

# 水华和赤潮的毒素及其检测与分析<sup>\*</sup>

许 敏 赵以军<sup>\*\*</sup> 程 凯

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

**提 要** 本文介绍了水华和赤潮藻类各种毒素的类型及特点,对近年来毒素检测分析方法进行了综述,重点介绍微囊藻毒素(Microcystin, MCYST, MC)和麻痹性贝毒(Paralytic shellfish poisoning, PSP)的提取、检测方法。

**关键词** 藻类毒素 水华 赤潮 分析

**分类号** Q949.22

水华和赤潮是指在适宜的化学物理等条件下,水体中的藻类短时间内大量繁殖并聚集的生态异常现象,这一现象若发生于淡水通常称作水华,在海洋则被称为赤潮。引起水华和赤潮的藻类很多,其中相当一部分能产生毒素。藻毒素使各种鱼类、水鸟、家禽及牲畜等中毒甚至死亡,不但破坏生态环境,还对水产养殖业造成重大的经济损失。更严重的是,这些毒素会富集于贝类或鱼类中通过食物链传递,或直接存在于饮用水源及娱乐用水中威胁人类的健康。目前,对水华和赤潮的发生及其毒素危害尚无切实有效的控制方法,根据国内外最新研究结果,就水华与赤潮毒素及其检测分析方法作一综述。

## 1 水华和赤潮藻毒素的类型

### 1.1 水华蓝藻毒素

蓝藻是最常见的水华藻类,在其五十多个属中,至少有20个属的50多种可以产生毒素,其中较为常见,也研究较多的主要有微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、颤藻属(*Oscillatoria*)和束丝藻属(*Aphanizomenon*)等,蓝藻产生的毒素主要分为四种<sup>[1]</sup>:神经毒素(neurotoxins)、肝毒素(hepatotoxins)、非专性毒素(non-specific toxins)和脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)。其中神经毒素和肝毒素危害最大,文献中对这两类毒素报道最多。

1.1.1 肝毒素 肝毒素可由微囊藻、鱼腥藻、节球藻、念珠藻、颤藻等产生,其中最常见的是微囊藻毒素(microcystin, MCYST, MC),通常结构为环(-D-丙氨酸-L-X-赤-β-甲基-D-异天冬氨酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-Mdha)。其中Mdha和Adda是两种特殊氨基酸,Adda与MC的毒性有密切关系<sup>[1]</sup>,X、Y代表两种可变氨基酸,由它们的不同,产生了多种微囊藻毒素异构体,常见的有MC-LR、MC-RR和MC-YR。目前发现的异构体有60多种,LD<sub>50</sub>(半致死量)多在60-70μg/kg鼠体重之间。

\* 国家自然科学基金(批准号:39970064)、教育部优秀青年教师基金(教人司[2001]39号)、武汉市青年科技展元计划(985005072)资助课题。

收稿日期:2001-02-19;收到修改稿日期:2001-08-10。许敏,女,1976年生,硕士研究生。

\*\* 通讯作者,Email: yjzhao@public.wh.hb.cn

1990年, Mackintosh等人发现MC能抑制蛋白磷酸酶PP1和PP2A的活性<sup>[2]</sup>,有极强的促肿瘤作用.因此,即使是低浓度的MC,长期存在于饮用水中,也可能使人患上慢性肝病.它还是至今所知的最烈的致肝癌物.鉴于它的巨大危害,WHO制定了饮用水中MC的控制标准( $1\mu\text{g/L}$ ),目前英美等多个发达国家已采用此标准.

另一种蓝藻肝毒素为节球藻毒素(Nodularin),是最先发现的蓝藻毒素,由泡沫节球藻(*Noctularia spumigena*)产生.它是单环五肽,结构与MC相似,含有Adda<sup>[3]</sup>,也是蛋白磷酸酶PP1和PP2A的烈性抑制剂.节球藻毒素的 $\text{LD}_{50}$ 为 $60\mu\text{g/kg}$ 鼠体重.

