

麻痹性贝毒毒素研究

II. 麻痹性贝毒毒素纯化产品的高效液相色谱和质谱分析^{*}

王云峰 于仁诚 李 钧 颜 天 周名江

(中国科学院海洋研究所)

麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)毒素由石房蛤毒素(saxitoxin, STX)及其衍生物组成,目前已发现 20 余种,在赤潮研究、分子生物学和神经生物学基础研究、医药、军事防化等方面均有应用潜力。由于 PSP 毒素的稀有来源和国际社会对 STX 交易的禁止,限制了国内 PSP 毒素应用及研究的全面深入展开,因此本文作者对 PSP 毒素进行了自行制备,并采用不同方法对制得的 PSP 毒素进行了分析研究。

目前已建立了多种 PSP 毒素的生物和化学分析方法。小鼠法作为 PSP 毒素监测和定量的标准方法已有 60 余年的历史(Sommer et al., 1937; McFarren et al., 1958; Helrich, 1990),它对海产品毒性的测定是有效的方法,但难以揭示毒素的化学本质。其他生物分析方法如免疫分析等尽管灵敏度比小鼠法有所提高,但同样都面临难以揭示毒素的化学本质的难题。因此,对 PSP 毒素的分析还需借助仪器分析进行确证。尽管现在已针对 PSP 毒素建立了薄层色谱、毛细管电泳、高效液相色谱等多种化学分析方法,但真正得到广泛应用的只有高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)方法。对于这类 PSP 毒素的分离是基于离子对反相色谱原理,采用磷酸四丁基铵、己基磺酸盐、庚基磺酸盐、辛基磺酸盐等做离子对,在 C-8 或 C-18 反相色谱柱上进行分离。检测手段是基于 PSP 毒素在碱性条件下氧化——酸化后可以生成荧光衍生物这一原理(Bates et al., 1975),将 PSP 毒素衍生成荧光物质,用荧光检测器进行检测。Oshima(1989)用三个等梯度洗脱法成功地分离分析了 PSP 毒素中的 N-磺酰氨基类毒素(C1-C4),膝沟藻毒素(GTX1-6)和石房蛤类毒素(STX, dcSTX 和 neoSTX),全部分析采用 C-8 反相柱。由于这种方法几乎可以分析已知的绝大多数 PSP 毒素,因而被广泛接受。

自从发明了快原子轰击(Fast Atom Bombardment, FAB)电离源后,用质谱(Mass Spectrometry, MS)分析 PSP 毒素才成为现实(Barber et al., 1982)。虽然 FAB 已能够提

^{*} 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4365 号。

国家高技术研究与发展计划, 8638190605 号;国家自然科学基金重大项目, 39790110 号资助;国家自然科学基金项目, 40076030 号, 39950001 号。

质谱分析得到北京微量化学研究所肖宏展博士等的支持, 特此致谢。

收稿日期: 2001 年 6 月 15 日。

供纯化的整套 PSP 毒素的质谱,但用在分析毒素含量低的复杂提取物时灵敏度不够。Luckas(1990)报道用热喷雾(thermospray, TS)MS 分析 PSP 毒素,但不是很成功,也未提供更多有用的关键细节。Quilliam 等(1989)用配有大气压电离源和 IonSprayTM (ISP)接口的 MS 分析三种海洋神经毒素软骨藻酸(domoic acid)、石房蛤毒素(STX)、河豚毒素(TTX)后认为:配有大气压电离技术的质谱对分析痕量极性海洋毒素很有潜力。由于大气压电离(包括电喷雾电离(Electrospray Ionization, ESI)和大气压化学电离(Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)是一种软电离技术,可以使液相中的被检测分子变成气相离子时未经受外部能量的激发,因而不会发生断裂,然后通过碰撞诱导断裂(collision induced dissociations, CID, 选定某种分子离子或碎片离子,在碰撞室中与惰性气体的原子(分子)相碰撞。通过碰撞,离子的一部分动能可转换为该离子的内能,导致该离子发生碎裂,这就是 CID)可以产生碎片,从而提供分子的结构信息,因适于分析痕量极性 PSP 毒素而得到较多应用(Pleasant et al., 1992; Poon et al., 1993; Lagos et al., 1999)。

本文作者将实验室培养的塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)藻细胞经提取分离纯化制得 PSP 毒素中的膝沟藻毒素 2, 3 (Gonyautoxin 2, 3, GTX2, 3)和膝沟藻毒素 1, 4 (Gonyautoxin 1, 4, GTX1, 4),用小鼠法测定其表现典型的 PSP 毒素中毒症状。为了确定制得的毒素是 GTX2, 3 和 GTX1, 4, 在本文中利用 HPLC 方法,采用荧光检测(Fluorescence Detection, FD),分析制得的 GTX2, 3 和制得的 GTX1, 4, 并与同时分析的标准毒素 GTX2, 3 和 GTX1, 4 作比较。此外,本文作者还利用 MS 方法,采用 ESI 作为电离源,来获得制得的 GTX2, 3 和制得的 GTX1, 4 的主要分子离子峰和碎片离子峰,并与同时分析的从标准毒素 GTX2, 3 和 GTX1, 4 作比较,从分子的结构信息进一步确证制得的毒素是 GTX2, 3 和 GTX1, 4。通过 CID 将部分分子离子和碎片离子进一步打成更小的碎片,来充分分析制得的 GTX2, 3 和制得的 GTX1, 4 的分子结构和杂质情况。

一、材料和方法

1. 仪器和方法

进行毒素分析的高效液相色谱系统包括以下组件: Waters 600A 高压泵用于输送洗脱液; WISP 自动进样器进样; Waters Nova-Pak C18 反相柱(3.9mm×150mm, 60A, 4 μ m)用于毒素分离,柱后衍生应用 Waters 双头泵分别输送氧化剂和酸化剂,用 Waters 温度控制装置进行温度控制,衍生温度为 80℃。应用 Waters 474 荧光检测器(Fluorescence Detection, FD)进行毒素检测,激发波长为 330nm,发射波长为 390nm,系统采用 Waters 2010 Millenium 管理软件进行管理。分析过程采用两次等梯度洗脱。第一次专门分析 GTX 毒素,洗脱液为含有 3mmol/L 庚基磺酸盐离子对的 10mmol 磷酸铵缓冲液, pH 为 7.1。第二次分析 STX 类毒素,洗脱液为含有 2.5mmol/L 庚基磺酸盐离子对的 30mmol/L 磷酸铵缓冲液, pH 为 7.1,并按 100:5 的比例加入乙腈。氧化剂为含有 7mmol/L 高碘酸的 50mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 为 9.0。酸化剂为 0.5M 的乙酸溶液。洗脱液的流速为 0.7mL/min,氧化剂和酸化剂的流速均为 0.4mL/min。

进行毒素分析的质谱(MS)采用 Bruker 公司的 Esquire-LC 是 LC/MSⁿ 液-质联用离子

阱质谱仪, 具有 HPLC 和直接进样两种进样方式, 能进行正、负离子两种模式检测, 具有 ESI 和 APCI 两种大气压电离源, 用四极离子阱作为质量分析器, 能够进行多级质谱分析, 在一个色谱峰中对重要组分进行 MS/MS 或 MSⁿ 串联质谱分析。能进行全扫描、选择离子扫描及 MSⁿ 等多种扫描方式。全扫描采用电喷雾电离源, 直接进样。用 MS 和 MS/MS, 通过 CID 产生碎片, 提供子离子、母离子和中性丢失等多种信息, 用于分子结构的分析。

