

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240303004

海鱼中海洋神经毒素污染特征及暴露风险评估

申慧婧^{1,2}, 王兴龙³, 张弛^{1,2}, 周爽², 葛鑫禹^{1,2}, 吴永宁^{1,2*}

(1. 北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021;
3. 杭州市疾病预防控制中心, 杭州 310000)

摘要: **目的** 调查我国南海区域典型海洋神经毒素主要污染的海鱼品种及污染水平, 为污染分布、暴露评估提供技术手段。**方法** 采用固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)对海鱼样品中的石房蛤毒素(saxitoxin, STX)、新石房蛤毒素(neosaxitoxin, NEO)、膝沟藻毒素(gonyautoxin, GTX-1、GTX-4、GTX-5)、N-磺酰氨基乙酰基类毒素(N-sulfocarbamoyltoxins, C1、C2)、脱氨基酰石房蛤毒素(decarbamoylsaxitox, dcSTX)、脱氧脱氨基乙酰基新石房蛤毒素(decarbamoylneosaxitoxin, dcNEO)、脱氧脱氨基乙酰基膝沟藻毒素(decarbamoylgonyautoxin-2&3, dcGTX 2、dcGTX 3)、河豚毒素(tetrodotoxins, TTX) 12种海洋神经毒素进行测定, 外标法定量。**结果** 在1.2~50.0 µg/kg浓度范围内, 12种海洋神经毒素呈良好的线性关系($R^2 \geq 0.9990$), 48种海鱼样本中, 有13种检出海洋神经毒素, 各省份平均暴露水平均在安全范围内, 提示了潜在的急性暴露风险。**结论** 建立了海产品中多种海洋神经毒素的UPLC-MS/MS痕量检测技术并将其应用于南海海域的毒素污染特征及暴露风险评估, 为海鱼中海洋神经毒素的检测和控制提供了技术支撑和理论依据。

关键词: 海洋毒素; 海鱼; 超高效液相色谱-串联质谱法; 风险评估

Pollution characteristics and exposure risk assessment of marine neurotoxins in marine fish

SHEN Hui-Jing^{1,2}, WANG Xing-Long³, ZHANG Chi^{1,2}, ZHOU Shuang²,
GE Xin-Yu^{1,2}, WU Yong-Ning^{1,2*}

(1. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 3. Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the species and pollution levels of typical marine neurotoxins in the South China Sea, and provide technical means for pollution distribution and exposure assessment. **Methods** Solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect saxitoxin (STX), neosaxitoxin (NEO), gonyautoxin (GTX-1, GTX-4, GTX-5), N-sulfocarbamoyltoxins (C1, C2), decarbamoylsaxitox (dcSTX), decarbamoylneosaxitoxin (dcNEO), decarbamoylgonyautoxin-2&3 (dcGTX 2, dcGTX 3), tetrodotoxins (TTX) 12 kinds of marine neurotoxins were determined. The samples were quantified by

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100802)、国家自然科学基金项目(31471671)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100802), and the National Natural Science Foundation of China (31471671)

***通信作者:** 吴永宁, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: wuyongning@cfsa.net.cn

***Corresponding author:** WU Yong-Ning, Professor, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China. E-mail: wuyongning@cfsa.net.cn

external standard method. **Results** In the concentration range of 1.2–50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 12 kinds of marine neurotoxins showed a good linear relationship ($R^2 \geq 0.9990$). Among 48 kinds of marine fish samples, 13 kinds of marine neurotoxins were detected, and the average exposure levels in all provinces were within the safe range, suggesting the potential acute exposure risk. **Conclusion** The UPLC-MS/MS trace detection technology for various marine neurotoxins in seafood is established and applied to the assessment of toxin contamination characteristics and exposure risk in the South China Sea, which provide technical support and theoretical basis for the detection and control of marine neurotoxins in marine fish.

KEY WORDS: marine toxins; sea fish; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; risk assessment

0 引言

海洋生物毒素(贝类毒素)是海洋生物体内存在的一类高活性的特殊代谢成分,一般拥有剧烈毒性,主要由藻类或浮游植物产生^[1-2]。早期,通常将贝类毒素按照中毒症状进行分类,常见的贝类毒素有麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning, PSP)、腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、失忆性贝类毒素(amnesic shellfish poisoning, ASP)和神经毒性贝类毒素(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)等,其中, DSP 和 PSP 最为常见^[3-4]。随着研究的不断深入和新贝类毒素种类的发现,原有的分类方法不便于检测和制定限量标准。2004 年在都柏林举行的关于贝类生物毒素的会议上,由联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization, FAO)、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和政府间海洋学委员会(Intergovernmental Oceanographic Commission, IOC)共同组建的双壳类软体生物毒素工作组按照化学结构将贝类毒素重新划分为八大类^[5]:石房蛤毒素(saxitoxin, STX)组、软骨藻酸(domoic acid, DA)组、大田软海绵酸毒素(okadaic acid, OA)组、原多甲藻酸毒素(azaspiracid, AZA)组、短裸甲藻毒素(brevetoxin, BTX)组、扇贝毒素(peccenotoxin, PTX)组、虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)组和环亚胺类毒素(cyclic imine, CI)。同时,目前常见的贝类毒素中, STX 和 DA 较易溶于水,被称为水溶性贝类毒素(hydrophilic shellfish toxins)^[6];其余六大类均为聚醚类物质,易溶于甲醇、乙醚等有机溶剂中,统一称作为脂溶性贝类毒素(lipophilic shellfish toxins)^[7]。另外,与 PSP 毒理相似的河豚毒素(tetrodotoxins, TTX)也受到人们的广泛关注与研究^[8-10],河豚毒素是河豚鱼特有的一种毒性物质,最早由日本学者 Yoshizumi Tahara 从河豚鱼的卵巢中发现^[11],因此用河豚鱼的名字来命名。其急性口服致死剂量为 232 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$,并且是所有海洋毒素中毒事件中致死率最高的^[12-13]。

这些海洋毒素会在许多底栖海洋物种(软体动物、腹足类、甲壳类、两栖动物、章鱼和鱼类)中通过食物链累积。世界各地都有因食用受污染的渔业产品而导致人类中毒的报道^[14-16],可能出现四肢麻木,嘴唇、舌头和口腔发痒,呼

