

文章编号:1000 - 0615(2002)06 - 0528 - 05

舟山渔场及其邻近海域腹泻性贝类毒素的初步研究

袁 骥

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要:在江苏及浙江共 5 个地点采集了 8 种贝类,使用四甲基氢氧化胺和 9 - 氯乙基蒽衍生的高效液相色谱法,检测样品的大田软海绵酸含量。结果表明:样品中的大田软海绵酸含量从 15.75 ~ 218.95ng · g⁻¹,平均含量为 37.10ng · g⁻¹,检出率为 48%。有一个样品的含量超过食用标准(200ng · g⁻¹)。从该结果与其他研究结果可以推断腹泻性贝类毒素在我国分布区域较广,且在某些地区含量较高。

关键词:腹泻性贝类毒素;四甲基氢氧化胺;9 - 氯乙基蒽;高效液相色谱法

中图分类号:S963.21 **文献标识码:**A

The preliminary study of diarrhetic shellfish poison in Zhoushan fishing ground and its adjacent area

YUAN Qi

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China)

Abstract: 8 species of shellfish which were collected from Jiangsu and Zhejiang Provinces in Feb. 1992, were detected for okadaic acid by high performance liquid chromatography with 9-chloromethylanthracene (9-CA) and tetramethylammonium hydroxide (TMAH). The result showed that the range of okadaic acid content is from 15.75 ~ 218.95ng · g⁻¹, and the average of content is 37.10ng · g⁻¹. 48% samples were detected okadaic acid, and the content of one sample was beyond the critical limit (200ng · g⁻¹). It suggests that the diarrhetic shellfish poison is widely distributed in China, and shellfish from some areas contain high toxicity.

Key words: diarrhetic shellfish poison; tetramethylammonium hydroxide; 9-chloromethylanthracene; HPLC

腹泻性贝类毒素(DSP)的中毒症状与普通细菌感染引起的腹泻类似,都具有腹泻、恶心、呕吐、下腹部微疼或严重绞痛、寒颤等体征,一般在食用后 30min 至数小时内发作,其发作时间较后者短,且无有效的治疗药物^[3]。目前已发现的腹泻性贝类毒素可大致分为三类:软海绵酸(okadaic acid, OA)及其衍生物鳍藻毒素(DTX)、大环内酯 - 扇贝毒素(PTX)和碘化毒素(YTX)及其衍生物。其中 OA 和 DTX1 除能引起腹泻外,还具有损伤肠黏膜和促进肿瘤生长的作用^[2]。

高效液相色谱法可以准确地分析腹泻性毒素的各组成成分的含量,对于研究各成分的致毒机理、及其在生物体内的降解过程,检测贝类是否可供食用等具有重要价值。国外开展这方面的研究较多,采用不同的荧光试剂,检测腹泻性贝类毒素的含量;国内主要采用生物法(鼠)或采用香豆素衍生进行检测,

收稿日期:2002-03-05

资助项目:“948”项目资助(973090)

作者简介:袁 骥(1969 -),女,上海市人,助研。主要从事赤湖毒素的分析研究。Tel :021 - 65686991

而可以快速检测腹泻性贝类毒素的四甲基氢氧化胺和9-氯乙基葱衍生的检测法还未见报道。

1 材料和方法

1.1 样品和试剂

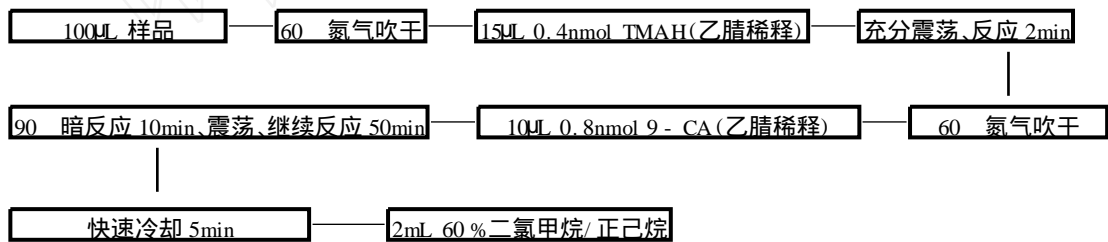
1999年1-2月在吕泗、宁海、定海、石浦和泗礁采集8种贝类27个样品。大田软海绵酸的标准品来自加拿大海洋研究所,鳍藻毒素(DTX1)由美国Rhode Island大学Yuzuru Shimizu教授提供。四甲基氢氧化胺和9-氯乙基葱均购自Sigma公司,所有化学试剂均为色谱级。固相微萃取柱(3mL、500mg)购自Supercol公司。