2. 样品和试剂

GTX2,3 和 GTX1,4 由实验室培养的塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 藻细胞经提取分离纯化制得; 作为标准毒素的标准的 GTX2,3 和标准的 GTX1,4 购自加拿大海洋生物研究所, 作为样品的对照。藻样品中毒素以 0.1 mol/L 乙酸溶液制备。标准的毒素同样采用 0.1 mol/L 乙酸溶液稀释。

用于毒素分析所需的化学试剂均为色谱纯或分析纯。乙腈为禹王公司生产色谱纯试剂, 其他试剂为分析纯试剂, 包括: 磷酸, 盐酸, 乙酸, 高碘酸, 氨水, 磷酸二氢钾, 氢氧化钾和氢氧化钠。分析采用的离子对庚基磺酸盐购自 Sigma 公司, 分析所用的水为 Milli-Q 超纯水系统生产的超纯水。其余试剂均为国产分析纯试剂。

二、结 果

对制得的毒素和标准的毒素的液相色谱分析结果如图 1、图 2 所示。由色谱图上可看出, 制得的 GTX2,3 (图 1a) 的保留时间与标准的 GTX2,3 (图 1b) 的保留时间一致, 结合小鼠法测定其表现为典型的 PSP 毒素中毒症状, 分析认为制得的毒素是 GTX2,3。同样, 制得的 GTX1,4 (图 2a) 的保留时间与标准的 GTX1,4 (图 2b) 的保留时间一致, 结合小鼠法测定其表现为典型的 PSP 毒素中毒症状, 分析认为制得的毒素是 GTX1,4。但制得的毒素的比例和标准的毒素的比例有所不同。对 GTX2,3 来说, 制得的毒素中, GTX3 的含量很高, GTX2 的含量极低 (图 1a), 而标准的毒素中 GTX2 含量较高, GTX3 的含量要低得多, GTX2 与 GTX3 的峰面积之比接近 4:1 (图 1b)。对 GTX1,4 来说, 制得的 GTX1,4 荧光峰主要为 GTX4, 未见明显的 GTX1 荧光峰存在 (图 2a), 而标准的 GTX1,4 荧光峰主要为 GTX1, GTX4 的荧光峰较低 (图 2b)。同时还发现, 在 GTX1,4 的色谱图中, 无论是制得的毒素还是标准的毒素, 其中都含有少量的 GTX2,3 组分。

在质谱分析中, 质谱检测的是 GTX2,3 和 GTX1,4 质子化 [M+H]⁺ 的分子 (分子量分别为 395 和 411, *m/z* 分别为 396 和 412)。制得的 GTX2,3 的分子离子峰和主要碎片峰为 *m/z* 412.2, 396.2, 378.1, 332.2, 316.1, 298.1 (图 3a), 标准的 GTX2,3 的分子离子峰和主要碎片峰为 *m/z* 396.4, 378.0, 316.0, 298.0 (图 3b), 制得的 GTX2,3 比标准的 GTX2,3 的分子离子峰和主要碎片峰多 *m/z* 412.2, 332.2。制得的 GTX1,4 的分子离子峰和主要碎片峰为 *m/z* 412.1, 394.1, 332.3, 314.4 (图 4a), 标准的 GTX1,4 的分子离子峰和主要碎片峰为 *m/z* 412.4, 394.1, 332.1, 314.1 (图 4b), 制得的 GTX1,4 与标准的 GTX1,4 的分子离子峰和主要碎片峰一致。将制得的 GTX2,3、标准的 GTX2,3、制得的 GTX1,4、标准的 GTX1,4 的分子离子峰和主要碎片峰 *m/z* 列入表 1 中对比可见, 制得的 GTX2,3 比标准的 GTX2,3 多的 *m/z* 412.2, 332.2 在制得的 GTX1,4 和标准的 GTX1,4 中都可以见到, 因此, 认为制

得的 GTX2, 3 比标准的 GTX2, 3 多的是 GTX1, 4。这样结合之前的小鼠法和 HPLC 法的分析结果, 再加上 MS 提供的制得的 GTX2, 3 和标准的 GTX2, 3 有一致的分子离子峰和主要碎片峰, MS 提供的制得的 GTX1, 4 和标准的 GTX1, 4 有一致的分子离子峰和主要碎片峰, 进一步确定制得的毒素是 GTX2, 3 和 GTX1, 4。

