

铜铸熟若蟹中麻痹性毒素成分的分离和鉴定

林华娟^{1,3}, 长岛裕二², 章超桦^{1,3}, 秦小明^{3*}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;

2. 日本东京海洋大学食品科学技术学部, 日本 东京 1088477;

3. 水产品深加工广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 在分析了日本珊瑚扇蟹铜铸熟若蟹甲壳组织和内脏组织中毒性含量的基础上, 对毒素提取液进行分离纯化, 并通过液相色谱法对其毒素种类进行分析。毒性分析结果显示, 毒蟹个体的含毒量在 37 500 ~ 116 000 MU 范围, 远远超过成人中毒致死量(5 000 MU), 但个体间的毒含量有较大差异; 毒蟹个体的甲壳组织的比毒性(909 ~ 1 610 MU/g) 总体高于内脏组织(111 ~ 576 MU/g)。Bio-Gel P-2 凝胶柱层析纯化结果显示, 粗毒素提取液通过反复纯化可以达到纯化目的, 毒素的比毒性从 4.8 MU/mg 上升到 30 MU/mg 左右; 毒素进一步通过 Bio-Rex 70 离子交换柱层析的分离纯化结果显示, 毒素中约有 9% 为膝沟藻毒素群(GTXs, 麻痹性毒素中的一类)。高效液相色谱分析结果显示, 膝沟藻毒素群的主要成分为 GTX3 和 GTX2, 并含有少量的 dcGTX2 和 dcGTX3。

关键词: 铜铸熟若蟹; 麻痹性毒素(PSP 毒素); 膝沟藻毒素(GTXs); 毒性

中图分类号: S 917

文献标志码: A

贝类麻痹性毒素(paralytic shellfish poisoning toxins, 简称 PSP 毒素)是由毒甲藻或产毒微生物产生, 通过食物链蓄积于贝类或一些鱼类的以石房蛤毒素(saxitoxin)为基本骨架的一类衍生化合物^[1]。根据化学结构特征, PSP 毒素主要有石房蛤类毒素(saxitoxins, 简称 STXs)、膝沟藻类毒素(gonyatoxins, 简称 GTXs)和磺酰甲氨酰基类化合物(ctoxins, 简称 CTXs)等三大类毒素化合物^[2]。目前已发现的 PSP 毒素多达 30 种以上。由于 PSP 毒素分布范围广, 由麻痹性毒素导致的食物中毒发生频率高, 目前已经被列入贝类安全监控的常规检测指标^[2]。

PSP 毒素最初发现于贝类软体动物中, 因此习惯上将该毒素称为麻痹性贝毒, 但是随着研究的不断深入, 发现这种贝毒不仅存在于产毒藻类、贝类, 还广泛存在于一些鱼类、螃蟹等各种生物体内。其中毒性最强的要数扇蟹科(Xanthidae)中的铜铸熟若蟹(*Zosimus aeneus*)、颗粒扁足蟹

(*Platypodia granulose*)、花纹爱洁蟹(*Atergatis floridus*)^[3-6]。KOYAMA 等^[7]在分析调查铜铸熟若蟹个体毒含量差异的研究中, 发现毒含量最高的个体的比毒性高达 16 500 MU/g。以上毒蟹先后在日本、菲律宾、中国台湾和澳大利亚等热带亚热带礁石海域得到证实和研究^[7-12]。广东海洋大学水生博物馆收藏有一只于 1984 年在湛江海域采集到的铜铸熟若蟹标本, 但是到目前为止国内尚未有任何关于该蟹毒素的研究报道。文献检索结果显示, 毒蟹的生栖区域、个体大小和季节对毒蟹的蓄毒量、毒素种类均有较大的影响。分布于日本琉球群岛的铜铸熟若蟹主要含有石房蛤毒素群和少量膝沟藻毒素群^[3, 6, 8-9], 分布于菲律宾的铜铸熟若蟹主要含有河豚毒素^[10], 而分布于台湾的铜铸熟若蟹则主要含有河豚毒素, 另外还含有约 20% 的膝沟藻毒素群^[11]。随着环境的变化, 生栖于各区域的铜铸熟若蟹的毒含量和毒素种类可能还会发生明显变化。在蓄毒机理方面,

