

# 贝类毒素检测中两种筛选方法的比较研究

刘莹\*, 陈溪, 崔晗, 黄大亮, 张晓林

(大连出入境检验检疫局庄河办事处, 庄河 116400)

**摘要:** **目的** 采用传统小鼠生物法(MBA)和酶联免疫吸附法(ELISA)对贝类样品中四类毒素进行检测, 为不同要求下建立或选择准确的贝类毒素检测快速筛选方法提供参考。**方法** 分别采用 MBA 和 ELISA 检测腹泻性贝毒(DSP)和麻痹性贝毒 (PSP), 并采用 ELISA 检测记忆缺损性贝毒(ASP) 和神经性贝毒(NSP)。**结果** 对 2009~2011 年 8 种 67 份贝类样品进行检测, 结果表明: 两种测试方法在实际应用中对 DSP、PSP 检测结果不存在差异, 检测结果有很好的吻合性。使用 ELISA 法对自制 ASP、NSP 模拟阳性样品进行检测, 均测得 ASP、NSP, 检测结果满意。**结论** 两种筛选方法在贝类毒素检测中均有其应用空间。实验室可根据不同情况选择合适的检测方法。

**关键词:** 贝类毒素; 小鼠生物法; 酶联免疫吸附法; 快速筛选; 检测

## Comparison of two screening methods in detection of shellfish poisons

LIU Ying\*, CHEN Xi, CHUI Han, HUANG Da-Liang, ZHANG Xiao-Lin

(Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Offices in Zhuanghe, Zhuanghe 116400, China)

**ABSTRACT: Objective** To determine four kinds of toxins in shellfish by using the methods of mouse bioassay(MBA) and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and provide references for the rapid detection of toxins in shellfish. **Methods** Diarrhetic shellfish poison and paralytic shellfish poison were detected by MBA and ELISA, while amnesic shellfish poison and neurotoxic shellfish poison were detected by ELISA. **Results** The experiment was conducted using a total of 8 kinds of 67 samples and the results showed that there were no differences between the detection results of diarrhetic shellfish poison and paralytic shellfish poison using the two methods. The result obtained by MBA was in good accordance with that of ELISA. **Conclusion** These two kinds of rapid screening methods in the detection of shellfish poison has its own application scope. The laboratory can choose a suitable detection method based on different situations.

**KEY WORDS:** shellfish poison; mouse bioassay; enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA); rapid screening; detection

贝类毒素根据毒性作用机制主要分为 4 类: 腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poison, DSP)、麻痹性贝毒 (paralytic shellfish poison, PSP)、记忆缺损性贝毒 (amnesic shellfish poison, ASP)、神经性贝毒 (neurotoxic shellfish poison, NSP)等。DSP 毒素主要引起腹泻, 可分成三类: 聚醚类毒素(如 OA 和 DTX)、大环聚醚内酯毒素(如 PTX) 和融合聚醚毒素(如 YTX)。PSP 是一类剧毒的含氯杂环有机化合物, 根据基团的相似性, 可分为三类: 氨基甲酰基类毒素

(carbamoyl toxin)、氨基甲酰基—N—磺基类毒素 (N-sulfo carbamoyl toxin)、去氨基甲酰基类毒素 (decarbamoyl toxin)。氨基甲酰基类毒素如石房蛤毒素 (saxitoxins, STX)、新石房蛤毒素(neosaxitoxins, neo-STX)和膝沟藻毒素(gonyautoxins, GTX1-4)。氨基甲酰基—N—磺基类毒素包括 GTX5 和 GTX6 等。脱氨基甲酰基类毒素包括 dcSTX、dcneoSTX、dcGTX1-4 等。ASP 主要成分软骨藻酸(domoic acid, DA)是一种具有生理活性的氨基酸类物质, 有 7 种异构体。NSP 主要

\*通讯作者: 刘莹, 女, 本科, 研究方向: 海洋生物毒素。E-mail: lnciqly@126.com

由短裸甲藻产生,目前已分离多达13种毒素,包括BTX-A、B和半短裸甲藻毒素B(hemibrevetoxins B)等<sup>[1]</sup>。

欧盟2002/225/EC对DSP设定了最高限量水平:其中OA/DTX和PTX的总量不能超过160 μg OA eq/kg; YTX及其衍生物不能超过1 mg YTX eq/kg; AZA不能超过160 μg AZA eq/kg。麻痹性贝类毒素国际许可的安全剂量是每100 mg贝类组织含80 g毒素(以STX计),相当于4 MU/g。欧盟提出ASP的允许含量水平为20 mg DA/kg。目前,对新鲜、冷冻或罐装制品牡蛎、蛤类和贻贝的NSP最大允许限量为0.8 mg/kg(即:20 MU/100 g)<sup>[2]</sup>。

