

文章编号: 1674-5566(2009)03-0376-05

· 研究简报 ·

织纹螺的毒素成分分析

苏捷, 张农, 刘海新, 李庐峰

(福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

摘要: 近年来, 我国常有食用织纹螺中毒事件发生, 由于织纹螺在世界各地海区分布广泛, 种类繁多, 所含的毒素成分也不完全相同, 目前对织纹螺的毒素组成还存在较大的分歧。国内学者认为织纹螺毒素主要成分是麻痹性贝毒 (PSP), 认为织纹螺毒素可能是通过食用赤潮中有毒的藻类在体内蓄积产生。通过动物实验、液相色谱方法对福建沿海的有毒织纹螺的毒素进行比较分析, 发现织纹螺的毒素中的主要成分是河豚毒素 (TTX)。再用液质联用的方法对织纹螺的毒素成分作进一步分析研究, 发现液质联用的条件可以很好地分离和确定样品中的 TTX 及其衍生物。实验研究表明织纹螺的毒素主要成分是 TTX 同时还含有 TTX 的 4 位空间异构体 (4-epiTTX)、脱水河豚毒素 (anhydrotTX)、脱氧河豚毒素 (deoxyTTX)、单加氧河豚毒素 (11-oxoTTX) 等 TTX 的衍生物。

关键词: 织纹螺; 液相色谱; 液质联用; 河豚毒素

中图分类号: R 996.3 **文献标识码:** A

Component analysis of toxins in Nassarius

SU Jie, ZHANG Nong, LIU Hai-xin, LI Lu-feng

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China)

Abstract: Poisoning incidents caused by eating Nassarius have been reported frequently in the last several years in China. Various Nassarius are widespread distributed in sea areas of the world and toxins they have are also different, so there are many disputations in what toxins Nassarius are made up. Some experts believe that the toxin contained in Nassarius is paralytic shellfish poisoning which may be eaten through deleterious algae during red tide. The toxins of Nassarius had been analyzed by animal experiment and high performance liquid chromatography (HPLC). We found the main component of Nassarius toxins is tetrodotoxin (TTX). Furthermore, the high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used in this paper, and the ramification such as 4-epiTTX, anhydrotTX, deoxyTTX, and 11-oxoTTX also had been found in Nassarius.

Key words: Nassarius; HPLC; LC-MS; tetrodotoxin

织纹螺 (Nassarius, 属软体动物门腹足纲织纹螺科, 盛产于我国东南沿海, 是我国沿海地区较为常

收稿日期: 2008-10-09

基金项目: 福建省科技厅资助项目 (2004 b10)

作者简介: 苏捷 (1980-), 男, 福建闽侯人, 助理研究员, 硕士, 主要从事海洋生物活性物质分离纯化和水产加工研究工作。

Te: 0592-6010170, E-mail: sjscu@126.com

通讯作者: 张农, Te: 0592-6010170, E-mail: z@fjcs.ac.cn

见的螺种之一。织纹螺是我国沿海居民常食用的海产品,但自上世纪九十年代开始,由食用织纹螺引起的中毒事件数、人数及死亡人数呈上升趋势。织纹螺毒素组成一直存在较大的争议。一些研究人员根据小白鼠的中毒症状推测织纹螺体内的毒素为麻痹性贝毒^[1-4],并未对毒素的成分进行有效分离与鉴定。Hwan^[5-9]对我国台湾地区引起中毒的苦瓜织纹螺和正织纹螺毒素的研究表明,织纹螺毒素主要由河豚毒素(tetrodotoxin,TTX)和麻痹性贝类毒素(Paralytic shellfish poisons,PSP)两部分组成,其中河豚毒素占80%,麻痹性贝毒为20%,而PSP中又包括膝沟藻毒素(GTX₃)和石房蛤毒素(SIX)。此外,他们还发现在有毒织纹螺中,个体带毒率为60%~80%。陈人强等^[10]应用显色反应推测织纹螺毒素中含有河豚毒素,但未能对毒素种类组成进行分析。本文采用了目前较为先进的高效液相色谱(HPLC)和液质联用仪(LCMS)等仪器进行分析,确定了东南沿海的织纹螺毒素的主要成分。

