

西加毒素检测分析研究新进展

周秀锦, 李孝军, 何明, 周向阳, 邵宏宏, 颜建波 (舟山出入境检验检疫局, 浙江舟山 316000)

摘要 西加毒素是一种属于获得性毒素的珊瑚鱼毒素, 为脂溶性多聚醚类化合物, 有强烈的和不可逆的胆碱酯酶抑制毒性。从发现西加毒素至今, 有不同的检测方法提出, 但都不能满足适应市场的需求。笑 对西加毒素现有的检测分析方法进行了综述, 将有助于多种检测方法更好地提高与完善, 对于西加毒素中毒防治、水产业的顺利发展以及公众的健康都具有重要意义。

关键词 西加毒素; 检测; 小鼠生物法; 细胞毒性检测; 高效液相色谱-质谱分析; 免疫学测定法

中图分类号 S609.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)02-00800-02

Research Advance on Detection and Analysis of Ciguatera

ZHOU Xiu-jin et al (Zhoushan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan, Zhejiang 316000)

Abstract Ciguateras (CTXs) may be an acquired coral fish toxin. CTXs are a family of lipidsoluble cyclic polyethers which have strong and irreversible choline esterase inhibition. Several approaches were developed in the past decades to address this issue because of some drawbacks are not the convenient and accurate detection method for CTXs. To provide references for detection and prevention of ciguatera fish poisoning, development of aquatic products industry, protection public health, the current detection methods of CTXs were reviewed.

Key words Ciguatera; Detection; Mouse bioassay; Cytotoxicity assay; HPLC/MS/MS; Immunoassays

西加毒素, 又名雪卡鱼毒素, 是一类无色、耐热、脂溶性、极易被氧化的混合毒素, 由 13 个连续连接成阶梯状的醚环组成, 包括 5、6、7、8、9 元醚环, 整个骨架具有反式或顺式的立体化学特征。其来源于一种腰鞭毛藻 - 冈比尔盘藻 (*Gambierdiscus toxicus*), 并能通过食物链的传递而影响到人类的生命健康, 每年都有西加毒素中毒的相关报道。目前国内外对其已有多种检测方法, 主要的方法有: 小鼠生物法、细胞毒性试验、高效液相色谱-质谱分析、免疫测定法等, 但因西加毒素类毒素的复杂性、多样性和毒性以及缺少西加毒素标准品, 至今尚未建立一种简便、快速的可靠的检测方法, 且以上几种检测方法都存在优缺点, 现对这些分析方法的特点及其发展应用现状进行概述。

1 西加毒素检测分析方法

1.1 小鼠生物法 (mouse bioassay) 方法的原理是根据小鼠腹腔注射西加毒素后建立剂量与死亡时间的关系方程式 $\log MU = 3.7 \log(1 + T)$, 查出鼠单位, 并按小鼠体重, 校正鼠单位 (corrected mouse unit, CMU), 计算确定每 100 g 样品中西加毒素的鼠单位。小鼠生物法的缺点是特异性差、灵敏度低、准确性和重现性差、不能断定个体毒素成分、操作要求较高技巧、对试验动物的种系及体重要求苛刻, 但该方法具有可靠性强、能表达出样品中实际毒性、不需复杂设备等优点, 是目前最广泛被使用的西加毒素检测的方法。1999 年, Dechraoui 等首次将小鼠生物法应用到西加毒素的检测^[1], Lehane 等^[2]和 Laurent 等^[3]在判定标准和依据方面进行了方法学优化。2010 年, Kerbrat 等在检测远洋性海洋蓝藻束毛藻类西加毒素中, 结合了小白鼠生物法、细胞毒性试验方法和受体阻滞法^[4], 进一步验证了 Endean 等远洋性海洋蓝藻束毛藻中西加毒素与麻痹类毒素的毒性相互增强^[5]。2011 年, 许轶肖等利用小鼠生物法、酶联反应法和高效液相色谱串联质谱法同

时分析了我国南部沿海近岸西加毒素, 酶联反应法与小白鼠生物法对毒素定性检测结果基本一致, 并报道了 6 个采样区的样品均含有西加毒素, 阳性检出率高达 50%^[6]。

