

剧毒卡罗藻 GM5 株中标志性毒素 4,5-dihydro-KmTx2 的色谱制备

陈蓉¹, 王如坤², 李伟¹, 黄立明¹, 曹嘉懿^{1*}, 周成旭¹, 李双^{1,2}, 徐继林¹

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波海关 技术中心, 浙江 宁波 315040)

摘要: 建立了剧毒卡罗藻 GM5 株中标志性毒素 4,5-dihydro-KmTx2 的分离纯化体系, 通过高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)对其纯化效果进行评价。过滤后的培养液经大型固相萃取柱(YMC-GEL ODS-A-HG, 80 cm×10 cm, 12 nm, S-50 μm)进行富集, 依次用体积分数为 10%、40%和 60%的甲醇溶液进行淋洗, 体积分数为 80%的甲醇溶液进行洗脱, 得到目标化合物粗提液(纯度为 51.3%)。采用半制备型高效液相色谱技术进一步分离纯化, 使得目标化合物纯度高达 93.2%。该方法提取及纯化效率高, 可操作性强, 可以为 4,5-dihydro-KmTx2 的规模化生产及功能活性研究提供技术支持。

关键词: 液相色谱; 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 4,5-dihydro-KmTx2; 剧毒卡罗藻 GM5 株
中图分类号: O657 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-5132 (2020) 02-0001-06

近年来卡罗藻(*Karlodinium veneticum*)引起的赤潮在世界范围内频发, 研究者们对卡罗藻的关注度越来越高。周成旭等^[1]首次对中国东海分离的一株卡罗藻进行了相关毒性检测, 结果显示该藻细胞内外提取物均表现出不同强度的生物毒性。卡罗藻中分离得到的生物毒素称为卡罗藻毒素(Karlotoxins, 简称 KmTxS), 具有溶血性、鱼毒性、细胞毒性和胚胎毒性等多种毒性特征^[2]。剧毒卡罗藻产生的这类毒素, 不仅可以防御袭击^[3], 还能麻痹生物, 从而进行捕食等^[4]。由于卡罗藻毒素独特的化学结构和高生物活性, 已成为国内外海洋药物研究的热点^[5], 但该毒素目前尚无法人工合成, 只能从天然样品中提取、纯化。然而, 获取微量的毒素需要大量的资金投入和技术支撑, 因而限制了对该毒素的深入研究。目前, 国内外尚未见有关 4,5-dihydro-KmTx2 分离纯化技术的研究报道。

本文首次通过色谱分离技术, 建立了剧毒卡罗藻 GM5 株中标志性毒素 4,5-dihydro-KmTx2 的分离纯化体系, 通过高效液相色谱-四极杆/静电场轨

道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)对其纯化效果进行评价, 以期为进一步开展 4,5-dihydro-KmTx2 的毒理和病理研究提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Q-Exactive 四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司), 配置有 H-ESI II 源。液相色谱系统为 UltiMate 3000 高压液相色谱带自动进样器。色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C18 柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)。高效液相色谱仪(美国沃特世 2996), 配置有 PDA 紫外检测器; 半制备柱为 YMC-Pack ODS-A(10 mm×250 mm, 5 μm); YMC-GEL ODS-A-HG 固相萃取柱(10 cm×80 cm, 12 nm, S-50 μm), 使用前采用 1 L 甲醇进行活化, 并静置 30 min。Milli-Q 高纯水发生器(美国 Millipore 公司)。滤膜(DIKMA, Nylon 0.22 μm)。旋转蒸发仪(德国 IKA 公司)。

Amphidinols(AMs)标准品购自 Sigma 公司, 纯

收稿日期: 2019-09-23。

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900400); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49); 浙江省分析测试科技计划项目(2018C37072); 浙江省科技重大专项(2019C02057); 宁波市“科技创新 2025”重大专项(2019B10006)。

第一作者: 陈蓉(1992-), 女, 山西太原人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋生物化学。E-mail: chenrong321@163.com