近年来在海洋生物毒素检测方面用于快速筛选的方法多为小鼠生物法(mouse bioassay, MBA)与酶联免疫吸附法(ELISA)。本文通过研究这两种检测方法在不同贝类毒素检测中的应用,为不同要求下建立或选择快速准确的贝类毒素检测筛选方法提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

大田软海绵酸(okadaic acid, OA)、石房蛤毒素(saxitoxin, STX)、软骨藻酸(domoic acid, DA)标准品均购自加拿大国家研究委员会(National Research Council of Canada, NRC); 试剂盒:美国Abraxis公司; 实验动物:体重为18.0~21.0 g的健康ICR品系雄性小鼠(由大连医科大学提供); 丙酮、乙醚、盐酸、氢氧化钠、甲醇、二氯甲烷均为分析纯; 1%吐温-60生理盐水(分析纯); 试验所需样品均购置于海鲜市场,置3~4℃冷藏保存。

### 1.2 仪器与设备

全自动酶标仪(瑞士Sunrise公司); T-18均质器(德国IKA公司); R-215旋转蒸发器(瑞士BUCHI公司); 移液器(德国Eppendorf公司); MS3数显涡旋混合仪(德国IKA公司); 电热板(中国龙口市电炉制造厂); L15/12实验室马弗炉(捷克LAC公司); 3K15离心机(德国SIGMA公司); 一次性注射器:1 mL; PL203电子天平(梅特勒公司)。

## 2 实验部分

### 2.1 试样的制备

用清水将贝壳外表彻底洗净,用刀将闭壳肌切断,开壳,用清水淋洗内部去除泥沙及其他外来物,

取出完整贝肉。注意开壳前不要加热或使用麻醉剂,不要破坏闭壳肌以外的组织,尤其是中肠腺。收集约500 g贝肉置于3个10号筛子中沥水5 min(不要使肉堆积),检出碎壳等杂物。整个操作过程中,必须防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

### 2.2 小鼠生物检测法

#### 2.2.1 DSP小鼠生物检测法<sup>[3]</sup>

毒素提取:准确称量200 g贝肉(精确至0.1 g),仔细切取全部中肠腺,将中肠腺称重后置于均质杯内,加3倍量丙酮至少均质2 min; 倒入布氏漏斗中抽滤,收集滤液; 对残渣以检样两倍量丙酮再抽滤两次,合并抽滤液。将滤液移入圆底烧瓶中,56℃±1℃下,减压浓缩去除丙酮直至在液体表面分离出油状物。用100~200 mL乙醚溶解油状物,将浓缩物移入分液漏斗内,轻轻振荡,静置分层后去除水层。用相当乙醚半量的蒸馏水洗醚层2次,再将醚层移入圆底烧瓶中,减压浓缩去除乙醚。以少量乙醚将浓缩物移入50 mL茄形瓶中,再次减压浓缩去除乙醚。以1%吐温-60生理盐水将全部浓缩物在刻度试管中稀释到10 mL。

检测方法:取18.0~20.0 g健康ICR雄性小鼠6只,称重并记录重量,随机分为实验组和对照组两组,每组三只小鼠。使用涡旋混合仪使试液成为均一的悬浮液; 分别取1 mL待测液或1%吐温-60生理盐水腹腔注射小鼠。记录注射完毕至小鼠停止呼吸死亡的时间,未死亡的应连续观察24 h。在空白对照组小鼠正常的情况下,实验组若出现2只或3只小鼠死亡,则应按表1进行最小染毒量动物实验或最大稀释度实验。

计算方法:观察时限24 h内,在空白对照组小鼠正常的情况下,若检测样品组无小鼠死亡或仅有1只小鼠死亡,则报告检测样品中DSP毒力为:<0.05 MU/g。在空白对照组小鼠正常的情况下,若检测样品组有2只或3只小鼠死亡按表1进行动物实验并报告结果。

