

利玛原甲藻中大田软海绵酸和鳍藻毒素-1提取与纯化

金 薇^{1,2,3}, 姚敬元^{1,2,3}, 陈文博⁴, 官长宝^{1,3,5},
贾宝林^{1,3}, 隋世峰^{1,3}, 冯少姝^{1,3}, 韩 蕾^{1,3},
梁玉波^{1,3}, 吕颂辉²

(1.国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 2.暨南大学, 广东 广州 510632; 3.大连市藻毒素重点实验室, 辽宁 大连 116023; 4.大连市现代农业生产发展服务中心, 辽宁 大连 116023; 5.大连理工大学, 辽宁 大连 116024)

摘 要: 批量培养产生腹泻性贝类毒素的利玛原甲藻, 甲醇提取超声破碎后的藻细胞; 用大孔吸附树脂 HP20 富集其胞外毒素并进行毒素的初步纯化。经制备型高效液相色谱法分离, 分别得到毫克级的大田软海绵酸和鳍藻毒素-1 固体。经核磁共振氢谱和高分辨质谱确认结构, 定量核磁确定纯度, 得到的大田软海绵酸和鳍藻毒素-1 纯度分别为 99.39% 和 99.26%, 满足标准物质制备要求。

关键词: 利玛原甲藻; 大田软海绵酸; 鳍藻毒素-1; 提取; 纯化

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2019)00-0001-07

Extraction and purification of okadaic acid (OA) and dinophysin toxin-1 (DTX1) in the dinoflagellate *Prorocentrum lima*

JIN Wei^{1,2,3}, YAO Jing-yuan^{1,2,3}, CHEN Wen-bo⁴, GONG Chang-bao^{1,3,5},
JIA Bao-lin^{1,3}, SUI Shi-feng^{1,3}, FENG Shao-shu^{1,3}, HAN Lei^{1,3},
LIANG Yu-bo^{1,3}, LV Song-hui²

(1.National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 2.Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3.Dalian key laboratory of algal toxin, Dalian 116023, China; 4.Dalian modern agricultural production development service center, Dalian 116023, China; 5.Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Marine dinoflagellate *Prorocentrum lima* producing diarrhetic shellfish poison were mass cultured and crushed by ultrasonic, followed by extracting with methanol for okadaic acid (OA) and dinophysin toxin-1 (DTX1). OA and DTX1 with high purity were obtained by a preparative high performance liquid chromatographic (HPLC) method after enrichment and purification with macroporous adsorption resin HP20, which was used for the enrichment of extracellular toxin secreted in the sea water. The two compounds were identified by nuclear magnetic resonance hydrogen spectrum (1H-NMR) and high-resolution mass spectrometry (HRMS). The purity of OA and DTX1 was identified by quantitative nuclear magnetic to be 99.39% and 99.26% respectively, meeting the requirements for preparation of standard material.

Key words: *Prorocentrum lima*; okadaic acid; dinophysin toxin-1; Extraction; purification

收稿日期: 2019-06-25, 修订日期: 2019-09-16

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFF0201104, 2017FYC1404303); 国家自然科学基金(41576120, 41276099); 国家海洋局海洋赤潮灾害立体监测技术与应用重点实验室开放基金(MAYTHAB201605); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室开发基金(201613)

作者简介: 金 薇(1981-), 女, 辽宁大连人, 博士, 主要从事海洋生物毒素研究, E-mail: weijin@nmemc.org.cn

通讯作者: 梁玉波(1962-), 男, 研究员, 博士, 主要从事海洋生物毒素研究, E-mail: ybliang@nmemc.org.cn

吕颂辉(1963-), 男, 教授, 博士, 主要从事海洋赤潮生态研究, E-mail: lusonghui1963@163.com

利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)是一种产生腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)的海洋底栖甲藻,常附着于大型海藻、珊瑚礁、海草及海底沙粒上,主要栖息于温带、亚热带、热带海域^[1],广泛分布于世界近海。利玛原甲藻可产生的毒素有大田软海绵酸(okadaic acid, OA)和鳍藻毒素(dinophysins toxins, DTXs, 包括 DTX1-4, DTX5a,b,c)及其它衍生物(Acyl-OA, 19-epi-OA, DTX1 methyl ester等)^[2-6]。其胞内毒素可用甲醇^[4]、甲醇-水^[7]、tris-HCl-甲醇^[8]以及甲醇-乙醚^[9]等提取,胞外毒素可使用大孔吸附树脂(如HP20)富集,经有机溶剂洗脱后,可获得一定数量的毒素粗提物。

