

贝类毒素固相吸附示踪监测技术研究进展*

李兆新^{1,2①} 张婷婷^{1,3} 郭萌萌^{1,2} 孙晓杰^{1,2} 宋才湖^{1,3}
周德山⁴ 宋新成⁴

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 4. 连云港市水产品质量检测中心 连云港 222001)

摘要 固相吸附毒素示踪监测技术(Solid Phase Adsorption Toxin Tracking, SPATT)是一项新的贝类毒素监测技术。该技术模拟滤食性贝类摄食过程,利用内含吸附剂的采样器富集水体中的贝类毒素,结合高效液相色谱-质谱检测技术或酶联免疫检测技术,可以对产毒藻类的暴发以及贝类毒素污染进行示踪研究。SPATT 监测技术与贝类监测法、浮游藻类监测法相比,具有取样操作简单、检测成本低等优点,已成为贝类毒素污染监测技术研究的热点。本综述针对 SPATT 技术的研究进展及应用进行阐述,对技术适用监测的毒素种类、吸附材料的优劣等进行分析。

关键词 固相吸附毒素示踪监测技术; 贝类毒素; 吸附剂

中图分类号 X55 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)05-0162-05

海洋浮游藻类是牡蛎、贻贝、扇贝和蛤等双壳滤食性贝类的主要食物,因此,大多数情况下,浮游藻类的增殖有益于贝类生长。但是,在 3000 多种微藻中,大约有 80 多种微藻会产生毒素,贝类通过摄食藻类富集这类毒素,并通过食物链传递给人类,严重影响人体健康(Turrell *et al*, 2009)。这类海洋生物毒素称为“藻类毒素”,通常又称为“贝类毒素”或“贝毒”(程永强等, 2012; 程树军等, 2011)。在国内发生多起贝类中毒事件,贝类毒素已成为影响消费者健康的重要问题。在国际贝类贸易中,不同国家和地区对贝类产品中各种毒素的含量均有严格的限量标准(MacKenzie *et al*, 2004; 刘永健等, 2008)。贝毒污染的早期预报,对于保护消费者食用安全和贝类产品的进出口贸易意义重大。世界上很多国家,特别是贝类养殖大国,都建立了贝类毒素监测计划(MacKenzie *et al*, 2004)。国际上对贝类毒素的监控方法有两种,一是直接贝类监测法(Shellfish Monitoring),该法从海水中采集贝类样品进行毒素定性、定量分析,确定贝类的食用安全性,但是,无法对贝毒污染进行早期预报。

直接在海上采集贝类样品,工作强度较大,采集成本较高。由于不同贝类对毒素的吸收能力存在种间差异、贝类样品基质复杂、样品组织提取物中干扰成分较多等因素,在进行高效液相色谱-质谱(HPLC-MS/MS)或酶联免疫吸附法(ELISA)等高灵敏度方法检测前必须进行净化处理(MacKenzie *et al*, 2004)。二是浮游藻类监测法(Phytoplankton Monitoring),通过观察海水中有毒藻类繁殖状况,间接推断贝类受毒素污染的风险,进而对贝类受毒素污染进行有效的预测。该法节约了贝类采样和毒素分析成本,然而需要采用专用采集器采集海水中有毒藻类,且需要专业人员进行鉴别(Rodríguez *et al*, 2011; MacKenzie, 2010; MacKenzie *et al*, 2004)。近年来,利用固相吸附毒素示踪(Solid Phase Adsorption Toxin Tracking, SPATT)技术对贝类毒素污染监测得到较快发展。该技术采用内置吸附剂的采样器,模拟贝类滤食有毒藻而富集毒素的过程,吸附剂选择性地富集有毒藻释放到海水中的毒素,结合 HPLC-MS/MS 或酶联免疫吸附法等高灵敏度的检测方法(母清林等,

* 农业部引进国际先进农业科学技术计划项目(NO.948-2013-S8)资助。

① 通讯作者: 李兆新, 研究员, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-07-03, 收修改稿日期: 2015-07-27

2011), 对海水中毒素的种类及含量进行连续监测, 从而实现对贝类受毒素污染的预报(MacKenzie *et al.*, 2004)。SPATT 技术可以监测多种海洋生物毒素, 并可用于部分淡水水体中藻类毒素的监测。该技术与直接贝类监测法、浮游藻类监测法相比具有较多优势, 已成为贝毒预报研究的热点。