#### 2.2.2 PSP小鼠生物检测法<sup>[4,5]</sup>

PSP标准工作液的配制:将石房蛤毒素标准品用盐酸酸化至pH为3的蒸馏水配制为1 μg/mL石房蛤毒素标准液,置3~4℃冷藏保存。用10、15、20、25、30 mL的酸化蒸馏水分别稀释1 μg/mL的石房蛤毒素标准液10 mL,配制成系列浓度的标准稀释液。

表 1 注射量与毒力的关系

Table 1 Relationship of injection dose and virulence

试验液	注射量(mL)	检样量 <sup>1)</sup> (g)	毒力(MU/g)
原液	1.0	20	0.05
原液	0.5	10	0.1
4 倍稀释液	1.0	5	0.2
4 倍稀释液	0.5	2.5	0.4
16 倍稀释液	1.0	1.25	0.8
16 倍稀释液	0.5	0.625	1.6

注: 1) 以中肠腺为检样时, 相当于含有中肠腺的去壳肉量。

**毒素提取:** 取 2.1 中制备的样品 100 g 于 800 mL 烧杯中, 加 0.18 mol/L 盐酸溶液 100 mL 充分搅拌, 均质, 调整 pH 在 2.0~4.0 范围内; 必要时, 可逐滴加入 5 mol/L 盐酸溶液或 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调整 pH, 加碱时速度要慢, 同时需不断搅拌, 防止局部碱化破坏毒素。将混合物加热, 并文火煮沸 5 min, 冷却至室温, 将混合物移至量筒中并稀释至 200 mL, 调节 pH 至 2.0~4.0 (pH 值切勿 > 4.5)。将混合物倒回烧杯, 搅拌均匀, 自然沉降至上清液呈半透明状, 不堵塞注射针头即可, 必要时将混合物或上清液以 3000 r/min 离心 5 min, 或用滤纸过滤。收集上清液备用。

**检测方法:** 1) 每只小鼠试验前称重, 以 10 只小鼠为一组, 用中位数死亡时间在 5~7 min 范围内的三个浓度含量的标准稀释液注射小鼠, 测定并记录每只小鼠腹腔注射完毕至停止呼吸的所需死亡时间。本实验所得小鼠中位数死亡时间在 5~7 min 的标准稀释液浓度试验组 1 为 18 mL 酸化蒸馏水+1 μg/mL 石房蛤毒素标准液 10 mL; 试验组 2 为 19 mL 酸化蒸馏水+1 μg/mL 石房蛤毒素标准液 10 mL; 试验组 3 为 20 mL 酸化蒸馏水+1 μg/mL 石房蛤毒素标准液 10 mL。

**毒素转换系数的计算:**

$$CF = \frac{C}{CMU} \quad (1)$$

式中:

CF—毒素转换系数;

C—每毫升 STX 实际毒素含量, 单位为微克每毫升(μg/mL);

CMU—校正鼠单位(鼠单位×小鼠的重量校正因子)。

计算每组 10 只小鼠的平均 CF 值, 即为组内毒素转换系数。各组内毒素转换系数的平均值即为组间毒素转换系数。

表 2 石房蛤毒素标准液注射所得毒素转换系数

Table 2 Shellfish poison conversion coefficient of injected STX stranded solvent

试验组	W	t	CF
1	19.86±0.16	354.00±34.79	0.220±0.02
2	19.96±0.22	347.50±42.38	0.207±0.03
3	19.98±0.18	344.50±41.26	0.199±0.02

注: W 为小鼠体重(g); t 为小鼠死亡时间(s)。

本次试验所得组内毒素转换系数 CF1=0.220、CF2=0.207、CF3=0.199 组间毒素转换系数 CF 为 0.209。

2) 取 19.0~21.0 g 健康 ICR 雄性小鼠 6 只, 称重并记录重量。随机分为实验组和空白对照组(0.18 mol/L 盐酸)两组, 每组三只。对每只试验小鼠腹腔注射 1 mL 提取液或空白对照液。记录注射完毕时间, 仔细观察并用秒表记录小鼠停止呼吸时的死亡时间(到小鼠呼出最后一口气止)。若注射样品原液后, 1 只或 2 只小鼠的死亡时间大于 7 min, 则需再注射至少三只小鼠以确定样品的毒力。若小鼠的死亡时间小于 5 min, 则要稀释样品提取液后, 再注射另一组小鼠(3 只), 直至得到 5~7 min 的死亡时间; 稀释提取液时, 要逐滴加入 0.18 mol/L 盐酸溶液, 调节 pH 至 2.0~4.0。

