

固相吸附毒素跟踪技术(SPATT)在浙江南麂海域的应用*

渠佩佩¹ 杨晶晶¹ 徐轶肖² 高寒¹ 佟蒙蒙¹

(1. 浙江大学海洋学院海洋生物研究所 舟山 316000; 2. 广西师范学院北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室 南宁 530001)

摘要 浙江南麂岛海域是我国近岸贝类的重点养殖区,近年来一直遭受脂溶性贝类毒素(lipophilic shellfish toxins, LSTs)的污染,威胁着人类健康。为了建立有效的食品安全预警方法,本研究利用固相吸附毒素跟踪技术(solid phase adsorption toxin tracking, SPATT)在该海域进行了为期一年的野外监测和 LSTs 毒素分析。结果表明:7 种 LSTs 毒素在 SPATT(DIAION[®]HP20)中被检出,分别是 大田软海绵酸(okadaic acid, OA)、鳍藻毒素-1(dinophysistoxin-1, DTX-1)、虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)及其衍生物 homoYTX、扇贝毒素-2(pectenotoxin-2, PTX-2)及其衍生物 7-epi-PTX2sa 和环亚胺毒素(gymnodimine, GYM);有 8 种毒素在厚壳贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)中被检出,分别是 OA、DTX1、homoYTX、PTX2、7-epi-PTX2sa、GYM、原多甲藻酸贝类毒素-3(azaspiracid-3, AZA-3)和虾夷扇贝毒素衍生物 45-OH-homoYTX。整体而言,SPATT(HP20)中吸附的毒素种类与贝肉中监测出的毒素种类大体上一致,且两者间 OA、DTX1 和 PTX2 的浓度在时间上具有较好的相关性,可见 SPATT(HP20)对这些 LSTs 毒素具有较高的灵敏度,有望作为水体中 LSTs 毒素的预警监测材料。南麂岛海域 LSTs 分布特征明显,夏季最高,其次是春秋季节,冬季最低,其中 2014 年夏季贝肉中 OA 毒素含量高达 77.19ng/g 贝肉,超出国家限量标准(45ng/g 贝肉)比例达 11.76%,为浙江南麂海域贻贝的食用安全带来隐患。

关键词 固相吸附毒素跟踪技术(SPATT);脂溶性贝类毒素(LSTs);树脂(HP20);南麂岛

中图分类号 X56 doi: 10.11693/hyhz20160100007

浙江南麂海域地处台湾暖流与江浙沿岸流交汇区,生物种类繁多,是我国深海网箱养殖和近岸贝类重点养殖区,也是我国首批五个国家级海洋类自然保护区之一,1999 年被联合国教科文组织列为世界生物圈保护区,素有“贝藻王国”和“蓝色牧场”的美誉。近年来,受鳌江等河流径流和江浙沿岸流的影响,该海域水体富营养化日益严重,成为赤潮及贝类中毒事件高发区(姚炜民等,2005),对消费者生命健康安全、水产养殖业、旅游业以及贝类产品出口等构成严

重威胁(陈舜等,2009;郑重莺等,2012)。2011 年 5 月 25 日至 31 日,在福建宁德和浙江宁波两地发生了因误食染毒紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)引起的中毒事件,中毒人数多达 200 人(Li *et al.*, 2012)。贝类毒素中毒事件的持续暴发,把贝类产品食用安全及毒素暴发的预警预报这一重大问题提上研究日程。因此,探寻快速有效的贝类毒素监测方法,建立贝类毒素事件的预警预报机制,刻不容缓。

“固相吸附毒素跟踪”技术(solid phase adsorption

* 浙江省公益技术研究农业项目,2013C32040 号;国家自然科学基金项目,41306095 号,41176086 号,41276099 号;教育部博士点基金项目,20130101120105 号;国家海洋局海洋生态环境科学与工程重点实验室开放基金项目,MESE-2015-05 号;北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室开放基金,2014BG ERLKF01 号。渠佩佩,硕士研究生, E-mail: qupeipei@zju.edu.cn

通讯作者: 佟蒙蒙,博士生导师,副教授, E-mail: mengmengtong@zju.edu.cn

收稿日期: 2016-01-11, 收修改稿日期: 2016-03-21

toxin tracking, SPATT)是利用聚合吸附树脂来被动吸附海水中生物毒素的原位监测技术。这项技术由新西兰的研究团队(MacKenzie *et al.*, 2004)首先应用到海水中的脂溶性贝类毒素(lipophilic shellfish toxins, LSTs)监测中,取得了较好的成果。因此,本研究在对南麂岛海域 LSTs 毒素种类和含量的调查基础上,结合固相吸附毒素跟踪技术(SPATT),选用树脂 DIAION[®] HP20为 SPATT 内填充物,对 LSTs 在该海域的分布特征进行了分析,以期为该海域贝类养殖区建立快速方便的脂溶性贝类毒素采集、监测以及行之有效的预警预报方案提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样点部署及样品采集

本研究在浙江南麂列岛海域贝类养殖区附近,设置两个采样点 N1 和 N2(图 1),分别布放/采集 SPATT 树脂盘(图 2)和采集厚壳贻贝。根据全年浮游生物生物量的变化及南麂岛海域贝类养殖和收割周期的特点,将全年采样分为三个阶段:2014 年 4 月至 10 月采样周期为 10 天,2014 年 11 月至 12 月采样周期为 30 天,2015 年 1 月至 4 月采样周期为 15 天。将 SPATT 树脂盘固定在贻贝养殖链距水面约两米的位置,采集 SPATT 树脂盘及其相同位置的贻贝,同时将