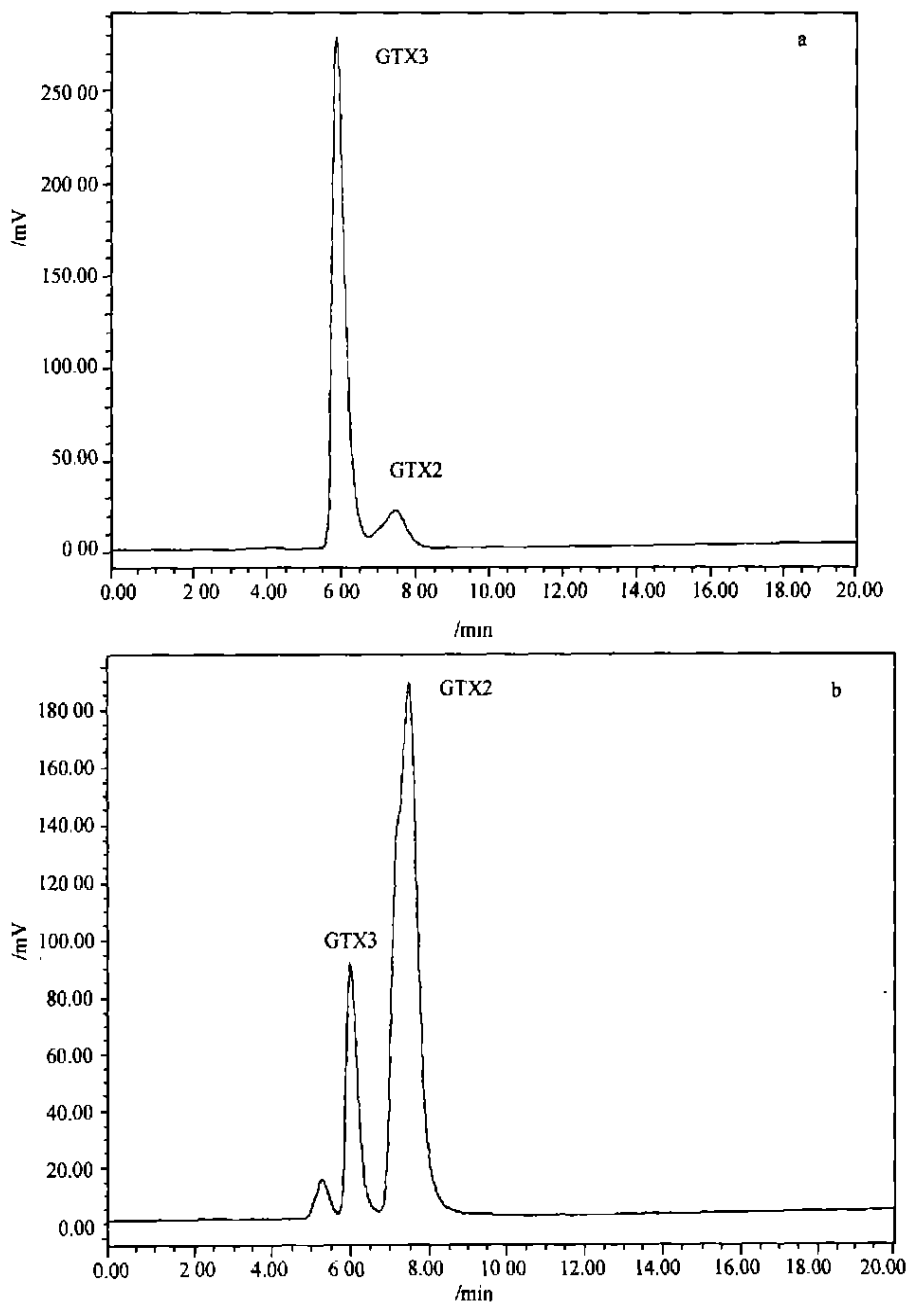


图 1 制得的 GTX2, 3(a)和标准的 GTX2, 3(b)的高效液相色谱

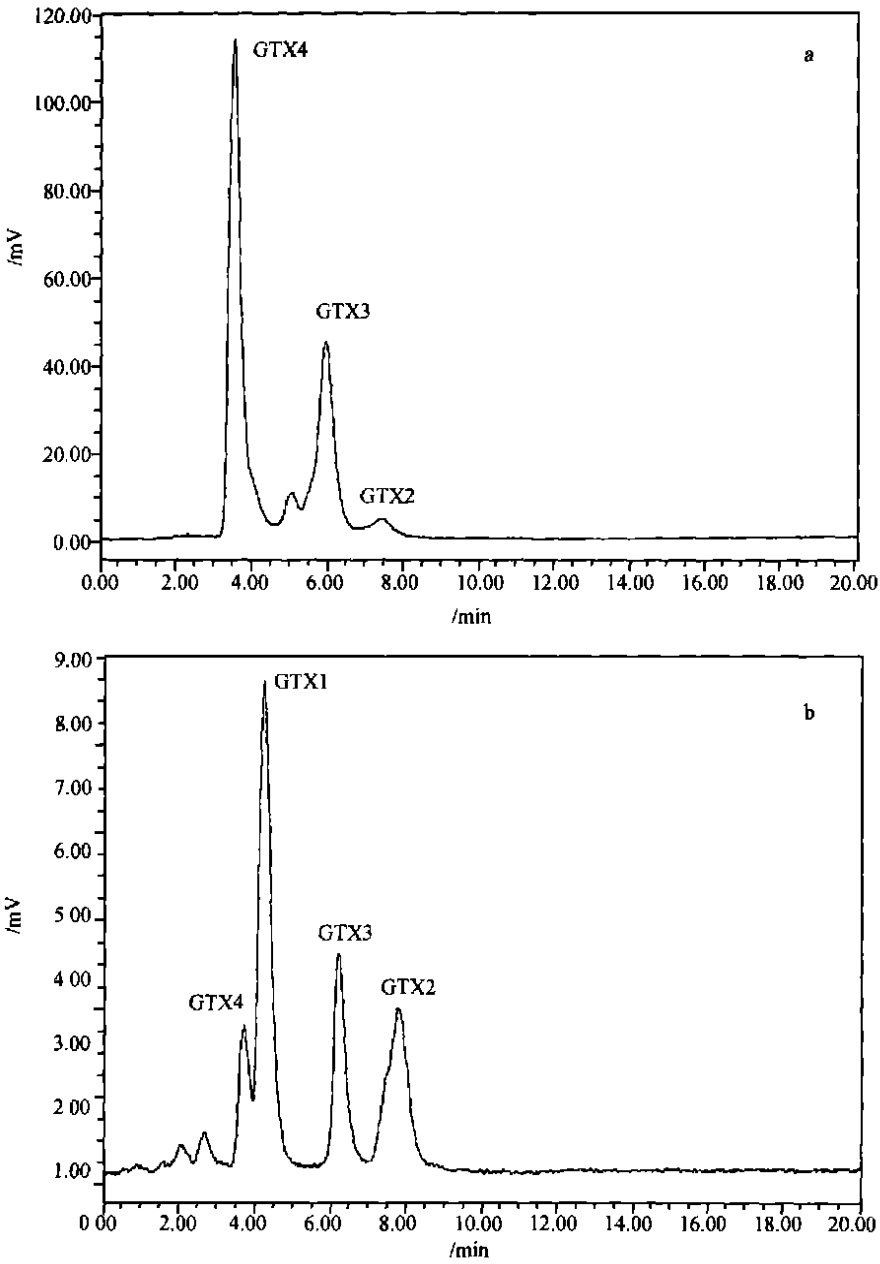


图 2 制得的 GTX1, 4(a)和标准的 GTX1, 4(b)的高效液相色谱

Display Report

Analysis Info:

File C:\ESQUIR-1\ESQDATA\ANALYSE\SAMPLE\ESI507-9.D

Date acquired Fri Aug 04 14:01:18 2000

Instrument: EsquireLC_00054

Task

Method

Printed: Fri Aug 04 14:29:01 2000

Operator: Administrator

Sample: ATc23

Acquisition Parameter:

Source: ESI

Mode: Std/Normal

CapExrt: 95.8 Volt

Scan Range: 50.00~500.00m/z

Accum.time: 41.77 s

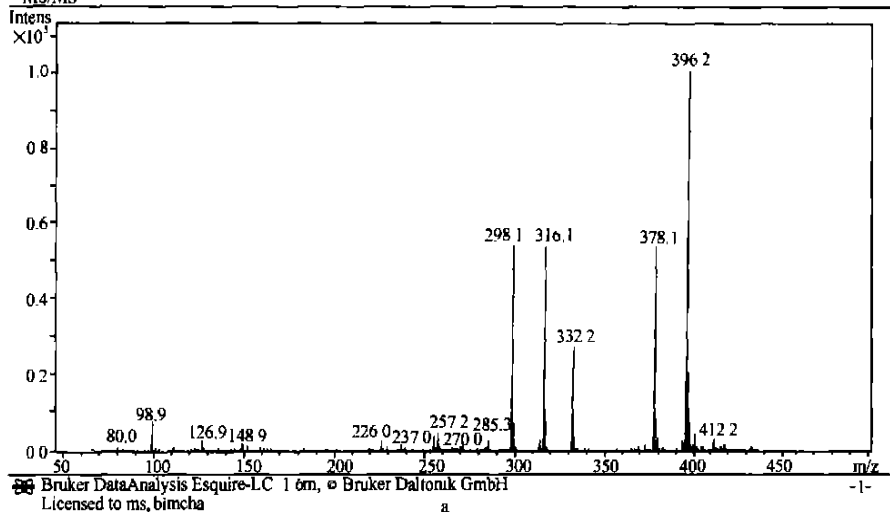
MS/MS

Polarity: Positive

Skim 1: 25.9 Volt

Trap Drive: 36

Summation: 8 Spectra



Display Report

Analysis Info:

File C:\ESQUIR-1\ESQDATA\ANALYSE\SAMPLE\ESI506-2.D

Date acquired Fri Aug 04 11:51:54 2000

Instrument: EsquireLC_00054

Task

Method

Printed: Fri Aug 04 14:27:53 2000

Operator: Administrator

Sample: ATs23

Acquisition Parameter:

Source: ESI

Mode: Std/Normal

CapExrt: 95.8 Volt

Scan Range: 100.00~600.00m/z

Accum.time: 50.00 s

MS/MS

Polarity: Positive

Skim 1: 25.9 Volt

Trap Drive: 36

Summation: 8 Spectra

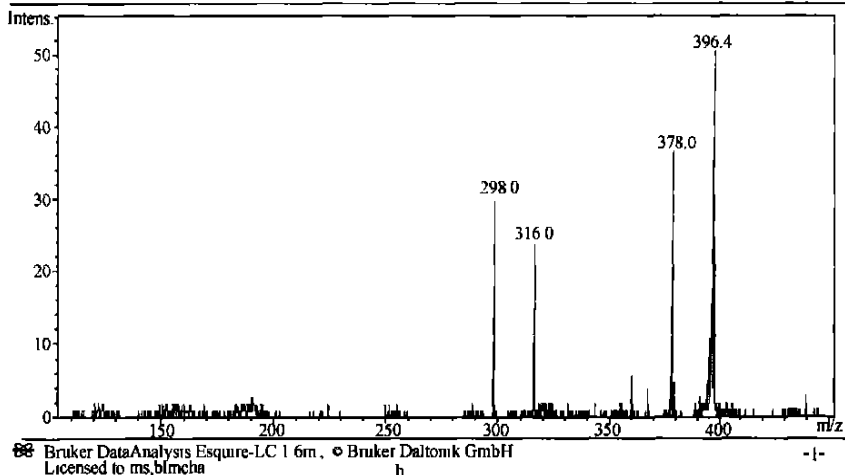


图 3 制得的 GTX2, 3(a)和标准的 GTX2, 3(b)的质谱

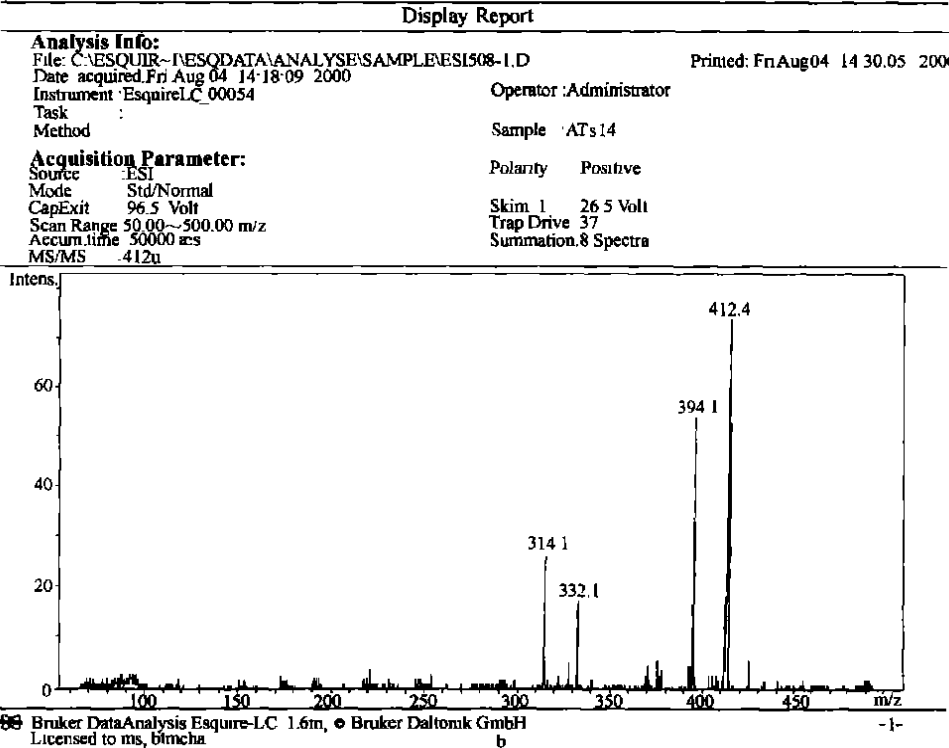
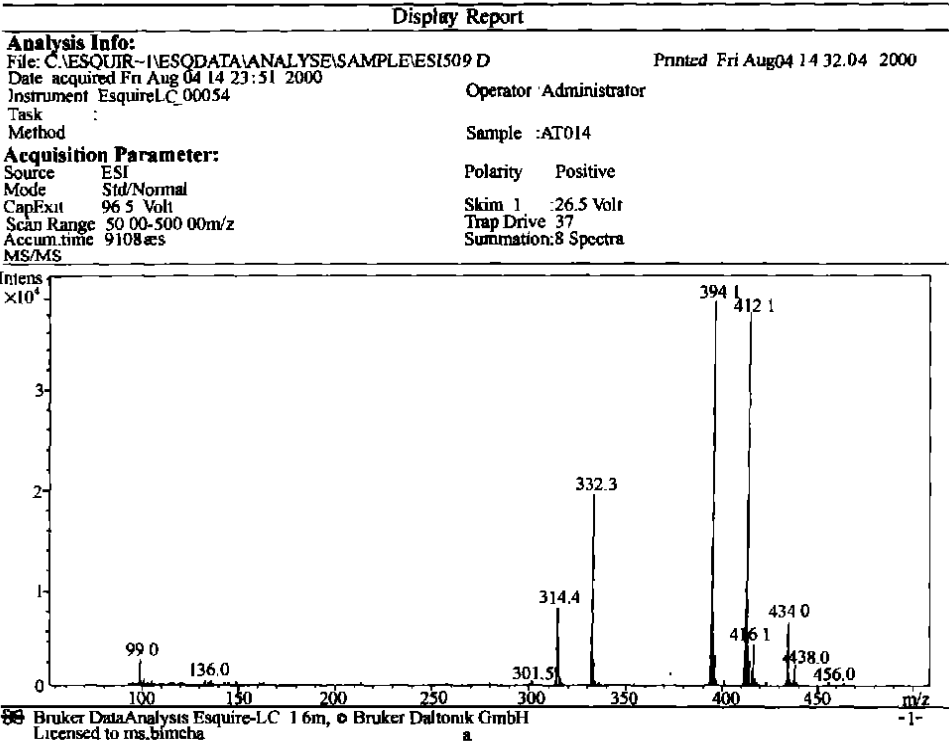