**计算方法:** PSP 毒力的计算与结果表述: 每 100 g 样品中 PSP 的含量按公式(2)计算。

$$X = CMU1 \times CF \times DF \times 200 \quad (2)$$

式中:

X—每 100 g 样品中 PSP 的含量(μg/100 g);

CMU1—检测样品受试组小鼠的中位数校正鼠单位;

CF—组间毒素转换系数;

DF—稀释倍数;

200—表示样品提取液定容的体积, 单位为毫升(mL)

## 2.3 酶联免疫吸附法

### 2.3.1 ELISA 法毒素的提取

**DSP 毒素提取:** 配置 80% 的甲醇水溶液(甲醇:去离子水, 80:20); 用去离子水洗净按 1.3.1 所处理的样品, 用均质器均质; 称取 1 g 均质后的样品(精确至 0.1 g)加入 6 mL 80% 的甲醇水; 3500 r/min 离心 10 min, 收集上清液; 加 2 mL 80% 的甲醇水到残渣中 4 °C 3500 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 加入到上述上清液中; 用 80% 的甲醇水定容到到 10 mL。

**PSP 毒素提取:** 称取 10 g 按 1.3.1 所处理的均质后的样品(精确 0.1 g)加入 10 mL 80% 0.1 mol/L HCl, 煮沸 5 min, 边煮沸边搅拌; 冷却后 3500 r/min 离心 10 min; 用 5 mol/L HCl 调节 pH 至 4.0 以下, 定容至 10 mL。

**ASP 毒素提取:** 称取 0.5 g 按 1.3.1 所处理的均质后的样品(精确至 0.01 g), 加入 2 mL 甲醇/蒸馏水 (50/50), 涡旋振荡 1 min。3000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。用 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤上清液, 得到样品提取液。移取 20  $\mu\text{L}$  收集的上清液用样品稀释液稀释到 1 mL。

**NSP 毒素提取:** 称取 1.00 g 按 1.3.1 所处理的均质后的样品(精确至 0.01 g), 放入 40 mL 的玻璃瓶中, 然后加入 9.0 mL 甲醇/去离子水溶液(9: 1, v/v); 盖住瓶子, 摇动 2 min; 3000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。

高浓度的样品, 如超出标准曲线范围, 可进一步用缓冲液稀释, 直至样品浓度在标准曲线范围以内。

### 2.3.2 ELISA 法毒素的检测及计算

**检测方法:** 使用前试剂盒中溶液要恢复到室温;

按说明书要求配制样品稀释缓冲液和洗液。将足够数量的微孔条插入微孔架(标准液和样液分别做复孔), 记录标准液和样液的位置。按说明书操作要求进行相关试剂的添加操作。用酶标仪在 450 nm 下读取每个孔的吸光度值(OD), 此操作在加入终止液 15 min 内完成测量。

**计算方法:** 计算各毒素试剂盒标准液或样液的平均吸光度值, 通过对比阴性控制样品孔的读数求得每个毒素标准液或样液的百分比吸光度值。以百分比吸光度值为纵坐标, 毒素标准溶液浓度(ng/mL)的对数值为横坐标, 绘制标准曲线。每次试验均应重新绘制标准曲线, 或通过软件计算出浓度与百分比吸光度值间的标准曲线公式。

本次试验 DSP、PSP、ASP、NSP 标准溶液吸光度值见表 3-表 6。

将所得待测孔吸光度值带入相应曲线公式得到待测样品中 DSP、PSP、ASP、NSP 浓度, 再乘以样品稀释倍数即为原始样品中毒素浓度。得到本方法检测低限 DSP 为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; PSP 为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; ASP 为 1  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; NSP 为 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 3 DSP 标准溶液吸光度值  
Table 3 Absorbance value of DSP stranded solvent

编号	浓度(ng/mL)	DSP 标准溶液吸光度值		平均吸光度值	百分比吸光度值
		微孔 1	微孔 2		
A	0.0	1.402	1.387	1.395	1.000000
B	0.1	1.109	1.110	1.110	0.795626
C	0.2	0.962	0.958	0.960	0.688419
D	0.5	0.691	0.694	0.693	0.496594
E	1.0	0.514	0.520	0.517	0.370742
F	2.0	0.362	0.358	0.360	0.258157
G	5.0	0.203	0.206	0.205	0.146648

表 4 PSP 标准溶液吸光度值  
Table 4 Absorbance value of PSP stranded solvent

编号	浓度(ng/mL)	PSP 标准溶液吸光度值		平均吸光度值	百分比吸光度值
		微孔 1	微孔 2		
A	0.00	2.018	2.101	2.060	1.000000
B	0.02	1.790	1.788	1.789	0.868657
C	0.05	1.404	1.388	1.396	0.677834
D	0.10	0.927	0.929	0.928	0.450595
E	0.20	0.583	0.559	0.571	0.277252
F	0.40	0.364	0.314	0.339	0.164603

表 5 ASP 标准溶液吸光度值  
Table 5 Absorbance value of ASP stranded solvent

编号	浓度(ng/mL)	NSP 标准溶液吸光度值		平均吸光度值	百分比吸光度值
		微孔 1	微孔 2		
A	0.00	0.901	0.868	0.885	1.000000
B	0.50	0.645	0.640	0.643	0.726399
C	1.00	0.518	0.513	0.516	0.582815
D	2.00	0.432	0.399	0.416	0.469757
E	5.00	0.231	0.209	0.220	0.248728
F	10.00	0.141	0.155	0.148	0.167326

表 6 NSP 标准溶液吸光度值  
Table 6 Absorbance value of NSP stranded solvent

编号	浓度(ng/mL)	NSP 标准溶液吸光度值		平均吸光度值	百分比吸光度值
		微孔 1	微孔 2		
A	0.00	1.398	1.390	1.394	1.000000
B	0.01	0.927	0.933	0.930	0.667145
C	0.025	0.748	0.745	0.747	0.535509
D	0.05	0.692	0.641	0.667	0.478121
E	0.10	0.585	0.566	0.576	0.412841
F	0.25	0.483	0.452	0.468	0.335366
G	0.50	0.385	0.362	0.374	0.267934
H	2.00	0.151	0.149	0.150	0.107604

### 3 结果与讨论

#### 3.1 结果

本次试验采用传统小鼠生物法检测 DSP 和 PSP, 用酶联免疫吸附法检测 DSP、PSP、ASP 和 NSP, 结果见表 7。实验结果表明两种检测方法所得结果相吻合, 其中 PSP 通过两种检测方法所得结果均可用  $\mu\text{g}/\text{kg}$  进行描述, 有着很好的可比性。

本试验对 2009~2011 年包括扇贝、牡蛎、贻贝等贝类产品共 8 种 67 份样品, 分别采用传统小白鼠生物法和酶联免疫吸附法对 DSP 和 PSP 进行检测, 结果表明两种测试方法在实际应用中对 DSP、PSP 检测结果不存在差异, 检测结果有很好的吻合性(见表 8)。使用 ELISA 法对自制 ASP、NSP 模拟阳性样品进行检测, 均测得 ASP、NSP, 检测结果满意。

#### 3.2 讨论

##### 3.2.1 两种快速筛选方法比较

小鼠生物检测法是检测贝类组织中 DSP、PSP、NSP 最普遍、常用的传统检测方法。该方法的优点是可表达样品中实际毒素的总量, 可靠性强; 技术容易掌握; 不需要复杂设备且操作程序简便易行, 使用

广泛。小鼠生物检测法在贝类毒素的毒理学研究方面有着不可替代的作用, 目前依然被许多国家接受和采用。小鼠生物检测法缺点是该方法检测周期长; 缺乏特异性, 只能检测总体毒性的大小, 无法确定毒素的组分和含量; 需大量使用小鼠, 不符合“3R”的要求; 生物体本身存在个体差异, 试验结果会因所采用小鼠的不同而有差异, 重复性差; 人为操作误差较大; 该法测定高毒性贝类样品时存在变异性较高的缺陷<sup>[10]</sup>; 灵敏度、精确度较低。

