

离子色谱法定量检测酒曲发酵液中的河豚毒素

舒 静, 李柏林, 欧 杰*

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要:建立了一种离子色谱定量检测酒曲发酵液中河豚毒素的分析方法。样品经乙腈(含 0.1% 磷酸)溶液提取和阳离子交换柱净化后,采用离子交换色谱柱分离和紫外检测。在优化的条件下,酒曲样品中的河豚毒素在 10 ~ 100 mg/L 内呈良好的线性关系($r^2 = 0.997$),加标回收率为 90% ~ 103%,相对标准偏差小于 4.9%,检出限(信噪比为 3)为 1.0 mg/L。结果表明,该方法能达到定量检测的目的。将该方法应用于实际样品的检测,验证了方法的可靠性。河豚毒素初步降解实验发现,随着时间的推移,酒曲中河豚毒素的含量逐渐减少,表明酒曲发酵液对河豚毒素的降解效果显著。

关键词:离子色谱;河豚毒素;酒曲

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2011)02-0187-04

Determination of tetrodotoxin in fermentation broth of distiller's yeast by ion chromatography

SHU Jing, LI Bailin, OU Jie*

(College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A method was developed for the quantitative analysis of tetrodotoxin (TTX) in fermentation broth of distiller's yeast by ion chromatography. After extraction with acetonitrile solution (containing 0.1% phosphoric acid) and purification with an ion-exchange column, the tetrodotoxin was separated by ion chromatography and detected by a ultraviolet-visible (UV-VIS) absorbance detector. The experimental results showed that the tetrodotoxin had a good linearity ($r^2 = 0.997$) in the range of 10 – 100 mg/L and the detection limit (3 of signal-to-noise ratio) was 1.0 mg/L. The average recoveries were between 90% – 103% with a relative standard deviation lower than 4.9%. The analysis of real samples verified the reliability of this method and demonstrated that the ion chromatography can be used for the quantification detection of the tetrodotoxin. The degradation experiment results suggested that distiller's yeast had a remarkable effect on the tetrodotoxin degradation.

Key words: ion chromatography (IC); tetrodotoxin; distiller's yeast

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是一种氨基全氢化喹啉化合物,分子式为 $C_{11}H_{17}N_3O_8$,通常以两性离子的形式存在,但其阳离子形式比两性离子形式作用更强^[1]。河豚毒素是豚毒鱼类及其他生物体内含有的一种生物碱,在河豚鱼的卵巢和肝脏中含量较高。它不仅广泛存在于河豚等多种海洋脊椎动物、无脊椎动物体内或体表以及海底沉积物中,也存在于很多海洋微生物中^[2]。河豚毒素在生物中分布如此广泛,因此对这些生物加工过程中废弃的含毒器官进行大批量的生物降解可以减少二次污染。

目前国内外对河豚毒素的微生物来源、性质以及河豚鱼源的河豚毒素提取和检测方面的研究颇多,但对微生物能否降解河豚毒素尚未见报道。酒曲是用高粱、玉米、大米、大麦、糯米、米粉或麸皮等粮食作物作为原料,接入一定量的母曲,在控制温度和湿度的条件下制成的。其中的微生物主要有霉菌、酵母,还有少量的细菌。本研究试图利用酒曲发酵液中的微生物种群这一生态体系降解河豚毒素,因此建立酒曲中复杂多组分体系中河豚毒素的定量检测方法显得尤为重要。

* 通讯联系人:欧 杰,硕士,副教授,研究方向为食品生物技术。E-mail: jou@shou.edu.cn.