1.2 细胞毒性检测 (Cytotoxicity assay) 细胞毒性试验的原理是将一定量的供试液, 加入细胞培养液中, 培养细胞, 通过对细胞生成和增殖影响的观察, 评价供试品对细胞的潜在毒性作用。Catterall^[7-8]和 Manger 等^[9-10]利用西加毒素能与钠离子通道蛋白质结合活化钠离子通道的性质, 结合藜芦定 (veratridine) - 钠离子通道激活剂和乌本甙 (ouabain) - Na^+ , K^+ 泵抑制剂, 使用小鼠来源的成神经肿瘤细胞系钠离子通道易被这一特性检测毒素; 当加入一定浓度比例的藜芦定和乌本甙处理细胞后, Na^+ 过度内流, 而造成部分细胞肿胀死亡, 再加入一定浓度的毒素会增强这种作用, 细胞的死亡数与毒素的量成反 S 型曲线关系, 通过 MTT、WST-8 等细胞计数法, 在酶标仪上测定细胞 A 值, 间接反映出毒素的量。此方法检测的灵敏度较高, 能检测出较低含量的毒素水平 (检测极限可达到 0.01 fg/kg)。目前, Dechraoui 等^[11]、Bienfang 等^[12]、Campora 等^[13]、Dickey 等^[14]、Boada 等^[15]、Chan 等^[16]和 Wu 等^[17]在区分是否含有西加毒素和流行病学调查方面已有应用, 但由于该技术特异性差, 不能确定毒素的准确成分, 试验配置及操作人员的技术要求高等原因, 制约了该方法的普及应用。蔡朝民等同时采用细胞毒性试验和小鼠生物法检测西加毒素, 并将 2 种方法进行方法学的比较, 发现二者的检测结果具有一定的相关性, 但细胞毒性试验检测西加毒素的灵敏度远高于小鼠生物法^[18]。Caillaud 等在 2012 年利用成神经肿瘤细胞的细胞毒性试验, 提高了该方法的检测灵敏度, 西加毒素的 LOQ 为 0.009 6 ng CTX1B eq/g TE, 并通过 DNA 分析, 确定了含有西加毒素的鱼类, 为不必要的误判提供了可靠的依据^[19]。

1.3 高效液相色谱-质谱分析 (HPLC/MS) 该法主要是将样品中的西加毒素进行提取净化后, 根据西加毒素结构中具有反应活性的伯醇羟基基团, 通过高效液相色谱串联质谱

基金项目 浙江省舟山市科技计划项目 (10204-2)。

作者简介 周秀锦 (1974 -), 女, 河南商水人, 工程师, 硕士, 从事食品安全及标准化研究, E-mail: zsxj@zs.ziq.gov.cn。

收稿日期 2012-11-12

分析 (HPLC/MS/MS) 对样品提取物进行定性定量分析。Lewis 等采用液相色谱-质谱法建立了鱼体中太平洋西加毒素的检测方法,检测灵敏度可达到 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 水平^[20-22]。目前只有 2 种快速 HPLC/MS/MS 检测方法报道^[22-23],但是基质效应干扰较大,回收率普遍不高,波动在 27% ~ 75%。Dechraoui 等采用样品均质后超声提取鱼体内的西加毒素,优化了样品前处理步骤,但是回收率仍然不稳定^[24]。刘红河等将鱼类样品经丙酮提取后,用冷冻脱脂,经 PSA 固相萃取柱净化后, C₁₈ 色谱柱分离,采用电喷雾串联四极杆质谱进行检测,方法的定量检出限为 $0.1 \text{ g}/\text{L}$,平均回收率为 82.3% ~ 87.2%^[25]。Wu 等建立了快速溶剂萃取-液相色谱-质谱仪检测鱼体内的太平洋西加毒素,基质添加回收率在 49% ~ 85%,ABI 5000 液相色谱-串联质谱仪采集和分析数据,检测底限达到 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[17]。由于这种方法具有灵敏度高、可比性和重复性好、可检测样品中各种毒素成分的实际含量水平等特点,一般将 HPLC/MS 作为其他检测方法的重要辅助方案,提供准确的参考标准。该法需要昂贵的设备及高素质的人员,样品前处理要求较高,毒素标准品价格昂贵,不能同时检测大量样品等,因此一般用于实验室的分析研究,而不适用于实际检测中的应用。