新的 SPATT 树脂盘放入原采样点位置待下一次采集,采集到的贝肉及 SPATT 树脂盘放置于 -20°C 冷冻保存待后续处理。

1.2 贝肉监测

1.2.1 贝肉中 LSTs 毒素的提取 贝肉中 LSTs 毒素的提取步骤参见 GB17378.7-2007 海洋监测规范第 7 部分:近海污染生态调查和生物监测。本文稍作修改:贝肉解冻后,称取 100g 匀浆,取 2g 加入 9mL 100% 甲醇,振荡搅拌 1min,离心($4000\times g$, 5min),取上清液,重复该步骤。将两次的上清液转入 30mL 的全玻璃针筒中,经 $0.22\mu\text{m}$ 一次性微孔过滤器过滤后,样品收集至 25mL 血清瓶中,氮吹浓缩,用 100% 甲醇定容至 5mL,取 1mL 于色谱进样瓶中,于 -80°C 冷冻,待 LC-MS/MS 分析。

1.2.2 贝肉样品的水解 另取 1mL 上述萃取液,加入 0.125mL 2.5mol/L 的 NaOH 溶液,置于 76°C 条件下恒温加热 40min。然后取出,待该溶液温度降至室温后,再加入 0.125mL 2.5mol/L 的 HCl 溶液,经 $0.22\mu\text{m}$ 一次性微孔过滤器过滤后,于 -80°C 冷冻,待 LC-MS/MS 分析。

1.3 SPATT 的吸附监测方法

1.3.1 SPATT 树脂盘的制作与预处理 SPATT 树脂盘的制作方法参见 Fux 等(2008):将筛绢裁剪成约

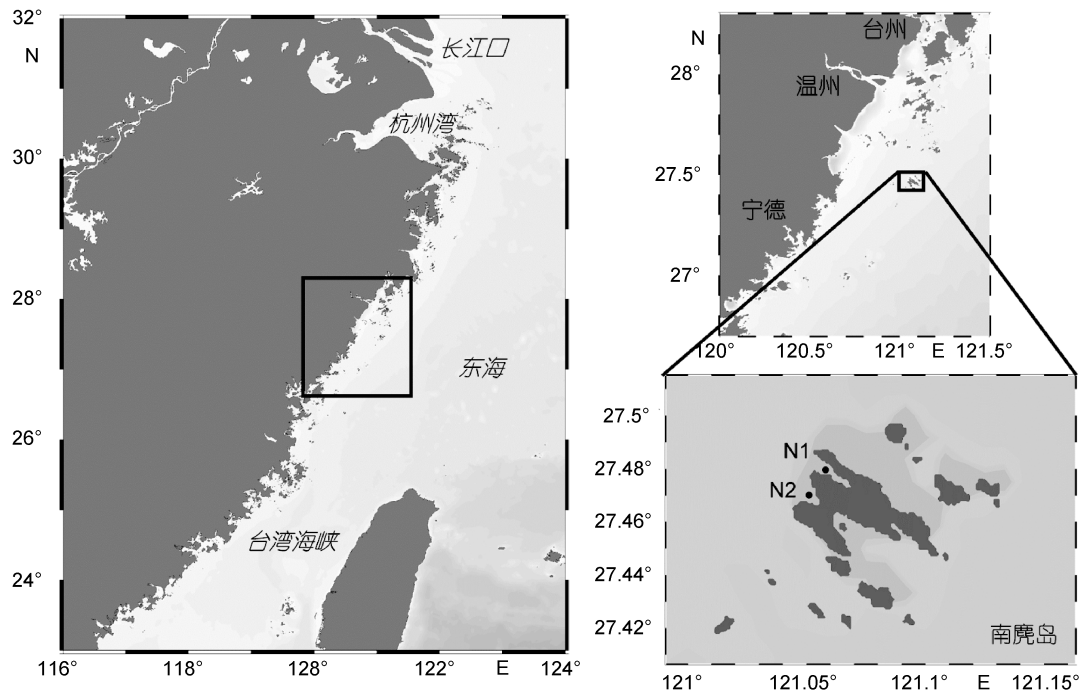


图 1 采样点(N1, N2)及 SPATT 树脂盘的布设

Fig.1 Sampling sites (N1 and N2) for detection by SPATT discs

23cm×12cm 大小, 将 DIAION®HP20 树脂(干重 9.00g±0.05g)放入其中, 再用绣花绷子(直径 9cm)固定即可(图 2)。使用前树脂需活化处理: 将制作好的 SPATT 树脂盘放入 100%甲醇中浸泡 48h, 然后经过 MilliQ 水冲洗、树脂盘置于 MilliQ 水中超声 10min、MilliQ 水冲洗等步骤将树脂中的甲醇去除, 最后将活化后的树脂盘保存在 4—6°C 的 MilliQ 水中备用。

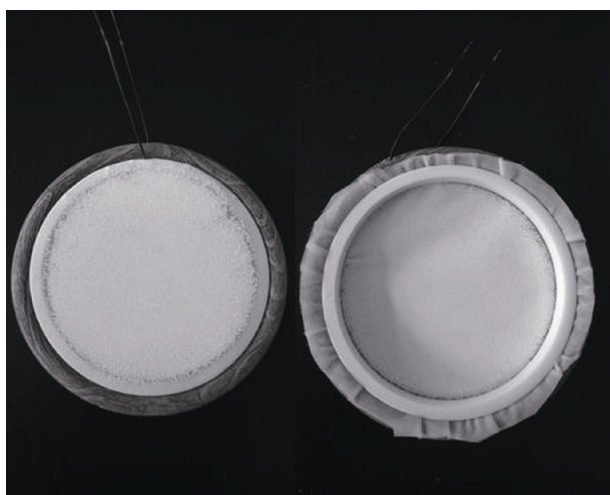


图 2 SPATT 树脂盘
Fig.2 The SPATT discs

1.3.2 SPATT 树脂盘中 LSTs 的提取 将 SPATT 树脂盘用 500mL MilliQ 水浸泡 2 次, 每次 5min, 除去盐分及其它杂质, 轻甩, 尽可能除去 SPATT 上多余的水分。然后将树脂从 SPATT 树脂盘里取出, 填充在 30mL 的全玻璃针筒中, 并放置于安装有 0.22 μ m 的一次性微孔过滤器的固相萃取装置上。加入约 30mL 甲醇, 搅拌 1min, 控制流速为 1mL/min, 收集萃取液于 25mL 样品瓶中。氮吹浓缩, 用 100%甲醇定容至 5mL, 取 1mL 萃取液于色谱进样瓶中, 于 -80°C 保存, 待 LC-MS/MS 分析。

