

# 腹泻性贝类毒素及检测技术研究进展

刘晓玉<sup>1</sup>, 徐静<sup>2</sup>, 黄莲芝<sup>2</sup>, 邵筠乔<sup>2</sup>, 刘慧颖<sup>2</sup>, 曹际娟<sup>2\*</sup>, 李丹丹<sup>1</sup>

(1. 大连工业大学, 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

**摘要:** 近些年来海洋污染越来越严重, 赤潮频发直接导致海洋生物毒素对贝类产品大面积污染, 这不仅直接影响海洋产品的品质和食用安全, 更加阻碍了海洋养殖业的健康发展, 对食品安全造成极大威胁。为了解决海洋产品的食品安全问题, 保障人们生命健康, 对海洋生物毒素分析检测的研究已越来越多。本文综述了腹泻性贝类毒素的主要特征、主要毒素成分及毒理效应, 并对小鼠生物测试法、酶联免疫检测法、胶束电动色谱法、酶活力抑制法、毛细管电泳法、高效液相色谱以及高效液相色谱-质谱法等常用的检测方法作以综合性评价, 并对其研究进展加以介绍。

**关键词:** 贝类; 腹泻性贝毒; 生物毒素检测技术

## Research progress on diarrhetic shellfish poison and the detection methods

LIU Xiao-Yu<sup>1</sup>, XU Jing<sup>2</sup>, HUANG Lian-Zhi<sup>2</sup>, SHAO Jun-Qiao<sup>2</sup>, LIU Hui-Ying<sup>2</sup>,  
CAO Ji-Juan<sup>2\*</sup>, LI Dan-Dan<sup>1</sup>

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

**ABSTRACT:** In recent years, marine pollution has become more and more serious. The frequent occurrence of red tides directly leads to marine toxins pollution on shellfish, which not only directly affect the quality and safety of marine products, but also hinder the healthy development of the marine aquaculture industry. In order to solve the safety problem of marine products and protect people's life and health, the analysis and detection of marine biological toxins has been more and more concerned. The main characteristics, toxin components and toxicological effect of the diarrhea shellfish poisoning were reviewed in this paper. The detection methods including mouse bioassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), molecular biological detection, micellar electrokinetic chromatography, enzyme inhibition methods, capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography(HPLC), high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) were used to evaluate the comprehensive evaluation, and were also summarized in this paper.

**KEY WORDS:** shellfish; diarrhetic shellfish poison; biological toxin detection methods

## 1 引言

近些年来海洋污染越来越严重, 有害赤潮频发和海

洋生物毒素对海洋产品的大范围污染, 直接影响了海洋产品的品质和食用安全, 这不仅给人们留下极大的安全隐患, 并且极大阻碍了海洋养殖业的可持续发展。海洋生物毒素

基金项目: 国家质检公益性行业科研专项(201310141)

**Fund:** Supported by the National Quality Inspection of Public Welfare Industry Research Projects (201310141)

\*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测的研究。E-mail: cjj0909@163.com

\*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Researcher, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.60 Changjiang East Road, Dalian 116034, China. E-mail: cjj0909@163.com

大多由藻类或浮游植物产生, 根据化学结构可将其大致分为多肽类毒素、聚醚类毒素和生物碱类毒素 3 大类。也可以根据毒性作用机制分为 4 大类毒素, 分别是腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning, PSP)、神经性贝类毒素(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)和记忆缺损性贝类毒素(amnesic shellfish poisoning, ASP), 其中因腹泻性贝类毒素在世界海域分布广、对人体危害大而受到人们的关注和重视。本文主要综述了腹泻性贝类毒素结构特征、主要成分及相应毒理效应, 并对其常用的检测方法、原理及研究进展加以介绍。

## 2 腹泻性贝类毒素

### 2.1 化学结构与理化性质

腹泻性贝类毒素(DSP)是一类脂溶性物质, 其化学结构是聚醚或大环内酯化合物<sup>[1]</sup>, 不易溶于水, 热稳定性极高, 通常的加热处理不易破坏。DSP 毒素分子结构中含有 1 个饱和的 5,6,6-三螺环基团和一个饱和的 6,6-二螺环, 还有一个不饱和的 6,6-二螺环<sup>[2]</sup>。见图 1。DSP 毒素分子结构中的羧基官能团与荧光物质反应, 生成的荧光性物质可被液相色谱的荧光检测器检测。