*通信作者: 曹嘉懿(1989-), 女, 江苏南通人, 讲师, 主要研究方向: 海洋微藻生物。E-mail: caojiayi@nbu.edu.cn

度 $\geq 95\%$ 。色谱纯甲酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)。甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司)。实验用水为 Milli-Q 超纯水($18.2 \Omega \cdot \text{cm}$)。f/2 配方中化学试剂为分析纯, 购自南京化学试剂一厂。

1.2 藻类的培养

剧毒卡罗藻 GM5 株由宁波大学海洋生物藻种实验室提供。培养海水为 pH 8.30, 盐度 28, 使用前经 $0.45 \mu\text{m}$ 醋酸纤维滤膜过滤后煮沸冷却, 培养液采用 f/2 配方。将卡罗藻 GM5 接种到装有灭菌海水的 5.0 L 锥形瓶中, 初期接种密度为 $3.2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 光强 $3\,000 \sim 4\,000 \text{ lx}$, 温度 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 每天摇晃 3 次, 通过血球计数板测量藻种密度。经测定, 21 d 左右藻种达到最大密度, 因此连续培养 21 d。每组实验设 3 组平行。

1.3 4,5-dihydro-KmTx2 回收率及纯度测定

目前, 市场上无法购买到 4,5-dihydro-KmTx2 标准品, 而化合物 AMs 无论是元素组成还是化合物结构均与目标化合物相似^[6](图 1)。因此, 可通过 4,5-dihydro-KmTx2 结构类似物, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 验证不同纯化方法的回收率。利用高分辨质谱技术, 对制备得到的 4,5-dihydro-KmTx2 单体化合物构成进行检测, 并通过内标法计算得到目标混合物 4,5-dihydro-KmTx2 单体的纯度。

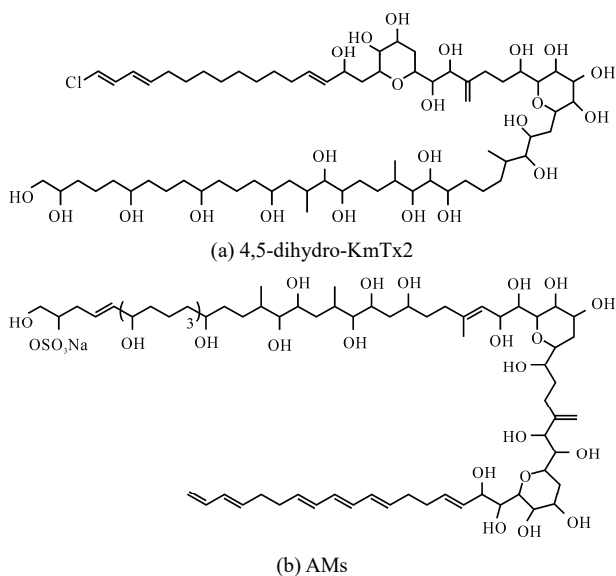


图 1 化学结构

1.4 藻毒素粗提物的制备

剧毒卡罗藻液 GM5 株中含有大量的色素、有

机酸类、光合膜脂和低极性的甘油三酯等化合物^[7], 这些物质的存在会干扰 4,5-dihydro-KmTx2 毒素的检测, 必须通过技术手段加以去除。从文献[8]可知, 剧毒卡罗藻 GM5 株含有的 4,5-dihydro-KmTx2 在整个平台期持续积累, 并在平台末期达到最高值, 去藻上清液的毒素活性稳定在较高水平。收集平台末期藻液, 超声 5 min, $4\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 得到上清液; 取上清液沿 YMC-GEL ODS-AHG 固相萃取柱侧壁缓慢上样(1 L), 依次分别用 1.0 L 体积分数为 10%、40%和 60%的甲醇溶液进行淋洗, 用 1.0 L 体积分数为 80%的甲醇溶液进行洗脱, 得到藻毒素粗提液, 旋蒸浓缩(40°C), 冷冻干燥后保存(-80°C)。取上述粗提物 1 mg, 用体积分数为 80%的甲醇溶液复溶, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜, 待分析。

1.5 4,5-dihydro-KmTx2 的确定

将获得的粗提物化合物经 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术进行解析, 保留时间为 6.21 min 时的峰响应度最高。为进一步明确其化学结构, 在 ESI^+ 离子模式下形成 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰, m/z 1369.7985 形成的二级碎裂片段如图 2 所示。获得的毒素化合物二级碎裂片段的特征离子峰(939.5587、735.5632、647.5031)与文献[9]进行对比, 确定该毒素为 4,5-dihydro-KmTx2。