基金项目:上海市科委部分地方院校计划项目(No. 08390513900)。

收稿日期:2010-10-15

目前国内外对河豚毒素检测多以河豚鱼肉、尿液或血浆为基质建立的小鼠生物法^[3]、酶联免疫学方法^[4]、亲水液相色谱法^[5]、液相色谱-质谱联用^[6,7]及气相色谱-质谱联用^[8,9]等。利用离子色谱法(IC)对河豚毒素进行定量分析的研究鲜有报道。本研究以酒曲为基质,利用离子色谱法来定量检测酒曲发酵液中的河豚毒素。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Dionex ICS3000 离子色谱仪,配有紫外-可见光(UV-VIS)吸收检测器(美国戴安公司);R250 型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);DL-5-B 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂)。实验用水为 Millipore Advantage A10 制备的超纯水。浓硫酸、磷酸(分析纯,国药集团);磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(色谱纯级,德国 CNW 公司);辛烷磺酸钠(分析纯,德国 Merck 公司);河豚毒素标准品(纯度 $\geq 99\%$,河北省水产研究所),用 0.1% 磷酸溶液溶解标准品,配制成 100 mg/L 的标准原液,于 -4°C 储存备用;酒曲(山东黄河龙酒业集团股份有限公司)。

1.2 色谱条件

分析柱:Dionex Ionpac CS12A 柱(250 mm \times 4 mm),保护柱:Ionpac CG12A 柱(50 mm \times 4 mm);淋洗液 A:超纯水;淋洗液 B:100 mmol/L 硫酸。淋洗梯度:0~10.00 min,2.5% B~5.0% B;10.00~12.00 min,5.0% B~50.0% B;12.00~20.00 min,50.0% B;20.00~20.01 min,50.0% B~2.5% B;20.02~30.00 min,2.5% B。柱温: 30°C ;进样量:25 μL ;流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm。

1.3 样品前处理

样品提取:分别精确称取 10.00 g 酒曲置于 A、B 两个 50 mL 离心管中;在 B 管中加 1 mL 质量浓度为 100 mg/L 河豚毒素标准液,搅拌均匀,A 管作为空白对照;将 20 mL 乙腈(含 0.1% 磷酸)分别加于上述离心管中,在 5 000 r/min 转速下离心 10 min 后取上清液,在 50°C 下减压蒸馏除去乙腈,最后用 0.1% 磷酸溶液溶解定容至 5 mL。

样品净化:C18 小柱与 SCX 阳离子交换柱(德国 CNW 公司)使用前均用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化平衡;提取液先过 C18 小柱^[10],收集滤液过 SCX 阳离子交换柱;用 5 mL 5% 氨水/甲醇溶液洗脱 SCX 阳离子交换柱,收集洗脱液;在 45°C 下减压蒸馏除去甲醇,用 0.1% 磷酸溶液溶解定容至 5 mL;检测前过 0.45 μm 滤膜,进样测定。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

从标准品的检测结果来看,河豚毒素在 200 nm 处有最大吸收峰。但由于实验所用酒曲发酵液中有很多有机物(如游离氨基酸等),以及实验所用有机溶剂(甲醇、乙酸等)在 190~200 nm 处同样有很大吸收,对河豚毒素检测造成干扰,使得河豚毒素与杂质峰不能区分。在 230 nm 处,河豚毒素虽然与其他杂质峰有较好的分离,但其峰高相对其他杂质峰很低,且积分面积很小,灵敏度低,不能准确定量。在 210 nm 处,河豚毒素既能与杂质峰区分又能很好地定量,故选 210 nm 作为最佳检测波长。图 1 分别为在 200、210、230 nm 波长下检测的酒曲发酵液样品的色谱图。

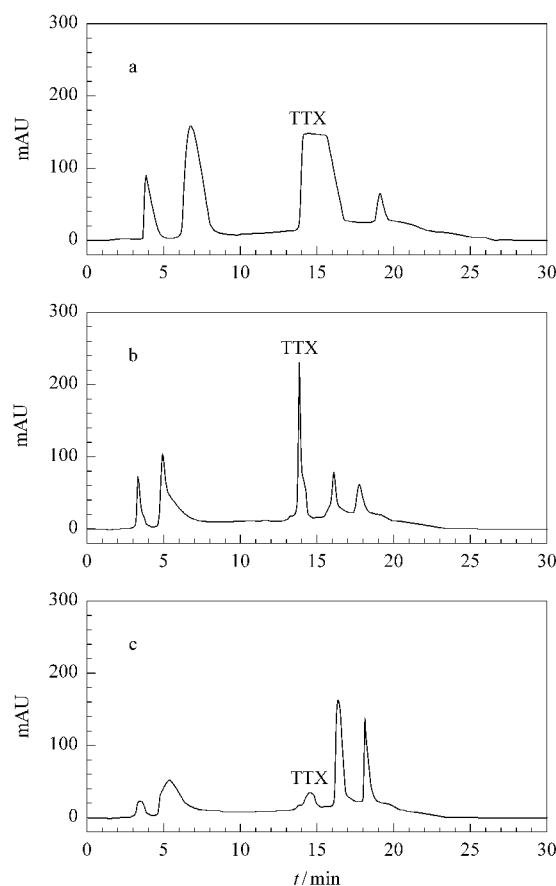


图 1 不同波长下酒曲发酵液样品的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of fermentation broth of distiller's yeast at different detection wavelengths
a. 200 nm; b. 210 nm; c. 230 nm.

2.2 提取净化方法的优化

本实验分别采用乙酸^[11]、乙酸/甲醇溶液^[12]、乙酸/乙腈溶液及磷酸/乙腈溶液对酒曲中河豚毒素进行提取。比较发现,由于甲醇具有更强的溶解力,

在溶解河豚毒素的同时也溶解了其他的脂质;采用乙腈提取可以去除部分脂质的影响,且选用乙腈作为提取及定容试剂更有利于降低检出限^[13]。检测发现,由于乙酸在 210 nm 处也有很大的吸收且与河豚毒素保留时间相近,对河豚毒素的检测造成很大的干扰,而磷酸在 210 nm 处无吸收,且对河豚毒素的溶解提取效果与乙酸相同。因此最后确定用磷酸/乙腈溶液对样品中的河豚毒素进行提取。

考察了活性炭、C18 小柱、活性炭-C18 小柱联用、C18 小柱-SCX 阳离子交换柱联用等的净化效果。活性炭仅能去除一些大分子杂质,因而只能得到粗毒液;由于河豚毒素有很强的极性,而 C18 小柱只能吸附样品中部分非极性化合物,而对河豚毒素没有保留;河豚毒素在溶液中以铵盐形式 $C_{11}H_{16}-O_8N_2NH_2^+$ 存在,能与 SCX 阳离子交换树脂中的苯磺酸发生反应,最后可用洗脱性较强的氨水/甲醇溶液洗脱。因此采用 C18 小柱-SCX 阳离子交换柱联用的方法较其他方法能更好地净化样品。

2.3 两种检测方法的比较

本实验比较了高效液相色谱法 (HPLC) 与离子色谱法对酒曲发酵液中的河豚毒素分析的结果。高效液相色谱的检测条件:Waters e2695 HPLC 分析系统;Waters 2998 光电二极管阵列 (PDA) 检测器;分离柱为 Waters Atlantis T3 C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.05 mol/L KH_2PO_4 -0.05 mol/L K_2HPO_4 -5 mmol/L 辛烷磺酸钠^[14]。图 2 为分别采用 HPLC 和 IC 检测河豚毒素标准品及酒曲发酵液样品的色谱图。

在 HPLC 检测中,由于河豚毒素有很强的极性,在 C18 柱上不保留,因此考虑在流动相中添加碳链较长的辛烷磺酸钠作为离子对试剂来改善分离效果。但实验结果发现,该方法虽然对河豚毒素有一定的保留,但保留时间极短,在 2 min 左右出峰,而酒曲中含有的有机杂质较多,很多物质与河豚毒素的保留时间相同,因此对河豚毒素的检测造成很大的干扰。IC 检测结果则显示出了很好的分离效果。

2.4 方法的线性关系

配制 10、20、50、80、100 mg/L 共 5 个质量浓度梯度的河豚毒素标准溶液进行测定,每个样品平行测定 3 次,得到相应的色谱峰响应平均值。以河豚毒素色谱峰的峰面积 Y (mAU · min) 对河豚毒素标准溶液的质量浓度 X (mg/L) 进行线性回归计算,结果表明河豚毒素在 10 ~ 100 mg/L 范围内呈现良好的线性关系,河豚毒素线性回归方程 $Y = 0.0527X - 0.0710$ 相关系数 $r^2 = 0.997$ 。