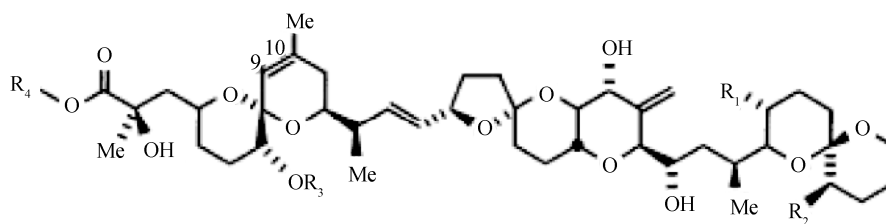
腹泻性贝类毒素主要分为软海绵酸(okadaic acid, OA)、鳍藻毒素(dinophysistoxin, DTX)、蛤毒素(pecteno-toxins)和虾夷扇贝毒素(yessotoxins, YTX)。大田软海绵酸的二醇酯衍生物<sup>[3-5]</sup>类型主要有 OA-1、OA-2、OA-3、OA-4、OA-5 和 OA-6, 鳍藻毒素的主要衍生物是 DTX-1、DTX-2、DTX-3、DTX-4、DTX-5a 和 DTX-5b。软海绵酸(OA)和鳍藻毒素衍生物(DTXs)有着密切的联系, 两者不仅结构十分相似, OA 和 DTX-2 还互为同分异构体, 并且 DTX-3 是 7-O-acyl-DTX-1。

OA 和 DTXs(鳍藻毒素衍生物总称)毒素对蛋白磷酸

酶 1(PP1)和蛋白磷酸酶 2A(PP2A)型的蛋白磷酸酶的抑制作用具有高效性和专一性<sup>[6]</sup>, 其中 OA 和 DTX 毒素对 PP2A 的抑制能力比 PP1 高千倍, 而 OA 还可以对蛋白磷酸酶 3(PP3)和蛋白磷酸酶 4(PP4)产生抑制作用<sup>[7]</sup>。利用这一性质人们开发了 OA 检测相关技术以及电化学检测酶传感器<sup>[8-10]</sup>。OA 不仅对蛋白质的超磷酸化以及增生基因的表达有促进作用, 还具有明显致癌作用<sup>[6,11]</sup>, 对霉菌有极强的抑制能力<sup>[12]</sup>。OA 和 DTX-1 对成人的最小致死量分别为 48  $\mu\text{g}$  和 38.4  $\mu\text{g}$ <sup>[2]</sup>。有报道称, 贝类产品肝脏内 OA 和 DTX-1 毒素的含量分别超过 2  $\mu\text{g/g}$  和 1.8  $\mu\text{g/g}$ , 被人类食用就会产生毒害作用<sup>[13]</sup>。目前, 欧美等一些发达国家对冷藏鲜贝肉腹泻性贝毒的最高允许限量 0.8  $\mu\text{g/g}$ <sup>[14]</sup>。

### 2.2 中毒途径与毒性

在世界许多海域的贝类中都发现有腹泻性贝毒的存在, 在一定程度上它的种类决定于地理位置。我国北方黄海、渤海等养殖区的贝类产品多被腹泻性贝类毒素所污染<sup>[15]</sup>; 从爆发时间来看, 每年 4~11 月份是贝类产品收获的季节, 也是腹泻性贝毒高发期<sup>[15,16]</sup>; 以季节来看, 发生在夏季的居多, 尤其是初夏。DSP 毒素在贝类脂肪组织内大量积累, OA 和 DTXs 毒素通过进行酰化反应, 都能连接上一个饱和或不饱和的 C14~C22 长度不一的脂肪酸化合物<sup>[13,17]</sup>, 而这些酰化衍生物也具有毒性, 有人认为这些酰化衍生物是贝积累毒素后的代谢产物<sup>[17]</sup>。在碱性条件下加热水解这些酰化衍生物, 就可以都得到原来的 OA 和 DTXs 毒素。OA 毒素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<sup>[7]</sup>。OA 通过激活肠道细胞内环磷酸腺苷(cAMP)介质系统而引起腹泻, 它依赖 cAMP 的蛋白激酶随着细胞内 cAMP 的升高而被激活, 蛋白质磷酸化, 细胞大量分泌水、氯及碳酸盐, 抑制细胞对钠的正常吸收, 从而导致水泻<sup>[18]</sup>。



| 毒素名称                     | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|--------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| okadaic acid, OA         | CH <sub>3</sub> | H               | H              | H              |
| Dinophysistoxin-1, DTX-1 | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | H              | H              |
| Dinophysistoxin-2, DTX-2 | H               | CH <sub>3</sub> | H              | H              |
| Dinophysistoxin-3, DTX-3 | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> | Acyl           | H              |

图 1 腹泻性贝类毒素化学结构

Fig. 1 Structure of diarrhetic shellfish toxins

腹泻性贝毒中毒的主要症状是腹泻、恶心、呕吐和腹部疼痛等,但有些腹泻性贝毒根本不会导致腹泻。中毒症状可能会持续3 d,不会留下后遗症更不会致命。

### 3 腹泻性贝类毒素的生物检测分析方法

#### 3.1 小鼠生物测试法

小鼠生物测试法是目前国内检测 DSP 毒素普遍认可的常规方法<sup>[19]</sup>,其具体操作是:用丙酮提取贝类中 DSP 毒素,经乙醚分配后,减压旋转蒸干后溶解到1%的吐温-60生理盐水中,再以含1%吐温-60的生理盐水为分散介质,制备 DSP-1%吐温-60生理盐水混悬液,提取液注射到体重约为20 g的小鼠腹腔内,在24~48 h观察其病理效应。

