

塔玛亚历山大藻的麻痹性贝毒研究*

郑淑贞 林晓 林慧贞 陈海生

(中国科学院广州化学研究所 广州 510650)

提要 对暨南大学水生生物研究所于1991年10月从香港海域底泥分离后于实验室人工培养的塔玛亚历山大藻运用高效液相色谱分析麻痹性贝毒的组成;按照美国分析化学家协会的小白鼠生物检定标准方法测试其毒性。结果表明,所含毒素成分主要是膝沟藻毒素-2(GTX2),含量为 $94.13 \times 10^{-12} \text{g} / \text{cell}$;次要成分是膝沟藻毒素-4的N-磺基氨基甲酰衍生物C4,含量为 $15.67 \times 10^{-12} \text{g} / \text{cell}$,测得其毒性为 $(3.23-4.11) \times 10^{-6} \text{MU} / \text{cell}$ 。研究表明,所用的微藻麻痹性贝毒的提取方法和高效液相色谱分析方法都比较容易和有效。

关键词 塔玛亚历山大藻 毒性 膝沟藻毒素 高效液相色谱法

学科分类号 O629.9

麻痹性贝毒(PSP)是众所周知的海洋生物毒素之一(Shimizu, 1993)。香港海域近年来发生了多起由含有PSP的裸甲藻(*Gymnodinium* spp.)和原甲藻(*Prorocentrum* spp.)所引起的赤潮,造成大量鱼死亡事故(Wong *et al*, 1987),因而引起对存在于该海域的毒性微藻的注意。暨南大学水生生物研究所从该海域的底泥分离出塔玛亚历山大藻的孢囊,以后又对该种微藻进行人工培养并获得成功。本文报告人工培养的塔玛亚历山大藻的麻痹性贝毒的提取成分及其毒性,以期对有毒赤潮的研究及其引起的麻痹性贝毒中毒事故的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

所用微藻样品系暨南大学水生生物研究所于1991年10月从香港海域底泥分离后于实验室人工培养的塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)。本研究第一批微藻样品(I)于1994年3月3日采集,密度为3930cell/ml;第二批微藻样品(II)于1994年5月25日采集,密度为8750cell/ml。

1.2 毒素提取方法

藻液用0.45 μm 滤膜过滤,除去培养介质(*f*/2加富海水);用少量0.03mol/L醋酸(HAc)水溶液将微藻从滤膜上洗下并收集于离心试管中,用超声波处理2—5min,离心沉降。将澄清液分成三部分:第一部分直接供生物试验和高效液相色谱(HPLC)分析;第二部分用0.1mol/l盐酸(HCl)煮沸5min后作HPLC分析;第三部分加入澄清液量的1%的

* 国家自然科学基金资助项目, 9389008号。郑淑贞, 女, 出生于1937年8月, 研究员, E-mail: flhuang@public.guangzhou.gd.cn

收稿日期: 1996-04-03, 收修改稿日期: 1998-05-08

食盐 (NaCl) 后作生物试验。以 HPLC 方法分析麻痹性贝毒成分。

1.3 HPLC 分析方法

用此方法分析麻痹性贝毒的成分。仪器为日本分光公司 (JASCO) 高效液相色谱: 泵 (二个) 880-PU 型; 紫外光鉴定器为 UVIDE C-100-III; 色谱柱为 Wakosil-II 5C₁₈H. G. 150 × 4.6mm, 一根或二根 (串联)。测定条件: 流动相为 2mmol / l 1-庚烷磺酸钠的磷酸缓冲液 (pH = 7.2); 流速为 0.8ml / min; 紫外吸收波长为 210nm。

1.4 生物试验

按照美国分析化学家协会 (AOAC) 标准方法¹⁾ 进行试验并计算毒性。所用动物为 20 ± 1g 雄性昆明纯种小白鼠, 经腹腔注射微藻提取液 1ml 后有 ≥3 个小鼠死亡时间落在 5—7min 之间。毒性以鼠单位 / 细胞 (MU / cell) 表示。1MU 代表在 15min 杀死 20g 雄性小白鼠的剂量。样品 I 毒性试验一项, 样品 II 毒性试验三项。

2 结果与讨论

2.1 塔玛亚历山大藻麻痹性贝毒的成分

表1 塔玛亚历山大藻的麻痹性贝毒的成分及含量

Tab.1 The components and concentration of PSP from *A. tamarensis*

成分	含 量		摩尔百分数 (mol%)
	×10 ⁻¹⁵ (mol/cell)	×10 ⁻¹² (g/cell)	
GTX2	239	94.13	87.8
C4	33.2	15.67	12.2

HPLC 分析结果 (表 1 和图 1) 表明, 经醋酸处理后的提取物和再经盐酸处理后的提取物都有膝沟藻毒素-2 (GTX2) 的峰出现; 但后者比前者多出一个 GTX4 小峰, 这说明原来存在着 GTX4 的 N-磺基氨基甲酰衍生物 C4, 在盐酸作用下 C4 转变成 GTX4。膝沟藻毒素-2 含量为 94.13 × 10⁻¹²g / cell,

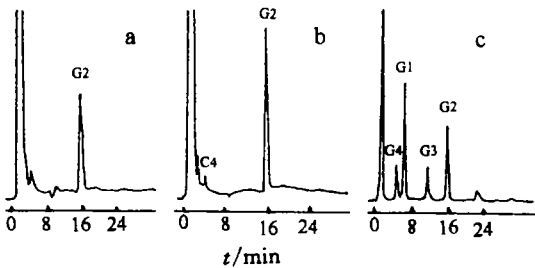


图 1 塔玛亚历山大藻麻痹性贝毒的 HPLC 图

Fig.1 HPLC of PSP from *A. tamarensis*

a. 醋酸提取物. b. 盐酸处理物. c. G1—G4 标准样品: 5ml 0.03mol/L HAc 溶液含 0.5μ mol G1—G4, 其中 G1, 1.74 × 10⁻³ μ mol; G2, 1.92 × 10⁻³ μ mol; G3, 6.76 × 10⁻⁴ μ mol; G4, 6.67 × 10⁻⁴ μ mol. G1—G4 依次代表 GTX1—GTX4

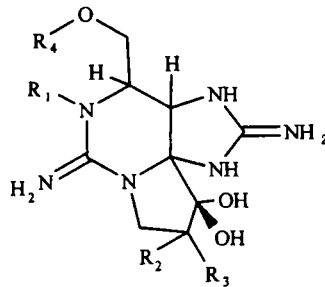


图 2 塔玛亚历山大藻麻痹性贝毒的结构 (Lawrence, 1991b)

Fig.2 Structures of PSP of *A. tamarensis*

	GTX2	C4	GTX4
R ₁	H	OH	OH
R ₂	H	OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻
R ₃	OSO ₃ ⁻	H	H
R ₄	CONH ₂	CONHSO ₃ ⁻	CONH ₂

1) Gershman L L, 1984. Paralytic shellfish poison biological method final action. AOAC Off Meth Anal, 344

占总麻痹性贝毒摩尔百分数的 87.8%; 而 C4 含量为 $15.67 \times 10^{-12} \text{g} / \text{cell}$, 仅占总麻痹性贝毒摩尔百分数的 12.2%。所以, 塔玛亚历山大藻的 PSP 的主要成分是膝沟藻毒素-2。次要成分是膝沟藻毒素-4 的 N-磺基氨基甲酰衍生物 C4 (结构式见图 2)。表 1 的 HPLC 数据是采用一根色谱柱的分析结果。用二根色谱柱 (串联) 的分离效果得到改善, 色谱图的基线飘移得小一些, 而测得值基本相同。

从分析结果可认为, 本研究采用的 HPLC 分析方法是有效的, 并且这个方法与已有的其它方法 (Oshima *et al.*, 1987; Lawrence *et al.*, 1991a, 1991b) 比较还显示出操作简便、设备简单、方法容易等特点。因为它不必将毒素在柱前或柱后转变为荧光物质, 不须用荧光鉴定器和多个泵体, 也不须梯度洗脱。

2.2 塔玛亚历山大藻麻痹性贝毒的生物试验结果

用两批人工培养的塔玛亚历山大藻 (I, II) 的麻痹性贝毒提取液对小白鼠进行毒试验结果见表 2。从香港海域底泥分离并经多代繁殖的塔玛亚历山大藻的 PSP 的毒性为 $(3.23-4.11) \times 10^{-6} \text{MU} / \text{cell}$, 与 Singh 等 (1982) 报道的塔玛亚历山大藻毒性范围 $(45-170) \times 10^{-6} \text{MU} / \text{cell}$ 相比, 其毒性较低。此毒性可能与培养条件、藻体大小、繁殖代数等等有关。本研究表明, 生物试验时样品的纯度也影响麻痹性贝毒的毒性值, 当注射样品中含有食盐时, 测得的毒性值降低。如注射样品含 1%NaCl 时, 小鼠死亡时间由 00:05:38 延长至 00:09:12, 小鼠死亡时间延长了 00:03:34 (延长了约 60%), 测得的麻痹性贝毒的毒性值比不含 NaCl 的样品低约 30%, 这与桥本芳郎 (1980) 的报道相近。

试验表明, PSP 毒性试验的样品必须保证无盐, 而要除去培养介质或海水带入的盐, 过滤方法比离心容易, 特别是在微藻毒性低或细胞浓度低而必须用大量的样品时, 用离心方法测甚为麻烦和困难, 因为微藻的细胞壁较脆, 在离心时会受到离心力作用而破裂, 从而使测得毒性值降低。从 NaCl 降低 PSP 提取液的毒性结果可以间接推测, PSP 的毒理与毒素影响细胞膜钠离子通道的通透性 (Shimizu, 1982) 有关。

3 结语

从香港海域的底泥分离出的孢囊经人工培养成的塔玛亚历山大藻是有毒的, 它含有俗称的麻痹性贝毒, 其毒素成分主要是膝沟藻毒素-2, 含量为 $94.13 \times 10^{-12} \text{g} / \text{cell}$; 次要成分是膝沟藻毒素-4 的 N-磺基氨基甲酰衍生物 C4, 含量为 $15.67 \times 10^{-12} \text{g} / \text{cell}$ 。由生物试验测得其 PSP 毒性为 $(3.23-4.11) \times 10^{-6} \text{MU} / \text{cell}$ 。

致谢 暨南大学水生生物研究所提供人工培养的塔玛亚历山大藻, 日本静冈大学上村

表2 塔玛亚历山大藻贝毒用于小白鼠试验结果

Tab.2 The mouse bioassay of PSP of *A. tamarense*

微藻样品	提取物介质 (mol/L)	注射微藻量 ($\times 10^5$)	死亡时间 (min:s)	毒性 ($\times 10^{-6} \text{MU}/\text{cell}$)
I	0.03HAc	4.02	05: 48	4.11
II	0.03HAc	5.21	05: 38	3.23
II	0.03HAc (+1%NaCl)	5.21	09:12	2.21
II	0.03HAc (+1%NaCl)	6.95	06: 12	2.23

研究室帮助进行 HPLC 测试, 谨志谢忱。

参 考 文 献

桥本芳郎, 1980. 鱼贝类の毒. 东京: 学会出版マツター. 51

Lawrence J F, Menard C, Charbonneal C, 1991a. A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Assoc Off Anal Chem*, 74: 404—409

Lawrence J F, Menard C, 1991b. Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation. *J Assoc Off Anal Chem*, 74: 1006—1012

Oshima Y, Hasegawa H, Yasumoto T *et al*, 1987. *Dinoflagellate Gynmodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in *Tasmanian* shellfish. *Toxicon*, 25: 1105—1111

Shimizu Y, 1982. Recent progress in marine research. *Pure Appl Chem*, 54: 1973—1980

Shimizu Y, 1993. Microalgal metabolites. *Chem Rev*, 93: 1685—1698

Singh H T, Oshima Y, Yasumoto T, 1982. Growth and toxicity of *Protogonyaulax tamarensis* in axenic culture. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 48: 1341—1343

Wong P S, Wu R S S, 1987. Red tides in Hong Kong: problems and management strategy with special reference to the mariculture industry. *J Shoreline Management*, 3: 1—21

STUDIES ON PARALYTIC SHELLFISH POISONING OF *ALEXANDRIUM TAMARENSE* FROM HONG KONG WATERS

ZHENG Shu-zhen, LIN Xiao, LIN Hui-zhen, CHEN Hai-sheng

(Guangzhou Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510650)

Abstract The components and toxicity of paralytic shellfish poisoning (PSP) of *Alexandrium tamarensis* isolated from Hong Kong waters in Oct. 1991 and cultured in the laboratory in the Institute of Hydrobiology, Jinan University, were studied. The alga was collected by filtration and the PSP was extracted by 0.03mol / L CH₃COOH. The PSP was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and mouse bioassay. The results show that the major toxic component from *A. tamarensis* cultured is Gonyautoxin-2 (GTX-2) at a concentration of 94.13×10^{-12} g / cell (87.8% of the total PSP toxin), and the minor component is N-sulfocarbamate derivative of GTX4 (C4) at a concentration of 15.67×10^{-12} g / cell (12.2% of the total PSP toxin). The toxicity was $(3.23—4.11) \times 10^{-6}$ MU / cell by mouse bioassay according to the standard method of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). The presence of 1% NaCl causes a decrease of around 30% in the toxicity in mouse bioassay. The cultured *A. tamarensis* used in the present study appears to have a lower toxicity than that identified in previous studies elsewhere. The difference might be due to a combined effect of different culture conditions, sizes of the alga and the number of culturing passage. The methods of sample extraction and HPLC analysis of PSP toxin used in the present study were efficient but simpler than those used by other investigators in the

previous research.

Key words *Alexandrium tamarense* Toxicity Gonyautoxin HPLC

Subject classification number O629.9

刊物简介

《海洋与湖沼》学报简介

BRIEF INTRODUCTION OF THE OCEANOLOGIA ET LIMNOLOGIA SINICA

《海洋与湖沼》学报遵循科学技术要面向经济建设的宗旨, 倡导不同学术观点的争鸣, 开展国内外学术交流, 以繁荣学术、提高研究水平; 报道最新科研成果, 为促进科学技术的发展和加速社会主义现代化建设服务; 发挥老科学家的指导作用、中年科技人员的骨干作用, 热情扶植青年学者, 以利于科技人才的尽快成长, 从而不断壮大科技力量。《海洋与湖沼》学报, 系海洋湖沼科技领域综合性的学术刊物, 以报道基础研究、应用基础研究论文为主, 同时重视应用研究、开发研究成果的发表; 论文涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、简报、综述、学术争鸣、学术简报、科学家简介、书评等栏目。对于发明创造和同国计民生有重大关系的研究成果、带有崭新学术观点的论文和学术争鸣, 特别是青年学者的优秀论文, 将予以优先刊登。

《海洋与湖沼》学报于 1957 年创刊, 第一任主编为中科院院士、第三世界科学院院士曾呈奎教授, 第二任主编为著名海洋生物学家刘瑞玉教授, 现任主编为中科院院士秦蕴珊教授。由于刊物一向注重高水平、高质量, 为学术交流、国家建设、人才成长作出引人注目的贡献, 因而在国内外均享有较高声誉。1988—1993 年获省部级以上优秀科技期刊奖 7 项, 最高为国家二等奖。