

高效毛细管区带电泳测定河豚毒素

张金兰 周同惠

(中国协和医科大学 中国医学科学院药物研究所分析室 北京 100050)

摘要 采用高效毛细管区带电泳, 以毛细管柱 $50\ \mu\text{m} \times 37\ \text{cm}$, 缓冲液 $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸二氢钾溶液, 分离电压 $11\ \text{kV}$, 检测波长 $192\ \text{nm}$, 分离时间 $10\ \text{min}$, 柱温 $20\ ^\circ\text{C}$, 阳极压力进样 $8\ \text{s}$ 为分离条件, 测定了北京、天津、大连提供的河豚毒素相对百分含量, 并对影响河豚毒素与未知物分离的一些因素作了初步探讨。

关键词: 高效毛细管区带电泳 河豚毒素

河豚毒素 (TTX) 是豚毒鱼类及其它生物体内含有的一种生物碱, 其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{N}_3$, 分子量为 319, 分子结构已有报道^[1]。河豚鱼味鲜美, 中国、日本等亚洲国家的居民有食用的习惯, 因此中毒时有发生, 一般将河豚鱼的毒性归因于河豚毒素, 有关河豚毒素药理研究的报道很多, 普遍认为河豚毒素是一种钠离子通道阻断剂^[2]。Weber 等人报道河豚毒素在不阻断动作电位情况下可以阻止因缺氧和缺糖导致的体外大鼠脑海马片的损伤^[3]。因此建立有效的方法检测和控制河豚毒素是很必要的。本文采用毛细管区带电泳法, 测定了北京、天津、大连提供的河豚毒素相对百分含量, 并对影响河豚毒素与未知物分离的一些因素做了初步探讨。

1 仪器、试剂及样品

Beckman 5500 P/ACE 毛细管电泳仪, 配有二极管阵列检测器。

毛细管柱: $50\ \mu\text{m} \times 37\ \text{cm}$, 河北永年光纤厂生产。

二次重蒸水, 醋酸: 分析纯, 北京化工厂。

TTX: 由北京防化院、大连海洋生物所、天津南开大学提供, 这 3 个地方提供的 TTX 均不纯, 但经 NMR 及 MS 谱证实以 TTX 为主。分别准确称取 3 个地方提供的 TTX 约 $300\ \mu\text{g}$ 于 $1\ \text{mL}$ 容量瓶中, 以 0.02% 醋酸稀释并定容, 超声混匀。

所用缓冲液均经 G_4 垂熔漏斗过滤, 用前

超声 $5\ \text{min}$ 。

2 分析条件的选择

以北京防化院提供的 TTX 作为研究对象, 考察了分离电压、缓冲液浓度、柱温对 TTX 与 2 个主要未知物分离的影响, 最终确定分析条件如下: 毛细管柱: $50\ \mu\text{m} \times 37\ \text{cm}$, 有效柱长 $30\ \text{cm}$, 缓冲液: $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸二氢钾, 分离电压 $11\ \text{kV}$, 检测波长 $192\ \text{nm}$, 分离时间 $10\ \text{min}$, 柱温 $20\ ^\circ\text{C}$, 阳极压力进样 $8\ \text{s}$, 每次运行之前用缓冲液冲洗毛细管柱 $2\ \text{min}$ 。分离情况见图 1。

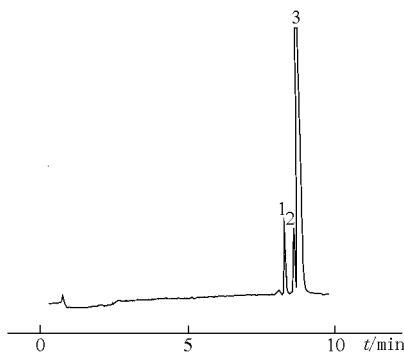


图 1 北京防化院提供的 TTX 毛细管电泳图谱
1、2. 未知物 3. TTX

2.1 电压对 TTX 与未知物分离的影响 实验条件如上所述, 只是分离电压依次改变为: 20 、 15 、 12 、 11 、 $10\ \text{kV}$, TTX 与未知物迁移时间 t_M 随电压变化见图 2。从图 2 可以看出, TTX 及未知物的迁移时间随电压的减小而延长, 但电压对 TTX 与未知物分离情况的影响不很明

