

微波辅助碱解荧光分光光度法快速测定河豚毒素含量

沈晓书, 郭磊*, 顾明松, 冯建林, 谢剑炜

军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

摘要 建立了一种快速、简便、灵敏地测定河豚毒素的新方法。在水和异丙醇混合碱性溶液中对河豚毒素进行微波碱解, 通过测定碱解产物的量来间接测定河豚毒素的含量。结果表明: C₀碱的最大激发波长为 380 nm, 最大发射波长为 496 nm, 其在 0.1~10 μmol·L⁻¹的浓度范围内与荧光强度呈线性关系, 相关系数 $r=0.9991$, 检测限为 0.05 μmol·L⁻¹, 比文献报道降低近 20 倍。该方法快速、灵敏和准确, 可用于河豚毒素的定量检测。

主题词 河豚毒素; 荧光分光光度法; 微波碱解

中图分类号: R996 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)12-2264-04

引言

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是毒性最强的非蛋白类神经毒素之一, 广泛存在于多种海洋生物以及蝶螈、火蜥蜴、青蛙、蟾蜍和扁形虫等动物体内^[1], 它作用于中枢及外周神经系统, 阻断钠离子通道, 使得神经肌肉呈麻痹状态, 甚至引起死亡。由于其具有高毒性及在军事医学等领域潜在的应用价值, 因此各类基质中 TTX 的检测显得尤为重要。

现有的 TTX 检测方法可分为生物测定法、免疫化学法和仪器分析法。生物测定法往往基于 TTX 自身的毒理或钠离子通道阻断特性, 不需改变 TTX 的化学性质。其中较灵敏的竞争置换法^[2]对 TTX 的检测限可达到 1.9 nmol·L⁻¹; 但这类方法的共同缺点是个体差异大, 耗时。免疫化学法主要分为酶联免疫吸附^[3]和免疫亲和层析, 选择性及灵敏度高, 检测限能达到 3~6 nmol·L⁻¹。但免疫法操作复杂, 抗体制备的难度很大。现代仪器分析检测方法则可利用高效液相色谱-荧光检测^[4]、高效液相色谱-质谱联用^[5]、荧光^[6]等技术。检测限可分别达到 0.08 μmol·L⁻¹, 0.3 nmol·L⁻¹和 1 μmol·L⁻¹。但以上仪器分析方法的样品前处理过程复杂, 若检测低浓度的 TTX 往往还需要进行溶剂浓缩^[4]或阳离子交换富集^[5]等。本文建立了一种新的微波辅助碱解荧光法, 在水和异丙醇混合碱性溶液中对河豚毒素进行微波辅助碱解, 通过测定产物 C₀碱(2-氨基-8-羟基-6-羟甲基-喹唑啉)等来间接测定河豚毒素的含量, 不需要任何富集分离手段。在 0.1~10 μmol·L⁻¹的浓度范围内与荧光强度呈线性关

系, 相关系数 $r=0.9991$, 检测限为 0.05 μmol·L⁻¹。本法具有快速、灵敏、准确的特点, 并已应用于分子文库技术中 TTX 与 DNA 结合率的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

F-4010 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司), 激发狭缝 10 nm, 发射狭缝 20 nm; WP800SL23 型微波炉(格兰仕公司), 频率 2 450 MHz; 最大额定输出功率 1 200 W, 使用额定输出功率 420 W; LCT 高分辨飞行时间质谱仪(英国 Micromass 公司), 正离子检测, 直接注射进样, 源温 100 °C, 脱溶剂温度 250 °C, 脱溶剂气流量 350 L·h⁻¹, 毛细管电压 2 800 V, 样品椎孔电压 10 V, 抽取椎孔电压 5 V, 仪器分辨率大于 6 000。

1.1.2 试剂

NaOH(北京化学试剂公司); 异丙醇(Fisher, 优级纯); 河豚毒素标准品(河北省水产公司); Tris(北京舒伯伟化工仪器有限责任公司, 优级纯); NaCl(北京化学试剂公司); MgCl₂(北京化学试剂公司)。以上试剂除说明外, 均为分析纯。水为二次重蒸水, 经检测无荧光杂质。