收稿日期:2010-11-18 修回日期:2011-07-12

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(贝类, 47)

通讯作者:秦小明, E-mail: qinxm@gdou.edu.cn

虽然有学者尝试从其胃内容物等方面探讨该蟹的蓄毒机理^[13],但是到目前为止,尚未得到能科学解释其蓄毒机理的证据。

本研究以日本铜铸熟若蟹为研究材料,在分析了毒蟹个体甲壳组织和内脏组织毒性含量的基础上,对粗毒素进行分离纯化,并通过液相色谱法分析其毒素种类。由于我国在麻痹性毒素方面的研究起步比较晚,对于贝类以外的海洋生物中麻痹性毒素的研究更是少见报道,本研究同时为我国开展同类生物中麻痹性毒素的研究提供了科学的研究方法和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

铜铸熟若蟹 2009 年 6 月采集于日本石恒岛川平湾,样品采集后立即置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻箱送至实验室,并于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存直至用于实验。STX、neoSTX 以及 GTX1-4 等毒素标准品由东京海洋大学生体物质化学研究室提供。

1.2 实验方法

贝类麻痹性毒素的提取 将解冻后的毒蟹个体分为内脏组织和甲壳组织两部分,并分别提取其中毒素。对于内脏组织,加入等量的 0.1 mol/L HCl 后直接用超声波破碎仪(UP 200s, KUBOTA)进行匀浆破碎,然后置于沸腾水浴锅中加热 5 min 。冷却后离心分离($8\ 000\times\text{g}$, 10 min),得到上清液和残渣。对于残渣反复以上操作一次,得到的上清液合并后减压浓缩即得到内脏毒素提取液。对于甲壳组织,采用研钵将组织充分破碎后加入等量的 0.1 mol/L HCl ,一边不停地搅拌悬浊液一边用盐酸调整溶液,使溶液 pH 值保持在 $2\sim 3$ 左右。待溶液 pH 值稳定后,置于沸腾水浴锅中加热 5 min ,冷却、离心分离,取其上清液即为甲壳毒素提取液。

贝类麻痹性毒素的分离纯化 毒素的分离纯化方法基本同笔者已发表的方法^[14]。即采用超滤膜(切除分子量 $5\ 000\text{ u}$, Amico USA)对毒素提取液进行超滤,去除高分子杂质,然后先后采用 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析和 Bio-Rex 70 阳离子交换柱层析对毒素进行进一步的分离纯化。

小鼠生物法毒性试验 小鼠生物法毒性试验参考 AOAC 麻痹性毒素生物法(2000)进行^[15]。小鼠为体质量 $18\sim 22\text{ g}$ 的 ddy 系小鼠

(三协实验服务会社,东京)。毒性单位,以体质量 20 g 的 ddy 系小鼠在腹腔注射后 15 min 死亡的致死量规定为 1 个鼠单位(MU)。

高效液相色谱法(HPLC)分析 膝沟藻毒素群的高效液相色谱分析条件基本同笔者已发表的方法^[14],石房蛤毒素群的分析条件参考长岛等方法^[16],除了流动相条件有较大差异外,其他条件同膝沟藻毒素的 HPLC 分析。色谱柱为 Ultrasphere ODS ($4.6\text{ mm}\times 25\text{ cm}$) (Beckman coulter Inc. Fullerton, CA, USA),柱后反应温度为 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$,荧光检测的激发波长为 336 nm ,荧光波长为 394 nm ,石房蛤毒素群检测的流动相为含有 2 mmol/L 1-庚基磺酸钠的 30 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.1)与乙腈按照适当比例混合而成的溶液。