1 固相吸附毒素示踪监测技术

通过对藻类产毒过程和贝类摄食过程的分析研究, MacKenzie 等于 2004 年首先提出固相吸附毒素示踪监测技术(SPATT)。产毒藻类暴发期间, 会向水体中释放大量极性、非极性的生物毒素, 采用内含吸附剂的采样装置, 吸附水体中的藻类毒素, 结合后续的提取、检测步骤, 利用 HPLC-MS/MS 可以对多种毒素进行快速、准确的定性及定量分析。SPATT 技术与半透膜被动采样技术(SPMD)、极性有机化合物一体化采样器(POICS)原理相似(MacKenzie *et al.*, 2004; MacKenzie, 2010; 吕利雪等, 2011; 娄嵩等, 2012; Vermeirssen *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2009)。与现行的贝类监测法、浮游藻类监测法相比, SPATT 技术更具优势, 采样器通常设计成小袋或盘片状, 内含 3–5 g 吸附剂, 因而采样器放置、储藏简便, 运输经济, 可用于贝类采样比较困难、危险的地方, 以及贝类资源不集中的水域。采样器置于水体中, 即可在放置区域模拟贝类富集毒素, 实现连续采样, 所采集的样本在时间、空间上更具有可靠性和代表性。吸附剂直接吸附水体中的目标毒素, 不含生物基质, 干扰杂质较少, 更适合于高灵敏度的 HPLC-MS/MS 分析(Turrell *et al.*, 2007; MacKenzie, 2010; MacKenzie *et al.*, 2004; 程树军等, 2011)。

2 固相吸附毒素示踪监测的毒素种类

SPATT 技术提出以来, 除神经性贝毒(Neurologic Shellfish Poisoning, NSP)短裸甲藻毒素(bevetoxins)外, 对各种亲脂性、亲水性贝毒以及西加鱼毒素、淡水藻毒素的吸附实验相继展开。

2.1 腹泻性贝毒

腹泻性贝毒(Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)是 SPATT 技术最早应用研究的贝类毒素。腹泻性贝类毒素的产毒藻为鳍藻(Fux *et al.*, 2009; 刘永健等, 2008), 主要包括大田软海绵酸(Okadaic Acid, OA)、鳍藻毒素(Dinophysistoxins, DTXs)、蛤毒素(Pectenotoxins, PTXs)、虾夷扇贝毒素(Yessotoxins, YTXs)和原多甲藻

酸(Azaspiric acids, AZAs)毒素等亲脂性毒素(Lipophilic Shellfish Toxins, LSTs)。

2.2 麻痹性贝毒

麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)属四氢嘌呤类物质, 碱性, 易溶于水, 微溶于甲醇、乙醇, 主要包括石房蛤毒素(Saxitoxins, STXs)、新石房蛤毒素(Neosaxitoxins, neoSTXs)、膝沟藻毒素 1–4 (GTX1-4), 由亚历山大藻分泌产生。PSP 亲水性相对较高, 并且在水体中的含量通常很少, 因此, 用 SPATT 技术采样比亲脂性毒素困难。

2.3 记忆缺失性贝毒

记忆缺失性贝毒(Amnestic Shellfish Poisoning, ASP)的主要成分是由硅藻产生的软骨藻酸(Domoic Acid, DA), 属氨基酸类化合物, 具有典型的酸性氨基酸特征, 具有亲水性, 易溶于水(刘永健等, 2008; Takahashi *et al.*, 2007)。

2.4 西加鱼毒素

西加鱼毒素(Ciguatoxins, CTXs)主要由鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* 产生, 是 13–14 个醚环构成的大分子聚醚类神经毒素, 具有亲脂性。Caillaud 等(2011)应用 SPATT 技术对西加鱼毒素进行吸附实验, 研究表明, SPATT 的吸附装置可以吸附可溶性的西加鱼毒素 CTX1 和刺尾鱼毒素(maitotoxin, MTX)。在西加鱼毒素存在的海区, SPATT 技术可用于监测 CTXs 的发生和分布状况。