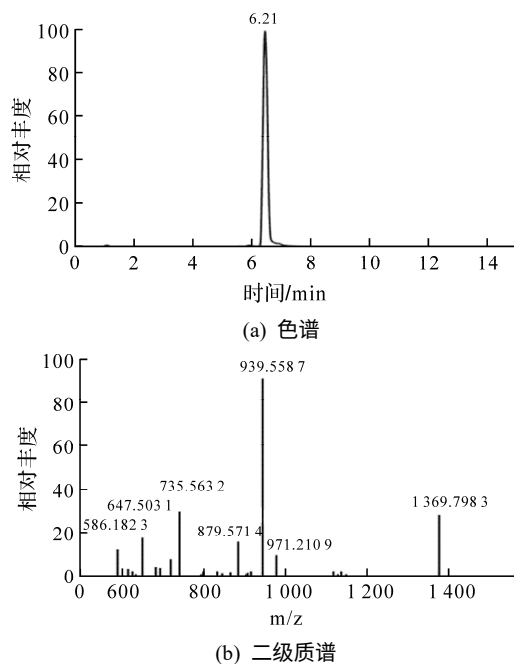


图 2 4,5-dihydro-KmTx2 标准物质

1.6 4,5-dihydro-KmTx2 毒素化合物的半制备色谱纯化

固相萃取技术可很好地分离去除一些杂质成分,但是对于结构及极性极相似的毒素单体混合物很难去除,需要采用半制备型高效液相技术进一步分离、纯化^[10-12]。半制备色谱纯化仪器条件为:流动相 A: 水; 流动相 B: 甲醇; 色谱柱 YMC-Pack ODS-A(10 mm×250 mm, 5 μm); 洗脱梯度: 0~6 min, 10%~50%B; 6~15 min, 50%~100%B; 15~20 min, 100%B。检测波长 234 nm, 流速 2 mL·min⁻¹, 进样量 5 mL。根据出峰时间分段收集制备液,并利用高分辨质谱对收集的各段化合物进行质谱解析,确定目标化合物 4,5-dihydro-KmTx2 毒素在上述实验条件下的洗脱时间,大量收集该时间段的制备液,冷冻干燥后保存(-80℃)。取上述纯化物 1 mg,在体积分数为 80%的甲醇溶液中复溶,过 0.22 μm 滤膜,待分析。

1.7 仪器条件

色谱条件: 色谱柱 Hypersil Gold C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm), 柱温 40℃, 流动相 A: 0.1%甲酸水溶液; 流动相 B: 甲醇溶液(含 0.1%甲酸); 梯度洗脱: 0~6 min, 10%~80%B; 6~12 min, 80%B; 12~15 min, 80%~100%B; 15~18 min, 100%B; 18~25 min, 100%~10%B。流速: 0.2 mL·min⁻¹, 进样量: 10 μL。

质谱条件: 正离子模式; 质量范围: m/z 300~1500; 分辨率 70 000; 自动增益控制(AGC)目标值 10e⁶; 喷雾电压 3 000 V; 离子传输管温度 300℃; 鞘气压(N₂) 350 MPa; 辅助气压(N₂) 100 MPa; 气化室温度 350℃。在样品运行前对仪器进行正离子校正; 二级采用自动触发模式, 分辨率 35 000, AGC 目标值 2e⁵, 碰撞能量范围 25%~40%。保留时间采集范围: 根据一级色谱图中各个目标物质的保留时间(RT)±1.00 min。

2 结果与讨论

2.1 藻毒素粗提物的纯化结果

甲醇溶解性好、渗透强,已经成为固相萃取柱中常用溶剂^[13]。实验中分别考察甲醇体积分数为 10%、40%、60%、80%和 100%时对待测化合物 4,5-dihydro-KmTx2 回收率的影响,并且通过 4,5-

dihydro-KmTx2 结构类似物(AMs)绘制标准曲线,验证不同纯化方法的回收率。结果表明: 当甲醇体积分数低于 40%时,AMs 不能洗脱,回收率均为 0; 当甲醇体积分数为 60%时,AMs 部分洗脱,回收率为 17.2%; 当甲醇体积分数为 80%和 100%时,AMs 才能洗脱,回收率趋于稳定,均能达到 80%以上(图 3)。