1.2 方法

1.2.1 样品萃取^[5]

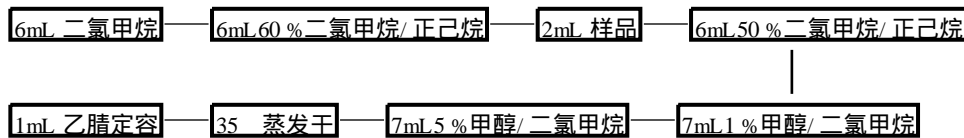
取5g左右的贝肉,与等体积80%甲醇-水溶液均质、离心(4500r·min⁻¹,15min);取上清液经15%二氯甲烷-正己烷脱脂,50%二氯甲烷-正己烷萃取,40℃蒸发干,5mL甲醇重定容。

1.2.2 样品衍生^[1]



1.2.3 样品净化

采用硅胶基固相微萃取柱净化样品。



1.2.4 色谱条件

Waters600 四元梯度泵、Waters 474 荧光检测仪、20μL 手动进样器; Waters symmetry Rp18 柱(4.6mm × 150mm)、柱温 20℃; 激发波长:365nm、发射波长:412nm; 采用梯度洗脱法(表1); 检测限大于3倍基线噪音。

表1 梯度洗脱表

Tab.1 Gradient table

时间(min) time	流速(mL·min ⁻¹) rate	流动相 A:乙腈(%) mobile phase A:CH ₃ CN	流动相 B:水(%) mobile phase B:H ₂ O
0.0	1.2	75	25
3.0	1.2	75	25
9.0	1.2	95	5
11.0	1.2	85	15
13.0	1.2	75	25
15.0	1.2	75	25

2 结果与讨论

2.1 贝类中大田软海绵酸的含量及检出率

检测结果如表 2 所示。从表 2 可以看到,贝类中大田软海绵酸的含量为 15.75 ~ 218.95 ng · g⁻¹ 平均含量为 31.70 ng · g⁻¹。所有缢蛏和四角蛤蜊样品均检测到不同含量的大田软海绵酸,且最高值也出现在缢蛏样品中;而所有青蛤样品均未检出大田软海绵酸。

表 2 检测结果
Tab. 2 The results of analysis

地点 area	种类 species	含量 (ng · g ⁻¹) content	地点 area	种类 species	含量 (ng · g ⁻¹) content
吕泗 Lusi	花蛤	ND	宁海 Ninghai	香螺	26.52
	缢蛏(1月)	ND		毛蚶	ND
	缢蛏(2月)	61.36		青蛤	ND
	文蛤	ND		花蛤	ND
	青蛤	ND		缢蛏	218.95
泗礁 Sijiao	四角蛤蜊	91.2	定海 Dinghai	四角蛤蜊	46.02
	毛蚶	ND		银蚶	ND
	青蛤	ND		毛蚶	ND
	贻贝	30.49		缢蛏	44.63
石浦 Shipu	四角蛤蜊	43.37	石浦 Shipu	花蛤	43.37
	毛蚶	40.13		银蚶	ND
	青蛤	ND		扇贝	ND
	缢蛏	166.28		香螺	15.75
	四角蛤蜊	27.86			

注:ND 为未检出; Note: ND stands for not detected

5 个站点均检测出 OA, 从图 2 可以看到, 宁海样品的平均含量最高, 其次为石浦, 而泗礁样品的平均含量最低。从各地区检出率来看, 石浦贝类中软海绵酸的检出率最高, 达 57%, 吕泗的检出率最低, 但也达 33%。

2.2 OA 和 DTX1 的鉴定

检测生物样品时, 存在较多的干扰杂质, 需要有一简便的方法可以迅速确定是否确实为 OA 或 DTX1 给出的峰, 除可采用加标进样的方法外, 由于采用荧光试剂衍生, 且 9- 氯乙基萘对紫外线敏感, 所以也可以采用紫外线照射的方法进行鉴别。图 3 显示了经过不同时间照射后, OA 和 DTX1 的峰高变化情况。与图 1 相比, 在紫外线照射 5min 后, OA 和 DTX1 的峰高均大幅度下降, 10min 后两峰完全消失。