图 4 制得的 GTX1,4(a)和标准的 GTX1,4(b)的质谱

表 1 毒素质谱图中分子离子峰与主要碎片峰的 m/z 对比

	毒 素			
	制得的 GTX2, 3	标准的 GTX2, 3	制得的 GTX1, 4	标准的 GTX1, 4
	412.2	—	412.1	412.4
分子离子峰与	396.2	396.4	394.1	394.1
主要碎片峰	378.1	378.0	—	—
[M+H] ⁺	332.2	—	332.3	332.1
m/z	316.1	316.0	314.4	314.1
	298.1	298.0	—	—

为了从质谱上获得更多 GTX2, 3 的结构信息, 将制得的 GTX2, 3 碎片离子 298 (图 3a)进行碰撞诱导断裂(CID), 产生的主要碎片离子峰为 m/z 281、237、220、195(图 5)。

在制得的 GTX1, 4 质谱图(图 4a)中, 对应于 GTX1, 4 的分子离子峰 412, 有一个小峰 416, 比分子离子峰多 4; 对应于 GTX1, 4 的钠化分子 434.0 (ESI-MS 仪器有时会将分子加上一个 Na 而非 H, 表现为 m/z 增加 Na 的分子量 23, 此处 GTX1, 4 的分子量为 411, 增加一个 Na 后为 m/z 434), 也有一个 438.0 的小峰存在。在 PSP 毒素中并未见分子量为 415 的分子, 为了对离子 416 有进一步的了解, 选定离子 416 进行 CID, 产生碎片峰 336(图 6), 比 GTX1, 4 的碎片峰 332 也多 4。

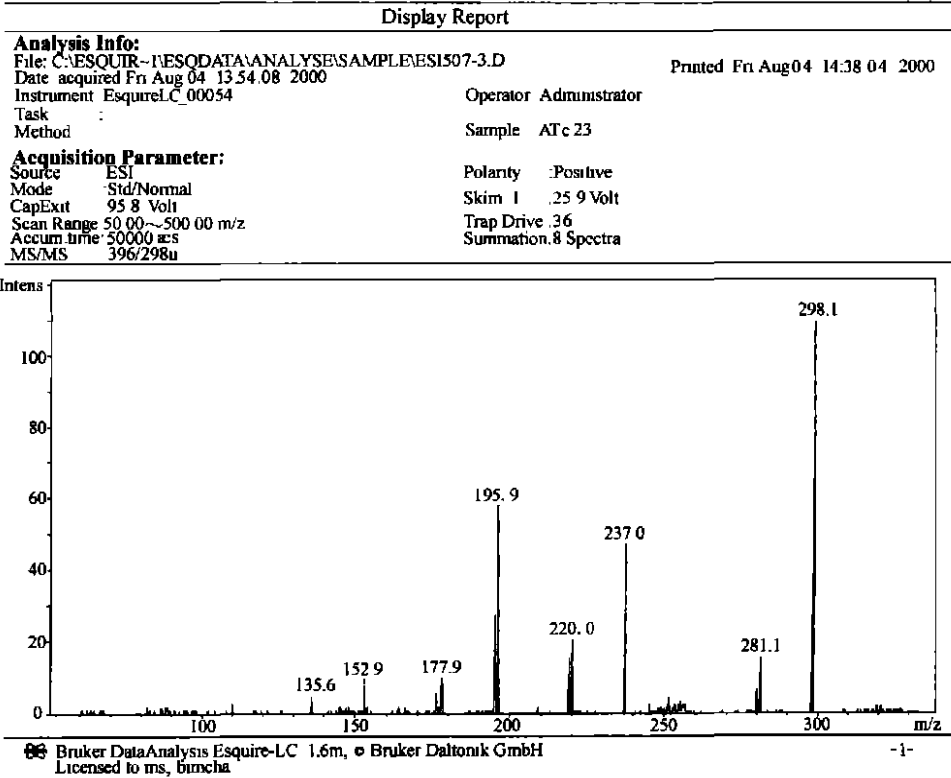


图 5 将制得的 GTX2, 3 碎片离子 298 碰撞诱导断裂(CID)产生的 [M+H]⁺质谱

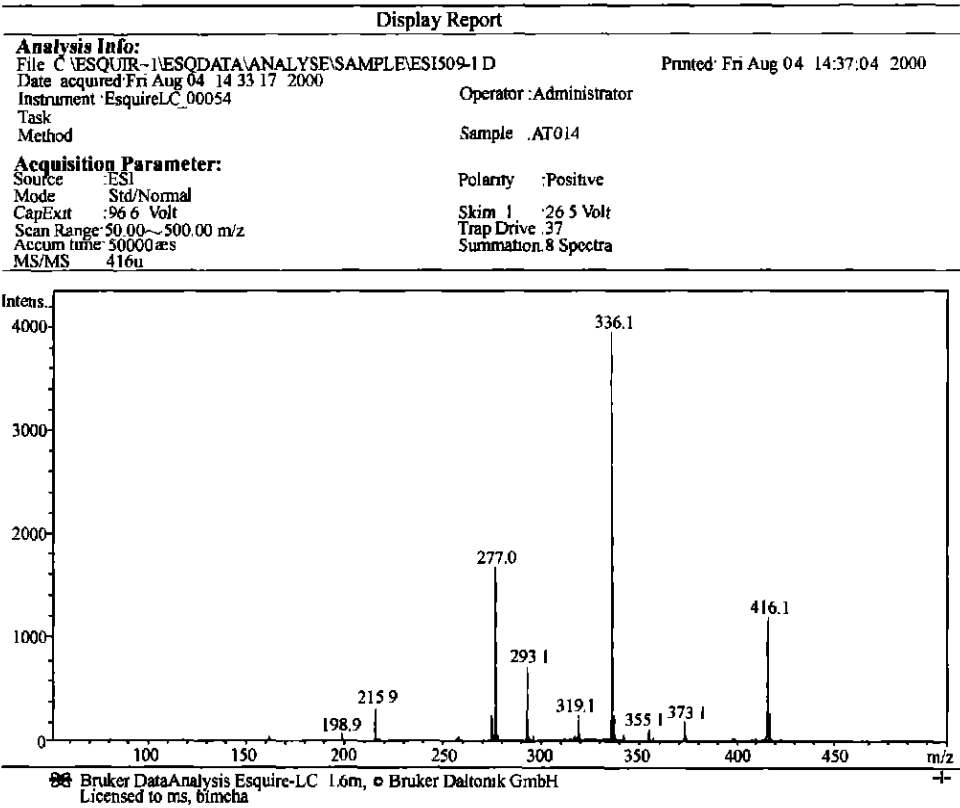


图 6 制得的 GTX1, 4 离子 416 碰撞诱导断裂(CID)产生的 $[M+H]^+$ 质谱

三、讨 论

GTX2(图 7a)和 GTX3(图 7b)是空间异构体,其差别在于 C11 位所连接的磷酸基和 H 的空间取向不同,两者的分子量均为 395.3,分子式为 $C_{10}H_{17}O_8N_7S$ 。同样, GTX1(图 8a)和 GTX4(图 8b)也是空间异构体,表现在 C11 位上连接的磷酸基和 H 的空间取向差异,两者分子量均为 411.3,分子式为 $C_{10}H_{17}O_9N_7S$ 。