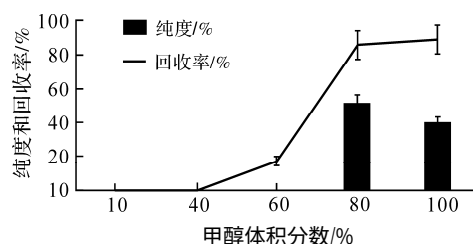


图3 不同洗脱条件下 AMs 回收率及目标化合物纯度

此外,在保证回收率的前提下,纯度也是重要的评价指标。利用内标法对毒素粗提物中含有 4,5-dihydro-KmTx2 的纯化值进行评价,结果表明: 当甲醇体积分数为 80%和 100%时,4,5-dihydro-KmTx2 毒素纯度分别为 51.3%和 42.7%(图 3)。因此,将体积分数为 40%和 60%的甲醇溶液作为淋洗液,去除藻液中小分子极性组分(包括水溶性色素、有机酸类等)^[14]; 用体积分数为 80%的甲醇溶液作为洗脱液,在保证回收率的前提下,可提高目标物 4,5-dihydro-KmTx2 的纯度(51.3%); 最后采用 100%甲醇对大型固相萃取柱(YMC-GEL ODS-A-HG)进行清洗和再生,洗脱去除残留在 SPE 柱上的非极性物质(包括光合膜脂、甘油三酯、磷脂及脂溶性色素等)^[15]。将得到的藻毒素粗提液旋蒸浓缩(40℃),冷冻干燥后保存(-80℃),获得 4,5-dihydro-KmTx2 粗提物 70 mg。

2.2 高纯度 4,5-dihydro-KmTx2 毒素化合物的制备结果

大型固相萃取柱(YMC-GEL ODS-A-HG)净化后,得到的 4,5-dihydro-KmTx2 粗提物主要为几种相似毒素单体混合物,普通的固相色谱纯化手段很难对其进行完全分离。陈永芳^[16]利用高效液相色谱对微囊藻毒素 MC-LR 纯品进行制备,最后得到纯度为 90%以上的微囊藻毒素-LR 纯品; 卫涛^[17]利用高效液相色谱对微囊藻毒素进行分离,结果重现性好,且具有很高的精密度和回收率。

本文采用半制备型高效液相色谱技术进一步

纯化粗提液, 并利用高分辨质谱技术确证目标化合物的制备时间. 结果表明: 前 5 min 为杂质干扰峰, 10~30 min 间色谱峰最高的物质即为目标物. 为提高目标毒素物质的纯度, 对洗脱梯度进行优化, 采用洗脱梯度为 0~6 min, 10%~0% 甲醇; 7~15 min, 30%~100% 甲醇; 16~30 min, 100%~10% 甲醇进行进样后, 结果如图 4(a)所示. 采用洗脱梯度为 0~6 min, 10%~80% 甲醇; 7~15 min, 80%~100% 甲醇; 16~30 min, 100%~10% 甲醇进行进样后, 结果如图 4(b)所示. 杂质对目标化合物形成干扰, 通过洗脱流速的优化, 也无法完全分离. 采用洗脱条件为 0~6 min, 10%~50% 甲醇; 7~15 min, 50%~100% 甲醇; 16~30 min, 100%~10% 甲醇进行进样后, 峰形对称如图 4(c)所示, 可完全分离目标物与杂质峰. 最终, 杂质在梯度为 24.87%~29.73% 和 60.84%~55.02% 甲醇时出峰, 目标毒素在 95.22%~100%~94.21% 甲醇时出峰.

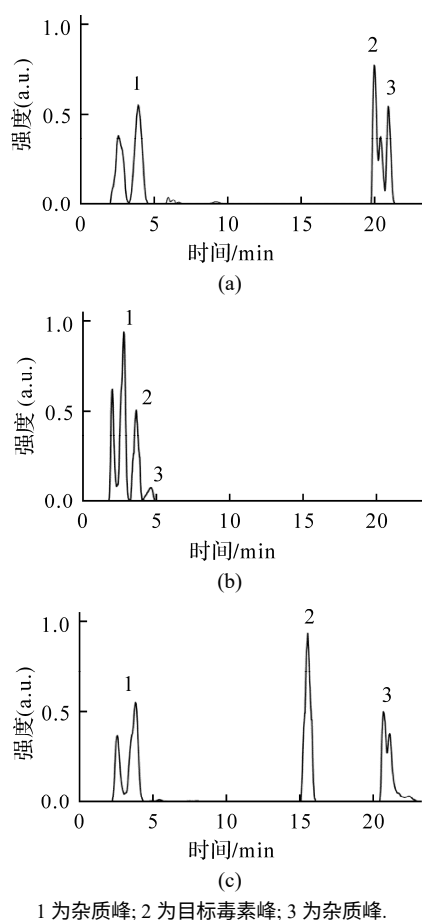
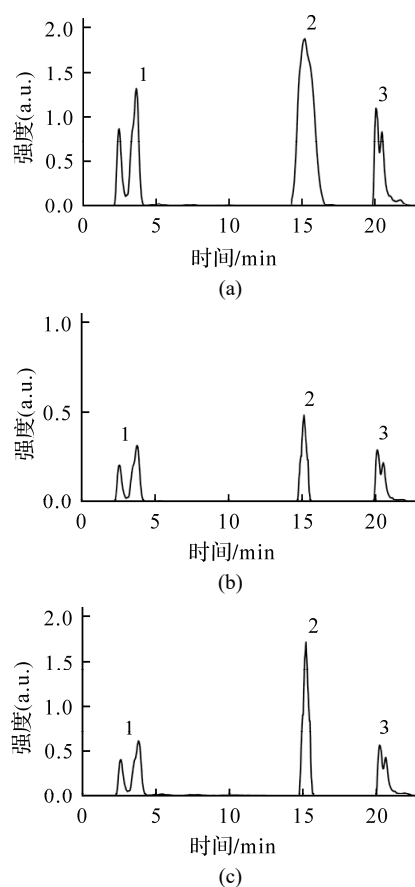


图 4 3 种不同梯度洗脱下 4,5-dihydro-KmTx2 粗提液的高效液相色谱

对进样量进行优化: (1)当进样量为 10 mL 时, 部分色谱峰峰型过宽, 色谱柱出现过载现象, 缩短色谱柱使用寿命(图 5(a)); (2)当进样量为 1 mL 时, 色谱峰峰形较好, 但进行大批量制备时, 耗费时间较多(图 5(b)); (3)当进样量为 5 mL 时, 色谱峰峰形对称, 响应值高, 无载样量高情况出现, 适合进行大批量制备(图 5(c)). 实验结果表明: 制备方法(3)具备较高的可行性, 能够为 4,5-dihydro-KmTx2 的规模化生产提供参考.



1 为杂质峰; 2 为目标毒素峰; 3 为杂质峰.

图 5 3 种不同进样量下 4,5-dihydro-KmTx2 粗提液的高效液相色谱

经鉴定, 采用半制备液相色谱分离后, 保留时间为 15.14 min 的组分为 4,5-dihydro-KmTx2 毒素, 收集该保留时间下 4,5-dihydro-KmTx2 洗脱液 78 mL, 冷冻干燥后保存(-80 °C). 利用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS, 在扫描范围: m/z 500~2 000 内利用内标法对 4,5-dihydro-KmTx2 纯化效果进行评价. 结果表明: 半制备型高效液相色谱分离后的 4,5-dihydro-KmTx2 纯度可达 93.2%.