2 结果

2.1 铜铸熟若蟹个体及不同组织中的毒性分布

为了分析毒蟹个体中甲壳组织和内脏组织的毒性分布情况,分别将毒蟹个体分为甲壳组织和内脏组织两部分,分别提取其中毒素,并测定各组织的含毒量,结果如表 1 所示。从毒蟹个体总含毒量来看,个体总毒量在 $3.74\times 10^4\sim 1.16\times 10^5\text{ MU}$ 范围之间,个体总毒量均超过 3 万 MU,表明铜铸熟若蟹的毒性异常高。从毒蟹个体的比毒性(每克单位的含毒量, MU/g)看,比毒性最高的个体达 $1\ 568\text{ MU/g}$,而最低个体为 777 MU/g ,表明毒蟹个体间的蓄毒量有较大差异。从毒性在组织中的分布情况看,甲壳组织的比毒性在 $909\sim 1\ 610\text{ MU/g}$,而内脏组织的比毒性除了 2 号样本毒性异常高之外($2\ 070\text{ MU/g}$),其他个体均在 $111\sim 576\text{ MU/g}$ 。虽然不同个体间组织的含毒量有明显差异,但是总体上看甲壳组织的比毒性约为内脏组织的 2 倍以上。

2.2 Bio-Gel P-2 凝胶层析柱纯化铜铸熟若蟹粗毒素

虽然蟹个体的毒含量有较大差异,但是本次的蟹样本均于同一海域同一时间采集,推测其毒素成分组成比例无明显差异,因此本研究随机选择其中一个蟹样本的甲壳组织粗毒素进行进一步分离纯化并作为后续研究材料。粗毒素经过超滤后,采用 Bio-Gel P-2 层析柱对其进行进一步的纯化,洗脱结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,大部

分毒素被水洗脱,只有约 11.2% 的毒素被吸附于树脂上,并被 0.1 mol/L 醋酸洗脱(AFT1 组分)。为了提高毒素的纯化率,回收未被树脂吸附的 WFT1 组分,采用脱盐仪(ASTOM,日本)对其进行脱盐处理后再次进行同样的 Bio-Gel P-2 层析柱纯化。虽然树脂对毒素的吸附效果明显高于前一次,但是只有 18.7% 的毒素被吸附(AFT2 组分,洗脱曲线图未显示)。表 2 列出了 Bio-Gel P-

2 凝胶柱层析的纯化结果。从表 2 可以看出,经过纯化后,AFT1 和 AFT2 组分的比毒性从纯化前的 4.8 MU/mg 分别上升到了 24.2 MU/mg 和 30.2 MU/mg,表明 AFT1 和 AFT2 组分得到了一定程度的纯化。为了分析两次纯化得到的组分中毒素组成是否有差异,本研究对 AFT1 和 AFT2 组分分别进行进一步分离纯化,然后对其进行毒素组成分析。

表 1 毒性在铜铸熟若蟹甲壳组织和内脏组织中的分布

Tab. 1 Distribution of toxicity in exoskeleton and viscera tissue of *Z. aeneus*

样品编号 sample no.	体质量/g body weight	组织 tissue	组织重量/g tissue weight	组织毒性/ MU tissue toxicity	组织比毒性/ (MU/g) specific toxicity for tissue	总毒量/ MU total toxicity	比毒性/ (MU/g) specific toxicity
1	110.38	甲壳 exoskeleton	87.13	9.52×10^4	1 090	1.05×10^5	947
		内脏 viscera	23.7	9.94×10^3	420		
2	84.43	甲壳 exoskeleton	63.96	9.51×10^4	1 490	1.16×10^5	1 568
		内脏 viscera	10	2.07×10^4	2 070		
3	37.79	甲壳 exoskeleton	27.28	4.38×10^4	1 610	4.48×10^4	1 228
		内脏 viscera	9.2	1.02×10^3	111		
4	51.06	甲壳 exoskeleton	38.64	3.51×10^4	909	3.74×10^4	777
		内脏 viscera	9.5	2.29×10^3	241		
5	63.44	甲壳 exoskeleton	44.65	6.93×10^4	1 550	7.74×10^4	1 320
		内脏 viscera	14	8.07×10^3	576		
6	42.6	甲壳 exoskeleton	30.16	3.33×10^4	1 110	3.8×10^4	961
		内脏 viscera	9.4	4.73×10^3	503		

