

水产品中麻痹性贝类毒素 (PSTs) 检测技术的 研究进展

杨锡洪^{1,2}, 张丽娜¹, 解万翠^{1,3}, 章超桦¹

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点试验室, 水产品深加工广东普通高等学校重点试验室, 国家贝类加工技术研发分中心(湛江), 广东湛江 524088) (2. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东青岛 266042) (3. 青岛科技大学化工学院, 山东青岛 266042)

摘要: 麻痹性贝类毒素是一种分布范围广及危害较大的赤潮毒素。可经食物链的富集、传递作用, 引发人体麻痹性中毒, 大量发生的中毒事件, 对人类健康和经济构成了严重威胁。目前, 麻痹性贝类毒素常用检测技术主要是小鼠生物法、高效液相色谱法和酶联免疫试剂盒测试法, 这些检测方法均有各自的优势, 但麻痹性贝类毒素成分多且复杂、结构特殊, 毒性又较强, 这使得其监管检测较为困难, 亟待建立快速简便、灵敏度高、特异性强的分析检测方法。本文基于麻痹性贝类毒素的基本性质, 依据检测原理的不同论述了其生物检测技术、仪器分析技术和生化测试技术, 并对各类技术的特点进行分析, 提出建设性的意见, 最后展望了未来麻痹性贝类毒素检测技术的发展趋势, 以期麻痹性贝类毒素检测监管提供借鉴。

关键词: 麻痹性贝类毒素; 性质; 生物法; 仪器分析; 生化分析

文章编号: 1673-9078(2016)12-366-373

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.055

Developments in Paralytic Shellfish Toxin (PST)-detection Techniques

YANG Xi-hong^{1,2}, ZHANG Li-na¹, XIE Wan-cui^{1,3}, ZHANG Chao-hua¹

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang), Zhanjiang 524088, China) (2. College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China) (3. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: Paralytic shellfish poisoning, caused by the ingestion of shellfish contaminated with paralytic shellfish toxins (PSTs), has been reported in many countries. These poisoning incidents have resulted in losses to local economies due to a negative impact on shellfish harvests. Currently, the mouse bioassay (MBA), high performance liquid chromatography (HPLC), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are widely used to detect PSTs. Although these techniques have many advantages, high toxicity and the presence of many complex components and special structures makes the analysis of this group of compounds especially challenging. A rapid, simple, effective, and specific method needs to be designed. Biological methods, techniques for instrumental analysis, and biochemical tests for the detection of PSTs in shellfish, cyanobacteria, and contaminated water are summarized in this paper, and their advantages and disadvantages for particular applications are discussed. Future studies that will contribute to their improvement are also discussed.

Key words: paralytic shellfish toxins; characterization; biological methods; instrumental analysis technologies; biochemical testing technologies

收稿日期: 2016-02-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271938); 现代农业产业技术体系专项 (GARS-48)

作者简介: 杨锡洪(1963-), 博士, 教授, 研究方向: 海洋化学及水产品安全

通讯作者: 解万翠(1969-), 博士, 教授, 研究方向: 食品风味和质量与安全

有害赤潮中的部分有毒藻能够产生对水产动物以及人类有害的藻毒素, 这些毒素通过滤食性贝类或植食性鱼类等生物的积累, 并通过食物链传递给人类造成危害。常见的赤潮藻毒素有: 麻痹性贝类毒素 (Paralytic Shellfish Poisoning toxins, PSTs)、腹泻性贝类毒素 (Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins, DSP)、记忆缺失性贝类毒素 (Amnesic Shellfish Poisoning

toxins, ASP)和神经性贝类毒素(Neurotoxic Shellfish Poisoning toxins, NSP)。PSTs 是一类膜神经毒素的统称^[1], 能选择性作用于神经细胞电压敏感性 Na⁺通道, 阻断 Na⁺内流, 导致人体神经系统传输受阻而引起麻痹^[2]。该毒素主要来源于双鞭甲藻类 *dinoflagellate algae* (亚历山大藻属 *Alexandrium*、膝沟藻属 *Gonyaulax*、裸甲藻 *Gymnodinium aerucyinosum Stein* 及甲藻属 *Pyrrophyta* 等)^[3], 淡水蓝藻^[4]或有害藻的共生菌^[5]。

目前, 包括发展中国家在内, 已有 20 多个国家和地区均制定了 PSTs 相关限量标准, 其中大多数标准规定 100 g 可食贝肉中 PSTs 的检出量不得超过 80 μg STX eq (400 MU), 检测多是采用 AOAC 认可的小鼠生物法(Mouse Bioassay, MBA), 日本、韩国和丹麦是将小鼠生物法 (MBA) 和高相液相色谱法 (HPLC) 同时作为国标检测法^[6]。MBA 和 HPLC 是检测监管 PSTs 时普遍采用的方法, 但由于 PSTs 的复杂性、活体动物实验的不确定性并涉及伦理道德以及 PSTs 标准品的缺乏等诸多问题, 这两种方法已不能满足科研和实际应用要求, 急需建立更高效简便、更灵敏及特异性更强的分析检测方法。本文就 PSTs 基本性质及其各类分析检测技术进行综述, 为 PSTs 的深入研究提供借鉴。

1 PSTs 基本性质

PSTs 是一类四氢嘌呤三环类化合物, 基本结构为含有 2 个胍基的多叠六元环 (图 1)^[7], 属于非蛋白质毒素, 7、8 和 9 位的胍基和附近 C12 位的羟基是其致病活性基团^[8]。当前经研究鉴定的 PSTs 多达 57 种^[9], 并不断有新的毒素衍生物被发现。这些衍生物大致分为七类, 但在水生贝类分离提取并具有毒性资料的主要包括四类^[10]: 氨基甲酸酯类、N-磺酰氨基甲酰基类、脱氨基甲酰基类以及脱氧脱氨基甲酰基类。此外, 还有贝体内新近发现的代谢产物 (M1-5), 因其毒性较低, 被认为是 PSTs 在贝体内的代谢中间体或终级产物^[11]。

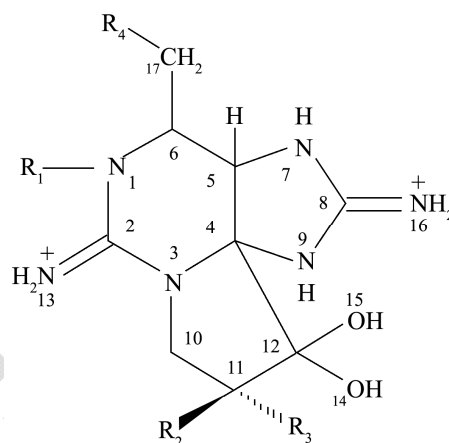


图 1 PSTs 的基本结构^[7]

Fig.1 Structure of paralytic shellfish toxin^[7]

表 1 PSTs 种类和毒性^[10]

Table 1 Analogs of paralytic shellfish toxins and their toxicities^[10]

种类	R1	R2	R3	R4	名称	分子量	毒性 MU/μmol
氨基甲酸酯类	H	H	H		STX	301	2100
	OH	H	H		neoSTX	317	2300
	OH	H	OSO ₃ ⁻	OCONH ₂	GTX1	412	1900
	H	H	OSO ₃ ⁻		GTX2	396	1000
	H	OSO ₃ ⁻	H		GTX3	396	1600
	OH	OSO ₃ ⁻	H		GTX4	412	1900
N-磺酰氨基甲酰基类	H	H	H		GTX5	380	150
	OH	H	H		GTX6	396	150
	H	H	OSO ₃ ⁻	OCONHSO ₃ ⁻	C1	476	17
	H	OSO ₃ ⁻	H		C2	476	258
	OH	H	OSO ₃ ⁻		C3	492	-
脱氨基甲酰基类	OH	OSO ₃ ⁻	H		C4	493	-
	H	H	H		dcSTX	258	900
	OH	H	H		dneoSTX	274	900
	OH	H	OSO ₃ ⁻	OH	dcGTX1	369	950
	H	H	OSO ₃ ⁻		dcGTX2	353	380

转下页

接上页

	H	OSO ₃ ⁻	H		dcGTX3	353	380
	OH	OSO ₃ ⁻	H		dcGTX4	369	950
	H	H	H		doSTX	242	-
脱氧脱氨甲酰基类	H	H	OSO ₃ ⁻	H	doGTX2	337	-
	H	OSO ₃ ⁻	H		doGTX3	337	-

PSTs 属于小分子 (约 200~500 u) 有机物质, 其纯品为白色固体, 呈碱性, 易溶于水、盐酸和乙酸等极性溶剂, 微溶于甲醇和乙醇, 不溶于石油醚和丙酮等大多数非极性溶剂^[12]。一般条件下, PSTs 化学性质较稳定, 耐高温, 酸性条件下稳定 (当 pH 值为 3~4, 最稳定), -18 °C 以下能够保存较长时间, 且毒性不会降低^[13]。当处于碱性条件时易被氧化, 若对氧化后的 PSTs 进行酸化可形成荧光物质, 这是仪器分析法检测 PSTs 的一个重要依据。

2 PSTs 检测方法

2.1 生物检测技术

2.1.1 小鼠生物检测法

MBA 法是 20 世纪 30 年代末由 Sommer 等人创建的一种半定量分析法。其原理是: 取 1 mL PSTs 提取液, 腹腔注射健康雄性小鼠 (20±2 g), 记录注射后小鼠的死亡时间 (直至呼出最后一口气), 查出鼠单位 (MU, AOAC 定义 1 MU 为 15 min 内使腹腔注射 1 mL PSTs 提取液的 20 g 健康小鼠死亡的最小毒素剂量), 并根据小鼠体重, 计算确定提取液中 PSTs 毒力的大小^[14]。国标 GB/T 5009.213-2008 《贝类中麻痹性贝类毒素的测定》中采用 MBA 法对出入境贝类产品进行监管监测, 其检出限约为 0.16 μg STX/mL 或 40 μg STX eq/100 g 贝肉。

MBA 法操作简单、无需复杂设备, 并且能检测 PSTs 提取物中的总毒性, 这对于水产品的安全性检测很重要, 尤其是对未知的毒素和污染物, 是难以替代的直观测定方法。但该方法存在很多缺点, 首先, 无法确定 PSTs 的种类及各组分的含量; 其次不同品系、不同健康状态的小鼠, 致使检测的结果有变动, 存在假阳性的现象; 再者高含量钠盐降低 PSTs 毒素毒性, 致使检测结果偏低^[15], 且染毒贝体富集的 Zn 对小鼠有毒害作用, 造成检测结果偏高^[16]; 此外, 该方法所需小鼠数量大, 违背动物实验中的“3R”原则, 一定程度上也违背了动物保护公约^[17]。

2.1.2 其他生物检测法

除常用的 MBA 法, PSTs 的生物检测还包括家蝇生物法 (House-fly bioassay) 和蝗虫生物法 (Locust

bioassay, LBA)。其中家蝇生物法与 MBA 法的分析方法相近, 通过记录家蝇的体内注射 PSTs 毒素提取液后的死亡时间, 计算提取液中 PSTs 毒性大小, 其检出限约为 0.20 μg STX eq/g。但此法需借助显微镜, 不易操作^[18]。蝗虫生物法是通过蝗虫体节之间注射 PSTs 提取液, 在一定时间内观察记录被麻痹蝗虫的百分率, 进而获得毒素毒性。Cook 等^[19]曾用沙漠蝗虫 (*Schistocerca gregaria* L.) 检测贝肉中 PSTs, 相比 MBA 法, 该法测试效果更好, 成本低, 不受钠盐、锌等的影响, 且为经伦理允许、具有广谱功能的生物法。

无论是 MBA 法, 还是其他生物检测法, 都对实验人员的专业技能和经验要求很高, 耗时也较长, 且活体动物实验的结果受诸多不确定因素, 试验结果的重复性和再现性较差、灵敏度较低^[20]。

2.2 仪器分析检测技术

2.2.1 高效液相色谱法

HPLC 是广泛应用于检测 PSTs 的经典方法。利用离子对反相色谱原理, 以磷酸四丁基铵、庚基磺酸盐等为离子对, 在反相色谱柱 (C-8 或 C-18) 上分离 PSTs, 利用其在碱性条件下氧化-酸化后可生成荧光物质的原理实现对 PSTs 的检测分析。依据 PSTs 氧化和分离的先后不同, 可分为柱前衍生法 (pre-) ^[21] 和柱后衍生法 (pro-) ^[22]。柱后衍生可分析已知的所有 STX 及其衍生物, 但需分三次洗脱, 耗时长, 且需配置特殊的柱后衍生装置, 分析成本高; 柱前衍生较柱后衍生的灵敏度更高, 但同样耗时长, 且不能对所有毒素组分进行定性定量分析^[23]。

相对 pre-HPLC 而言, pro-HPLC 的应用更为普遍。我国为此制定了 GB/T 23215-2008 《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》和 SN/T 1735-2006 《进出口贝类产品中麻痹性贝类毒素检验方法-高效液相色谱法》, 其最低检出限为 0.125 μg STX eq/g 可食贝肉。Yuko Cho 等^[24]利用 pro-HPLC 首次实现了对塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) Axat-2 单细胞中 PSTs 的定量分析。姜沛宏等^[25]对 pro-HPLC 检测 GTX1-4 的条件进行优化, 当以 70 mmol/L HIO₄-20% HCHO (含 0.12 mol/L KOH

和 0.75 mol/L HCOONa·2H₂O) 为柱后衍生条件, 1% HCHOH (1:99, V/V)、1.5 mmol/L 庚烷磺酸钠及 10 mmol/L H₃PO₄ 为流动相, 结果显示 GTX1-4 的最低检出限依次为 18.2 ng/mL、15.0 ng/mL、4.7 ng/mL 和 26.2 ng/mL。HPLC 法具有精确度高、检出限低等突出的优点, 但需小鼠生物法进行广泛标定, 且存在仪器昂贵, 花费大、耗时长和专业技术要求高等问题^[26]。

2.2.2 液-质联用法

液-质联用技术 (LC/MS) 综合了色谱的分离能力和质谱的定性功能, 能完成对复杂物质更精确的定量定性分析。1989 年, Quilliam^[27]首次利用 LC-ESI-MS 联用质谱仪成功分析了 STX, 其检出限为 0.03 ng, 优于 MBA 法。2001 年, Jaime 等^[28]建立一种电喷雾离子化质谱联用技术实现了对 PSTs 的定量分析, 该方法检测效果良好。2005 年, Carmela 等^[29]建立了亲水作用液相色谱-电喷雾串联质谱法 (HILIC-MS/MS), 能够一次性同时完成对主要 PSTs 的分析, 该技术目前已获得广泛应用, 并被进一步优化完善。

Dell'Aversano 等^[30]利用 HILIC-MS/MS 技术发现贻贝体内存在 5 种新型 STX 衍生物 M1-5, 并对 M1-4 四种衍生物的结构进行了分析鉴定。陈桃英等^[31]曾用 HPLC-MS 法在 4 h 内完成了对 *Alexandrium*、蒙古裸腹蚤 *Moina mongolica Daday* 及菲律宾蛤仔中的 GTX_{1,4} 检测, 得知不同生物对 GTX_{1,4} 有不同的蓄积方式。Boundy 等^[32]建立了 HILIC UPLC-MS/MS 法检测长牡蛎、紫贻贝及新西兰绿唇贻贝中 PSTs 并进行优化, 其灵敏度更好, 选择性更强。LC/MS 填补了 HPLC 法定性能力不足的缺陷, 在检测分析 PSTs 方面具有很大的应用潜力^[33]。该法灵敏度高, 尤其是在分析低浓度毒素样品上具有突出优势; 定性分析能力强, 可同时定性、定量分析多种毒素成分, 并能鉴别新毒素的结构特征; 分离效能高、选择性强、分析速度快, 是分析各种样品中 PSTs 含量的优选方法, 但 PSTs 衍生物较多, 分离困难, 且液-质联用设备昂贵, 需专业人员维护, 故限制了其应用推广。

2.2.3 薄层色谱法

薄层色谱法 (TLC) 是 PSTs 检测的传统方法之一, 根据 PSTs 各组分对同一吸附剂吸附能力的差异, 将毒素提取物点样在用固定相均匀涂布的薄层 (玻璃板、塑料或铝基片等) 上, 通过对比样品与参照物的比移值获得样品信息, 常与荧光检测器、质谱仪和火焰热离子检测器等联用实现对毒素样品的定性定量分析, 具有简便快速、成本低的优势^[34]。

Indrasena 等^[35]利用薄层色谱-火焰热离子检测器 (TLC/FTID) 对经 Chromarods-SIII 硅胶色谱棒分离

的 STX 及其衍生物进行分析检测, 结果显示每克贝肉组织中 GTX_{2,3}、STX、NEO 和 C_{1,2} 的检出限分别为 0.4 μg、2.1 μg、0.8 μg 和 2.5 μg, 表明 TLC/FTID 可作为一种筛选 PSTs 染毒产品的低廉、快速的方法。但 TLC 的检出限远低于 HPLC 和 LC-MS 等, 灵敏度也较低, 限制了其应用。

2.2.4 荧光分光光度计法

荧光分光光度计法 (Fluorescence Spectrophotometry) 简称荧光计法, 通常作为筛选染毒 PSTs 样品的方法, 通过对待测样品进行提取、净化和浓缩, 再经氧化酸化衍生, 取适量于比色皿中, 以其荧光强度进行定量分析^[36]。该方法是以荧光强度为指标对 PSTs 提取液中总毒性进行定量分析, 故 NeoSTX、C_{1,2} 等衍生后荧光性较弱的毒素不易采用该方法, 而 STX、GTX_{2,3} 的衍生物荧光性较强, 荧光计法能较精准的对其定量检测。

刘晓丽等^[37]曾将荧光分光光度计法与 MBA 法对比检测经 Sephadex-G15 凝胶层析柱纯化的 PSTs, 结果显示两者检测结果相吻合。G Gerdtts 等^[38]应用快速荧光法 (FFA) 对赤潮毒藻 (*Alexandrium fundyense* CCMP1719、*A. tamarense* 57OK1K、*A. tamarense* CCMP115 和 *Prorocentrum micans* ME04) 中 PSTs 进行分析, 其结果显示 FFA 测试结果和 HPLC 检测结果具有很好的线性关系, 可作为赤潮的一个简便快速、成本低的监测工具。但荧光计法中样品前处理复杂, 且样品中脂肪、蛋白等物质对检测结果有干扰。此外, 该法只能给出 PSTs 荧光衍生物的总量, 不能实现对其各个组分的定性定量分析^[39]。

2.2.5 毛细管电泳法

毛细管电泳法 (CE) 是 1980s 初兴起的新型分离检测技术。该法依据 PSTs 毒素组所带电荷量的差异性 (STX、neoSTX、dcneoSTX、dcSTX 等带 2 个正电荷; GTX_{1,6}、dcGTX_{1,4}、doGTX_{2,3} 等带 1 个正电荷; C_{1,4} 不带电荷) 将其初步分离, 再经荧光、紫外或质谱检测器进行检测^[40]。

Keyon 等^[41]曾用瞬间等速电泳-细管区带电泳-电容耦合非接触电导检测器/紫外检测器 (tITP-CZE-C4D/UV) 对贻贝中 PSTs 进行检测分析, 并应用柱前衍生-HPLC-FLD (AOAC, 2005) 进行验证, 结果显示这种方法可作为 PSTs 早期的在线检测, 效果良好。陈晓燕等^[42]建立磷酸氢二钠-柠檬酸为运行缓冲液的 CZE-UV 法对 GTX_{2,3} 进行检测分析, 该法显示 GTX_{2,3} 的检出限分别为 0.38 μmol/L 和 0.36 μmol/L, 且线性检测范围较好。CE 法所需样本量少、简便快速, 但其分离效果差、灵敏度低, 且不适于检测没有

净电荷的毒素^[43]。

2.3 生化检测技术

2.3.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫法(ELISA)是基于抗原抗体之间特异性反应的原理对样品中 PSTs 毒素进行检测。主要方法包括直接酶联免疫吸附法(dc-ELISA)和间接酶联免疫法(idc-ELISA)两种。自 Johnson 等^[44]首次制得抗 STX 的多克隆抗体以来, ELISA 迅速发展, 现已有商业化的 PSTs 诊断免疫试剂盒, 其在定性定量初筛检测 PSTs 方面的效果较好。黄玉柳等^[45]曾用酶联免疫试剂盒在短时间(2 h)内完成了对近江牡蛎样品和文蛤样品中 PSTs 的检测, 该试剂盒的灵敏度为 0.015 ng/g, 最低检测限可达 0.02 ng/g, Kawatsu 等^[46]曾将直接竞争酶联免疫检测法与 MBA 法对比检测 GTX_{2,3}, 相比 MBA 法, dc-ELISA 灵敏度达 100%, 特异性为 89.7%。

ELISA 法具有专一性强、灵敏度高、操作方便快速等优点, 是快速筛选贝类毒素和藻类毒素的首选技术, 但存在某些 PSTs 组分的结合特异性较低、标准品的缺乏以及试剂盒昂贵且易产生交叉反应等问题, 致使该法的应用具有一定的局限性^[47]。

2.3.2 放射性受体结合检测法

放射性免疫分析法(RIA)是于 1984 年由 Davio 和 Fontelo 建立^[48]。该法依据对毒素功能活性的识别检测其毒力的大小。³H-STX 和 STX 与特异性神经受体相互竞争结合, 通过检测分析 ³H-STX 与受体的结合程度, 判断毒素毒性的大小^[49]。

RBA 法经完善后^[50], 实现了对样品中主要 PSTs 毒素总毒性的检测, 具有快速、简便和灵敏度高等优点, 可作为 MBA 法的一种可靠的替代方法。但该方法无法区分毒素组成成分, 且采用放射性标记, 需专门的仪器设备, 成本高, 故目前尚未得到推广使用^[51]。

2.3.3 细胞毒性检测法

细胞毒性检测法(Cell-bioassay)又称组织培养测试法, 根据 PSTs 阻断 Na⁺内流这一作用机制, 取适量藜芦定(Na⁺通道活化剂)或乌本苷(Na⁺/K⁺-ATP 酶抑制剂)加到培养的组织细胞中, 会引起 Na⁺内流过多致使细胞肿胀, 甚至死亡; 若同时添加适量能阻断 Na⁺通道的 PSTs, 则其与藜芦定或乌本苷发生拮抗作用能限制 Na⁺内流过多, 细胞可存活, 进而根据细胞的存活百分率对总 PSTs 进行定量分析^[52]。

黄海燕等^[53]曾建立 PSTs 小鼠脑神经瘤细胞(N-2a)检测法, 并用 MBA 法进行验证, 结果显示该方法与 MBA 法具有一致性, 灵敏度高, 检出限最

低为 10⁻⁹ mol/L 剂量水平。但该法采用显微计数活细胞数对 PSTs 进行定量分析, 耗时长, 所需细胞量大, 不过目前已有一种神经细胞生物分析装置(MIST AlertTM)可快速对染毒贝类中 PSTs 总毒性进行定量检测, 其检测限约 40 μg STX eq/100 g 剂量水平^[54]。总体来说, 细胞毒性检测法比较直观, 且实验条件易于控制, 是一种十分有前景的赤潮毒素检测技术。但其无法对毒素含量及组成精确定性。

3 展望

随着对 PSTs 研究的不断深入以及分析技术的快速发展, 其检测技术也在不断被优化完善, 新的检测技术也持续被建立, 如生物传感器检测法^[55]、电压敏感荧光染料技术^[56]。今后, PSTs 的检测技术相关研究会持续朝着以下几个方向发展: (1) 物理化学法相结合大量纯化 PSTs, 为其应用研究和进一步检测分析提供保证; (2) 建立更加便捷、高效及低廉的定性定量分析方法, 以便分析已知 PSTs 组分和鉴别新型毒素; (3) 深入研究免疫学检测技术, 尤其是 ELISA 和受体结合测试法, 克服毒素之间的交叉反应, 研制方便、灵敏度高的免疫试剂盒; (4) 完善 PSTs 检测技术的小型便携和在线测试, 实现精确检测分析现场样品。

参考文献

- [1] Chang F H, Anderson D M, Kulis D M, et al. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand [J]. *Toxicon*, 1997, 35: 393-409
- [2] Halstead B W, Schantz E J. Paralytic shellfish poisoning [R]. WHO Offset Publication. Geneva, Switzerland: World Health Organization
- [3] 卞中园. 麻痹性贝毒在牡蛎体内蓄积、分布、转化以及羧甲基壳聚糖的脱除作用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013
- BIAN Zhong-yuan. Study on the accumulation, distribution, transformation for paralytic shellfish poisoning and the depuration of cm-chitosan in oyster [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013
- [4] Néstor Lagos, Hideyuki Onodera, Pedro Antonio Zagatto, et al. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil [J]. *Toxicon*, 1999, 37(10): 1359-1373
- [5] Kodama M, Ogata T, Sakamoto S, et al. Production of paralytic shellfish toxins by a *Bacterium Moraxella* sp. isolated from protogonyaulax tamarensis [J]. *Toxicon*, 1990, 28(6): 707-714
- [6] 张卫兵, 张周建. 食品安全国家标准中水产食品贝毒素指标

- 的确立[J].中国卫生标准管理,2011,2(6):37-41
- ZHANG Wei-bing, ZHANG Zhou-jian. Establishment of the index of shellfish toxin aquatic products of national food safety standards [J]. China Health Standard Management, 2011, 2(6): 37-41
- [7] Baden, DG. Marine food-borne dinoflagellate toxins [J]. Int. Rev. Cytol, 1983, 82: 99-150
- [8] Mons M N, Van Egmond H P, Speijers G J A. Paralytic shellfish poisoning: A review [J]. RIVM Report, 1998
- [9] Maria Wiese, Paul M D'Agostino, Troco K Mihali, et al. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs [J]. Marine Drugs, 2010, 8(7): 2185-2211
- [10] 于姬.北黄海虾夷贝扇内麻痹性贝毒研究[D].大连:大连海事大学,2009
- YU Ji. Study on the PSP in *Patinopecten yessoensis* [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2009
- [11] Jonathan R Deeds, Jan H Landsberg, Stacey M Etheridge, et al. Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning [J]. Marine Drugs, 2008, 6(2): 308-348
- [12] 崔伟民,杨维东,刘洁生.双壳贝类麻痹性贝毒抗性机制的研究[J].卫生研究,2008,37(3):377-380
- CUI Wei-min, YANG Wei-dong, LIU Jie-sheng. Studies on resistance mechanism to paralytic shellfish poisoning in bivalves [J]. Journal of Hygiene Research, 2008, 37(3): 377-380
- [13] W M Indrasena, T A Gill. Storage stability of paralytic shellfish poisoning toxins [J]. Food Chemistry, 2000, 71(1): 71-77
- [14] Jellett JF, Marks LJ, Stewart JE, et al. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays - automated end-point determination and standardization of the *in vitro* tissue-culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay [J]. Toxicon, 1992, 30(10): 1143-1156
- [15] Schantz E J, McFarren E F, Schafer M L, et al. Purified poison for bioassay standardization [J]. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 1958, 41(1): 160-168
- [16] McCulloch A W, Boyd R K, Defreitat A S W, et al. Zinc from oyster tissue as a causative factor in mouse deaths in official bioassay for paralytic shellfish poison [J]. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 1989, 72: 384-386
- [17] A R Humpage, V F Magalhaes, S M Frosocio. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2010, 397(5): 1655-1671
- [18] Bernard, C. Abbott, Alvin Siger, et al. The common housefly as a simple, inexpensive bioassay for neurotoxins [J]. Toxicon, 1985, 23(1): 21
- [19] A C Cooka, S Morrisb, R A Reese, et al. Assessment of fitness for purpose of an insect bioassay using the desert locust (*Schistocerca gregaria* L.) for the detection of paralytic shellfish toxins in shellfish flesh [J]. Toxicon, 2006, 48(6): 662-671
- [20] CAO Ji-juan, ZHENG Jiang, YU Bing, et al. Evaluation of mouse bioassay results in an inter-laboratory comparison for paralytic shellfish poisoning toxins [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(40): 912-916
- [21] Lawrence J F, Menard C, Cleroux C. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish [J]. Journal of AOAC International, 1995, 78(2): 514-520
- [22] Oshima Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins [J]. Journal of AOAC International, 1995, 78(2): 528-532
- [23] P Rodriguez, A Alfonso, A M Botana, et al. Comparative analysis of pre- and post-column oxidation methods for detection of paralytic shellfish toxins [J]. Toxicon, 2010, 56(3): 448-457
- [24] Yuko Choa, Ryoko Ozekib, Mari Yotsu-Yamashita, et al. Single-cell analysis of paralytic shellfish toxins in *Alexandrium tamarense* by HPLC with post-column fluorescent derivatization [J]. Harmful Algae, 2013, 25: 47-53
- [25] 姜沛宏,章超桦,秦小明,等.柱后衍生高效液相色谱法检测膝沟藻毒素[J].食品科学,2013,34(2):170-174
- JIANG Pei-hong, ZHANG Chao-hua, QIN Xiao-ming, et al. Analysis of Gonyautoxins (GTXs) by high performance liquid chromatography with post-column derivatization [J]. Food Science, 2013, 34(2): 170-174
- [26] B Ben-Gigirey, M L Rodríguez-Velasco, A Otero, et al. A comparative study for PSTs toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish [J]. Toxicon, 2012, 60(5): 864-873
- [27] Michael A Quilliam. Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1989, 3(5): 145-150
- [28] Elke Jaime, Christian Hummert, Philipp Hess, et al. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography [J]. Journal of Chromatography, A, 2001, 929(1-2): 43-49

- [29] Carmela Dell'Aversano, Philipp Hess, Michael A. Quilliam. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1081(2, 22): 190-201
- [30] Carmela Dell'Aversano, John A Walter, Ian W Burton, et al. Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels [J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(9): 1518-1523
- [31] 陈桃英,柳俊秀,李水军,等.膝沟藻毒素液质联用快速检测及其在海洋生物体内的累积[J].*海洋与湖沼*,2009,40(1): 88-93
CHEN Tao-ying, LIU Jun-xiu, LI Shui-jun, et al. Gonyautoxin: HPLC-MS detection and accumulation in marine organisms [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(1): 88-93
- [32] Michael J Boundy, Andrew I Selwood, D Tim Harwood, et al. Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction [J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1387(27): 1-12
- [33] Andrew D Turner, Robert G Hatfield, Monika Rapkova, et al. Comparison of AOAC 2005.06 LC official method with other methodologies for the quantitation of paralytic shellfish poisoning toxins in UK shellfish species [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(3): 1257-1270
- [34] 汪瑗,朱若华,陈惠.薄层色谱分析法及其进展[J].*大学化学*,2006,21(3): 34-40
WANG Yuan, ZHU Ruo-hua, CHEN Hui. Progress of thin layer chromatography analysis method [J]. *University Chemistry*, 2006, 21(3): 34-40
- [35] W M Indrasena, R G Ackman, T A Gill. Separation of paralytic shellfish poisoning toxins on Chromarods-SIII by thin-layer chromatography with the Iatroscan (mark 5) and flame thermionic detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 855(2): 657-668
- [36] 徐静,孙兴权,韩慧,等.荧光法在食品理化检验标准中的应用进展[J].*食品安全质量检测学报*,2015,6(1):17-24
XU Jing, SUN Xing-quan, HAN Hui, et al. Application of fluorescence detection in food inspection standards [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2015, 6(1): 17-24
- [37] 刘晓丽,章超桦,解万翠,等.链状亚历山大藻的培养及麻痹性贝类毒素的提取和检测[J].*水产学报*,2010,34(11):1783-1788
LIU Xiao-li, ZHANG Chao-hua, XIE Wan-cui, et al. Cultivation of *Alexandrium catenella* and extraction and detection of paralytic shellfish poisoning(PSP) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(11): 1783-1788
- [38] G. Gerdt, C. Hummert, G. Donner, et al. A fast fluorimetric assay (FFA) for the detection of saxitoxin in natural phytoplankton samples [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 230(1): 29-34
- [39] W M Indrasena, T A Gill. Fluorometric detection of paralytic shellfish poisoning toxins [J]. *Analytical Biochemistry*, 1998, 264(2): 230-236
- [40] N. Piñeiro, J M Leão, A Gago Martínez, et al. Capillary electrophoresis with diode array detection as an alternative analytical method for paralytic and amnesic shellfish toxins [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 847(1-2): 223-232
- [41] Aemi S Abdul Keyon, Rosanne M Guijt, Christopher J S Bolch, et al. Transient isotachopheresis-capillary zone electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet detection for the analysis of paralytic shellfish toxins in mussel samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1364(17): 295-302
- [42] 陈晓燕,张允奇,张银辉.高效毛细管电泳法测定膝沟藻毒 2 和 3[J].*中国卫生检验杂志*,2007,17(3):398-399
CHEN Xiao-yan, ZHANG Yun-qi, ZHANG Yin-hui. Analysis of gonyautoxin-2 & 3 by high performance capillary electrophoresis [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(3): 398-399
- [43] Aemi S Abdul Keyon, Rosanne M Guijt, Christopher J S Bolch, et al. Transient isotachopheresis-capillary zone electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet detection for the analysis of paralytic shellfish toxins in mussel samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1364(17): 295-302
- [44] Johnson H M, Frey P A, Angelotti R, et al. Haptenic properties of paralytic shellfish poison conjugated to proteins by formaldehyde treatment [J]. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1964, 117: 425-430
- [45] 黄玉柳,黄国秋,叶欣宇,等.水产品中麻痹性贝类毒素(PSTs)的快速检测[J].*江苏农业科学*,2012,40(1):255-256
HUANG Yu-liu, HUANG Guo-qiu, YE Xin-yu, et al. Rapid detection of paralytic shellfish poison (PSTs) in the aquatic products [J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2012, 40(1): 255-256
- [46] Kentaro Kawatsu, Masashi Kanki, Tetsuya Harada, et al. A highly rapid and simple competitive enzyme-linked

- immunosorbent assay for monitoring paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish [J]. *Food Chemistry*, 2014, 162(1): 94-98
- [47] Myoung-Ho Kim, Suk-Jung Choi. Immunoassay of paralytic shellfish toxins by moving magnetic particles in a stationary liquid-phase lab-on-a-chip [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 66(15): 136-140
- [48] Stephen R Davio, Paulito A Fontelo. A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin [J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 141(1): 199-204
- [49] P Ve Âleza, J Sierraltab, . Alcayaga, et al. A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels [J]. *Toxicon*, 2001, 39(7): 929-935
- [50] Gires Usup, Chui-Pin Leaw, Mei-Yee Cheah, et al. Analysis of paralytic shellfish poisoning toxin congeners by a sodium channel receptor binding assay [J]. *Toxicon*, 2004, 44(1): 37-43
- [51] Alison Robertson, Andrew P. Negri, James N. Burnell, et al. Development and assessment of radioreceptor binding assays for the detection of saxitoxin binding proteins in biological extracts [J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 356(1): 66-75
- [52] Masanao Okumura, Hideaki Tsuzuki, Ban-Ichi Tomita. A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay [J]. *Toxicon*, 2005, 46(1): 93-98
- [53] 黄海燕,付英斌,赵昆山,等.麻痹性贝类毒素细胞检测法的建立[J].*中国卫生检验杂志*,2010,20(4):779-781
HUANG Hai-yan, FU Ying-bin, ZHAO Kun-shan, et al. *In vitro* evaluation of paralytic shellfish poisoning toxin potency [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2010, 20(4): 779-781
- [54] Joanne F Jelletta, Raymond L Robertsa, Maurice V Laycock, et al. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSTs) toxins in shellfish tissue using MIST Alert™, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC® mouse bioassay [J]. *Toxicon*, 2002, 40(10): 1407-1425
- [55] Julie P Meneely, Katrina Campbell, Charles Greef, et al. Development and validation of an ultrasensitive fluorescence planar waveguide biosensor for the detection of paralytic shellfish toxins in marine algae [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41: 691-697
- [56] Ronald Manger, Doug Woodle, Andrew Berger, et al. Flow cytometric detection of saxitoxins using fluorescent voltage-sensitive dyes [J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, 366(2): 149-155