1.4 LC-MS/MS 分析检测

Dionex UltiMate 3000/API 4000 液质联用仪(LC/MS/MS)用于对各 LSTs 毒素进行检测分析。

1.4.1 色谱条件 负离子(ESI⁻)扫描模式下条件: Waters XBridgeTMC18 柱(3.0mm×150mm, 3.5 μ m); 柱温: 40°C; 进样量: 10 μ L; 流速: 0.4mL/min 流动相分为 A、B 两部分, 其中 A 为水(含体积比为 0.05%氨水), B 为 90%的乙腈(含体积比为 0.05%氨水), 采用梯度洗脱方式(0—1min, 10%的流动相 B; 1—9min, 10%—90%的流动相 B; 9—12min, 90%的

流动相 B; 12—14min, 90%—10%的流动相 B; 14—18min, 10%的流动相 B)。用于分析大田软海绵酸(okadaic acid, OA)、鳍藻毒素-1,-2,-3(dinophysistoxin-1,-2,-3, DTX-1,-2,-3)、虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)及其衍生物(homoYTX、45-OH-homoYTX、45-OH-YTX 和 Carboxy-YTX)。

正离子(ESI⁺)扫描模式下条件: Waters XBridgeTMC18 柱(2.1mm×50mm, 2.5 μ m); 柱温: 25°C; 进样量: 10 μ L; 流速: 0.3mL/min; 流动相分为 C、D 两部分, 其中 C 为水(含 2mmol/L 甲酸铵和 50mmol/L 甲酸), D 为 95%的乙腈(含 2mmol/L 甲酸铵和 50mmol/L 甲酸), 采用梯度洗脱方式(0—1min, 10%的流动相 D; 1—3min, 10%—80%的流动相 B; 3—5min, 80%的流动相 D; 5—7min, 80%—10%的流动相 D; 7—9min, 10%的流动相 D)。用于分析扇贝毒素-1,-2,-6(pectenotoxin-1,-2,-6, PTX-1,-2,-6)及其衍生物(7-epi-PTX2sa)、螺环内酯毒素-1(spirolide-1, SPX-1)、环亚胺毒素(gymnodimine, GYM)、原多甲藻酸贝类毒素-1,-2,-3(azaspiracid-1,-2,-3, AZA-1,-2,-3)和短裸甲藻毒素-2,-3(brevetoxin-2,-3, PbTX-2,-3)。

1.4.2 质谱条件 负离子(ESI⁻)扫描: 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 气帘气: 13psi; 碰撞气: 5psi; 喷雾电压: -4.5kV; 离子源温度: 600°C; 离子源气 1: 60psi; 子源气 2: 50psi; 模式: 多反应监测(Multiple Reaction Monitor, MRM), [M-H]⁻(母离子 > 子离子): OA 803.5>255.1; DTX1 817.5>255.2; DTX2 803.5>255.2; DTX3 1055.7>255.2; YTX 1141.5>1061.5; homoYTX 1155.5>1075.5; 45-OH-homoYTX 1171.5>1091.5; 45-OH-YTX 1157.5>1077.5; Carboxy-YTX 1173.5>1094.4。

正离子(ESI⁺)扫描: 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 气帘气: 16psi; 碰撞气: 5psi; 喷雾电压: 4.5kV; 离子源温度: 650°C; 离子源气 1: 60psi; 子源气 2: 45psi; 模式: 多反应监测(Multiple Reaction Monitor, MRM), [MH 或 MNH₄]⁺(母离子 > 子离子): PTX1 892.5>839.5; PTX2 876.5>823.5; PTX6 906.5>853.5; 7-epi-PTX2sa 894.5>823.5; SPX1 692.4>164.1; GYM 508.4>490.3; AZA1 842.6>824.6; AZA2 856.5>838.5; AZA3 828.5>810.5; PbTX2 895.5>877.5; PbTX3 897.5>725.2。

1.5 数据分析

本文对于树脂中毒素含量的计算, 基于两个假设: (1) LSTs 毒素被树脂被动吸附的过程在时间上呈均匀分布, 即每天的吸附量相同; (2) LSTs 毒素在树

脂中的吸附未到达饱和状态。基于以上两个假设,树脂中吸附毒素的含量,将统一以10天为一个计算单位[ng/(g/10d)]。样品收集周期为15和30天的,也计算转换为以10天为单位的毒素含量。

OA的国际限量标准是45ng OA e.q./g贝肉(Alexander *et al.*, 2008),中国绿色食品标准是200ng OA e.q./g贝肉,PTX2的国际限量标准是120ng e.q./g贝肉(Alexander *et al.*, 2009),homoYTX的国际限量标准是3750ng YTX e.q./g贝肉(Alexander *et al.*, 2009)。

2 结果

本研究自2014年4月11日起至2015年4月10日对中国浙江南麂海域附近进行LSTs毒素的监测,监测的脂溶性贝类毒素LSTs包括:大田软海绵酸(okadaic acid, OA)、鳍藻毒素-1,-2,-3(dinophysistoxin-1-2-3, DTX-1,-2,-3)、虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)及其衍生物45-OH-YTX、Carboxy-YTX、homoYTX、扇贝毒素-1,-2,-6(pectenotoxin-1,-2,-6, PTX-1,-2,-6)及

其衍生物7-epi-PTX2sa、螺环内酯毒素-1(spirolide-1, SPX1)、环亚胺毒素(gymnodimine, GYM)、原多甲藻酸贝类毒素-1,-2,-3(azaspiracid-1,-2,-3, AZA-1,-2,-3)和短裸甲藻毒素-2,-3(brevetoxin-2, -3, PbTX-2,-3),其中OA、DTX1、homoYTX、PTX2、7-epi-PTX2sa和GYM在贝肉中和SPATT(DIAION® HP20)中均检出,YTX仅在树脂中检出,AZA3和45-OH-homoYTX仅在贝肉中检出(见表1)。对于毒素YTX、45-OH-homoYTX、7-epi-PTX2sa和AZA3的定性分析,因缺少其毒素标准品,本研究通过比对各毒素母离子及子离子的质荷比来确定。OA、DTX1、PTX2、homoYTX和GYM将进行定量分析。