吸困难,胃肠道问题,以致完全瘫痪等神经系统症状,严重的甚至导致呼吸停止和心血管休克或死亡,对人类健康造成极大的危害^[17]。因而,食用水产品导致生物毒素中毒的风险应引起重视。

中国海洋生物种类丰富,其中不乏能够富集海洋神经毒素但又被人类大量食用的海产品^[18-19],而不同海产品的海洋毒素在典型海域中的污染特征受到了广泛的关注^[20-23]。近些年来,随着检测技术的逐步发展,一些海洋毒素的研究也只侧重于 TTX 等单个毒素的检测^[24]。为开展我国典型海鱼中海洋神经毒素污染特征研究,进一步了解我国南海海域中海洋神经毒素的污染与膳食暴露风险,本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)多毒素分析方法,对海洋神经毒素进行检测,探讨居民膳食暴露风险及主要贡献来源,为高风险海洋食品提供预警信息,指导居民膳食选择,预防中毒事件的发生,为海鱼的食物安全风险提供基础科学数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

南海海域海鱼分别是 2017—2018 年于湛江当地码头市场或菜市场陆续采集的样本,分别是:金鼓鱼、鳕鱼、石斑鱼、花鲢鱼、泥鳅鱼、海红友鱼、黄尾鱼、流潺鱼、米鲳鱼、长尾鲳鱼、博米鱼、流德鱼、尖头鱼、豆腐鱼、红鲷鱼、黄柴鱼、黄花鱼、金丝鱼、鲷鱼、马友鱼、带鱼、沙尖鱼、海鳙鱼、沙鼓头鱼、龙利鱼、沙丁鱼、多宝鱼、三牙鱼、油斑鱼、白鲳鱼、骨鱼、沙甲鱼、马鲛鱼、剥皮鱼、龙躄鱼、蟹鱼、石头鱼、红友鱼、须毛鱼、花鲈鱼、大眼鸡鱼、比目鱼、门鳞鱼、海鲈鱼、金鲳鱼、红鱼、七星斑鱼、铁尾鱼,共 48 种,每个品种鱼类采集 2~3 条,共计 118 份。每份样品保留可食部,匀浆处理后冷链运送至实验室-40℃密封保存。

1.2 试剂

标准品石房蛤毒素(STX, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、新石房蛤毒素(neosaxitoxin, NEO, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、膝沟藻毒素(gonyautoxin, GTX-1, 23.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GTX-4, 7.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GTX-5, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、

N-磺酰氨基甲酰基类毒素(N-sulfocarbamoyl toxins, C1、C2, 20 $\mu\text{g/mL}$)、脱氨基砒石房蛤毒素(decarbamoyl saxitoxin, dcSTX, 16.63 $\mu\text{g/mL}$)、脱氧脱氨基砒基新石房蛤毒素(decarbamoyl neosaxitoxin, dcNEO, 10 $\mu\text{g/mL}$)、脱氧脱氨基砒基膝沟藻毒素(deoxydecarbamoyl toxins, dcGTX 2, 35.26 $\mu\text{g/mL}$, dcGTX 3, 10.36 $\mu\text{g/mL}$)、TTX (20 $\mu\text{g/mL}$) (加拿大海洋生物研究所), 其结构式如图 1 所示; 甲醇、乙腈(色谱级, 赛默飞世尔科技有限公司); 甲酸铵、乙酸(色谱级, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 三氯甲烷(分析纯, 美国 J.T. Baker 公司)。

1.3 主要仪器设备

VortexGenie2T 型旋涡混合器(美国 Scientific Industries 公司); Millipore Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相色谱-Xevo TQ-S 三重四极杆质谱联用仪、BEH Amide 色谱柱(100 mm \times 3.0 mm, 1.7 μm)、Oasis HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL)(美国 Waters 公司); 3-16PK 高速离心机(德国 Sigma 公司); MS304S 万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 标准溶液的配制

分别将 12 种海洋神经毒素的标准物质用乙酸溶液(0.01 mol/L)稀释并定容到不同的容量瓶中, 配制成一定浓

度的标准储备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存。随后根据实验要求, 将标准储备液分别稀释至所需浓度, 配制得标准工作液。

1.4.2 样品前处理

参考 GB 5009.213—2016《食品安全国家标准 贝类中麻痹性贝类毒素的测定》, 在此基础上, 称 2 g 样品于 15 mL 离心管中, 加入 8 mL 1%乙酸提取液, 振荡提取 15 min, 以 8000 r/min 的速度离心 5 min。随后取 2 mL 上清液加入 4 mL 三氯甲烷除脂, 振荡 5 min 充分混匀, 接着以 8000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上清液过柱。净化过程: 依次加入 6 mL 甲醇、6 mL 水、6 mL 1%乙酸对 HLB 固相萃取柱进行活化, 然后取 1 mL 上清液上样, 1 mL 1%乙酸淋洗。收集上清样流出液与淋洗液, 随后加入 1 mL 乙腈, 经过离心、过膜后上机检测(样品稀释 12 倍)。

1.4.3 仪器条件

液相色谱参考条件: 流动相(A: 0.2%甲酸 5 mmol/L 甲酸铵水溶液; B: 0.2%甲酸 5 mmol/L 甲酸铵 95%乙腈溶液); 色谱柱: BEH Amide (100 mm \times 3.0 mm, 1.7 μm); 梯度见表 1。

质谱参数: 离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI+); 毛细管电压: 3.0 kV; 锥孔电压: 30 V; 脱溶剂气流速: 900 L/hr; 脱溶剂气温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 锥孔气流速: 150 L/hr; 碰撞气流速: 0.15 mL/min; 多反应监测模式, 各化合物母离子、子离子、碰撞能等参数如表 2 所示。

