

Forekomst av pinnatoksiner i norske skjell

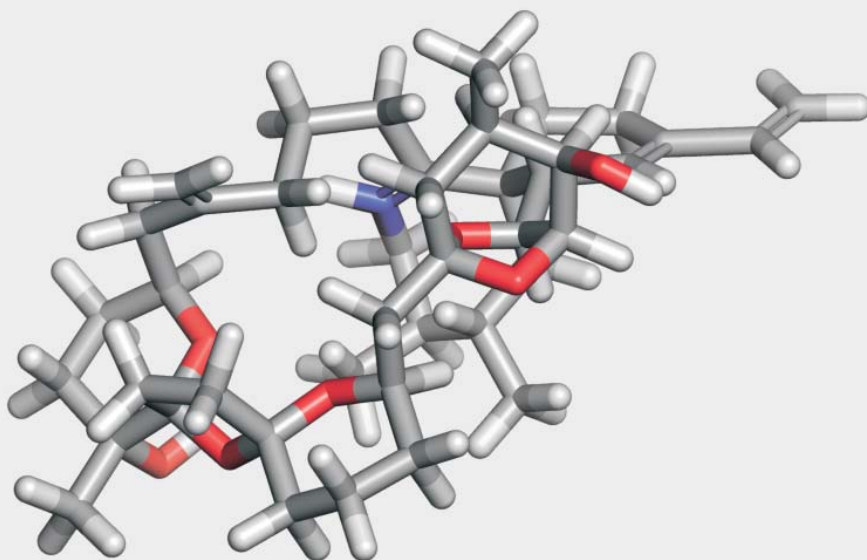
Christopher O. Miles

Thomas Rundberget

Morten Sandvik

John A. B. Aasen

Andrew I. Selwood





Veterinærinstituttets rapportserie · 07 - 2010

Tittel

Forekomst av pinnatoksiner i norske skjell

Publisert av

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

Form omslag: Graf AS

Forsidefoto: Colourbox

Bestilling

kommunikasjon@vetinst.no

Faks: + 47 23 21 60 01

Tel: + 47 23 21 63 66

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

Forslag til sitering:

Miles CO, Rundberget T, Sandvik M, Aasen JAB, Selwood AI.
Pinnatoksiner i norske skjell. Veterinærinstituttets rapport-
serie 07-2010. Oslo: Veterinærinstituttet; 2010.

© Veterinærinstituttet

Kopiering tillatt når Veterinærinstituttet gjengis som kilde



Veterinærinstituttets rapportserie

National Veterinary Institute's Report Series

Rapport 07 · 2010

Forekomst av pinnatoksiner i norske skjell

Forfattere

Christopher O. Miles

Thomas Rundberget

Morten Sandvik

John A. B. Aasen (Norges veterinærhøgskole, Oslo)

Andrew I. Selwood (Cawthron Institute, Nelson, New Zealand)

8. april 2010

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

1. Sammendrag

Naturlig forekommende algegifter kan gi risiko for forgiftning hos mennesker når de akkumuleres i skjell som skal til konsum. Nå har Veterinærinstituttet identifisert en hittil ukjent algegift i norske farvann som kan utgjøre et potensielt problem.

Pinnatoksiner og pteriatoksiner er giftstoffer som først ble identifisert av japanske forskere i 1995, etter en forgiftningsepisode i Kina i 1990. Det er likevel usikkert om disse giftstoffene var årsak til denne episoden, og giftvirkning på mennesker er ikke kjent. Strukturelt ligner giftene på de mer kjente spirolidene, som produseres av blant annet dinoflagellaten *Alexandrium ostenfeldii*, og som hyppig påvises i norske farvann.

Veterinærinstituttet har etablert en sensitiv analysemetode for bestemmelse av pinnatoksiner og spirolider. Etter kjemiske analyser av skjell- og algeekstrakter er gifttypen pinnatoksin funnet i skjell og algeprøver langs hele norskekysten. Dette er første gangen pinnatoksiner har blitt påvist i Europa. Pinnatoksinene gir høy dødelighet ved lave doser, ikke bare ved intraperitoneal (i.p.) injisering, men også når musene spiser giftstoffet.

Algen som produserer pinnatoksin G er fremdeles ukjent, mens forskere på New Zealand har klart å dyrke en ny type dinoflagellat som produserer pinnatoksin F. Det fins ikke noe kunnskap om metabolisme og avgiftning av pinnatoksiner i ulike skjellarter i Norge, og det er også viktig å etablere kunnskap om virkningsmekanismer, hvor farlige pinnatoksiner er i sjømat og om mulige grenseverdier.