除了以上两种,还有一种称为拟筒孢藻毒素或筒孢藻素(Cylindrospermopsin)的毒素,有时也被归为肝毒素.它能以渐近的方式损伤包括肝脏在内的大多数器官,最早是在澳大利亚的热带水华蓝藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)中发现的,后来,又陆续从日本及以色列的其他蓝藻中得到<sup>[4]</sup>.它是带有环状胍基的生物碱类物质,不抑制蛋白磷酸酶PP1、PP2A和PP3,中毒症状也与MC不完全相同.

1.1.2 神经毒素 鱼腥藻、束丝藻、颤藻和束毛藻(*Trichodesmium*)等能产生神经毒素<sup>[1,5]</sup>.已知的神经毒素主要有以下五种:anatoxin-a、homoanatoxin、anatoxin-a(s)、saxitoxin和neosaxitoxin.它们的化学成分是生物碱,因此,作用时间非常快.

anatoxin-a主要由鱼腥藻产生,能阻断后突触胆碱能的传递,使神经肌肉兴奋过度.其 $\text{LD}_{50}$ 是 $200\mu\text{g/kg}$ 鼠体重<sup>[1]</sup>.

homoanatoxin与anatoxin-a是同系物,从一种颤藻(*O. rubescens*)中得到,也是烈性的神经肌肉阻断剂.毒性比anatoxin-a稍低, $\text{LD}_{50}$ 为 $250\mu\text{g/kg}$ 鼠体重.

1978年,Carmichael和Gorham发现了一种致死作用比anatoxin-a强十倍神经毒素,并同时观察到流涎现象,将它命名为anatoxin-a(s)<sup>[1]</sup>.anatoxin-a(s)中毒症状与anatoxin-a相似,但结构完全不同.它为N-羟基谷氨酸甲基磷酸酯,是乙酰胆碱酯酶的烈性抑制剂.

saxitoxin和neosaxitoxin最初在水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*)中发现<sup>[6]</sup>,因而,被称为aphanotoxin I和II.后来证实它们就是已知的海洋甲藻麻痹性贝毒毒素saxitoxin和neosaxitoxin.saxitoxin也在鞘丝藻(*Lyngbya wollei*)、鱼腥藻以及一株颤藻中检测到<sup>[7,8]</sup>.Mahmood和Carmichael用水华束丝藻NH-5的冻融细胞进行生物测试,得到的 $\text{LD}_{50}$ 为 $5\text{mg/kg}$ 鼠体重<sup>[9]</sup>.

## 1.2 赤潮藻毒素

根据Sournia(1995)统计,海洋中能够产生毒素的藻类有60-78种,占海洋微藻总数的1.8%-1.9%,并且这一数目还随着人类认识的不断深入而继续增长<sup>[10]</sup>.产毒的赤潮藻类主要是甲藻(dinoflagellates),另外也有一些硅藻(diatoms).

常见的赤潮藻毒素主要有麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)、腹泻性贝毒(Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)、记忆丧失性贝毒(Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)、神经性贝毒(Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP)及西加鱼毒(Ciguatera Fish Poisoning, CFP).这几种毒素的产毒藻类型、致毒机制和中毒症状见表1.

