

水产品海洋生物毒素与 检测技术

Shuichanpin Haiyang Shengwu Dusu
Yu Jiance Jishu

曹际娟 主编



中国质检出版社
中国标准出版社

水产品海洋生物毒素与检测技术

曹际娟 主 编

中国质检出版社

中国标准出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

水产品海洋生物毒素与检测技术/曹际娟主编. —北京:中国标准出版社, 2016. 7

ISBN 978-7-5066-8242-8

I. ①水… II. ①曹… III. ①水产品—海洋生物—毒素—检测
IV. ①TS254. 7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 074183 号

中国质检出版社
中国标准出版社 出版发行

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)
北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 68533533 发行中心: (010) 51780238

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 12.25 字数 254 千字
2016 年 7 月第一版 2016 年 7 月第一次印刷

*

定价 56.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 68510107

编委会名单

主 编 曹际娟

副主编 李爱峰 徐 静 郑秋月 孙兴权

编 委(按姓氏拼音首字母排序)

白 璐	曹冬梅	董振霖	董伟峰	代 弟
高 鹭	姜 丽	李 军	李一尘	刘 冉
刘 宇	刘 洋	马惠蕊	那 晗	庞艳华
齐震玉	宋慧君	苏明明	史媛媛	邵筠乔
孙 瑶	孙哲平	孙铭英	隋 凯	田 苗
田 卓	王宏伟	王 刚	王 楠	王玉萍
徐 杨	徐君怡	谢 琰	肖珊珊	于 灵
于 珂	郁 风	杨春光	杨 璐	赵 昕
赵 禹	张 琳			

前 言

随着沿海水产养殖业规模和密度的不断提高,陆地氮磷等营养元素大量进入海洋,造成严重的海洋水体富营养化问题,为赤潮的形成奠定了基础。近二十年来,有害赤潮在全球范围内频繁爆发,其中一部分由产毒藻引起的有毒赤潮严重破坏了海洋生态系统并威胁着人类的身体健康。有毒赤潮产生的毒素及其他海洋生物毒素成为水产品中重要的污染物来源之一。每年因食用有毒海洋产品造成的中毒事件时有发生,如河豚鱼中毒(Puffer Fish Poisoning, PFP)、西加鱼中毒(Ciguatera Fish Poisoning, CFP),以及因食用贝类引起的麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)、记忆缺失性贝毒(Amnestic Shellfish Poisoning, ASP)、腹泻性贝毒(Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)、神经性贝毒(Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP)等中毒事件。另外,因食用织纹螺引起的中毒事件在我国沿海地区频繁发现。据统计,自20世纪70年代以来,我国发生了150余起食用海洋产品中毒事件,中毒人数800余人,其中55人死亡。2004年,在内陆城市银川又发生了食用织纹螺导致的中毒事件,中毒人数50余人,有1人死亡。由此看来,海洋生物毒素已成为影响水产品品质的重要因素,严重威胁水产品的食用安全,制约着当前水产养殖业的可持续健康发展。

为保障海洋产品食用安全,必须加强对海洋生物毒素检测分析的研究。随着现代分析技术的快速发展,小鼠生物测试法、酶联免疫检测法、现代分子生物学检测技术、胶束电动色谱法、毛细管电泳法、高效液相色谱以及高效液相色谱-质谱法等已经成为海洋生物毒素检测的常用手段。本书从毒性作用机制角度对常见海洋生物毒素分类,并对各类毒素的理化性质、毒理作用、检测方法等进行了论述,以供相关科研及检验工作者参考。

曹际娟

2016年1月5日

目 录

第一章 绪 论	1
第一节 水产品海洋生物毒素概述	1
一、种类	1
二、成因	1
三、来源	1
四、分布	3
第二节 海洋生物毒素对人类健康的影响	5
第三节 海洋生物毒素对水产渔业的影响	8
第四节 海洋生物毒素的药物开发价值	8
一、海洋生物毒素对神经系统的作用	8
二、海洋生物毒素对心血管系统的作用	9
第五节 水产品海洋生物毒素检测技术概述	11
一、生物检测法	11
二、免疫分析法	13
三、受体结合检测法	14
四、细胞毒性/细胞培养检测法	14
五、化学分析法	15
第六节 水产品海洋生物毒素的卫生控制	24
参考文献	27
第二章 腹泻性贝类毒素与检测	36
第一节 腹泻性贝类毒素概述	36
一、化学结构与理化性质	36
二、中毒途径与毒性	38