2. Forekomst av pinnatoksiner i norske skjell: bakgrunn og foreløpige resultater

I forbindelse med en forgiftningsepisode i Kina i 1990 hvor skjellkonsumenter ble forgiftet etter inntak av skjellarten *Pinna attenuata*, rapporterte kinesiske forskere om tilstedeværelse av en uidentifisert giftig forbindelse som mulig årsak (1).

Mellom 1995 og 2001 identifiserte japanske forskere en rekke pinnatoksiner og pteriatoksiner fra japanske *Pinna* og *Pteria* arter (2-5) og disse toksinene er medlemmer av den såkalt syklisk-imin gruppen (som nå inkluderer gymnodiminer, spirolider, pinnatoksiner, pteriatoksiner, prorocentriminer og spiro-procentrolider) av hurtigvirkende toksiner (6). Disse pinnatoksinene og pteriatoksinene ble antatt å være metabolitter av forbindelser biosyntetisert i dinoflagellater (5).

Pinna- og *pteria*-toksiner er meget giftige i musetesten, men de har ikke vært testet oralt og, så vidt vi vet, er det ikke noe direkte bevis for at disse toksinene var ansvarlige for den opprinnelige matforgiftningen i Kina. Pinnatoksiner er strukturelt beslektet med de bedre kjente spirolidene (Figur 1), som produseres av blant annet dinoflagellaten *Alexandrium ostenfeldii* (7) og som hyppig påvises i norske farvann (8).

Veterinærinstituttet har i samarbeid med forskere på New Zealand og Universitetet i Oslo bestemt strukturen av 4 nye pinnatoksiner ((9) samt upublisert informasjon) som er isolert fra flere ulike arter av australske og newzealandske skjell etter at disse hadde forårsaket toksisk respons i musetesten.

Hvilke algearter som produserte toksinene var på det tidspunkt ikke kjent, men våre kollegaer på New Zealand har nå dyrket en kultur av en ny dinoflagellat som produserer en av de to gruppene pinnatoksiner (pinnatoksin F) (10). Arten som produserer pinnatoksin G er ikke kjent. Pinnatoksin G omdannes sannsynligvis i skjell til pinnatoksin A-C og pteriatoksin A-C, mens pinnatoksin F sannsynligvis omdannes til pinnatoksin D og E (9).



Pinnatoksiner						Spirolider					
	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		<i>m/z</i> [M+H] ⁺	R ₁	R ₂	R ₂	
Pinnatoksin G	694		OH	H	H	Spirolide C	706		OH	CH ₃	CH ₃ Δ ^{2,3}
Pinnatoksin A	712		OH	H	H	13-desmetylspirolide C	692		OH	H	CH ₃ Δ ^{2,3}
Pinnatoksiner B, C	741		OH	H	H	Spirolide D	708		OH	CH ₃	CH ₃ -
Pinnatoksin F	766		H	OH	CH ₃	13-desmetylspirolide D	694		OH	H	CH ₃ -
Pinnatoksin E	784		H	OH	CH ₃	Spirolide G	692		H	H	H Δ ^{2,3}
Pinnatoksin D	782		H	OH	CH ₃	20-metylspirolide G	706		H	H	CH ₃ Δ ^{2,3}

Figur 1. Strukturene til de vanligste pinnatoksinene og spirolidene. Pinnatoksin A og G er nylig identifisert i norske farvann og skjell.