2.5 淡水藻类毒素

淡水中的蓝细菌(*Cyanobacteria*)会分泌蓝藻毒素(Cyanotoxins), 这类毒素主要包括水体微囊藻毒素(Microcystins, MCs)、鱼腥藻毒素(Anatoxins, ATXs)。蓝藻毒素的污染日益严重, 破坏水质, 尤其是对饮用水源的污染, 影响人类和其他生物的健康(Kudela *et al.*, 2011; MacKenzie, 2010; Wood *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013)。MCs 为七环肽, MC-LR、MC-RR、MC-YR 是其中毒性较大的 3 种异构体, 易溶于水。鱼腥藻毒素 a (anatoxin-a)和鱼腥藻毒素同系物 a (homoantx-a)、鱼腥藻毒素同系物 a(s) [anatoxin-a(s)]等属于生物碱, 是水溶性较强的蓝藻毒素。

2.6 其他毒素

SPATT 技术也适用于环亚胺(Spirolids, SPXs)、螺旋形亚胺(Gymnodimine, GD 或 GYM) 等亲脂性毒

素的监测(Fux *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2007)。

3 固相吸附毒素示踪监测吸附材料的选择

SPATT 技术中, 固相吸附剂的性质尤为重要, 需要对各种类型的树脂进行选择、改良及实验, 为化学性质各异的毒素寻找适当的吸附剂(MacKenzie, 2010)。SPATT 技术研究初期, 主要是利用非极性的芳香族树脂吸附 OA、DTX、PTX、YTX、AZA 等亲脂性贝毒。这类树脂以苯乙烯-二乙烯苯为骨架, 主要型号有 HP-20、SP-70、SP700、SP850、SP825L、XAD4、L-493。实验室及野外实验证明, HP20 和 SP700 的吸附能力最强(Rodríguez *et al.*, 2011; Fux *et al.*, 2009; Turrell *et al.*, 2007; MacKenzie, 2010、2004; Li *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2007)。

Piletska 等(2008)应用计算机设计出 2 种聚合物树脂(CDP), 分别以 2-三氟甲基丙烯酸(2-trifluoromethyl acrylic acid, TFMAA)和甲基丙烯酸磷酸乙二醇酯(Ethylene glycol methacrylate phosphate, EGMP)为功能单体, 极性高、特异性好。如以 EGMP 为骨架的 CDP 树脂, 其吸附作用是利用自身的磷酸基团与 PSP 磺酸基团之间的强亲合力进行吸附。用树脂 CDP 和 SP700 对极性较强的亲水性麻痹性贝毒 PSP 和软骨藻酸 DA 进行对比吸附实验, 结果显示, CDP 和 SP700 均可吸附 STX、neoSTX 等极性贝毒, 并且很容易解吸, CDP 的吸附能力强于 SP700 (Piletska *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2011)。XAD761 为大孔酚醛系极性树脂, 易于结合亲水性有机物, 实验室实验显示, XAD761 型树脂对软骨藻酸吸附效果较好(MacKenzie, 2010)。吸附树脂 HP-20 在野外实验中, 有效地提前 6 周预测了软骨藻酸产毒藻的爆发(MacKenzie, 2010)。而 SP700、SP207 和 SP207SS 类型树脂在对软骨藻酸吸附的野外实验中, 其吸附性和解吸性各异。

Oasis HLB 属亲水亲油两性吸附剂。Kohoutek 等(2008)实验室及野外实验证明, Oasis HLB 对微囊藻毒素 MC-RR 和 MC-LR 吸附性较好, 可用于连续性监测淡水中的微囊藻毒素。Kudela 等(2011)研究表明, 非极性树脂 HP-20 对微囊藻毒素 MC-LR、-YR、-LA、-RR 等各种异构体同样具有良好的吸附能力。

Wood 等(2011)在实验室比较了 15 种吸附材料对亲水性鱼腥藻毒素 ATXs 的吸附能力。吸附剂包括颗粒状活性炭(GAC)、粉末状活性炭(PAC G-60)、石墨、Silica-COOH、Strata-X (Polymer-COOH、Polymer-SO₃H)、HP-20、Oasis MCX、Amberlite IRP-64 等, 其中粉末状活性炭 PAC G-60、Strata-X 在野外实验中吸

附效果很好。选取其中吸附能力较强的粉末状活性炭(PAC) G-60 和 strata-X(亲水、亲油两性树脂)进行野外实验, 结果显示, 这 2 种吸附剂均能对环境中的 ATX、HTX 进行有效吸附。