显, 根据电压—电流工作曲线(见图 3), 选择了在线性范围内的 11 kV 做为分离电压。

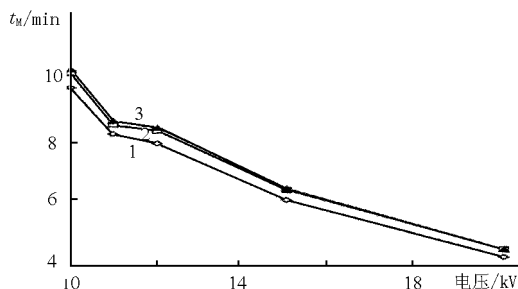


图 2 分离电压对迁移时间的影响

1. 未知物 1 2. 未知物 2 3. TTX

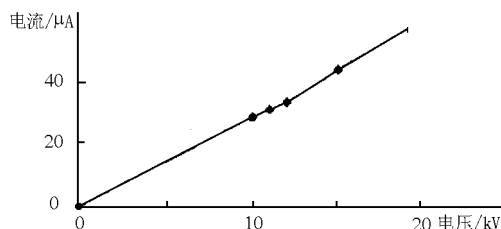


图 3 分离电压对电流的变化曲线

2.2 缓冲液浓度对 TTX 与未知物分离的影响 实验条件同上, 只是将磷酸二氢钾缓冲液浓度改变为: 0.2、0.1、0.05、0.025 mol/L, TTX 与未知物迁移时间随缓冲液浓度变化见图 4。随缓冲液浓度的升高, TTX 与未知物逐渐分开, 当浓度达 0.1 mol/L 时基本达基线分离, 当浓度超过 0.1 mol/L 时基线漂移, 迁移时间重现性差, 可能是因为浓度过高产生焦耳热所致。因此确定缓冲液浓度为 0.1 mol/L。

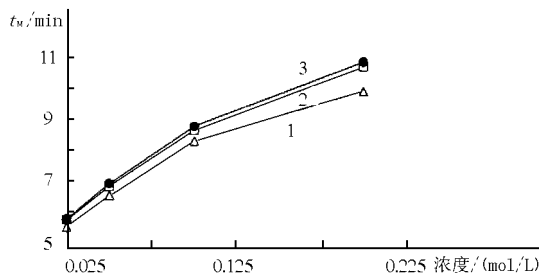


图 4 缓冲液浓度对迁移时间的影响

1. 未知物 1 2. 未知物 2 3. TTX

2.3 柱温对 TTX 与未知物分离的影响 实验条件同上, 只是将柱温改变为: 20、25、30 °C, TTX 与未知物迁移时间随温度变化情况见图

5。随温度升高, TTX 与未知物迁移时间均变短, 而且 TTX 与未知物分离情况变差, 可能是因为温度升高, 缓冲液粘度变小, 被分离组分迁移时间变快所致, 因此选择 20 °C 做为分离柱温。

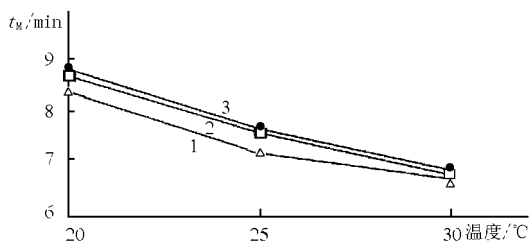


图 5 柱温对保留时间的影响

1. 未知物 1 2. 未知物 2 3. TTX

3 精密度

进行 TTX 迁移时间及峰面积的精密度试验, 结果 RSD ($n = 6$) 分别为 1.75 %、4.44 %, 均在 5 % 以内, 因此所得结果是准确的。

4 不同地方 TTX 相对百分含量

按上述实验条件, 用峰面积归一化法测定了大连、北京、天津提供的 TTX 相对百分含量, 每个样品平行进样 2 次。结果分别为 84.97 %、86.70 %、94.4 %。

