

水产品中麻痹性贝类毒素的评价及相关研究

黄卓, 王依群, 唐黎明*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: 目的 对 185 批水产品中的麻痹性贝类毒素(PSP)进行评价和相关的方法学研究。**方法** 采用国际公认的标准方法——小鼠生物法, 检测水产品中的麻痹性贝类毒素, 并与酶联免疫吸附(ELISA)方法进行比对。**结果** 在 185 批水产品中检测出 PSP 超过国家标准的产品共 5 批, 超标率为 2.7%, 小鼠生物法和 ELISA 方法的评价结果完全一致。**结论** 采用小鼠生物法测得到的 PSP 检测结果可以为摄入 PSP 的风险评估提供有力的数据支持。

关键词: 麻痹性贝类毒素; 小鼠生物法; 风险评估

Assessment and related research of paralytic shellfish poisons in aquatic products

HUANG Zhuo, WANG Yi-Qun, TANG Li-Ming*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To assess paralytic shellfish poisons (PSP) in 185 batches of aquatic products and study on the detection methods. **Methods** The PSP in aquatic products were detected by mouse bioassay, which was the internationally accepted standard method, and compared with the results detected by ELISA method. **Results** Within 185 batches of aquatic products, there were 5 batches, whose PSP values were higher than the national standard, with the exceeding rate of 2.7%. The assessment results of mouse bioassay and ELISA were exactly the same. **Conclusion** The detected values of PSP by mouse bioassay can provide strong data support for the risk assessment of PSP intake.

KEY WORDS: paralytic shellfish poisons; mouse bioassay; risk assessment

1 引言

20 世纪 50 年代以后, 海洋赤潮频发, 对海洋生态环境、天然海洋生物资源和近海海域养殖业产生了极大的危害, 其中以有毒赤潮藻的影响尤为严重。有资料表明, 能够形成赤潮的微藻约为 184~267 种, 其中有有毒的有 60~78 种, 约占海洋中浮游植物的 1.8%~1.9%^[1]。这些有毒赤潮藻是牡蛎、贻贝、文蛤、扇贝等贝类的食物, 通过食物链在贝类体中蓄积, 成为贝类毒素。海洋藻类毒素是由海洋中的微藻或者海洋细菌产生的一类生物活性物质的总称,

常见的贝类毒素主要有麻痹性贝毒(paralytic shellfish poison, PSP)、腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poison, DSP)、神经性贝毒(neurotoxic shellfish poison, NSP)和记忆缺失性贝毒(amnesic shellfish poison, ASP)4 种^[2]。

当前世界上分布最广、事故发生频率最高、对人类生命健康危害最大的一种贝类毒素是 PSP^[3], 其在全球范围内已经导致了众多的中毒和死亡事故。PSP 具有毒性大、反应快、防治困难等特点^[4-7]。PSP 是由甲藻产生的一类四氢嘌呤毒素的总称, 按结构可分为 3 大类 20 多种, 石房蛤毒素(saxitoxin, STX)是最常见、神经毒性最大的一种 PSP,

*通讯作者: 唐黎明, 主任药师, 主要研究方向为药理毒理。E-mail: tangliming@smda.gov.cn

*Corresponding author: TANG Li-Ming, Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Drug and Food Control, No. 1500 Zhangheng Road, Pudong New District, Shanghai 201203, China. E-mail: tangliming@smda.gov.cn

通过阻断细胞膜上的钠离子通道从而阻碍信息传导, 导致神经肌肉麻痹, STX 的致死剂量是 1~4 mg^[8]。我国对 PSP 的限值为 80 μg STX eq /100 g 可食部分(以 STX 计), 即 400 鼠单位(MU)/100 g 可食部分^[9], 与联合国卫生组织及大多数国家的规定一致^[10]。

我国对于 PSP 的检测方法有很多, 如生物实验法—小鼠生物测定法^[11,12], 免疫化学分析法如酶联免疫吸附法(ELISA)^[13], 化学仪器分析法如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[14]等。小鼠生物测定法是最经典的检测方法, 但该方法对操作人员的要求很高, 主观性较大。近年来, 随着免疫分析技术的不断进步, 酶联免疫吸附法以其特异性强、灵敏度高、操作简便迅速等优点快速发展起来。