1.1.3 溶液的配制

TTX 标准溶液: 取 1 mg TTX 标准品溶解于 1 mL 重蒸水中, 即为 1 mg·mL⁻¹。取 255.2 μL 的 1 mg·mL⁻¹ TTX 置于 10 mL 容量瓶中, 用重蒸水定容至刻度, 即 80 μmol·

收稿日期: 2005-09-08, 修订日期: 2006-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(20305013)资助

作者简介: 沈晓书, 1980 年生, 军事医学科学院毒物药物研究所读硕士研究生 * 通讯联系人

L^{-1} 作为储备液溶液。

NaOH 储备液: 称取 16 g NaOH 至 25 mL 容量瓶中, 用重蒸水定容至刻度, 即为 $16 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 的 NaOH 溶液。

结合缓冲液: 称取 2.42 g Tris-HCl (pH 7.4), 5.85 g NaCl, 0.475 g $MgCl_2$ 至 1 000 mL 容量瓶中, 用重蒸水定容至刻度。

1.2 实验方法

荧光测定: 取 25 μL 一定浓度的 TTX, 加入 75 μL $16 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ NaOH 及 100 μL 异丙醇, 混合均匀后离心, 使水相置于离心管底部。在微波炉中 420 W (低火额定功率) 碱解 3 min, 取出立即放入 $-20 \text{ }^\circ C$ 冰箱, 5 min 后以 380 nm 为激发波长, 496 nm 为发射波长, 测量溶液的荧光强度值 F , 同时做空白校正。

ESI-MS (电喷雾离子质谱) 及 UV 鉴定: 取 25 μL $1 \text{ mg} \cdot mL^{-1}$ TTX 与 75 μL $16 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ NaOH 混合后, 加入 100 μL 异丙醇, 微波碱解后加入 90 μL $16 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 甲酸, 摇匀, 放置至明显分层后, 取出上层异丙醇, 再加入 100 μL 异丙醇提取 1 次, 将提取液混合后挥干, 溶于 20 μL 重蒸水。进行 UV 及 ESI-MS (Electrospray ionization-mass spectrometry) 鉴定, 同时做空白校正。

结合率实验: 取 10 μL $80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 的 TTX 与 32 μL $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 的 ssDNA (单链 DNA) 混合, 加入 $2 \times$ 结合缓冲液 50 μL ($2 \times$ 即 2 倍), 用水补至 100 μL , 在 $37 \text{ }^\circ C$ 下孵育 1 h。将孵育后的溶液放入离心超滤浓缩管 (3 K, 3 K—管中截留分子量为 3 K (3 000)) 中, $5\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 将上层用 200 μL 水洗 2 次, 收集滤过液, 浓缩至 100 μL , 取出 25 μL 加入 NaOH 及异丙醇, 微波碱解后测定荧光值, 同时做空白校正。

2 结果与讨论

2.1 碱解方法的选择

现有的 TTX 的荧光测定法, 是加入一定量的 NaOH 后在较高温度下 ($80 \sim 120 \text{ }^\circ C$) 加热, 然后测量其碱解产物的荧光强度。我们首先采用上述的加热方法, 于 $80 \text{ }^\circ C$ 水浴加热 45 min 可得到最高的 C_9 碱产率, 检测限为 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$, 与文献 [6] 相当。而以微波辐射作为热源直接加热时, 在密闭容器中获得的高温高压往往导致更快的反应速度和更高的反应产率 [7], 在本体系中应用微波辅助碱解, 3 min 碱解即可完全化, 且使用异丙醇与水的混合溶剂进行碱解时可大大增强其荧光强度, 使检测限降低 20 倍, 达到 $0.05 \text{ } \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 。刘彦明 [8] 亦曾用微波消解的方法测定样品的微量元素。

2.2 产物的确证

TTX 的笼状结构在强碱溶液中可被破坏, 生成含胍基的唑啉平面结构会产生荧光发射, 在异丙醇和水的混合体系中 TTX 经过微波碱解后, 可得到图 1 所示的荧光光谱, 其最大激发波长 λ_{ex} 和发射波长 λ_{em} 分别为 380 和 496 nm, 与水溶液中碱解产物的荧光性质相似 [9]。但使用异丙醇与水的混合体系进行碱解时是否会产生新的荧光产物, 我们对碱解