1.4 免疫学测定法 (immunoassays) 该方法的基本原理是细胞因子(或受体)与相应的特异性抗体(单克隆抗体或多克隆抗体)结合,通过同位素、荧光或酶等标记技术加以放大和显示,从而定性或定量显示细胞因子(或受体)的水平。这类方法的优点是试验周期短,抗原与抗体专一、特异结合,一次能检测大量标本,易标准化。HOKAMA 等先后建立了 RIA 检测牛血清白蛋白偶联的西加毒素、ELISA 检测、S-PIA(固态免疫珠分析)和 MIA(膜免疫珠分析)检测技术^[26-29],随着西加毒素的毒素成分被相继地鉴定以及人工合成毒素的获得,美国 Oceanit TestSystems, Inc. 公司^[30]利用 P-CTX 1 的单克隆抗体,在 MIA 的基础上研制了西加毒素免疫膜检测试剂盒,其检测的灵敏度最低为 $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前在市场上免疫法测定西加毒素是利用最广的一种简便、快速检测方法,许钦肖等采用该公司试剂盒对我国南部沿海 6 个地区进行检测分析,均检出染毒鱼类,总阳性检出率高达 50%,染毒种类主要包括蝴蝶鱼科、鹦嘴鱼科、鰕科、笛鯛科和指科,其中有 17.4% 的样品超过 $100 \text{ ng P-CTX1}/\text{kg}$ 肉,达到中毒水平^[6]。Campora 等用 ELISA 方法检测 175 个鱼类样品,约 9.4% 的样品检出西加毒素阳性^[31]。但该检测试剂盒也存在一些缺点,如可能非特异性地检测出其他的聚醚类海洋毒素,引起假阳性的产生,这就需要利用其他的辅助检测方法加以验证,才能获得一个准确、安全的检测结果。

2 结语

综上所述,随着西加毒素的毒素成分越来越被人们所认识,检测西加毒素的多种方法逐渐成熟,并且各种方法之间可以互相补充和验证,来确保检测诊断结果的准确性;为了适应市场对鱼类产品新鲜的要求,迫切需要建立现场快速检测诊断的检测方法和快速确证方法。因此,以抗原-抗体为

基础的免疫学检测方法和高效液相串联质谱法是以后研究与推广应用的重点,是今后西加毒素检测以及中毒诊断的发展方向。并且高效液相串联质谱法在西加毒素的毒理学性质研究、西加毒素纯品的提取制备等研究中起举足轻重的作用,该方法更是以后研究的热点。随着对西加毒素各方面研究的不断深入,将有助于多种检测方法更好地提高与完善。

参考文献

- [1] DECHRAOUI M Y, NAAR J, PAULLAC S, et al. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels [J]. *Toxicon*, 1999, 37(1): 125-143.
- [2] LEHANE L, LEWIS R J. Ciguatera: recent advances but the risk remains [J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 61: 91-125.
- [3] LAURENT D, KERBRAT A S, DARIUS H T, et al. Are cyanobacteria involved in Ciguatera fish poisoning-like outbreaks in New Caledonia [J]. *Harmful Algae*, 2008, 7(6): 827-838.
- [4] KERBRAT A S, DARIUS H T, PAULLAC S, et al. Detection of ciguatoxin-like and paralyzing toxins in *Trichodesmium* spp. from New Caledonia lagoon [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 61: 360-366.
- [5] ENDEAN R, MONKS S A, GRIFFITH J K, et al. Apparent relationships between toxins elaborated by the cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* and those present in the flesh of the narrow-barred Spanish mackerel *Scomberomorus commersoni* [J]. *Toxicon*, 1993, 31: 1155-1165.
- [6] 许钦肖, 王爱辉, 胡蓉, 等. 我国南部沿海近岸西加毒素的研究 [J]. *中国环境科学*, 2012(2): 330-336.
- [7] CATTERALL W. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1980; 20: 15-43.
- [8] CATTERALL W. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels [J]. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55: 953-985.
- [9] MANGER R, LEJA L, LEE S, et al. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts [J]. *J AOAC Int*, 1995, 78: 521-527.
- [10] MANGER R, LEJA L, LEE S, et al. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins [J]. *Analyt Biochem*, 1993, 214: 190-194.
- [11] DECHRAOUI M Y B, TIEDEKEN J A, PERSAD R, et al. Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: application to great barracuda from Florida Keys [J]. *Toxicon*, 2005, 46: 261-270.
- [12] BIENFANG P, OBEN B, DEFELICE S, et al. Ciguatera: the detection of neurotoxins in carnivorous reef fish from the coast of Cameroon, West Africa [J]. *Afr J Mar Sci*, 2008, 30: 533-540.
- [13] CAMPORA C E, DIERKING J, TAMARU C S, et al. Detection of ciguatoxin in fish tissue using sandwich ELISA and neuroblastoma cell bioassay [J]. *J Clin Lab Anal*, 2008, 22: 246-253.
- [14] DICKEY R W. Ciguatera toxins: chemistry, toxicology and detection [M]//BOTANA L M. Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2008: 479-500.
- [15] BOADA L D, ZUMBADO M, LUZARDO O P, et al. Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: an emerging risk in the Canary Islands (Spain) [J]. *Toxicon*, 2010, 56(8): 1516-1519.
- [16] CHAN W H, MAK Y L, WU J J, et al. Spatial distribution of ciguateric fish in the Republic of Kiribati [J]. *Chemosphere*, 2011, 84: 117-123.
- [17] WU J J, MAK Y L, MURPHY M B, et al. Validation of an accelerated-solvent extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for Pacific ciguatoxin-1 in fish flesh and comparison with the mouse neuroblastoma assay [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(9): 3165-3175.
- [18] 蔡朝民, 袁建辉, 谢猛, 等. 雪卡毒素两种检测方法的比较研究 [J]. *中国热带医学*, 2009, 9(8): 1448-1450.
- [19] CAILLAUD Y A, EIXARCH H, DE LA IGLESIA P, et al. Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands [J]. *Food Additives and Contaminants, Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2012, 29(6): 1000-1010.

2.6 冰葡萄酒感官评价结果 试验选定 60 位女同学、50 位男同学按表 1 所列感官要求对 9 组试样进行评价,所得平均分数如表 8 所示。

表 8 正交试验感官评价得分

菌种	温度//℃		
	12	20	28
1 号菌种	77.5	77.0	74.0
3 号菌种	75.5	73.5	70.5
莱蒙特 D ₄₇	79.0	80.5	75.5

3 结论与讨论

综上所述,在冰葡萄酒酿造过程中,可溶性固形物呈下降趋势,且发酵温度越高,糖的消耗起始时间越短,糖的消耗速度也越快;在冰葡萄酒酿造过程中,总酸含量保持较平稳,或略微下降。在冰葡萄酒酿造过程中,挥发酸含量呈上升趋势,并均符合冰葡萄酒挥发酸含量标准值(≤ 2.1 g/L)。莱蒙特 D₄₇ 菌种在 12℃ 下酿造得到了感官评价的最高评分,其可溶性固形物含量为 27.8°Brix,总酸含量为 11.4 g/L,挥发酸含量为 561.0 mg/L,酒精度为 11.2%,为进一步降低成本和发酵强度的研究奠定了基础。

辽宁桓仁县已逐渐成为我国冰葡萄酒产地的地理标志^[12],该研究不仅对其今后的进一步发展研究起到基础研究的作用,更为冰酒品种开发铺垫了一套研究方法。该试验对冰葡萄酒在酿造过程中成分变化进行研究,将对冰葡萄酒的品质、发酵条件优化及加工技术的提高都具有重要的科学意义,同时对开拓国际国内市场具有重要的实际意义。该试

验结果可为以后研究冰葡萄酒的理化成分做一个数据参考,同时在菌种筛选试验中得到相对较好的菌种,为今后优良菌种的培育奠定了基础。同时,可为冰梨、冰苹果等其他类冰冻水果进行冰酒酿造开发提供理论参考^[13]。

参考文献

- [1] 高献亭,刘建华.冰葡萄酒发展态势[J].保鲜与加工,2008,8(4):54-55.
- [2] 陈玉庆.葡萄酒的成分与营养价值[J].酿酒,2004(5):12.
- [3] 裴广仁.辽宁桓仁冰酒产区冰葡萄酒关键工艺研究[D].烟台:烟台大学,2010.
- [4] 付方宝.冰葡萄酒酿造工艺的特异性研究[D].北京:中国农业大学,2006.
- [5] 朱宝镛,赵光鳌,张继民,等.葡萄酒科学与工艺[M].北京:中国轻工业出版社,1992:188-189.
- [6] SHIMAZU Y, WATANAE M. Effects of yeast strains and environmental conditions of formation of organic acids in must fermentation [J]. Ferment Tech, 1981, 59: 27-32.
- [7] 邵卫平.冰酒生产工艺及其品质影响因素[J].酿酒,2004,31(2):73-74.
- [8] MARGARET C, DOGAN Y, BENOIT G, et al. Characterization of canadian ice wines by sensory and compositional analyses [J]. Am J Enol Vitic, 2002, 53(1): 46-53.
- [9] ARGYRIS TSAKIRIS, ATHANASIOS A, KOUTINAS. A new process for wine production by penetration of yeast in un-crushed frozen grapes [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 162: 1109-1121.
- [10] 裴广仁,李济明,赵玉平,等.冰葡萄酒酵母的筛选[J].食品与发酵工业,2010,36(6):98-102.
- [11] 张兰威,崔宏斌.传统法酿造糯米酒中酵母菌的筛选及发酵特性研究[J].食品工业科技,2007,28(8):88-93.
- [12] 鲁会玲.建立寒地特色葡萄酒酒庄推动区域葡萄产业发展[J].北方园艺,2004(6):6-7.
- [13] 黄卫东,李景明,王秀芹,等.冰葡萄酒生产及其在我国的发展[J].农产品加工学刊,2005(9):55-60.
- [20] LEWIS R J, JONES A. Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners present in ciguatera fish by gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Toxicon, 1997, 35: 159-168.
- [21] POTTIER I, HAMILTON B, JONES A, et al. Identification of slow and fastacting toxins in highly ciguateric barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding [J]. Toxicon, 2003, 42: 663-672.
- [22] LEWIS R J, YANG A, JONES A. Rapid extraction combined with LC-tandem mass spectrometry (CREM-LC/MS/MS) for the determination of ciguatoxins in ciguatera fish flesh [J]. Toxicon, 2009, 54: 62-66.
- [23] STEWART I, EAGLESHAM G K, POOLE S, et al. Establishing a public health analytical service based on chemical methods for detecting and quantifying Pacific ciguatoxin in fish samples [J]. Toxicon, 2010, 56: 804-812.
- [24] DECHRAOUI M Y B, TIEDEKEN J A, PERSAD R, et al. Use of two detection methods for discriminating ciguatoxins from brevetoxins: application to Great Barracuda from Florida [J]. Toxicon, 2005, 46: 261-270.
- [25] 刘红河,刘桂华,杨俊,等.高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定鱼体中雪卡毒素[J].分析化学,2009(37):1675-1678.
- [26] WU J J, MAK Y L, MURPHY M B, et al. Validation of an accelerated solvent extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for Pacific ciguatoxin in-1 in fish flesh and comparison with the mouse neuroblastoma assay [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400: 3165-3175.
- [27] HOKAMA Y, BANNER A H, BOYLAND B. A radioimmunoassay for the detection of ciguatoxin [J]. Toxicon, 1977, 15: 317-325.
- [28] HOKAMA Y. Recent methods for detection of seafood toxins: recent immunological methods for ciguatoxin and related polyethers [J]. Food Addit Contam, 1993, 10(6): 71-82.
- [29] HOKAMA Y, NISHIMUR K, TAKENAKA W, et al. Simplified solid phase membrane immunobead assay (MIA) with monoclonal anticiguatoxin antibody (Mab-CTX) for detection of ciguatoxin and related polyether toxins [J]. J Nat Toxins, 1998, 7(1): 1.
- [30] NAGUMO Y, OGURI H, SHINDO Y, et al. Concise synthesis of ciguatoxin ABC-ring fragments and surface plasmon resonance study of the interaction of their BSA conjugates with monoclonal antibodies [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2001, 11(15): 2037-2040.
- [31] CAMPORA C E, DIERKING J, TAMARU C S, et al. Detection of ciguatoxin in fish tissue using sandwich ELISA and neuroblastoma cell bioassay [J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2008, 22: 246-253.

(上接第 801 页)