本文以大连地区的扇贝、蛤蜊等水产品为样本, 采用国际公认的标准方法—小鼠生物测定法检测水产品中的麻痹性贝类毒素, 并与酶联免疫吸附(ELISA)方法进行比对, 为完成水产品及水产制品的监督抽检和风险监测工作提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 材 料

ICR 系雄性小鼠, 体重: 19~21 g, 由上海市斯莱克实验动物有限公司提供, 动物生产许可证号 SCXK(沪)2003-0003。饲养环境为 SPF 级实验动物房, 使用许可证号: SYXK(沪)2006-0003, 环境温度(22±0.5) °C, 相对湿度 50%~60%。

扇贝、蛤蜊等水产品共 185 批(大连)。

2.2 仪器和设备

FLUKO FA25 型均质器(上海弗鲁克液体机械制造有限公司); Mettler Toledo PL3001-S 型天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Eppendorf centrifuge 5702R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); Mettler Toledo 320 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); 金雀牌 J9-1 型秒表(上海手表五厂)。

2.3 试 剂

0.1、5 mol/L 盐酸(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司); 0.1 mol/L 氢氧化钠(96.0%, 上海凌峰化学试剂有限公司)。

2.4 试验方法

2.4.1 样品提取

取市售鲜活蛤蜊若干, 均分为未染毒组、4 d 染毒组、9 d 染毒组, 送上海水产大学相关教研室用海藻染毒, 依据小鼠生物法^[11]提取并测定 PSP, 同时设置溶媒对照组。

2.4.2 样品制备

对于牡蛎、蛤及贻贝, 用清水彻底洗净贝类外壳, 切

断闭壳肌, 开壳, 用清水淋洗内部去除泥沙及其他外来杂质, 仔细取出贝肉, 切勿割破肉体。收集贝肉沥水 5 min(避免贝肉堆积), 捡出碎壳等杂物, 将贝肉均质。开壳前不能加热或用麻醉剂。

对于扇贝, 取可食部分(闭壳肌)用作检测, 沥干及均质过程同上。

对于冷冻贝类, 在室温下, 使冷冻的样品(带壳或脱壳的)呈半冷冻状态, 按上述规定的方法清洗、开壳、淋洗、取肉、均质。

2.4.3 提 取

取 100 g 按 2.4.2 处理的样品于 800 mL 烧杯中, 加入 100 mL 0.1 mol/L 的 HCl 溶液充分搅拌, 调节 pH 至 2.0~4.0。需要时, 可逐滴加入 5 mol/L HCl 溶液或 0.1 mol/L NaOH 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, 并缓慢煮沸 5 min, 冷却至室温, 调节 pH 至 2.0~4.0, 将混合物移至量筒中并稀释至 200 mL。

将混合物倒回烧杯, 搅拌至均质状, 使其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。保留进行小鼠注射用的足量液体。

2.4.4 测定步骤

用感量为 0.1 g 的天平将小鼠称重并记录重量, 每个样品注射 3 只小鼠。对每只试验小鼠腹腔注射 1 mL 提取液。注射时若有 1 滴以上提取液溢出, 须将该只小鼠丢弃, 并重新注射一只小鼠。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 3 只小鼠以确定样品的毒力; 小鼠的死亡时间小于 5 min, 则需稀释样品提取液后, 再注射另一组小鼠(3 只), 得到 5~7 min 的死亡时间, 稀释提取液时, 要逐滴加入 0.1 mol/L 或 0.01 mol/L HCl 溶液, 调节 pH 至 2.0~4.0。

2.4.5 结果的计算与判断

毒力的计算: 根据小鼠的死亡时间, 在附录中查出相应的每毫升注射液的鼠单位数 M, 将存活鼠的死亡时间视为大于 60 min 即相当于<0.875 MU。

样品中 PSP 的含量按下列公式计算

$$X = \frac{\sum M_i}{n} \times D \times 200$$

式中: X—样品中 PSP 含量, 单位为 MU/100 g; M_i —每只小鼠的鼠单位数, 单位为 MU; D—试验原液的稀释倍数, 原液的 D=1; n—每组小鼠的数量; 200—样品换算系数。