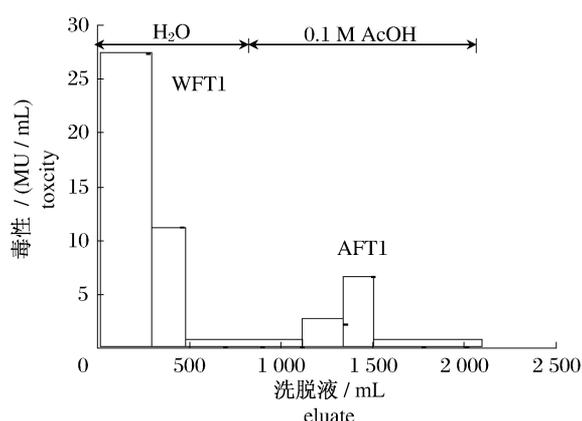


图 1 铜铸熟若蟹粗毒素在 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析(2 cm × 95 cm)上的洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of crude toxin extracted from *Z. aeneus* on a Bio-Gel P-2 column(2 cm × 95 cm)

表 2 铜铸熟若蟹粗毒素在 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析上的分离纯化

Tab. 2 Purification of crude toxin extracted from *Z. aeneus* on the Bio-Gel P-2 column

step	总毒量/ MU total toxicity	干重/ mg dry weight	比毒性/ (MU/mg) specific toxicity	产率/ % yield
unfiltrate (cut off >5 000 u)	51 700	10 740	4.8	100
Bio-Gel P-2				
WFT2 ^a	40 100			77.6
AFT1	5 800	240	24.2	11.2
AFT2 ^b	9 660	320	30.2	18.7

注:a,图 1 中 WFT1 组分进一步上 Bio-Gel P-2 柱并被水洗脱下来的组分;b,WFT1 进一步上 Bio-Gel P-2 柱并被醋酸洗脱下来的组分。

Notes:a,the fraction eluted by distilled water from the same Bio-Gel P-2 column for a further fractionation of WFT1 in Fig. 1; b,the fraction eluted by acetic acid solution from the same Bio-Gel P-2 column for a further fractionation of WFT1.

2.3 Bio-Rex 70 离子交换层析柱进一步分离纯化 AFT1 和 AFT2 毒素组分

根据 PSP 毒素分子所带电荷的特点,采用阳离子交换柱层析可以将磺酰甲氨酰基类毒素群 (CTXs)、膝沟藻类毒素 (GTXs) 以及石房蛤类毒素群 (STXs) 分离。由于 CTXs 毒素为阴离子化合物,在阳离子交换层析柱中不被树脂吸附而直接洗脱出来,GTXs 毒素分子的阳电荷量较 STXs 毒素弱,因此可以通过改变洗脱溶液的离子强度将 GTXs 和 STXs 毒素分离^[2,17]。本研究采用 Bio-Rex 70 离子交换柱层析对 AFT1 和 AFT2 组分分别进行进一步的分离纯化^[14],结果如图 2 所示(AFT2 的洗脱曲线图未显示)。从图 2 可以看出,水洗脱液的小鼠跟踪试验中未检出毒素,说明毒素几乎全部吸附于 Bio-Rex 70 树脂,可以推测 AFT1 组分中几乎不含 CTXs 毒素。0.03 mol/L 醋酸洗脱溶液处得到 AFP1 毒素组分,推测该组分为 GTXs 毒素。0.01 mol/L HCl 处基本上未检出毒性,推测这部分洗脱液几乎无 STXs 毒素。

为了分析毒素纯化回收率,收集 AFP1 组分,经过浓缩、冻结干燥后进行小鼠毒性分析。分析结果显示,虽然 AFP1 毒组分的比毒性从原来的

24.3 MU/mg 上升到了 46.8 MU/mg,但是组分总毒量仅为 468 MU,为上柱前总毒量(5 800 MU)的 8.1%。这个结果表明还有相当一部分毒素未被洗脱出来。以同样方法对 AFT2 组分进行分离纯化得到的结果,与 AFT1 组分的分离纯化结果基本一致(洗脱曲线图未显示)。