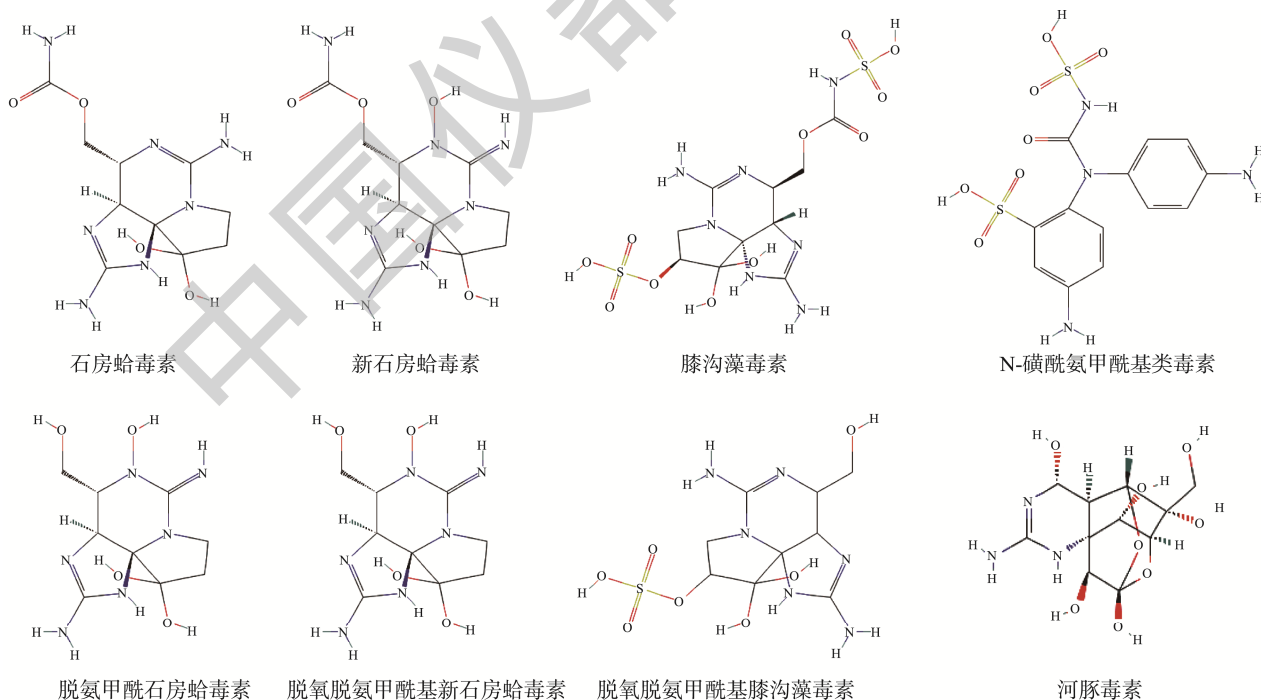


图 1 海洋神经毒素结构式图

Fig.1 Structural diagram of marine neurotoxin

表 1 液相色谱参数
Table 1 Liquid chromatography parameters

时间/min	流速/(mL/min)	A	B
0	0.4	15	85
1.5	0.4	15	85
8.0	0.4	50	50
9.5	0.4	50	50
11.0	0.4	15	85

表 2 海洋性神经毒素母离子、子离子、碰撞电压和碰撞能信息
Table 2 Information on parent ions, daughter ions, collision voltage and collision energy of marine neurotoxins

化合物	母离子	子离子	碰撞电压/eV	碰撞能/eV
TTX	320	162/302*	20	36/22
dcGTX 2/3	353.1	255.1/273.1*	25	15/10
GTX5	380.1	282.2/300.1*	20	20/15
C1、C2	396.1	298.1/316.2*	25	20/15
GTX-1、GTX-4	412.2	314.1/332.1*	25	20/15
dcSTX	257.1	126/239.1*	50	15/15
dcNEO	273.1	126/255.1*	40	15/15
STX	300.1	204.1/221.1*	30	25/20
NEO	316.1	220.1/298.1*	45	20/15

注: *为定量离子。

1.4.4 定性定量方法

本研究采用外标法进行定量测定, 计算公式如式(1):

$$X = C \times \frac{V}{m} \times \frac{1}{R_c} \times \frac{1000}{1000} \quad (1)$$

X: 样品中各海洋毒素的含量, 单位为 $\mu\text{g}/\text{kg}$; C: 从标准工作曲线得到的各毒素的质量浓度, 单位为 ng/mL ; V: 样品定容体积, 单位为 mL ; m: 样品的质量, 单位为 g ; R_c : 回收率, 单位为%。

1.4.5 回收率、检出限和定量限

选用不含海洋毒素的空白试样, 以基质加标方式确定方法的检出限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantitation, LOQ)、回收率。以对应 10 倍信噪比的空白基质加标量作为方法定量限, 以对应 3 倍信噪比的空白基质加标量作为方法检出限。在空白基质中各添加 3 个不同浓度水平的标准溶液, 按照 1.4.2 节前处理方法进行提取和净化, 每个水平做 3 个平行实验, 外标法定量。

分析方法的准确度采用加标回收率来计算, 公式如式(2)。

$$\text{回收率}/\% = \frac{\text{测定值} - \text{空白值}}{\text{添加量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4.6 实际样品测定

对南海海域采集的 48 种海鱼样本(共 118 份), 经 1.4.2 前处理过程, 对水溶性海洋神经毒素污染水平进行检测。

2 结果与分析

2.1 方法线性、检出限和定量限

以各目标化合物的浓度为横坐标, 响应值的峰面积为纵坐标建立标准曲线。相应的线性方程、相关系数(R^2)和 LOD 见表 3。结果表明, 12 种分析物在相应的质量浓度范围内线性 R^2 均在 0.9990 及以上, 线性良好, 满足定量分析的需要。

表 3 海洋神经毒素的线性关系、LOD 与 LOQ
Table 3 Linear relationship, LOD and LOQ of marine neurotoxins

分析物	线性方程	线性范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
GTX-1	$Y=71.725X+1088.8$	1.2~18.5	0.9997	30	100
GTX-4	$Y=195.47X-534.55$	3.7~58.8	0.9991	30	100
C1	$Y=761.08X+330.32$	8.4~134.8	0.9998	10	30
C2	$Y=316.57X+25.083$	2.5~40.3	0.9996	10	30
GTX-5	$Y=536.9X-528.71$	3.3~52.8	0.9994	10	30
dcGTX 2	$Y=36.286X+65.405$	5.5~88.3	0.9991	30	100
dcGTX 3	$Y=771.52X+804.26$	1.6~26.0	0.9997	10	30
TTX	$Y=690.74X+274.75$	3.1~50.0	0.9996	10	30
NEO	$Y=153.08X-193.64$	3.1~50.0	0.9991	20	50
STX	$Y=3727X-2337.2$	3.1~50.0	0.9991	20	50
dcNEO	$Y=436.61X-283.49$	3.1~50.0	0.9990	20	50
dcSTX	$Y=6231.5X-8115.5$	3.1~50.0	0.9991	20	50