2.3 仪器条件优化

分别用色谱柱 Hypersil Gold C18 柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)和色谱柱 Hypersil Gold C18 柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)对 4,5-dihydro-KmTx2 进行色谱分离。结果显示:除了保留时间有差异外,2种色谱柱均能很好地分离几种化合物;但在实际试验中,粒径为 1.9 μm 的色谱柱流速更小,可以很好地节约有机溶剂,更符合日常检测中快速、高效、经济的原则。因此,本实验采用 1.9 μm 粒径的色谱柱检测 4,5-dihydro-KmTx2 化合物,得到了纯度为 93.2% 的 4,5-dihydro-KmTx2 标准品。

高效液相色谱分析的运行条件采用 1.5 节中的参数,不同的是在流动相中添加了 0.1% 甲酸溶液,对梯度作了更改,目的是为了提离碎片离子强度和优化出峰时间^[18]。

在流动相中加入体积分数为 0.1% 甲酸溶液能增加正离子检测模式下电离效率,促进 $[M+H]^+$ 离子生成^[19],同时也可以进一步考察甲酸铵缓冲液离子强度对电离效率的影响^[20],包括:(1)不添加助离子化试剂;(2)加入体积分数为 0.1% 的甲酸溶液;(3)加入 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液;(4)同时加入体积分数为 0.05% 甲酸溶液和 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液。结果表明:在条件(2)和(4)下均获得相对较好的色谱峰形、分离效果和质谱信号响应。从降低仪器污染的角度,选择了加入体积分数为 0.1% 的甲酸溶液作为流动相,全过程选择梯度洗脱方式,通过优化流动相梯度洗脱条件实现 4,5-dihydro-KmTx2 毒素化合物的有效分离。最终得到纯度为 93.2% 的 4,5-dihydro-KmTx2 标准品。

3 结论

以剧毒卡罗藻 GM5 株为原料,运用组合色谱手段,研究了 4,5-dihydro-KmTx2 的制备方法,得到如下结论:

(1)运用液液萃取及大型固相萃取柱 YMC-GEL ODS-A-HG 可分离出 4,5-dihydro-KmTx2 粗提液。利用不同体积分数甲醇溶液对毒素进行洗脱,当甲醇体积分数为 80% 和 100% 时,回收率均超过 80%;在保证高回收率前提下,在体积分数为 80% 甲醇的洗脱液中 4,5-dihydro-KmTx2 纯度更高,故选用体积分数为 80% 的甲醇洗脱液对 YMC-GEL

ODS-A-HG 固相萃取柱进行洗脱并收集。

(2)利用半制备型高效液相色谱技术,从 4,5-dihydro-KmTx2 粗提液中成功分离得到纯度为 93.2% 的 4,5-dihydro-KmTx2 毒素化合物。为了能够将 4,5-dihydro-KmTx2 与杂质更好地分离,得到纯度更高的标准品,对流动相种类、梯度洗脱程序、流速等仪器参数进行了适当调整,利用内标法对制得的标准品进行纯化效果评价,最终确定最优的制备条件为:洗脱 0~6 min, 10%~50% 甲醇;7~15 min, 50%~100% 甲醇;16~30 min, 100%~10% 甲醇;进样量为 5 mL;采用 Hypersil Gold C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)色谱柱;流动相中加入体积分数为 0.1% 甲酸。最终得到纯度为 93.2% 的 4,5-dihydro-KmTx2 标准品。

(3)本文提出的方法可操作性强,能够为 4,5-dihydro-KmTx2 的规模化生产提供参考。

参考文献:

- [1] 周成旭,傅永静,严小军.新型赤潮种类微小卡罗藻的溶血毒性检测[J].海洋通报,2007,26(3):112-116.
- [2] 许亚如,何山,周成旭,等.卡罗藻毒素研究进展[J].海洋科学,2014,38(10):113-118.
- [3] Waggett R J, Tester P A, Place A R. Anti-grazing properties of the toxic dinoflagellate *Karlodinium veneficum* during predator-prey interactions with the copepod *Acartia tonsa*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2008, 366:31-42.
- [4] Sheng J, Malkiel E, Katz J, et al. A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(5):2082-2087.
- [5] 邴晖,高炳森,于海鹏,等.海洋生物毒素研究新进展[J].海南大学学报(自然科学版),2011,29(1):78-85.
- [6] Houdai T, Matsuoka S, Morsy N, et al. Hairpin conformation of amphidinols possibly accounting for potent membrane permeabilizing activities[J]. Tetrahedron, 2005, 61(11):2795-2802.
- [7] Place A R, Bowers H A, Bachvaroff T R, et al. *Karlodinium veneficum*—The little dinoflagellate with a big bite[J]. Harmful Algae, 2012, 14:179-195.
- [8] Bachvaroff T R, Adolf J E, Place A R. Strain variation in *Karlodinium veneficum* (dinophyceae): Toxin profiles, pigments, and growth characteristics[J]. Journal of Phycology, 2009, 45(1):137-153.
- [9] Cai P J, He S, Zhou C X, et al. Two new karlotoxins