2.1 贝肉中LSTs的检测结果与分布

本研究以南麂附近海域人工养殖的厚壳贻贝作为研究对象,在2014—2015年间进行29次样品采集,共获得57份样品,除PTX2检出率较低(10.47%)外,OA、DTX1、homoYTX和GYM的检出率均较高,分别为:71.92%、40.27%、52.90%和100%,其中仅OA毒素含量超过国际限量标准(45ng OA e.q./g贝

表1 浙江南麂岛海域监测出的LSTs毒素种类及含量
Tab.1 Toxin profiles and contents detected by SPATT discs in mussels from Nanji Island, East China Sea

毒素名称	毒素含量	
	SPATT 树脂[ng/(g·10d)]	贝肉(ng/g)
大田软海绵酸(okadaic acid, OA)	2.88—69.19	N/A—77.19
鳍藻毒素-1 (dinophysistoxin-1, DTX-1)	0.18—21.39	N/A—22.61
鳍藻毒素-2 (dinophysistoxin-2, DTX-2)	—	—
鳍藻毒素-3 (dinophysistoxin-3, DTX-3)	—	—
虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)	未定量	—
虾夷扇贝毒素衍生物(45-OH-YTX)	—	—
虾夷扇贝毒素衍生物(Carboxy-YTX)	—	—
虾夷扇贝毒素衍生物(homoYTX)	N/A—92.93	N/A—47.00
虾夷扇贝毒素衍生物(45-OH-homoYTX)	—	未定量
扇贝毒素-1 (pectenotoxin-1, PTX-1)	—	—
扇贝毒素-2 (pectenotoxin-2, PTX-2)	N/A—253.03	N/A—3.15
扇贝毒素-6 (pectenotoxin-6, PTX-6)	—	—
短裸甲藻毒素-2 (brevetoxin-2, PbTX-2)	—	—
短裸甲藻毒素-3(brevetoxin-3, PbTX-3)	—	—
扇贝毒素衍生物(7-epi-PTX2sa)	未定量	未定量
螺环内酯毒素-1(spirolide-1, SPX1)	—	—
环亚胺毒素(gymnodimine, GYM)	0.20—3.19	0.48—16.28
原多甲藻酸贝类毒素-1(azaspiracids-1, AZA-1)	—	—
原多甲藻酸贝类毒素-2(azaspiracids-2, AZA-2)	—	—
原多甲藻酸贝类毒素-3(azaspiracids-3, AZA-3)	—	未定量

注: N/A 和 “—”表示未检出或者低于检出限

肉)(Alexander *et al.*, 2008), 超标率达 3.51%, OA 毒素浓度最高达到 77.19ng/g; GYM 在贝肉中的含量较低, 但检出率却达到 100%, 为贻贝的食用安全带来隐患。

2014 年春季共采集贝类样品 12 份, OA、DTX1 及 GYM 的检出率均达到 100%, PTX2 检出率 16.67%, 无 homoYTX 检出, 所有样品中毒素含量均未超标。2014 年夏季共采集贝类样品 17 份, 其中 OA 检出率和超标率分别为 88.24%和 11.76%, DTX1、homoYTX、PTX2 和 GYM 检出率分别为 58.82%、82.35%、3.53% 和 100%。2014 年秋季共采集贝类样品 12 份, 无样品毒素超标, 其中 DTX1 和 PTX2 未检出, OA、homoYTX、GYM 检出率分别为 91.67%、50%和 100%。2014 年冬季共采集贝类样品 8 份, DTX1、homoYTX 和 PTX2 未检出, OA 及 GYM 检出率分别为 12.5%和 100%。2015 年春季共采集贝类样品 8 份, homoYTX 和 PTX2 未检出, OA、DTX1、GYM 检出率分别为 25%、25%和 100%(图 3)。

OA 和 DTX1 为腹泻性贝类毒素(Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)中产生腹泻症状的主要毒素成分, 就其检出率而言, 2014 年春季>2014 年秋季>2014 年夏季>2015 年春季>2014 年冬季(图 3, 4), 就其超标率而言, 仅 2014 年夏季超标。OA+DTX1 的总毒素含量, 超标率为 17.65%, 主要是夏季。

2.2 SPATT 树脂中 LSTs 的检测结果与分布

采用 SPATT 技术, 选用大孔吸附树脂 DIAION[®] HP20 对浙江南麂海域脂溶性贝类毒素的污染状况进

行监测, SPATT 技术的优势在于可避免生物转化的影响, 提高检测的准确性和灵敏度。在为期一年的采样中, 本研究共实施 29 次样品采集, 获得 56 份 SPATT 样品, OA、DTX1 和 GYM 的检出率均高达 100%, PTX2 和 homoYTX 检出率分别为 98%和 59%, 且 SPATT 树脂中 OA、DTX1 和 PTX2 含量均远远高于贝肉的检出结果(表 1, 图 4、6、7)。

2014 年春季共采集 SPATT 样品 10 份, OA、DTX1、PTX2 及 GYM 的检出率均达到 100%, 无 homoYTX 检出。2014 年夏季共采集 SPATT 样品 18 份, OA、DTX1、homoYTX、PTX2 和 GYM 检出率

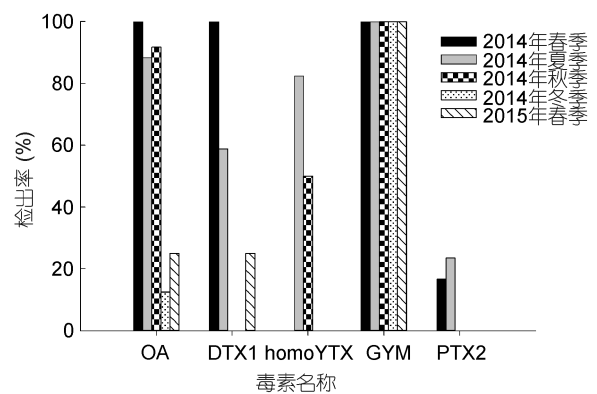


图 3 2014—2015 年不同季节厚壳贻贝贝肉中 OA、DTX1、PTX2、homoYTX 和 GYM 的检出情况

Fig.3 Result of detection to OA, DTX1, PTX2, homoYTX and GYM in mussels during 2014—2015