4 固相吸附毒素示踪监测技术应用及相关标准规范

贝类毒素固相吸附毒素示踪监测技术建立以来, 引起了广泛关注和深入研究。在新西兰、挪威、美国、澳大利亚和中国等国的贝类毒素监测野外实验显示, 直接贝类监测法、浮游藻类监测法和 SPATT 3 种监测方法所得的结果具有相关性, SPATT 法显示出对产毒藻类的暴发以及贝毒污染进行早期预测的能力(Rundberget *et al.*, 2009; Kohoutek *et al.*, 2008; Turrell *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2011; Fux *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2007)。但在爱尔兰西海岸进行的野外实验中, 由于利用 SPATT 技术所检测到的海水中腹泻性毒素水平与同一区域贝类中腹泻性毒素水平同步上升, SPATT 技术没有表现出对贝毒污染提前数天进行预测的能力(Fux *et al.*, 2011)。

2006 年, Li 等(2011)采用 SPATT 技术对中国黄海青岛近海海域 7-8 月海水中的脂溶性贝毒蛤毒素 PTX2 进行了短期研究, 结果显示, 该海域水体中存在腹泻性贝毒 PTX2 及其系列衍生物 PTX-2 SA、7-epi-PTX-2 SA, 每克树脂中 PTX-2 含量达 107 ng。2009 年, 李兆新等(2011)利用 SPATT 技术初步研究了青岛胶州湾海域夏季水体中蛤毒素 PTX-2 的变化规律, 结果显示, 这一海域海水中存在蛤毒素 PTX-2、PTX-2SA 和 7-epi-PTX-2SA, 不存在蛤毒素 PTX-11、PTX-12a 和 PTX-12b; 海水中蛤毒素 PTX-2、PTX-2SA 与 7-epi-PTX-2SA 之和的最大峰值出现在 8 月 1 日, 然后, 海水蛤毒素浓度逐渐降低。目前, SPATT 技术仍处于实验阶段, 缺少相关应用标准规范, 尚没有正式用于贝类毒素监测计划。

5 结论

实验室研究和野外实验表明, SPATT 技术可用于海洋和淡水水体中藻类毒素的连续监测, 并能提前数天对产毒藻类的暴发、贝毒污染进行预测。吸附材料的研究是 SPATT 技术的关键, 根据目标毒素的结构, 在树脂上引入功能基团进行修饰改良, 可提高树脂的吸附能力和特异性。目前, 随着各类极性、非极性吸附材料的应用, SPATT 技术可以作为传统监测方法的补充, 除短裸甲藻毒素(Brevetoxin)尚未进行吸