大田软海绵酸(OA)及其衍生物鳍藻毒素-1(DTX1)是腹泻性贝类毒素的常见组分,属一类脂溶性多环醚(图1),易溶于甲醇、乙醇、氯仿和乙醚等有机溶剂^[10]。对蛋白质磷酸酶有抑制活性,可在贝类等海洋动物体中积累,导致食用者中毒,中毒症状有腹泻、恶心、呕吐及肠胃绞痛等^[11-12]。是一种很强的致癌剂,长期接触会促进消化道肿瘤的形成^[13]。欧盟规定贝类等海产品中 大田软海绵酸(OA)与鳍藻毒素(DTX1/2)的限量标准为二者合计 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[14],我国海产品中腹泻性贝类毒素限量标准为 50 MU/kg。

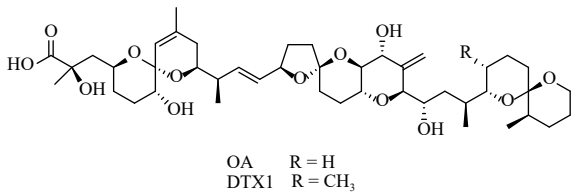


图1 大田软海绵酸及鳍藻毒素-1的化学结构

Fig. 1 The structure of OA and DTX1

大田软海绵酸(OA)及鳍藻毒素-1(DTX1)的检测方法有小鼠生物法(mouse biological assay, MBA)^[11-12]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[15]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[11]和高效液相色谱-质谱联用法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[12, 16]。由于小鼠生物法检测结果假阳性严重,国际上已逐渐废除。酶联免疫吸附法和高效液相色谱-质谱联用法为现在最常用的腹泻性贝类毒素检测方法,但这两种方法都

需要相应的毒素标准物质。近年来,我国沿岸海域腹泻性贝类毒素时有检出^[17-18],全世界仅有加拿大和西班牙两家公司可提供海洋生物毒素标准物质,供货时间长,价格昂贵,严重制约我国海洋环境及海产品中相关毒素日常检测工作的开展。因此,开展我国腹泻性贝类毒素标准物质的研制十分必要。

本研究通过批量培养利玛原甲藻,提取纯化其胞内和胞外毒素,得到毫克级高纯度的大田软海绵酸(OA)和鳍藻毒素-1(DTX1),为其标准物质的研制,提供可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

利玛原甲藻来自厦门大学藻种库。使用添加 f/2 培养基的灭菌海水在实验室连续培养。培养温度 22 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 4000 lx、光照周期 L : D = 12 h : 12 h。30 d 左右收获一次^[8]。经连续流离心机分离浓缩,藻泥用于胞内毒素的提取;培养液经大孔吸附树脂 HP20 富集,乙醇洗脱,收集胞外毒素。

1.2 试剂与仪器

试剂:大田软海绵酸(OA)和鳍藻毒素-1(DTX1)标准物质购自加拿大海洋生物研究所;甲醇、乙腈为色谱纯,购自德国默克公司;乙醇、盐酸、乙酸均为分析纯,购自天津市科密欧化学试剂公司;大孔吸附树脂 HP20 购自日本三菱公司;色谱仪器用水均为蒸馏水,购自屈臣氏公司;0.22 μm 孔径滤膜购自上海兴亚净化材料厂。

仪器:高效液相色谱(Ulitimate 3000, Thermo)-三重四级杆质谱(API4000, AB)联用仪;半制备型高效液相色谱仪(Agilent 1260-6120, 单四级杆质谱检测器,安捷伦);制备型高效液相色谱仪(P2100, 紫外检测器,辽宁谱道);旋转蒸发仪(I-300, BUCHI);冷冻干燥机(Scientz-18N, 宁波新芝);温控型超声波细胞粉碎机(Xinchen);高速冷冻离心机(2-16KL, Sigma);制备型反相液相色谱柱(XB-C18, 21.2 \times 250 mm, 10 μm , 上海月旭);半制备型反相液相色谱柱(Xtimate-C18, 10 \times 250 mm, 5 μm , 上海月旭);反相液相色谱柱(X-Bridge C18, 3.0 \times 150 mm, 3.5 μm , waters)。