产物进行了进一步的 UV 及 ESI-MS 鉴定。结果表明, 碱性条件下的产物, 其最大紫外吸收波长仍为 274 nm, 峰形也与 C_9 碱的 UV 特征相符 [6]。而从 ESI-MS 结果 (见图 2) 可以看出, m/z 192 和 m/z 224 为碱解产物的特征峰, m/z 192 为 C_9 碱的特征质荷比, 与文献 [6] 报道一致。但 m/z 224 为碱解过程中出现的新化合物, 推测在醇类溶剂参与的碱解反应中, 生成了另一强发射荧光的物质。考虑到荧光和紫外光谱性质, 我们认为可能是 C_9 碱的胍基团上伯胺的氢被 2 个羟基取代, 因为胍基化合物的荧光强度是随叔胺 > 仲胺 > 伯胺的顺序依次递减的 [8], 体系荧光强度增强数倍也可能是因为生成了此种 N, N-取代胍基化合物, 图 3 列出了其可能的碱解反应产物。

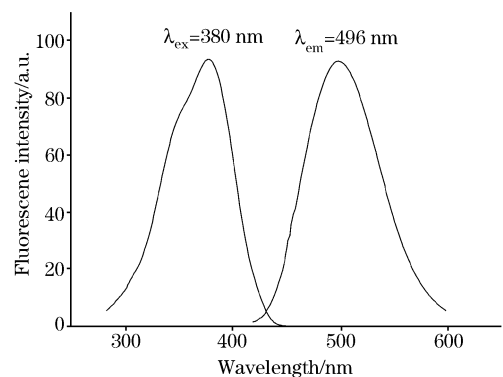


Fig. 1 The fluorescence spectra of product

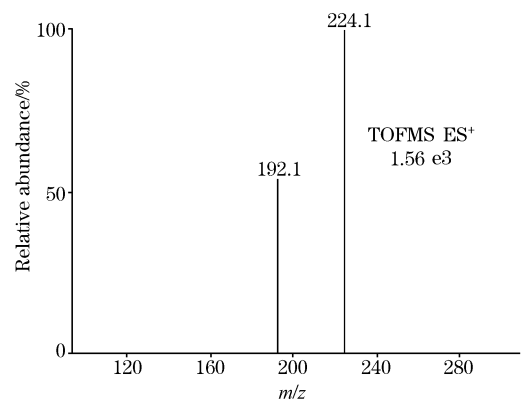


Fig. 2 The ESI-MS chromatogram of product

2.3 方法的优化

2.3.1 微波碱解时间

将最终浓度为 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 的 TTX 碱解体系, 在 420 W 微波下分别反应 1~10 min, 随着时间的延长, 碱解效率在不断提高, 3 min 时 TTX 已水解完全。但 3 min 后再延长反应时间会使其碱解效率下降, 可能是生成了其他没有荧光的物质 [9]。

2.3.2 反应体系中各反应物浓度

对于最终浓度为 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 的 TTX 碱解体系, 随着 NaOH 的浓度从 $1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 增加到 $6 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, TTX 的碱解效率增加, 但 NaOH 浓度过大会使碱解效率下降, 仍可能是在更剧烈的反应条件下, 生成了其他没有荧光的物质。