附实验外, 适用于已知的各种贝类毒素的监测。SPATT 技术正式纳入贝毒监测计划, 还需进行标准吸附剂的选取、采样器的规范化等工作, 以及更多野外验证实验。

参 考 文 献

- 母清林, 方杰, 万汉兴, 等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素. 分析化学, 2011, 39(1): 111-114
- 吕利雪, 原思国. 非苯乙烯骨架极性吸附树脂的合成及结构表征. 离子交换与吸附, 2011, 27(1): 18-25
- 刘永健, 刘娜, 刘仁沿, 等. 赤潮毒素研究进展. 海洋环境科学, 2008, 27(S2): 151-159
- 李兆新, 杨守国, 郭萌萌. 腹泻性贝毒的特征与检测技术. 齐鲁渔业, 2011, 28(1): 10-12
- 李兆新, 郭萌萌, 杨守国, 等. 黄海胶州湾海水中蛤毒素特征及变化规律. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 69-75
- 娄嵩, 刘永峰, 白清清, 等. 大孔吸附树脂的吸附机理. 化学进展, 2012, 24(8): 1427-1436
- 程永强, 杨立, 郭翠莲. 海洋赤潮毒素高灵敏度检测技术综述. 环境科学与技术, 2012, 35(12): 130-135
- 程树军, 黄韧, 刘慧智. 贝类毒素监测的动物试验优化及替代方法. 中国比较医学杂志, 2011, 21(2): 51-55
- Caillaud A, de la Iglesia P, Barber E, *et al.* Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. Harmful Algae, 2011, 10(5): 433-446
- Fux E, Bire R, Hess P. Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the west coast of Ireland. Harmful Algae, 2009, 8(3): 523-537
- 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. Harmful Algae, 2008, 7(5): 574-583
- Kohoutek J, Babica P, Bláha L, *et al.* A novel approach for monitoring of cyanobacterial toxins: development and evaluation of the passive sampler for microcystins. Anal Bioanal Chem, 2008, 390(4): 1167-1172
- Kudela RM. Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater. Harmful Algae, 2011, 11: 117-125
- Li AF, Ma FF, Song XL, *et al.* Dynamic adsorption of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in passive sampling relates to pore size distribution of aromatic adsorbent. J Chromatogr A, 2011, 1218(11): 1437-1442
- Li ZX, Guo MM, Yang SG, *et al.* Investigation of pectenotoxin profiles in the Yellow sea (China) using a passive sampling technique. Mar Drugs, 2010, 8(4): 1263-1272
- MacKenzie LA. In situ passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool. Curr Opin Biotechnol, 2010, 21(3): 326-331
- 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. Toxicon, 2004, 44(8): 901-918
- Piletska EV, Villoslada FN, Chianella I, *et al.* Extraction of domoic acid from seawater and urine using a resin based on 2-(trifluoromethyl) acrylic acid. Anal Chim Acta, 2008, 610(1): 35-43
- Rodríguez P, Alfonso A, Turrell E, *et al.* Study of solid phase adsorption of paralytic shellfish poisoning toxins (PSP) onto different resins. Harmful Algae, 2011, 10(5): 447-455
- Rundberget T, Gustad E, Samdal IA, *et al.* A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers. Toxicon, 2009, 53(5): 543-550
- Shaw M, Eaglesham G, Mueller JF. Uptake and release of polar compounds in SDB-RPS Empore™ disks; implications for their use as passive samplers. Chemosphere, 2009, 75(1): 1-7
- Takahashi E, Yu QM, Eaglesham G, *et al.* Occurrence and seasonal variations of algal toxins in water, phytoplankton and shellfish from North Stradbroke Island, Queensland, Australia. Mar Environ Res, 2007, 64(4): 429-442
- Turrell E, Lacaze JP, Hermann G, *et al.* An overview of the EC 6th framework project spies-detox. Marine Environment and Health Series, 2009(37): 49-58
- Turrell E, Stobo L, Lacaze JP, *et al.* Development of an early warning system for harmful algal blooms using solid-phase adsorption toxin tracking (SPATT). Oceans, 2007, 24(8): 1-6
- Vermeirssen EL, Asmin J, Escher BI, *et al.* The role of hydrodynamics, matrix and sampling duration in passive sampling of polar compounds with Empore™ SDB-RPS disks. J Environ Monit, 2008, 10(1): 119-128
- Wood SA, Holland PT, MacKenzie L. Development of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) for monitoring anatoxin-a and homoanatoxin-a in river water. Chemosphere, 2011, 82(6): 888-894
- Zhao H, Qiu JB, Fan H, *et al.* Mechanism and application of solid phase adsorption toxin tracking for monitoring microcystins. J Chromatogr A, 2013, 1300(14): 159-164

Review of the Development and Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking for Shellfish Toxin Monitoring

LI Zhaoxin^{1,2①}, ZHANG Tingting^{1,3}, GUO Mengmeng^{1,2}, SUN Xiaojie^{1,2}, SONG Caihu^{1,3}
ZHOU Deshan⁴, SONG Xincheng⁴

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture,
Qingdao 266071; 3. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University,
Shanghai 201306; 4. Lianyungang Center for Quality Testing of Aquatic Products, Lianyungang 222001)

Abstract Toxins produced by harmful algae has been a global food safety issue in aquaculture industry. Unlike conventional phytoplankton and shellfish monitoring techniques, solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) simulates the contamination of filter feeding bivalves and employed passive sampling of adsorption substrates. Combined with appropriate assays such as HPLC-MS/MS and ELISA that purify and analyze algal toxins, SPATT gives early warning of harmful algal blooms and the subsequent contamination of shellfish. In this review we discussed the progress and prognosis on studies of SPATT. We elaborated the advantage of SPATT in detecting marine toxins including diarrhetic shellfish poisoning, paralytic shellfish poisoning, amnesic shellfish poisoning, ciguatoxins, cyanotoxins, and homoanatoxins. We also summarized the function of different absorbent resins such as HP-20, SP-70, SP700, SP850, SP825L, XAD4, and L-493. SPATT is an inexpensive and convenient tool for fast detection of algal toxins.

Key words Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT); Shellfish toxin; Adsorbent

① Corresponding author: LI Zhaoxin, E-mail: lizx@ysfri.ac.cn