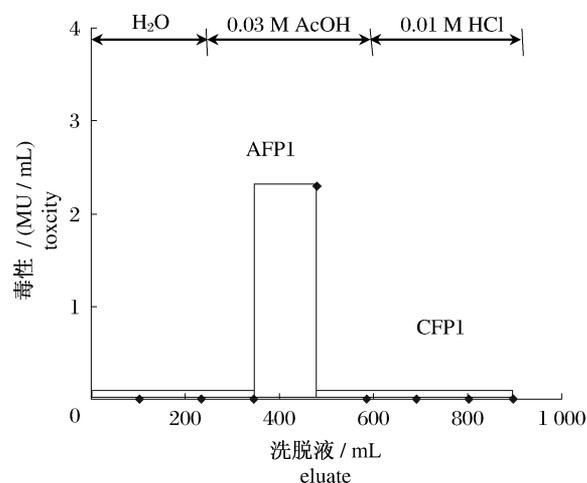


图 2 图 1 中得到的 AFT1 组分在 Bio-Rex 70 柱层析上的洗脱曲线

Fig. 2 Elution profile of AFT1 from Fig. 1 on a Bio-Rex 70 column (0.8 cm × 85 cm)

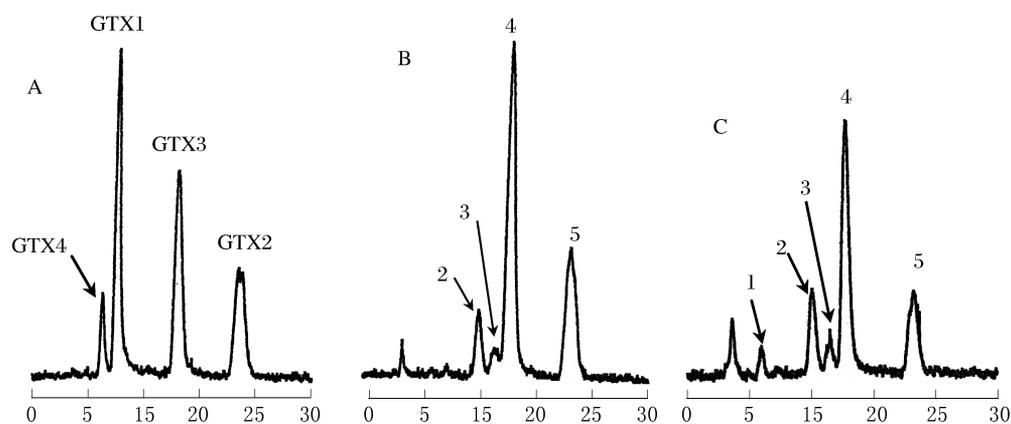


图 3 膝沟藻毒素群的 HPLC 色谱图

A. GTX1-4 标准物质; B. 图 2 中的 AFP1 组分; C. AFP2 组分(AFT2 在 Bio-Rex 70 柱上的醋酸洗脱组分)。

Fig. 3 HPLC analysis of GTXs

A. standards of GTX1-4; B. AFP1 from Fig. 2; C. AFP2. (Acetic acid eluted fraction from AFT2 on the Bio-Rex 70 column).

2.4 HPLC 分析铜铸熟若蟹中贝类麻痹性毒素的成分组成

为了进一步分析 AFP1 和 AFP2 (AFT2 在 Bio-Rex 70 柱上的醋酸洗脱组分)中膝沟藻毒素群成分组成情况,采用液相色谱法对其进行成分分析。从图 3 可以看出,图 3-C (AFP2)中除了很

小的 1 号峰外,图 3-B 和图 3-C 的 HPLC 色谱图没有明显差异。根据标准毒素的保留时间以及相关文献数据^[6],图 3-B 和图 3-C 中的 1-4 号峰分别被定性为 GTX4,脱氨甲酰基膝沟藻毒素 3 (dcGTX3,根据文献推测),脱氨甲酰基膝沟藻毒素 2 (dcGTX2,根据文献推测),GTX3 和 GTX2。

从峰面积比例来看,2、4、5号峰面积的比例约为1/9/4。这个结果表明,AFP1和AFP2中的主要毒素成分为GTX3和GTX2,另外可能还含有少量的dcGTX3和dcGTX2毒素。

