

# 中国沿海部分地区半褶织纹螺的毒性及毒素组成分析\*

罗璇<sup>1,2</sup> 于仁成<sup>1,3</sup> 王晓杰<sup>4</sup> 周名江<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071; 4. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

**摘要** 为确定中国沿海不同地区织纹螺中的毒素成分,本研究在江苏省、浙江省和福建省设立了多个采样点,对采集的半褶织纹螺样品进行了毒性测试和毒素组成分析。研究结果显示,采集的织纹螺样品毒性范围为 2—664MU(mouse unit)/g 湿重,其中,采自江苏省连云港地区的织纹螺样品毒性远高于其它地区。应用高效液相色谱-质谱联用(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)方法对样品中的毒素成分进行分析,在各地的织纹螺样品中均检测到了河豚毒素(TTX)及 trideoxyTTX、4-epiTTX 和 anhydroTTX 等衍生物,但各种毒素成分所占的比例存在差异。自江苏省连云港市和浙江省舟山市采集的织纹螺样品中,TrideoxyTTX 是主要的毒素成分,TTX 和其它两种毒素成分次之;而自江苏省盐城市、浙江省宁波市及福建省宁德市和莆田市采集的织纹螺样品中,TTX 的含量最高。采集自江苏省连云港和浙江省舟山市的大部分织纹螺样品中,肌肉组织的毒素含量最高,其次是消化腺组织,其余组织中的毒素含量最低。高毒性成分 TTX 的最高值主要出现在肌肉组织或消化腺组织中。从实验结果可以看出,各地的有毒织纹螺中毒素成分基本一致,而各种毒素成分所占的比例有一定的差异,织纹螺的毒性与高毒性成分 TTX 的含量有关。

**关键词** 织纹螺(*Nassarius* spp.); 河豚毒素及其同系物; 毒素组成; LC-MS

**中图分类号** S917.4; R155.51 doi: 10.11693/hyh20151100289

织纹螺(*Nassarius* spp.)是一类海洋腹足类动物,腐食性,广泛分布于热带、亚热带及温带地区的潮间带及海底(Britton *et al.*, 1994a, b)。我国沿海部分地区的居民素有食用织纹螺的习惯,因食用织纹螺导致的食物中毒事件近年来多次发生。1991—2003 年期间,江苏省连云港市发生了 10 起食用织纹螺导致的食物中毒事件,其中 40 人中毒,8 人死亡(林祥田等, 2005)。从 1979 年到 2000 年,浙江省舟山市发生类似中毒事件 42 起,导致 307 人中毒,其中 16 人死亡。1985 年至 2000 年期间,浙江省宁波市有 59 人因食用有毒织纹螺中毒,其中 18 人死亡(水黎明等, 2001; 秦

品章等, 2003)。1989 至 2010 年期间,福建省宁德市共发生类似中毒事件 22 起,导致 79 人中毒,其中 10 人死亡(郭胜利, 2012)。另外,海南、广东及台湾地区也多次发生食用织纹螺导致的食物中毒事件(Hwang *et al.*, 1995, 2002; Hwang *et al.*, 2005)。对此,我国卫生部门采取了多种相关措施,并在中毒事件高发期限制水产品市场上的织纹螺交易,一定程度上减少了中毒事件的发生。但是,由于对织纹螺的毒性消长规律及毒素组成情况仍缺乏清楚的认识。2012 年 7 月浙江省温州市再次发生中毒事件,引起了公众的广泛关注(林学尧等, 2015)。

\* 国家自然科学基金面上项目, 30571426 号; 国家自然科学基金委-山东省联合基金项目, U14066403 号, U14066403 号; 国家海洋局公益项目, 201305010-1 号; 国家自然科学基金创新研究群体项目, 40821004 号。罗璇, E-mail: luoxuan@qdio.ac.cn

通讯作者: 于仁成, 博士生导师, 研究员, E-mail: rcyu@qdio.ac.cn

收稿日期: 2015-11-20, 收修改稿日期: 2015-12-25

以往研究发现,采集自福建省的织纹螺毒性消长具有明显的季节性和地域性特征(罗璇等, 2008),河豚毒素及其衍生物(tetrodotoxins, TTXs)是织纹螺中主要的致毒成分(Hwang *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2005; Shui *et al.*, 2003; 于仁成等, 2007)。但是,也有学者发现织纹螺(*Nassarius papillosus*)中同时存在河豚毒素和麻痹性贝毒毒素(paralytic shellfish toxins, PSTs)(Hwang *et al.*, 1995; 徐景野等, 2010)。TTX 是一种钠离子通道阻断剂,广泛存在于陆地和海洋生物体内。在法螺、细纹玉螺、蛙螺、日本油螺、骨螺、榧螺和织纹螺等腹足类软体动物体内,经常检测到 TTX(Narita *et al.*, 1981; Noguchi *et al.*, 1981, 1984; Yasumoto *et al.*, 1981; Jeon *et al.*, 1984; Hwang *et al.*, 1990, 1991a, b c; Hwang *et al.*, 2003)。TTX 存在一系列结构相似的同系物,如 4-epiTTX、6-epiTTX、11-deoxyTTX、4,9-anhydroTTX、11-norTTX-(S)-ol、5,6,11-trideoxyTTX、11-oxoTTX 等,其毒性存在较大差异(Lai *et al.*, 2003)。在带有 TTX 的有毒生物中,由于毒素来源不同,毒素同系物间转化情况也有差别(Yotsu-Yamashita *et al.*, 1999),毒素组成往往有明显差异。运用 LC-MS 等分析技术,可以对织纹螺中的毒素成分进行定性定量检测,进而比较不同地域织纹螺中的毒素组成。

在本研究中,我们选取了中国沿海多个发生过食用织纹螺中毒事件的地区,采集织纹螺样品,并运用 LC-MS 方法对样品中的 TTX 及其同系物进行了分析,以研究不同地域织纹螺的毒素组成,探讨毒素组成与其毒性的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