小鼠生物测试法的优点是检测技术简单、方法易掌握、仪器简易,不需要精密的高端仪器和专门的操作人员。缺点是: DSP 毒素是亲脂性聚醚类化合物,无特异性,为保证毒素的提取效率,样品提取步骤相当繁琐和复杂,另外,小鼠法不能有效地分析 DSP 毒素的组分,并且小鼠死亡时间的判断受主观因素、实验室饲养条件以及实验人员操作手法影响,样品中生物基质成分复杂、干扰程度比较大,特别是游离脂肪酸对小鼠毒性影响很大,常常造成假阳性<sup>[20-23]</sup>。因此,尽管小鼠生物测试法一直是海洋毒素检测分析的常用检测方法,却不能成为标准测试方法。

#### 3.2 免疫分析法

免疫分析法主要利用特异性抗原-抗体结合来检测药物、激素、蛋白质、微生物等物质的定量分析方法。免疫分析主要包括放射免疫分析(RIA)和酶联免疫分析(ELISA)。酶联免疫分析方法以特异性抗体-抗原的反应为基础,将待测物与酶连接,酶与底物发生显色反应,所建立的一种用于定量测定的免疫分析技术,因其特异性强、灵敏快速、操作简便,不需要大型精密的检测设备以及专门的技术人员,对于现场和大批量样本的分析检测具有优越性,近年来在海洋生物毒素的快速检测中应用越来越广泛,有很多的生物公司都研发出用于 DSP 毒素的酶试剂盒。

Garthwaite 等<sup>[24]</sup>建立了4类贝毒(ASP、NSP、DSP和PSP)的酶联免疫分析法,具有很高的灵敏度,可以满足对贝类提取物中可疑样品的鉴定,并发现使用酒精提取样品所有毒素都有很好的回收率。宋向明等<sup>[25]</sup>使用酶联免疫法测定牡蛎中腹泻性毒素在样品中添加1.0、3.0和5.0 μg/kg腹泻性毒素标准品,平均回收率分别达到88.0%、86.7%和88.6%。李军涛等<sup>[26]</sup>建立腹泻性贝类毒素免疫荧光层析纸条检测方法,其灵敏度能够达到0.125 μg/mL,完全达到了我国贝类产品中 DSP 所允许的限量,甚至超过了美国200 μg/kg的检测限量。

刘仁沿<sup>[27,28]</sup>通过细胞融合,制备抗软海绵酸单克隆抗

体和胶体金标记抗体,建立快速检测软海绵酸的免疫层析试纸条分析方法,该方法检出限为500 ng/mL,并在此技术上改进,使用卵清蛋白合成高偶联比的包被抗原,以硝酸纤维素膜为载体,改进后方法检出限可达12 ng/mL。张洋等<sup>[29]</sup>首次应用自行研制开发的免疫胶体金试纸条,对双壳贝类腹泻性贝毒的主要成分大田软海绵酸的污染情况进行调查,实验结果验证:应用免疫胶体金试纸条检测贝类样品与 ELISA 检测结果100%吻合,且检测结果准确可靠,没有假阳性的出现,基本满足对 OA 安全食用标准的检测要求。

免疫分析法因具有高特异性和灵敏度、样品前处理操作简便、检测用样少、适用于大批量检测等优点使其在海洋生物毒素检测分析中得到广泛使用。酶联免疫分析法中所采用的抗体专一性较强,仅与 OA 和 DTX-1 反应,且与其他毒物反应,灵敏度可达 $10^{-9}$ ,其敏感性要比相应的小鼠生物法或 HPLC 法高得多,检测级可以达到 $10^{-12}$ 级<sup>[13]</sup>。但对于生物基质成分较多的毒素,交叉反应难以避免,导致实验结果的重现性较差。

#### 3.3 细胞毒性测试法

细胞毒性测试法原理是利用贝类毒素与细胞膜上的敏感成分相互作用启动特异反应,根据细胞膜通透性的改变来进行细胞毒性的检测。细胞毒性测试法检测 DSP 原理是使用小鼠正常的细胞或者肿瘤细胞作为受试细胞,加入 OA 毒素标准品或样品提取物,在最适的实验条件下培养细胞24 h,在细胞培养终止前4 h加入0.5% MTT,作为细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶的底物参与反应,细胞活化增殖时通过线粒体能量代谢过程,将 MTT 代谢形成紫蓝色的甲瓖沉积于细胞内或细胞周围,甲瓖可经异丙醇或二甲亚砷完全溶解,可用酶标仪测定细胞培养物的 OD 值。因甲瓖形成的量与细胞活化增殖的程度成正比,故可根据 OD 值反映细胞活化增殖情况<sup>[30]</sup>。