OA: 大田软海绵酸(okadaic acid); DTX1: 鳍藻毒素(dinophysistoxin-1); PTX2: 扇贝毒素(pektenotoxin-2); homoYTX: 虾夷扇贝毒素衍生物(homo-yessotoxin); GYM: 环亚胺毒素(gymnodimine)

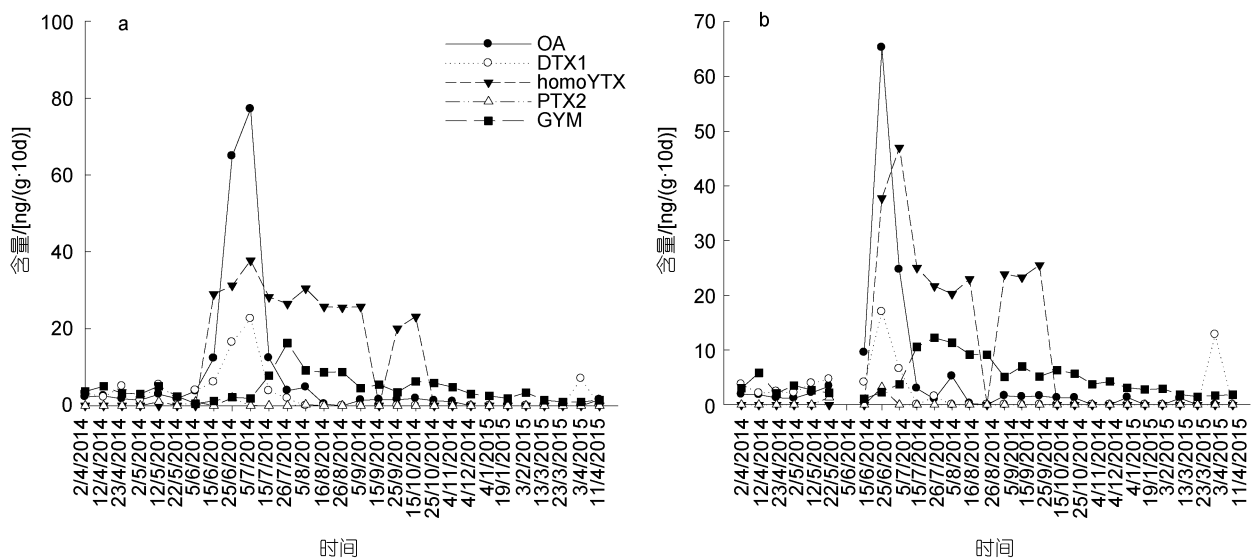


图 4 厚壳贻贝贝肉中 OA、DTX1、PTX2、homoYTX 和 GYM 含量的年分布特征(a: N1; b: N2)

Fig.4 Temporal distribution of OA, DTX1, PTX2, homoYTX and GYM in mussels (a: Site N1; b: Site N2)

均为 100%。2014 年秋季共采集 SPATT 样品 12 份, 但检出率均为 100%。2014 年冬季共采集 SPATT 样品 8 份, 除 homoYTX 检出率分别为 25%外, 其它毒素检出率均为 100%。2015 年春季共采集 SPATT 样品 8 份, homoYTX 和 PTX2 检出率分别为 12.5%和 87.5%, OA、DTX1 和 GYM 检出率均为 100%。由检测结果可见(图 5), 全年监测过程中, OA、DTX1、PTX2 及 GYM 的检出率均为 100%, homoYTX 的检出率在夏季和秋季也达到 100%。

和贝类样品中毒素的监测结果类似, 夏季 SPATT 树脂中吸附的毒素含量高于其它季节, 其中 2014 年夏季 PTX2 的最高含量高达 253.03ng/(g·10d), OA 的最高含量为 69.19ng/(g·10d)。

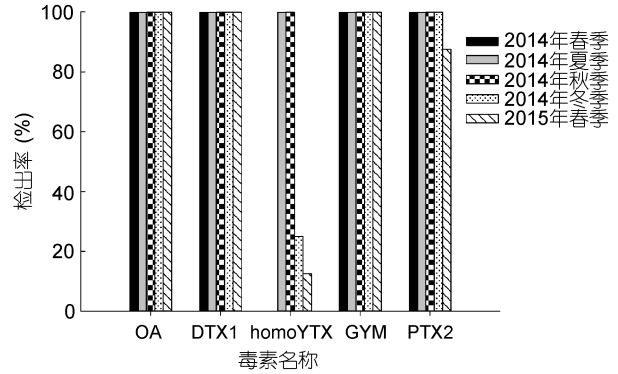


图 5 2014—2015 年不同季节 SPATT(DIAION®HP20)中 OA、DTX1、PTX2、homoYTX 和 GYM 的检出情况
Fig.5 Result of detection to OA, DTX1, PTX2, homoYTX, and GYM by SPATT (DIAION®HP20) during 2014—2015