表 1 几种赤潮藻毒素的比较  
Tab.1 Characteristics of algal toxins of red tides

毒素名称	产毒赤潮藻	作用机制	轻微症状	极端症状
PSP (麻痹性贝毒)	<i>Alexandrium acatenella</i> , <i>A. catenella</i> , <i>A. cf. Cohorticola</i> , <i>A. fundyense</i> , <i>A. lusitanicum</i> , <i>A. minutum</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> 等	作用于 Na <sup>+</sup> 通道位点 1, 阻断神经及 肌肉细胞 Na <sup>+</sup> 内流	在 30 分钟嘴唇感觉 刺痛或麻木,逐渐扩 散到面部和颈部,手 指和脚趾有针刺的 感觉,头晕、恶心、呕 吐、腹泻	肌肉麻痹、呼吸困 难、有窒息感,由呼 吸麻痹引起的死亡 发生于进食后 2-24 小时
DSP (腹泻性贝毒)	<i>Dinophysis acuminata</i> , <i>D. acuta</i> , <i>D. caudate</i> , <i>D. fortii</i> , <i>Prorocentrum</i> <i>hoffmannianum</i> , <i>P. lima</i> , <i>P. maculosum</i> (= <i>P. concavum</i> )等	OA 和 DTX: 抑制蛋白磷 酸酶活性	30 分钟到几个小时 后,表现出腹泻、恶 心、呕吐和腹部疼痛 等症状	慢性接触可能会促 进消化系统肿瘤的 形成
ASP (记忆丧失性贝毒)	<i>Pseudo-nitzschia actydropbila</i> , <i>P. australis</i> , <i>P. multiseriis</i> , <i>P. pseudodelicatissima</i> , <i>P. serrata</i> , <i>Amphora coffaeiformis</i> 等	作用于神经 递质受体(谷 氨酸受体)	3-5 小时后腹泻、 恶心、呕吐、腹部空 挛	对疼痛的反应力降 低、头昏眼花、精神 混乱、短期记忆丧 失、癫痫等
NSP (神经性贝毒)	<i>Gymnodinium breve</i> , <i>G. cf. breve</i> (New Zealand)	作用于 Na <sup>+</sup> 通道位点 5, 诱导 Na <sup>+</sup> 内 流	3-6 小时后感觉寒 冷、头痛、腹泻、肌肉 无力、关节痛、恶心、 呕吐	感觉异常、忽冷忽 热,呼吸困难、产生 幻视、有说话和吞咽 障碍
CFP (西加鱼毒)	<i>Gambierdiscus toxicus</i> <i>Ostreopsis lenticularis</i> , <i>O. samensis</i> 等	CTA;作用于 Na <sup>+</sup> 通道位 点 5,诱导 Na <sup>+</sup> 内流 MTX: 活 化 Ca <sup>2+</sup> 通道	症状发生在吃鱼后 12-24 小时,肠胃 的症状有腹泻、腹部 疼痛、恶心、呕吐	手脚麻木、有刺痛 感、失去平衡、心跳 减慢、血压降低,出 现皮疹。更严重时, 因呼吸衰竭而死

赤潮藻毒素中,麻痹性贝毒(PSP)是目前为止分布最广、危害最大的一类,主要包括石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)及其四氢咪喃衍生物,发现的有近三十种。由分子结构中 R4 基团的不同,可分为四类:①氨基甲酸酯类,包括石房蛤毒素(STX)、新石房蛤毒素(neosaxitoxin, neoSTX)和膝沟藻毒素(gonyautoxins, GTX1-GTX4);②N-磺酰氨基甲酰基类,包括 GTX5(B1)、GTX6(B2)和 C1-C4;③脱氨基甲酰基类,包括 dcSTX、dcneoSTX、dcGTX1-4;④脱氧脱氨基甲酰基类,包括 doSTX、doGTX2 和 doDTX3。现在,石房蛤毒素(STX)已被收入《化学武器公约》中禁止化学品的第二类清单,我国也将 PSP 毒素列为贝类产品的常规检测指标之一。

腹泻性贝毒(DSP)是几类有毒物质的总称,具体包括①聚醚化合物:大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)和鳍藻毒素 1-3(Dinophysistoxin, DTX1-3);②大环聚醚内酯物:pectenotoxin(PTX1-4)和 Prorocentrolide;③聚醚融合物 yssotoxin(YTX)<sup>[11]</sup>。由于腹泻症状仅由 OA 和 DTX 引起,也有人只把它们看作 DSP。OA、DTX1 已被证实是蛋白磷酸酶 PPI 和 PP2A 的烈性抑制剂<sup>[12]</sup>,具有强烈的促肿瘤和致癌作用,而且主要作用于消化道部分。另外,从 *Proroc-*

*centrum lima* 和 *Prorocentrum maculosum* 等甲藻中还提取到一些二元醇酯类物质,它们在体外不抑制蛋白磷酸酶的活性<sup>[13]</sup>,但可水解成为 OA 或 DTX,因此,检测 DSP 毒素时这些二元醇酯类物质也应考虑在内.与 PSP 一样,DSP 也是我国贝类商品出口的必检指标.

产生 ASP 毒素的赤潮藻主要为硅藻.研究表明,这种毒素的活性成分为软骨藻酸(Domoic acid, DA),是一种水溶物,有典型的酸性氨基酸特征,具神经兴奋剂的作用.对于 DA,加拿大规定的安全标准是 $\leq 20\mu\text{g/g}$  贝类组织,这个标准也被其他一些国家采用.