2.2 样品回收率

本研究选用不含海洋毒素的空白样品做添加回收实验, 以建立的标准曲线计算样品的测得浓度, 求得各加标样品的回收率。结果表明, 该方法对上述海洋神经毒素具有良好的回收率、准确度和精密度, 如图 2 所示, 平均回收率在 78%~122%之间, 能够满足实际样品的测定需求。

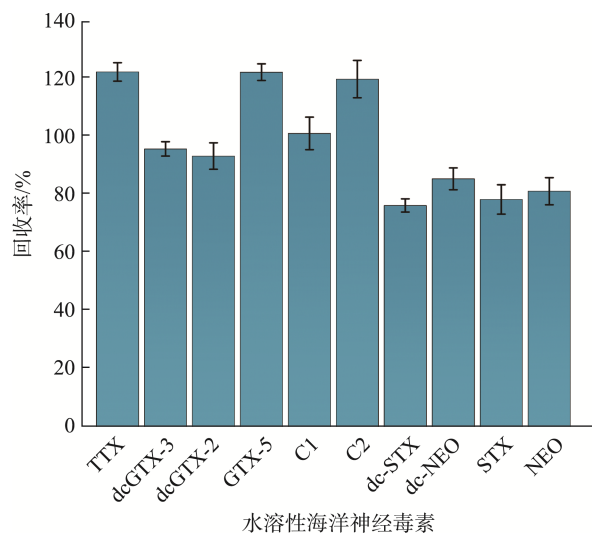


图 2 水溶性海洋神经毒素检测回收率
Fig.2 Recovery rates of water soluble marine neurotoxin

2.3 水溶性海洋神经毒素的实际样品多组分检测

针对典型的海洋神经毒素,本研究建立了多毒素同时检测的 UPLC-MS/MS 痕量精准检测技术,水溶性海洋神经毒素标准色谱图如图 3 所示。GTX-1 的保留时间为 6.15 min, GTX-4 的保留时间为 6.49 min, C1 和 C2 的保留时间分别为 6.37 和 6.77 min, dcGTX 2 的保留时间为 6.22 min, dcGTX 3 的保留时间为 6.57 min, 结果表明,该方法的液相色谱条件可以较好地实现对应异构体的分离。

以本研究方法检测我国沿海地区采集的海产品,以阳性样品马鲛鱼为例,水溶性海洋神经毒素(GTX-1、NEO、TTX、dc-STX、C1、STX、dc-NEO)的提取离子色谱图如图 4 所示,该结果验证了本方法的实用性。

2.4 南海海域海鱼样品污染水平

本项目除了对南海海域取样外,也对黄渤海海域采集

的 37 种(共 37 份)样本进行了水溶性海洋神经毒素的检测,结果均未检出。可能部分由于海鱼种类的差异,同时黄渤海海域与南海海域相比水温较低,不利于海洋神经毒素的产生以及随食物链在海鱼体内的富集^[25]。有研究发现,在温度、盐度、光照及营养等适宜的条件下,贝类体内毒素之间会发生化学转化或酶促转化,贝类摄食有毒藻后部分 C 毒素在体内可转化成 GTX 毒素,因此贝类体内毒素种类的差异性可能与其内在转化有关^[26]。我国近岸水体中的太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*)和链状亚历山大藻(*A. catenella*)含有较高比例的 C 毒素, GTX-1、GTX-4 和 GTX-2, GTX-3 比例也较高,微小亚历山大藻(*A. minutum*)通常只含有 GTX-1、GTX-4 和 GTX-2、GTX-3, C1、C 2 和 STX 毒素是极少见的^[27]。

因此以南海海域为主,本研究对南海海域采集的 48 种海鱼样本(共 118 份),进行水溶性海洋神经毒素检测,结果如表 4 所示。

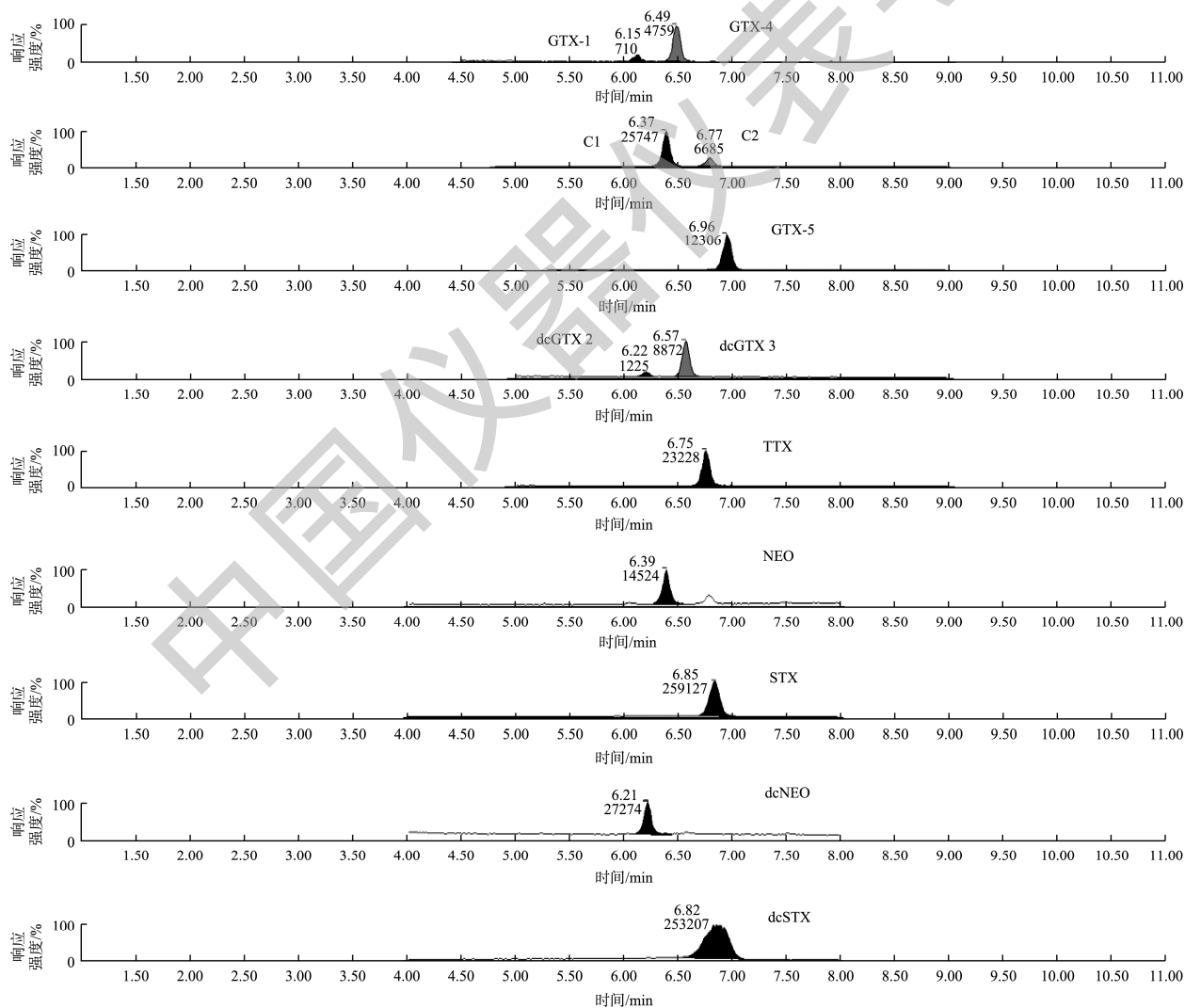


图 3 水溶性海洋神经毒素标准色谱图

Fig.3 Standard chromatogram of water soluble marine neurotoxins

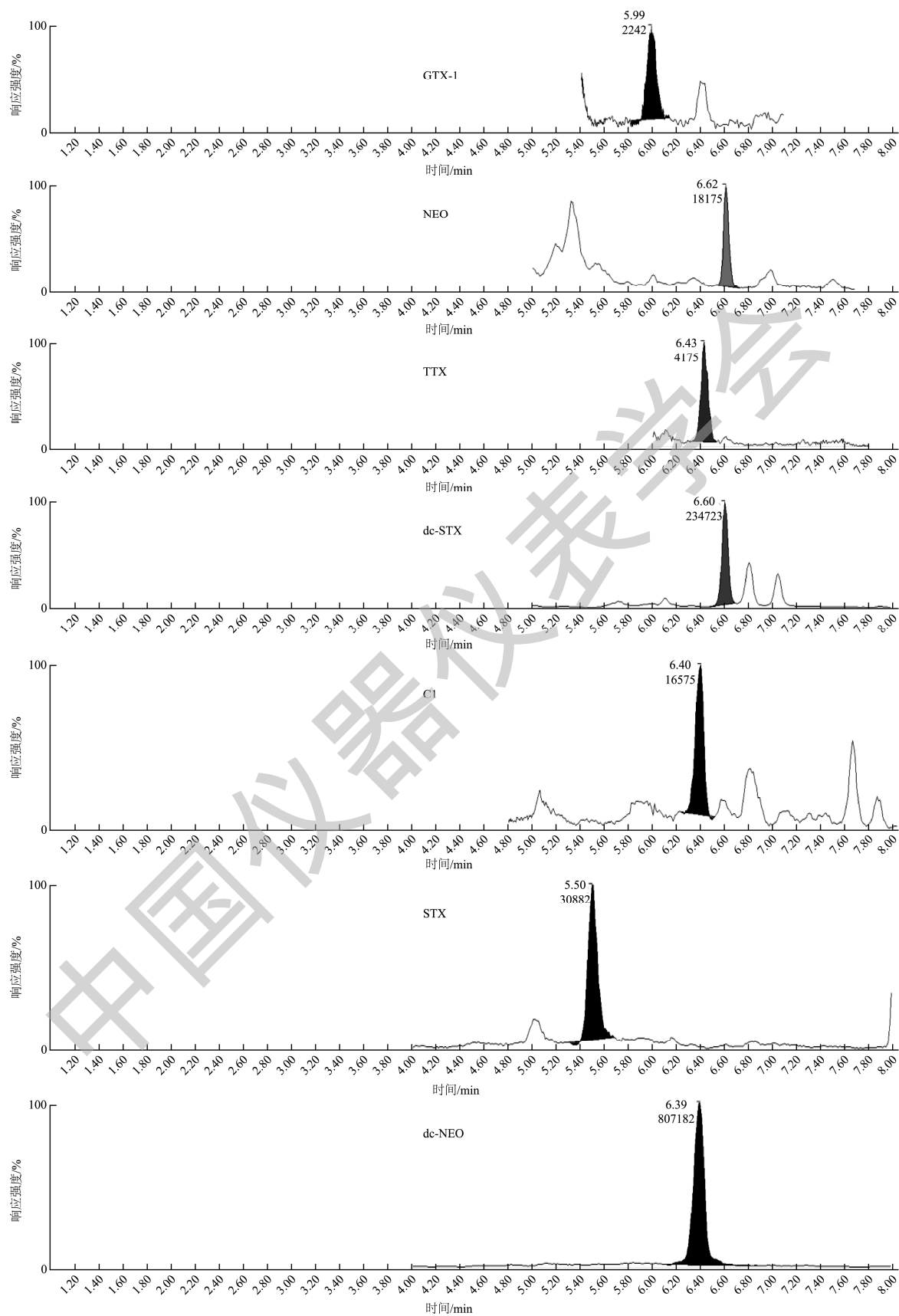


图 4 代表性阳性样品中水溶性海洋神经毒素提取离子色谱图

Fig.4 Ion chromatography of extraction of water soluble marine neurotoxin from a positive sample

其中 7 种水溶性神经毒素有检出, 包括 TTX、GTX-1、GTX-4、dc-STX、dc-NEO、STX、NEO, 其他毒素未检出。从样品种类分析, 48 种海鱼样本中, 有 13 种样本有检出, 分别为鳕鱼、豆腐鱼、流潺鱼、骨鱼、大眼鸡鱼、马鲛鱼、龙趸鱼、剥皮鱼、门鳞鱼、铁尾鱼、白鲳鱼、长尾鲳鱼和泥鳅鱼, 其中鳕鱼、骨鱼、马鲛鱼、铁尾鱼、白鲳鱼、长尾鲳鱼的毒素检出率为 100%, 豆腐鱼也在 5 个样本中检出 3 个阳性样本, 检出率为 60%, 龙趸鱼和门鳞鱼均在 2 个样本中检出 1 个, 检出率为 50%, 随后是流潺鱼和泥鳅鱼, 检出率分别为 33.3% 和 25%。大眼鸡鱼、马鲛鱼、铁尾鱼、白鲳鱼、长尾鲳鱼虽然只有一个样本, 但其中也检出主要的海洋神经毒素(ds-STX、TTX、GTX-1、STX), 马鲛鱼样本中含毒素种类较多, 检出 6 种神经毒素(TTX、GTX-1、GTX-4、dsSTX、dcNEO、NEO)。鳕鱼中的 dcSTX 毒素含量最高, 高达 832.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。GTX-1 在长尾鲳鱼中的含量次之, 为 332.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。对于检出浓度高, 超出标准曲线内的阳性样本, 在样本检测时稀释, 使其处于标曲范围内。NEO 对多种海鱼样本污染影响程度较小, dc-NEO 分别在鳕鱼、豆腐鱼、马鲛鱼、泥鳅鱼中均有检出阳性样本, STX 在流潺鱼、骨鱼、门鳞鱼、铁尾鱼、白鲳鱼也都有检出。TTX 仅在马鲛鱼样本中有检出, 含量为 68.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在相关的文献研究中, TTX 主要富集在螺类和河豚鱼体内, 在其他动物如蝾螈、虾虎鱼、青蛙、章鱼、螺类、海星、螃蟹等体内也有检出^[28-29], 因此 TTX 在海鱼样本中的检出率较小。这些数据结果可以对南海海域海鱼样品污染水平判断提供一定的基础。

同时, 为进一步判断毒素污染的危害, 根据麻痹性神经毒素毒性因子换算关系(表 5), 以 STX 为基准计算, 鳕鱼样品 STX 类毒素含量最高, 为 424.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其次为长尾鲳鱼(329 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 豆腐鱼(251 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 马鲛鱼(236 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和另一份鳕鱼样本(215 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 其他阳性样本含量均不高于

80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果表明, 不同品种海洋毒素的检出率及含量差异, 可能是由于不同海洋毒素对有毒藻类滤食、吸收、转化以及积累毒素的能力不同, 毒素含量与有毒藻的摄食行为、对有毒藻毒素的吸收和代谢能力等因素有关, 也与海水中有毒藻的种类、毒性、丰度及接触有毒藻的时间长短等有关^[30]。同时, 将本研究结果与欧盟对 STX 类毒素限量标准规定(0.8 mg/kg)相比, 本次采集的样品中均无超标样品。

2.5 海洋神经毒素的平均暴露水平评估

结合我国居民海鱼消费量数据(图 5, 来源于第五次中国总膳食研究^[31]), 可估算我国居民海洋神经毒素的平均暴露水平以及各沿海高消费省份居民的海洋神经毒素暴露水平。由于 TTX 在海鱼中的检出率较低, 基本不会对人体造成健康风险。以本次采集的毒素含量较高的阳性样本 STX (424.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)来估算急性暴露量, 计算得到全国平均值为 0.139 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$, 仅为急性健康指导值的 20%(表 6); 其中宁夏、江西、湖北、四川的平均消费量为 0, 急性暴露量值由低到高省份依次为河南、青海、陕西、内蒙古、广西、湖南、辽宁, 这些省份的平均消费量也低于全国平均值, 但对于高暴露省份福建、上海、浙江来说, 急性暴露量分别达到 0.91 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$ 、0.50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$ 和 0.45 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$, 其中福建占急性健康指导值的 130%, 上海、浙江分别占急性健康指导值的 71% 和 64%, 这些结果表明对于海鱼消费量较高的省份, 若偶然食用污染较为严重的海鱼时, 有可能造成一定的急性健康风险。但即使是急性暴露量最高的省份, 也没有达到有害作用水平。

经全国 20 个省份的海鱼消费量调查, 我国主要消费的海鱼品种为带鱼、鲳鱼、平鱼、小黄鱼、鲷鱼、鲈鱼、鳊鱼、鲳鱼、梅童鱼、金钱鱼, 这些海鱼在此次采样中检出海洋神经毒素含量较低, 因此可以得出, 我国各省分由食用海鱼导致的海洋神经毒素中毒普遍风险非常低。

表 4 南海海域 48 种海鱼样本中海洋神经毒素检出情况($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Table 4 Detection of marine neurotoxins in 48 species of marine fish in the South China Sea ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

样本检出#	鳕鱼/2/2	豆腐鱼/3/5	流潺鱼/1/3	骨鱼/2/2	大眼鸡鱼/1/1	马鲛鱼/1/1	龙趸鱼/1/2	剥皮鱼/1/3	门鳞鱼/1/2	铁尾鱼/1/1	白鲳鱼/1/1	长尾鲳鱼/1/1	泥鳅鱼/1/4
TTX						68.5							
GTX-1		181.2~254.0				145.2						332.4	
GTX-4		67.2				106.1							
ds-STX	86.8~832.8				27.6	29.3	25.4	47.6					
dc-NEO	18.8	10.2				81.7							74.4
STX			15.5	16.0~70.8					44.8	67.8	68.3		
NEO						58.84							

注: #代表性阳性样本/检测总样本。

表 5 麻痹性海洋神经毒素毒性因子
Table 5 Paralytic marine neurotoxin toxic factors

毒素	GTX-1	GTX-4	GTX-2	GTX-3	dcGTX2	dcGTX3	GTX-5	STX	dcSTX
毒性因子	0.99	0.73	0.36	0.64	0.65	0.75	0.06	1	0.51

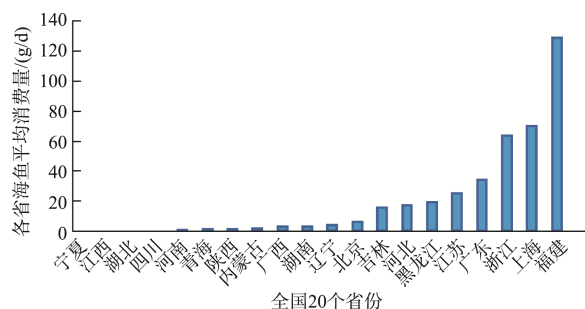


图 5 我国各省居民海鱼平均消费量

Fig.5 Average consumption of marine fish among inhabitants of our country provinces

2.6 海洋神经毒素的限量标准

全球对于海洋神经毒素均有一定的限量标准, 其中

FAO、IOC、WHO 规定 100 g 贝类可食部分的麻痹性贝类毒素限量为 80 μg STX eq/100 g (eq/100 g: 环氧值)^[5]。我国 GB 2733—2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》中规定, 不论海水贝类还是淡水贝类, 其麻痹性贝类毒素限量不应超过 4 MU/g (MU 为毒力单位, 1 MU 是指使 18~22 g 的小白鼠在 15 min 内死亡的毒力), 该值与国际组织规定麻痹性贝类毒素限量标准一致, 我国标准中还规定腹泻性贝类毒素限量不应超过 0.05 MU/g。NY 5073—2006《无公害食品水产品中有毒有害物质限量》则规定, 贝类中麻痹性贝类毒素限量不应超过 400 MU/100 g (相当于 80 μg /100 g), 腹泻性贝类毒素不得检出。同时, 将本研究结果与各国对 STX 类毒素限量标准规定(0.8 mg/kg)相比(表 6^[5]), 本次采集的样品中均无超标样品。

表 6 海洋毒素国际健康指导值及管理规定

Table 6 International health guideline values and management regulations of marine toxins

毒素分组	最小可见损害作用水平 (1)无可见有害作用水平 (2)/[$\mu\text{g}/(\text{kg body weight})$]	安全系数[人体数据 (H)]	临时急性毒性 参考计量	根据 100 g (1), 250 g (2)和 380 g (3)的消耗量推导出 的指导水平/最大水平	欧盟立法中实施的 限量值
AZA	0.4 (1)	10 (H)	0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2.4 $\mu\text{g}/\text{成人}^{\text{a)}$	0.024 mg/kg SM (1) 0.0096 mg/kg SM (2) 0.0063 mg/kg SM (3)	0.16 mg/kg SM
BTX			N/A		
Cyclic Imines	1000 (1)		N/A		
DA	1 (1)	10 (H)	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 6 mg/成人 ^{a)}	60 mg/kg SM (1) 24 mg/kg SM (2) 16 mg/kg SM (3)	20 mg/kg SM
OA		3 (H)	0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 20 $\mu\text{g}/\text{成人}^{\text{a)}$	0.2 mg/kg SM (1) 0.08 mg/kg SM (2) 0.05 mg/kg SM (3)	0.16 mg/kg SM
PTX			N/A		0.16 mg OA eq/kg SM
STX	2 (1)	3 (H)	0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 42 $\mu\text{g}/\text{成人}$	0.42 mg/kg SM (1) 0.17 mg/kg SM (2) 0.11 mg/kg SM (3)	0.8 mg/kg SM

注: a): 以 60 kg 的成人重量计算; N/A: not applicable, 不适用。

3 结论

本研究采用乙酸溶液提取, 三氯甲烷除脂, HLB 固相萃取柱富集净化, 针对海产品中重要的水溶性海洋神经毒素建立了 UPLC-MS/MS 检测方法, 该方法具有良好的检出限与回收率, 线性良好, 适用于海产品中海洋毒素的痕量精准检测。同时, 本研究提示了我国南海区域海洋神经毒素主要污染的海鱼品种(鲷鱼、豆腐鱼、流潺鱼、骨鱼、大眼鸡鱼、马鲛鱼、龙复鱼、剥皮鱼、门鲚鱼、铁尾鱼、白鲳鱼、长尾鲳鱼、泥鳅鱼)及污染水平情况, 毒素含量最高的为鲷鱼中的 dcSTX, 高达 832.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dc-NEO 分别在鲷鱼、豆腐鱼、马鲛鱼、泥鳅鱼中均有检出阳性样本, STX 在流潺鱼、骨鱼、门鲚鱼、铁尾鱼、白鲳鱼也都有检出。同时, 评估我国居民海洋神经毒素的平

均暴露水平以及各沿海高消费省份居民的海洋神经毒素急性暴露水平, 全国平均水平以及各省份平均暴露水平均在安全范围内, 福建、上海、浙江为海鱼高消费省份, 食用高污染的海鱼样品可能造成福建的毒素急性暴露量达到健康指导值的 130%, 提示了潜在的急性暴露风险。同时, 黄渤海海域的海鱼样品均未检出海洋神经毒素, 暴露评估结果显示黄渤海地区海鱼不会引起健康风险。这些数据结果可以对南海海域海鱼样品污染水平判断提供一定的基础, 为海洋神经毒素污染监测提出了关注重点, 并提醒当地居民在食用高污染种类的海鱼时应提高警惕。同时, 未来也可以对于不同海域中新兴的海洋毒素开展毒性评价、检测技术研发和污染水平的调查, 以实现更加全面的风险评估^[32], 为我国海洋中的新兴毒素提供防控支持和依据。

参考文献

- [1] ESTEVEZ P, GAGO-MARTINEZ A. Contribution of mass spectrometry to the advances in risk characterization of marine biotoxins: Towards the characterization of metabolites implied in human intoxications [J]. *Toxins*, 2023, 15(2): 103.
- [2] WANG Q, YANG QL, WU W, *et al.* Ensuring seafood safe to spoon: A brief review of biosensors for marine biotoxin monitoring [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2022, 62(9): 2495–2507.
- [3] 陈巧莉, 杨兵, 洪晴悦, 等. 海洋生物毒素的分类、毒害作用机制及检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(5): 321–331.
- CHEN QL, YANG B, HONG QY, *et al.* Research progress on classification, toxic action mechanism and detection technology of marine biotoxins [J]. *Food Sci*, 2021, 42(5): 321–331.
- [4] XU W, NIU J, GAN WY, *et al.* Identification of paralytic shellfish toxin-producing microalgae using machine learning and deep learning methods [J]. *J Oceanol Limnol*, 2022, 40(6): 2202–2217.
- [5] TOYOFUKU H. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report) [J]. *Mar Pollut Bull*, 2006, 52(12): 1735–1745.
- [6] OCHI N. Simultaneous determination of ten paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin in scallop and short-necked clam by ion-pair solid-phase extraction and hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1651: 462328.
- [7] SIBAT M, RÉVEILLON D, ANTOINE C, *et al.* Molecular networking as a novel approach to unravel toxin diversity of four strains of the dominant *Dinophysis* species from French coastal waters [J]. *Harmful Algae*, 2021, 103: 102026.
- [8] MELNIKOVA DI, MAGARLAMOV TY. An overview of the anatomical distribution of tetrodotoxin in animals [J]. *Toxins*, 2022, 14(8): 576.
- [9] CHEN P, WANG J, ZHANG S, *et al.* Total syntheses of tetrodotoxin and 9-epi tetrodotoxin [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 679.
- [10] QIAO K, WANG C, HUANG L, *et al.* Molecular characterization of a new tetrodotoxin-binding protein, Peroxiredoxin-1, from *Takifugu bimaculatus* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3071.
- [11] SUEHIRO M. Historical review on chemical and medical studies of globefish toxin before World War II [J]. *Yakushigaku Zasshi*, 1994, 29(3): 428–434.
- [12] GOUEL P, GATTI CMI, DE HARO L, *et al.* Tetrodotoxin poisoning in mainland France and French Overseas territories: A review of published and unpublished cases [J]. *Toxins*, 2022, 14(5): 351.
- [13] KATIKOU P, GOKBULUT C, KOSKER AR, *et al.* An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(1): 47.
- [14] ALBERGHINI L, TRUANT A, SANTONICOLA S, *et al.* Microplastics in fish and fishery products and risks for human health: A review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 20(1): 789.
- [15] KIM DY, JEON H, SHIN HS. Risk assessment and determination of arsenic and heavy metals in fishery products in Korea [J]. *Foods*, 2023, 12(20): 3750.
- [16] SUN X, XIANG YT, LIU M, *et al.* High-performance and-efficiency cardiomyocyte-based potential biosensor for temporal-specific detection of ion channel marine toxins [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 220: 114837.
- [17] ZHANG Y, ZOU S, YIN S, *et al.* Source, ecological function, toxicity and resistance of tetrodotoxin (TTX) in TTX-bearing organisms: A comprehensive review [J]. *Toxin Rev*, 2023, 42(4): 727–740.
- [18] SIBAT M, MAI T, TANNIOU S, *et al.* Seasonal single-site sampling reveals large diversity of marine algal toxins in coastal waters and shellfish of New Caledonia (Southwestern Pacific) [J]. *Toxins*, 2023, 15(11): 642.
- [19] GUILLOTIN S, DELCOURT N. marine neurotoxins' effects on environmental and human health: An omics overview [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(1): 18.
- [20] MALLOGGI C, RIZZO B, GIUSTI A, *et al.* First toxicological analysis of the pufferfish spheroides *pachygaster* collected in Italian waters (Strait of Sicily): Role of citizens science in monitoring toxic marine species [J]. *Animals*, 2023, 13(11): 1873.
- [21] WANG J, LI R, LIU B, *et al.* Occurrence and distribution of lipophilic marine algal toxins in the coastal seawater of Southeast China and the South China Sea [J]. *Mar Pollut Bull*, 2023, 187: 114584.
- [22] THI YVN, VU TD, NGO AD, *et al.* Residual toxins on aquatic animals in the Pacific areas: Current findings and potential health effects [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 906: 167390.
- [23] CHEN J, YANG J, HE X, *et al.* Prevalence of the neurotoxin domoic acid in the aquatic environments of the Bohai and Northern Yellow seas in China [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 876: 162732.
- [24] BIAN Y, ZHANG Y, FENG X, *et al.* Marine toxins in seafood: Recent updates on sample pretreatment and determination techniques [J]. *Food Chem*, 2023, 438: 137995.
- [25] LAWRENCE J, LOREAL H, TOYOFUKU H, *et al.* Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs [J]. *FAO Fish Aquacul Techn Paper*, 2011, 129: 551.
- [26] LEE HG, KIM HM, MIN J, *et al.* Quantification of the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Alexandrium* species using a digital PCR [J]. *Harmful Algae*, 2020, 92: 101726.
- [27] LIU M, KROCK B, YU R, *et al.* Co-occurrence of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) ribotypes from the Chinese and Malaysian coastal waters and their toxin production [J]. *Harmful Algae*, 2022, 115: 102238.
- [28] ZHANG Y, YAMATE Y, TAKEGAKI T, *et al.* Tetrodotoxin profiles in xanthid crab *Atergatis floridus* and blue-lined octopus *Hapalochlaena cf. fasciata* from the Same Site in Nagasaki, Japan [J]. *Toxins*, 2023, 15(3): 193.
- [29] HONG HK, SHIN JS, PARK BK, *et al.* Detection of tetrodotoxin (TTX) and its analogues in mud snails *Nassarius livescens* from jeju coast using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *Fish Sci*, 2023, 89(6): 863–873.
- [30] 郑旭颖, 李兆新, 孙晓杰, 等. 渤海海域唐山贝类养殖区腹泻性和麻痹性贝类毒素的监测与风险评估[J]. *渔业科学进展*, 2023, 44(5): 231–241.
- ZHENG XY, LI ZX, SUN XJ, *et al.* Surveillance and risk assessment of diarrheal and paralytic shellfish toxins in Tangshan shellfish culture area, Bohai Sea [J]. *Progress Fish Sci*, 2023, 44(5): 231–241.
- [31] 吴永宁, 赵云峰, 李敬光. 第五次中国总膳食研究[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
- WU YN, ZHAO YF, LI JG. The fifth Chinese total diet study [M]. Beijing: Science Press, 2018.
- [32] 申慧婧, 张弛, 周爽, 等. 食品中新兴真菌毒素检测技术及其污染现状研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(12): 203–213.
- SHEN HJ, ZHANG C, ZHOU S, *et al.* Research progress of emerging mycotoxin detection technology and its contamination status in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(12): 203–213.

(责任编辑: 张晓寒 蔡世佳)

作者简介



申慧婧, 博士研究生, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: huijings001@163.com



吴永宁, 研究员, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: wuyongning@cfsa.net.cn