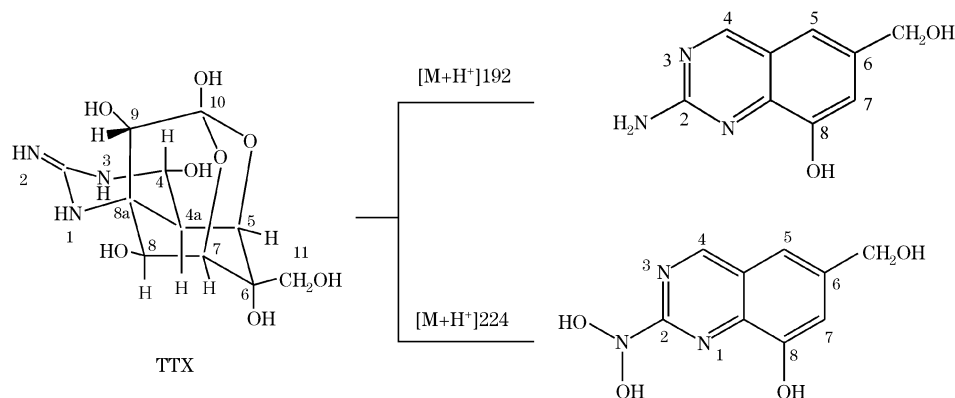


Fig. 3 The chemical structure of product

异丙醇百分含量对本体系亦存在显著影响。随着异丙醇含量的增加, 碱解效率增加, 50%为最佳的碱解配比。

一般来讲, 反应物的浓度越低, 衍生化反应越不容易进行完全。为此我们考察了 3 个处于不同数量级的 TTX 浓度对碱解反应的影响。由图 4 可见, 随 TTX 浓度的增加, 碱解速度越快, 相同时间碱解产率越高。1 min 时 0.1, 1 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碱解产率分别达到 11.2%, 23.2% 和 47.8%。但三者达到碱解最大化的最佳时间均为 3 min。

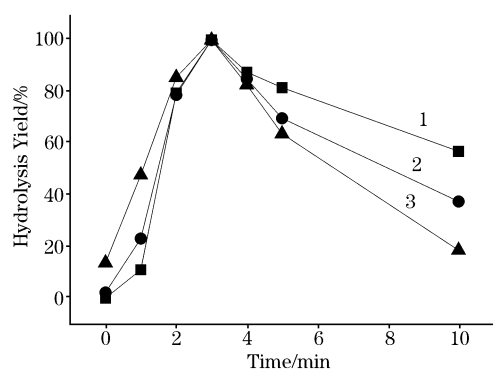


Fig. 4 The effect of TTX concentration on reactive efficiency

Concentration/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ —1: 0.1; 2: 1; 3: 10

2.3.3 有机溶剂种类

有机溶剂对 TTX 碱解反应的影响较大, 我们详细考察了不同的有机溶剂对碱解的影响(见图 5)。极强的碱性是立体笼状结构的 TTX 断裂生成喋啶平面刚性分子的必要条件, 故酸性溶剂(如甲酸、乙酸等)的加入削弱了碱性, 碱解效率极低; 偶极溶剂如 DMSO(二甲基亚砜), DMF(二甲基甲酰胺)和乙腈等对碱解影响很小; 而极性的醇类溶剂(如甲醇、乙醇、异丙醇、叔丁醇等)对荧光的增强有很大作用, 尤其是含有支链的醇类能够将荧光值增强近 7 倍。由于甲醇和乙醇的空白值较大, 叔丁醇略低于异丙醇, 故选用异丙醇作为混合溶剂的有机相。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性

配制最终浓度为 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TTX 碱解体系, 按照实验方法项下操作, 放置 0, 30, 60, 90, 120 min 测定荧光强

度, 结果表明在 2 h 内荧光强度稳定。但在荧光仪氙灯照射下荧光强度下降较快, 因此反应后应立即测定。

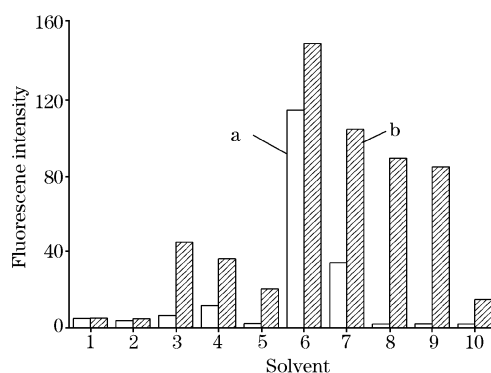


Fig. 5 The effect of solvents on fluorescence intensity

a: Blank; b: Solvent

1: Formic acid; 2: Acetic acid; 3: DMSO; 4: DMF; 5: Acetonitrile; 6: Methanol; 7: Ethanol; 8: Iso-Propanol; 9: Tert-Butanol; 10: H_2O

2.4.2 标准曲线

配制最终浓度为 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准 TTX 碱解体系, 按实验方法项下操作, 测定荧光强度, 同时做空白校正。得标准曲线的线性回归方程为 $Y = 91.315 \times X - 3.483$, 相关系数 $r = 0.9991$, 线性范围为 0.1 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$)。

2.4.3 精密度及回收率实验

平行配制低、中、高 3 个浓度(0.25, 1, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 TTX 碱解体系, 按照实验方法项下操作, 在 1 d 内分别测定 5 份样品荧光强度, 计算日内精密度。每天各测定一份样品, 连续测定 5 d, 计算日间精密度(结果见表 1)。按照日内精密度的方法, 配制低、中、高 3 个浓度(0.25, 1, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 TTX 碱解体系, 测定绝对回收率(结果见表 1)。