通过小鼠法、HPLC 法和 MS 法,可以比较好地确定本文作者制得的毒素是 GTX2, 3 和 GTX1, 4。当然,要充分确定制得的毒素是 GTX2, 3 和 GTX1, 4, 还需要结合核磁共振、红外等手段分析的结果。由于 GTX2, 3 是由 GTX2 和 GTX3 这对空间异构体组成的混合物,本文作者所做的制备的 GTX2, 3 的核磁共振氢谱主要有两组化学位移峰组成,谱图难以解析,因此未列入本文中。尽管纯化出单一的 GTX2 和 GTX3 后,它们会相互转化,但进行核磁共振氢谱分析时还需要纯化的单一毒素。

通过对制得的毒素和标准的毒素的液相色谱分析结果可看出,制得的毒素与标准的毒素中两种毒素比例有所不同。这种差别主要是由有毒藻的毒素组成和不同毒素的稳定性差异造成的。在用于制备毒素的 *Alexandrium tamarense* 中, β 异构体(GTX3,

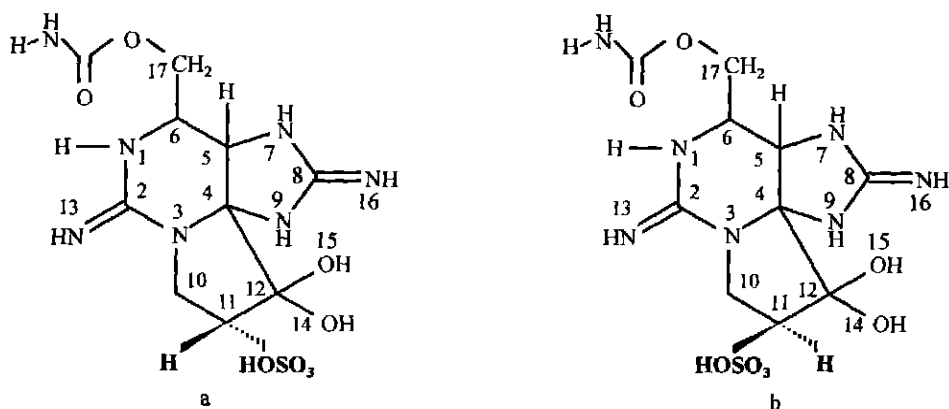


图 7 GTX2(a)和 GTX3(b) 的结构

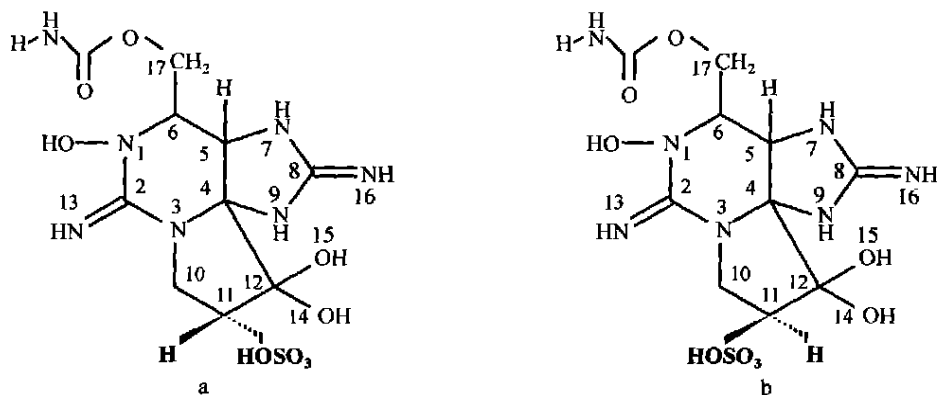
图中黑体示 C11 位上-HOSO₃ 和-H 的空间异构情况

图 8 GTX1(a)和 GTX4(b) 的结构

图中黑体示 C11 位上-HOSO₃ 和-H 的空间异构情况

GTX4)大量存在(Yu et al., 1998), 因此表现在刚刚制得的毒素中, GTX3 和 GTX4 所占的毒素比例较高。而在正常环境下, β 异构体经长期储存可以转变成更加稳定的 α 异构体, 最终比例为 4 : 1 左右(Hall et al., 1990), 因此, 标准的毒素在出售之前均要经过毒素的预平衡过程, 以使两种毒素的比例趋于稳定。这就使 HPLC 谱图中制得的 PSP 毒素与标准的 PSP 毒素的比例出现了差异。这也是制得的毒素与标准的毒素在质谱谱图中出现不同峰丰度差异的原因。制得的毒素和标准的毒素在各峰的丰度上有所不同, 主要是由于制得的毒素和标准的毒素中两种毒素(GTX2 与 GTX3, GTX1 与 GTX4)的比例不同造成的。

从 HPLC 图中可见制得的 GTX1, 4(2a)和标准的 GTX1, 4(2b)都含有 GTX2, 3, 而从质谱中未见制得的 GTX1, 4(4a)和标准的 GTX1, 4(4b)含有 GTX2, 3。从 HPLC 图中未见制得的 GTX2, 3(1a)中含有 GTX1, 4, 而从质谱中可见制得的 GTX2, 3(3a)中含有 GTX1, 4。这些差别可能是由 HPLC 和 MS 对 GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 的检测灵敏度

的不同造成的。由于液相色谱系统对 GTX1 和 GTX4 的检测灵敏度比 GTX2 和 GTX3 低得多[GTX1、GTX4、GTX2、GTX3 相对于 STX 的灵敏度(%)分别为 3.8、4.2、90.9、109, Yu et al., 1998], 因此在制得的 GTX2,3 质谱中见到 GTX1,4, 而在 HPLC 中却未见有 GTX1,4 存在; 同样, 在 HPLC 中制得的 GTX1,4 和标准的 GTX1,4 均见到 GTX2,3, 但在质谱中未见 GTX2,3 存在。结合 HPLC 和 MS 的分析结果, 可以推测制得的 GTX2,3 中混有 GTX1,4, 而制得的 GTX1,4 中也可能混有 GTX2,3。在制得的 GTX2,3 质谱中见到 GTX1,4, 而在标准的 GTX2,3 质谱中未见 GTX1,4; 在制得的 GTX1,4 液相色谱和标准的 GTX1,4 液相色谱中均含有 GTX2,3。由于 GTX1,4 不太稳定, 在室温下能够转化为 GTX2,3, 因此推测标准的 GTX1,4 中含有的少量 GTX2,3 可能是由 GTX1,4 转化而来。而 GTX2,3 相对比较稳定, 一般不会转化成 GTX1,4, 因此, 制得的 GTX2,3 中含有的少量 GTX1,4 可能是纯化未完全所致。而制得的 GTX1,4 中混有的极少量 GTX2,3 可能是纯化未完全所致, 也可能是 GTX1,4 转化所致。