毒力单位转换: 样品中的毒力单位按下列公式计算:

$$F \times 80 \mu\text{g}/100 \text{ g} = 400 \text{ MU}/100 \text{ g}$$

式中: F—毒素转换系数; 80 μg/100 g—样品中 PSP 限量(μg/100 g); 400 MU/100 g—样品中 PSP 限量(MU/100 g)。

表1 提取方法研究结果
Table 1 Results of extraction method

组别	动物症状
溶媒组	注射后即刻均出现活动减少, 约 10 min 后恢复正常
未染毒组	注射后即刻均出现活动减少, 约 10 min 后恢复正常
4 d 染毒组(低剂量组)	3 只小鼠注射后即刻均出现活动减少、静卧、呼吸急促, 其中 1 只小鼠出现后肢抽搐, 约 30 min 后基本恢复正常
9 d 染毒组(高剂量组)	3 只小鼠注射后即刻均出现活动减少、静卧、呼吸急促, 3~5 min 后 3 只小鼠均出现后肢强烈抽搐、扭曲, 约 60 min 后基本恢复正常

2.4.6 小鼠生物法测定样品中 PSP

取抽检的扇贝、蛤蜊等水产品共 185 批, 依据小鼠生物法提取测定 PSP, 试验方法同上。

2.4.7 ELISA 法测定部分样品中 PSP

取小鼠生物法测定 PSP 超过国家标准^[9]的样品 4 批, 用德国 R-Biopharm 公司的 RIDASCREEN®FAST Saxitoxin 试剂盒检测 PSP^[15], 同时取 2 批 PSP 未超过国家标准的样品平行检测。

3 结果与分析

3.1 提取方法研究的结果

由表 1 可见, 动物症状与 PSP 染毒量呈明显的量效关系, 证明提取 PSP 方法的有效性。

3.2 小鼠生物法测定结果

185 批样品中 5 批样品的 PSP 超过国家标准(PSP 80 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分), 分别为 552.6、416.2、136.2、369.6、294.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分, 其余 180 批样品均 PSP 35 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分, 未超过标准规定。

3.3 ELISA 法测定结果及与小鼠生物法结果的比较

表2 ELISA 法结果及与小鼠生物法结果的比较
Table 2 Comparison of determined results by ELISA and mouse bioassay methods

样品编号	ELISA 法测定结果 ($\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分)	小鼠生物法测定结果 ($\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分)
SC200701265	442.3	416.2
SC200701271	186.5	136.2
SC200701272	497.2	369.6
SC200701273	406.3	294.4
SC200701286	6.3	35
SC200701299	5.7	35

由表 2 可见, 小鼠生物法与 ELISA 法的检测结果相近,

对于 PSP 是否超过国家标准(80 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分)的判断完全一致。但是小鼠生物法对阳性样品的 PSP 测定值均小于 ELISA 法的检测结果, 可能由于前者的灵敏度比后者低, 前者的检测下限为 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 可食部分(35 $\mu\text{g}/100\text{g}$), 而后者为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 可食部分, 说明 ELISA 法更适合于检测 PSP 含量较小的样品。但小鼠生物法具有操作简便、不需要使用专门仪器、试剂的优点, 因此, 目前该方法是被大多数国家所接受的标准方法, 而 ELISA 法由于其高灵敏度和特异性可作为小鼠生物法的确证方法之一。

4 结论

由于 PSP 为生化战武器之一, 无法得到其对照品, 所以我室与上海水产大学的相关教研室合作, 用能产生 PSP 的甲藻养殖蛤蜊(染毒)进行量效研究, 证明了提取 PSP 方法的有效性。

基于 STX 抗原和其抗体特异性结合反应的 ELISA 方法是近年出现的新方法, 具有特异、灵敏、快速的优点。本研究采用的试剂盒检测 PSP(以 STX 计)的检测下限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 因此, 可以作为小鼠生物法的确证方法之一。

小鼠生物法是 1937 年由 Sommerand Mayer 建立的, 该方法操作简便、不需要使用专门仪器、试剂, 是目前唯一得到国际公认的 AOAC 标准生物检测 PSP 的方法, 也是目前是被大多数国家所接受的标准方法, 其结果可作为法庭依据, 对 PSP 的限度我国标准与美日及欧盟一致, 均为 PSP 80 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分或 400 MU/100 g 可食部分。但本法具有 PSP 标准品不易得到、灵敏度低、对操作者的要求较高等缺点。