陈洋<sup>[31]</sup>用小鼠皮肤细胞、人肝细胞、人肝癌细胞和小鼠神经瘤细胞作为受试细胞对 DSP 毒素的重要组分—OA 毒素和其他几种成分进行 MTT 比色细胞毒性测试实验,实验结果表明,OA 毒素对这4种细胞的增殖呈显著抑制作用,且抑制作用与毒素剂量呈正相关。但 Dickey 等<sup>[32]</sup>研究发现,在毒性测试过程中很容易造成细胞大面积死亡,且不同实验室、不同操作条件以及不同操作人员实验差异性很大,即重现性极差,甚至结果可能相差几千倍,所以细胞毒性测试法的应用范围受到极大的限制。

#### 3.4 酶活力抑制分析法

酶活力抑制分析法检测 DSP 毒素基于 OA 和 DTXs 毒素抑制蛋白磷酸酶的酶活力的特点所建立的一种生物化学测试法。在 Tubaro<sup>[33]</sup>、Honkanen<sup>[34]</sup>和 Mountfort<sup>[35]</sup>等基础上,李爱峰等<sup>[36]</sup>利用 OA 对 PP2A 酶活力抑制的特性,选择在酶催化反应后产生荧光产物的一种物质作为底物,依

据酶反应过程中产物产生的速率来指示酶活力受抑制的程度, 进而计算抑制剂 OA 的浓度, 建立了碱性蛋白磷酸酶活力变化检测 OA 毒性当量的酶活力抑制分析法。赵前程等<sup>[37]</sup>也建立了检测贝类中 OA 毒素抑制磷酸酶法, 并得到其定性检测限和定量检测限分别为 30.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 70.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 3.5 毛细管电泳法

毛细管电泳是近几年发展起来的具有高效灵敏、操作简便、检测快速等优点的分析检测技术, 在海洋生物毒素检测分析有广阔的应用前景, 目前已在腹泻性贝类毒素分离分析中得到应用。Bouaïcha 等<sup>[38]</sup>首先用配有紫外检测器的毛细管胶束电动电泳对贻贝中的 OA 与 DTX-2 毒素进行检测, 但是由于缓冲液选择不佳, 导致实验效果不是很理想。在此基础上, Li 等<sup>[39]</sup>优化了该方法的实验条件, 建立了检测 OA 与 DTX-2 的毛细管胶束电动色谱技术, 并得到该方法检测限为 3.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。张基木等<sup>[40]</sup>建立了 OA 和 DTX-1 毒素的高效毛细管电泳分离分析方法, 将大体积进样的柱富集法巧妙地运用于胶束毛细管电动色谱, 考察了运行缓冲液的 pH、胶束浓度、缓冲液浓度、进样时间和电渗流排基体时间等因素对富集的影响。

## 4 腹泻性贝类毒素化学分析法

### 4.1 气相色谱法

气相色谱法主要是利用混合物中各组分沸点、吸附能力、极性、极性等物理性质的不同, 进行分离、分析的一种以气体为流动相的色谱分析方法。气相色谱法对直接挥发成气体或者一定温度下转化成气体的生物毒素进行检测分析, 针对极性、不宜挥发、性质稳定的物质不能直接进行检测, 实验室内使用气相色谱法检测 DSP 毒素的实际应用不多。气相色谱法检测 DSP 毒素方法是采用二乙基醚提取, 用硅胶、渗透凝胶和反相分散色谱依次纯化样品, 三甲基硅烷化后用配有氢火焰离子化检测器进行分析<sup>[2]</sup>。但是由于 DSP 对热稳定, 不易挥发的特点, 气相色谱法分析 DSP 毒素, 不能得到推广使用。

### 4.2 薄层色谱法

薄层色谱法的原理是将适宜的固定相均匀地涂布在玻璃板、铝箔或者塑料上呈一薄层, 以合适的溶剂作为流动相在点样后进行洗脱, 对混合毒素进行分离、鉴定和定量的层析分离技术。薄层色谱法检测 DSP 毒素方法是使用硅胶平板, 点样后用甲苯-丙酮-甲醇混合溶液洗脱, 然后向平板喷洒含有香草醛的硫酸-乙醇混合溶液, 在室温下放置几分钟后, OA、DTXs 和二醇酯衍生物均可显色为粉红色, 其中 OA 和 DTXs 毒素的显色较亮, 二醇酯的显色稍暗, 该方法对纯化后的 OA 毒素的检出限约为 1  $\mu\text{g}$ , 与其他方法相比, 该检出限相对较高<sup>[2]</sup>。薄层色谱分析因检出限过高、定量不准确等缺点, 在 DSP 毒素的分析检测中

应用中并不很常见。

### 4.3 液相色谱法

液相色谱法是利用两相对混合物中不同组分亲和力的差别来达到分离效果的一种定性和定量分析技术, 也是检测 DSP 毒素的中是最重要的方法之一, 原理是利用 OA 和 DTX 上的羧基以及和荧光试剂之间的反应标记毒素, 以酸化的乙腈水溶液作为流动相, 用  $\text{C}_{18}$  反相柱分离, 最后用配有荧光检测器的液相色谱检测<sup>[41]</sup>。陈则玲等<sup>[42]</sup>在国内最先建立检测 OA 的高效液相色谱法, 并使用该方法测得 OA 的最低浓度是 0.1  $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。袁骥等<sup>[43]</sup>建立了四甲基氢氧化胺和 9-氯乙基葱衍生的高效液相色谱法对江苏及浙江共 5 个采集点的贝类中 OA 毒素进行检测, 并对紫外线照射 OA 和 DTX1 来鉴别两者的色谱峰的方法做了分析和研究。傅云娜等<sup>[44]</sup>对腹泻性贝毒的高效液相色谱测定方法的条件进行改进, 使原来对实验条件要求苛刻的方法更适宜于一般的实验室使用, 使该方法更有希望代替小鼠法。Louppis 等<sup>[45]</sup>使用 ADAM 作前柱衍生试剂, 由配有荧光检测器的高效液相色谱检测 OA、DTX 及其相关酯类, 该方法与液质联用法、小鼠生物法检测结果相关性分别为 100%、97.1%。液相色谱法对 OA 的灵敏度很高, 被广泛应用于 DSP 毒素分析检测, 但由于样品基质存在很大的背景干扰, 检测分析成本高、仪器设备昂贵、操作和维护需要专门技术人员, 由于 ADAM 价格昂贵, 在常温下化学性质不稳定, 该法应用受到一定限制。

### 4.4 液相色谱-质谱联用法

液相色谱-质谱联用法是目前在海洋生物毒素分析检测中最有优势的一种分析检测方法, 它将色谱的分离与质谱的定性这 2 种优势有机结合, 发展成为一种能够准确定性定量, 并能够提供准确的分子结构信息的新型分离技术。

李爱峰<sup>[2]</sup>建立了检测分析 OA 和 DTX-1 毒素的液相色谱-质谱联用阴离子和阳离子检测方法, 用阴离子检测时 OA 和 DTX-1 检出限分别为 110 和 220  $\text{pg}$ ; 用阳离子检测时, OA 和 DTX-1 检出限分别为 49.6 和 84.6  $\text{pg}$ 。之后国内有很多学者都使用液质联用方法对腹泻性贝类毒素进行检测分析, 取得了很好的结果<sup>[46-54]</sup>。样品的主要处理步骤是在贝类样品, 加入 80%(V:V) 甲醇溶液, 超声提取后离心, 用正己烷脱脂, 45  $^{\circ}\text{C}$  下氮吹, 之后 HLB 固相萃取小柱进行固相萃取。李晓晶等<sup>[55]</sup>通过样品前处理条件的优化和改进, 建立了固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱同时测定贝类水产品中 OA 类贝类毒素的检测方法, 方法定量下限 (LOD) 为 0.05~0.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 5 结 语

在腹泻性贝类毒素的检测分析中, 小白鼠生物法仍然是目前最常用的方法, 其检测技术简单、方法易掌握, 仪

器简易,不需要专业的高端仪器和专门的操作人员,但是由于缺乏准确的定量且不能做定性研究,操作步骤繁琐,样品中生物基质成分复杂、干扰程度比较大等缺点,使其应用受到了很大的限制。免疫分析法因其高度的准确性、特异性、稳定性,适用范围广、检测速度快以及费用低等优点在腹泻性贝类毒素的分析检测中使用非常广泛。毛细管电泳法有望成为有效的检测手段,但因方法本身存在的一些尚未解决的问题,使此方法一直未能推广使用。而高效液相色谱技术因其灵敏度高、专一性强、准确性高、分离效果好、结果稳定重复性好的优点,并且提供更多毒素信息等优势已成为国际标准方法。质谱联用技术,因其快速、精准,高效,能够提供准确的分子结构信息的特点,在海洋生物毒素检测分析中比高效液相色谱在定性和定量方面更有优势。因为液相和质谱联用技术都需要专门的技术人员且仪器设备价格昂贵,在一定程度上限制了其推广和运用。

#### 参考文献

- [1] 颜天,周名江,曾呈奎.有毒赤潮藻种 *Pfiesteria piscicida* 的研究进展综述[J].海洋与湖沼,2000,31(1):15-17.  
Yan T, Zhou MJ, Zeng CK. Review of studies on toxic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* [J]. Oceanolog Limnologia Sin, 2000, 31(1): 15-17.
- [2] 李爱峰.液-质联用技术分析海洋生物毒素的研究[D].北京:中国科学院,2005.  
Li AF. Study on marine biological toxins by liquid chromatography mass spectrometry [D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2005.
- [3] Yasumoto T, Murata M, Lee JS, et al. Polyether toxins produced by dinoflagellate [J]. Mycotoxins Phycotoxins, 1989, 10: 375-382.
- [4] Hu T, De-Freitas ASW. New diolsters (okadaic acid) isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum* [J]. Nat Prod, 1992, 55: 1631-1637.
- [5] Norte M, Padilla A. Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Prorocentrum lima* [J]. Tetrahedron, 1994, 50: 9175-9180.
- [6] Boudreau RT, Hoskin DW. The use of okadaic acid to elucidate the intracellular role(s) of protein phosphatase 2A: lessons from the mast cell model system [J]. Int J Immunopharm, 2005, 5(10): 1507-1518.
- [7] 谭志军,吴海燕,郭萌萌,等.脂溶性贝类毒素安全评价与检测技术研究进展[J].中国水产科学,2013,02:467-479.  
Tan ZJ, Wu HY, Guo MM, et al. Progresses in risk assessment and detection method of lipophilic phycotoxins [J]. Chin Aquat Sci, 2013, 02: 467-479.
- [8] Campas M, Jean-Louis M. Enzyme sensor for the electrochemical detection of the marine toxin okadaic acid [J]. Anal Chim Acta, 2007, 605: 87-93.
- [9] Campàs M, Iglesia P, Berre ML, et al. Enzymatic recycling-based amperometric immunosensor for the ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish [J]. Biosens Bioelectron, 2008, 24 (4): 716-722.
- [10] Volpe G, Cotroneo E, Moscone D, et al. A bienzyme electrochemical probe for flow injection analysis of okadaic acid based on protein phosphatase 2A inhibition:an optimization study [J]. Anal Biochem, 2009, 385(1): 50-56.
- [11] Hummert C, Reichelt M, Luckas B. New strategy for the determination of microcystins and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, two potent phosphatases 1 and 2A inhibitors and tumor promoters [J]. Fresenius J Anal Chem, 2000, 366(5): 508-513.
- [12] James FL, Sonia R, Cathie M. Liquid chromatographic determination of okadaic acid and dinophysistoxin -1 in shellfish after derivatization with 9-chloromethylanthracene [J]. J Chromatogr A, 1996, 721: 364-359.
- [13] Hallegraef GM. Manual on harmful marine microalgae [M]. UNESCO, France: DCM Annuals and Guides, 1995.
- [14] 杨维东,彭喜春,刘洁生,等.腹泻性贝毒研究现状[J].海洋科学,2005,29(5):66-72.  
Yang WD, Peng XC, Liu JS, et al. Review on research of diarrhetic shellfish poisoning [J]. Mar Sci, 2005, 29(5): 66-72.
- [15] 曾玲,文菁,龙超,等.中国沿海贝类腹泻性贝毒的特征分析[J].水产科学,2015,03:188-194.  
Zeng L, Wen J, Long C, et al. Characteristics of diarrhetic shellfish poisons in shellfish from coastal China [J]. Fish Sci, 2015, 03: 188-194.
- [16] 杨莉,杨维东,刘洁生,等.广州市售贝类麻痹性贝毒和腹泻性贝毒污染状况分析[J].卫生研究,2006,04:435-439.  
Yang L, Yang WD, Liu JS, et al. Analysis on the status of shellfish poisoning and diarrhea in Guangzhou city [J]. J Health Res, 2006, 04: 435-439.
- [17] Jeffrey LC, Wright. Dealing with seafood toxins: present approaches and future options [J]. Food Res Int, 1995, 28(4): 347-358.
- [18] 李青选.海洋生化工具药的研究进展[J].中国海洋药物,1995,(1):35-39.  
Li QX. Progress in the research of marine biochemical drugs [J]. Chin J Mar Drug, 1995, (1): 35-39.
- [19] 吴锋,江天久,张帆,等.浙江南麂海域双壳贝类的腹泻性贝毒分析[J].海洋环境科学,2010,29(4):492-495.  
Wu F, Jiang TJ, Zhang F, et al. Analysis on diarrhetic shellfish poisoning in bivalve collected from Nanji Island sea area of Zhejiang province [J]. Mar Environ Sci, 2010, 29(4): 492-495.
- [20] 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 Suis Gak, 1984, 50: 1413-1418.
- [21] Combes RD. 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.
- [22] Turrell EA, Stobo LA. 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.
- [23] 沈志刚.牡蛎产品腹泻性贝毒检测假阳性结果的产生原因及其控制措施[D].中国农业科学院,2009.  
Shen ZG. The reasons and controlling measures for fake positive sign of DSP in oyster products [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
- [24] Garthwaite I, Ross KM, Miles CO, et al. Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand [J]. J AOAC Int, 2001, 84(5): 1643-1648.

- [25] 宋向明, 谢小华, 赵冲厚, 等. 酶联免疫法测定牡蛎中腹泻性毒素的研究[J]. 水产养殖, 2013, 01: 49–52.  
Song XM, Xie XH, Zhao CH, *et al.* The study on detection of diarrhetic shellfish poisons by ELISA in *Ostrea rivularis Gould* [J]. J Aquacult, 2013, 01: 49–52.
- [26] 李军涛, 候水平, 姬泽薇, 等. 腹泻性贝类毒素的免疫荧光层析检测方法的初步建立[J]. 热带医学杂志, 2015, 02: 189–192.  
Li JT, Hou SP, Ji ZW, *et al.* The establishment of the immune fluorescence chromatographic detection method of the toxic shellfish toxins [J]. J Trop Med, 2015, 02: 189–192.
- [27] 刘仁沿, 梁玉波, 陈冰君, 等. 胶体金免疫层析方法快速检测腹泻性贝毒软海绵酸的初步研究[J]. 分析试验室, 2008, 07: 26–29.  
Liu RY, Liang YB, Chen BJ, *et al.* Primal study on rapid detection of okadaic acid by immune thin layer chromatography with colloidal gold [J]. Chin J Anal Lab, 2008, 07: 26–29.
- [28] 刘仁沿, 梁玉波, 陈媛, 等. 胶体金免疫层析法快速检测腹泻性贝毒软海绵酸的研究[J]. 分析科学学报, 2010, 01: 31–34.  
Liu RY, Liang YB, Chen Y, *et al.* Development of gold immunochromatography assay for the detection of okadaic acid [J]. J Anal Sci, 2010, 01: 31–34.
- [29] 张洋, 贾睿, 何培民. 免疫胶体金试纸条快速检测贝类体内的腹泻性贝毒[J]. 生物技术通报, 2013, 06: 221–225.  
Zhang Y, Jia R, He PM. Rapid determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish samples by immune colloidal gold strip [J]. Biol Bull, 2013, 06: 221–225.
- [30] 白慧玲. 实验免疫学技术教程[M]. 河南: 河南大学出版社, 2009.  
Bai HL, Experimental immunology technology tutorial [M]. Henan: Henan University Press, 2009.
- [31] 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.  
Chen Y. Toxic Effects and mechanisms of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) and other HAB toxins on mammalian cells [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008.
- [32] Dickey RW, Plakas SM, Jester ELE, *et al.* Multilaboratory study of five methods for hte determination of breve- toxins in shellfish tissue extracts [J]. Harm Algae, 2002: 300–302.
- [33] Tubaro A, Florio C, Luxich E. A protein phosphatase 2a inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels [J]. Toxicon, 1996, 34(7): 743–752.
- [34] Honkanen RE, Stapleton JD, Bryan DE, *et al.* Development of a protein phosphatase-based assay for the detection of phosphatase inhibitors in crude whole cell and animal extracts [J]. Toxicon, 1996, 34: 1385–1392.
- [35] Mountfort DO, Kennedy G Garthwaite I, *et al.* Evaluation of the fluorimetric protein phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels [J]. Toxicon, 1999, 37: 909–922.
- [36] 李爱峰, 于仁成, 李钧, 等. 利用蛋白磷酸酶活力抑制法检测牡蛎体内的腹泻性贝毒[J]. 分析化学, 2006, 03: 283–287.  
Li AF, Yu RC, Li J, *et al.* Protein phosphatase inhibition assay for detection of diarrhetic shellfish poison in oyster [J]. Fresenius J Anal Chem, 2006, 03: 283–287.
- [37] 赵前程, 秦成, 吴斌, 等. 贝类毒素(大田软海绵酸)抑制磷酸酶法的建立[J]. 食品科技, 2010, 05: 294–296, 300.  
Zhao QC, Qin C, Wu B, *et al.* The establishment of phosphatase inhibition assay for detection of diarrhetic shellfish poison (okadaic acid) in shellfish [J]. Food Sci Technol, 2010, 05: 294–296, 300.
- [38] Bouaicha N, Hennion MC, Sandra P. Determination of phycotoxins in aquatic medium by capillary electrophoresis [J]. Toxicon. 1997, 35: 276–281.
- [39] Li D, Sun L, Chen Z, *et al.* Survey of the distribution of red tide toxins (okadaic acid and dinophytoxin-1) in the Dalian bay sea area of China by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Electrophoresis, 2001, 22(16): 3583–388.
- [40] 张基木, 胡涛, 吴庆政, 等. 胶束电动毛细管色谱在柱富集检测腹泻性贝毒 OA 和 DTX-1[C]. 北京: 国家自然科学基金委员会化学科学部. 第二届全国生命分析化学学术报告与研讨会论文集, 2008.  
Zhang JM, Hu T, Wu QZ, *et al.* Micellar electrokinetic capillary chromatography on column preconcentration and detection of diarrhetic shellfish poison in OA and DTX-1 [C]. Beijing: Chemical Science Department of National Natural Science Fund Committee. The second National Symposium on life analysis chemistry and chemistry, 2008.
- [41] Lee J, Yanagi T, Kenma R, *et al.* Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography [J]. Agric Biol Chem, 1987, 51: 877–881.
- [42] 陈则玲, 傅云娜, 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, 01: 73–78.  
Chen ZL, Fu YN, Gong N. Sensitive HPLC-fluorometric determination of red tide diarrhetic shellfish-toxins in Liaodong bay, Bohai dea [J]. Mar Sci Bull, 2000, 01: 73–78.
- [43] 袁骥. 舟山渔场及基邻近海域腹泻性贝类毒素的初步研究[J]. 水产学报, 2002, 26(6): 528–532.  
Yuan Q. Preliminary study on the toxin of the fish in the Zhoushan fishing ground and the base of the sea [J]. J Fish, 2002, 26(6): 528–532.
- [44] 傅云娜, 陈则玲. 腹泻性贝毒的高效液相色谱法测定条件改进及其运用[J]. 海洋通报, 2003, 01: 92–95.  
Fu YN, Chen ZL. Improvement of the HPIC-fluorometric determination condition for mussels Infested with diarrhetic shellfish-toxins and its application [J]. Sci Bull, 2003, 01: 92–95.
- [45] Louppis AP, Badeka AV, Katikou P, *et al.* Determination of okadaic acid, dinophysist. xin I and related esters in Oreekmus-sels using HPIC with fluorometric detection, LC-MS/MS and mouse bioassay [J]. Toxicon, 2010, 55(4): 724–733.
- [46] 卢士英, 张代辉, 周玉, 等. 大田软海绵酸液相色谱串联质谱检测方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(9): 1537–1539, 1551.  
Lu SY, Zhang DH, Zhou Y, *et al.* ELISA and HPLC-MS/MS for detecting okadaic acid in shellfish [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(9): 1537–1539, 1551.
- [47] 姚建华, 谭志军, 周德庆, 等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中的原多甲藻酸贝类毒素[J]. 色谱, 2010, 04: 363–367.  
Yao JH, Tan ZJ, Zhou DQ, *et al.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for detection of shellfish toxins in shellfish products [J]. J Chromatogr, 2010, 04: 363–367.
- [48] 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.  
Yao JH. Establishment and application of the analytical method for shellfish poisoning with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010.

- [49] 母清林, 方杰, 万汉兴, 等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 111-114.  
Mu QL, Fang J, Wan HX, *et al.* Determination of diarrhetic shellfish poisoning in shellfishes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2011, 39(1): 111-114 .
- [50] 张海琪, 何欣, 郑重莺. 高效液相色谱-串联质谱法测定贻贝中腹泻性贝类毒素的含量[J]. 福建分析测试, 2012, 21(3): 12-17.  
Zhang HQ, He X, Zheng CY. Determination of two diarrhetic shellfish poisons residues in *Mytilus edulis Linnaeus* by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Fujian Anal Test, 2012, 21(3): 12-17.
- [51] 刘仁沿, 梁玉波, 刘磊, 等. 液相色谱结合串联质谱方法研究中国沿海贝类中脂溶性藻毒素的种类结构和分布规律[J]. 生态环境学报, 2014, 08: 1320-1326.  
Liu RY, Liang YB, Liu L, *et al.* The lipophilic phycotoxins profile and distribution in bivalve shellfish of Chinese coasts by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. J Ecol Environ Sci, 2014, 08: 1320-1326.
- [52] 宫小明, 万进, 马荣栓, 等. 液相色谱-高分辨质谱测定贝类中的 4 种贝毒素及 16 种兽药残留[J]. 分析测试学报, 2014, 08: 881-886.  
Gong XM, Wan J, Ma RH, *et al.* Determination of 4 shellfish toxins and 16 veterinary residues in shellfish by liquid chromatography - high resolution mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 08: 881-886.
- [53] 伍志强, 王本成, 孙艳波, 等. 贝类中大田软海绵酸的液相色谱-串联质谱优化测定法[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 01: 265-271.  
Wu ZQ, Wang BC, Sun YB, *et al.* Improvement of determination method of okadaic acid in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 01: 265-271.
- [54] 吴振兴, 静平, 曹文卿, 等. 液相色谱-串联质谱法检测 9 种腹泻性贝毒毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 08: 3262-3268.  
Wu ZX, Jing P, Cao WQ, *et al.* Determination of 9 kinds of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 08: 3262-3268.
- [55] 李晓晶, 彭荣飞, 于鸿, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定贝类水产品中原多甲藻酸类和大田软海绵酸类毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 19: 2757-2758.  
Li XJ, Peng RF, Yu H, *et al.* Simultaneous determination of azaspiracid and okadaic acid in shellfish by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 19: 2757-2758.

(责任编辑: 李振飞)

## 作者简介



刘晓玉, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: liuxiaoyua@sina.com



曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: cjj0909@163.com