3 讨论

3.1 铜铸熟若蟹个体及不同组织中的毒性分布

从表1可以看出,虽然蟹个体间的总毒量有明显差异,但是毒量最低也均超过3.7万MU/只,按照成人中毒致死量5000MU计,一只50g左右的铜铸熟若蟹即可导致7人中毒致死,说明铜铸熟若蟹确实为一种超剧毒的扇蟹,可称其为霸王毒蟹。为了比较个体间含毒量差异,以比毒性进行个体间含毒量的比较。从表1可以看出,毒蟹个体的比毒性最低的为777MU/g,最高则达1568MU/g,毒蟹体质量与比毒性之间未发现明显的规律性,这个结果与文献有些差异。KOYAMA等^[7]在分析不同海域不同个体间含毒量的研究中发现虽然毒蟹个体间的含毒量有明显个体差异性,但是总体上看存在蟹体重与比毒性成反比的趋势性关系,即蟹体越小,其比毒性越大。由于本次采集到的样本数量较少,因此数据尚不能充分说明蟹体重与其比毒性之间的关系。另外,值得一提的是,虽然本次毒性最高样本的比毒性达1568MU/g,但是与文献报道的最毒蟹(16500MU/g)相比只有其毒性的1/10。目前,研究在努力寻找优良的麻痹性毒素的毒源材料,制备麻痹性毒素标准品以满足麻痹性毒素安全监控检测的需求。以上结果表明,相对于亚历山大毒藻^[18-19],铜铸熟若蟹无疑是绝佳的毒源材料。

从毒素在甲壳和内脏组织的分布比例看,甲壳组织的比毒性(909~1610MU/g)总体约为内脏组织(111~576MU/g)的2倍,这个结果与文献报道的铜铸熟若蟹甲壳组织中的毒素高于其他组织的结果基本一致^[6]。牡蛎、扇贝等软体动物中内脏组织的蓄毒能力明显高于肌肉组织,而铜铸熟若蟹的这种蓄毒特征明显与软体动物的蓄毒特征完全相反。蓄毒机理研究结果表明,牡蛎、扇贝等软体动物是通过食物链的方式蓄积毒素,而非其体内产毒^[20]。为了探讨铜铸熟若蟹的蓄毒机理,SAISHO等^[13]分析了铜铸熟若蟹的胃内容物,结果发现铜铸熟若蟹并不以微藻为食,也未发现有任何携毒的生物材料,因此否定了铜铸熟若

蟹是通过食物链蓄积毒素的可能性。到目前为止,尚未有证据能合理解释铜铸熟若蟹的蓄毒机理。

3.2 毒素的分离纯化

从表2粗毒素的分离纯化效果看,第一次Bio-Gel P-2层析柱只有11.2%的毒素被吸附于树脂上,第二次粗毒素经过脱盐仪处理后吸附比例虽然上升至18.7%,但是总体未能达到预期效果。NOGUCHI等^[17]在用基本同样规格的Bio-Gel P-2层析柱分离纯化粗毒素时,95%以上粗毒素被吸附并被洗脱。为了分析毒素吸附效率低下原因,对回收的粗毒素进行了草酸试验,结果发现溶液出现明显浑浊的白色沉淀,表明粗毒素溶液中含有高浓度的钙离子。从这个结果可以推测,脱盐仪并未能彻底脱除钙离子,从而严重影响毒素的吸附效率。以上结果表明,采用盐酸提取铜铸熟若蟹毒素,甲壳组织溶出的钙离子对毒素的后续纯化带来了严重干扰,因此需要考虑其他方式提取毒素。

在Bio-Rex 70阳离子交换柱层析分离纯化过程中,虽然毒素几乎都被树脂吸附,但是醋酸洗脱下来的毒素只有总毒量的8%~9%,约有90%的毒素未能被0.01mol/L HCl洗脱下来。NOGUCHI等^[17]的毒素分离纯化结果表明,在Bio-Rex 70层析柱中,0.03mol/L醋酸浓度基本可以把GTXs毒素群完全洗脱,略大于0.03mol/L醋酸,即可将STX毒素洗脱。考虑到本柱层析是利用洗脱液离子强度大小将GTXs和STXs分离,在相同离子强度条件下尽量用低浓度试剂,以减少试剂对后续浓缩等处理过程中对毒素的影响,本研究选择浓度相对低但是离子强度远高于0.03mol/L醋酸的0.01mol/L HCl进行洗脱,但是小鼠检测法和液相色谱法均未检出毒素,适当提高洗脱盐酸浓度至0.05mol/L HCl,仍未得到满意结果。从这个结果可以推测,铜铸熟若蟹中除了GTXs毒素群外,可能还有相当一部分能与树脂牢固结合的未知毒素,对于这部分毒素有待进一步研究。