在 185 批水产品中, PSP 超过国家标准的产品共 5 批, 超标率为 2.7%。由两种方法比对结果可见, 小鼠生物法与 ELISA 法的检测结果相近, 对于 PSP 是否超过国家标准的判断完全一致, 2 种方法的结合运用可以测得到的 PSP 检测结果可以为摄入 PSP 的风险评估提供有力的数据支持。

参考文献

[1] Sournia A. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean:all

- inquiry into biodiversity[C]. Harmful Marine Algal Blooms. Paris: Technique Documentation—Lavoisier, Intercept Ltd, 1995: 103–112.
- [2] 丁君. 赤潮毒素中腹泻性贝毒和麻痹性贝毒的研究及进展[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(3): 212–218.
Ding J. The research and progress of the diarrhea shellfish poison and the paralysis shellfish poison in the red tide toxin [J]. J Dalian Aquac Univ, 2001, 16(3): 212–218.
- [3] 张少君, 丁永生, 李大志, 等. 贝毒及检测方法的研究进展[J]. 大连海事大学学报(自然科学版), 2003, 29(4): 63–65.
Zhang SJ, Ding YS, Li DZ, *et al.* Progress in the research of shellfish poisoning and detection methods [J]. J Dalian Marit Univ (Nat Sci Ed), 2003, 29(4): 63–65.
- [4] 江天久, 江涛. 中国沿海部分海域麻痹性贝毒研究[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(1): 36–41.
Jiang TJ, Jiang T. Study on the paralysis shellfish poison in the coastal waters of China [J]. Chin J Ocean Limnol, 2007, 38(1): 36–41.
- [5] Hilleb. The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin: a structural hypothesis [J]. Biophys, 1975, 15: 615–619.
- [6] Indrasena M, Gill A. Thermal degradation of paralytic shellfish poisoning toxins in scallop digestive glands [J]. Food Res Int, 1999, 32: 49–57.
- [7] 周名江, 李钧. 赤潮藻毒素研究进展[J]. 中国海洋药物, 1999, 18(3): 48–54.
Zhou MJ, Li J. Progress in the research of red tide algae toxin [J]. Chin Marine Drug, 1999, 18(3): 48–54.
- [8] 林洪. 水产品安全性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
Lin H. Safety of aquatic products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005.
- [9] NY5073-2006 无公害食品水产品中有毒有害物质限量[S].
NY5073-2006 Limits of toxic and harmful substances in aquatic products without social effects of pollution [S].
- [10] 刘智勇, 计融. 各国贝类水产品中麻痹性贝类毒素限量标准的对比[J]. 中国热带医学, 2006, 6(1): 175–177.
Liu ZY, Ji R. Comparison of limit standard of shellfish toxins in shellfish aquatic products [J]. Chin Trop Med, 2006, 6(1): 175–177.
- [11] SC/T 3023-2004 无公害食品麻痹性贝类毒素的测定生物法[S].
SC/T 3023-2004 Determination of paralysis shellfish poison bioassay [S].
- [12] GB/T 5009.213-2008 贝类中麻痹性贝类毒素的测定[S].
GB/T 5009.213-2008 Determination of paralytic shellfish poison in shellfish [S].
- [13] SN/T 1773-2006 进出口贝类中麻痹性贝类毒素检验方法-酶联免疫吸附试验法[S].
SN/T 1773-2006 Inspection of paralytic shellfish poison in shellfish for import and export—ELISA method [S].
- [14] GB/T 5009.213-2008 贝类中多种麻痹性贝类毒素含量的测定液相色谱-荧光检测法[S].
GB/T 5009.213-2008 Determination of paralytic shellfish poison in shellfish HPLC-fluorescence detection method [S].
- [15] R-Biopharm AG 公司 RIDASCREEN®FAST Saxitoxin 试剂盒使用手册. Use manual of RIDASCREEN®FAST Saxitoxin kit, R-Biopharm AG company.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



黄 卓, 副主任药师, 主要研究方向为药理毒理、药品及食品检验。
E-mail: huangzhuo3@126.com



唐黎明, 主任药师, 主要研究方向为药理毒理。
E-mail: tangliming@smda.gov.cn