1.3 实验方法

1.3.1 利玛原甲藻胞内毒素提取

称取 4 份利玛原甲藻藻泥, 每份 10 g, 分别加入 10 mL 的甲醇(溶剂 A)、0.1 mol/L 乙酸+80% 甲醇溶液(溶剂 B)、H₂O+80% 甲醇溶液(溶剂 C)、1:2 的 tris-HCl+甲醇溶液(溶剂 D), 涡旋混合均匀后超声破碎, 功率为 20 W, 脉冲间歇时间为 3 s, 破碎时间 12 min, 使利玛原甲藻细胞壁破裂, 藻细胞充分破碎, 重复提取 3 次。10,000 r/min 离心后合并收集上清提取液, 提取液经 HPLC-MS/MS 检测 OA 和 DTX1 的含量并确定最佳溶剂。用最佳溶剂多次提取藻泥, 直至提取液中不再检出 OA 和 DTX1 为止。合并全部提取液, 浓缩冻干, 得到毒素粗提物 4 °C 密封保存, 待用大孔吸附树脂初步分离。

1.3.2 利玛原甲藻胞外毒素的富集

称取活化后的 1 kg 大孔吸附树脂 HP20 装入带有砂板的玻璃层析柱中, 树脂稳定后高度为 40 cm, 体积 1.8 L。将利玛原甲藻培养液以 2.0 L/h 的流速通过大孔吸附树脂 HP20。动态吸附结束后, 静态吸附过夜, 用 6 倍柱体积的 95% 乙醇溶液淋洗树脂柱, 收集洗脱液, 浓缩后用 HPLC-MS/MS 检测 OA 和 DTX1 的含量。

1.3.3 大孔吸附树脂初步分离毒素

1.3.1 和 1.3.2 得到的浓缩液, 纯净水稀释定容, 以 1.0 L/h 的流速通过再生的 HP20 树脂柱。上样结束后, 吸附过夜, 依次用水、50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液淋洗树脂柱, HPLC-MS/MS 检测洗脱液毒素组分及含量, 收集其中 OA 和 DTX1 含量较高的部分, 浓缩、冻干后甲醇溶解待制备液相色谱进一步纯化。

1.3.4 高效液相色谱-质谱联用分析方法

高效液相色谱分析条件: 色谱柱: X-Bridge C18(150 mm×3.0 mm, 3.5 μm); 流动相: A: 0.05% 的氨水溶液 (pH 11); B: 含有 0.05% 氨水的乙腈-水 (90/10, v/v) 溶液 (pH 11); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL; 梯度: 0~10 min, B: 10%~90%; 10~13 min, B: 90%。

三重四级杆质谱分析条件: 离子源: 电喷雾离子源 (ESI-); 喷雾电压: 4,500 V; 毛细管温度: 600 °C; 源内碰撞解离电压: 5 V; 雾化气流速: 60 L/min; 辅助气流速: 50 L/min。扫描模式: 负

离子全扫描; 荷质比: 200~1500。选择 OA、DTX1 及相关衍生物的定性离子确定利玛原甲藻的产毒特征(表 1)。

表 1 HPLC-MS/MS 检测利玛原甲藻中 OA、DTX1 及其衍生物的质谱条件

Tab.1 The analysis condition of OA and DTX-1 and its derivatives in *Prorocentrum lima* cells by HPLC-MS/MS

名称	Q1	Q3
OA	803	255
DTX1	817	577
DTX2	803	577
DTX3	1055	-
DTX4	1509	1311.1
DTX5a	1458	937
DTX5b	1472	951
DTX5c	1430	714
Acyl-OA	1041	-
19-epi-OA	803	785
DTX1 methyl ester	831	813

1.3.5 制备型高效液相色谱 (preparation high performance liquid chromatography, PHPLC) 分离纯化毒素

首次制备: 色谱柱: XB-C18 柱(21.2×250 mm, 10 μm); 柱温: 室温; 流动相 A: 水, 流动相 B: 乙腈; 流速: 15 mL/min; 进样量: 10 mL; 馏分收集器: 3 min/管; 梯度: 0~40 min, B: 20%~80%; 40~45 min, B: 80%~100%; 45~60 min, B: 100%。