Tabell 1. Informasjon om forekomst og toksisitet av pinnatoksiner

Toksin	Antatt kilde	Hvor funnet	Toksisitet (i.p., mus, µg/kg)	
Pinnatoksin A	Pinnatoksin G*	Japan New Zealand Australia Norge	<i>Pinna</i> og <i>Pteria</i> spp. Grønnskjell, østers Østers, <i>Pinna</i> sp., blåskjell, sediment Blåskjell, sjøvann	LD ₉₉ 180 (5) LD ₉₉ 135 (11)
Pinnatoksin B/C	Pinnatoksin G*	Japan	<i>Pinna</i> sp.	LD ₉₉ 22 (3)
Pinnatoksin D	Pinnatoksin F*	Japan Australia New Zealand	<i>Pinna</i> spp. <i>Pinna</i> sp., østers Østers	LD ₉₉ 400 (2)
Pinnatoksin E	Pinnatoksin F*	New Zealand Australia Cookøyene	Østers, grønnskjell, sjøvann, alge Østers, <i>Pinna</i> sp., sjøvann, sediment Sjøvann	LD ₅₀ 45 (9)
Pinnatoksin F	Ny algeart (10)	New Zealand Australia Cookøyene	Østers, alge, grønnskjell Østers, <i>Pinna</i> sp., sjøvann, sediment Sjøvann	LD ₅₀ 16 (9)
Pinnatoksin G	Ukjent alge	New Zealand Australia Norge	Grønnskjell, østers, hjerteskjell Østers, <i>Pinna</i> sp., blåskjell, sjøvann, sediment Sjøvann, blåskjell	LD ₅₀ 50 (9)
Pteriatoksin A	Pinnatoksin G*	Japan	<i>Pteria</i> sp.	LD ₉₉ 100 (4)
Pteriatoksin B/C	Pinnatoksin G*	Japan	<i>Pteria</i> sp.	LD ₉₉ 8 (4)

*via metabolisme eller hydrolyse

Etter at vi har fått standarder av pinnatoksinene A, E, F og G, har vi etablert en sensitiv HPLC-MS/MS metode for bestemmelse av pinnatoksiner.

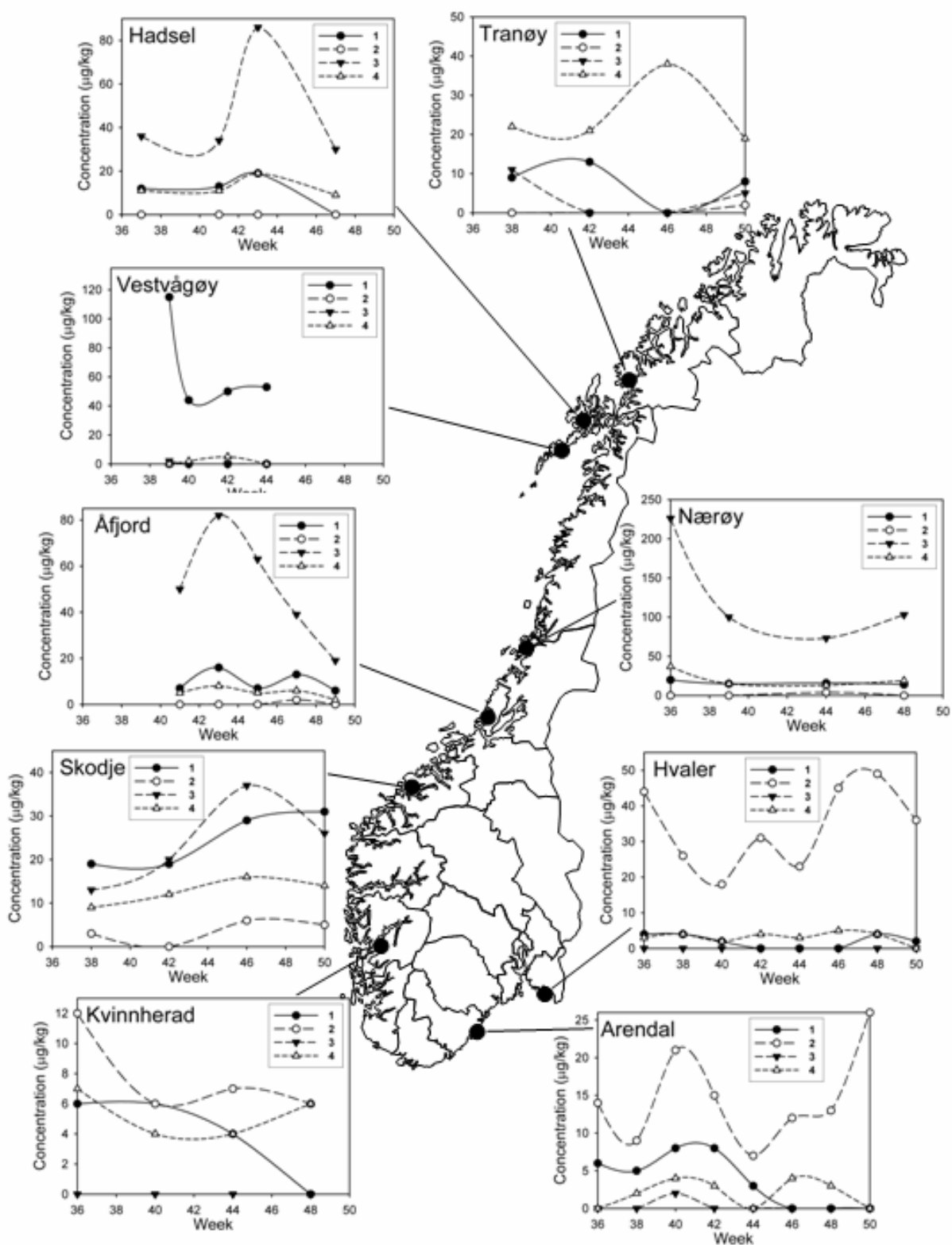
Vi har analysert en rekke skjellekstrakter fra NVH/MT sitt overvåkingsprogram. I tillegg har vi analysert ekstrakter fra passive prøvesamlere (en metode for å måle fettløselige algetoksiner i sjøvann) fra en rekke lokaliteter langs norskekysten (12).

Det viste seg at det var tildels store mengder pinnatoksin G i flere av skjellprøvene (opp til 115 µg/kg) og at pinnatoksin G ble påvist i mesteparten av skjell- og ekstraktene fra prøvesamlerne.

Mindre mengder av pinnatoksin A ble også påvist i blåskjell. Det ble ikke funnet noen tegn på fettsyrestere av pinnatoksiner i norske blåskjell. Den nevnte HPLC-MS/MS metoden ble også benyttet til å undersøke prøvene for en rekke spirolider (Det finnes standard av 13-desmetylspirolide C). Resultatene er vist i **Tabell 2** og **Figur 2**.

Tabell 2. Oppsummering av LC-MS resultater (µg/kg skjellmat) for pinnatoksin G og spirolider fra 166 norske blåskjellprøver i ukene 36-50, 2009.

	Spirolide C	13-desMe-Spirolide C	20-Me-Spirolide G	Pinnatoksin G
% positive	56	22	78	67
Typisk +ve nivå	4-25	20-50	4-20	5-30
Maks nivå	49	226	38	115



Figur 2. Konsentrasjonene av pinnatoksin G (1), spirolide C (2), 13-desmetylspirolide C (3) og 20-metylspirolide G (4) i norske blåskjell fra utvalgte steder i ukene 36-50, 2009.

3. Toksikologi

De fleste av spirolide-toksinene er meget giftige ved intraperitoneal administrering (i.p. mus 10-250 µg/kg). Oral toksisitet er langt lavere (10-100 ganger mindre giftig per os avhengig av toksin og hvordan toksinene er administrert) (13) (Tabell 3). På bakgrunn av dette er det foreslått en "guidance level" på 400 µg/kg for spirolide C, 13-desmethylspirolide C og 20-methylspirolide G (13).

Foreløpig foreligger det ennå ikke publiserte data for oral toksikologi av rene pinnatoksiner eller pteriatoksiner (13), men pinnatoksiner og pteriatoksiner er meget giftige ved i.p. injeksjon til mus (9, 13) (Tabell 1).

I motsetning til spirolidene har pinnatoksiner vist seg å være nesten like toksiske ved oral dosering som ved i.p. Et ekstrakt fra den pinnatoksin-produserende algen fra New Zealand var omtrent 2 ganger mindre giftig per os sammenlignet med i.p., og kun ca 5 ganger mindre giftig ved fôring, enn ved i.p. (10).

Dette tyder på at pinnatoksin-analoger kan være et mer alvorlig problem i sjømat enn andre kjente cycliske iminer (Tabell 3). Omregnet til µg/kg skjellmat vil en se at grensene overstiges i noen perioder slik at en kan forvente at forekomst også detekteres på musetesten. Det er også mulig at forekomst av fettsyre estere av spirolider kan føre til en forsinket effekt i musetesten (14) og være en av årsakene til dødelighet i enkelte musetester vi ikke har kunnet forklare.

Vi har nylig bekreftet at pinnatoksiner binder seg til nikotin reseptorer (upublisert informasjon) som aktiveres via nevrotransmitteren acetylkolin. Nikotin acetylkolin reseptorer er blant annet ansvarlig for overføring av nervesignaler fra motornevroner til muskelfibre.

Toksinene i den sykliske-imin gruppen er ennå ikke vurdert av EFSA.

Tabell 3. Toksisitet (LD₅₀, mus, µg/kg*) av utvalgte spirolider og pinnatoksin F.

Toksin	i.p.	oralt	i fôr
Spirolide C	7 (13)	53 (13)	~ 500 (13)
13-desmethylspirolide C	8 (13)	125 (13)	~ 600 (13)
20-Methylspirolide G	8 (13)	88 (13)	~ 500 (13)
Pinnatoksin F	16 (9)		
Pinnatoksin E + F (1:6) [†]	13 (10)	23 (10)	60 (10)

*µg/kg kroppsvekt av musene

[†]Ekstrakt fra den pinnatoksin-produserende algen, med LD₅₀ verdier beregnet fra innholdet av pinnatoksin i ekstraktet beskrevet i studiet til Rhodes et al. (10).

4. Kunnskapshullene

- Forekomst i Norge (når, hvor, og i hvilke skjellarter)
- Algearten(e) som produserer pinnatoksin G i Norge
- Metabolisme og avgiftning i forskjellige skjellarter i Norge
- Toksikologi (virkningsmekanismer, hvor farlige er pinnatoksiner i sjømat, mulig grenseverdi)

5. Litteratur

1. Zheng, S. Z.; Huang, F. L.; Chen, S. C.; Tan, X. F.; Zuo, J. B.; Peng, J.; Xie, R. W., The isolation and bioactivities of pinnatoxin [in Chinese]. *Chin. J. Mar. Drugs* **1990**, *33*, 33-5.
2. Chou, T.; Haino, T.; Kuramoto, M.; Uemura, D., Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4027-30.
3. Takada, N.; Umemura, N.; Suenaga, K.; Chou, T.; Nagatsu, A.; Haino, T.; Yamada, K.; Uemura, D., Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3491-4.
4. Takada, N.; Umemura, N.; Suenaga, K.; Uemura, D., Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve *Pteria penguin*. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3495-7.
5. Uemura, D.; Chou, T.; Haino, T.; Nagatsu, A.; Fukuzawa, S.; Zheng, S. Z.; Chen, H. S., Pinnatoxin A: a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1155-6.
6. FAO/IOC/WHO Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs (Advance Prepublication Copy); FAO/IOC/WHO (http://www.fao.org/es/ESN/food/risk_biotoxin_en.stm); Oslo, Norway, Sep 26-30, 2004.
7. Cembella, A. D.; Bauder, A. G.; Lewis, N. I.; Quilliam, M. A., Association of the gonyaulacoid dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with spirolide toxins in size-fractionated plankton. *J. Plankton Res.* **2001**, *23*, 1413-19.
8. Aasen, J.; MacKinnon, S. L.; LeBlanc, P.; Walter, J. A.; Hovgaard, P.; Aune, T.; Quilliam, M. A., Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 509-15.
9. Selwood, A. I.; Miles, C. O.; Wilkins, A. L.; van Ginkel, R.; Munday, R.; Rise, F.; McNabb, P., Isolation, structural determination, and acute toxicity of novel pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *submitted*.
10. Rhodes, L.; Smith, K.; Selwood, A.; McNabb, P.; van Ginkel, R.; Holland, P.; Munday, R., Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* **2010**, (in press).
11. McCauley, J. A.; Nagasawa, K.; Lander, P. A.; Mischke, S. G.; Semones, M. A.; Kishi, Y., Total synthesis of pinnatoxin A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7647-8.
12. Rundberget, T.; Gustad, E.; Samdal, I. A.; Sandvik, M.; Miles, C. O., A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers. *Toxicon* **2009**, *53*, 543-50.
13. Munday, R., Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocontrolide, spiro-prorocentrimine, and symbioimines. In *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd ed.; Botana, L. M., Ed. CRC Press: Boca Raton, 2008; pp 581-94.
14. Aasen, J. A. B.; Hardstaff, W.; Aune, T.; Quilliam, M. A., Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1531-7.



Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primæroppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 350 ansatte.

www.vetinst.no

Tromsø

Stakkevollvn. 23 b · 9010 Tromsø
9010 Tromsø
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11
vitr@vetinst.no

Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad
9480 Harstad
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51
vih@vetinst.no

Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80
post.vib@vetinst.no

Sandnes

Kyrkjev. 334 · 4325 Sandnes
Pb 295 · 4303 Sandnes
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41
vis@vetinst.no

Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim
7485 Trondheim
t 73 58 07 27 · f 73 58 07 88
vit@vetinst.no

Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo
Pb 750 Semtrum · 0106 Oslo
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01
post@vetinst.no