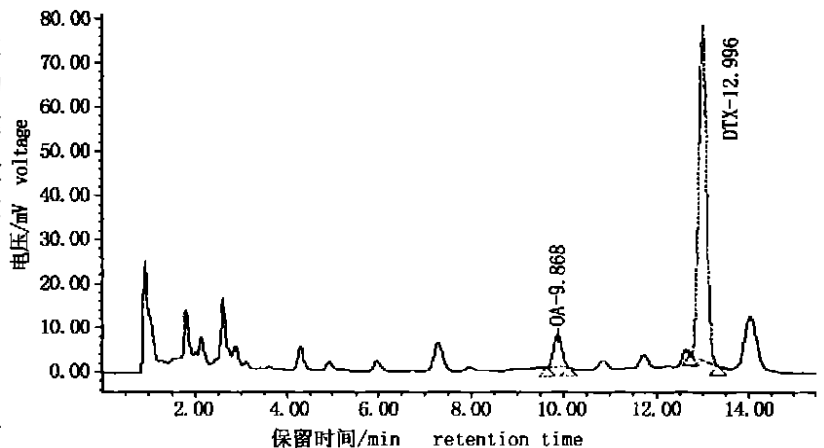


图 1 软海绵和鳍藻毒素的高效液相色谱法图谱
Fig. 1 The Chromatography of OA and GTX1 standard
(OA :1.012ng/ injection; DTX1 :20ng/ injection)

图 3 显示了经过不同时间照射后, OA 和 DTX1 的峰高变化情况。与图 1 相比, 在紫外线照射 5min 后, OA 和 DTX1 的峰高均大幅度下降, 10min 后两峰完全消失。

2.3 与其他方法的比较

腹泻性贝类毒素检测方法主要有:生物学法、化学法和酶联法,这些方法各有其特点。

生物学法的主要缺点在于分析时间较长,30min 至几个小时,不能确定毒素的组成成分,定量困难,假阳性率高(通常是由脂肪酸引起),重现性差;其优点在于比较直观,可直接判断该样品是否可供使用^[5]。

化学法可以检测样品中各组成成分及其含量;香豆素衍生法的检测限较低,有报道为 $25\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[3];9- 蒽基重氮甲烷(ADAM)虽然具有良好的检测限,但 ADAM 价格昂贵,化学性质不稳定,容易分解,且分析时间较长,需要 1h 左右^[5]。采用 TMAH 和 9- CA 衍生法,OA 的检测限可达到 $12 \sim 20\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[1]。且分析时间仅需要 15min,适合大批量样品的检测。

酶联法对 OA 的检测限可达到 $1\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$,且该方法与高效液相色谱法具有良好的重合性。但目前酶联法仅能检测 OA 和 DTX1 两种成分^[5]。