2.5 结合率实验

在药物的筛选、药物靶标的发现及分子间作用机理的研究中, 开展小分子与生物大分子的结合率实验往往具有重要意义。有些目的生物大分子含量极其微量, 这时就需要测定方法有较高的灵敏度, 能够检测到与之结合的痕量小分子。

在研究 TTX 与 ssDNA 结合的实验中, TTX 本身没有荧光和紫

Table 1 The results of precision and recovery($n=5$)

TTX concentration / $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Precision(RSD%)		Recovery(%)
	Intraday	Interday	
0.25	3.1	3.7	102.9
1	1.7	2.9	100.4
5	5.1	6.1	100.3

外吸收, 使用超滤法时必须将其转化为荧光产物, 从而间接测定 TTX 与 ssDNA 的结合率。将等摩尔比的 TTX 与 ssDNA 混合孵育, 按照实验方法项下结合率测定方法操作, 由表 2 可见, TTX 与 ssDNA($pI=4.7$)有一定的结合, 原因可能是 TTX 在 pH 7.4 的缓冲体系中带正电荷, 而 ssDNA 在此体系中带负电荷且能够形成发卡、茎-环、G-四聚体、假节

等多种二级结构, 形成的空间结构将 TTX 包于其中。

Table 2 The results of binding percent

Samples	TTX recovery/%	DNA binding percent/%
1	83.87	16.13
2	80.77	19.23
3	89.36	10.64

3 结 论

本实验建立了一种新的简单、快速、灵敏度高的荧光测定 TTX 的方法, 并在生物学方面如结合率实验中得到了满意的应用。它亦可作为在分离分析 TTX 及其类似物时, 柱后碱解或在线微波碱解的检测手段。

参 考 文 献

- [1] Mebs D, Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T, et al. *Toxicon*, 1995, 33(2): 246.
- [2] Davio S R, Fontelo P A. *Anal. Biochem.*, 1984, 141(1): 199.
- [3] WANG Jian-wei, LUO Yun, JI Rong(王健伟, 罗云, 计融). *Journal of Hygiene Research(卫生研究)*, 1997, 26(2): 106.
- [4] Kawatsu K, Shibata T, Hamano Y. *Toxicon*, 1999, 37(2): 325.
- [5] Hayashida M, Hayakawa H, Wada K, et al. *Leg. Med. (Tokyo)*, 2003, 5(Suppl 1): 101.
- [6] Nunez M T, Fischer S, Jaimovich E. *Anal. Biochem.*, 1976, 72(1-2): 320.
- [7] SUN Ying, YANG Zhan-lan, WENG Shi-fu, et al(孙颖, 杨展澜, 翁诗甫, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2000, 20(5): 641.
- [8] LIU Yan-ming, CHEN Zhi-yong, HAN Jin-tu, et al(刘彦明, 陈志勇, 韩金土, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(5): 947.
- [9] Conn R, Davis R. *Nature*, 1959, 183 (4667), 1053.

Rapid Determination of Tetrodotoxin Using Microwave Assisted Alkaline Hydrolysis and Spectrofluorometric Analysis

SHEN Xiao-shu, GUO Lei*, GU Ming-song, FENG Jian-lin, XIE Jian-wei
Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China

Abstract To develop a rapid, simple and sensitive method for determining the concentration of tetrodotoxin(TTX), TTX was hydrolyzed in the strong alkali solution of water mixed with isopropanol. The concentration of TTX can be indirectly analyzed by the fluorescence signal of its alkaline hydrolysis product which can be enhanced by the microwave method. The maximum excitation and emission wavelengths of the alkaline hydrolysis product of tetrodotoxin were 380 and 496 nm, respectively. The linear range of the calibration curve was 0.1-10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with $r=0.9991$. The limit of detection was 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which was twenty times lower than before. A rapid, highly sensitive and accurate method was thus established. It can be used as a quantitative method for detecting TTX.

Keywords Tetrodotoxin; Fluorescence spectrophotometry; Microwave alkalization

(Received Sep. 8, 2005; accepted Jan. 2, 2006)

* Corresponding author