

蛤毒素的研究进展

李兆新¹ 郭萌萌¹ 杨守国^{1,2} 邢丽红¹ 谭志军¹

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘要 蛤毒素是由有毒甲藻产生的脂溶性毒素, 已经确认的同系物有 14 种。在不同国家的不同贝类中蛤毒素组成特征和含量均存在差异。蛤毒素的小鼠腹腔注射毒性大于经口毒性。目前, 国际上蛤毒素的食用安全限量标准尚不统一。蛤毒素的总量可用生物法测定, 每种蛤毒素组分的含量可用液相色谱-质谱法测试。蛤毒素的酶联免疫测定方法正在研究阶段。我国关于蛤毒素的研究较少, 建议加强对毒素的生物学特征及代谢规律研究。

关键词 蛤毒素 甲藻 双壳贝类 分布 安全限量

中图分类号 X55 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)04-0131-11

A review on the study of pectenotoxins

LI Zhao-xin¹ GUO Meng-meng¹ YANG Shou-guo^{1,2}

XING Li-hong¹ TAN Zhi-jun¹

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT Pectenotoxins are a group of lipophilic toxins produced by dinoflagellates. There are 14 pectenotoxin analogues which have been confirmed. The profiles and the concentration of pectenotoxins are different in toxic algal and shellfish from different countries. The lethality of pectenotoxins by intra-peritoneal injection is higher than by oral administration of mouse. At present, there are no internationally accepted criteria of maximum residue limits of pectenotoxins for shellfish. The total amount of pectenotoxins can be tested by mouse bioassay. The concentration levels of individual pectenotoxin can be analyzed by HPLC-MS methods. The enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA) method for determination of pectenotoxin is under development. In China, few studies on pectenotoxins have been carried out. The studies on profiles and metabolism of pectenotoxins in shellfish are recommended.

KEY WORDS Pectenotoxin Dinoflagellates Bivalve Distribution
Maximum residue limit

近年来随着工业化进程的加快, 人类活动的加剧, 近岸海水污染日益严重。总体趋势上, 赤潮出现的频率和强度都不断加大(Blanco *et al.* 2005)。中国海域在 20 世纪 90 年代后赤潮发生比较频繁, 仅 1990 年就发

国家科技支撑计划项目(2007BAD621305)资助

收稿日期: 2008-10-11; 接受日期: 2008-12-20

作者简介: 李兆新(1967-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事水产品安全与海洋生物毒素研究。E-mail: lizx@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85835917

生了34次,不仅使渔业遭受了巨大的经济损失,也使近海及沿岸生态系统遭到了破坏(陈则玲等 2000)。在海洋中大部分藻类是无毒的,只有少部分藻类具有毒性。而有些藻类在它们生命周期的大部分阶段是无毒的,只在某些特定阶段会产生毒素。滤食性贝类和草食性鱼类通过摄食这些藻类而富集毒素,这些贝类和鱼类又通过食物链直接地或间接地把毒素传递给海洋哺乳动物、海鸟和人类,对人类及其他生物造成健康隐患。因此藻类毒素已成为影响海洋食品安全的关键因素之一。2004年世界粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和联合国教科文组织海洋科学委员会(Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, IOC)根据贝类毒素的化学分子结构把毒素分为8类(Toyofuku *et al.* 2006),蛤毒素(Pectenotoxin, PTX)是其中的一类。蛤毒素由鳍藻属 *Dinophysis* sp. 产生(Yasumoto *et al.* 2006; Daiguji *et al.* 1998; Wilkins *et al.* 2006; Draisci *et al.* 1996; James *et al.* 1999; MacKenzie *et al.* 2002, 2005; Miles *et al.* 2006; Fernandez *et al.* 2006),属脂溶性环状聚醚化合物,20世纪80年代被发现。在我国有关蛤毒素的研究资料甚少。本文分别从蛤毒素的起源、化学性质、分子结构、毒理学、食用安全限量、生物学特征与分布规律以及检测技术等方面介绍蛤毒素的研究状况和最新进展。

1 蛤毒素的起源

20世纪80年代,PTX-1和PTX-2最先由日本科学家Yasumoto等(1985)从日本虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis* 的肝胰腺(Hepatopancreas)中分离出来,并因此命名为蛤毒素。随后,从藻类和贝类中分离并确认了一系列蛤毒素同系物,并证实蛤毒素由微藻产生,贝类可以通过滤食有毒藻而富集蛤毒素。

2 蛤毒素的化学性质及分子结构

蛤毒素是脂溶性环状聚醚化合物,可溶于有机溶剂,但有些有机溶剂(如乙腈)可造成毒素分子结构的变化(Sasaki *et al.* 1998),在强碱性条件下,分子结构易被破坏(Blanco *et al.* 2005)。

PTX-2的结构最早由Yasumoto等(1985)通过X-射线法确定。现已确认的蛤毒素的同系物有14种,其中PTX-1、2、3、4、6、7、8、9、11、12、13和14的分子结构已经确定,PTX-5和PTX-10尚未报道(Larsen *et al.* 2007)。蛤毒素同系物的分子结构如图1所示,分子量列于表1。PTX-4与PTX-1互为空间异构体,PTX-4也称为7-*epi*-PTX-1。PTX-6与PTX-7互为空间异构体,PTX-7也被称为7-*epi*-PTX-6。PTX-8和PTX-9分别是PTX-1/4和PTX-6/7酸化的产物。不同于PTX-2的环链结构,PTX-2 SA和7-*epi*-PTX-2 SA具有开链结构。PTX-11(Suzuki *et al.* 2006)、PTX-12(Miles *et al.* 2004)、PTX-13(C₃₂位 α 基PTX-12)和PTX-14(C₃₂, C₂₆位脱氢PTX-13)(Miles *et al.* 2006)的分子结构也已确定。最近发现部分蛤毒素在贝类中以开链脂肪酸酯的形式存在(Wilkins *et al.* 2006)。综上所述,蛤毒素同系物分子结构的差异表现在4个方面:(1)在43位的甲基的氧化程度不同,从低到高分别为甲基、羟基和羧基;(2)A环和B环的同分异构化;(3)环链聚醚和开链脂肪酸的差异;(4)游离蛤毒素和蛤毒素脂肪酸酯的差异。