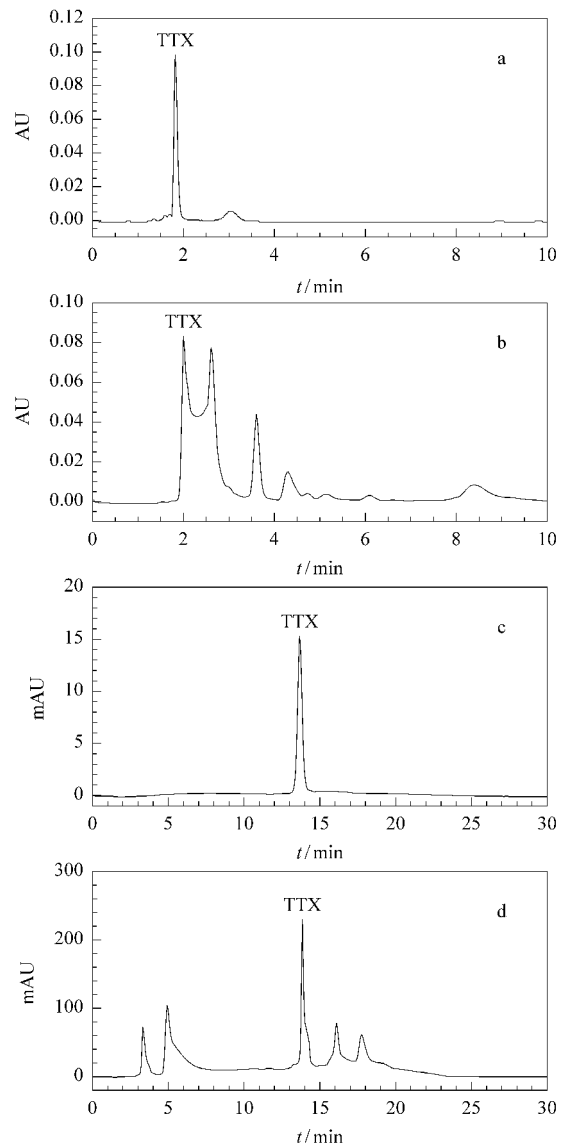


图 2 采用 (a, b) HPLC 和 (c, d) IC 测定河豚毒素标准溶液 (20 mg/L) 和酒曲发酵液中添加河豚毒素 (添加水平 20 mg/L) 的图谱

Fig. 2 Chromatograms of TTX standard solution (20 mg/L) and fermentation broth of distiller's yeast spiked with TTX standard at 20 mg/L by (a, b) HPLC and (c, d) IC

a, c: for TTX standard solution (20 mg/L); b, d: for fermentation broth of distiller's yeast.

2.5 回收率、精密度及检出限

在酒曲发酵液样品中添加河豚毒素标准溶液,加标量分别为 10 和 100 mg/L。按建立的方法处理和分析样品,计算 6 次测定的平均回收率与精密度,得到平均回收率为 90% ~ 103%,相对标准偏差 (RSD) 小于 4.9% (见表 1),精密度符合实验要求。样品中河豚毒素与其他物质有很好的分离度,表明本方法所得结果可靠。在上述实验条件下,以 3 倍信噪比 (S/N) 计算方法的检出限 (LOD) 为 1.0 mg/L。

表 1 酒曲发酵液中河豚毒素的回收率和精密度 ($n=6$)Table 1 Recovery and precision for TTX added in fermentation broth of distiller's yeast at two spiked levels ($n=6$)

Added/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
10	90	4.9
100	103	2.6

2.6 河豚毒素的降解实验

在酒曲发酵液中加入河豚毒素标准液,提取净化之后、进样检测之前的河豚毒素的加标量为 100.00 mg/L。将上述样品置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养,每隔 2 d 取样一次,采用上述检测方法对酒曲降解实验样品中的河豚毒素含量进行检测。结果发现,经过一段时间的培养,河豚毒素的含量发生了很大的变化,图 3 为添加到酒曲发酵液中的河豚毒素含量随着培养时间变化的趋势图。

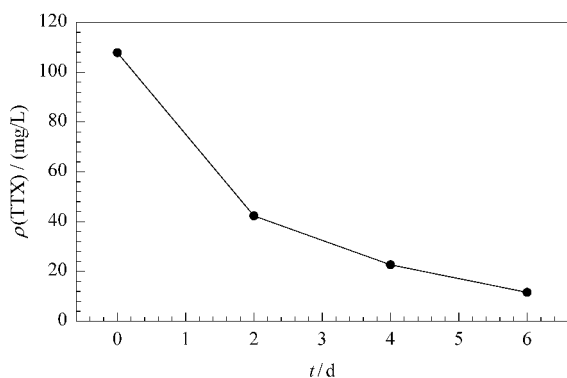


图 3 酒曲发酵液中 TTX 含量随着培养时间的变化趋势
Fig. 3 Trend of TTX mass concentration in distiller's yeast with fermentation time

从图 3 可以看出 2 d 后河豚毒素的含量从最初的 108.10 mg/L 降为 42.52 mg/L,降解率达 60.67%;到第 6 d 时,河豚毒素的含量已降为 11.94 mg/L,可以看出酒曲发酵液对河豚毒素的降解具有较为显著的效果。6 d 后由于酒曲发酵液中开始有杂菌生长,不再适宜继续进行降解实验。

3 结论

建立了一种采用离子色谱检测酒曲中河豚毒素

的方法。该方法简单、准确,可达到定量分析的目的,为降解实验提供了可靠的技术方法。酒曲对河豚毒素的降解初步探索实验表明,经过一段时间的培养,添加到酒曲中的河豚毒素可降解。对于降解条件的优化、有关降解机理以及河豚毒素被降解为何种物质,有待于进一步研究确定。

致谢 感谢华东理工大学施超欧老师和上海海洋大学王婧老师在本实验过程中给予的帮助与指导。

参考文献:

- [1] Su J, Zhang N, Jiang L L. Fishery Modernization (苏捷, 张农, 姜琳琳. 渔业现代化), 2007, 34(3): 34
- [2] Wang G N, Xie L P, Zhang R Q. Journal of Marine Science Bulletin (王冠男, 谢丽萍, 张荣庆. 海洋通报), 2007, 26(1): 107
- [3] Duan F M, Xie X L, Zhu B P. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (段发森, 谢心磊, 朱宝平. 中国卫生检验杂志), 2000, 10(4): 463
- [4] Zhou Y, Li Y S, Pan F G, et al. Journal of Medical Colleges of PLA, 2007, 22(6): 347
- [5] Zhang X Y, Cai X X. Chinese Journal of Analytical Chemistry (张秀尧, 蔡欣欣. 分析化学), 2009, 12(37): 1829
- [6] Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyatawa T, et al. Anal Biochem, 2001, 290(1): 10
- [7] Hong N H, Jie L, H L L. Toxicon, 2008, 51(5): 774
- [8] Ito K, Okabe S, Asakawa M, et al. Toxicon, 2006, 48(4): 620
- [9] Asakawa M, Toyoshima T, Ito K, et al. Toxicon, 2003, 41(7): 747
- [10] Tsai Y H, Hwang D F, Cheng C A, et al. J Chromatogr B, 2006, 832(1): 75
- [11] Li S P, Jiao X A, Huang J L, et al. Journal of Yangzhou University: Agricultural and Life Science Edition (李世平, 焦新安, 黄金林, 等. 扬州大学学报: 农业与生命科学版), 2004, 25(2): 58
- [12] Lin W L, Huang H L, Chen S X. Journal of Huaqiao University: Natural Science (林文奎, 黄惠莉, 陈少欣. 华侨大学学报: 自然科学版), 1999, 20(4): 412
- [13] Yao J H, Tan Z J, Zhou D Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (姚建华, 谭志军, 周德庆, 等. 色谱), 2010, 28(4): 363
- [14] Cui J Z, Shen X Y, Gong Q L, et al. Chinese Journal of Chromatography (崔建洲, 申雪艳, 宫庆礼, 等. 色谱), 2006, 24(3): 317