神经性贝毒 NSP 是一类危害范围较小的毒素,它的活性成分为短裸甲藻毒素(brevetoxin, PbTx),是脂溶性的环状聚醚物,有多种衍生物.除了对人的影响,NSP 也导致了大量鱼类死亡事件.

CFP 由热带甲藻产生,通常以鱼为媒介,引起人类中毒.它是大分子聚醚物质,可分为亲脂性的西加鱼毒素(ciguatoxin, CTX)和亲水性的刺尾鱼毒素(maitotoxin, MTX).据报道,0.1ppb 水平的 CTX 就会对人的健康产生不良影响.

## 2 藻毒素的检测与分析

### 2.1 微囊藻毒素

Harada 将微囊藻毒素的检测和分析分为四个层次<sup>[14]</sup>:筛选(Screening)、纯化(Cleanup)、鉴定(Identification)和定量分析(Quantitative analysis).通常运用以下几类方法<sup>[4]</sup>:①生物测试,②组织培养细胞毒性测试,③色谱分析法,如 TLC、GC、HPLC 等,④质谱分析法,如 FABMS、LSIMS 等,⑤酶联免疫法,⑥酶抑制试验.这些方法检测的毒素类型及检测侧重点有所不同,灵敏度差异性大,对仪器及操作技能的要求也各不相同.因此,检测毒素时,要依据样品来源、数量及实验目的,选择适当的方法,也可将多种方法联合运用,相互验证和补充.

2.1.1 生物测试法 生物测试通常采用小白鼠腹腔注射法,得出的半致死剂量(LD<sub>50</sub>),以 mg 干藻/kg 鼠体重为单位.一般 LD<sub>50</sub><50mg/kg 时,为高毒;在 50-500mg/kg,毒性中等;LD<sub>50</sub>>500mg/kg 时,毒性较低;若>1000mg/kg,则可视为无毒.

生物测试法是最早采用的常规方法.它简便直观,但需消耗较多毒素,灵敏度和专一性不高,无法准确定量,也不能辨认 MC 的异构体类型.因此,生物测试通常只作为毒素的最初筛选方法,要想准确地测定毒性,必须在毒素粗提后,利用化学或生化方法进行检测.

#### 2.1.2 化学及生化检测法

(1)微囊藻毒素的粗提 粗提通常利用固相萃取(solid-phase extraction, SPE)的原理,在 C18 硅胶柱(如 Sep-Pak 或 Bond Elut)上完成.

水样中 MC 量少,其他杂质多,需要进行多步纯化.1994 年, Tsuji 等人的方法<sup>[15]</sup>较为简单,精度也可达到 0.02ppb 级,现在常被采用.它主要包括两次硅胶柱纯化过程,并用含 0.1% 三氟乙酸(TFA)的 90% 甲醇溶液将毒素洗脱. Lawton 的研究<sup>[16]</sup>也证实,在甲醇溶液中加入 0.1% 的 TFA 后减少了粗提物中的杂质成分,也有利于微囊藻毒素的洗脱.

对于冻干的藻样中加入水和 20% 甲醇、5% 丁醇抽提,再过 C18 硅胶快速制备柱纯化.此过程可重复进行一至两次.另外,也有用 5% 的醋酸溶液抽提毒素的方法,其余的步骤相同<sup>[14]</sup>.

最近, Metcalf 等人采用微波炉和沸水水浴抽提法,放弃了甲醇等有机溶剂的使用,从藻细

胞中成功地提取出微囊藻毒素<sup>[17]</sup>.但这种方法还有待于进一步地发展和完善.

(2)高效液相色谱检测及提纯 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)是检测微囊藻毒素常用的手段,它准确灵敏,检测下限低,可达 ng/L 级,结果的重现性好.而且,定量检测的同时,还可分析出不同的微囊藻毒素异构体,分离和制备毒素.但 HPLC 法检测时必须依赖标准毒素样品.此外,用这种方法检测毒素耗费时间较长,实验成本高.

HPLC 法则检测微囊藻毒素时,通常使用反相 C18 柱,流动相选用甲醇和 0.05M 磷酸缓冲液的混合液(V/V=60:40).也有方法以乙腈和 0.02M 醋酸胺的混合液(V/V=26:74)作为流动相,但实验证明,此时 MC-YR 不易被检测出.另外,检测器的不同也会影响到灵敏度.

(3)酶联免疫吸附法(ELISA)<sup>[18,19]</sup> ELISA 法是一种固相测定法,它利用抗原、抗体和酶标二抗之间的特异性反应进行.水样一般直接用于 ELISA 测定,冷冻干燥的藻粉需用 PBS 稀释.

ELISA 法灵敏度极高,检测限低,定量检测水中总毒素,最低可至 pg 级.需要的样品量少,前处理简单,是它的另一大优点.目前,已经得到了微囊藻毒素的多种克隆抗体<sup>[20]</sup>,并且还有人用从噬菌体中得到的重组抗体片段进行 ELISA 分析<sup>[21]</sup>.然而,这些抗体都是针对 MC-LR 设计的,虽与其他异构体有一定交叉反应,但不能用于毒素异构体类型的鉴定.另外,ELISA 法受多种干扰的影响,容易产生假阳性结果.

(4)蛋白磷酸酶抑制试验 由于微囊藻毒素对蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的活性有强烈的抑制作用,利用此特性可通过蛋白磷酸酶抑制试验对微囊藻毒素进行定量检测.此方法与 ELISA 法一样,也不能用于毒素种类的鉴定,而且,其他大田海绵酸类物质对蛋白磷酸酶有同样的抑制作用.

蛋白磷酸酶抑制试验原来多采用放射性同位素标记的方法,较复杂.1994 年 J. An 和 W. W. Carmichael 采用显色蛋白磷酸酶抑制试验的方法<sup>[22]</sup>,通过颜色的变化来检测样品中微囊藻毒素浓度,更为方便和便宜.

(5)质谱分析法(mass spectrometry, MASS 法) 质谱分析法是分析有机大分子的分子量、分子式及其结构等的重要化学手段,灵敏度可达 pg 级.用于分离和鉴定的质谱方法主要有 FABMS(快速原子轰击质谱法)和 LSIMS(液体二次离子质谱法)等.通常,质谱法与色谱技术结合运用,形成 GC(gas chromatography)/MS、LC/MS 和 Frit-FAB LC/MS 等多种分析法.质谱分析法灵敏、准确,但实验花费大.

(6)其他检测方法 除了以上较常用的方法,还有一些方法也可用于的微囊藻毒素检测与分析,如凝胶色谱法、薄层层析(TLC)、氨基酸分析以及核磁共振(NMR)等.随着化学分析手段的不断提高,越来越多的先进方法用于微囊藻毒素的研究,如微液相色谱(micro-LC)、毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)、毛细管液相色谱、串联质谱(tandem MS, MS-MS)和胶束电动色谱(micellar electrokinetic chromatography, MEKC)<sup>[23,24]</sup>等.近几年,微囊藻毒素方面的研究,又使运用基因工程的方法检测微囊藻毒素成为一种新的尝试.

## 2.2 麻痹性贝毒(PSP)

2.2.1 小鼠生物测试法 生物测试法是检测 PSP 的传统方法,经过一系列改进后,它是现在唯一国际认可的定量检测 PSP 方法(Association Official Analytical Chemists; AOAC, 1990).检测的敏感性与小白鼠的品系关系很大,所以,测定换算系数(conversion factor, CF),并将最

终结果转换成  $\mu\text{gSTXeq}/100\text{g}$  组织为单位是非常重要的。目前,多数国家认同的 PSP 最大摄入量为  $80\mu\text{gSTXeq}/100\text{g}$  组织。抽提时的 pH 值是影响测试结果的另一重要因素,大多数 PSP 毒素在 pH3-4 时最稳定。另外,Shantz 等人 1958 年的报道还指出,抽提物中大量的盐,主要是  $\text{Na}^+$ ,也会降低生物测试得到的毒性值<sup>[25]</sup>。

2.2.2 柱后衍生 HPLC 法(post-column derivatization HPLC methods) 生物测试法的特异性和精确度不高,因此,许多研究者寻找更为灵敏的化学方法来检测 PSP。Sullivan 等人采用的离子交换层析法<sup>[26]</sup>,可检测出甲藻产生的主要 PSP,如 STX、neoSTX 和 GTX1-6,但对于后来发现的其他 PSP 分离效果不好。Oshima 发现在碱性条件下,通过氧化作用,可使 PSP 毒素衍生为荧光化合物。将这一氧化反应作为柱后的反应系统与 HPLC 相结合,即可敏感、专一地定量检测各种 PSP 毒素<sup>[27,28]</sup>。

实验证明,柱后衍生 HPLC 法与生物测试的结果有很好的相关性,灵敏度更高。而且,与其他的检测方法相比,最大的优点是能从少量的粗样中定量分析每种 PSP 毒素。

2.2.3 其他方法 毛细管电泳和质谱联用(Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, CE-MS)的方法前处理过程较简单,检测的用量少,灵敏度高。但在 pH5.0 的检测条件下,C 类 PSP 不带电荷,无法检测出。

利用 PSP 对  $\text{Na}^+$  通道的作用,也有人用钠通道生物毒性试验法来进行检测。

### 2.3 腹泻性贝毒(DSP)

各国对 DSP 的检测方法不同,相应制定的安全水平也不一致<sup>[29]</sup>。Lee 认为每克贝类肝胰腺中含有  $2.0\mu\text{gOA}$  或  $1.8\mu\text{gDTX1}$ ,就不宜食用<sup>[30]</sup>。

在各种分析方法中,生物测试最常用,但分析时间长,不够敏感,还受贝类中脂肪酸含量的影响。欧洲一些国家也用大鼠(rat)作为生物材料进行测试<sup>[31]</sup>。1993 年,Vernoux 等人报道了用 *Daphnia magna* 检测 DSP 毒素的方法<sup>[32]</sup>,这种方法便宜简单,准确度较高。

通常以消化腺为材料,用甲醇、丙酮等有机溶剂提取 DSP 毒素。抽提后,一般先用石油醚或乙烷去除大量脂肪和非极性脂肪酸类物质,再用氯仿纯化。这样得到的提取物包括多种 DSP 毒素和它们的二醇酯类化合物。

由于 DSP 含有酰基,一般将其转化为荧光酯类衍生物,再进行检测。Lee 等人的方法<sup>[30]</sup>是用 9-anthryldiazomethane(ADAM)作荧光增色剂,但需要在衍生化后用硅胶柱进行纯化。Quilliam 在 1995 年将衍生化后的硅胶柱纯化步骤进行了改进,并用 7-O-acetylokadaic acid 作为内在标准物,校正毒素回收率,提高了检测的精确度<sup>[33]</sup>。ADAM-HPLC 法检测 OA 类物质,可达到  $10\text{pg}$  级。但 DTX-3 的分子量很大,且具亲脂性,不能直接用此法分析。最近,Gonzalez 等人发展了一种新的 HPLC-FL 方法,完全放弃了有害氯化物的使用。通过对 45 个样品的分析,证明此方法得到的结果与原有 ADAM/HPLC-FL 法有较好的一致性<sup>[34]</sup>。

HPLC 与喷射离子(ion-spray)质谱相结合的方法(LC-ISMS)是目前最好的检测方法<sup>[35]</sup>,只是由于价格昂贵,远不如 HPLC 常用。

另外,也有人用酶免疫法、磷酸酶抑制试验或者细胞毒性实验对 DSP 进行检测。

### 2.4 其他藻毒素

节球藻毒素与 MC 的性质相似,因此,几乎所有微囊藻毒素的分析方法都可用来检测节球藻毒素。

蓝藻的神经毒素在自然环境中不稳定,传播范围不太广,研究不多.对于蓝藻中的 STX 和 neoSTX,检测时方法与海洋 PSP 毒素检测相似.

记忆丧失性贝毒的活性成分软骨藻酸(OA)通常用柱前衍生 HPLC-UV 法检测.毛细管电泳和放射性免疫等方法近年也被运用.

另两类毒素 NSP 和 CFP 因危害范围相对较小,目前也无固定检测方法,故在此不详细叙述.它们的检测可参考其他贝毒毒素的方法进行.

### 3 藻毒素检测及分析方法的发展方向

随着全球水体富营养化的加剧,水华和赤潮的暴发日益频繁,藻类毒素的研究得到了越来越多的关注.对毒性质质的进一步了解和手段的不断提高,也使毒素的检测和分析的方法越来越多.作者认为,今后藻毒素的检测与分析可向以下几个方向发展:

(1)建立和完善更加快速、灵敏的检测方法,特别是 ELISA 法、蛋白磷酸酶抑制试验和神经受体结合试验等生化方法,并研制成方便使用的试剂盒;

(2)寻找更加简单、精确的化学检测方法,定量检测各种已知类型的毒素,并对新发现的毒素进行结构、性质等方面的分析;

(3)对饮用水、娱乐用水以及贝类、鱼类等海产品制定合理的安全标准;

(4)将藻类毒素的检测和分析与各种理化环境因子的监测相结合,探索毒素产生的规律及有效控制方法;

(5)运用化学方法大规模提纯毒素,纯毒素不但可作为检测分析的标准,还可开发为各种工具药和治疗药.

### 参 考 文 献

- 1 Carmichael W W. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol*, 1992, 72:445-459
- 2 Mackintosh C, Beattie K A, Klunpp S, *et al.* Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett*, 1990, 264:187-192
- 3 Rinehart K L, Harada K-I, Namikoshi C C, *et al.* Nodularin, microcystin and the configuration of Adda. *J Am Chem Soc*, 1988, 110:8557-8558
- 4 Crawford S D, Uthaga K S. Cyanotoxins. In: Whitton B A, Paerl M eds. *The ecology of cyanobacteria*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. 613-632
- 5 Carmichael W W. Toxin of cyanobacteria. *Sci Am*, 1994, 270:64-70
- 6 金传彪,何家苑,朱家明等.水华束丝藻 NH-5 株产生麻痹性贝毒素几个相关问题的研究.水生生物学报,2000,24(1):94-96
- 7 Carmichael W W. The cyanotoxins. *Adv Bot Res*, 1997, 27:211-256
- 8 Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, *et al.* And now saxitoxin-producing cyanobacteria in Europe. In: Carmichael W W, Paerl H W eds. Abstracts, 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria. Beaufort, North Carolina, 1998. 44
- 9 Mahmood N A, Carmichael W W. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon*, 1986, 24(2):175-186
- 10 周名江,李钧,于仁诚等.赤潮藻毒素研究进展.中国海洋药物,1999,3:48-54
- 11 Yasumoto T, Murata M. Polyether toxins involved in seafood poisoning. In: Hall S, Strichartz GR eds. *Marine Toxins*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington DC, 1990. 120-132

- 12 Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J*, 1988, **256**:283 - 290
- 13 Norte M, Padilla A, Souto M L. Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Proocentrum lima*. *Tetrahedron*, 1994, **50**:9172 - 9180
- 14 Harada K-I. Chemistry and detection of microcystins. In: Watanabe M F, Harada K-I, Carmichael W W *et al* eds. *Toxic Microcystis*. Florida: CRC Press, 1995. 103 - 148
- 15 Tsuji K, Naito S, Kowdo F, *et al*. A cleanup method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxicol*, 1994, **32**:1251 - 1259
- 16 Lawton L A, Edwards C, Codd G A. Extration and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated water. *Analyst*, 1994, **119**:1525 - 1530
- 17 Metcalf J S, Codd G A. Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **184**(2):241 - 246
- 18 Chu F S, Huang X, Wei R D. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J Asso Anal Chem*. 1990, **73**:451 - 456
- 19 McDermott C M, Feola R, Plude J. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique. *Toxicol*, 1995, **33**(11):1433 - 1442
- 20 Nagatas, Soutome H, *et al*. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Nat Toxins*, 1995, **3**(2):78 - 86
- 21 Mcelhiney J, Lawton L A, Proter A J. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a naive human phage display library. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **193**(1):83 - 88
- 22 An J S, Carmichael WW. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicol*, 1994, **32**:1495 - 1507
- 23 Bouaicha N, Rivasseau C, Hennion M C, *et al*. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in cell extracts by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, **685**(1):53 - 57
- 24 Bateman K P, Thibault P, Douglas D J, *et al*. Mass Spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line Chromatography and electrophoretic separations. *J Chromatogr A*, 1995, **712**(1):253 - 268
- 25 Shantz E J, Mcfarren E F, *et al*. Purified poison for bioassay standardization. *J Assoc Off Anal Chem*, 1958, **41**:160 - 168
- 26 Sullivan J J, Iwacka W T. High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. *J Assoc Off Anal Chem*, 1983, **66**:297 - 303
- 27 Oshima Y, Machida M, Sasaki K, *et al*. Liquid chromatographic-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins. *Agric Biol Chem*, 1984, **48**:1707 - 1711
- 28 Oshima Y. Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: Hallegraef G M, Anderson D M, Cembella A D eds. *Manual on harmful marine microalgae*. France: the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, UNESCO's Workshops, 1995. 81 - 94
- 29 Van Egmond H P, Speijers G J A, Van Top H J. Current Situation on worldwide regulations from marine phycotoxins. *J Nat Toxins*, 1992, **1**:67 - 85
- 30 Lee J, Yanagi T, Kenma R, *et al*. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agr Biol Chem*, 1987, **51**:877 - 881
- 31 Kat M. *Dinophysis acuminata* blooms. the distinct cause of Dutch mussel poisoning. In: Anderson D M, White A W, Baden DG eds. *Toxic Dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier, 1985. 73 - 77
- 32 Vernoux J P, Le Bant C, Masselin P, *et al*. The use of *Daphnia magna* for detection of okadaic acid in mussel extracts. *Food Addit Contam*, 1993, **10**:603 - 608
- 33 Quilliam M A. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J ADAC Int*, 1995, **78**(2):555 - 570
- 34 Gonzalez J C, Leira F, Vieytes M R, *et al*. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method



- using fluorimetric determination for the determination of the diarrhetic shellfish poisoning toxin okadaic acid without chlorinated solvents. *J Chromatogr A*, 2000, **876**:117-125
- 35 Laboratorio Alimenti, *et al.* Detection of diarrhetic shellfish toxins in mussels from Italy by isospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*, 1995, **33**(12):1591-603

## Algal Toxins of Blooms, Red Tides and Their Analysis Methods

XU Min ZHAO Yijun CHENG Kai

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, P. R. China)

### Abstract

Main types and characteristics of algal toxins of blooms and red tides are presented in this paper. Some important methods for assaying algal toxins are summarized. Emphases are given on the methods of extraction and analysis of microcystin (MCYST, MC) and Paralytic shellfish poisoning (PSP).

**Key Words** Algal toxins, bloom, red tide, analysis

### 第八届国际盐湖会议将于2002年7月在俄罗斯召开

第八届国际盐湖会议将于2002年7月26日在俄罗斯哈卡斯(Khakassia)共和国召开。国际盐湖学会是国际盐湖领域研究的权威学术组织。学会的宗旨和目的是帮助内陆盐湖(包括盐田)领域的研究人员建立密切联系,使公众更多地了解盐湖领域的科学研究、管理和保护。学会拥有自己的专门网站、期刊和完善的会员登记制度,每三年举行一次国际会议。2001年1月22日新修订的章程对学会的各个方面进行了详细规定。

本次会议的主题是:生物技术和医学研究在盐湖管理中的应用。涉及的内容有:人口动力学、热带相互作用、微生物加工、当地生物化学对动植物群的生物地球影响、人类基因冲击力、内陆盐湖水的保护及未来研究方向和新技术。

本次会议由生物物理研究院和俄罗斯哈卡斯共和国主办,会议将在 Shira 湖区中心举行,由俄罗斯科学院西伯利亚分院生物研究院院长 Andrei G. Degermendzhy 主持。

会议议题包括:(1)盐湖地质历史和古生态。(2)盐湖生态组织结构,如基因多样性、人口统计学、空间差异性 & 季节变化等。(3)盐湖生态系统作用,如热带结构和相互作用、生物地球化学相互作用、有机物的运动等。(4)生物技术和医学研究在盐湖管理中的应用。

欢迎我国有关研究人员积极参加。本次会议的具体联系方法是:Elena Maksimova, Institute of Biophysics, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia. Fax: + 7 3912 433400 E-mail: saltlake@ibp.ru. 网址: <http://www.ibp.ru/lakes>.

(中国地质科学院盐湖研究中心 郑绵平、李明慧供稿)