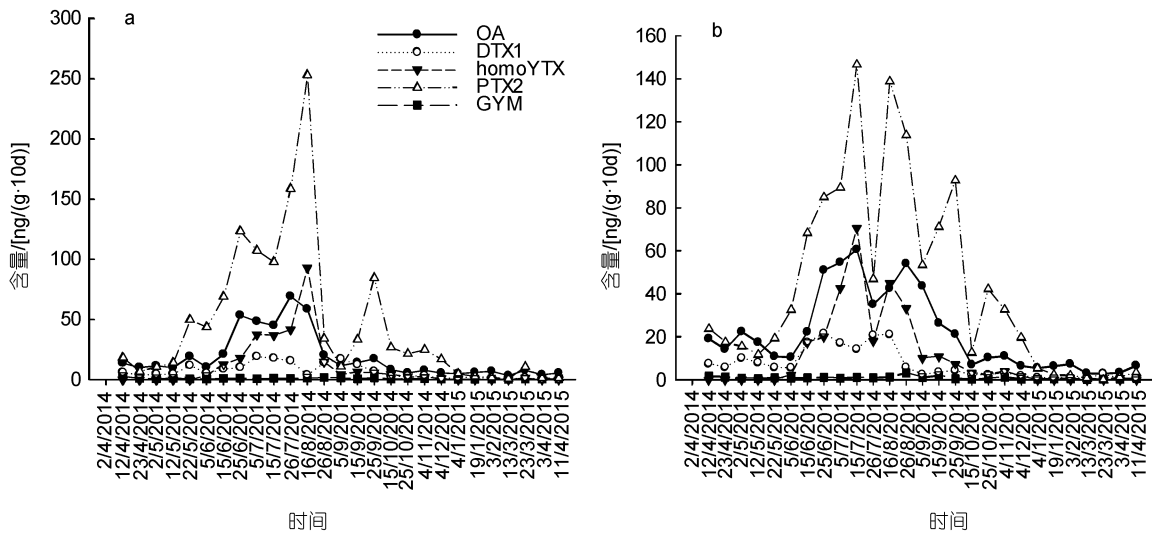


图 6 SPATT(DIAION®HP20)中 OA、DTX1、PTX2、homoYTX 和 GYM 的分布特征(a: N1; b: N2)

Fig.6 Temporal distribution of OA, DTX1, PTX2, homoYTX and GYM by SPATT (DIAION®HP20, a: Site N1; b: Site N2)

3 讨论

3.1 贝肉中 LSTs 毒素

吴锋等(2010)对南麂海域贝类污染状况的调查表明, 夏季为该海域 DSP 毒素检出率和超标率最高的季节(分别为 78.9%和 68.4%), 冬季最低(检出率与超标率均为 28.6%), 春秋两季差异不大。张树刚等(2011)对浙南海域的监测结果也表明 OA 的季节分布为夏季>春季>秋季。本研究也发现, 2014 年夏季南麂岛的 DSP 毒素检出率最高。由此可见, 夏季是浙江南麂岛海域脂溶性贝类毒素尤其是 DSP 毒素污染的高发期, 其次为春秋季节。夏季是加强食品安全监测的重要季节, 应采取相应的措施保证贝类等水产品的食用安全。

虽然 GYM 毒素含量不高, 但全年均有检出, GYM 的年分布变化不大, 可能是由于 GYM 在贝类体内降解代谢缓慢所致。MacKenzie 等(2002)的研究表明 GYM 在绿壳扇贝(*Perna canaliculus*)体内可以持续稳定的浓度存在 5 个月以上, 且 GYM 不仅累积在消化腺还存在于肌肉组织中。虽然目前 GYM 被认为是低风险毒素, 但其能够加强肿瘤的形成, 而且接触过 GYM 的 Neuro2a 细胞对 OA 的反应更加敏感, 表明 GYM 和 OA 的混合毒素具有更大的危害(Dragunow *et al*, 2005)。因此, 加强浙江南麂海域 GYM 毒素的研究与监测, 也迫在眉睫。

3.2 SPATT 中 LSTs 毒素

SPATT(DIAION®HP20)中检测到大量 PTX2 毒素(高达 253.03ng/(g·10d), 图 6), 但厚壳贻贝中 PTX2

的含量却非常低(全年检出率仅为 10.34%, 最高值仅为 3.15ng/g, 图 4), 这很有可能与 PTX2 的不稳定性有关, 由 PTX2 在贝类体内产生了生物转化所引起。Suzuki 等(2001)对扇贝(*Pecten novaezelandiae*)体内 PTXs 组分展开了研究, 结果表明 PTX2 在扇贝体内能够快速转化为 PTX-2sa 及 7-epi-PTX2sa, 且 PTX-2sa 占主导地位, 7-epi-PTX2sa 含量相对较少。在本研究中浙江南麂海域厚壳贻贝中检测出 7-epi-PTX2sa 的存在, 可能是 PTX2 毒素的生物转化的结果。此外, Miles 等(2004)的研究表明紫贻贝(*Mytilus edulis*)和新西兰绿壳贻贝(*Perna canaliculus*)能够将 PTX2 快速水解为 PTX-2sa, 虽然相较于 PTX2 的毒性(LD₅₀=219ng/g), PTX-2sa 毒性非常小(5000ng/g 的剂量对小鼠没有显著影响), 但 PTX-2sa 和 7-epi-PTX-2sa 共同作用对胃肠损害较大(Burgess

et al, 2001)。因而, 为进一步确保贝类水产品的食用安全, 对水体中 PTX2 的检测也不可少。

3.3 SPATT 树脂的预警预报效果

LSTs 毒素在贝肉和 SPATT 树脂中的含量呈现较好的相关性(图 7)。从时间分布来看, 贝肉中脂溶性贝类毒素的含量均在夏季达到峰值, 秋季次之, 冬春季最低(图 4、7), SPATT 树脂中脂溶性贝类毒素的含量亦呈此规律(图 6、7)。从毒素成分及含量来看, 贝肉和 SPATT 树脂中检测到的毒素成分一致, 分别为 OA、DTX1、PTX2、homoYTX 和 GYM。而且同一采样时间点, 贝肉和 SPATT 树脂中毒素含量的变化趋势基本相同。Fux 等(2009)在爱尔兰西海岸同时对 SPATT 树脂(HP20)和贻贝中贝类毒素进行监测, 均检测到 OA、DTX2、AZA1、PTX2 和 YTX, 且其在 SPATT 树脂和贝肉中的含量具有良好的相关性。