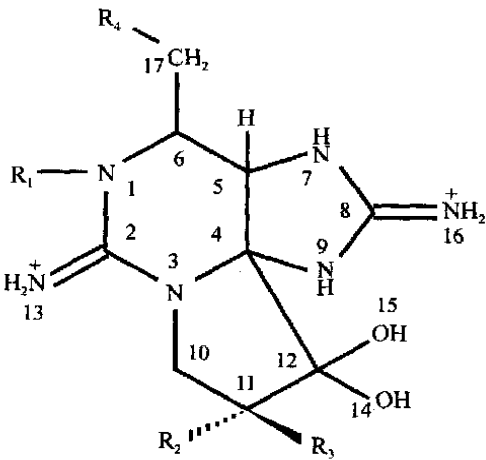


图 9 PSP 毒素的结构

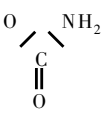
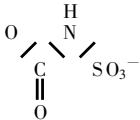
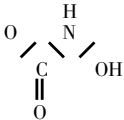
结合制得的 GTX2,3 的质谱(图 3a), 并与总结的 Pleasance 等(1992)对 STX、neoSTX、C1、C2、GTX3、GTX2 的质谱分析结果对比(表 2), 可见作者制得的 GTX2,3 的碎片离子峰 m/z 378、316、298 与 Pleasance 等(1992)所得的 GTX3 和 GTX2 的碎片离子峰一致, 进一步说明作者制得的毒素是 GTX2,3。作者制得的 GTX2,3 的 CID 碎片离子峰 m/z 298、281、237、220、195(图 5)与 Pleasance 等(1992)所得的 neoSTX 的碎片峰一致, 这是由于 PSP 毒素是一类四氢嘌呤的衍生物(图 9), 只是有 4 个取代基(图 9 中 R1、R2、R3、R4)的不同而形成不同的毒素

(表 3)。GTX2,3 失去 SO_3 后, C11 位连接的是 H 和 OH, N1 连接的是 H; neoSTX 与 GTX2,3 失去 SO_3 后的差别仅为 C11 位连接的是 H 和 H, N1 连接的是 OH。两者之后未在 C11 位和 N1 位发生断裂, 因此两者出现相同的碎片离子峰。结合分析 Pleasance 等(1992)所得的 PSP 毒素的断裂过程, 作者推测制得的 GTX2,3 的碎片离子峰 m/z 378、316、298、281、237 分别为 GTX2,3 分子离子失去 H_2O 、 SO_3 、 $\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_3$ 、 $\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_3 + \text{NH}_3$ 、 $\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_3 + \text{H}_2\text{NCO}_2\text{H}$, 图 10 表示本文作者推测 GTX2 的部分断裂过程。同样, 制得的 GTX1,4 的碎片离子峰 m/z 394、332、314 分别为 GTX1,4 分子离子失去 H_2O 、 SO_3 、 $\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_3$ 。GTX2,3 和 GTX1,4 的差别为 N1 位上连接的基团, GTX2,3 连接的是 H, GTX1,4 连接的是 OH。尽管 GTX2,3 和 GTX1,4 的分子结构存在如上差别, 但比较相应的碎片峰可见断裂过程相同(表 2)。GTX2,3 和 GTX1,4 断裂的一个碎片是失去 H_2O , 是从 C12 上的二元醇失去的, 这是用 ESI-MS 分析 PSP 毒素的共同特征(Hines, 1993; Poon et al., 1993; Lagos et al., 1999; Pereira et al., 2000), 失去 H_2O 后形成相应的酮。

表 2 一些 PSP 毒素的质谱分子离子峰和碎片离子峰

失去的基团		m/z						
		STX	neoSTX	C1, C2	GTX3	GTX2	GTX2, 3 GTX1, 4	
	[M + H] ⁺	300	316	476	396	396	396	412
H ₂ O	[M - H ₂ O + H] ⁺	282	298		378	378	378	394
SO ₃	[M - SO ₃ + H] ⁺			396	316	316	316	332
	[M - H ₂ O - SO ₃ + H] ⁺				298	298	298	314
	[M - SO ₃ - SO ₃ + H] ⁺			316				
	[鸟嘌呤核苷 + H] ⁺			284				
NH ₃	[M - H ₂ O - NH ₃ + H] ⁺	265	281					
	[M - H ₂ O - SO ₃ - NH ₃ + H] ⁺						281	
NHCO	[M - NHCO + H] ⁺	257	273					
H ₂ NCO ₂ H	[M - H ₂ NCO ₂ H + H] ⁺	240						
	[M - H ₂ O - H ₂ NCO ₂ H + H] ⁺	221	237					
	[M - H ₂ O - SO ₃ - H ₂ NCO ₂ H + H] ⁺						237	
		204	220				220	
		186	202					
		179	195				195	
	[色氨酸 + H] ⁺			205				
核糖部分	[腺嘌呤核苷 + H] ⁺			152				
	四氢嘌呤环	138	138					
	[M + Na] ⁺		338					
资 料 来 源		Pleasant et al , 1992					本文作者	

表 3 PSP 毒素种类与名称(R1、R2、R3、R4 为图 9 中 4 个取代基)(于仁诚、周名江, 1998)

R1	R2	R3	R4				
					OH		H
H	H	H	STX	GTX5(B1)	dcSTX	hySTX	doSTX
OH	H	H	neoSTX	GTX6(B2)	dcneoSTX	hyneoSTX	—
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX1	C3	dcGTX1	—	—
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX2	C1	dcGTX2	—	doGTX2
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX3	C2	dcGTX3	—	doGTX3
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX4	C4	dcGTX4	—	—

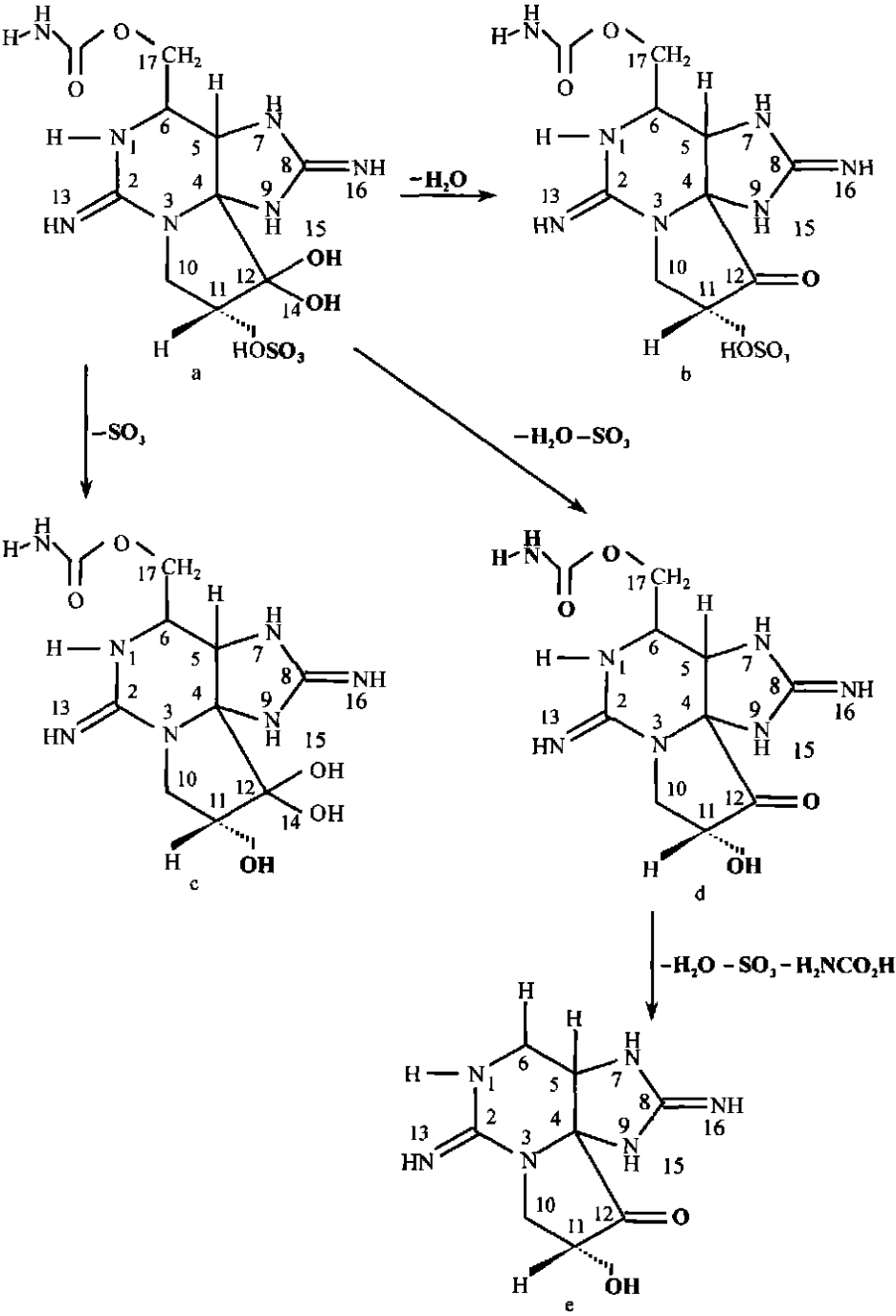


图 10 GTX2 的断裂过程

图中黑体示断裂前后的基团部位

a GTX2; b GTX2 失去 H₂O; c GTX2 失去 SO₃; d GTX2 失去 H₂O 和 SO₃;

e GTX2 失去 H₂O、SO₃ 和 H₂NCO₂H

有意思的是, 在制得的 GTX1, 4 质谱图(图 4a)中, 对应于 GTX1, 4 的分子离子峰 412, 有一个小峰 416, 比分子离子峰多 4; 对应于 GTX1, 4 的钠化分子 434, 也有一个 438 的小峰存在。将峰 416 进一步断裂, 所产生的碎片峰 336(图 6)也比分子离子峰 412 断裂的碎片峰 332 多 4(表 4)。离子 416 是什么? 离子 416 与 GTX1, 4 的确切关系如何? 为什么在 GTX1, 4 的质谱图中存在此峰, 而在 GTX2, 3 的质谱图中却无相应的峰出现? 这些问题将有待今后进一步研究。

表 4 GTX1, 4 分子离子 412 和未知分子离子 416 的碎片比较

	GTX1, 4 分子离子 412	未知分子离子 416
[M+Na] ⁺	434.0	438.0
[M+H] ⁺	412.1	416.1
[M-SO ₃ +H] ⁺	332.3	336.1

参 考 文 献

Baden D. G., 1983, Marine food-borne dinoflagellate toxins In: "International Review of Cytology" (Bourne G. H., Danielli J. F. eds.), Academic Press, New York, 82: 99~150.

Barber M., Bordoli R. S., Elliot G. J., et al., 1982, Fast atom bombardment mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 54: 645A~657A.

Bates H. A., Rapoport H., 1975, A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison, *J. Agric. Food Chem.*, 23 (2): 237~239.

Hall S., Strichartz G., Moczydlowski E., et al., The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology, In: "Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology" (Hall S., Strichartz G. eds.), American Chemical Society, Washington, DC, 418: 29~65.

Helrich K., 1990, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15thed. Arlington, VA AOAC Inc., 881~882.

Hines H. B., 1993, Electrospray ionization of selected low-molecular-weight natural biotoxins, *Biol. Mass Spectrom.*, 22: 243~246.

Lagos N., Onodera H., Zagatto P. A., et al., 1999, The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil, *Toxicon*, 37: 1359~1373.

Lukas B., Thielert G., Peters K., 1990, Zur Problematik der selektiven Erfassung von PSP-toxinen aus Muscheln, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 190: 491~495.

McFarren E. F., Schantz E. J., Campbell J. E., et al., 1958, Chemical determination of paralytic shellfish poison in clams, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 41: 168~177.

Oshima Y., Sugino K., Yasumoto T., 1989, Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins, *Mycotoxins and Phycotoxins*, 319~326.

Pereira P., Onodera H., Andrinolo D., et al., 2000, Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* isolated from Montargil reservoir, Portugal, *Toxicon*, 38: 1689~1702.

Pleasant S., Ayes S. W., Laycock M. V., et al., 1992, Ion spray mass spectrometry of marine toxins III. Analysis of paralytic shellfish poisoning toxins by flow injection analysis, liquid chromatography/mass spectrometry and capillary electrophoresis/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 6(1): 14~24.

Poon G. K., Griggs L. J., Edwards C., et al., 1993, Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry of cyanobacterial toxins, *J. Chromatogr.*, 628: 215~233.

- Quilliam, M. A., Thomson, B. A., Scott, G. J., et al., 1989, Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 3: 145 ~ 150.
- Sommer, H., Meyer, K. F., 1937, Paralytic shellfish poisonings, *Arch. Path.*, 24: 560 ~ 598.
- Yu, R. C., Hummert, C., Lucas, B., et al., 1998, A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China, *Chromatographia*, 48(9/10): 671 ~ 676.

STUDY ON PARALYTIC SHELLFISH POSIONING TOXINS

II. ANALYSIS OF PURIFIED PARALYTIC SHELLFISH POSIONING TOXINS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY^{*}

WANG Yunfeng, YU Rencheng, LI Jun, YAN Tian, ZHOU Mingjiang

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences*)

Abstract

High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC-FD) and Mass Spectrometry (MS) have been used to analyze the purified Gonyautoxin2, 3 (GTX2, 3) and Gonyautoxin1, 4 (GTX1, 4), the compound in the family of toxins responsible for paralytic shellfish poisoning (PSP), from a strain of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. The results showed that the retention time of the purified GTX2, 3 and the purified GTX1, 4 was the same as that of the standard GTX2, 3 and the standard GTX1, 4 by the HPLC method. Combining the purified GTX2, 3 and the purified GTX1, 4 showed the typical poisoning symptom of PSP toxins by mouse bioassay, the author thought the purified toxins were GTX2, 3 and GTX1, 4. The positive ionization produced the typical $[M+H]^+$ molecular ion of the purified GTX2, 3 and the purified GTX1, 4 (m/z 396 and 412), which was the same as that of the standard GTX2, 3 and the standard GTX1, 4 by MS method. The fragment ions of the purified GTX2, 3 (m/z 378, 316, 298) and the purified GTX1, 4 (m/z 394, 332, 314), generated by Collision Induced Dissociations (CID) of their respective $[M+H]^+$ ions, were also identical to those obtained for the standard GTX2, 3 and the standard GTX1, 4. They were further confirmed that the purified toxins were GTX2, 3 and GTX1, 4. Of course, the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Infrared (IR) are needed to fully confirm the results.

^{*} Contribution No. 4365 from the Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences.