备的高纯度 PTX2 可用于贝类毒素的日常监测筛查。

3 结论

本研究建立了一种从渐尖鳍藻纯种藻液中制备高纯度 PTX2 的方法。首先大量培养渐尖鳍藻, 收集藻细胞作为原料, 再通过反复冻融结合超声波破碎法进行细胞破碎, 乙醚和二氯甲烷进行 PTX2 毒素萃取, 葡聚糖凝胶色谱柱分离去除杂质, 高效液相色谱法纯化(碱性的流动相、C18 半制备型色谱柱), 最终分离得到纯度为 93.2% 的 PTX2。本研究选定的方法简单快捷, 高效易操作, 为从大规模培养的鳍藻细胞

中制备高纯度 PTX2 毒素提供了技术支持。

参 考 文 献

- 王艳龙, 陈军辉, 高莉媛等, 2016. 超高效液相色谱-串联质谱法测定海水悬浮颗粒物中的 8 种典型脂溶性藻毒素. 分析化学, 44(3): 335—341
- 钟韵山, 徐仰仓, 荆柏林等, 2014. 小球藻破壁技术研究进展. 食品研究与开发, 35(14): 120—124
- Alexander J, Benford D, Boobis A *et al*, 2009. Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins I Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal, 1306(2009), 6—23
- Cuellar-Bermudez S P, Aguilar-Hernandez I, Cardenas-Chavez D L *et al*, 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Microbial Biotechnology, 8(2): 190—209
- FAO (Food and agriculture organization of the United Nations), 2004. Marine biotoxins. Rome: FAO, 14
- Gao H, An X L, Liu L *et al*, 2017. Characterization of *Dinophysis acuminata* from the Yellow Sea, China, and its response to different temperatures and *Mesodinium* prey. Oceanological and Hydrobiological Studies, 46(4): 439—450
- García C, Oyaneder-Terrazas J, Contreras C *et al*, 2016. Determination of the toxic variability of lipophilic biotoxins in marine bivalve and gastropod tissues treated with an industrial canning process. Food Additives & Contaminants: Part A, 33(11): 1711—1727
- García-Altare M, Diogène J, De La Iglesia P, 2013. The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: single-laboratory validation under four chromatographic conditions. Journal of Chromatography A, 1275: 48—60
- Gerssen A, Mulder P P J, McElhinney M A *et al*, 2009. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. Journal of Chromatography A, 1216(9): 1421—1430
- Halim R, Harun R, Danquah M K *et al*, 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. Applied Energy, 91(1): 116—121
- Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D *et al*, 2003. Manual on Harmful Marine Microalgae. In: Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D eds. Monographs on Oceanographic Methodology. Paris: UNESCO, 1—793
- Ito E, Suzuki T, Oshima Y *et al*, 2008. Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. Toxicon, 51(4): 707—716
- James K J, Bishop A G, Draisci R *et al*, 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. Journal of Chromatography A, 844(1—2): 53—65
- Kim M O, Moon D O, Kang S H *et al*, 2008. Pectenotoxin-2

- represses telomerase activity in human leukemia cells through suppression of hTERT gene expression and Akt-dependent hTERT phosphorylation. *FEBS Letters*, 582(23–24): 3263–3269
- Li M H, Sun G, Qiu J B *et al*, 2017. Occurrence and variation of lipophilic shellfish toxins in phytoplankton, shellfish and seawater samples from the aquaculture zone in the Yellow Sea, China. *Toxicon*, 127: 1–10
- Matsushima R, Uchida H, Nagai S *et al*, 2015. Assimilation, accumulation, and metabolism of dinophysistoxins (DTXs) and pectenotoxins (PTXs) in the several tissues of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxins*, 7(12): 5141–5154
- Miles C O, Wilkins A L, Hawkes A D *et al*, 2006. Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon*, 48(2): 152–159
- Miles C O, Wilkins A L, Munday R *et al*, 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon*, 43(1): 1–9
- Nagai S, Nitshitani G, Tomaru Y *et al*, 2008. Predation by the toxic dinoflagellate *Dinophysis fortii* on the ciliate *Myrionecta rubra* and observation of sequestration of ciliate chloroplasts. *Journal of Phycology*, 44(4): 909–922
- Nielsen L T, Krock B, Hansen P J, 2013. Production and excretion of okadaic acid, pectenotoxin-2 and a novel dinophysistoxin from the DSP-causing marine dinoflagellate *Dinophysis acuta* – effects of light, food availability and growth phase. *Harmful Algae*, 23: 34–45
- Park M G, Kim S, Kim H S *et al*, 2006. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Microbial Ecology*, 45: 101–106
- Reguera B, Riobó P, Rodríguez F *et al*, 2014. *Dinophysis* toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs*, 12(1): 394–461
- Reguera B, Velo-Suárez L, Raine R *et al*, 2012. Harmful *Dinophysis* species: a review. *Harmful Algae*, 14: 87–106
- Suzuki T, Miyazono A, Baba K *et al*, 2009. LC–MS/MS analysis of okadaic acid analogues and other lipophilic toxins in single-cell isolates of several *Dinophysis* species collected in Hokkaido, Japan. *Harmful Algae*, 8(2): 233–238
- Suzuki T, Walter J A, LeBlanc P *et al*, 2006. Identification of pectenotoxin-11 as 34S-hydroxypectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic Dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Chemical Research in Toxicology*, 19(2): 310–318
- Tong M M, Smith J L, Richlen M *et al*, 2015. Characterization and comparison of toxin-producing isolates of *Dinophysis acuminata* from New England and Canada. *Journal of Phycology*, 51(1): 66–81
- Wu H Y, Guo M M, Tan Z J *et al*, 2014. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks. *Journal of Chromatography A*, 1358: 172–180

PREPARATION OF PECTENOTOXIN-2 BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

WANG Yu^{1,2}, PENG Ji-Xing², WU Hai-Yan², GUO Meng-Meng², TONG Meng-Meng^{1,3}, TAN Zhi-Jun²
 (1. Institute of Marine Biology, Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316021, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Zhoushan 316021, China)

Abstract A protocol for preparing pectenotoxin-2 (PTX2) from a large-scale culture of *Dinophysis acuminata* was conducted in high-performance liquid chromatography (HPLC). Methods of cell disruption, toxin extraction, and HPLC purification were selected and optimized. The results indicate that the most efficient cell disruption and toxin extraction were achieved in the combination of freezing + thawing + ultrasound, resulting in 99.2% and 81.5%, respectively. PTX2 was extracted using liquid-liquid extraction (methanol, acetone, diethyl ether, and dichloromethane) and Solid Phase Extraction columns (Oasis HLB SPE, Phenomenex Strata-X SPE, Sep-Pak C18 SPE). PTX2 extraction efficiency reached maximum (78.19%) with diethyl ether and dichloromethane. Studies on the optimization conditions of HPLC showed that the pH value of the mobile phase had an impact on the chromatographic reaction. When mobile phase was in alkaline condition (containing 6.7mmol/L ammonium hydroxide in acetonitrile/water, pH=10.94), PTX2 could be better chromatographically separated by Phenomenex Kinetex C18 (4.8mm × 250mm, 5μm). The final PTX2 reached 93.2% in purity. This method was rapid, effective, and comprehensive for extraction, separation, and purification of PTX2 from *D. acuminata* cells with HPLC.

Key words pectenotoxin-2; *Dinophysis acuminata*; high-performance liquid chromatography; extraction; preparation