三、毒理作用	38
四、中毒表现	38
五、救治	38
第二节 小鼠生物检测技术	39
一、原理	39
二、试样制备与保存	39
三、检测步骤	39
四、结果计算与表述	41
五、操作注意事项	41
第三节 酶联免疫检测技术	41
一、原理	41
二、试样的提取和净化	41
三、检测步骤	42
四、结果计算	42
五、其他	43
六、注意事项	43
第四节 高效液相色谱-串联质谱 (HPLC - MS/MS) 检测技术	43
一、原理	43
二、试剂和材料	44
三、仪器和设备	45
四、分析步骤	45
五、空白实验	48
六、分析结果的表述	48
七、精密度	48
八、其他	48
参考文献	50
第三章 麻痹性贝类毒素与检测	52
第一节 麻痹性贝类毒素概述	52
一、化学结构与理化性质	52
二、中毒途径与毒性	54

三、毒理作用	54
四、中毒表现	54
第二节 小鼠生物检测技术	54
一、原理	54
二、试剂和材料	55
三、仪器和设备	55
四、分析步骤	55
五、分析结果表述	58
六、其他	59
第三节 酶联免疫检测技术	59
一、原理	59
二、试剂和材料	60
三、仪器和设备	60
四、分析步骤	60
五、分析结果的计算与表述	61
六、其他	62
第四节 高效液相色谱法	62
一、原理	62
二、试剂和材料	62
三、仪器和设备	64
四、分析步骤	64
五、分析结果表述	66
六、精密度	66
七、其他	67
附录 A （规范性附录）麻痹性贝类毒素死亡时间-鼠单位的关系	68
附录 B （规范性附录）小鼠体重校正表	70
附录 C （资料性附录）ICR 小鼠的定义	71
附录 D 商业化试剂盒评价技术参数	72
附录 E （资料性附录）标准物质液相色谱图	73
附录 F （资料性附录）回收率	74
参考文献	75

第四章 失忆性贝类毒素与检测	76
第一节 失忆性贝类毒素概述	76
一、化学结构与理化性质	76
二、中毒途径与毒性	78
三、毒理作用	78
四、中毒表现	78
第二节 酶联免疫检测技术	78
一、原理	78
二、试剂和材料	79
三、仪器与设备	79
四、分析步骤	79
五、分析结果的计算与表述	81
六、其他	81
第三节 高效液相色谱检测技术	82
一、原理	82
二、试剂与材料	82
三、仪器与设备	83
四、分析步骤	83
五、空白实验	84
六、分析结果表述	84
七、精密度	84
八、其他	84
第四节 高效液相色谱-串联质谱检测技术	85
一、原理	85
二、试剂和材料	85
三、仪器与设备	85
四、分析步骤	86
五、空白试验	88
六、结果计算和表述	88
七、精密度	88

八、其他	88
附录 A 商业化试剂盒评价技术参数	89
附录 B 软骨藻酸标准品液相色谱图 (0.3 μ g/mL)	90
附录 C 软骨藻酸特征离子流图	91
参考文献	93
第五章 神经性贝类毒素与检测	95
第一节 神经性贝类毒素概述	95
一、化学结构与理化性质	95
二、中毒途径与毒性毒理	97
三、中毒表现	97
第二节 小鼠生物检测技术	98
一、原理	98
二、试剂和材料	98
三、仪器与设备	98
四、分析步骤	98
五、分析结果表述	100
六、安全警示	100
附录 A	101
第三节 毛细管电泳分离-电化学酶联免疫法	102
一、原理	102
二、试剂与材料	103
三、仪器与设备	103
四、分析步骤	104
五、分析结果表述	105
六、其他	106
第四节 高效液相色谱-飞行时间质谱联用法	106
一、原理	106
二、试剂与材料	107
三、仪器与设备	107
四、分析步骤	107