免疫方法包括 ELISA(酶联免疫吸附检测)、RIA(放射免疫分析)、EIA(竞争性酶免疫分析)及 S-PIA 法(固态免疫珠检测)等<sup>[11]</sup>。免疫测定法适用于贝类毒素检测的免疫学诊断方法, 主要有 ELISA 法、放射免疫(RIA)法, 这些方法均需制备贝类毒素的抗体。免疫学方法耗时短, 灵敏度高, 检出限低, 并且携带方便, 适于现场监测, 同时具有仪器设备投资少、检测成本低、样品前处理简便等优点, 已经越来越受到关注。现有多种可靠的诊断试剂盒用于分析不同毒素, 已成为德国的官方方法, 并被美国官方农业化学家协会(AOAC)推荐使用。ELISA 法的使用可替代部分动物试验用于样品的初筛。但是 ELISA 法通

表7 MBA法和ELISA法测得样品中四种贝类毒素结果  
Table 7 Detection of 4 kinds of shellfish poisons with MBA and ELISA method

编号	样品名称	DSP 测定结果		PSP 测定结果		ASP、NSP 测定结果	
		MBA (MU/g)	ELISA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MBA ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	ELISA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ASP ELISA ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	NSP ELISA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1	扇贝 (7月购买)	ND <sup>2</sup>	ND	75.24	810.5	ND	ND
2	扇贝 (8月购买)	0.1	386	78.24	824.2	ND	ND
3	牡蛎 (3月购买)	ND	ND	ND	ND	1.24	ND
4	牡蛎 (6月购买)	ND	ND	ND	ND	ND	0.045
5	贻贝 (7月购买)	ND	ND	61.86	685.8	ND	ND
6	贻贝 (11月购买)	0.05	203	ND	ND	ND	ND
7	杂色蛤 (4月购买)	ND	ND	ND	ND	ND	0.061
8	杂色蛤 (8月购买)	ND	ND	ND	ND	2.48	ND

注: 1、ASP、NSP 阳性样品为自制模拟阳性样品; 2、一个编号代表一份样品; 3、ND 表示低于检测下限。

表8 实际应用中ELISA与MBA法检测四种贝类毒素结果  
Table 8 The detection results of 4 kinds of shellfish poisons with the MBA and ELISA method

名称	数量	ELISA 检测 DSP 结果			ELISA 检测 PSP 结果			ELISA 法检测 ASP、NSP 阳性率	
		阴性数	阳性数	吻合率	阴性数	阳性数	吻合率	ASP 阳性数	NSP 阳性数
扇贝	9	6	3	100%	6	3	100%	1	2
缢蛭	6	6	0	100%	6	0	100%	0	0
贻贝	9	8	1	100%	8	1	100%	0	1
夏夷贝	8	7	1	100%	6	2	100%	0	0
牡蛎	7	6	1	100%	6	1	100%	1	1
文蛤	6	6	0	100%	6	0	100%	0	0
青柳蛤	5	5	0	100%	5	0	100%	0	0
杂色蛤	17	17	0	100%	17	0	100%	3	1
总计	67	61	6	100%	60	7	100%	5	5

常只有在单一毒素存在并且其抗体特异性高的情况下, 样品中毒素浓度的测量与它的毒性直接相关。而在其它情况下, 免疫学方法只能用于样品的筛选或定性方法, 不能作为定量方法。而且试剂盒存在价格昂贵、保质期短, 较难满足应急检测需要的缺点。

### 3.2.2 其他检测方法

高压液相色谱技术(HPLC)是被国内外普遍接受的检测贝毒的仪器分析方法。近年以 HPLC 分离原样或净提取物为基础, 用物理和化学方法进行特异性毒素检测技术发展很快, 例如紫外线(LC-UV)应用于 DA 毒素的检测; 荧光法(LC-FL)测定 OA、STX 和

dc-STX 毒素或质谱分析法(LC-MS)检测贝类毒素<sup>[12]</sup>。与其他检测方法相比较 HPLC 具有明显的优越性: 灵敏度高; 专一性强; 在酸性条件下不稳定的基因如氨甲酰基、磺基在分析的过程中不会解离, 缩短了分析时间; 通过自动注射技术能处理更多的样品, 便于进行毒素监控; 能够提供关于毒素的更多信息, 能够测出每一个组分的具体含量及毒性的大小, 从而有助于比较或了解毒素种类的差异。HPLC 法是唯一能定性、定量检测出各种毒素组分的技术, HPLC 法发展非常迅速并极可能替代小鼠检测法成为主要的检测方法<sup>[13]</sup>。