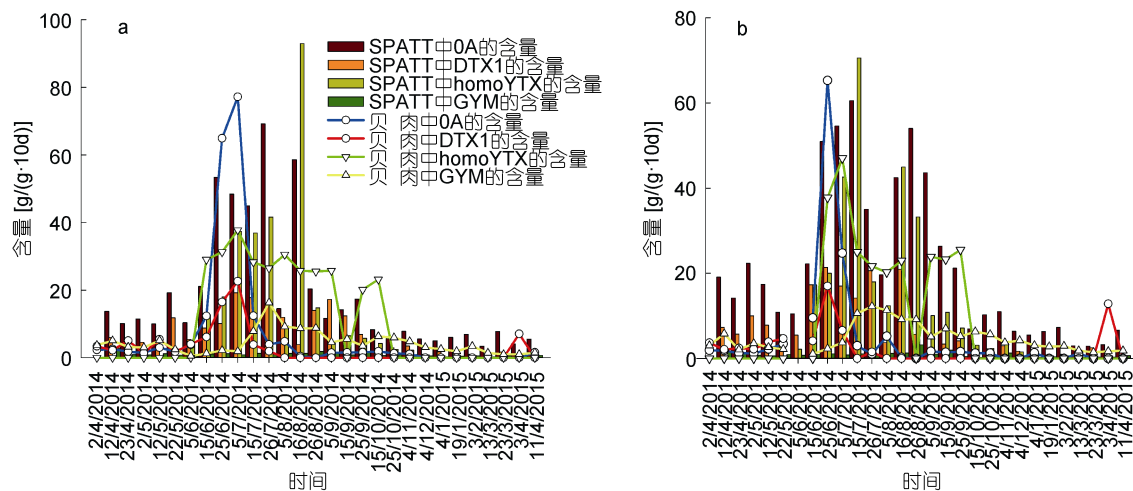


图 7 OA、DTX1、homoYTX 和 GYM 在 SPATT 树脂和贝肉中的分布特征 (a: N1; b: N2)

Fig.7 Quantitative relationships between the adsorption of OA, DTX1, homoYTX, and GYM by SPATT discs and the accumulation of toxins in mussel tissues along coast of Nanji Island (a: Site N1; b: Site N2)

在本研究中, 除 2014 年 6 月底和 7 月初等个别采样时间点外, OA、DTX1 和 PTX2 毒素在 SPATT 树脂(HP20)中的含量均高于其在贝肉中的含量。从全年检出率来看, 贝肉中各毒素检出率由高到低依次为: GYM(100%)、OA(71.92%)、homoYTX(52.90%)、DTX1(40.27%)和 PTX2(10.47%); SPATT 树脂中各毒素检出率依次为: GYM(100%)、OA(100%)、DTX1(100%)、PTX2(98%)和 homoYTX(59%)。在冬季贝肉中无 OA、DTX1、PTX2 和 homoYTX 毒素检出的情况下, SPATT 树脂中仍检测到较高含量的相应毒素, 且 OA、DTX1 和 PTX2 在 SPATT 树脂中的检出率仍高达 100%。由此可见, 相对于厚壳贻贝,

SPATT 树脂(HP20)对水体中脂溶性贝类毒素 OA、DTX1 和 PTX2 更加敏感。Fux 等(2009)发现当 SPATT 树脂(HP20)中 OA 和 DTX2 在 2005 年 8 月下旬达到峰值(分别为 2640ng/g 和 617ng/g)时, 几乎在同一时间贝肉中 OA 和 DTX2 的含量也达到峰值(分别为 365ng/g 和 141ng/g), 贝肉中 OA 和 DTX2 的含量远低于 SPATT 树脂中相应毒素的含量。Rundberget 等(2009)的研究也表明 DTXs 在 SPATT 树脂(HP20)和贝肉中的含量的变化趋势一致, 具有良好的相关性, 且同一时刻, SPATT 树脂中毒素含量明显高于贝肉中毒素的含量。同时, Lane 等(2010)的研究还指出 HP20 树脂的特性(相对较低的吸附速率、较高的解吸速率

等)较适宜用来模仿贝类吸附贝类毒素。

SPATT 技术自 2004 年问世(MacKenzie *et al*, 2004)以来以其独特的优势,如:可有效避免生物转化;较高的灵敏度;可应用于无贝类存在的海域;简单便捷等 (Rundberget *et al*, 2009; MacKenzie, 2010),得到广泛的研究和应用(Fux *et al*, 2008; Pizarro *et al*, 2013; McCarthy *et al*, 2014; Zendong *et al*, 2014, 2016; Zhang *et al*, 2015)。本文研究也表明, SPATT 树脂(HP20)和贝肉中监测到的毒素种类及含量具有良好的相关性,相对于厚壳贻贝, SPATT 树脂对水体中脂溶性贝类毒素 OA、DTX1 和 PTX2 等更加敏感,有望作为水中贝类毒素的监测材料,进行预警。

4 结论

(1) 南麂岛附近海域贝肉和 SPATT 树脂(HP20)中检测到的毒素种类一致,分别为 OA、DTX1、PTX2、homoYTX 和 GYM;各毒素成分在贝肉和 SPATT 树脂(HP20)中的含量具有良好的相关性;相对于厚壳贻贝, SPATT 树脂对水体中脂溶性贝类毒素 OA、DTX1 和 PTX2 等更加敏感,有望作为水中贝类毒素的监测材料,进行预警。

(2) 在南麂岛附近海域监测的 LSTs 毒素中,OA、DTX1、PTX2、homoYTX 和 GYM 的检出率存在季节差异,呈现夏季最高,春秋季节较低,冬季最低的趋势。

致谢 本研究中藻毒素的液质分析部分在国家海洋环境监测中心生态室完成,感谢监测中心梁玉波研究员、刘磊博士和实验室的老师及同学们对本研究的支持与帮助!