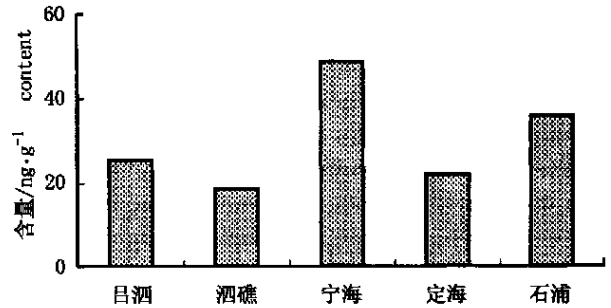


图 2 不同地区样品中软海绵酸平均含量

Fig.2 The average content of OA from different areas

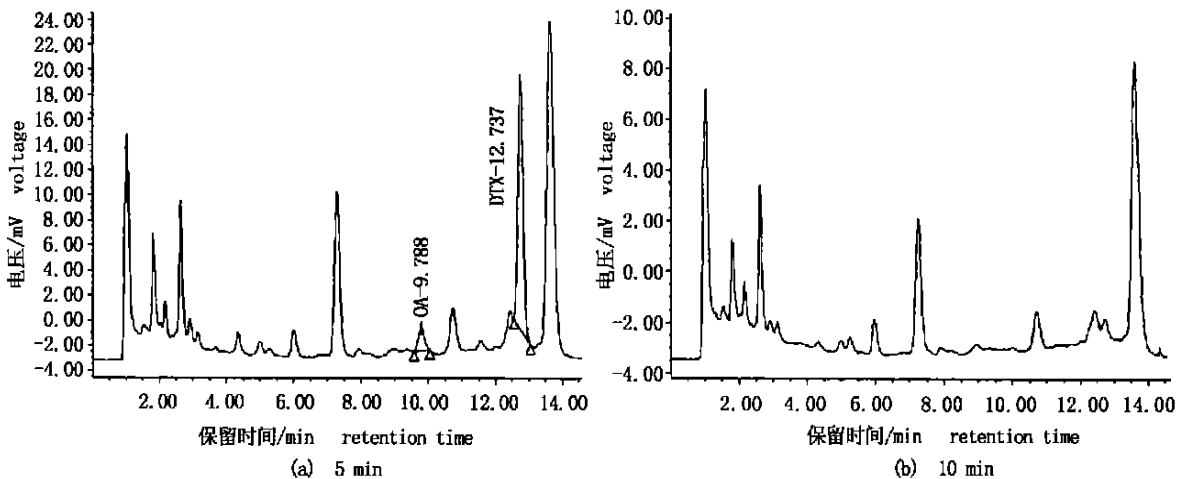


图 3 紫外线照射后 OA 和 DTX1 的变化

Fig.3 OA and DTX1 illuminated by UV light under different minutes

2.4 与其他检测结果的比较

本次 OA 检出率高达 48%;根据我们尚未发表的实验结果,1999 年 6 月山东、浙江 11 个地点 37 个贝类样品(采用酶联法,试剂盒为日本 Ranapharm 公司生产,检测对象为 OA 和 DTX1)的检出率为 35% ($1.01 \sim 174.95\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$);另据报道,1995 年 6 - 8 月大连近岸贻贝所测站位的超标率达 77%^[3]。由此可见,腹泻性贝类毒素在我国,特别是东海和黄海海域有着一定的分布。

3 结论和建议

腹泻性毒素中毒症状与普通细菌性腹泻类似,且一般 3d 后可自行愈合,人们很难判断是中毒还是肠炎;该种毒素虽不会造成中毒死亡事件,但它的几种成分具有促肿瘤作用,因而具有潜在威胁。能产生腹泻性贝类毒素的鳍藻在我国沿海广有分布,且从现有资料检测结果看,我国沿海的贝类中含有一定程度的腹泻性贝类毒素,因此必须在我国沿海,特别是在一些赤潮高发区及贝类重点养殖区,开展腹泻

性贝类毒素定期的常规检测,建立中心检测实验室,以达到保护我国人民健康的目的。

我国有着丰富的贝类资源,种类多、产量高。在我国加入 WTO 以后,我国与其他国家的水产品贸易量不断增长,许多国家,如欧盟就以我国贝类无这方面的检测资料为由,限制我国的贝类出口,因此只有将贝类毒素做为常规检测指标,才能保证我国的贝类出口,占领国际市场;同时在加拿大西海岸、日本等国腹泻性贝类毒素也极为常见,只有建立进口贝类的检测制度,才能防止有毒贝类流入我国市场,危害我国人民健康。

参考文献:

- [1] Zhou H N. Manual on microalgal toxin detection in seafood products [M]. Health of Taiwan Administration, 1999. [周宏农. 水产品藻源毒素检测操作手册[M]. 台湾行政院卫生署,1999.]
- [2] James F L, Sonia R, Cathie M. Liquid chromatographic determination of okadaic acid and dinophysistoxin I in shellfish after derization with 9-chloromethylanthracene [J]. Journal of Chromatography A, 1996,721 :364 - 359.
- [3] Wang J Y, Guan D M, Hang G C. Analytical methods for diarrhetic shellfish poisoning [J]. Marine Environmental Science, 1996,15(4) :63 - 67. [王菊英,关道明,韩庚辰. 腹泻性贝类毒素的分析方法研究[J]. 海洋环境科学,1996,(15)4,63 - 67.]
- [4] Pamela E N, Anne C. S. Comparison of a protein phosphatase inhibition assasy, HPLC assay and enzyme-linked immunosorbent assay with the mouse bioassay for the detection of diarrhetic shellfish poisoning toxins in European shellfish [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 36:39 - 48.
- [5] Lee J S, Yangai Y, Kenma R, et al. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography [J]. Agric Biol Chem (Jap), 1987, 51 :881 - 877.