五、分析结果表述	108
六、其他	108
参考文献	110
第六章 河豚毒素与检测	111
第一节 河豚毒素概述	111
一、化学结构与理化性质	111
二、中毒途径与毒性	112
三、毒理作用	113
四、中毒表现	113
第二节 小鼠生物检测技术	113
一、原理	113
二、试剂与材料	113
三、试样制备与保存	114
四、分析步骤	114
五、结果计算与判断	115
六、结果报告	115
七、注意事项	116
第三节 酶联免疫检测技术	117
一、原理	117
二、样品制备与保存	117
三、检测步骤	118
四、结果计算	118
第四节 液相色谱-荧光检测以及液相色谱-串联质谱法检测	119
一、原理	119
二、样品制备与保存	119
三、测定步骤	119
四、结果计算	121
五、精密度	122
参考文献	124

第七章 西加鱼毒素与检测	127
第一节 西加鱼毒素概述	127
一、概述	127
二、西加鱼毒素	127
三、刺尾鱼毒素	129
四、水螅毒素	130
第二节 小鼠生物检测技术	131
一、原理	131
二、试样制备与保存	131
三、试剂和材料	131
四、仪器与设备	131
五、检测步骤	132
六、结果计算与判断	133
第三节 胶体金放大技术毛细管电泳—酶联免疫分析法	136
一、原理	136
二、试剂与材料	137
三、仪器与设备	137
四、检测步骤	137
五、分析结果	138
第四节 高效液相色谱—串联质谱法	141
一、原理	141
二、试剂与材料	141
三、仪器与设备	141
四、检测步骤	142
五、分析结果	142
参考文献	147
第八章 肝损伤性贝毒与检测	149
第一节 肝损伤性贝毒概述	149

一、虾夷扇贝毒素	149
二、蛤毒素	150
第二节 液相色谱-串联质谱法同时检测两种肝损伤性贝类毒素	151
一、原理	151
二、试剂与材料	152
三、仪器与设备	152
四、检测步骤	152
五、分析结果	153
参考文献	155
第九章 氮杂螺环酸毒素与检测	157
第一节 氮杂螺环酸毒素概述	157
一、氮杂螺环酸毒素	157
二、螺环内酯毒素	158
三、米氏裸甲藻毒素	159
四、江珧毒素	160
五、Pteriatoxin	161
六、Prorocentrolide	161
第二节 液相色谱-串联质谱法测定水产品中氮杂螺环酸贝类毒素	162
一、原理	162
二、试剂与材料	162
三、仪器与设备	163
四、检测步骤	163
五、分析结果	164
第三节 液相色谱-串联质谱检测贝类组织中螺环内酯毒素和米氏裸甲藻毒素	166
一、原理	166
二、试剂与材料	166
三、仪器与设备	167
四、检测步骤	167

五、分析结果	168
参考文献	170
附 录	174
附录 1 缩略语表	174
附录 2 水产品中海洋生物毒素国际标准检测方法目录和网站	175

第一章 绪 论

第一节 水产品海洋生物毒素概述

水产养殖业是我国重要的支柱产业之一，养殖种类繁多，养殖规模不断扩大。其中扇贝、牡蛎、贻贝和蛤仔等是常见的养殖生物种类，每年都大量出口。同时，野生贝类和海螺的种类多、数量大，成为人们经常消费的水产品。如我国福建和浙江等沿海地区的居民食用织纹螺的习惯由来已久，织纹螺成为人们餐桌上的一道美味。但因食用贝类和螺类导致的中毒事件时有发生，严重时甚至会导致食用者死亡。引起中毒的主要原因是贝类体内含有生物毒素，其中不同类型的海洋微藻毒素及西加鱼毒素等是常见的致毒因子。近年来，随着分析技术的发展和人们对水产品质量的关注，对海洋生物毒素的了解逐步深入，在一定程度上推动了贝类食品安全研究工作。

一、种类

海洋生物毒素主要由藻类或浮游植物产生，根据化学结构可将海洋生物毒素大致分为多肽类毒素（包括河豚毒素和芋螺毒素）、聚醚类毒素（目前已发现有 100 余种，线性聚醚以岩沙海葵毒素和西加毒素为代表）、生物碱类毒素（石房蛤毒素、刺尾鱼毒素）等三大类。也可以根据毒性作用机制分为腹泻性贝毒（DSP）、麻痹性贝毒（PSP）、神经性贝毒（NSP）和记忆缺损性贝毒（ASP）四类。海洋生物毒素可以在滤食性的软体贝壳类动物的组织内蓄积^[1,2]。

二、成因

海洋生物毒素属于海洋天然有机物，其形成与海洋中有毒藻类赤潮的发生密切相关。海洋中能够引起赤潮的藻类有 300 多种，其中能够产生毒素的有 80 余种，为海洋微藻总数的 2.0%，并且这一数目还随着人类认识的不断深入而继续增长^[3,4]。海洋贝类通过滤食有毒的藻类，经过生物体内累积和放大作用则转化生成相关毒素，即贝毒。

三、来源

麻痹性贝类毒素：麻痹性贝毒是研究较早的一类海洋毒素，但直到 20 世纪二三十

年代才把这类毒素和海洋中的有毒甲藻赤潮联系起来。到目前为止,已经确定 *A. catenella*, *A. fundyense*, *A. fraterculus*, *A. lusitanicum*, *A. cohorticula*, *A. minutum*, *A. monilatum*, *Gymnodinium catenatum*, *A. ostenfeldii*, *A. tamarense*, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* 等多种可以产生麻痹性贝毒的甲藻。除此之外,也有部分蓝藻产生麻痹性贝毒的报道。另有研究表明,与甲藻共生的部分细菌也能够产生麻痹性贝毒毒素^[5]。

腹泻性贝类毒素:大田软海绵酸和鳍藻毒素是引起腹泻性贝毒中毒的主要毒素类型,二者主要是由鳍藻属和原甲藻属的有毒藻产生。鳍藻属的藻类是浮游植物群落中所占比例较少的生物,所以极少有鳍藻大量繁殖导致水体变色的报道。目前已经检测到鳍藻属中能够产生大田软海绵酸或鳍藻毒素的藻种共有 7 种,其中能够产生 OA 的藻种是 *Dinophysis*, *D. acuminata*, *D. acuta*, 能够产生 DTX 的藻种是 *D. acuta*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. norvegica*, *D. rotundata* 和 *D. tripos*。除了这七种藻类外, *D. caudata*, *D. hastate*, *D. sacculus* 也被研究者怀疑能够产生毒素,但尚未得到普遍认可。原甲藻中能够产生毒素的藻种通常为半底栖型藻种,同样很难达到较高的生物量,如 *Prorocentrum hofmannianum*, *P. lima*, *P. concavum* 等。与之相对的是部分浮游型原甲藻藻种,它能够生长达到很高的生物量,但是通常不具有毒性效应,因此危害并不显著。对于影响有毒藻产生藻毒素的因素及其机制,在腹泻性贝毒产毒藻中研究较少,这主要是由于鳍藻的室内培养比较困难。因此,对腹泻性贝毒产毒藻的产毒生理学研究主要集中在原甲藻上。Quilliam 等^[6]和 Jackson^[7]等探讨了氮、磷营养物质对部分有毒原甲藻生长和毒素产生的影响。结果表明单位细胞的毒素含量与生长呈正相关关系。氮限制和磷限制能够使单位细胞毒素水平上升, *Prorocentrum lima* 在利用有机磷酸盐作为磷的来源时也表现出毒素含量升高的现象。对鳍藻的少数产毒生理学研究大多是采用野外采集的有毒藻在实验室内短期培养完成的。也有研究表明,氮缺乏会导致 *Dinophysis acuminata* 和 *D. acuta* 细胞内毒素水平升高。

鳍藻属和原甲藻属的有毒藻种在世界广泛分布,其中原甲藻属的有毒藻种主要分布在热带和温带海域。根据对浮游植物的调查和研究,在我国沿海也存在能够产生腹泻性贝毒的有毒藻种,如 *D. caudata*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. rotundata*, *Dinophysis acuminata* 等,并且腹泻性贝毒在贝类样品中也已有检出。

记忆缺失性贝毒:记忆缺失性贝毒最早的研究开始于 1987 年。这一年,在加拿大发生了食用贻贝导致的中毒事件,有 150 余人中毒,并有 3 人死亡,但是造成中毒的原因并不清楚。因为中毒病人的典型症状之一是记忆丧失,所以人们将可能导致中毒的毒素称为记忆缺失性贝毒。随后,加拿大政府组织开展了一系列研究工作,很快就表明导致中毒的毒素成分为软骨藻酸,其在贝体内的蓄积导致了食用者中毒。软骨藻酸最早是由日本科学家从日本南部的大型红藻 *Chondria armata* 中分离得到,人们尝试用其杀灭昆虫,在随后的研究中又在其他种类的大型红藻中发现了相同的化合物。但这种化合物并未得到人们足够重视,直到 1987 年在加拿大发生了大规模食物中

毒事件后才逐渐得到人们的关注。研究报道在加拿大导致人类中毒的软骨藻酸是来自一种硅藻——多列型尖刺拟菱形藻。随后人们又陆续发现有多种产生软骨藻酸的藻种, 如 *P. actydropil*、*P. australis*、*P. delicatissima*、*P. multistriat*、*P. pungens*、*P. pseudodelicatissima*、*P. seriata*、*a* 以及不属于拟菱形藻属的一种硅藻 *Amphora coffaiformis* 等。但有的藻种, 如 *Amphora coffaiformis* 和 *P. multistriata*、*P. pungens* 只有极少的文献报道产毒, 其毒性状况并未得到普遍的认可。

不同藻种软骨藻酸的产生情况差异很大, 而且受到温度、营养盐等因素的影响, 但作用机制并不清楚。通常而言, 水温的上升能够促进软骨藻酸的产生, 但是, 一些冷水中也能够产生高浓度的软骨藻酸。营养物质显著影响藻毒素的产生, 以往的研究曾提出, 硝酸盐的增加能够提高藻细胞内毒素的含量, 使软骨藻酸合成速率增加^[8]; 连续培养条件下毒素产生的量与生长速率和硅的吸收成反比^[9]; 磷缺乏也可以导致毒素合成的增加, 软骨藻酸合成的增加与细胞碱性磷酸酶活性的增加成正比, 表明毒素合成也与磷限制有关^[10]。拟菱形藻广泛分布于全球海水中。有毒藻种的全球分布在某种程度上决定了软骨藻酸的污染可能成为一个全球性的问题。虽然我国已报道发现多种能够产生软骨藻酸的拟菱形藻, 如 *P. delicatissima*、*P. pungens*、*P. seriata*, 但迄今为止尚未有我国的这几种藻株产毒方面的报道。

神经性贝毒: 系由短裸甲藻 (*Gymnodinium breve*) 产生, 它常在墨西哥湾和佛罗里达沿岸形成赤潮, 引起鱼类大量死亡, 其所产生的毒素主要是短裸甲藻毒素 (BTX)。在各类贝类毒素中, BTX-B 最早被发现。其结构通过 X 射线衍射分析得到, 这是首个从甲藻中分离得到的聚醚化合物。随后 BTX-B 的两个同系物, BTX-C 和 *dihydrobrevetoxin B* 也先后从同一藻种中被分离出来, 此后, 毒性最高的组分 BTX-A 的结构也通过 X 射线衍射分析得到。除此之外, 还从同一种藻中分离得到了半短裸甲藻毒素 *hemibrevetoxin B*。在 1993 年新西兰的中毒事件中, 人们从贝类中分离得到了一些新的毒素成分, 如 BTX-B1、BTX-B2、BTX-B3, 这些组分在藻类中从未被发现过。虽然 BTX-B1 和 BTX-B2 保留了 BTX-B 毒素作用于钠离子通道的特征, 但却丧失了鱼毒性。

四、分布

麻痹性贝毒: 是迄今为止世界范围内分布最广、危害最大的一类赤潮生物毒素。其中石房蛤毒素 (saxitoxin) 最早在北美洲的石房蛤内发现, 随后有研究表明这类毒素实际上是来源于海水中的有毒甲藻。麻痹性贝毒在世界范围内的分布非常广泛, 随着人们对藻毒素问题的日益关注, 在世界上很多地方发现了贝类中存在麻痹性贝毒的污染问题。图 1-1 显示了 1970 年和 2000 年麻痹性贝毒 (PSP) 检出情况在全球的变化^[11]。