3 蛤毒素的毒理学

澳大利亚分别在1997年和2001年报道了两起因食用含蛤毒素的贝类而造成的中毒事件(Quilliam *et al.*

表1 蛤毒素的分子量(MWt)
Table1 Molecular weight of PTXs

蛤毒素 PTX	PTX-8	PTX-1	PTX-2	PTX-3	PTX-4	PTX-5	PTX-6	PTX-7
	PTX-10	PTX-9	PTX-11	PTX-12	PTX-13	PTX-14	PTX-2S A	7- <i>epi</i> -P TX-2SA
分子量 MWt	874	858	872	874	876	888	874	874
	未知	888	874	856	874	856	876	876

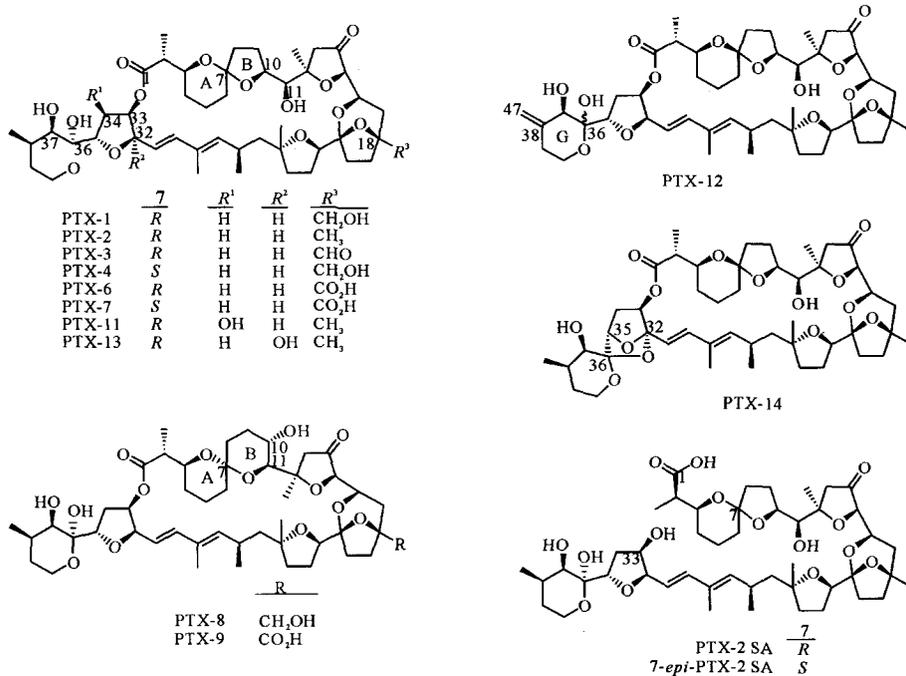


图 1 PTX-1,2,3,4,6,7,8,9,11,12,13,14,PTX-2 SA 和 7-epi-PTX-2 SA 的化学结构(Miles *et al.* 2007)

Fig. 1 Structures of PTX-1,2,3,4,6,7,8,9,11,12,13,14,PTX-2 SA and 7-epi-PTX-2 SA (Miles *et al.* 2007)

1998)。但后续研究表明,中毒现象更可能是由其他种类的毒素所导致(Miles *et al.* 2007)。食用含有蛤毒素的贝类不会造成消费者急性中毒。

在小鼠体内毒性试验中,以腹腔注射的方式,PTX-1、PTX-2、PTX-3、PTX-4、PTX-7 和 PTX-11 最小致死量范围从 192 μ g/kg 至 770 μ g/kg 小鼠体重,PTX-8、PTX-9 和 PTX-2 SA 最小致死量高于 5 000 μ g/kg 小鼠体重(Miles *et al.* 2007)(表 2)。日本的研究表明,在 PTX-2 的口服剂量为 1 500 μ g/kg 小鼠体重时,小鼠未产生腹泻症状,但造成小鼠小肠积水。当剂量为 2 000 μ g/kg 小白鼠体重时,小鼠产生腹泻症状。然而在新西兰的研究中,当 PTX-2(Miles *et al.* 2004)或 PTX-11(Suzuki *et al.* 2006)的口服剂量达到 5 000 μ g/kg 小鼠体重时,小鼠未产生腹泻。在体外毒性试验中,当剂量为 1.8 μ g/L 时,PTX-2 SA 对 KB 细胞没有毒性,而 PTX-2 在 0.05 μ g/L 时对 KB 细胞就有毒性作用。由此推断,PTX-2 的毒力与其环状分子结构有关(Daiguji *et al.* 1998)。

表 2 口服或注射方式蛤毒素对小鼠的致死量(μ g/kg)

Table 2 Lethality of PTXs (μ g/kg) by i. p or oral administration to mouse

蛤毒素 PTX analogue	半致死量(注射) LD ₅₀ (i. p.)	最小致死量 MLD (i. p.)	口服半致死量 Oral LD ₅₀	参考文献 Reference
PTX-1		250 260		Yasumoto <i>et al.</i> 1984 Yasumoto <i>et al.</i> 1985 Yasumoto <i>et al.</i> 1989
PTX-2	219	230 192		Miles <i>et al.</i> 2004 Yasumoto <i>et al.</i> 1989
PTX-3		350		Yasumoto <i>et al.</i> 1989
PTX-11	244	250	>5 000	Suzuki <i>et al.</i> 2006
PTX-4		770		Yasumoto <i>et al.</i> 1989
PTX-6		500		Yasumoto <i>et al.</i> 1989
PTX-7		>500		Sasaki <i>et al.</i> 1998
PTX-8		>5 000		Sasaki <i>et al.</i> 1998
PTX-9		>5 000		Sasaki <i>et al.</i> 1998
PTX-2		>5 000	>5 000	Miles <i>et al.</i> 2004
PTX-2 SA		>5 000	>5 000	Miles <i>et al.</i> 2004

蛤毒素通常和大田软海绵酸(OA)、鳍藻毒素(DTXs)同时出现在贝类和藻类组织中,并且可以使用相同的方法从贝类和藻类中提取出来。通过腹腔注射的方法,高剂量蛤毒素可以致小白鼠腹泻甚至死亡。因此传统上蛤毒素被归类为腹泻性毒素(Yasumoto *et al.* 1985)。但是,蛤毒素与软海绵酸在毒性机理上有很大不同,软海绵酸是蛋白磷酸酯酶抑制剂,而蛤毒素对蛋白磷酸酯酶没有抑制作用。因此,现在更趋向于将蛤毒素列为单独的一类毒素(Toyofuku *et al.* 2006)。

4 蛤毒素的食用安全限量

目前大多数国家没对贝类中的蛤毒素做出单独的限量要求。欧盟规定双壳贝类可食性组织中腹泻性贝毒不大于 $160\mu\text{g}/\text{kg}$ (以 OA 计)。腹泻性贝毒包括 OA、DTX-1、DTX-2 和 PTX-1、PTX-2。小白鼠生物法可以测试腹泻性贝毒素总量,不区分毒素的组份。由于不同国家的研究结果不一致,对 PTX 的毒性仍存在歧义。2004 年,WHO/FAO/IOC 的专家组认为:“由于蛤毒素的毒理学数据不充分,无法建立蛤毒素的每日最大允许摄入量(Tolerable Daily Intake, TDI)”。2005 年,欧盟专家建议把 $720\mu\text{g}/\text{kg}$ 作为贝肉中蛤毒素(不包括 PTX-8,9,10)的限量标准。不同国家和组织中蛤毒素的有关建议或规定列于表 3(European Union 2002; Madigan *et al.* 2006)。

表 3 不同国家和组织有关贝类中 PTXs 的安全限量
Table 3 Summary of PTXs guidelines on shellfish of different countries or groups

国家 Nation	限量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Limit	贝类组织 Tissue of shellfish	实施时间(年) Issue date(Year)
欧盟(含挪威) EU(* Including Norway)	160,OA 计(含 PTXs)	贝肉 Edible tissues	2002
加拿大 Canada	1000,PTXs 200,PTXs	消化腺 Digestive gland 贝的软组织 Edible tissues	2007
新西兰 New Zealand	200,以 OA 计(含 PTXs)	可食部分 Edible tissues	2006
澳大利亚 Australia	200,以 OA 计(含 PTXs)	贝肉 Edible tissues	2006

5 鳍藻中蛤毒素特征

研究表明,蛤毒素是由鳍藻 *Dinophysis* spp. 产生的,常见的产毒藻有弗氏鳍藻 *D. fortii*, 急尖鳍藻 *D. acuta*、渐尖鳍藻 *D. acuminata*、具尾鳍藻 *D. caudata*、圆形鳍藻 *D. rotundata* 和斯堪的纳维亚鳍藻 *D. norvegica* 等(Larsen *et al.* 2007; Suzuki *et al.* 2003; Miles *et al.* 2004; Draisci *et al.* 1996; James *et al.* 1999; Lee *et al.* 1989; MacKenzie *et al.* 2002,2005; Miles *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2001)。其单细胞形状分别如图 2 所示。

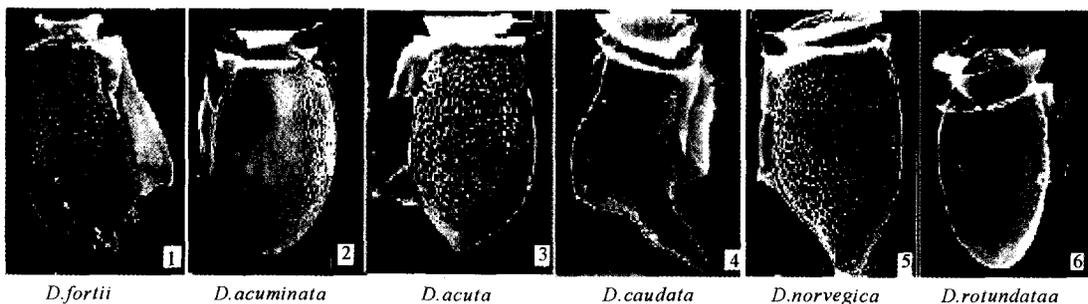


图 2 产生蛤毒素的有毒藻种类(Faust *et al.* 2002)

Fig. 2 The original toxic algal producing PTXs (Faust *et al.* 2002)

蛤毒素的产毒藻在地域上分布较广, 在欧洲、美洲、日本和大洋洲均有报道。产毒藻的种类、分布及其所对应产生的蛤毒素列于表 4。

表 4 鳍藻种类、分布及其所产生的蛤毒素
Table 4 Pectenotoxins, the original *Dinophysis* sp. and their distribution

产毒藻种 Algal Species	蛤毒素 PTXs	地区 Locations	参考文献 Reference
弗氏鳍藻 <i>Dinophysis fortii</i>	PTX-2	日本 Japan	Yasumoto <i>et al.</i> 1985
		意大利 Italy	Draisci <i>et al.</i> 1996
	PTX-2	西班牙 Spain	Luisa <i>et al.</i> 2006
		爱尔兰 Ireland 葡萄牙 Portugal	James <i>et al.</i> 1999 Vale 2004
PTX-12	挪威 Norway	Miles <i>et al.</i> 2004	
急尖鳍藻 <i>D. acuta</i>	PTX-2, PTX-11, PTX-13,14	新西兰 New Zealand	MacKenzie <i>et al.</i> 2002
			MacKenzie <i>et al.</i> 2005
			Miles <i>et al.</i> 2004
			Miles <i>et al.</i> 2006
			Suzuki <i>et al.</i> 2006
			Suzuki <i>et al.</i> 2001
渐尖鳍藻 <i>D. acuminata</i>	PTX-2	新西兰 New Zealand	MacKenzie <i>et al.</i> 2005
		挪威 Norway	Miles <i>et al.</i> 2004
		澳大利亚 Australia	Madigan <i>et al.</i> 2006
		智利 Chile	Blanco <i>et al.</i> 2007
具尾鳍藻 <i>D. caudata</i>	PTX-2	西班牙 Spain	Fernandez <i>et al.</i> 2006
斯塔的纳维亚鳍藻 <i>D. norvegica</i>	PTX-12	挪威 Norway	Miles <i>et al.</i> 2004
圆形鳍藻 <i>D. rotundata</i>	PTX-12	挪威 Norway	Miles <i>et al.</i> 2004

在日本和意大利的 *D. fortii* 中都检测到 PTX-2 (Yasumoto *et al.* 1985; Draisci *et al.* 1996)。在新西兰渦鞭毛藻 *P. reticulatum* 的每个藻细胞中的 PTX-2、PTX-11、PTX-2 SA 和 PTX-11 SA 含量分别为 81.0、22.0、1.9 和 1.0pg。*D. acuta* 的每个藻细胞中的 PTX-2、PTX-11、PTX-2 SA 和 PTX-11 SA 含量分别为 82.0、47.0、3.0 和 0.5 pg。在 *P. reticulatum* 和 *D. acuta* 中, PTX-2 和 PTX-11 含量较高, 而开链脂肪酸 PTX-2 SA 和 PTX-11 SA 含量较低 (MacKenzie *et al.* 2002)。在我国黄海、东海、渤海和南海区均发现有鳍藻属 (*Dinophysis* sp.) *D. Fortii*, *D. acuminta*, *D. caudata*, *D. rotunda*, *D. mitra* 和 *D. miles* (表 5)。黄海胶州湾水域, 李伟才等 (2000) 在 1994 年 6 月份观测到海水中存在渐尖鳍藻 *D. acuminta*, 数量达 200~800 个/m³。

表 5 鳍藻在中国海域的分布
Table 5 The distribution of *Dinophysis* sp. in the sea of China Seas

项目 Item	分布区域 Distribution			
	渤海 Bohai	黄海 Yellow Sea	东海 East China Sea	南海 South China Sea
鳍藻属 <i>Dinophysis</i> sp.			渐尖鳍藻 <i>D. acuminta</i>	渐尖鳍藻 <i>D. acuminta</i>
			弗氏鳍藻 <i>D. fortii</i>	弗氏鳍藻 <i>D. Fortii</i>
			具尾鳍藻 <i>D. caudata</i>	具尾鳍藻 <i>D. caudata</i>
			圆形鳍藻 <i>D. rotunda</i>	<i>D. mitra</i>
				<i>D. miles</i>
		渐尖鳍藻 <i>D. acuminta</i>	渐尖鳍藻 <i>D. acuminta</i>	
		弗氏鳍藻 <i>D. fortii</i>	弗氏鳍藻 <i>D. fortii</i>	

6 双壳贝类中的蛤毒素特征

双壳贝类通过摄食含有蛤毒素的鳍藻而富集蛤毒素, 同时蛤毒素在双壳贝类体内代谢而生成一系列衍生

物。现已分离、鉴定出 14 种蛤毒素的同系物。

在日本虾夷扇贝的肝胰腺中分离出 PTX-1、PTX-2、PTX-3 和 PTX-6 (Yasumoto 1984; Yasunoto *et al.* 1985)。蛤毒素 PTX-1、PTX-2 和 PTX-6 含量分别为 260、550 和 1310 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在爱尔兰紫贻贝 *M. edulis* 中, 蛤毒素 PTX-2、PTX-2 SA 含量分别为 414 和 130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Miles *et al.* 2007)。在紫贻贝 *M. galloprovincialis* (James *et al.* 1999) 以及绿贻贝 *P. canaliculus* (Daiguji *et al.* 1998) 中都发现了 PTX-2 SA 和 7-*epi*-PTX-2SA。在新西兰扇贝 *P. canaliculus* 的中肠腺中, 蛤毒素 PTX-1、PTX-2、PTX-2SA、PTX-11 和 PTX-11SA 含量分别为 105、1560、79 和 283 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (MacKenzie *et al.* 2002)。在 2003 年南澳大利亚 *D. acuminata* 暴发期间, 在牡蛎 *Crassostrea gigas* 全贝肉中 PTX 含量较高, PTX-2 和 PTX-2 SA 分别为 0.11 和 0.79 mg/kg ; 在蟹 *Pecten fumatus* 的全部可食部中的含量次低, PTX-2 和 PTX-2 SA 分别为 0.023 和 0.51 mg/kg ; 在 Razorfish (*Pinna biclour*) 全贝肉中含量很低, PTX-2 和 PTX-2 SA 分别为 0.013 和 0.15 mg/kg (Madigan *et al.* 2006)。在葡萄牙近岸的贻贝 *M. galloprovincialis*、蛤 *Donax trunculus* 和蛤 *Spisula solida* 中也分别检出 PTX-2 SA 和 7-*epi*-PTX-2 SA (MacKenzie *et al.* 2002; Vale 2004, 2006)。在挪威紫贻贝 *M. edulis* 中, 蛤毒素 PTX-1、PTX-2、PTX-2 SA、PTX-12 和 PTX-12 SA 含量分别为 486、929、15 875、2 306 和 2 070 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Miles *et al.* 2004)。在俄罗斯紫贻贝 *M. edulis* 中, 蛤毒素 PTX-2 和 PTX-2 SA 含量分别为 0.2 和 2.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在我国尚没有贝类中蛤毒素含量的具体资料。

不同国家的贝类中蛤毒素的组成成份不同, 同一种毒素在不同地域间的含量差异也很大。这可能是因为不同海域中的毒藻不同, 也可能与贝类样品的采集时间有关。贝类中蛤毒素组分、产毒藻种类及其地域分布如表 6 所示。

7 蛤毒素的生物转化

双壳贝类通过摄食含毒藻而富集毒素。蛤毒素在双壳贝类中的富集和代谢与贝类的品种以及其所摄食的有毒藻种类有关。

7.1 蛤毒素在扇贝中的氧化

PTX-1、PTX-3 和 PTX-6 存在于日本虾夷扇贝的肝胰腺中 (Yasumoto *et al.* 1985; Yasumoto 1984)。进一步研究证实 PTX-2 是由 *D. fortii* 产生 (Lee 1989)。但在 *D. fortii* 中并不存在 PTX-1、PTX-3 和 PTX-6。因此推断, 虾夷扇贝摄食 *D. fortii* 后在肝胰腺中把 PTX-2 转化为 PTX-1、PTX-3 和 PTX-6 (Lee 1989)。PTX-2 的氧化作用发生在 C₄₃ 位置上, 该位置上的 CH₃ 被氧化成羟基、羧基或羰基而形成 PTX-1、PTX-3 和 PTX-6 (Yasumoto *et al.* 1985, 1989; Sasaki *et al.* 1998) (图 3A)。

7.2 蛤毒素在双壳贝类中的水解

在新西兰扇贝 *P. novaezelandiae* (Suzuki *et al.* 2001)、贻贝 *M. galloprovincialis* 和贻贝 *P. canaliculus* (Suzuki *et al.* 2001) 以及挪威贻贝 *M. edulis* 中, PTX-2 的聚醚环迅速地酶解形成 PTX-2 SA。在体外试验中, 当把 PTX-2 加入贻贝 *M. edulis* 提取物中后, 很快就形成了蛤毒素开链脂肪酸。在酶的作用下, PTX-2 的环链在 C₁-C₃₃ 水解断裂而形成开链脂肪酸 (图 3B)。

7.3 蛤毒素开链脂肪酸在双壳贝类中的酯化

在爱尔兰贻贝 *M. edulis* 中分离出 PTX-2 SA 酯。主要成分是 37-O-acyl(酰基)PTX-2 SA 酯, 其次是 11-O-acyl(酰基)PTX-2 SA 酯, 还有少量的 33-O-acyl(酰基)PTX-2 SA 酯 (Wilkins *et al.* 2006)。

7.4 蛤毒素的同分异构化

PTX-4 与 PTX-1 互为空间异构体, PTX-4 也称为 7-*epi*-PTX-1。PTX-6 与 PTX-7 互为空间异构体, PTX-7 也称为 7-*epi*-PTX-6。在受到光照、温度或酸度等的影响时, 蛤毒素在 C₇ 位置的 A 环和 B 环可以发生空间结

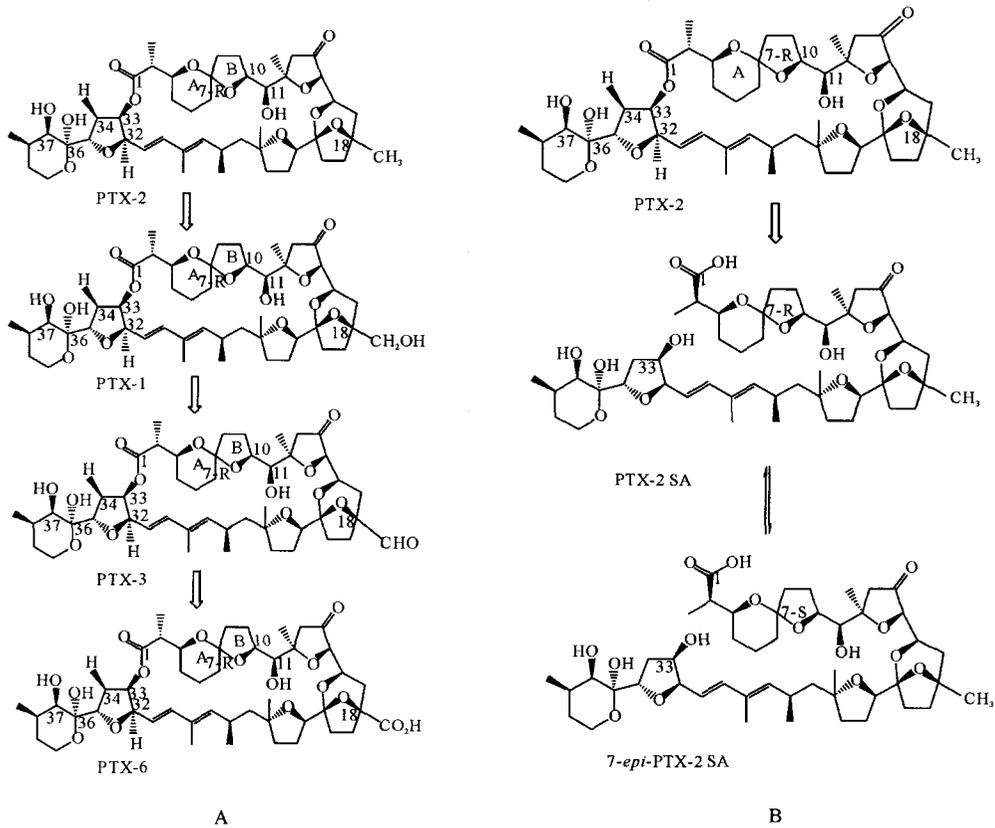
构变异形成相应的同分异构体。

表 6 贝类中蛤毒素、毒素藻种类及其地域分布
Table 6 Summary of PTXs occurrence in shellfish species, *Dinophysis* sp. and their distribution

贝类名称 Shellfish name	贝类品种 Species name	蛤毒素 PTXs	蛤毒素开链酸 PTX-SA	微藻品种 Algal species	地域分布 Distribution location
	<i>Patinopecten yessoensis</i>	PTX-1,2, PTX-6		<i>D. fortii</i>	日本 Japan
扇贝 Scallop	<i>Pecten novaezelandiae</i>	PTX-2	PTX-2 SAs	<i>D. acuta</i>	新西兰 New Zealand
	<i>Pecten fumatus</i>	PTX-2	PTX-2 SA	<i>D. acuminata</i>	澳大利亚 Australia
	<i>Argopecten irradians</i>	PTX-2	PTX-2 SA	<i>D. acuminata</i>	智利 Chile
	<i>P. canaliculus</i>	PTX-2, PTX-11	PTX-2 SA PTX-11 SA	<i>D. acuta</i>	新西兰 New Zealand
绿贻贝 Greenlipped mussel		PTX-2	PTX-2 SA 7- <i>epi</i> -PTX-2 SA	<i>D. acuta</i>	葡萄牙 Portugal
	<i>M. galloprovincialis</i>	PTX-2	PTX-2 SAs	<i>D. acuta</i>	爱尔兰 Ireland
				7- <i>epi</i> -PTX-2SA	-
			PTX-2SA esters	<i>D. acuta</i>	爱尔兰 Ireland
紫贻贝 Blue mussels	<i>M. edulis</i>	PTX-2	PTX-2 SA, PTX-12 SA	<i>D. acuminata</i> <i>D. acuta</i> <i>D. norvegica</i>	挪威 Norway
		PTX-12			
	<i>M. edulis</i>	PTX-2	PTX-2 SA	<i>D. acuminata</i>	智利 Chile
贻贝 Mussels	<i>Semimytilus algaus</i>	PTX-2	PTX-2 SA	<i>D. acuminata</i>	智利 Chile
牡蛎 Pacific Oyster	<i>Crassostrea gigas</i>	PTX-2	PTX-2 SA	<i>D. acuminata</i>	澳大利亚 Australia
蛎 Razor clam	<i>Pinna biclour</i>	PTX-2	PTX-2 SA	<i>D. acuminata</i>	澳大利亚 Australia
鸟蛤 Cockle	<i>Cerastoderma edule</i>	PTX-2, PTX-12	PTX-2 SA, PTX-12 SA	<i>D. acuminata</i> <i>D. acuta</i> <i>D. norvegica</i>	挪威 Norway
		PTX-2	PTX-2 SA 7- <i>epi</i> -PTX-2 SA	<i>D. acuta</i>	葡萄牙 Portugal
斧蛤 Pipis	<i>Donax trunculus</i>	PTX-2	PTX-2 SA 7- <i>epi</i> -PTX-2 SA	<i>D. acuta</i>	葡萄牙 Portugal
蛤 Clam	<i>Spisula solida</i>	PTX-2	PTX-2 SA 7- <i>epi</i> -PTX-2 SA	<i>D. acuta</i>	葡萄牙 Portugal
蛤 Clam	<i>Mesoderma donacium</i>	PTX-2	PTX-2 SA	<i>D. acuminata</i>	智利 Chile

7.5 蛤毒素在螃蟹体内的生物转化

通过食物链蛤毒素可以从双壳贝转移到螃蟹体内。研究表明,当以含蛤毒素的紫贻贝 *M. edulis* 饲喂棕蟹 *Cancer pagurus* 时,在 12°C 水温条件下,在 *C. pagurus* 体内 PTX-2、PTX-2 SA、7-*epi*-PTX-2 SA、PTX-12a 与 PTX-12 的半衰期分别为 6.5、6.0、6.5、7.5 和 7.5d。而且在代谢过程中所形成的代谢产物 Metabolite-1 与 PTX-2 的分子构架相似(Li 2008)。



A: C₁₃甲基氧化形成 PTX-1, PTX-3 和 PTX-6; B: 在 C₁-C₃₃水解形成 PTX-2 SA 和 7-epi-PTX-2 SA

A: PTX-1, PTX-3 and PTX-6 by oxidation at 43-methyl group; B: PTX-2 SA and 7-epi-PTX-2 SA by hydrolyzation at C₁- C₃₃

图3 PTX-2 向其同系物的转化

Fig. 3 Conversion of PTX-2 to its analogues

8 蛤毒素的测试方法

8.1 贝类样品中蛤毒素的测试方法

蛤毒素的分析方法主要有小白鼠生物学测试法(Mouse assay)和液相色谱-质谱联用法(LC - MS/MS)等。

8.1.1 小白鼠生物学测试法

用小白鼠生物学方法测试腹泻性贝毒素最早是由日本学者确立的(Yasumoto *et al.* 1978)。其具体步骤为:取适量均质后的贝类样品,以丙酮提取后离心,丙酮提取液以氮气吹干后加入乙醚溶解,以水洗醚相,弃去下层水相,醚相吹干后加入含1%吐温-60的生理盐水制成注射液。分别取0.5和1.0ml注射液原液和4倍、16倍体积稀释后的注射液,每组腹腔注射3只ICR系小白鼠,观察24h内死亡两只以上的组,查表确定毒性的剂量,单位为鼠单位(MU)。受小白鼠性别、品系、个体大小差异等的影响,生物学方法测试结果的重复性和精度都较差(Nagashima *et al.* 1991; Stabell *et al.* 1992; Park *et al.* 1986),因为丙酮提取物中可能含有多种脂溶性贝毒素,如OA、DTX-1、DTX-2和PTX-1、PTX-2等,所以小白鼠生物法测试的是脂溶性腹泻性贝毒素总量,不能区分毒素的组份特征。同时由于每年大量使用小白鼠用于贝类毒素的日常检验,在学术界已引起是否有违科研道德的争论(Hess *et al.* 2006)。由于以上原因,在一些国家已限制使用该方法。

8.1.2 液相色谱-质谱联用法

液相色谱测试技术需要用毒素标准品作对照,而毒素标准品的缺乏,限制了液相色谱的应用。液相色谱-质谱联用技术很好地解决了这一问题。其原理是利用液相色谱将不同类型的毒素分离,利用质谱检测器,对不

同的毒素进行检测。即使没有毒素标准品,只要知道这种毒素的分子量,就可对其进行定性分析。有毒素标准品时,液相色谱-质谱联用分析技术也可对毒素进行精确的定量分析(Quilliam *et al.* 1998; Quilliam 2003; Stobo *et al.* 2005; Suzuki *et al.* 2003)。液相色谱-质谱联用技术的发展和运用,极大地推动了对 PTX 的精确定性和定量研究(Castberg *et al.* 2004; Quilliam *et al.* 2001)。

8.1.3 酶联免疫吸附方法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

ELISA 是贝类毒素的重要测试方法之一。其方法原理是利用毒素诱发免疫反应产生抗体,利用抗体对抗原的特异性识别来测试各种毒素。酶联免疫法具有灵敏、快速、简单、易用以及适用现场分析等特点。PTXs 的酶联免疫吸附方法和商品试剂盒正在研制中(Hess *et al.* 2006)。

8.2 海水中蛤毒素测试技术

蛤毒素由藻类产生,并释放于海水中。在新西兰,Mackenzie 等(2004)利用主动吸附的原理,测试海水中脂溶性毒素的含量。具体操做方法为:把经过甲醇处理的吸附树脂封装于聚酯网袋内,然后吊挂于待测定海区的海水表面以下,一定时间后取出,吸附剂中的毒素经提取、净化和浓缩后用 LC-MS/MS 分析。该方法简便经济,可以连续监测海水中的毒素。

9 我国蛤毒素研究状况及建议

我国已建有赤潮监测计划,并对贝类中的腹泻性毒素进行了研究(吴施卫等 2005;杨莉等 2006;戴红等 2005)。虽然在我国黄海、东海、渤海和南海区均发现鳍藻属(*Dinophysis* sp.)微藻 *D. Fortii*, *D. acuminata*, *D. caudat*, *D. rotunda*, *D. mitra* 和 *D. miles*,但是,由于采用小白鼠生物法测试腹泻性毒素,所以无法确定呈阳性的贝类样品中是否含有蛤毒素组分。目前对蛤毒素的产毒藻源及贝类中蛤毒素组成特征尚没有确切的报道。因此,应当建立蛤毒素的化学检测方法,并加强对蛤毒素的生物学特征的基础研究。

目前,我国还没有发生因食用含贝毒的蟹而导致中毒的事件,所以对蟹类中贝毒素的研究尚未引起重视。在自然海区中,由于蟹类及其他海洋生物捕食双壳贝类,所以在生物之间存在着毒素的传递。建议加强毒素在蟹及其他海洋生物体内积累和代谢动力学的研究。

参 考 文 献

- 李伟才,李桂生. 2000. 中国沿海部分海区贝毒素的调查. 海洋科学, 24(9): 18, 19~22
- 陈则玲, 巩宁. 2000. 腹泻性贝毒及其高效液相色谱检测方法. 海洋通报, 19(1): 73~78
- 吴施卫, 张纯超, 卢楚谦, 刘景钦, 梁谦林. 2005. 南海近岸海域腹泻性贝类毒素分析. 海洋环境科学, 24(4): 48~51
- 杨莉, 杨维东, 刘洁生, 江涛. 2006. 广州市售贝类麻痹性贝毒和腹泻性贝毒污染状况分析. 卫生研究, 35(4): 435~439
- 戴红, 李奶姜, 陈国斌. 2005. 福建三都湾赤潮监控区的麻痹性贝毒和腹泻性贝毒研究. 海洋环境科学, 24(1): 44~47
- Blanco, J., Morono, A., and Fernandez, M. L. 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. Galician J. Mar. Resour. 1: 1~70
- Blanco, J., Alvarez, G., and Uribe, E. 2007. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. Toxicon, 49(5): 710~716
- Castberg, T., Torgersen, T., Aasen, J., Aune, T., and Naustvoll, L. J. 2004. Diarrhoeic shellfish poisoning toxins in *Cancer pagurus* Linnaeus, 1758 (Brachyura, Cancridae) in Norwegian waters. Sarsia, 89(5): 311~317
- Daiguji, M., Satake, M., James, K. J., Bishop, A., MacKenzie, L., Naoki, H., and Yasumoto, T. 1998. Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. Chemistry Letters, (7): 653~654
- Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., and Poletti, R. 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. Toxicon, 34(8): 923~935
- European Union. 2002. European Union commission decision of 15 March 2002 laying down detailed rules for the implementation of Council directive 91/492/EEC as regards the maximum permitted level and the methods for analysis of certain marine biotoxins in bivalve mollusks, echinoderms, tunicates and marine gastropods

- Faust, M. A., and Rose, A. G. 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. *Smithsonian contributions from the United States National Herbarium*, 42: 1~144
- Fernandez, M. L., Reguera, B., Gonzalez-Gil, S., and Miguez, A. 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). *Toxicon*, 48(5): 477~490
- Hess, P., Grune, B., Anderson, D. B., Aune, T., Botana, L. M., Caricato, P., van Egmond, H. P., Halder, M., Hall, S., Lawrence, J. F., Moffat, C., Poletti, R., Richmond, J., Rossini, G. P., Seamer, C., and Vilageliu, J. S. 2006. Three Rs Approaches in Marine Biotoxin Testing. The Report and Recommendations of a Joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 54). *Altern. Lab. Anim.* 34(2): 193~224
- James, K. J., Bishop, A. G., Draisci, R., Palleschi, L., Marchiafava, C., Ferretti, E., Satake, M., and Yasumoto, T. 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *Journal of Chromatography A*, 844(1-2): 53~65
- Larsen, K., Petersen, D., Wilkins, A. L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Rundberget, T., Goldstone, D., Arcus, V., Hovgaard, P., Rise, F., Rehmman, N. O., Hess, P. O. A., and Miles, C. O. 2007. Clarification of the C-35 stereochemistries of Dinophysistoxin-1 and Dinophysistoxin-2 and its consequences for binding to protein phosphatase. *Chem. Res. Toxicol.* 20(6): 868~875
- Lee, J. S. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1: 147~151
- Li, Z. X. 2008. Metabolism of pectenotoxins in brown crabs *Cancer pagurus* fed toxic blue mussels *Mytilus edulis*. *J. venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 14(3): 555
- Luisa, F. M., Reguera, B., Gonzalez-Gil, S., and Miguez, A. 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). *Toxicon*, 48(5): 477~490
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., and Suzuki, T. 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon*, 40(9): 1 321~1 330
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., and Selwood, A. 2004. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): A new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon*, 44(8): 901~918
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., and Selwood, A. 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae*, 4(1): 75~85
- Madigan, T. L., Lee, K. G., Padula, D. J., McNabb, P., and Pointon, A. M. 2006. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish. *Harmful Algae*, 5(2): 119~123
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Hawkes, A. D., Jensen, D. J., Cooney, J. M., Larsen, K., Petersen, D., Rise, F., Beuzenberg, V., and MacKenzie, A. L. 2006. Isolation and identification of a cis-C8-diol-ester of okadaic acid from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon*, 48(2): 195~203
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Munday, R., Dines, M. H., Hawkes, A. D., Briggs, L. R., Sandvik, M., Jensen, D. J., Cooney, J. M., and Holland, P. T. 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon*, 43(1): 1~9
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Hawkes, A. D., Jensen, D. J., Selwood, A. I., Beuzenberg, V., Lincoln M., A., Cooney, J. M., and Holland, P. T. 2006. Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon*, 48(2): 152~159
- Miles, C. O. 2007. Pectenotoxins. In *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Botana, L. M. (Ed.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford: 159~186
- Nagashima, Y., Noguchi, T., Kawabata, T., and Hashimoto, K. 1991. Dose-death time curve of paralytic shellfish poisons in ddY strain mice. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 699~704
- Park, D. L., Adams, W. N., Graham, S. L., and Jackson, R. C. 1986. Variability in the mouse bioassay for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of the AOAC International*, 69:547~550
- Quilliam, M. A., Gago-Martinez, A., and Rodriguez-Vazquez, J. A. 1998. Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxycarboxylic acids; Application to diarrhetic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography A*, 807(2): 229~239
- Quilliam, M. A., Hess, P., and Dell'Aversano, C. 2001. Recent development in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. In: De Koe, W. J., Samson, R. A., van Egmond, H. P., Gilbert, J., Sabino, M. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium Proceedings of Xth International IUPAC Symposium on mycotoxins and phycotoxins*, Brasil, 383~391
- Quilliam, M. A. 2003. The role of chromatography in the hunt for red tide toxins. *Journal of Chromatography A*, 1 000(1-2): 527~548
- Sasaki, K., Wright, J. L., and Yasumoto, T. 1998. Identification and characterization of Pectenotoxin (PTX) 4 and PTX7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported pectenotoxins. *J. Org. Chem.* 63 (8): 2 475~2 480
- Stabell, O. B., Steffenak, I., and Aune, T. 1992. An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of diarrhetic shellfish toxins. *Food Chem. Toxicol.* 30: 139~144

- Stobo, L. A., Lacaze, J. P., Scott, A. C., Gallacher, S., Smith, E. A., and Quilliam, M. A. 2005. Liquid chromatography with mass spectrometry—detection of lipophilic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 88(5): 1 371~1 382
- Suzuki, T., MacKenzie, L., Stirling, D., and Adamson, J. 2001. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicon*, 39(4): 507~514
- Suzuki, T., Beuzenberg, V., MacKenzie, L., and Quilliam, M. A. 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Journal of Chromatography A*, 992(1-2): 141~150
- Suzuki, T., Walter, J. A., LeBlanc, P., MacKinnon, S., Miles, C. O., Wilkins, A. L., Munday, R., Beuzenberg, V., MacKenzie, A. L., Jensen, D. J., Cooney, J. M., and Quilliam, M. A. 2006. Identification of pectenotoxin-11 as 34S-hydroxypectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2): 310~318
- Toyofuku, H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin*, 52 (12): 1 735~1 745
- Vale, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: A phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon*, 44(2): 123~134
- Vale, P. 2006. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins, part II: Offshore bivalve species. *Toxicon*, 47(2): 163~173
- Wilkins, A. L., Rehmann, N., Torgersen, T., Rundberget, T., Keogh, M., Petersen, D., Hess, P., Rise, F., and Miles, C. O. 2006. Identification of fatty acid esters of pectenotoxin-2 seco acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15): 5 672~5 678
- Yasumoto, T., Oshima, Y., and Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 44: 1 249~1 255
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. K., and Clardy, J. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41(6): 1 019~1 025
- Yasumoto, T. 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In: ACS Symposium Series, 262:207~214
- Yasumoto, T., Nagasu, M., Lee, J. S., and Torgoe, K. 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. Amsterdam Elsevier. 375~382