铜铸熟若蟹的粗毒素经过Bio-Gel P-2和Bio-Rex 70分离纯化后,得到的膝沟藻毒素群(GTXs)组分约为总毒量的9%。这个结果略高于一些文献报告(约为5%~6%)^[5,8],但是总体不超过10%,表明对于分布于同一海域的铜铸熟

若蟹,膝沟藻毒素群在其毒素比例中没有太大变化。

3.3 铜铸熟若蟹的毒素成分组成

HPLC 分析结果显示,铜铸熟若蟹的 GTXs 中主要有 GTX3 和 GTX2,并含有少量的 dcGTX3 和 dcGTX2 毒素。YASUMOTO 等报道的铜铸熟若蟹中的 GTXs 几乎为 GTX2^[8]。在 GTXs 成分组成上,虽然样品采集点基本相同,本研究结果与文献有较大差异,推测铜铸熟若蟹随着时间变化,体内膝沟藻毒素的成分组成可能会发生变化。对于铜铸熟若蟹的毒性、毒素种类以及分布特征还有待进一步调查研究。

以上研究结果表明,铜铸熟若蟹是一种超毒的扇蟹,其毒素成分组成比较复杂,不同海域、不同时期对其毒含量和毒素组成均有较大影响,为了更深入了解这类蟹的毒生理特征,有必要对其进行更广泛的研究。另一方面,如何将毒蟹变毒为宝,充分开发利用此类毒蟹的毒素用于毒素标准品的制备并延伸其应用价值,是未来研究的重点。据调查,我国南海海域亦有此类蟹分布,但是对于其毒性方面尚无文献报道,因此有必要对分布于我国南海海域的同类生物进行毒素方面的深入调查和研究。

参考文献:

- [1] PEARSON L, MIHALI T, MOFFITT M, *et al.* On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin [J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(5) : 1650 - 1680.
- [2] ETHERIDGE S M. Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives [J]. *Toxicon*, 2010, 56(2) : 108 - 122.
- [3] HASHIMOTO Y, KONISU S, INOUE A, *et al.* Screening of toxic crabs in the Ryukyu and Amami Islands [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1969, 35(1) : 83 - 87.
- [4] KONOSU S, INOUE A, NOGUCHI T, *et al.* A further examination on the toxicity of three species of xanthid crab [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1969, 35(1) : 88 - 92.
- [5] KOYAMA K, NOGUCHI T, UEDA Y, *et al.* Occurrence of neosaxitoxin and other paralytic shellfish poisons in toxic crabs belonging to the family xanthidae [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1981, 47(7) : 965.
- [6] ARAKAWA O, NOGUCHI T, ONOUE Y. Paralytic shellfish toxin profiles of xanthid crabs *Zosimus aeneus* and *Atergatis floridus* collected on reefs of Ishigaki Island [J]. *Fisheries Science*, 1995, 61(4) : 659 - 662.
- [7] KOYAMA K, NOGUCHI T, UZU A, *et al.* Individual, local, and size-dependent variations in toxicity of the xanthid crab *Zosimus aeneus* [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1983, 49(8) : 1273 - 1279.
- [8] YASUMOTO T, OSHIMA Y, KONTA T. Analysis of paralytic shellfish toxins of xanthid crabs in Okinawa [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Science Fisheries*, 1981, 47(7) : 957 - 959.
- [9] DAIGO K, UZU A, ARAKAWA O, *et al.* Isolation and some properties of neosaxitoxin from a xanthid crab *Zosimus aeneus* [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1985, 51(2) : 309 - 313.
- [10] YAMAMOTO T, YASUMURA D, OHIZUMI Y, *et al.* Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50(1) : 163 - 167.
- [11] TSAI Y H, JWNG S S, HWANG D F. Seasonal and regional variations of toxicity in the xanthid crab *Zosimus aeneus* in Taiwan [J]. *Fisheries Science*, 1997, 63(2) : 313 - 314.
- [12] DEEDS J R, LANDSBERG J H, ETHERIDGE S M, *et al.* Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning [J]. *Marine Drugs*, 2008, 6 : 308 - 348.
- [13] SAISHO T, NOGUCHI T, KOYAMA K, *et al.* Examination of stomach contents in xanthid crabs [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1983, 49(6) : 939 - 947.
- [14] 林华娟,秦小明,章超桦,等. 扇贝中麻痹性毒素的提取与分离纯化 [J]. *水产学报*, 2010, 34(3) : 428 - 434.
- [15] AOAC Official Method 959. 08, Paralytic Shellfish Poison Biological Method [S], 2000.
- [16] NAGASHIMA Y, MARUYAMA J, NOGUCHI T, *et al.* Analysis of paralytic poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, 53 : 819 - 823.
- [17] NOGUCHI T, UZU A, KOYAMA K, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin as the major toxin in a xanthid crab *Atergatis floridus* [J]. *Bulletin of the*