再次制备: 色谱柱: Xtimate-C18 柱(10×250 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流动相 A: 0.05% 的氨水溶液, 流动相 B: 含有 0.05% 氨水的乙腈-水 (90/10, v/v) 溶液; 流速: 4.0 mL/min; 进样量: 100 μL; 梯度: 0~1 min, B: 20%; 1~15 min, B: 20%~90%; 15~17 min, B: 90%。

1.3.6 定量核磁检测方法

1.3.6.1 检测条件与仪器

仪器: Bruker AVANCE III 型 400 MHz 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); 实验材料: 一级标准物质苯甲酸(GBW06117); 氘代试剂(氘代甲醇, J&K Co., Ltd); 5 mm 核磁管 (Wilmad 经济型核磁管)。

1.3.6.2 主要实验过程

(1) 样品配制方法

分别准确称量约 1 mg (精确至 0.001 mg) 样

品和 0.4 mg(精确至 0.001 mg)内标物苯甲酸各 7 份置于棕色玻璃瓶,在 0.8 mL 氘代甲醇中振荡完全溶解后,转移至直径为 5 mm 的核磁试管中,待测。

(2)核磁数据采集

核磁实验参数中 1H NMR 测定参数设定包括,自动匀场(topshim tune)和自动调谐(atma),激发脉冲角度,时间域数据点 64 K,采用自动调节增益(rga)和手动调节相结合的方式(首先采用自动调节增益信号摸索最大的增益,如果发现信号溢出,需要采用手动调节增益的方式,来获得信号最大的放大倍数),中心频率(位于定量峰和内标峰的中心位置)。

(3)图谱的后处理

通过 Topspin 2.1 软件进行数据采集,利用 Topspin 2.1 软件进行处理,依次采用自动(apk)和手动相位调整(包括一级相位调整和二级相位调整),自动(abs)和手动基线校准及根据氘代溶剂的氢谱数据进行化学位移校正。窗函数采用 EM, lb=0.3 Hz。在基线与峰的重合扩大 ± 0.1 Hz 范围内进行积分。

(4)纯度计算:

定量核磁法定值计算公式如下:

$$P_{\text{NMR}} = \frac{I_x}{I_{\text{std}}} \cdot \frac{n_{\text{std}}}{n_x} \cdot \frac{M_x}{M_{\text{std}}} \cdot \frac{m_{\text{std}}}{m_x} \cdot P_{\text{std}}$$

式中: P_{NMR} 为采用核磁共振法测得的被测物的纯度; I_x 为样品指定峰的积分面积; I_{std} 为内标物指定峰的积分面积; n_{std} 为内标物指定峰的核群核个数; n_x 为样品指定峰的核群核个数; M_x 为样品的分子量; M_{std} 为内标物的分子量; m_{std} 为添加的内标物的质量; m_x 为样品的称样量; P_{std} 为内标物的纯度。

2 结果与讨论

2.1 不同提取溶剂对大田软海绵酸和鳍藻毒素-1 提取效率的影响

本研究培养的利玛原甲藻藻泥经甲醇超声提取后, HPLC-MS/MS 检测, 提取液中只检测到 大田软海绵酸(OA)和鳍藻毒素-1(DTX1), 无其它毒素组分。可确定该藻株只产生 OA 和 DTX1, 不产生其他腹泻性贝类毒素衍生物(如 DTX2、DTX3、DTX4、DTX5a、DTX5b、DTX5c、

Acyl-OA、19-epi-OA、DTX1 methyl ester)(图 2)。说明这一株系利玛原甲藻是制备 OA 和 DTX1 的适宜藻种, 无其他毒素衍生物, 有利于 OA 和 DTX1 的纯化。

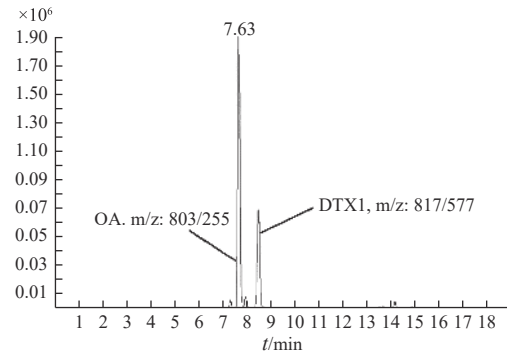


图 2 利玛原甲藻胞内 OA 和 DTX1 多重反应监测色谱

Fig. 2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram showing the presence of numerous okadaic acid and dinophys toxin-1 in the strain *Prorocentrum lima* cells.