自 2006—2007 年间,选取江苏省连云港市和盐城市、浙江省舟山市和宁波市,以及福建省宁德市和莆田市,在沿海地区潮间带和潮下带设立采样点,定期采集织纹螺样品(采样地如图 1 所示),所有样品均采自 4—8 月织纹螺种群数量较高的季节,其余月份由于织纹螺种群数量急剧下降,无法满足采样需求。采集到的样品被迅速冷冻处理,尽快运送到实验室,于  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存。选取各地采集的半褶织纹螺样品(*N. semiplicatus*)进行毒性测试和毒素分析。

### 1.2 毒性测试

半褶织纹螺样品的毒性测试采用小鼠生物法,过程参照美国分析化学家协会(Association of Analytical Communities, AOAC)公布的针对 PSP 的毒性测试方

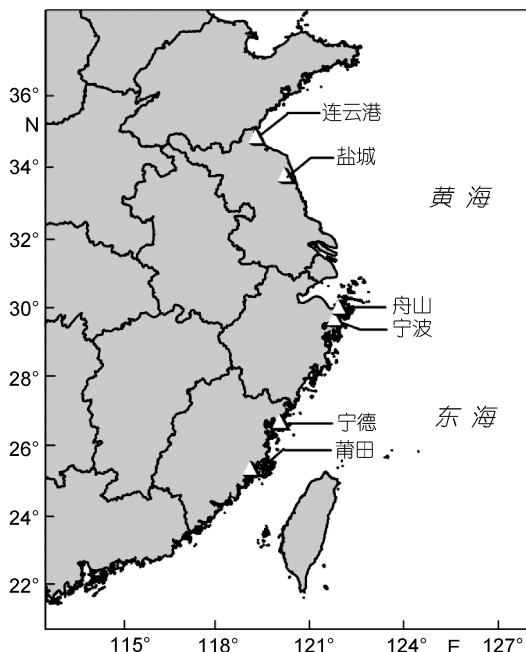


图 1 中国沿海织纹螺样品采样点设置图  
Fig.1 Sampling locations for nassariids

法(Williams, 1984)。这种方法对 PSP 毒素和 TTX 毒素的毒性测试都很有效。解剖取出完整的织纹螺软体组织,匀浆,称取 5g 匀浆后组织,加入 5mL HCl 溶液(0.1mol/L)进行提取,用组织高速分散器打碎,以 1.0mol/L HCl 调整其 pH 值至 2.0—4.0。将混合物放到沸水浴中加热 10min,取出冷却至室温后,再次以 1.0mol/L HCl 调整其 pH 值至 2.0—4.0,并将提取体系的最终体积定容到 10mL,在 6000r/min 转速下离心 15min,取上清液对实验小鼠(昆明系小鼠,购买自青岛市药品检验所)进行腹腔注射,观察小鼠的反应并记录下死亡时间和体重。样品的毒性水平依照 Hwang 等建立的剂量-死亡时间关系进行计算,以小鼠单位(mouse unit, MU)表示,1MU 代表能够在 30min 内杀死 1 只体重为 20g 雄性小鼠的毒素量(Hwang *et al.*, 1991)。用于生物毒性测试法的化学试剂均为分析纯级别以上。

### 1.3 毒素分析

半褶织纹螺样品的毒素分析采用 LC-MS 方法,系参照李爱峰等和于仁成等所用的方法(李爱峰等, 2007; 于仁成等, 2007),并略有改动。用于 LC-MS 分析的化学试剂均为色谱纯,实验用水为经 Millipore 纯水系统净化的超纯水(Millipore, 美国)。TTX 标准品购买自美国 Calbiochem 公司。

取 2g 匀浆后的织纹螺组织,加入 4mL 酸化甲醇

水(甲醇:水=80:20,含0.1%乙酸),在冰浴中用组织分散器处理5min后静置,进行毒素提取,在20℃下6000r/min离心15min,取上清液。向离心后剩余残渣中再加入4mL酸化甲醇水重复提取1次。合并提取液,在45℃下旋转蒸发至干。以4mL 0.05mol/L乙酸分多次溶解残余物,并定容至5mL。前后加入等体积二氯甲烷进行二次脱脂后,将含有毒素的水相吸出,用孔径为3000Da的超滤离心管(Millipore, Bedford, MA, USA)在12000r/min转速下离心15min,滤出液用于LC-MS/MS分析TTX及其同系物。

对数量相对较多的采集自的江苏连云港和浙江舟山两地的织纹螺样品进行了组织分离,将其分为肌肉、消化腺及其它组织三部分,并分别提取毒素和分析,以了解毒素在织纹螺不同解剖学组织中的含量与分布情况。

样品分析所用的LC-MS系统为Varian 2100 L(Varian公司,美国)型高效液相色谱仪串联三重四极杆质谱仪,采用电喷雾离子化源。毒素的分离采用亲水性相互作用色谱柱SeQuant ZIC-HILIC(150×2.1mm, 5μm),购自瑞典SeQuant AB公司。流动相A为超纯水,流动相B为90%乙腈,两者中均含有5mmol/L甲酸铵和5mmol/L甲酸。洗脱采用了梯度洗脱,洗脱液的初始比例为A:B=30:70,前7min内流动相A的比例逐渐增加至50%,在第8分钟回复至初始比例,并保持12min。流速为0.2mL/min,进样量3—10μL(根据样品小鼠测试毒性结果大小而定)。

检测模式采用多反应检测方式(Multiple reaction monitoring, MRM),分别检测trideoxy TTX(272.30/162.10), anhydro TTX(302.30/162.10), deoxy TTX(304.30/162.10), TTX及其同分异构体4-epi TTX(320.30/162.10), oxo TTX(336.30/162.10)。通过流动注射(FIA)方式,以0.25μg/mL的TTX标准品溶液(流速0.2mL/min)对质谱检测器进行调谐后,设定参数为:质谱进液针(needle)电压5400V,电流为31μA;干燥气温度为150℃,气压为19psi;电喷雾离子化源氮气压为57psi;毛细管扫描电压为79V;电离室温度为50℃;保护电压600V;阳离子模式检测器电压为1750V;离子导向电压(Q0),一级(Q1)和二级(Q3)电压分别为-4.9V、-0.8V和-0.2V;碰撞能-36.5V。