- Japanese Society of Science Fisheries, 1983, 49(12): 1887 – 1892.
- [18] WOSESSANG S, OGATA T, KODAMA M, *et al.* Accumulation of paralytic shellfish toxins by green mussel *Perna perna* viridis by feeding on cultured cells of *Alexandrium cohorticula* isolated from the gulf of Thailand [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(1): 127 – 131.
- [19] KIM C H, SAKO Y, ISHIDA Y. Comparison of toxin composition between populations of *Alexandrium* spp. from geographically distant areas [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59(4): 641 – 646.
- [20] HASHIMOTO T, MATSUOKA S, YOSHIMATSU S, *et al.* First paralytic shellfish poisoning infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coasts of the Seto Inland Sea, Japan [J]. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2002, 43(1): 1 – 5.

Isolation and identification of PSP toxin in xanthid crab (*Zosimus aeneus*) collected from coral reef in Japan

LIN Hua-juan^{1,3}, NAGASHIMA Yuji², ZHANG Chao-hua^{1,3}, QIN Xiao-ming^{3*}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 1088477, Japan;

3. Key Laboratory of Aquatic Product Advanced Processing of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Some xanthid crabs are known to be toxic and have a serious threat of food poisoning. In present study, the distribution of toxicities in exoskeletal and visceral tissues in the xanthid crab, *Zosimus aeneus* collected from Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan and its paralytic shellfish poisoning toxins (PSP) profiles were examined. Toxicity assay showed that all of six individuals tissue were strongly toxic although there was significant difference among individuals in toxicity. Total toxicity of the individuals ranged between 37 500 MU and 116 000 MU, exceeding the estimated adult lethal dose of 5 000 MU. Generally, the toxicity of the exoskeletal tissues (909 – 1 610 MU/g) was higher than that of the visceral tissues (111 – 576 MU/g). The purification showed that the crude extract could be partly purified by repeat of chromatography on a Bio-Gel P-2 column, and the specific toxicity of the toxin fractions rose approximately to 30 MU/mg from 4.8 MU/mg. Furthermore, the partial purified toxin fraction was applied to Bio-Rex 70 column chromatography, and the results showed that almost toxin was absorbed onto the resin, and approximately 9% of the toxin eluted by 0.03 mol/L acetic acid. This result indicates the toxin in *Zosimus aeneus* crab contained gonyatoxins (GTXs, a kind of paralytic shellfish poisoning toxins). HPLC analysis revealed that the GTXs fraction consisted of GTX2 and GTX3, along with decarbamoyl GTX2 (dcGTX2) and decarbamoyl GTX3 (dcGTX3) as the minor.

Key words: xanthid crab (*Zosimus aeneus*); paralytic shellfish poisoning toxins (PSP); gonyatoxins (GTXs); toxicity

Corresponding author: QIN Xiao-ming. E-mail: qinxm@gdou.edu.cn