分别用添加了水、酸及碱的甲醇, 超声提取破碎的利玛原甲藻细胞, 提取液的检测结果表明: 不同的提取溶剂中 OA、DTX1 及其衍生物种类及含量并无显著差异(表 2)。在后处理过程中, 添加了水、酸或碱的溶液, 很难通过旋转蒸发除去, 故选择甲醇作为提取溶剂。

表 2 不同试剂提取利玛原甲藻中 OA 和 DTX1 毒素的效率

Tab.2 The content of OA and DTX1 in *Prorocentrum lima* cells under different extraction solvent

提取溶剂	OA/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	DTX1/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
甲醇	48	38
0.1 M 乙酸-甲醇(20:80)	47	36
水-甲醇(20:80)	48	37
tris-HCl(pH=8.0)-甲醇(1:2)	45	36

用甲醇反复提取胞内毒素, 随着提取次数的增加, OA 和 DTX1 的含量逐渐降低, 提取 5 次后, 提取液中已不再检出 OA 和 DTX1(图 3)。根据毒素含量及细胞密度可以得出, 本项研究的利玛原甲藻胞内 OA 含量为 1.62 pg/cell, DTX1 含量为 2.19 pg/cell。

英国南岸的一株利玛原甲藻^[2], 甲醇提取, 胞内毒素含量 OA 0.4 ~ 17.1 pg/cell, DTX1 0.4 ~ 11.3 pg/cell, 同时在培养液中也检测到 OA 和 DTX1, 含量分别为 59,581 pg/mL 和 94,626 pg/mL。曾

玲等^[15]采用改良的 K 培养基,发现利玛原甲藻最佳产毒条件为:温度:20 ℃,光照周期:8L : 16D,起始密度:6,000 cell/mL,用 1:2 的 tris-HCl-甲醇提取其胞内毒素,提取 3 次,酶联免疫检测试剂盒检测,OA 的含量最高可以达到 50.90 pg/cell。钟娜、杨维东等^[19-20]进行了不同的氮源和磷源对利玛原甲藻生长和产毒的研究,发现利玛原甲藻毒素的分泌与环境中的营养盐的形态有关。

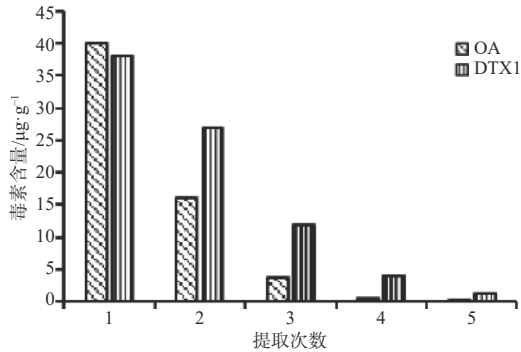


图 3 不同提取批次利玛原甲藻藻泥中 OA 和 DTX 的含量

Fig. 3 The content of OA and DTX1 in *Prorocentrum lima* cells under different extraction times

2.2 大孔吸附树脂 HP20 富集胞外毒素及初步纯化毒素

富集培养液中毒素的大孔吸附树脂柱,经 95% 的乙醇洗脱,HPLC-MS/MS 检测培养液中的毒素(即胞外毒素)的组成及含量。结果显示,利玛原甲藻培养液中的毒素主要为 OA 和 DTX1,浓度分别为 16.44 μg/L 和 13.14 μg/L。

固相吸附毒素跟踪技术(solid phase adsorption toxin tracking, SPATT)最早由 MacKenzie 等提出,用于监测水体中的毒素变化^[21]。最常用的吸附剂为 Diaion HP 系列和 Sepabeads SP 系列大孔吸附树脂。有研究揭示大孔树脂 HP20 吸附海水中 OA 和 DTX1 的过程主要是树脂的微孔结构发挥了主要作用^[22]。Fux 等^[23]发现大孔吸附树脂 HP20 无论是在室内还是室外试验对腹泻性贝类毒素 OA 和 DTX1 均有很好的吸附效果,是监测海水中毒素的首选吸附材料。在“固相吸附毒素跟踪技术”中洗脱毒素多用甲醇,但在实验过程中用乙醇毒性更小,故本研究采用乙醇作为大孔树脂洗脱溶剂。

大孔吸附树脂 HP20 也可用于 OA 和 DTX1 初步纯化。藻泥提取液及上述洗脱液蒸除醇类

溶剂后,纯净水稀释上样。吸附结束后,先用 8 倍柱体积的纯净水冲洗树脂柱,除去吸附的盐等无机杂质,然后依次用 50%、60%、70%、80% 和 90% 的乙醇溶液淋洗树脂柱,每一比例 2 L(约 1 倍柱体积),每 500 mL 收集一瓶,依次编号 1~15。HPLC-MS/MS 检测收集瓶中的毒素组成及含量(图 4)。结果显示:5#和 6#主要是 OA,7~11#是 OA 和 DTX1 的混合物,12#和 13#中主要为 DTX1。虽然用大孔吸附树脂可以将少部分 OA 和 DTX1 分开,但大部分的 OA 和 DTX1 无法分离,故下一步考虑用同大孔吸附树脂分离原理完全不同的高效制备液相色谱进一步提纯 OA 和 DTX1。

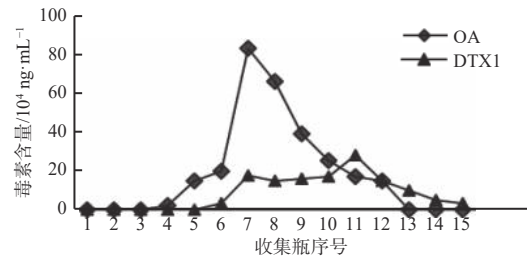


图 4 大孔树脂 HP20 吸附柱上 OA 和 DTX1 的乙醇洗脱效率

Fig. 4 Ethanol elution efficiency of OA and DTX1 on macroporous resin HP20 adsorption column

2.3 制备型高效液相色谱纯化毒素

由于 OA 和 DTX1 无紫外吸收,因此用制备型高效液相色谱系统(配有紫外检测器)纯化毒素采用全收集模式,收集全部流出液,每 3 min 收集一瓶,共收集 17 瓶,高效液相色谱-质谱联用分析方法检测。结果显示:在 21~27 min,收集到的主要馏分为 OA;在 39~45 min,收集到的主要馏分为 DTX1(图 5)。在此步骤中,分别得到 OA 和 DTX1 的粗品(纯度≥70%)。

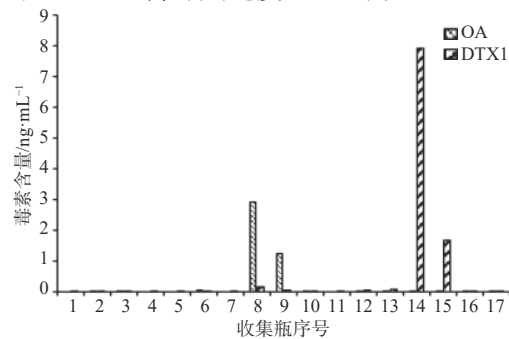


图 5 不同收集瓶中 OA 和 DTX1 的含量

Fig. 5 The content of OA and DTX1 in different retention time via preparation high performance liquid chromatography

再次制备时,用配有质谱检测器的半制备型高效液相色谱系统,实时监测馏出液中的毒素组分的荷质比(m/z)。上一步得到 OA 和 DTX1 粗品分别再制备。制备液浓缩干燥后,分别得到 26 mg 和 31 mg 白色固体粉末,高效液相色谱-质谱联用分析方法检测,同 OA 和 DTX1 标准品的保留时间一致。

2.4 毒素结构鉴定及纯度分析

纯化后的 OA 和 DTX1 用高分辨质谱(HRMS)和核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)进行结构确认(图6)。根据正负离子质谱(图6a)实验结果,可以确定该化合物的分子量为 804.4601,对应的分子式为 $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$,同 OA 的分子式一致。根据正负离子质谱(图6b)实验结果,可以确定化合物的分子量为 818.4754,对应的分子式为 $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$,同 DTX1 的分子式一致。

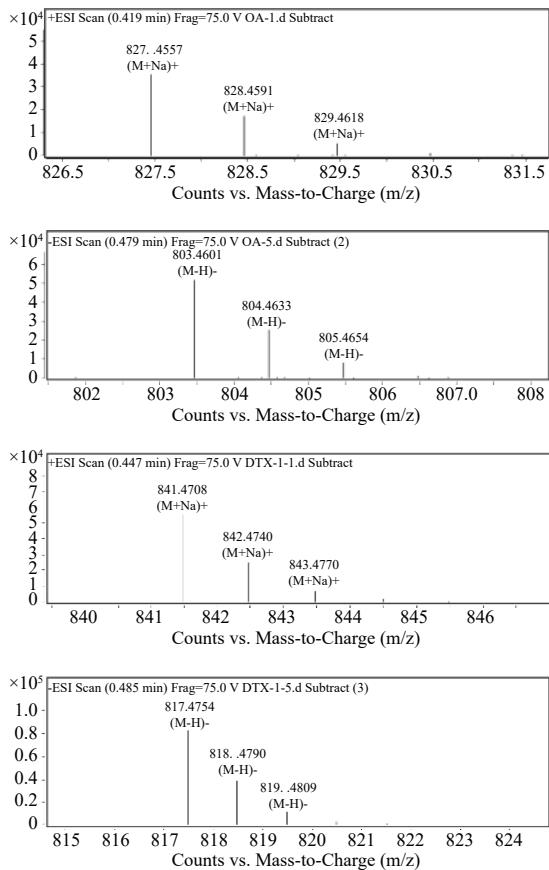


图6 OA 和 DTX1 的高分辨质谱

Fig. 6 High resolution mass spectra of OA and DTX1

核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)结果表明得到的毒素固体就是大田软海绵酸(OA)和鳍藻毒素-1

(DTX1)(图7)。定量核磁检测纯度,纯化后的 OA 纯度为 99.39%, DTX1 纯度为 99.26%。

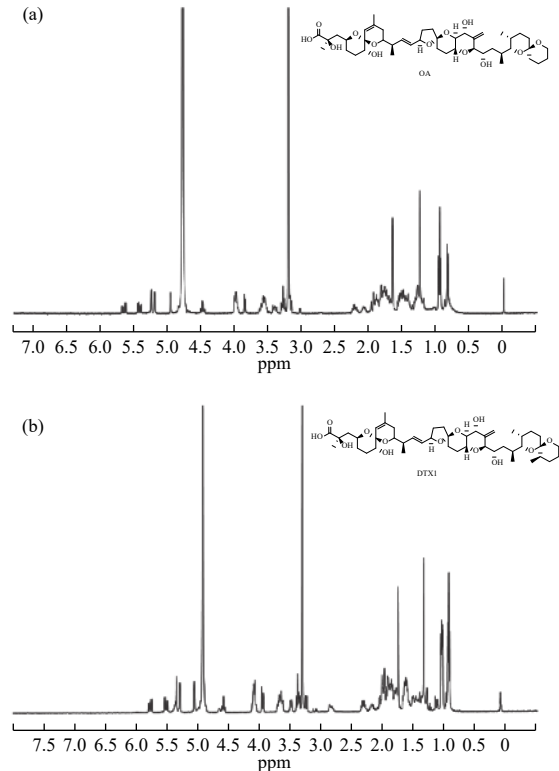


图7 OA 和 DTX1 的高分辨质谱

Fig. 7 The NMR of OA and DTX1

3 结论

(1)本项研究中的利玛原甲藻株系易于室内批量培养,所分泌毒素主要为大田软海绵酸(OA)和鳍藻毒素-1(DTX1),未发现其他腹泻性贝类毒素衍生物,结构少,有利于 OA 和 DTX1 提取与纯化。

(2)利玛原甲藻胞内毒素的适宜提取溶剂为甲醇,提取 5 次后即可达到很好的效果。

(3)用大孔吸附树脂 HP20 可有效富集胞外的 OA 和 DTX1,并用作初步纯化毒素的手段。

(4)经过制备型高效液相色谱纯化 2~3 次后,可获得纯度大于 99% 的 OA 和 DTX1,满足标准物质研制的要求。

参考文献:

- [1] BRAVO I, FERNÁNDEZ M L, RAMILO I, et al. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain)[J]. *Toxicon*, 2001, 39(10): 1537-1545.

- [2] NASCIMENTO S M, PURDIE D A, MORRIS S. Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK[J]. *Toxicon*, 2005, 45(5): 633-649.
- [3] HU T M, CURTIS J M, WALTER J A, et al. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*[J]. *Chemical Communication*, 1995, (5): 597-599.
- [4] VALE P, VELOSO V, AMORIM A. Toxin composition of a *Prorocentrum lima* strain isolated from the Portuguese coast[J]. *Toxicon*, 2009, 54(2): 145-152.
- [5] PAZ B, DARANAS A H, CRUZ P G, et al. Characterisation of okadaic acid related toxins by liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. *Toxicon*, 2007, 50(2): 225-235.
- [6] HU T M, LEBLANC P, BURTON I W, et al. Sulfated diesters of okadaic acid and DTX-1: self-protective precursors of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins[J]. *Harmful Algae*, 2017, 63: 85-93.
- [7] VARKITZI I, PAGOU K, GRANÉLI E, et al. Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge[J]. *Harmful Algae*, 2010, 9(3): 304-311.
- [8] 李丽璇, 汤敬谦, 杨维东, 等. 海洋底栖甲藻-利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*)产毒特征的研究[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(5): 745-750.
- [9] DRAISCI R, GIANNETTI L, LUCENTINI L, et al. Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 798: 137-145.
- [10] YASUMOTO T, MURATA M. Marine toxin[J]. *Chemical Reviews*, 1993, 93(15): 1897-1909.
- [11] PRASSOPOULOU E, KATIKOU P, GEORGANTELIS D, et al. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection[J]. *Toxicon*, 2009, 53(2): 214-227.
- [12] LOUPPIS A P, BADEKA A V, KATIKOU P, et al. Determination of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and related esters in Greek mussels using HPLC with fluorometric detection, LC-MS/MS and mouse bioassay[J]. *Toxicon*, 2010, 55(4): 724-733.
- [13] RODAS V L, MANEIRO E, MARTINE J, et al. Harmful algal blooms, red tides and human health: diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer[J]. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2006, 72(3): 391-408.
- [14] EU Regulation 853/2004. Regulation (EC) No. 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin[S].
- [15] 曾玲, 何伟宏, 龙超, 等. 环境因子对利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*)产毒影响的初步研究[J]. *中国海洋药物杂志*, 2010, 29(6): 21-28.
- [16] 罗璇, 于仁成, 周名江. 应用LC-MS联用方法分析青岛近海渐尖鳍藻(*Dinophysis acuminata*)细胞中的毒素成分[J]. *海洋环境科学*, 2014, 33(5): 781-787.
- [17] LI X, LI Z Y, CHEN J H, et al. Detection, occurrence and monthly variations of typical lipophilic marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in the coastal seawater of Qingdao City, China[J]. *Chemosphere*, 2014, 111: 560-567.
- [18] CHEN J H, HAN T Z, LI X T, et al. Occurrence and distribution of marine natural organic pollutants: lipophilic marine algal toxins in the Yellow Sea and the Bohai Sea, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 612: 931-939.
- [19] 钟娜, 杨维东, 刘洁生, 等. 不同氮源对利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*)生长和产毒的影响[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(6): 1186-1191.
- [20] 杨维东, 钟娜, 刘洁生, 等. 不同磷源及浓度对利玛原甲藻生长和产毒的影响研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(10): 2760-2765.
- [21] MACKENZIE L, BEUZENBERG V, HOLLAND P, et al. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves[J]. *Toxicon*, 2004, 44(8): 901-918.
- [22] FAN L, SUN G, QIU J B, et al. Effect of seawater salinity on pore-size distribution on a poly(styrene)-based HP20 resin and its adsorption of diarrhetic shellfish toxins[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1373: 1-8.
- [23] FUX E, MARCAILLOU C, MONDEGUER F, et al. Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1[J]. *Harmful Algae*, 2008, 7(5): 574-583.