1 材料与方法

1.1 实验材料

织纹螺样品采自福建和广东沿海海区,保鲜运抵实验室后在-30℃的冰柜中冷冻至分析。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠检测法

采集织纹螺的软组织,包括肌肉和内脏,加入等量的0.1%醋酸溶液捣碎,沸水浴中抽提5 min,抽提液5 000 r/min离心20 min后,取上清液1 mL对体重20 g左右的小白鼠进行腹腔注射,并测定其死亡时间,根据小白鼠死亡时间推算出织纹螺毒素的毒力。将体重为20 g小白鼠在30 min毒死的毒素,毒力定义为一个小鼠单位(mouse unit, MU)。本方法毒素检出限为1 MU/mL软组织。

1.2.2 液相色谱、液质联用检测法

称取样品10 g加0.1%乙酸溶液20 mL,13 000 r/min匀浆5 min,用5 mL 0.1%乙酸清洗刀头两次,合并溶液,沸水浴10 min,边加热边搅拌,冷却后,3 000 r/min离心10 min,取上清液。再用5 mL乙酸提取残渣两次,合并上清液,定容至50 mL,将上清液过C₁₈固相萃取柱(预先用5 mL甲醇,5 mL 0.1%乙酸洗涤),取过柱清液经0.45 μm滤膜过滤,进行色谱分析。

液相色谱条件 色谱柱: Waters Puresil TM C₁₈ 5 μm, 4.6×250 mm; 流动相: 10 mmol/L庚烷磺酸钠+60 mmol/L磷酸铵缓冲液(pH 5.0)+2%乙腈; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25℃; 激发波长: 384 nm; 发射波长: 505 nm; 衍生化试剂: 4 mol/L NaOH; 反应温度: 110℃; 流速: 0.8 mL/min^[11]。

液质联用条件 色谱柱: Puresil C-18 (4.6×250 mm); 流速: 1.0 mL/min; 流动相: 30 mmol/L七氟丁酸、1 mmol/L磷酸铵缓冲液(pH 5.0); 离子源电压 50 kV; 检测方式: ESIMS正离子模式。

2 结果与分析

通过对河豚毒素标准品和织纹螺样品的液相色谱分析可知,织纹螺的毒素中含有河豚毒素,如图1。

对8个小鼠试验阳性样品进行液相检测,并按1 MU=0.22 μg河豚毒素进行换算,以小鼠检测结果为横坐标(x),以液相色谱检测结果为纵坐标(y),由x-y关系式 $y=0.6216x+1.6558$ $R^2=0.9691$ (图2), $\alpha<1\%$,斜率为0.6216,说明织纹螺中主要的毒素成分是TTX,小鼠检测结果与液相色谱检测结果线性相关说明织纹螺中其他成分的毒素和TTX的含量有明显的相关性,根据河豚毒素衍生物与TTX之间比例相对固定,推断其他毒素绝大多数可能是河豚毒素衍生物。

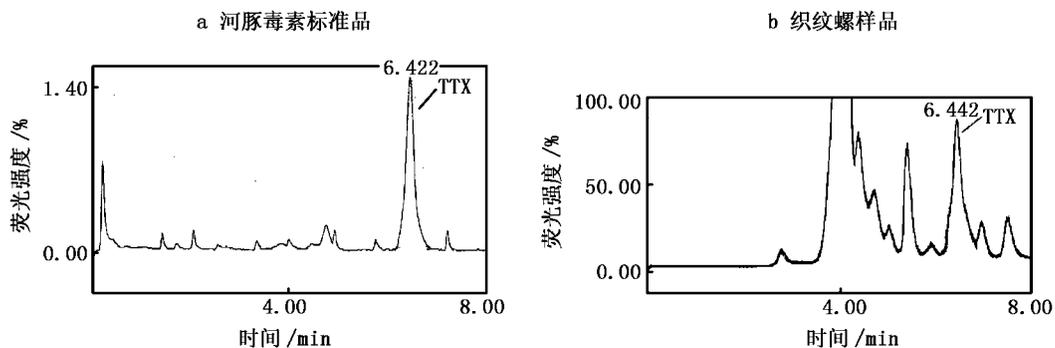


图 1 河豚毒素标准品和织纹螺样品的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of tetrodotoxin standard and Nassarius sample

为进一步明确织纹螺毒素的组成,我们采用了液质联用仪对织纹螺的毒素样品再次进行分析,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,质谱条件完全可以分离样品中的 TTX 及其衍生物。液质联用分析结果表明织纹螺毒素中除 TTX 外,还含有 TTX 的 4 位空间异构体 (4-epiTTX)、脱水河豚毒素 (anhydroTTX)、脱氧河豚毒素 (deoxyTTX)、单加氧河豚毒素 (11-oxoTTX) 等 TTX 的衍生物,其空间结构如图 4^[12]。因此我们判断织纹螺毒素中主要的成分是 TTX 及其衍生物。

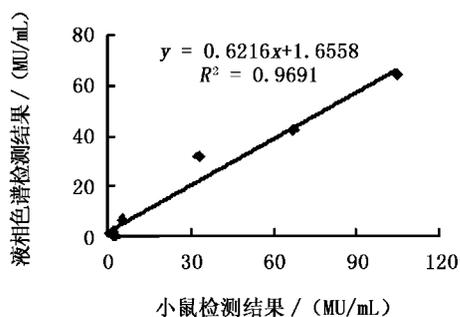


图 2 小鼠法与液相法测织纹螺毒素含量的比较
Fig. 2 Comparing results of the mouse and HPLC

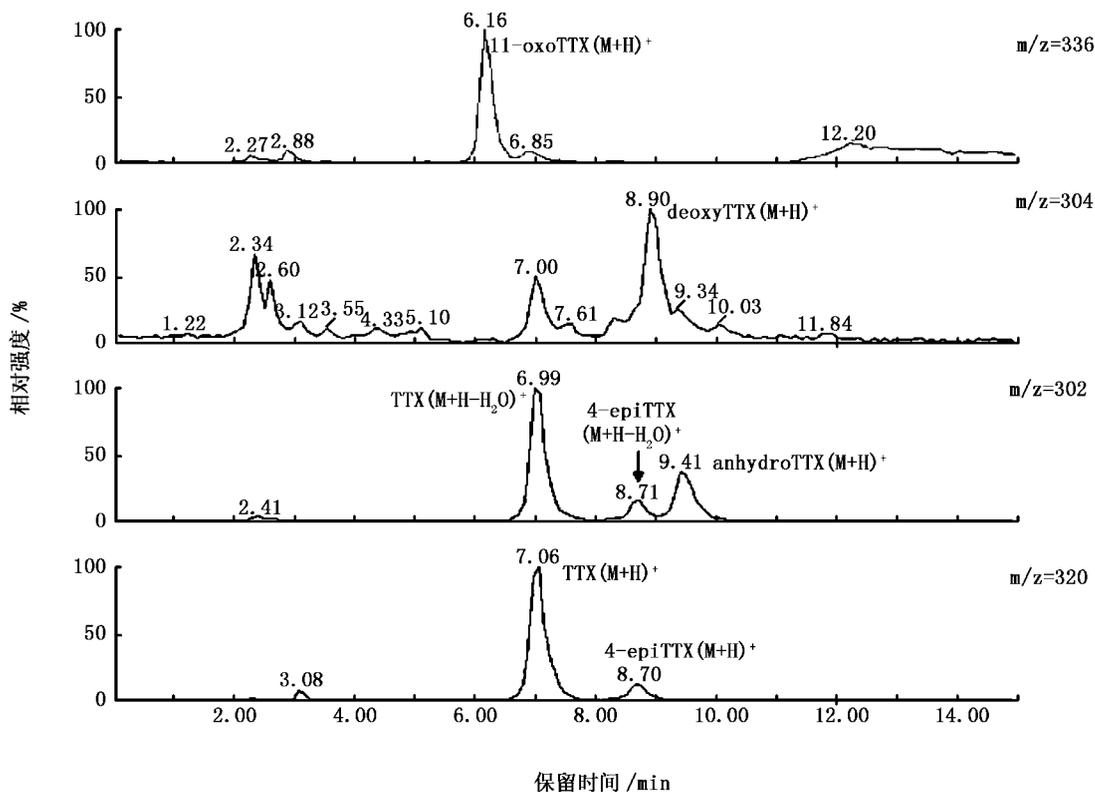
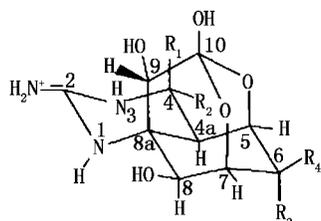
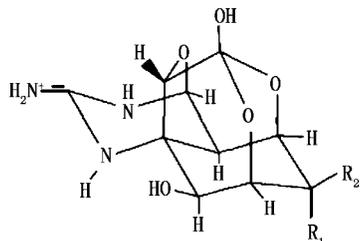


图 3 织纹螺毒素成分液质联用分析结果图
Fig. 3 SM chromatograms of toxin in Nassarius samples



毒素名称	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH
4-epiTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH
deoxyTTX	H	OH	CH ₂ OH	OH
11-oxoTTX	H	OH	OH	CH(OH) ₂



毒素名称	R ₁	R ₂
anhydroTTX	OH	CH ₂ OH

图4 河豚毒素及其衍生物空间结构

Fig 4 Structures of tetrodotoxin and its derivatives

3 讨论

由于织纹螺品种繁多,有毒的织纹螺在世界多个国家的海域都有分布,所以织纹螺毒素组成可能不完全相同,国内外的学者对织纹螺的毒素组成存在不同的看法。有专家认为织纹螺毒素主要成分是麻痹性贝毒(PSP)^[13],认为织纹螺是通过食用“赤潮”中有毒的藻类在体内蓄积产生的,而本研究表明我国沿海织纹螺毒素的主要成分是河豚毒素,同时还含有4-epiTTX、anhydroTTX、deoxyTTX、11-oxoTTX等河豚毒素的衍生物。

河豚毒素是因为首先在河豚鱼体内分离出来才得以命名,但多数研究表明,河豚毒素来源于海洋放线菌^[14],其它贝类、蟹类、章鱼、螺蛳等生物都是通过食物链而带毒的^[15]。织纹螺中河豚毒素的来源还没有明确的说法,多数专家认为是外源性的,织纹螺通过摄食河豚鱼尸体或河豚鱼卵,在体内蓄积河豚毒素^[16]。我们不排除织纹螺中河豚毒素来自食物链的可能性,但是我们在福建沿海有毒织纹螺分布地区调查取证时,并未发现河豚鱼尸体、卵或其它产河豚毒素的海洋动物。除此之外,织纹螺的毒素还有可能由自身或外界的产毒细菌引起的,或者某些种类的织纹螺其自身就能产生河豚毒素。实际上很多腹足类生物自身具有生产毒素的能力^[12]。在研究中发现,不同种类织纹螺毒素组成非常相似,显示它们具有相同或者相近的毒素来源,其毒素来源还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 刘少娟,陈伟伟,林健,等. 毒素污染的红带织纹螺小鼠毒力检测[J]. 海峡预防医学杂志, 2003, 9(2): 46
- [2] 秦品章,于梅. 织纹螺毒力消长及其栖息地环境影响的调查[J]. 海峡预防医学杂志, 2003, 9(1): 7-9
- [3] 蒋贤根,徐卫平,林香娟. 五起织纹螺引起的麻痹性贝类中毒的调查及分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(1): 53-54
- [4] 许景野,于梅,张思敏,等. 织纹螺麻痹性毒素毒性监测与探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 1999, 9(3): 199-201
- [5] Hwang Pai-An, Tsai Yung Hsiang, Lu Ya Hui, et al. Paralytic toxins in three new Gastropod (Mollusca) species implicated in food poisoning in southern Taiwan [J]. Toxicol, 2003, 44: 529-533
- [6] Hwang Deng Fwu, Shiu Yu Chünq, Huang Pai-An, et al. Tetrodotoxin in gastropods (snails) implicated in food poisoning in northern Taiwan [J]. Food Protection, 2002, 65(8): 1341-1344
- [7] Hwang Deng Fwu, Cheng Chao An, Tsai Hung Tsung, et al. Identification of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in marine gastropods implicated in food poisoning [J]. Fisheries Science, 1995, 61(4): 675-679
- [8] Hwang Deng Fwu, Cheng Chao An, Jeng Sen Shyong. Gon'yau toxin as a minor toxin in the gastropod Nipha clathrata in Taiwan [J]. Toxicol, 1994, 32(12): 1573-1579

- [9] Hwang Deng Fwu, Lin Li Chuan, Jeng Sen, et al. Occurrence of tetradotoxin-related toxins in the gastropod mollusk *Nipha cithara* from Taiwan [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992, 58(1): 63-67.
- [10] 陈人强, 李书龙, 关晓理, 等. 食用织纹螺引起的河鲀毒素中毒调查分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2001, 11(2): 251.
- [11] 刘海新, 张农, 董黎明, 等. 柱后衍生高效液相色谱法测定水产品中河豚毒素含量 [J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 815-817.
- [12] 于仁成, 周名江, 李爱峰, 等. 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 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 801-806.
- [13] 徐景野, 许国章. 织纹螺毒性与检测研究进展 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(3): 382-384.
- [14] 杨桂梅, 鲍宝龙. 河鲀和河鲀毒素之间关系的研究进展 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(6): 734-739.
- [15] 宋蔚忠, 顾杜新. 河豚毒素和石房蛤毒素的中毒与防治 [J]. *中国公共卫生*, 2000, 16(10): 947-948.
- [16] 徐立江, 胡正. 食用织纹螺中毒 15 例调查 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2006, 10(2): 39-40.

上海市精品课程——《水生生物学》

课程内容：“水生生物学”作为我校重要的专业基础课，为“水产养殖”、“生物科学”、“水族科学与技术”、“环境科学”等 10 个本科专业开设。我校是国内最早开设“水生生物学”课程的高校。1960 年出版了国内第一本“水生生物学”教材。1972—1988 年，编写了大量很有价值的教学参考资料，拍摄了与水生生物学相关的系列电视录像教学资料。1988 年在国内招收“水生生物学”本科专业。1995 年出版了《水生生物学》形态和分类教材。2000 年至今，进一步加强水生生物学课程建设，在教学手段和方式上实现了重要变革。该课程系统介绍浮游生物、底栖生物、大型水生植物等基础形态分类知识，同时涵盖与渔业、环保、水环境生态修复、水生种质资源和利用等学科的前沿内容；具体介绍淡海水生物的野外调查方法。教学方式上，理论教学采用多媒体课件、录像资料实行启发式教学，实验教学采用数码显微镜系统实现教师和学生互动，切实保证实验效果。采用网络课件，满足学生课外自学。

该课程获得了以下教学改革与研究成果：建立了一套完善的水生生物学教学体系；积累并收藏门类齐全、种类丰富的水生生物标本；实现了水生生物学的考教分离，建成了国内先进的教学实验室，实践了产学研的合作。于 2004 年获得了上海市精品课程称号。2005 年作为副主编单位出版了农业部十五规划教材《水生生物学》。

本课程主要特色：目前具备了完善的教学体系、自主研发的 CA 教学课件，先进的多媒体立体化教学手段，国内一流的数码互动显微镜实验教学，拥有淡水生物和海洋生物两个野外实习基地，在授课内容方面体现新时期水生生物学的时代特征和最新研究成果，形成具有鲜明特色的理论联系实际课程。

教学队伍：师资队伍由藻类学、浮游生物学、底栖动物学、甲壳动物学、生物修复学等专业教师组成，知识结构互补；学缘关系丰富；博士学位教师占 87.5%，高级职称教师占 71%。

课程负责人：周志刚教授、王丽卿教授

主讲教师：薛俊增教授、陈立婧副教授、张瑞雷副教授、季高华讲师

实验教学：周胜耀助理实验师

顾问：梁象秋教授、马家海教授

课程网址：<http://jpkc.shou.edu.cn/sssw/index.asp>