

河豚毒素的提取研究^{*}

林文奎 黄惠莉 陈少欣

(华侨大学化工学院, 泉州 362011)

摘要 从福建省泉州市崇武海域的现有资源出发, 就河豚鱼的种类, 及其毒性、毒素的形成、变化等情况, 对河豚毒素进行提取、纯化, 并对毒力进行定量试验研究. 结果表明: 崇武海域的河豚鱼属于弓斑园豚, 其内脏的毒性大小依次为卵、肝和肠. 用甲醇乙酸法提取河豚毒素较完全, 以活性炭纯化的效果最好, 但毒素有一定损失. 研究中提出在食用中毒时, 解毒的有效办法是饮用大量的余甘果汁.

关键词 河豚毒素, 弓斑园豚, 提取, 纯化

分类号 TQ 464.9

河豚鱼肉嫩味美, 但所含毒素毒性猛烈, 往往因处理不当引起食物中毒, 且死亡率高. 因此, 如何合理加工和综合利用河豚鱼的资源, 具有十分重要的现实意义. 纯的河豚毒素结晶体的市场售价为5~6万美元, 河豚毒素(Tetrodotoxin, 简称TTX)常用于镇痛、局麻、松弛肌肉痉挛、阻断钠通道. 在生理研究上, 已成为机制研究的工具药, 为神经细胞膜研究必不可少的标准药物^[1,2]. 河豚鱼在我国分布有40~50种之多, 年产量3~4万t, 仅福建省泉州市崇武海域产量每年就超过3000t. 因此, 我们就河豚鱼的无毒处理^[3], 以及从其内脏提取TTX进行重点研究, 以期提高河豚鱼的经济和实用价值.

1 材料和方法

1.1 材料

河豚鱼采集于崇武海区, 属弓斑园豚(*Spherooides Ocellatus*).

1.2 TTX的提取

取河豚鱼的内脏捣碎后, 加5倍量的甲醇, 用乙酸调节pH在4~5之间, 然后于沸水浴上加热回流20min. 分离甲醇溶液后, 再重复提取一次. 合并两次甲醇溶液, 过滤备用. 减压浓缩去除甲醇, 剩余物用少量乙醚脱脂分层. 分离去乙醚脱脂液, 将剩余液(毒素原液)折算每毫升相当于原样品多少重量.

1.3 生物试验

采用桥本法计算鼠单位(mu). 选择体重(m)为20g左右的小白鼠, 从腹腔注射0.5~1.0mL毒液. 以30min以内, 致小鼠死亡的毒液量(V)作为判断标准, 再乘以稀释倍数, 经换算求得被测样品的单位毒力(M). 鼠单位和毒素剂量(W)的变换系数是 $0.22 \mu\text{g} \cdot \text{mu}^{-1}$ [4].

2 试验内容与结果

2.1 TTX 的形成分布^[6,4]

现已查明,TTX 是寄生的产毒菌,在生长过程中所分泌并积累的一种毒素.由于微生物产毒素的量往往受到温度、pH 值和环境因素的影响,故鱼体内毒素的积累和分布部位也有差异.同一种属的河豚鱼在不同的海域或不同的季节捕获,其毒性强弱也有十分明显的差别.即使是同一种属的鱼,在同一时期捕获也存在着个体差异.产毒菌分泌的毒素被肠壁吸收后主要积聚在卵巢、肝脏、肠和皮等部位,肌肉部分的含量极微.就季节而言,一般每年11月至次年4月间的繁殖期间较高,产卵后则毒性明显降低.我们分批采集约35~40 kg 河豚鱼,分别进行不同部位、不同季节等毒力分析,结果分别见表1.从表1看出河豚鱼内脏毒力大小依次为卵、肝、肠,而且产卵后,体内毒素明显降低,且卵毒比肝毒小.

表 1 弓斑园豚毒素分布

部位	产卵前		产卵后	
	$M/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	V/mL	$M/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	V/mL
卵	5.54	700.0	1.27	400.0
肝	2.51	225.0	1.95	160.0
肠等	0.80	80.0	0.25	20.0

2.2 河豚毒素的浓缩和纯化

我们共做了5批河豚鱼样品,其内脏所提取毒液浓度均很低,且含有杂质,颜色较深.因此,我们将5批毒液合并,进行减压浓缩和活性碳脱色纯化,结果分别见表2,3.表中 $M_{\text{总}}$ 为总毒力, $m_{\text{总}}$ 为浓缩后毒素总量, V_1 、 V_2 分别为体积、注射量, t 为致死时间.

表 2 TTX 浓缩液总毒力表

样品	$V_{\text{合}}/\text{mL}$	$V_{\text{浓}}/\text{mL}$	$M_{\text{总}}/\mu\text{g}$	$m_{\text{总}}/\mu\text{g}$
卵毒液	1 000.0	920.0	10 242.0	2 253.24
肝毒液	1 120.0	1 040.0	6 415.0	1 411.30

表 3 活性碳脱色处理表

样品	V_1/mL	V_2/mL	m/g	t/s	$M_{\text{总}}/\mu\text{g}$	颜色
原毒液	200.0	1.0	23.3	73	1 363.6	深褐色
纯化液	185.0	1.0	23.0	150	1 192.0	淡黄色

从表2,3的结果可以看出,经减压浓缩后,毒素浓度提高,表现在总毒力值提高,折算所得毒素总量为3 364.54 μg .在酸性条件下进行活性碳脱色,毒液从原来的深褐色变为淡黄色,但总毒力损失了1/8.这说明经浓缩和脱色,初步达到提浓和去杂、脱色的目的.据资料介绍,100 kg 的内脏才能提取1 g 结晶的毒素.我们提取的是粗毒液,通过硅藻土、活性炭层析或离子交换树脂等方法提取,可得到TTX 纯品.

2.3 TTX 的结构^[2,4]

河豚毒素(TTX)的化学结构是具有多羟基氢化5,6 苯吡啶母核结构,分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$,分子量为319,结构式见文献^[2,4].

河豚毒素微溶于水、乙醇和浓酸,在含有醋酸的水溶液中极易溶解,不溶于有机溶剂.纯品为无臭无色针状结晶,易被碱还原.河豚毒素(TTX)主要分为河豚毒素和河豚鱼酸两部分,后者为白色无定形酸性物质.河豚毒素非常稳定,在日光下暴晒20 d 或在盐水中盐腌30 d,

其毒素仍不能被全部破坏. 只有在高温加热 30 min 以上, 或在碱性条件下才能将毒素分解. 据报道^[1], 有多种定性 TTX 的方法. 我们提取的毒素均定性分析后, 再做定量计算.

3 河豚毒素的解毒方法

(1) 用新鲜余甘果汁解毒. 采用当地富产的新鲜余甘果汁作为解毒剂. 将肝毒稀释 5 倍, 注射小白鼠, 然后同时注射 2 mL 新鲜余甘果汁, 小白鼠未死亡, 而对照组小白鼠在 125 s 左右死亡. 说明余甘汁有解毒功效, 这是因为, 新鲜余甘汁富含超氧化歧化酶(SOD) 起清除解毒的缘故.

(2) 注射 S-P 剂(即亚硫酸氢钠和磷酸的混合液). 据研究表明: 河豚毒素分子中有一个内酯环是毒性的成因, 内酯环断裂则毒性消失. S-P 试剂对内酯环有破坏作用^[6]. 试验中向河豚鱼毒液中加入适量的 S-P 试剂, 注射后的小白鼠安然无恙.

4 结论

(1) 从崇武海域采集的河豚鱼属弓斑园豚, 其内脏毒力大小次序分别为: 卵、肝、肠等, 且排卵期后肝毒大于卵毒. (2) 在当地如遇到中毒现象, 可服用大量新鲜余甘汁解毒, 效果良好. (3) 河豚鱼应综合加工, 将鱼内脏集中提取毒素, 鱼肉出售加工食用, 鱼骨头等加工做饲料.

参 考 文 献

- 1 桥本芳朗. 鱼贝类の毒. 东京: 学会出版, 1978. 63~75
- 2 陈文伟. 河豚鱼的毒性及其加工利用探讨. 中国海洋药物, 1988, (4): 30~33
- 3 长江水库研究所编. 河豚鱼及其综合利用. 北京: 农业出版社, 1963. 30~103
- 4 Khimoda S. Determination of TTX by capillary isoelectrophoresis. J. Food Sci., 1983, 43(3): 665~668
- 5 吴大鹏. 河豚毒素解毒方法研究的进展. 海洋药物, 1983, (4): 19~23

Extraction of Tetrodotoxin from Globefish

Lin Wenluan Huang Huili Chen Shaoxin

(College of Chem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract Starting from the globefish resource now available in the sea area of Chongwu, Quanzhou, an experimental study is made on globefish and tetrodotoxin(TTX), including variety and toxicity of globefish, formation and change of TTX, and its extraction, purification and toxicity quantitation. As shown by the results, the globefish there belongs to *Spheroides ocellatus*, the toxicity of its viscera is in the order of eggs> liver> intestine. The study centers on the method of TTX extraction and purification. Methanol-acetic acid method will lead to complete extraction, while activated carbon method will lead best purification. Drinking large amount of fruit Yugan juice as effective means of detoxication is proposed for the one who is poisoned by eating globefish.

Keywords globefish, tetrodotoxin, sea area of Chongwu