5 讨论

本文将高效毛细管区带电泳用于 TTX 的定量分析, 因为没有 TTX 的纯品, 所以采用峰面积归一化法测定了北京、天津、大连提供的 TTX 样品, 提供者已用 NMR 及 MS 谱证实所供样为 TTX, 从图 6 可以看出大连提供的 TTX 含杂质较多, 大小杂质共有 5 种, 北京提供的 TTX 含 4 种杂质, 天津提供的 TTX 含 3 种杂质, 3 个地方的样品虽然所含杂质数不同, 但均含未知物 1 和未知物 2。有关 TTX 的定量分析方法很多, 例如紫外分光光度法、薄层色谱法、高效液相色谱—柱后荧光衍生化法、气质联用法以及生化法等, 其中 Shimadzu^[5] 于 1983 年将毛细管等速电泳用于 TTX 的定量分析^[5], 本文将毛细管区带电泳用于 TTX 的定量分析。毛细管电泳法与其它方法相比, 具有操作简单、方便、快速、不需复杂的

样品前处理及柱后处理的特点, 可作为 TTX 潜力。
的质控方法, 在 TTX 定量分析方面具有很大

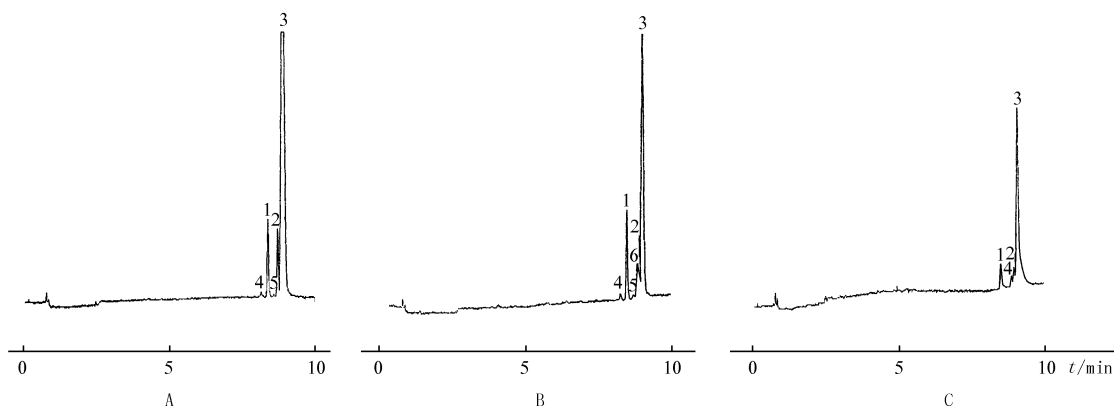


图6 TTX 毛细管电泳谱图

A. 北京 B. 大连 C. 天津

1、2、4- 6. 杂质 3. TTX(8.9min)

参考文献

- 1 Munetomo Nakamura. Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Toxicon*, 1985, 23(2): 271
- 2 Kao C Y. Structure- activity relations of tetrodotoxin, saxitoxin and analogs. *Ann N Y Acad Sci*, 1986, 479: 52
- 3 Weber M L, et al. Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slice is prevented by tetrodotoxin, li-

dacaine and phenytoxin without blockade of action potential. *Brain Res*, 1994, 664(1/2): 167

- 4 王健伟. 河豚毒素的定量检测方法研究进展. *国外医学卫生学分册*, 1995, 22(2): 86
- 5 Shimada K. Determination of tetrodotoxin by capillary isotachopheresis. *J Food Sci*, 1983, 48: 665

(本文于 1997 年 8 月 25 日收到)

Capillary Electrophoresis Determination of Tetrodotoxin

Zhang Jinlan and Zhou Tonghui

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100050*)

Abstract: A capillary zone electrophoresis method was established to determine the relative percent content of tetrodotoxin from Beijing, Tianjin, Dalian by using silica fused capillary column(50 $\mu\text{m} \times 37 \text{ cm}$) with 0.1 mol/L KH_2PO_4 as electrolyte. The sample solution was introduced into the capillary by pressure injection for 8s. Electrophoresis was performed at 11 kV at 20 $^{\circ}\text{C}$. Tetrodotoxin was detected at 192 nm.

Key words: capillary zone electrophoresis, tetrodotoxin