参 考 文 献

吴 锋, 江天久, 张 帆等, 2010. 浙江南麂海域双壳贝类的腹泻性贝毒分析. *海洋环境科学*, 29(4): 492—495

张树刚, 邹 清, 陈 雷等, 2011. 浙南海域腹泻性贝毒分析. *海洋科学*, 35(1): 44—47, 53

陈 舜, 佟蒙蒙, 江天久等, 2009. 赤潮灾害对水产养殖业损失的分级评估. *水产学报*, 33(4): 610—616

郑重莺, 张海琪, 宋珊瑚等, 2012. 浙江省市售主要食用贝类中麻痹性贝类毒素和腹泻性贝类毒素污染状况分析. *浙江农业科学*, (2): 236—239

姚炜民, 卢益炳, 2005. 浙江中、南海域的赤潮和赤潮生物. *温州师范学院学报(自然科学版)*, 26(5): 59—62

Alexander J, Auðunsson G A, Benford D *et al*, 2008. Marine biotoxins in shellfish-okadaic acid and analogues¹-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, 589: 1—62

Alexander J, Benford D, Boobis A *et al*, 2009. Marine biotoxins in shellfish-Summary on regulated marine biotoxins¹-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, 1306: 6—23

Burgess V, Shaw G, 2001. Pectenotoxins-an issue for public health: a review of their comparative toxicology and metabolism. *Environment International*, 27(4): 275—283

Dragunow M, Trzoss M, Brimble M A *et al*, 2005. Investigations into the cellular actions of the shellfish toxin gymnodimine and analogues. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(2): 305—312

Fux E, Marcaillou C, Mondeguer F *et al*, 2008. Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1. *Harmful Algae*, 7(5): 574—583

Fux E, Bire R, Hess P, 2009. Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland. *Harmful Algae*, 8(3): 523—537

Lane J Q, Roddam C M, Langlois G W *et al*, 2010. Application of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins domoic acid and saxitoxin in coastal California. *Limnology and Oceanography: Methods*, 8(11): 645—660

Li A F, Ma J G, Cao J J *et al*, 2012. Toxins in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) associated with diarrhetic shellfish poisoning episodes in China. *Toxicon*, 60(3): 420—425

MacKenzie L, Holland P, McNabb P *et al*, 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon*, 40(9): 1321—1330

MacKenzie L, Beuzenberg V, Holland P *et al*, 2004. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon*, 44(8): 901—918

MacKenzie L A, 2010. *In situ* passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool. *Current Opinion Biotechnology*, 21(3): 326—331

McCarthy M, van Pelt F N A M, Bane V *et al*, 2014. Application of passive (SPATT) and active sampling methods in the profiling and monitoring of marine biotoxins. *Toxicon*, 89: 77—86

Miles C O, Wilkins A L, Munday R *et al*, 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon*, 43(1): 1—9

Pizarro G, Morono A, Paz B *et al*, 2013. Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of *Dinophysis* toxins in shellfish. *Marine Drugs*, 11(10): 3823—3845

Rundberget T, Gustad E, Samdal I A *et al*, 2009. A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers. *Toxicon*, 53(5): 543—550

Suzuki T, Mackenzie L, Stirling D *et al*, 2001. Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxi-2 seco acid in the New

- Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. Fisheries Science, 67(3): 506—510
- Zendong Z, Herrenknecht C, Abadie E *et al*, 2014. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon*, 91: 57—68
- Zendong Z, Kadiri M, Herrenknecht C *et al*, 2016. Algal toxin profiles in Nigerian coastal waters (Gulf of Guinea) using passive sampling and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Toxicon*, 114: 16—27
- Zhang C L, Zhang J Y, 2015. Current techniques for detecting and monitoring algal toxins and causative harmful algal blooms. *Environmental Analytical Chemistry*, 2(1): 123

APPLICATION OF SPATT FOR TOXIN DETECTION IN THE MUSSELS ALONG COAST OF NANJI ISLAND, EAST CHINA SEA

QU Pei-Pei¹, YANG Jing-Jing¹, XU Yi-Xiao², GAO Han¹, TONG Meng-Meng¹

(1. Institute of Marine Biology, Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316000, China; 2. Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Guangxi Teachers Education University, Nanning 530001, China)

Abstract Nanji Island off the eastern Zhejiang Province is one of the main shellfish farming areas in China. Recently, the area suffers from recurrent and intense lipophilic shellfish toxins (LSTs) outbreaks, to which we developed an early warning tool to detect LSTs in shellfish. We conducted a year-long experiment to deploy SPATT (solid phase adsorption toxin tracking) discs in two sites along the coast of Nanji Island from 2014—2015. The SPATT discs were placed 2m below surface in aquaculture site. Sampling was conducted in three periods, i.e., Apr.—Oct. 2014 at interval of 10 days, Nov.—Dec. 2014 at interval of 30 days, and Jan.—Apr. 2015 at interval of 15 days. The sampling scheme was designed based on the annual variation in the local biomass and the harvest season for shellfish aquaculture. Mussels were co-sampled. Seven lipophilic toxins were targeted in shellfish by SPATT (DIAION®HP20) discs in liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), including okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX1), yessotoxin (YTX), homoYTX, pectenotoxin-2 (PTX2), 7-epi-PTX2sa, and gymnodimine (GYM), while 8 lipophilic toxins were detected in mussels including OA, DTX1, homoYTX, PTX2, 7-epi-PTX2sa, GYM, 45-OH-homoYTX and azaspiracid-3 (AZA3). Results show that in general, lipophilic shellfish toxins (LSTs) in resins and mussels were consistent. Accumulations of OA, DTX1, and PTX2 in mussels and absorption in the SPATT (HP20) discs were positively correlated. Therefore, the SPATT (HP20) was effective and can be used as a sensitive monitoring tool for OA, DTX1, and PTX2 as shown in Nanji Island. In addition, most contaminated mussels were found in summer samples, followed by spring/autumn, and winter. An amount of 11.76% of the mussels was detected for having high OA concentration (max. 77.19ng/g) that exceeded the international threshold of 45ng/g, exposing seafood safety issue in the shellfish meat and potential toxin in waters. Therefore, to understand the distribution and dynamics of LSTs in this region and to develop a simple and sensitive tool for early warning on contamination in shellfish culture have become an urgent scientific and managerial challenge to protect consumers and international shellfish trade.

Key words solid phase adsorption toxin tracking (SPATT); lipophilic shellfish toxins (LSTs); resin (HP20); Nanji Island