将TTX毒素标准品用0.05mol/L乙酸溶液稀释,得到0.002、0.01、0.05、0.25、1.00、2.5、5.0和10μg/mL不同浓度的系列标准,用于绘制方法标准曲线。

织纹螺样品中TTX含量依照TTX的标准品浓度

计算。由于缺少TTX同系物的标准品,对TTX同系物的定量分析参照TTX标准品的浓度进行计算。

## 2 实验结果

### 2.1 织纹螺样品毒性状况

根据小鼠生物法测试结果,采用Hwang提出的小鼠死亡时间与样品毒性关系表(Hwang *et al*, 1991)进行分析,表明采自各地的织纹螺样品毒性范围在2—664MU/g组织(湿重)之间。1MU大约相当于0.22μg TTX。在所有采样点中,来自江苏省连云港的织纹螺毒性最高,均在100MU/g组织(湿重)以上,最高达到664MU/g组织(湿重),相当于每100g组织中含有14.6mg TTX毒素。根据织纹螺软组织的平均湿重计算,所采集的高毒性织纹螺个体中含有约58.4μg TTX。采集自其它五个地区的织纹螺毒性相对较低,在2—6MU/g组织之间(表1)。

### 2.2 TTX的LC-MS分析方法

实验采用了亲水性相互作用色谱法对TTX毒素及其同系物进行分离,结果显示,亲水性相互作用色谱柱(ZIC-HILIC)对TTX有很好的保留效果,TTX保留时间为9.84min(图2a),在测定的TTX毒素浓度范围内(25—400ng/mL),信号与毒素浓度之间有良好的线性响应, $R^2=0.9968$ (图3)。同时,由于串联质谱对杂质信号优异的去除能力,该方法对TTX的检出限较低,信噪比等于3(Signal/Noise=3)时为0.01pg。同一浓度的TTX标准溶液(150ng/mL)分析结果的变异系数小于7%( $n=3$ ),说明该方法具有较高的精密度(见表2)。

### 2.3 中国沿海不同地域织纹螺样品的毒素组成与含量

运用上述LC-MS方法,从有毒织纹螺样品中检测到了TTX及trideoxyTTX, 4-epiTTX和anhydroTTX等毒素同系物(图2b)。毒素分析结果显示,在采集自中国沿海不同地域的织纹螺样品中,毒素成分基本一致,但TTX和trideoxyTTX所占的比例有所不同(图4—图6)。采集自江苏省盐城市、浙江省宁波市,福建省莆田市和宁德市的织纹螺样品中,TTX是主要的毒素成分,其次是trideoxyTTX, 4-epiTTX和anhydroTTX含量最低(图4A—C,图5A—B,图6)。而在采集自江苏省连云港市和浙江省舟山市的织纹螺样品中,trideoxyTTX的含量最高,远高于TTX和其它同系物(图4D—F,图5C—D)。对比织纹螺样品的毒性测试和TTX毒素含量(图7)可以看出,织纹螺的毒性主要

表 1 中国沿海不同地区采集的织纹螺样品毒性状况  
Tab.1 Toxicity of nassariid samples from different locations along the coast of China

采样地点	采样日期	平均个体组织重量(g)	毒性(MU/g)	
江苏	盐城射阳	2006-05-06	0.30	4.4
	盐城射阳	2006-05-25	0.31	4.9
	盐城射阳	2006-06-19	0.34	3.6
	连云港赣榆	2007-05-21	0.40	664.3
	连云港赣榆	2007-06-06	0.43	611.7
	连云港赣榆	2007-08-08	0.40	151.9
浙江	宁波象山港	2006-07-11	0.23	2.5
	宁波象山港	2006-08-02	0.21	2.4
	舟山定海	2006-07-07	0.31	3.2
	舟山定海	2006-08-28	0.20	6.4
福建	莆田哆头	2006-05-02	0.20	4.4
	莆田哆头	2006-05-12	0.22	3.3
	莆田哆头	2006-05-30	0.24	3.2
	宁德霞浦	2006-04-03	0.24	3.4
	宁德霞浦	2006-07-24	0.25	2.4

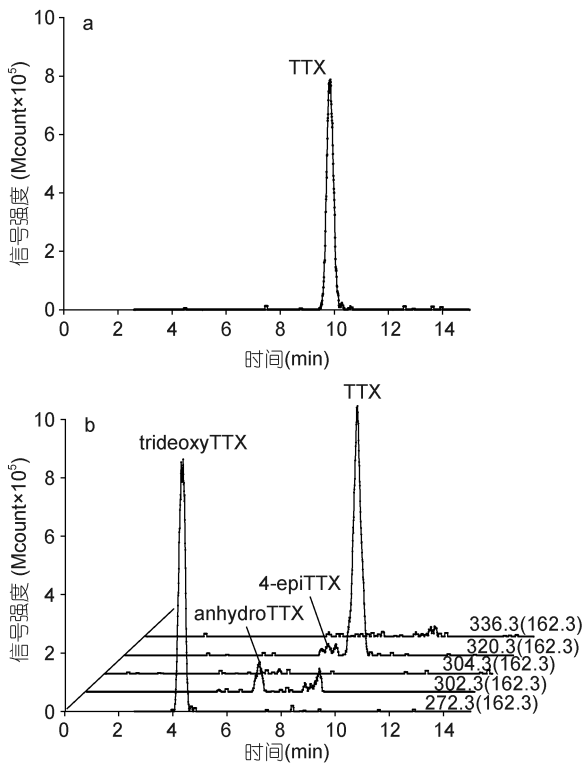


图 2 应用 LC-MS/MS 方法分析 TTX 毒素标准品和织纹螺样品(采集自江苏连云港赣榆)的色谱图

Fig.2 LC-MS/MS chromatograms of the TTX (tetrodotoxin) standard and a nassariid sample collected from Lianyungang (a) LC-MS/MS 分析 TTX 标准品的色谱图; (b) LC-MS/MS 分析半褶织纹螺样品(采集自江苏连云港赣榆)的色谱图  
(a) Chromatogram of the TTX standard; (b) Chromatogram of a *N. semiplicatus* sample collected from Lianyungang, China