化学仪器分析技术检测贝毒也有许多不足之处,如化学检测的仪器采用的柱后衍生荧光检测技术,必须严格控制条件才能获得理想的结果。近些年来,贝毒的分析领域不断涌现出一些新的技术,例如应用液相色谱-质谱联用技术,毛细管电泳技术等。然而相对于传统的液相色谱技术,这些方法还有待于进一步完善。由于食品(动物组织)的背景基底非常复杂,样品间差异又相当大,采用LC-MS(MS/MS)技术测定食品中贝类毒素的关键是样品的前处理。目前国内文献方法多采用固相萃取法进行纯化与浓缩,最常用的固相萃取柱是C<sub>18</sub>烷基键合硅胶,还有CN基键合硅胶或离子交换剂,非键合硅胶也有很好的纯化和萃取效果。此外还有各种溶剂提取方法,液相色谱制备法和超临界流体萃取法等。食品(水产品)中的贝类毒素残留量甚微,一般为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平,而且基质复杂,在此混合物中分析某种痕量成分并加以鉴别,常常是对分析化学家的挑战<sup>[14-16]</sup>。化学仪器分析技术在测定效率、测定批量和成本等方面不具有优势,不适合快速现场检测。

#### 4 结 论

本实验应用两种快速筛选方法对样品中 DSP、PSP、ASP、NSP 进行检测得出结论:两种实验方法测得 DSP、PSP 所得结果吻合,充分证明两种方法均可应用于贝类中 DSP、PSP 的检测。使用 ELISA 法对自制 ASP、NSP 模拟阳性样品进行检测,均测得 ASP、NSP,检测结果满意。根据两种快速筛选方法的优缺点不同,实验室可选择合适的方法进行检测工作。两种方法相结合可以确保检测结果更准确,更具说服力。

#### 参考文献

- [1] Alexander J, Benford D, Boobis A, *et al.* Marine biotoxins in shellfish—domoic acid[J]. *EFSA J.* 2009, 1181: 1–61.
- [2] FDA/CFSAN. Hazard analysis critical control point(HACCP)-Appendices (Seafood)[J], Generic Import Product Specification, Update.1997, 25(4): 11 .
- [3] GB/T 5009.212-2008, 贝类中腹泻性贝类毒素的测定[S].

- [4] GB/T 5009.213-2008, 贝类中麻痹性贝类毒素的测定[S].
- [5] SC/T 3023-2004, 麻痹性贝类毒素的测定生物法[S].
- [6] Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1984). Arlington, V.A. “Official Methods of Analysis” 18.086-18.092 (Adams, W.N. and Miescier, J. J.) *J Assoc Off Anal Chem*, 1980, 63: 1336.
- [7] 王茜,程金平,高利利,等.记忆缺失性贝毒软骨藻酸的污染现状及检测技术[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(26): 16070–16073, 16136.
- [8] SNT 1573-2005, 贝类中神经性贝类毒素检验方法 小鼠生物法[S].
- [9] APHA, Method for *Ptychodiscus brevis* toxins in Laboratory procedures for the examination of seawater and shellfish, 5th ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 1985: 64–80.
- [10] John J Sullivan. 分析贝类中腹泻性毒素(DSP)与麻痹性毒素(PSP)的方法[J]. *中国海洋药物*, 1991, 10(4): 43.
- [11] Hallegraeff GM. Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO, France: IOC Manuals and Guides No. 33. 1995: 182–199.
- [12] Fux E, McMillan D, Bire R, *et al.* Development of an ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1157(1–2): 273–280.
- [13] 王海明,王友强. 海洋生物毒素[J]. *浙江省医学科学院学报*, 2001, 12(2): 48.
- [14] 曹际娟,卫锋. 贝类毒素检测技术及研究进展[J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(1): 53–36.
- [15] 李伟才,栾刚,李立,等. 我国沿海部分海区贝毒毒素的调查[J]. *海洋学*, 2000, 24(9): 19–22.
- [16] 陈则玲,付云娜,巩宁. 腹泻性贝毒及其高效液相色谱检测方法[J]. *海洋通报*, 2000, 19(1): 73–78.

(责任编辑:张宏梁)

#### 作者简介



刘莹,女,本科,研究方向:海洋生物毒素。

E-mail: lnciqly@126.com