- found in *Karlodinium veneficum* (strain GM2) from the East China Sea[J]. Harmful Algae, 2016, 58:66-73.
- [10] 沈斐, 许燕娟, 姜晟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水华样品中微囊藻毒素及其基质效应的消除[J]. 色谱, 2017, 35(7):772-777.
- [11] 郑立洋, 陈娟娟, 徐继林, 等. 高效液相色谱-三重四极杆质谱同时测定与筛查海洋浮游藻类中的 5 种色素[J]. 色谱, 2014, 32(9):992-998.
- [12] 吴海燕, 郭萌萌, 赵春霞, 等. 液相色谱-串联质谱法筛查原多甲藻毒素及其代谢产物[J]. 色谱, 2016, 34(4):401-406.
- [13] 徐娜, 逢少军, 刘峰. 一株桑沟湾赤潮藻的分子鉴定[J]. 海洋科学, 2012, 36(4):13-18.
- [14] Bachvaroff T R, Adolf J E, Squier A H, et al. Characterization and quantification of karlotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Harmful Algae, 2008, 7(4):473-484.
- [15] Deeds J R, Hoesch R E, Place A R, et al. The cytotoxic mechanism of karlotoxin2 (KmTx2) from *Karlodinium veneficum* (dinophyceae)[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 159(1):148-155.
- [16] 陈永芳. 微囊藻毒素 MC-LR 纯品的制备工艺研究[D]. 济南: 济南大学, 2011.
- [17] 卫涛. 微囊藻毒素的分离、分析和制备[D]. 南京: 东南大学, 2005.
- [18] 丁西飞, 王彦霏, 章群, 等. 珠江口海域 3 种重要有害藻类的溶血毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 66-76.
- [19] Krock B, Busch J A, Tillmann U, et al. LC-MS/MS detection of karlotoxins reveals new variants in strains of the marine dinoflagellate *Karlodinium veneficum* from the Ebro Delta (NW Mediterranean)[J]. Marine Drugs, 2017, 15(12):391-411.
- [20] Guibal R, Lissalde S, Charriau A, et al. Coupling passive sampling and time of flight mass spectrometry for a better estimation of polar pesticide freshwater contamination: Simultaneous target quantification and screening analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1387:75-85.

Chromatographic preparation of 4,5-dihydro-KmTx2 from *Karlodinium veneficum* GM5 strain

CHEN Rong¹, WANG Rukun², LI Wei¹, HUANG Liming¹, CAO Jiayi^{1*}, ZHOU Chengxu¹, LI Shuang^{1,2}, XU Jilin¹

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo 315832, China;

2.Technology Center, Ningbo Customs, Ningbo 315040, China)

Abstract: A separation and purification system for the toxin 4,5-dihydro-KmTx2 in *Karlodinium veneficum* GM5 strain at the end of the platform was established. The purification effect of the system was evaluated by high-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS). First, the collected culture solution following the removal of the algae was enriched on a large solid-phase extraction column (YMC-GEL ODS-A-HG, 10 cm×80 cm, 12 nm, S-50 μm). The results showed that leaching was accomplished in sequence by using 10%, 40% and 60% methanol solution. The purity of the crude extract obtained by elution with 80% methanol was 51.3%. The crude extract was separated and purified by semi-preparative HPLC. The purity of the 4,5-dihydro-KmTx2 monomer was 93.2% with gradient elution using a methanol-water mixture as the mobile phase. The method has high extraction efficiency and operability, which can provide technical support for large-scale production and functional activity research of 4,5-dihydro-KmTx2.

Key words: liquid chromatography; quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry; 4,5-dihydro-KmTx2; *Karlodinium veneficum* strain GM5

(责任编辑 史小丽)