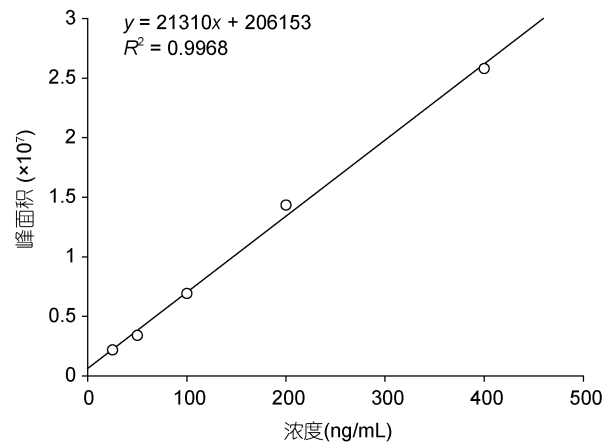


图 3 用 LC-MS 分析 TTX 的标准工作曲线  
Fig.3 Calibration curve for TTX using LC-MS method

表 2 应用 LC-MS 方法分析 TTX 标准毒素的精密度  
Tab.2 Reproducibility in TTX analysis using LC-MS method

TTX	150ng/mL	
	峰面积	峰高
平均值(n=3)	27816667	1589000
标准偏差	1255242	105910
相对标准偏差(%)	4.51	6.67

由其高毒性成分 TTX 决定( $R^2=0.839$ ), 而与其体内各种毒素的总量关系不大。

#### 2.4 毒素在织纹螺中的解剖学分布

对采集自江苏省连云港市和浙江省舟山市的半

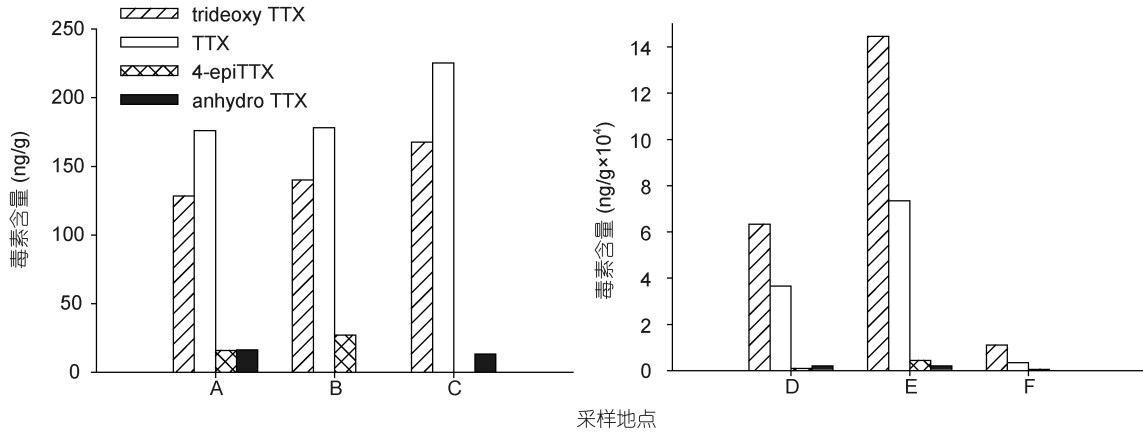


图 4 采集自江苏省不同地区的半褶织纹螺样品毒素组成

Fig.4 The toxin profiles of *N. semiplicatus* collected from two locations of Jiangsu Province

A—C: 采集自江苏省盐城射阳的半褶织纹螺样品(A: 2006-5-6; B: 2006-5-25; C: 2006-6-19); D—F: 采集自江苏省连云港赣榆的半褶织纹螺样品(D: 2007-5-21; E: 2007-6-6; F: 2007-8-6)  
 A—C: from Sheyang (A: on 2006-5-6; B: on 2006-5-25; C: on 2006-6-19); D—F: from Ganyu (D: on 2007-5-21; E: on 2007-6-6; F: on 2007-8-6)

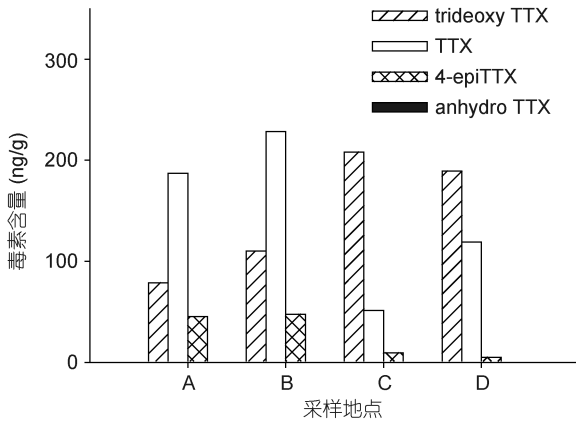


图 5 采集自浙江省不同地区的半褶织纹螺样品毒素组成  
Fig.5 The toxin profiles of *N. semiplicatus* collected from two locations of Zhejiang Province

A—B: 采集自浙江省宁波象山港的半褶织纹螺样品(A: 2006-7-11; B: 2006-8-2); C—D: 采集自浙江省舟山定海的半褶织纹螺样品(C: 2006-7-7; D: 2006-8-28)  
 A— B: from Xiangshan Harbor (A: on 2006-7-11; on B: 2006-8-2); C—D: from Dinghai (C: on 2006-7-7; D: on 2006-8-28)

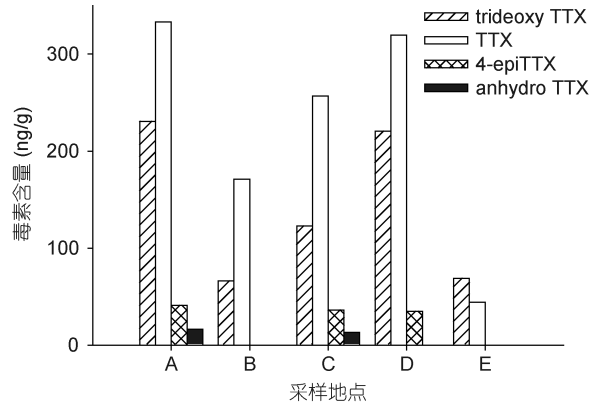


图 6 采集自福建省不同地区的半褶织纹螺样品毒素组成  
Fig.6 Comparison of toxin profiles of *N. semiplicatus* collected from two locations of Fujian Province

A—C: 采集自福建省莆田哆头的半褶织纹螺样品(A: 2006-5-2, 低潮区; B: 2006-5-16, 高潮区; C: 2006-5-30, 高潮区); D—E: 采集自福建省宁德霞浦的半褶织纹螺样品(D: 2006-4-3; E: 2006-6-24)  
 A—C: from Duotou (A: on 2006-5-2 in low tide zone; B: on 2006-5-16 in high tide zone; C: on 2006-5-30 in high tide zone); D—E: from Xiapu (D: on 2006-4-3; E: on 2006-6-24)

褶织纹螺样品进行了组织分离、毒素提取和分析。如图 8 所示, 除 2007 年 8 月 6 日采集的织纹螺样品外, 其余两个采集自江苏连云港的样品中肌肉组织的毒素总量最高, 其次是消化腺组织, 而其它组织中的毒素总量最低。各组织中主要的毒素成分均是 trideoxyTTX, 其次是 TTX 和其它毒素成分。而采集自浙江舟山的两个织纹螺中, 均是肌肉组织中的毒素总量最高, 其次是消化腺组织与其它组织。肌肉组织和其它组织中的主要毒素成分是 trideoxyTTX, TTX 次之; 消化腺组织中 trideoxyTTX 和 TTX 的含量相当, 均为主要毒素成分(图 9)。

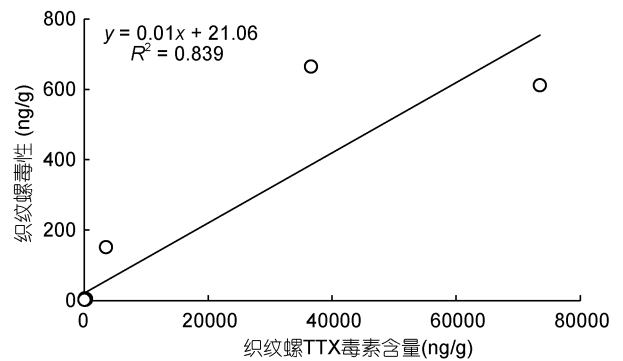


图 7 半褶织纹螺毒性与其 TTX 含量之间的关系

Fig.7 The relationship between the toxicity of *N. semiplicatus* and TTX content

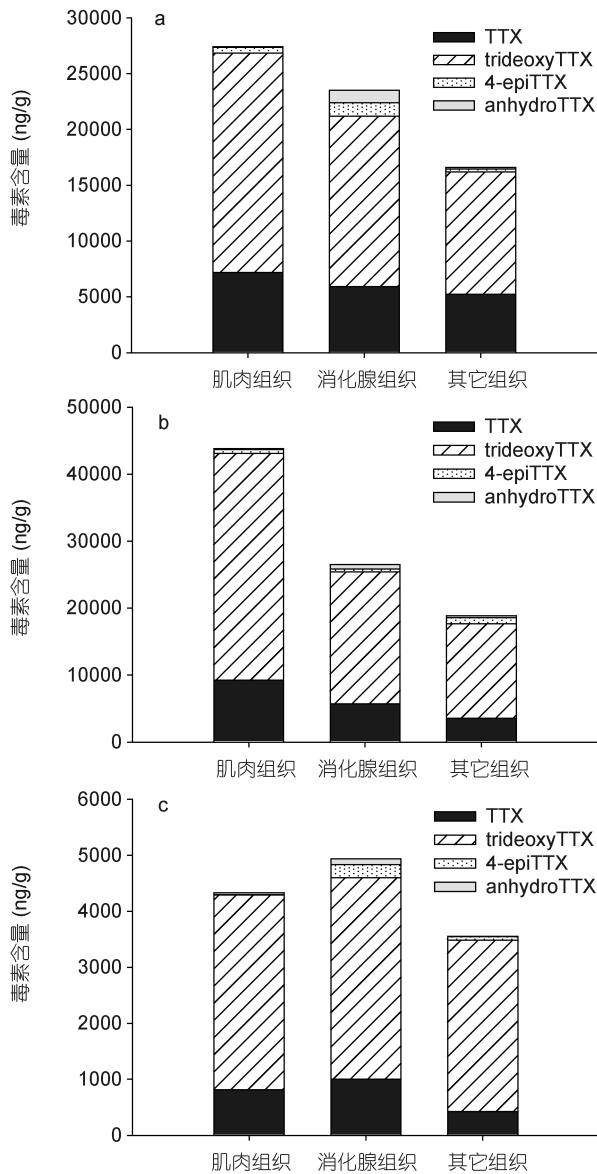


图8 江苏连云港采集半褶织纹螺体内河豚毒素的解剖学分布(a: 2007-5-21; b: 2007-6-6; c: 2007-8-6)

Fig.8 Anatomical distribution of toxins in *N. semiplicatus* collected from Lianyungang, Jiangsu Province  
a: on 2007-5-21; b: on 2007-6-6; c: on 2007-8-6

### 3 讨论

TTX 是一种非蛋白类神经性毒素, 可导致食物中毒。TTX 最早在河豚鱼中检测到, 随着研究的深入, 在多种陆地和海洋生物体内检测到 TTX 及其同系物 (Yasumoto *et al.*, 1986), 如河豚鱼 (Mahmud *et al.*, 1999)、蛙类 (Mebs *et al.*, 1995)、腹足类软体动物 (Hwang *et al.*, 1992a, b)、纽虫 (Asakawa *et al.*, 2000, 2003)、蛸螈 (Yotsu-Yamashita *et al.*, 2007a)、章鱼 (Yotsu-Yamashita *et al.*, 2007b)、蟹 (Ho *et al.*, 2006) 及海

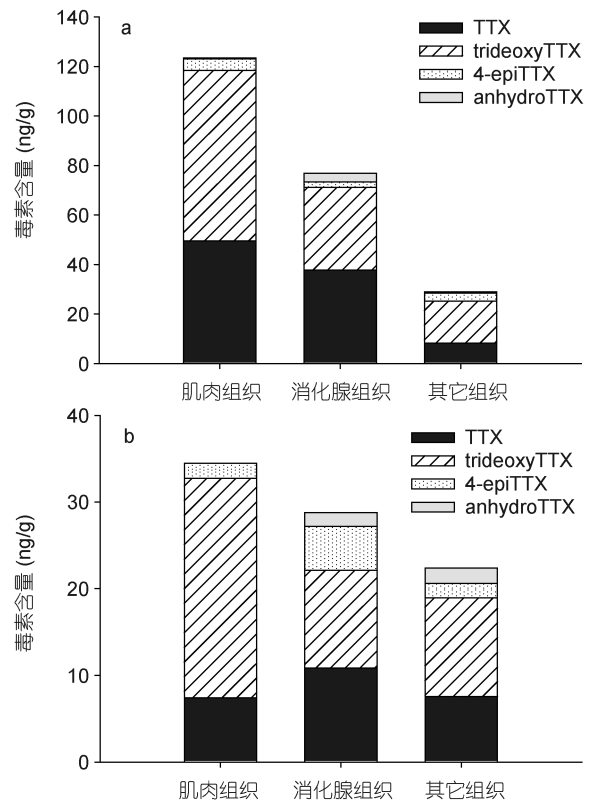


图9 浙江舟山采集半褶织纹螺体内河豚毒素的解剖学分布(a: 2006-7-7; b: 2006-8-28)

Fig.9 Anatomical distribution of toxins in *N. semiplicatus* collected from Zhoushan, Zhejiang Province  
a: on 2006-7-7; b: on 2006-8-28

星 (Lin *et al.*, 2001) 等。因食用含 TTX 的腹足类软体动物而导致的中毒事件首先在日本报道 (Narita *et al.*, 1981)。之后, 多种织纹螺 (如 *Zeuxius scalaris* 和 *Natica clathrata* 等) 在台湾引发食物中毒事件 (Hwang *et al.*, 1995)。自 1977 年开始, 我国浙江省发生了 40 多起织纹螺导致的中毒事件 (水黎明等, 2001)。在肇事织纹螺中, 大部分样品只含有 TTX 及其衍生物 (主要是 anhydroTTX)。但也有学者发现, 在部分玉螺科和织纹螺科的软体动物中, 除 TTX 外, 还存在麻痹性贝类毒素 (Hwang *et al.*, 1994, 1995; 徐景野等, 2010)。

本研究从中国沿海三省六个地区采集了 15 份织纹螺样品。经毒性测试, 大部分样品毒性在 2—6 MU/g 组织 (湿重) 之间, 而采自江苏省连云港的样品毒性较高, 均在 100 MU/g 组织 (湿重) 以上, 远高于其它地区的样品, 毒性最高可达 664 MU/g 组织 (湿重)。根据 Tani 提出的 TTX 对于人类的口服致死剂量为 10000 MU 的标准 (Tani, 1945), 食用数粒高毒性织纹螺样品就足以导致中毒。因此, 建议江苏省连云港赣榆当地的水产品安全监督部门对当地织纹螺的毒性

进行长期监测, 禁止居民食用, 以避免食物中毒事件。

本研究采用了亲水性相互作用色谱分离河豚毒素及其衍生物, 通过三重四级杆串联质谱在多反应检测模式下分析织纹螺中的 TTX 及其同系物。2001 年, Shoji 等(2001)首先应用 LC-MS 方法分析了河豚鱼体内的 TTX, 后来的研究发现亲水性相互作用色谱对于 TTX 及其同系物的分析很有优势(Nakagawa *et al.*, 2006)。本研究的结果同样表明亲水性相互作用色谱与串联质谱的结合非常适合织纹螺中的 TTX 及其同系物的检测, 是一种高效、快速的毒素分析方法。

通过毒素提取、超滤处理及 LC-MS/MS 分析, 在半褶织纹螺中均检测到了 TTX 及 trideoxyTTX, 4-epiTTX 和 anhydroTTX 等毒素同系物。受到毒素标准品限制, 在分析时使用 TTX 标准品对 TTX 的衍生物进行了定量计算, 与其实际含量可能存在一定偏差, 但不会影响不同样品间毒素组成的比较。通过对江苏省连云港市和浙江省舟山市的织纹螺样品毒素组成情况进行 4—5 个月的连续监测, 发现同一地区织纹螺毒素组成和毒素成分间相对比例非常稳定, 说明季节性因素对织纹螺毒素组成无明显影响(Luo *et al.*, 2012)。而对比各地采集的织纹螺样品可以看出, 样品中河豚毒素组成基本一致, 仅 TTX 和 trideoxyTTX 所占的比例有所不同。这一差异是否与各地海域环境条件有关, 仍有待于进一步研究。在检测到的 TTX 及其同系物中, TTX 的毒性最强, 通过腹腔注射对小鼠的半致死剂量  $LD_{50}$  约为  $8\mu\text{g}/\text{kg}$ , 而其余几种毒素成分的毒性远低于 TTX(Lai *et al.*, 2003)。通过对比织纹螺毒性与 TTX 含量之间的关系, 发现两者呈明显的正相关性, 说明高毒性毒素成分 TTX 对织纹螺毒性的贡献较大。

从江苏连云港和浙江舟山两地半褶织纹螺不同组织中的毒素组成来看(图 8—9), 毒性相对较低的 trideoxyTTX 在肌肉组织、消化腺组织和其它组织中是主要的毒素成分, 而毒性较大的 TTX 含量次之, 4-epi-TTX 和 anhydroTTX 的含量最少。大部分样品中, 毒素总量最高的是肌肉组织, 其次是消化腺组织, 其它组织中毒素总量最低, 但主要致毒成分 TTX 含量最高值出现在肌肉或消化腺组织中。李爱峰等(2008)对 2004 年导致福建仙游地区中毒事件的红带织纹螺(*N. succinctus*)进行研究, 也发现其不同组织中 trideoxyTTX 相对比例最高, 且高毒性毒素成分主要分布在内脏组织中。这种不同毒素成分在织纹螺不同组织的分布差异, 可能与其代谢过程有关, 具体机

制还有待于进一步探讨。

## 4 结论

本研究通过应用液-质联用分析方法和小鼠生物毒性测试法, 对采自我国沿海不同地区的 15 份半褶织纹螺样品进行了毒性和毒素分析。结果表明, 所采集的半褶织纹螺样品毒性范围为 2—664MU/g 湿重, 存在较大地域性差异, 其中江苏省连云港地区的半褶织纹螺样品毒性远高于其它地区。各地半褶织纹螺样品中的毒素成分基本一致, 均检测出 TTX 及 trideoxyTTX、4-epiTTX 和 anhydroTTX 等衍生物, 但各种毒素成分所占的比例存在差异。江苏连云港和浙江舟山的织纹螺样品中, TrideoxyTTX 是主要的毒素成分; 而江苏盐城、浙江宁波及福建宁德、莆田的织纹螺样品中, TTX 的含量最高。江苏连云港和浙江舟山的大部分织纹螺样品中不同组织间毒素含量存在差异, 肌肉组织的毒素含量最高, 其次是消化腺组织, 其余组织中的毒素含量最低, 高毒性成分 TTX 的最高值主要出现在肌肉组织或消化腺组织中。

致谢 衷心感谢江苏省连云港卫生监督所, 盐城射阳疾病预防控制中心以及福建省莆田市政府在织纹螺样品采集中的帮助, 中国科学院海洋研究所海洋标本馆张素萍研究员在织纹螺种类鉴定中给予的指导, 以及浙江省舟山海洋生态环境监测站的母清林工程师在毒素分析过程中给予的帮助, 谨致谢忱。

## 参 考 文 献

- 于仁成, 周名江, 李爱峰等, 2007. 中国沿海两例食用织纹螺中毒事件中织纹螺体内毒素分析. 中国水产科学, 14(5): 801—806
- 水黎明, 陈 坤, 王建跃等, 2001. 1977—2000 年舟山市织纹螺中毒流行病学特征及毒理学监测结果分析. 海峡预防医学杂志, 7(5): 4—7
- 李爱峰, 于仁成, 周名江, 2007. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用分析河豚毒素. 分析化学, 35(3): 397—400
- 李爱峰, 于仁成, 周名江等, 2008. 河豚毒素及其衍生物在织纹螺体内的解剖分布初探. 卫生研究, 37(4): 448—451
- 林学尧, 林 洁, 张秀尧等, 2015. 多起食用织纹螺中毒的流行病学调查. 中国卫生检验杂志, 25(10): 1646—1648
- 林祥田, 张明生, 张元瑛等, 2005. 连云港地区织纹螺食物中毒的流行病学研究. 江苏预防医学, 16(2): 5—7
- 罗 璇, 于仁成, 王晓杰等, 2008. 福建沿海部分地区织纹螺毒性消长及毒素成分分析. 水产学报, 32(4): 636—643
- 徐景野, 许国章, 叶鹿鸣等, 2010. 宁波地区织纹螺毒性特征探索研究. 卫生研究, 39(4): 494—497
- 秦品章, 于 梅, 2003. 1985—2000 年宁波市织纹螺食物中毒的调查. 中华预防医学杂志, 37(4): 226
- 郭胜利, 2012. 22 起食用织纹螺中毒事件的分析. 现代预防医

- 学, 39(14): 3515—3516
- Asakawa M, Toyoshima T, Ito K *et al*, 2003. Paralytic toxicity in the ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins. *Toxicon*, 41(7): 747—753
- Asakawa M, Toyoshima T, Shida Y *et al*, 2000. Paralytic toxins in a ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertean) adherent to cultured oysters in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon*, 38(6): 763—773
- Britton J C, Morton B, 1994a. Marine carrion and scavengers. *Ocean Mar Biol Ann Rev*, 32: 369—434
- Britton J C, Morton B, 1994b. Food choice, detection, time spent feeding, and consumption by two species of two subtidal Nassariidae from Monterey Bay, California. *Veliger*, 37: 81—92
- Ho P H, Tsai Y H, Hwang C C *et al*, 2006. Paralytic toxins in four species of coral reef crabs from Kenting National Park in southern Taiwan. *Food Control*, 17(6): 439—445
- Hwang D F, Cheng C A, Jeng S S, 1994. Gonyautoxin-3 as a minor toxin in the gastropod *Niotha clathrata* in Taiwan. *Toxicon*, 32(12): 1573—1579
- Hwang D F, Cheng C A, Tsai H T *et al*, 1995. Identification of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in marine gastropods implicated in food poisoning. *Fish Sci*, 61(4): 675—679
- Hwang D F, Chueh C H, Jeng S S, 1990. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Natica lineata* (lined moon shell). *Toxicon*, 28(1): 21—27
- Hwang D F, Jeng S S, 1991a. Bioassay of tetrodotoxin using ICR mouse strain. *J Chin Biochem Soc*, 20: 80—86
- Hwang D F, Li C L, Sen S J, 1992a. Occurrence of a new toxin and tetrodotoxin in two species of the gastropod mollusk Nassariidae. *Toxicon*, 30(1): 41—46
- Hwang D F, Lin L C, Jeng S S, 1992b. Occurrence of tetrodotoxin-related toxins in the gastropod mollusk *Niotha clathrata* from Taiwan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(1): 63—67
- Hwang D F, Lu S C, Jeng S S, 1991b. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropods *Rapana rapiformis* and *R. venosa venosa*. *Mar Biol*, 111(1): 65—69
- Hwang D F, Shiu Y C, Hwang P A *et al*, 2002. Tetrodotoxin in gastropods (snails) implicated in food poisoning in Northern Taiwan. *J Food Prot*, 65(8): 1341—1344
- Hwang D F, Tai K P, Chueh C H *et al*, 1991c. Tetrodotoxin and derivatives in several species of the gastropod Naticidae. *Toxicon*, 29(8): 1019—1024
- Hwang P A, Tsai Y H, Deng J F *et al*, 2005. Identification of tetrodotoxin in a marine gastropod (*Nassarius glans*) responsible for human morbidity and mortality in Taiwan. *J Food Prot*, 68(8): 1696—1701
- Hwang P A, Tsai Y H, Lu Y H *et al*, 2003. Paralytic toxins in three new gastropod (Olividae) species implicated in food poisoning in southern Taiwan. *Toxicon*, 41(4): 529—533
- Jeon J K, Narita H, Nara M *et al*, 1984. Occurrence of tetrodotoxin in a gastropod mollusk, “Araregai” *Niotha clathrata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50(12): 2099—2102
- Lai J, Hunter J C, Porreca F, 2003. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol*, 13(3): 291—297
- Lin S J, Hwang D F, 2001. Possible source of tetrodotoxin in the starfish *Astropecten scoparius*. *Toxicon*, 39(4): 573—579
- Luo X, Yu R C, Wang X J *et al*, 2012. Toxin composition and toxicity dynamics of marine gastropod *Nassarius* spp. collected from Lianyungang, China. *Food Addit Contam Part A*, 29(1): 117—127
- Mahmud Y, Yamamori K, Noguchi T, 1999. Occurrence of TTX in a brackish water puffer ‘Midorifugu’ *Tetraodon nigroviridis*, collected from Thailand. *J Food Hyg Soc Jpn*, 40(5): 363—367
- Mebs D, Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T *et al*, 1995. Tetrodotoxin in South American *Atelopus* species (Bufonidae). *Toxicon*, 33(3): 299
- Nakagawa T, Jang J, Yotsu-Yamashita M, 2006. Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs. *Anal Biochem*, 352(1): 142—144
- Narita H, Noguchi T, Maruyama J *et al*, 1981. Occurrence of tetrodotoxin in a trumpet shell boshubora *Charonia sauliae*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47(7): 935—941
- Noguchi T, Maruyama J, Narita H *et al*, 1984. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Tutufa lissostoma* (frog shell). *Toxicon*, 22(2): 219—226
- Noguchi T, Maruyama J, Ueda Y *et al*, 1981. Occurrence of tetrodotoxin in the Japanese ivory shell *Babylonia japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47(7): 909—913
- Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyazawa T *et al*, 2001. Electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs: liquid chromatography/mass spectrometry, tandem mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *AnalBiochem*, 290(1): 10—17
- Shui L M, Chen K, Wang J Y *et al*, 2003. Tetrodotoxin-associated snail poisoning in Zhoushan: a 25-year retrospective analysis. *J Food Prot*, 66(1): 110—114
- Tani I, 1945. *Toxicological Studies on Japanese Puffers*. Tokyo: Teikoku-Tosho Co., 12
- Williams S, 1984. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, Inc 344—345
- Yasumoto T, Nagai H, Yasumura D *et al*, 1986. Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin. *Ann NY Acad Sci*, 479: 44—51
- Yasumoto T, Oshima Y, Hosaka M *et al*, 1981. Occurrence of tetrodotoxin in the ivory shell *Babylonia japonica* from Wakasa Bay. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47(7): 929—934
- Yotsu-Yamashita M, Mebs D, Flachsenberger W, 2007b. Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*). *Toxicon*, 49(3): 410—412



Yotsu-Yamashita M, Mebs D, Kwet A *et al*, 2007a. Tetrodotoxin and its analogue 6-epitetrodotoxin in newts (*Triturus* spp.; Urodela, Salamandridae) from southern Germany. *Toxicol*, 50(2): 306—309

Yotsu-Yamashita M, Sugimoto A, Takai A *et al*, 1999. Effects of specific modifications of several hydroxyls of tetrodotoxin on its affinity to rat brain membrane. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(3): 1688—1696

## TOXICITY AND TOXIN COMPOSITION OF MARINE GASTROPOD *NASSARIUS SEMIPLICATUS* FROM DIFFERENT REGIONS ALONG THE COAST OF CHINA

LUO Xuan<sup>1,2</sup>, YU Ren-Cheng<sup>1,3</sup>, WANG Xiao-Jie<sup>4</sup>, ZHOU Ming-Jiang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Oceanography Laboratory, Qingdao 266071, China; 4. The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources Excavation and Utilization Conjunctive Administrated by Ministry of Education and Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** Marine gastropod *Nassarius* spp. Contains toxin causing many poisoning incidents along the coast of China. Tetrodotoxin (TTX) and its derivatives have been recognized in some toxic nassariids. However, little information is available on the toxin composition in nassariids collected along the coast of China. We studied the toxicity and toxin composition of *Nassarius semiplicatus* from the samples collected in different zones along coast of China, in Jiangsu, Zhejiang, and Fujian Provinces. The toxicity of the nassariid samples ranged 2—664 Mouse Units (MU) per gram tissue (wet weight). Toxicity of the samples from Lianyungang (Jiangsu) was much higher than that of others. In addition, we analyzed the toxin component and composition in high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). TTX and its derivatives, including trideoxyTTX, 4-epiTTX, and anhydroTTX were detected in all the samples, but the composition of TTXs varied among samples of different regions. TrideoxyTTX was the major component of the samples from Lianyungang and Zhoushan (Zhejiang), followed by TTX and two other derivatives. The samples from other regions, including Yancheng (Jiangsu), Ningbo (Zhejiang), and Ningde and Putian (Fujian), contained high proportion of TTX. The total toxin content in the most samples of Lianyungang and Ningbo was the highest in muscle, followed by digestive gland and the rest parts. The peak value of TTX, with high toxicity, mainly appeared in muscle or digestive gland. These findings suggested that toxic nassariids from these Chinese coastal zones had uniform toxin components, whereas their composition varied geographically. High toxic TTX was likely relative to the toxicity of nassariids.

**Key words** *Nassarius* spp.; tetrodotoxin and its derivatives; toxin composition; LC-MS