

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00467

## 脂溶性贝类毒素安全评价与检测技术研究进展

谭志军<sup>1,2</sup>, 吴海燕<sup>1,2</sup>, 郭萌萌<sup>1,2</sup>, 杨帆<sup>1,2</sup>, 王联珠<sup>1,2</sup>, 李兆新<sup>1,2</sup>, 翟毓秀<sup>1,2</sup>

1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 国家水产品质量监督检验中心, 山东 青岛 266071

**摘要:** 2004 年, 由联合国粮农组织、世界卫生组织和政府间海洋委员会共同组建的双壳软体生物毒素工作组根据贝类毒素的基本结构将其分为 8 类(组)。其中, 大田软海绵酸类毒素(okadaic acid, OA)、原多甲酸毒素(azaspiracid, AZA)、环亚胺类毒素(cyclic imine, CI)、短裸甲藻毒素(brevetoxin, BTX)、蛤毒素(pectenotoxin, PTX)、虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)均属于脂溶性贝类毒素(lipophilic phycotoxins, LPs), 这 6 大类毒素均为聚醚类物质, 在贝类中富集的时间较长, 目前已成为欧盟调整检测方法、最高残留限量等法律法规的主要目标。LPs 的主要成分在中国均已被发现, 这不仅意味着中国贝类消费存在巨大的潜在风险, 外贸出口还将面临新的技术和贸易壁垒。本文就 LPs 的化学性质、污染分布、毒理学评价、检测方法、限量标准、监控预警技术和政策法规等国际最新研究进展等逐一进行归纳与总结, 并对我国在 LPs 方面的科研举措进行展望, 旨在为我国制定相关政策措施提供科学依据。

**关键词:** 脂溶性贝类毒素; 污染分布; 毒理学评价; 检测方法; 监控预警; 政策法规

中图分类号: S949

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0467-13

海洋生物毒素(贝类毒素)特指主要由海洋有毒微藻或微生物产生、能够在海洋生物尤其是双壳贝类中富集的、对其他生物包括人类产生危害的一大类小分子有毒化学物质。针对这些生物毒素, 研究者初期主要根据所引起的中毒症状将其分为 6 大类: 麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning, PSP)、腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、神经性贝类毒素(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)、记忆缺失性贝类毒素(amnesic shellfish poisoning, ASP)、西加鱼毒素(ciguatera fish poisoning, CFP)、蓝绿藻毒素。随着研究的深入, 新的生物毒素种类不断被发现, 且多种毒素如 OA 常与 AZA 和 PTX 伴生而成, 但具有不同的致毒机理, 原有分类方法已不

能满足管理和科研的需求。

因此, 2004 年, 由联合国粮农组织、世界卫生组织和政府间海洋委员会共同组建的双壳类软体生物毒素工作组将贝类毒素分为 8 大类, 分别为石房蛤毒素组(saxitoxin, STX)、软骨藻酸组(domoic acid, DA)、大田软海绵酸毒素组(okadaic acid, OA)、原多甲酸毒素组(azaspiracid, AZA)、短裸甲藻毒素组(brevetoxin, BTX)、蛤毒素组(pectenotoxin, PTX)、虾夷扇贝毒素组(yessotoxin, YTX)和环亚胺类毒素(cyclic imine, CI)。除此之外, 水螅毒素(palytoxin, PTX)和西加鱼毒素(ciguatoxin, CTX)也正在被考虑是否划归贝类毒素中。

现有 8 大类贝类毒素中, STX 和 DA 毒素组较易溶解于水, 而 OA、AZA、BTX、PTX、YTX、

收稿日期: 2012-03-16; 修订日期: 2012-10-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41106109); 中央级基本科研业务费专项资金资助项目(20603022011004, 20603022012019);

山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划(BS2010HZ031).

作者简介: 谭志军(1978-), 男, 副研究员, 博士, 从事贝类毒素安全检测及评价研究. E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn

通信作者: 翟毓秀, 研究员. E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn

CI 则为聚醚类物质, 具热稳定性, 易溶解于甲醇、乙醚等非极性有机试剂中, 因此被统一称作为脂溶性贝类毒素(lipophilic phycotoxins, LPs)。LPs 的脂溶性特征导致其在贝类等生物体中的消除半衰期长达数十天甚至数月, 在贝类肌肉、内脏团等组织中的分布不具有显著的组织差异性, 且加热、微波等常规加工方式因降低水产品中的水分含量而导致毒素浓度更高, 所以这类毒素对消费者带来的潜在危害更难预防, 已成为发达国家制定贸易和技术壁垒的重要关注点。为此, 本文就 LPs 的性质、分布、毒理学评价、检测方法、限量标准、政策法规等国际最新进展逐一进行评述, 以期为我国开展 LPs 相关安全研究及制定应对措施提供参考。

## 1 脂溶性贝类毒素的化学结构、性质及分布

OA 毒素组是最早被发现的一类 LPs, 1978 年发现于产自日本海域的一种海绵 *Halichonrira okadaii*, 这也是其名字的由来<sup>[1]</sup>。OA 毒素组主要成分包括 OA 及其同系物鳍藻毒素(dinophysistoxin, DTX, 主要为 DTX1 和 DTX2), 基本结构由 38 个 C 骨架组成, 含有 17 个手性中心和 3 个螺环缩酮前体基团<sup>[2]</sup>, 其结构如图 1 所示。产毒藻主要为鳍藻 *Dinophysis* 和原甲藻 *Prorocentrum*, 目前已几乎在全球所有近岸海域均有分布, 且导致多起消费者中毒事件, 成为一个世界性的安全难题。

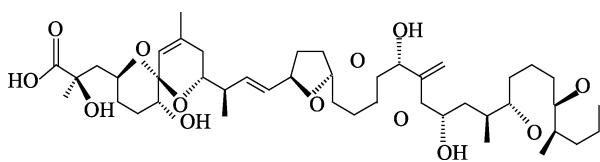


图 1 大田软海绵酸毒素(OA)组基本结构<sup>[2]</sup>

Fig. 1 The basic chemical structure of okadaic acid (OA) group<sup>[2]</sup>

AZA 毒素组于 1995 年首次发现于产自爱尔兰的贻贝(*Mytilus edulis*)中<sup>[3]</sup>, 为一类含氮聚醚类毒素, 包括一个独特的螺旋环[含杂环亚胺(哌啶)]和一个脂肪族羧酸基(图 2), 具热稳定性, 但在强酸或强碱中结构不稳定。目前共发现 32 种同系物,

主要为 AZA1-3, 也是欧盟现有限量标准中的目标成分。AZA 毒素组主要是产毒藻为原多甲藻 *Azadinium spp.*<sup>[4]</sup>, 其分布范围也逐步扩大, 已在除欧洲外的摩洛哥、加拿大、日本、智利以及中国等沿海地区贝类中发现<sup>[5]</sup>。

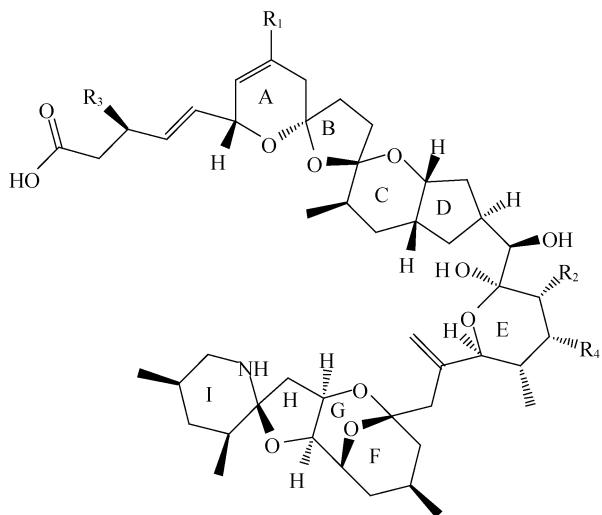


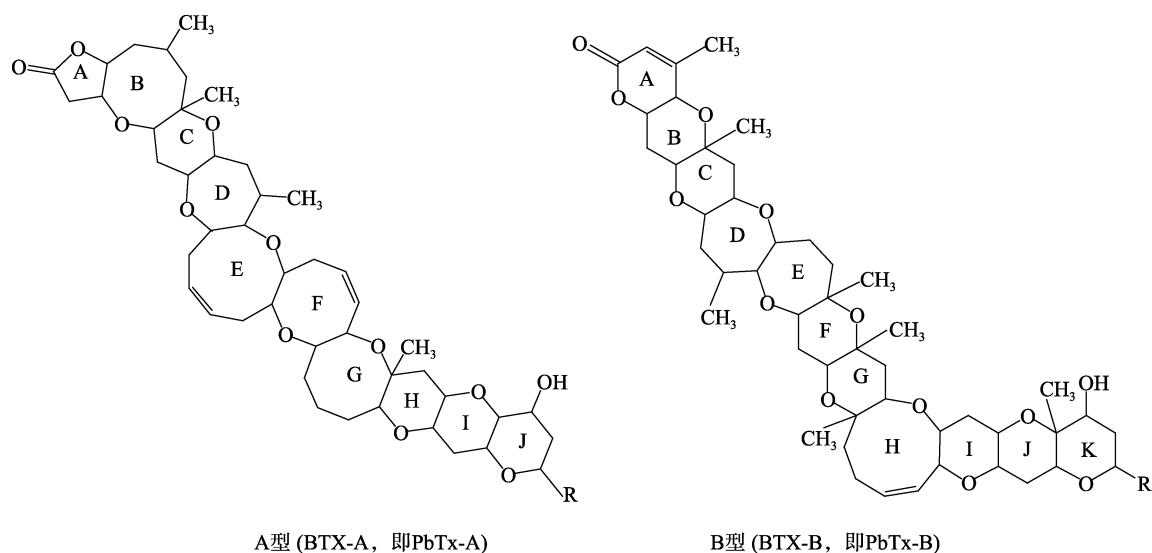
图 2 原多甲藻酸毒素(AZA)组基本结构<sup>[3]</sup>

Fig. 2 The basic chemical structure of azaspiracid (AZA) group<sup>[3]</sup>

BTX 毒素组为环状聚醚类物质(图 3), 1947 年首先在墨西哥湾中的裸甲藻(*Karenia brevis*)发现的<sup>[6-7]</sup>, 后来又发现针胞藻属的海洋卡盾藻(*Chattonella marina*)<sup>[8]</sup>、*Fibrocapsa japonica*<sup>[9]</sup>和赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*)也能产生这类毒素<sup>[10]</sup>。BTX 毒素基本结构分为 A 型(BTX-A, 即 PbTx-A)和 B 型(BTX-B, 即 PbTx-B), 其他数十种组分均为衍生物。目前, BTX 毒素的分布范围已由美洲墨西哥湾沿岸及新西兰豪拉基海湾扩散到其他海域<sup>[11]</sup>。

PTX 毒素组最初在产自日本的虾夷扇贝(*Patinpecten yessoensis*)中发现<sup>[12]</sup>, 在贝类中常常与 OA 组毒素伴生, 其相对分子质量和化学结构都与 OA 非常相似(图 4)。PTX 产毒藻主要为鳍藻(*Dinophysis spp.*), 已发现有 15 种组分, 其中 PTX2 分布最普遍, 其他大部分组分均是由 PTX2 转化形成。PTX 毒素的分布范围越来越广, 目前已扩展到澳大利亚、新西兰和一些欧洲国家<sup>[13]</sup>。

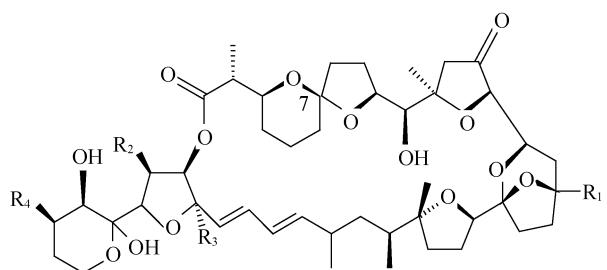
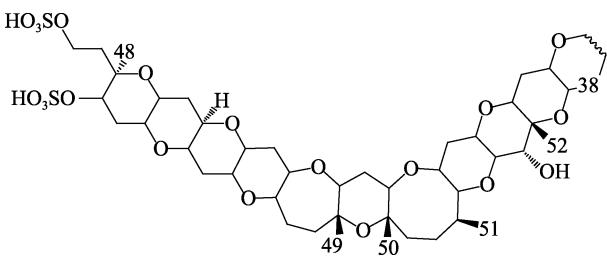
YTX 毒素组是 LPs 最为复杂的一类毒素, 其

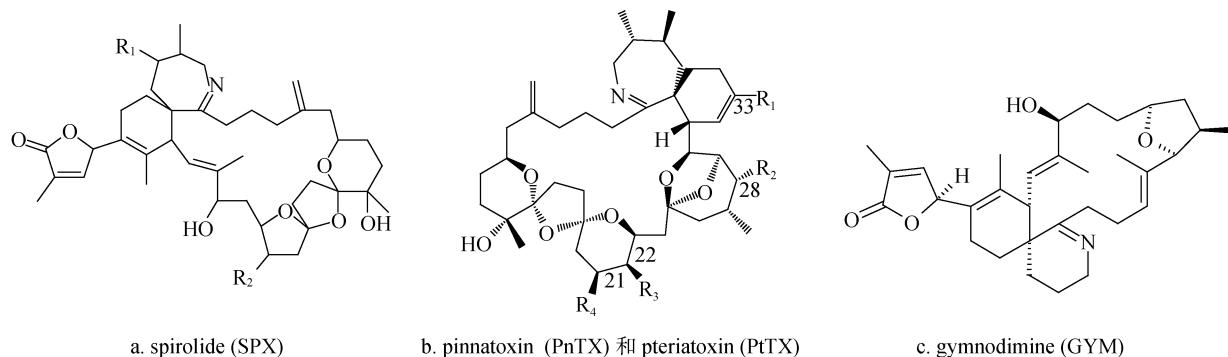
图3 短裸甲藻毒素(BTX)组基本结构<sup>[6]</sup>Fig. 3 The basic chemical structure of brevetoxin(BTX) group<sup>[6]</sup>

同系物已达上百种, 基本结构主要包括 11 个连续性的醚环(图 5), 1 个不饱和侧环及两个硫酸酯<sup>[14]</sup>。最早于 1986 年发现于日本的虾夷扇贝中<sup>[15]</sup>。不过, 目前已在世界多个地区的贝类中检出, 且含量级高达 mg/kg(贝肉)。YTX 主要存在于网状原甲藻(*P. reticulatum*)和 *Lingulodinium polyedrum*

(*Gonyaulax spinifera*)中, 在 1 株甲藻中可以发现超过 90 种同系物。YTX 不具腹泻性毒性, 目前还没有导致人类中毒的记录。

CI 毒素共包括 spirolide (SPX), pinnatoxin (PnTX), pteriatoxin (PtTX), gymnodimine (GYM), prorocentrolide 和 spiro-prorocentrime 等多种毒素成分, 都是具亚胺(碳氮双键)和三螺环醚的大环化合物(图 6), 在分子结构上极具相似性<sup>[16]</sup>。不过这几种 CI 的来源和分布各有不同, 其中, SPX 是 CI 中最大的一类, 目前已发现 12 种同系物, 最初是于 20 世纪 90 年代在加拿大新斯科特省的扇贝和贻贝中发现<sup>[17]</sup>, 产毒藻是 *Alexandrium ostenfeldii*。PnTX 早在 1995 年发现于日本<sup>[18]</sup>, 目前已发现 7 种成分(PnTX A-G), 分布范围也扩散到欧洲、大洋洲部分地区。和 PnTX 类似, PtTX 目前也仅发现于产自日本冲绳的一种企鹅珍珠贝 *Pteria penguin*。GYM 是 CI 中相对分子质量最小的物质, 已发现 3 种同系物, 即 A-C, 最初在产自新西兰的牡蛎中发现<sup>[19]</sup>, 主要产毒藻为裸甲藻 *Gymnodinium mokimotoi* 和 *G. selliforme*, 该甲藻同时可导致鱼毒性毒素中毒<sup>[20]</sup>。Prorocentrolide 是 CI 中相对分子质量最大的物质, 超过 1 000, 其与 spiro-prorocentrime 的产毒藻同为底栖原甲藻 *Prorocentrum*, 这种产毒藻的生理状态决定了

图4 蛤毒素(PTX)组基本结构<sup>[12]</sup>Fig. 4 The basic chemical structure of pecenotoxin (PTX) group<sup>[12]</sup>图5 虾夷扇贝毒素(YTX)组基本结构<sup>[15]</sup>Fig.5 The basic chemical structure of yessotoxin (YTX) group<sup>[15]</sup>

图 6 几种环亚胺类毒素(CI)组基本结构<sup>[16]</sup>Fig. 6 The basic chemical structure of cyclic imine (CI) group<sup>[16]</sup>

其密度不高，因此在贝类中的含量也较低。目前已在世界的多个地区的微藻或贝类中发现 CI 的存在，但还没有导致消费者中毒的报道<sup>[21–23]</sup>。研究表明，CI 毒素的分布虽然越来越广，但一般含量较低，且大部分 CI 的毒性较低，经口服对人类的风险较小，因此目前还未针对这类毒素制定相关的限量标准。

## 2 脂溶性贝类毒素毒理学研究进展

### 2.1 致毒症状及机理

OA 毒素组能够导致中毒者出现腹泻、腹痛、呕吐等中毒症状，可引起小肠上皮细胞的腹泻性退化并促进癌变的发展，其主要作用机制是抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(PPs)活性，其中 OA 和 DTX 毒素对 PP2A 的抑制能力比 PP1 高千倍，而 OA 还可以对 PP3 和 PP4 产生抑制作用。另外，OA 毒素组还具有促肿瘤作用，且具遗传毒性，可导致 DNA 加合物的形成。

AZA 主要靶器官为肠道，引起的中毒症状和 OA 及 DTX 相似，但作用方式却不相同。随着剂量的增加，可以影响到生物的肝、淋巴、胸腺等其他组织，毒性比 OA 组更强(表 2)。目前仍不明确 AZA 的致毒机理，不过可以确定的是 AZA 并不抑制蛋白磷酸酶活性，不产生神经毒性，但可以影响细胞内的 cAMP 水平，具有显著的组织和细胞毒性，且毒性大小与其自身结构有显著的相关性<sup>[24]</sup>。

BTX 毒素能够引起神经系统和胃肠道不适，

主要症状包括恶心、呕吐、腹泻、痉挛、支气管收缩、麻痹、抽搐和昏迷<sup>[25–26]</sup>。值得注意的是，这类毒素对鱼类、海鸟甚至海洋哺乳动物都具有显著的致死作用<sup>[27–28]</sup>。

PTX 的致腹泻作用还不清楚且毒性较弱，虽然这类毒素常与 OA 伴生，但致毒症状却不相似。经口并不能引起受试小鼠出现腹泻症状，但小鼠腹腔注射后发现其具有毒性作用，受试小鼠出现严重的中毒症状，如弓背、昏睡、疲惫、呼吸和运动失调<sup>[29–30]</sup>。

YTX 不具备抑制蛋白磷酸酶活性的能力，但对小鼠注射致死剂量的 YTX 毒素后，小鼠表现出烦躁不安，呼吸困难，颤抖，跳跃和/或痉挛的症状，且小鼠心肌细胞超微结构发生变化，有趣的是这种损伤在 90 d 后可以得到自我修复<sup>[31]</sup>。但是，迄今为止还未见消费者因 YTX 而中毒的报道<sup>[32]</sup>。

CI 中研究最为详细的为 SPX，与 GYM 类似，这类毒素对呼吸道具有神经性的毒害作用，毒性症状和 PSP 中毒症状相似，如呼吸急促、弓背、摇尾、抽搐等，腹腔注射可以在几分钟内导致小鼠死亡<sup>[33]</sup>。

### 2.2 对哺乳动物的毒性程度

在 LPs 限量标准的制定过程中，毒理学评价是重要的参考依据。目前，LPs 毒理学评价主要以小鼠等实验动物为对象，采用腹腔注射、灌胃等方式对小鼠进行染毒、观察并评价其毒性大小。从表 1 可以看出，这几类 LPs 对受试小鼠的毒性差异较大，其中腹腔注射半致死剂量毒性最大的

表1 不同LPs对实验小鼠的毒性比较

Tab. 1 Acute toxicity of LPs toxins through intravenous (*i.v.*) and intraperitoneal (*i.p.*) administration in mice

毒素种类 type	主要成分 main composition	实验动物 experimental animal	试验方式 method	毒性参数/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ BW)	参考文献 reference		
OA	OA	小鼠	腹腔注射	204( $\text{LD}_{50}$ )	[35]		
	DTX2	小鼠	腹腔注射	350( $\text{LD}_{50}$ )			
AZA	AZA1	小鼠	腹腔注射	200(致死剂量)	[36]		
	AZA2	小鼠	腹腔注射	110(致死剂量)	[37]		
	AZA3	小鼠	腹腔注射	140(致死剂量)	[37]		
	AZA4	小鼠	腹腔注射	470(致死剂量)	[38]		
	AZA5	小鼠	腹腔注射	1000(致死剂量)	[38]		
BTX	BTX-2	小鼠	静脉注射	200( $\text{LD}_{50}$ )	[39]		
			腹腔注射	200( $\text{LD}_{50}$ )			
	BTX-3	小鼠	静脉注射	94( $\text{LD}_{50}$ )	[39]		
			腹腔注射	170( $\text{LD}_{50}$ )	[39]		
			腹腔注射	250( $\text{LD}_{50}$ )	[40]		
PTX	PTX-2	小鼠	腹腔注射	219( $\text{LD}_{50}$ )			
	PTX-1 和-11	小鼠	腹腔注射	250( $\text{LD}_{50}$ )			
	PTX-3	小鼠	腹腔注射	350( $\text{LD}_{50}$ )			
	PTX-6	小鼠	腹腔注射	500( $\text{LD}_{50}$ )	[34]		
	PTX-4	小鼠	腹腔注射	770( $\text{LD}_{50}$ )			
	PTX-7, -8, -9, -2SA, 7-epi-PTX2 SA	小鼠	腹腔注射	5000( $\text{LD}_{50}$ )			
	YTX	小鼠	腹腔注射	100 ~ 500( $\text{LD}_{50}$ )			
YTX	1a-homoYTX	小鼠	腹腔注射	315 ~ 830( $\text{LD}_{50}$ )	[34]		
	45-hydroxyYTX	未报道	腹腔注射	500(致死剂量)	[41]		
	45-hydroxy-1a homoYTX	小鼠	腹腔注射	750 未出现死亡	[42]		
	SPX 混合物(粗提物)	小鼠	腹腔注射	40( $\text{LD}_{50}$ )	[33]		
CI			灌胃	1000( $\text{LD}_{50}$ )			
			腹腔注射	6.9 ( $\text{LD}_{50}$ )			
13-desmethyl SPX C	小鼠	灌胃	157 ( $\text{LD}_{50}$ )	[34]			
		奶油奶酪	500(CI 381 ~ 707) <sup>c</sup>				
		腹腔注射	8.0( $\text{LD}_{50}$ )				
SPX C	小鼠	灌胃	176( $\text{LD}_{50}$ )				
		奶油奶酪	500(CI 353 ~ 657) <sup>c</sup>				
GYM A	GYM A	小鼠	腹腔注射	96( $\text{LD}_{50}$ )	[43]		
			灌胃	755(CI 600 ~ 945)			
	PnTx E	小鼠	口服	4057(CI 3750 ~ 4390)			
			腹腔注射	50( $\text{LD}_{50}$ )			
PnTx F	PnTx F	小鼠	腹腔注射	45( $\text{LD}_{50}$ )	[22]		
	PnTx E and F	小鼠	灌胃	23(CI 20 ~ 25)	[44]		
PnTx G	PnTx G	小鼠	腹腔注射	16( $\text{LD}_{50}$ )	[22]		

注: CI: 95% 置信区间; <sup>c</sup>:毒素标准品溶解到纯奶油奶酪中; 毒性当量因子(TEFs)是基于腹腔注射方式下对小鼠的半数致死剂量。

Note: 95% confident interval; <sup>c</sup>:toxin standard substance dissolved in pure butter cheese; TEFs means  $\text{LD}_{50}$  of mice with the intraperitoneal injection.

为 13-desmethyl SPX C, 其  $\text{LD}_{50}$  仅为  $6.9 \mu\text{g}/\text{kg}$  (BW), 而 PTX 毒素组中的 PTX-7、-8、-9、-2SA、

7-epi-PTX2 SA 等成分则高达  $5\ 000 \mu\text{g}/\text{kg}$  (BW)<sup>[30]</sup>。

另外, 同一类毒素成分不同染毒方式对受试小鼠

表 2 临时性急性毒性参考剂量及指导标准(欧盟)

Tab. 2 Summary data used in the derivation of the ARfD and current guidance levels(EU)

毒素组 toxin type	LOAEL(1)NOAEL(2)/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ BW)	安全因子人类数据(H) 动物数据(A)	临时性急性毒性 参考剂量(ARfDs)	指导标准[消费量: 100 g(1), 250 g(2) 和 380 g(3)]	欧盟现有法规标准 (最高残留限量标准)
OA	1(1)	3(H)	0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 20 $\mu\text{g}/\text{adult}^{\text{a}}$	0.2 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(1) 0.08 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(2) 0.05 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(3) 0.024 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(1) 0.096 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(2) 0.063 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(3)	0.16 $\text{mg}/\text{kg}$ SM
AZA	0.4(1)	10(H)	0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2.4 $\mu\text{g}/\text{adult}^{\text{a}}$	N/A	0.16 $\text{mg}/\text{kg}$ SM
BTX				N/A	
PTX				N/A	0.16 mg OA eq/kg SM
YTX	5000(2)	100(A)	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 $\mu\text{g}/\text{adult}^{\text{a}}$	30 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(1) 12 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(2) 8 $\text{mg}/\text{kg}$ SM(3)	1 $\text{mg}/\text{kg}$ SM
CI				N/A	

注 : SM : shellfish meat(贝肉); LOAEL : 最小观察到的不良效应水平, NOAEL : 无不良反应剂量水平, N/A : 无有效数据; a) : 体质量为 60 kg 的成年人.

的毒性差异也较大。一般来说, 腹腔注射对小鼠的毒性最强, 其次为灌胃, 口服则最弱, 如 SPX C 这 3 种染毒方式对小鼠的半数致死剂量分别为 8.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (BW)、157  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (BW) 和 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (BW), 最高和最低之间相差近百倍<sup>[34]</sup>。

### 2.3 临时性急性毒性参考剂量及指导标准

联合国粮农组织/国际奥委会/世卫组织(FAO/IOC/WHO)特设专家组针对 LPs 设立了急性毒性参考剂量(acute reference doses, ARfDs)。不过, 工作组专家认为其中 CI、BTX 和 PTX 毒素组毒理学数据不够充分; 另外, 指导标准的制定基于一个体重为 60 kg 的成年人分别食用 100 g、250 g 或 380 g 贝肉的比较结果。不过专家组认为食用 100 g 贝肉并不是唯一的指导标准, 而大约 97.5% 的消费者大概能够消费 250 g 贝肉, 因此基于 250 g 贝肉的数据更为准确。

## 3 LPs 分析方法研究进展

目前已建立的 LPs 主要分析方法可分为 5 大类: 1) 生物活体毒性测定, 该方法主要是利用小鼠(mouse, 腹腔注射方式)和大鼠(rat, 口服方式)作为实验生物; 2) 体外细胞测试法, 主要有细胞毒性、离子通道激活及血细胞溶血法; 3) 体外的功能测试法, 包括受体结合和酶活性抑制/激活法; 4) 以酶联免疫为主的免疫法, 及后来建立的免疫-色谱法和生物传感器法; 5) 色谱分析法, 包括

薄层色谱、液相色谱和液相色谱质谱联用法。其中, 小鼠生物法的应用最为广泛, 直至目前仍然作为贝类毒素的常规监控分析技术在世界范围内被普遍采用, 但由于该方法自身缺陷及动物福利的原因, 欧盟、加拿大为首的国家和组织相继提出了用液相色谱质谱联用分析技术替代小鼠生物法的建议, 从而提升了液相色谱质谱联用分析技术在贝类毒素安全监控工作中的主导地位和作用。

### 3.1 小鼠生物法(mouse bioassay, MBA)

小鼠生物法最初是由 Yasumoto 及其同事建立的<sup>[45]</sup>, 经过多年发展, MBA 方法的准确度大大提高, 检测能力几乎包括所有的 LPs 毒素组, 检出限从数个 ng/mL 到几百个 ng/mL 不等。该方法主要是对小鼠腹腔注射贝类提取物, 然后观察小鼠神经中毒症状, 如抽搐、痉挛等反应, 并以小鼠的死亡时间等判断毒素的剂量, 毒性大小以鼠单位(MU)表示。为了提高 MBA 方法的检出限和灵敏度, 研究者对其进行了多次调整和优化, 如增加提取试剂的种类及实验动物数量<sup>[12,46]</sup>, 且欧盟内部专门针对该方法制订了标准的操作规程<sup>[47]</sup>。但是, 无论如何调整, MBA 方法特异性、重现性和灵敏度都很差, 而且耗时过长, 不能提供特定脂溶性贝类毒素的检出限, 且由于容易受到其他内源性化合物的影响, 容易造成假阳性结果<sup>[48-50]</sup>。而多种脂溶性贝类毒素如 AZA、OA、YTX 和 PTX 毒素组经常在贝类中共存<sup>[51]</sup>, 以及水溶性贝类毒

素、游离脂肪酸<sup>[52]</sup>及其他生物活性的物质对小鼠都具有毒性作用<sup>[53]</sup>, 这些均直接影响到 MBA 的特异性。甚至是小鼠的品系、性别、年龄及体质量都显著影响结果的准确性<sup>[54]</sup>。除此之外, 小鼠活体毒性实验, 越来越受到动物福利组织的诟病。鉴于此, 欧盟内部制定了三步走的制度, 即限制、减少和取代, 逐步以液质联用分析法取代。

### 3.2 细胞毒性测试法(cytotoxicity assays)

作为一种功能学测试方法, 细胞毒性法是 LPs 体外细胞测试法中研究最为广泛的一种分析方法, 主要集中于 BTX<sup>[55]</sup>、OA<sup>[55–56]</sup>和 CI<sup>[28]</sup>等。以目前较为成熟的 BTX 为例, 细胞毒性试验是基于 BTX 对钠离子通道的作用, 主要利用藜芦碱通过打开钠离子运输通道从而促进钠离子的转运同时用哇巴因( $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP 酶抑制剂)阻断钠钾离子泵活性, 该细胞的生存力可以通过代谢四钠染料(溴化噻唑蓝四氮唑)成紫色结晶物质的量测定<sup>[57]</sup>。但 Dickey 等<sup>[58]</sup>指出, 由于细胞在毒性测试过程中很容易大面积死亡, 因此该方法在不同实验室之间的重现性极差, 结果可能相差数千倍, 导致其应用受到限制。

### 3.3 受体结合分析法(receptor binding assay)

受体结合分析法就是利用 LPs 与细胞膜相关受体的结合力大小进行毒素测试, 目前有文献报道的受体分析法主要为 BTX 和 CI 毒素组, 方法检出限最低可达 ng/mL 级别。一般来说, 不同毒素结合的受体不一样, BTX 毒素与钠盐传输通道受体结合, CI 类毒素则主要与胆碱受体选择性结合<sup>[59]</sup>。不过, 即使同一类毒素, 不同成分与受体的结合能力也是不一样的, 如 BTX 的半胱氨酸结合物(BTX-B2 和 S-desoxy-BTX-B2)与钠离子通道受体的结合能力比 BTX-3 弱 3~10 倍<sup>[60]</sup>。这种特性也导致了该方法灵敏度和重现性都较差, 从而限制其进一步的应用。

### 3.4 酶蛋白抑制法(protein phosphatase inhibition assay)

该方法目前主要用于 OA 和 DTX 毒素的测定, 主要基于这类毒素对丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 活性的抑制作用。目前世界多

个国家均已建立了多个 OA 的免疫分析测试方法, 从早期的邻硝基苯磷酸盐基板法<sup>[61]</sup>、磷酸比色法<sup>[62]</sup>到后来的荧光检测法<sup>[63]</sup>, 灵敏度也从几十个 ng/mL 降低至 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 且 AOAC 曾于 2005 年进行了国际间实验室比对, 结果良好。不过, 这种方法也有自身缺点, 主要是必须有活性良好的蛋白磷酸酶, 而且无法提供任何毒素的信息。

### 3.5 免疫分析法(immunoassays)

和前几种分析方法相比, 免疫分析法具有更好的特异性和灵敏度, 也是重点发展的贝类毒素分析方法之一, 尤其是结合生物传感器技术, 在现场和快速高效贝类毒素检测方面具有很好的应用前景。目前, 该方法主要包括放射免疫 RIA 和酶联免疫 ELISA, 已有相关试剂盒应用于 OA 和 BTX 毒素组测试的报道。BTX 毒素的发展方向是竞争性酶联免疫分析技术, 目前主要集中于研发不同抗体, 如 Naar 等<sup>[64]</sup>研发的利用山羊抗 BTX 毒素抗体对 B 型 BTX 毒素有很高特异性, 最低检出限为 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 而采用竞争化学发光法则检出限可低至 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[65]</sup>。除此之外, 还可以结合胶体金技术和免疫层析法用于 BTX 毒素的检测<sup>[66–67]</sup>。虽然, 免疫分析法与其他非化学性分析方法相比在灵敏度、特异性上均有了很大的提高, 但必须有高质量的酶制剂, 且无法提供详细的毒素成分信息等, 这也限制了其在精确定性和定量方面的应用。

### 3.6 色谱分析法(chromatography)

LPs 的色谱分析法包括薄层色谱和液相色谱两大部分, 但由于薄层色谱其固有的缺点并未能得到推广应用。因此, 色谱分析法的主要方向是液相色谱法, 通过选择不同的检测器, 如紫外 UV、荧光 FL 和质谱 MS 而达到不同的结果。在初始阶段, 液相色谱法主要侧重于尝试利用紫外和荧光检测器对 LPs 进行检测分析, 但由于大部分 LPs 在紫外区吸收较弱或无吸收, 且不具备自发荧光能力, 因此高效液相色谱分析法在 LPs 分析方法的研究和应用均受限, 目前仅见 Lee 等<sup>[46]</sup>建立的 OA 毒素组的液相色谱-荧光分析法, 该方法需要用 9-蒽基叠氮甲烷衍生, 检出限为

100 μg/kg 贝组织。Marrouchi 等<sup>[68]</sup>则建立了贝类中 GYM 的高效液相色谱-紫外检测法, 主要用于检测 GYM A 和 B, 检出限为 2.4 μg/kg, 但必须利用液相色谱质谱联用技术进一步确证。另外, 针对 YTX 毒素也建立了相应的 LC-FL 分析法, 可以分析 YTX 及部分衍生物, 但样品基质的净化过程是一大挑战。

比较而言, 液相色谱质谱联用法(LC-MS<sup>n</sup>)在 LPs 检测分析中所表现出高灵敏度及特异性是其他任何分析方法都无法比拟的。因此, 虽然这种方法研究起步较晚, 但发展却最为迅速, 目前所有 6 大类 LPs 均建立了相应的 LC-MS<sup>n</sup> 分析方法。更重要的是, 随着液质联用技术的不断发展, 多种 LPs 组分一次性检出成为可能<sup>[70-71]</sup>, 而且所具有的极强定性和未知物筛查能力, 对于新型毒素的发现及确证具有很好的帮助, 从而使其成为 LPs 高灵敏度分析方法的研究热点<sup>[5,69-71]</sup>。当然, LC-MS<sup>n</sup> 也有其自身缺点, 主要是对人员和仪器设备的要求极高, 而且稀缺且昂贵的标准物质也是发展中国家反对将其设定为检测标准方法的主要原因。然而, 无论发展中国家如何反对, LC-MS<sup>n</sup> 技术成为主要贝类毒素分析方法的趋势不可避免, 必须加以重视。

#### 4 LPs 的监控预警技术

贝类毒素的严重危害性已引起多个国家的密切关注, 以欧美加等为首的发达国家相继制定了贝类毒素监控国家计划。传统的监控方法主要是定期对相关海域中的双壳贝类进行贝类毒素的含量及产毒藻种类和数量进行监测, 以评估贝类毒素的风险性, 对保护消费者安全、确保贝类产业健康发展做出了积极贡献。然而, 传统手段需要采集大量的贝类和藻类样品才能对贝类毒素做出有效预警, 不仅耗费大量的人力物力, 而且时效性不强。2004 年, MacKenzie 等<sup>[72]</sup>首次报道了一种固相吸附毒素追踪技术(solid phase adsorption toxin tracking, SPATT), 主要是利用特异性吸附材料对目标毒素进行吸附, 然后实验室内洗脱、浓缩和净化后经 LC-MS 检测。SPATT 技术与传统方

法相比, 不仅大量减少采样分析工作量, 而且还可以监控目标海域不同水层贝类毒素的变化, 同时结合相关海域贝类毒素的风险评估状况, 对贝类毒素有早期预警作用<sup>[73]</sup>, 具有很大的发展前景。

#### 5 发达国家针对脂溶性贝类毒素的政策动态

近期, 欧盟、美国、加拿大和国际食品法典委员会(CAC)等发达国家或组织针对脂溶性贝类毒素相继出台了一系列的法律法规, 主要集中于检测方法、限量标准和风险评估等 3 个方面, 而且这 3 个方面相辅相成, 构成了对发展中国家新的贸易壁垒。

欧盟第(EC)No. 2074/2005 法规的补充条款建议将液质联用方法完全取代小鼠法用于 LPs 的常规检测, 虽然给予发展中国家 3 年的缓冲期, 但仍带来极大的冲击。与此同时, 世界水产与水产加工品专业委员会(the Codex Committee on Fish and Fishery Products, CCFFP)制定了《鲜活贝类中生物毒素标准分析方法草案》, 也提出了相似的意见, 并在第 30、31 届 CCFFP 工作会议连续进行了多轮讨论和磋商。虽然在发展中国家的压力下, 美国提出了小鼠生物法和液质联用法并存的方案, 并于 2012 年 10 月 1~5 日在 32 届 CCFFP 会议上讨论, 但由于 MBA 方法并未被列入海洋生物毒素检测方法执行准则, 因此这一提议是否能够通过还不得而知。

限量标准方面, 现行鲜活全贝中的限量标准 OA、PTX、AZA 和 DTX 毒素组均为 160 μg/kg, YTX 限量标准为 1 000 μg/kg<sup>[74-75]</sup>, SPX 等环亚胺类毒素还未有限定标准。但由于这些标准的制定并没有充足的毒理学数据支持, 甚至部分毒素的资料完全缺乏。因此, 欧盟食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)在新的毒理学数据基础上, 对这些毒素的限量标准进行了重新评估并建议将现有脂溶性贝类毒素的限量标准修订为 OA 和 DTX 为 45 μg/kg, AZA 为 30 μg/kg, PTX 为 120 μg/kg, YTX 为 3 750 μg/kg<sup>[76-79]</sup>。

需要特别指出的是, 欧盟和 CAC 等特别强调, 在选择潜在的分析方法和限量标准之前, 相应国

表3 国际组织及部分国家水产品中 LPs 限量规定  
Tab. 3 The legislation limits of LPs in some countries

毒素种类 toxin type	中国 China	国际食品法典委员会 FAO/WHO	欧盟 EU	加拿大 Canada	澳大利亚/新西兰 Australia/ New Zealand	mg/kg	
						日本 Japan	
OA	不得检出 NY5073- 2006	0.16 (OA eq)	0.16 ( OA eq)	20	20( OA) 40( DSP) mg/kg (肝胰腺)	200, 2000(扇贝中肠腺)	1200(紫贻贝中肠腺)
AZA	未规定	0.16 eq ( AZA1-3 总量)	0.16 AZA eq	0.16 AZA eq			
BTX	未规定	0.8 BTX-2 eq ( 20MUs/100 g S)	0.8 BTX-2 eq	20 MUs/100g	20MUs/100 SM (未明确 BTX 种类)		
PTX	未规定		0.16 eq	0.16 eq			
YTX	未规定	0.16	1				
CI	未规定						

家应充分评估该类毒素在相关海域的潜在危害, 包括产生毒素的藻种, 该海域贝类(最小程度)或资源生物(尽其所能)中的毒素种类, 所影响到的双壳类种类以及毒素对人类健康危害的机制, 强调了生物毒素的风险评估等有关基础研究的重要性<sup>[80]</sup>。

## 6 展望

我国是一个赤潮高发国家, 近年来赤潮暴发范围已几乎扩大至我国所有沿海海域。不仅如此, 自上世纪末发现 OA 毒素组在我国存在以来<sup>[81]</sup>, 一些新型的 LPs 种类如 AZA, YTX, GYM 等也相继被发现<sup>[5, 82-83]</sup>, 导致我国面临着越来越严重的海洋生态和食品安全风险。而我国相关部门针对国际社会新政策要求的应对措施凸显出我国在贝类毒素研究方面存在严重缺陷和不足, 尤其在欧盟等重点强调的 LPs 检测方法、限量标准及风险评估方面存在诸多空白点。如我国针对 LPs 调查仍然采用的是小鼠生物法, 仅少数辅助以高效液相色谱法; 少数贝类毒素的限量标准也多参考欧盟和美国 FDA, 风险评估工作至今未系统开展。这些现状不仅导致我国应对相关贸易壁垒的能力严重不足, 更重要的是限制了相关研究的进一步开展, 不利于我国贝类产业的可持续发展。因此, 为更好的应对国际最新政策要求及潜在的贸易壁垒, 应以 LPs 毒素 LC-MS/MS 分析方法建立及标准化为突破口, 在此基础上系统开展我国主要养

殖海域环境及生物中 LPs 的污染本底调查及来源解析、LPs 影响贝类质量安全形成的主要过程及调控机理、典型 LPs 的毒理学评价、风险评估及监控预警技术等相关研究, 以提升我国贝类毒素研究能力和技术水平, 确保贝类产业健康可持续发展。

## 参考文献:

- [1] Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of new type of toxic shellfish in Japan and chemical properties of the toxin [C]// Taylor D, Seliger H H.(Eds.): Toxic Dinoflagellates Bloom, 1979: 495-502. New York: Elsevier.
- [2] Murata M, Shimatani M, Sugitani H, et al. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhoeic shellfish poisoning [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1982, 48: 549-552.
- [3] McMahon T, Silke J. Winter toxicity of unknown aetiology in mussels [J]. Harmful Algae News, 1996, 14: 2.
- [4] Rafael S, Urban T, Uwe J, et al. The role of *Azadinium spinosum* (Dinophyceae) in the production of azaspiracid shellfish poisoning in mussels [J]. Harmful Algae, 2011, 10(6): 774-783.
- [5] 姚建华. 贝类毒素液相色谱-串联质谱检测技术的建立与应用 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [6] Gunter G, Smith F G, Williams R H, et al. Mass Mortality of Marine Animals on the Lower West Coast of Florida, November 1946-January 1947 [J]. Science, 1947, 105: 256-257.
- [7] Davis C C. A new species of *Gymnodinium* [J]. Botanical Gazette, 1948, 9: 358-360.

- [8] Khan S, Ahmed M S, Arakawa O, et al. Properties of neurotoxins separated from a harmful red tide organism *Chattonella marina* [J]. *Isr J Aqua*, 1995, 47: 137–141.
- [9] Khan S, Arakawa O, Onoue Y. Neurotoxin production by a chloromonad *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) [J]. *J World A C*, 1996, 27(3): 254–263.
- [10] Khan S, Arakawa O, Onoue Y. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan [J]. *Aquac Res*, 1997, 28(1): 9–14.
- [11] FAO/IOC/WHO(Food and Agriculture Organization of the United Nations/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO/World Health Organization), 2004. In Background document of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, Oslo, Norway, September 26–30, 2004.
- [12] Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, et al. Diarrhetic Shellfish Toxins [J]. *Tetrahedron*, 1985, 41(6): 1019–1025.
- [13] FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2004. Marine biotoxins. Food and Nutrition Paper 80. <<http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e00.HTM>>.
- [14] Samdal I A. Yessotoxins in algae and mussels – Studies on its sources, disposition, and levels [D]. Norwegian: Norwegian School of Veterinary Science, 2005.
- [15] Murata M, Kumagai M, Lee J S, et al. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning [J]. *Tetrahedron Lett*, 1987, 28: 5869–5872.
- [16] Chapela M J, Reboreda A, Vieites JM, et al. Lipophilic Toxins Analyzed by Liquid Chromatography– Mass Spectrometry and Comparison with Mouse Bioassay in Fresh, Frozen, and Processed Molluscs [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 8979–8986.
- [17] Hu T, Curtis J M, Oshima Y, et al. Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish [J]. *J Chem Soc*, 1995, 117: 2159–2161.
- [18] Uemura D, Chou T, Haino T, et al. Pinnatoxin A: a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 1155–1156.
- [19] MacKenzie L, White D, Oshima Y, et al. The resting cyst and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand [J]. *Phycologia*, 1996, 35: 148–155.
- [20] Seki T, Satake M, MacKenzie L, et al. Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoagellate, *Gymnodinium* sp. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36(39): 7093–7096.
- [21] Cembella A D, Lewis N I, Quilliam M A, et al. The marine dinoagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins [J]. *Phycologia*, 2000, 39(1): 67–74.
- [22] Selwood A I, Miles C O, Wilkins A L, et al. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 50: 6532–6542.
- [23] FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, Oslo, Norway, September 26–30, 2004. 8.
- [24] Taleb H, Vale P, Amanhir R, et al. First detection of azaspiracids in mussels in North West Africa [J]. *Shellfish Res*, 2006, 25(3): 1067–1070.
- [25] Watkins S M, Reich A, Fleming L E, et al. Neurotoxic shellfish poisoning [J]. *Mar Drugs*, 2008(6): 431–455.
- [26] FAO/IOC/WHO(Food and Agriculture Organization of the United Nations/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO/World Health Organization) [R]. 2004, 9: 26–30.
- [27] Flewelling L J, Naar J P, Abbott J P, et al. Red tides and marine mammal mortalities [J]. *Nature*, 2005, 435: 755–756.
- [28] Bottein M Y D, Fuquay J M, Munday R, et al. Bioassay methods for detection of N-palmitoylbrevetoxin-B2 (BTX-B4) [J]. *Toxicon*, 2010, 55: 497–506.
- [29] Miles C O, Wilkins A L, Hawkes A D, et al. Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand [J]. *Toxicon*, 2006, 48: 152–159.
- [30] Munday J S. Toxicology of the pectenotoxins [C]. Florida: CRC Press (Taylor and Francis Group), 2008, 371–380.
- [31] Tubaro A, Giangaspero A, Ardizzone M, et al. Ultrastructural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in 3 months [J]. *Toxicon*, 2008, 51: 1225–1235.
- [32] Aune T, Sørby R, Yasumoto T, et al. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice [J]. *Toxicon*, 2002, 40: 77–82.
- [33] Richard D, Arsenault E, Cembella A D, et al. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins [C]// Hallegraeff G M, Blackburn S I, Bolch C J S, et al. IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Hobart: Intergovernmental Oceanographic Commission, 2000: 383–386.
- [34] Munday R, Aune T, Rossini GP. Toxicology of the yessotoxins [C]. In Seafood and Freshwater Toxins[R]. Florida:

- Taylor & FranCI, 2008: 329–339.
- [35] Aune T, Torgersen T, Aasen J, et al. Risk assessment of DSP toxins in brown crabs(*Cancer pagurus*) [C]// Henshilwood K, Deegan B, McMahon T, et al. Molluscan shellfish safety. Galway: Proceedings of the 5th International conference on Molluscan Shellfish Safety. Ireland: Galway, 2006, 464–468.
- [36] Satake M, Ofuji K, Naoki H, et al. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis* [J]. Am Chem Soc, 1998, 120: 9967–9968.
- [37] Ofuji K, Satake M, McMahon T, et al. Two analogues of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland [J]. Nat Toxins, 1999, 7: 99–102.
- [38] Ofuji K, Satake M, McMahon T, et al. Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of Azaspiracid poisoning in Europe [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65: 740–742.
- [39] Baden D G, Mende T J. Toxicity of two toxins from the Florida red tide marine dinoflagellate, *Ptychodiscus brevis* [J]. Toxicon, 1982, 20: 457–461.
- [40] Selwood A I, Ginkel R, Wilkins AL, et al. Semisynthesis of S-desoxybrevetoxin-B2 and brevetoxin-B2, and assessment of their acute toxicities [J]. Chem Res Toxicol, 2008, 21: 944–950.
- [41] Satake M, Tubaro A, Lee J S, et al. Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea[J]. Natural Toxins, 1997, 5: 107–110.
- [42] Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, et al. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice [J]. Toxicon, 2003, 41: 783–792.
- [43] Munday R, Towers NR, Mackenzie L, Beuzenberg V, et al. Acute toxicity of gymnodimine to mice [J]. Toxicon, 2004, 44: 173–178.
- [44] Rhodes L, Smith K, Selwood A, et al. Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland [J]. Harmful Algae, 2010, 9: 384–389.
- [45] Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1978, 44: 1249–1255.
- [46] Lee J S, Yanagi T, Kenna R, et al. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography [J]. Agric Biol Chem, 1987, 51: 877–881.
- [47] Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins, 2007. Standard Operating Procedure for detection of Okadaic acid, Dinophysistoxins and Pectenotoxins by Mouse Bioassay. Working group CRLMB/NRL. Version 4.0 (April 2007). Available at URL: <https://www.aesa.msc.es/crlmb/web/CRLMB.jsp>.
- [48] Takagi T, Hayashi K, Itabashi Y. Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intra-peritoneal injection [J]. Nippon Suisan Gakk, 1984, 50: 1413–1418.
- [49] Combes R D. The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning: a gross misuse of laboratory animals and of scientific methodology [J]. Atla-Alter Lab Anim, 2003, 31: 595–610.
- [50] Turrell E A, Stobo L. A comparison of the mouse bioassay with liquid chromatography–mass spectrometry for the detection of lipophilic toxins in shellfish from Scottish waters [J]. Toxicon, 2007, 50: 442–447.
- [51] FAO/IOC/WHO(Food and Agriculture Organization of the United Nations/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO/World Health Organization), Report of the Joint, 2004.
- [52] Lawrence J F, Chadha R K, Ratnayake W M N, et al. An incident of elevated levels of unsaturated free fatty acids in mussels from Nova Scotia and their toxic effect in mice after intraperitoneal injection [J]. Nat Toxins, 1994, 2: 318–321.
- [53] Gill S, Murphy M, Clausen J, et al. Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis [J]. Neurotoxicology, 2003, 24: 593–604.
- [54] Vieites J M, Leira F, Botana L M, et al. Determination of DSP toxins: comparative study of HPLC and bioassay to reduce the observation time of the mouse bioassay [J]. Arch Toxicol, 1996, 70: 440–443.
- [55] Tubaro A, Florio C, Luxich E, et al. A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels [J]. Toxicon, 1996, 34: 743–752.
- [56] 陈洋. DSP 等赤潮藻毒素对哺乳类细胞的毒性效应及机制研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008.
- [57] Plakas S M, Dickey R W. Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish [J]. Toxicon, 2010, 56: 137–149.

- [58] Dickey R W, Plakas S M, Jester E L E, et al. Multi-laboratory study of five methods for the determination of brevetoxins in shellfish tissue extracts [J]. Harmful Algae, 2002; 300–302.
- [59] Gerssen A, McElhinney M A, Mulder P P, et al. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 394: 1213–1226.
- [60] Van Dolah F M, Finley E L, Haynes G J, et al. Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic assays for marine phycotoxins [J]. Natural Toxins, 1994, 2: 189–196.
- [61] Takai A and Mieskes G. Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases [J]. Biochem, 1991, 275: 233–239.
- [62] Tubaro A, Florio C, Luxich E, et al. Aprotein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels [J]. Toxicol, 1996, 34: 743–752.
- [63] González J C, Leira F, Fontal O I, et al. Interlaboratory validation of the fluorescent protein phosphatase inhibition assay to determine diarrhetic shellfish toxins: intercomparison with liquid chromatography and mouse bioassay [J]. Anal Chim Acta, 2004, 466: 233–246.
- [64] Naar J, Bourdelais A, Tomas C, et al. A competitive ELISA to detect brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) in seawater, shellfish, and mammalian body fluid [J]. Environ Health Persp, 2002, 110: 179–185.
- [65] Poli M A, Rivera V R, Neal D D, et al. An electrochemiluminescence-based competitive displacement immunoassay for the type-2 brevetoxins in oyster extracts [J]. J AOAC Int, 2007, 90: 173–178.
- [66] Zhou Y, Pan F G, Li Y S, et al. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24: 2744–2747.
- [67] Zhou Y, Li Y S, Pan F G, et al. Development of a new monoclonal antibody based direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of brevetoxins in food samples [J]. Food Chem, 2010, 118: 467–471.
- [68] Marrouchi R, Dziri F, Belayouni N, et al. Quantitative determination of gymnodimine-A by high performance liquid chromatography in contaminated clams from Tunisia coastline [J]. Mar Biotechnol, 2009, 5: 579–585.
- [69] 黄聪, 李晓晶, 彭荣飞. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测贝类产品7种脂溶性贝类毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1075–1077.
- [70] Toshiyuki S, Akira M, Katsuhisa B, et al. LC-MS/MS analysis of okadaic acid analogues and other lipophilic toxins in single-cell isolates of several Dinophysis species collected in Hokkaido, Japan [J]. Harmful Algal, 2009, 8: 223–238.
- [71] Jorge R, Araceli E R, Gonzalo L, et al. Automated online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish [J]. Food Chem, 2011, 129: 533–540.
- [72] 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]. Toxicol, 2004, 44(8): 901–918.
- [73] Rundberget T, Gustad E, Samdal I A, et al. A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers [J]. Toxicol, 2009, 53(5): 543–550.
- [74] European Commission. Commission DeClion 2002/225/EC laying down detailed rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods [J]. Off J Eur Communities, 2002: 62–63.
- [75] 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 [J]. Off J Europ Union, 2004, 226: 22–82.
- [76] Alexander J, Auðunsson G A, Benford D, et al. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish—okadaic acid and analogues [J]. EFSA J, 2008, 589: 1–62.
- [77] Alexander J, Benford D, Cockburn A, et al. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish—Yessotoxin group [J]. EFSA J, 2008, 907: 1–62.
- [78] Alexander J, Benford D, Cockburn A, et al. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a re-

- quest from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – pectenotoxin group [J]. EFSA J, 2009, 1109: 1–47.
- [79] Alexander J, Benford D, Cockburn A, et al. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – Azaspiracid group [J]. EFSA J, 2008, 723: 1–52.
- [80] Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission, Thirty-fourth Session, Geneva, Switzerland, 4–9 July 2011. Report of the thirty-first session of the Codex Committee On Fish And Fishery Products, Tromsø, Norway 11 – 16 April 2011.
- [81] Zhou M J, Li J, Luckas B, et al. A recent shellfish toxin investigation in China [J]. Mar Poll Bull, 1999, 39(2): 331–334.
- [82] 高春蕾, 刘仁沿, 梁玉波, 等. 虾夷扇贝毒素 yessotoxins (YTXs), 中国沿海贝类中首次发现的一组贝类生物毒素 [J]. 海洋学报, 2010, 32(3): 129–137.
- [83] Liu R Y, Liang Y B, Wu X L, et al. First report on the detection of pectenotoxin groups in Chinese shellfish by LC-MS/MS [J]. Toxicol, 2011, 57: 1000–1007.

## Progresses in risk assessment and detection method of lipophilic phycotoxins

TAN Zhijun<sup>1,2</sup>, WU Haiyan<sup>1,2</sup>, GUO Mengmeng<sup>1,2</sup>, YANG Fan<sup>1,2</sup>, WANG Lianzhu<sup>1,2</sup>, LI Zhaoxin<sup>1,2</sup>, ZHAI Yuxiu<sup>1,2</sup>

1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. National Center for Quality Supervision and Test of Aquatic Products, Qingdao 266071, China

**Abstract:** The Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* expert consultation held in 2004 classified the phycotoxins into eight groups based on their chemical structure. Of these, six groups, namely the okadaic acid (OA), azaspiracid (AZA), cyclic imine (CI), brevetoxin (BTX), pectenotoxin (PTX) and yessotoxin (YTX) groups, are termed lipophilic phycotoxins (LPs) because of similarities in the structure of their lipid-soluble cyclic polyether compounds. LPs accumulate in shellfish and persist longer than other phycotoxins. In the European Union, much attention is being paid to legislation with an emphasis on the detection method, maximum residue limit and basic assessment. Almost all LPs have been identified in Chinese shellfish, which will surely bring challenges to the human health and trade barrier. In the present paper, we reviewed recent studies on the chemical characteristics, origin, toxicity, detection methods, supervision and legislation of LPs, to provide a reference for our country to carry out research and formulate measures.

**Key words:** lipophilic phycotoxin; pollution distribution; toxicity assessment; detection method; supervision; legislation

**Corresponding author:** ZHAI Yuxiu. E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn