

赤潮生物毒素——石房蛤毒素生化研究进展*

史元沂

(青岛市环境保护科学研究所)

赤潮及其危害

由于海洋浮游生物个别物种的暴发性繁殖,海水中的生物个体达到了很高的浓度^[1],致使局部海区水色异常,据物种和浓度的不同,或红或赤,或褐或碧,这种现象,叫做赤潮。形成赤潮的浮游生物,往往是细胞中含有橙色或红色色素的甲藻^[2]。水温、日照、盐度、降雨和江河径流等水文和气象要素都是赤潮的影响因子,特别是海岸上升流(Coastal upwelling)因对浮游生物的集中起运送的作用,对温度、盐度和营养物质的分布起混合作用,因而被认为是某些赤潮形成的关键^[3]。而海洋污染造成的富营养化(Eutrophication),即生物可利用的氮、磷、有机碳等营养成分的增加和聚积,则是促使赤潮暴发的另一原因。

赤潮的发生意味着生态平衡的破坏。在一定条件下它造成缺氧环境使海洋动物窒息。有些赤潮生物产生剧毒的代谢产物即生物毒素,使鱼类等中毒病变或死亡,直接破坏水产资源,并通过食物链危害人类。随着工业废水和城市生活污水对海洋污染的加剧,在日本,在北美两岸和北海各国沿岸,由五十年代至七十年代以来,赤潮暴发每趋频繁,成为愈演愈烈的公害^[4]。现在一般认为,赤潮频繁出现是海洋污染的危险信号。考虑在四个现代化进程中我国沿江、沿海工业和城市迅猛发展的前景,对赤潮问题及早进行科学

研究,实为我国海洋环境保护方面刻不容缓的任务。

赤潮生物毒素——石房蛤毒素的生物化学

一、概 况

对于赤潮这样一种奇异而肖森的自然景象,人们进行观察和研究已有很久的历史,例如在《旧约》中就有了关于赤潮现象的描述^[5],而大规模的^[6]赤潮生物毒素的生物化学研究,则于第二次世界大战后期发端于美国,按其背景,与其说出于公共卫生问题的考虑^[5],毋宁说是为了发展高效失能剂^[6a]或致死剂而寻找生物分子模型^[6]。七十年代以来,随着环境科学的产生和发展,赤潮问题的科学研究工作赋有了新的内容和意义。赤潮生物毒素的生物化学研究,一般认为是赤潮

* 本文承山东海洋学院海洋化学系唐思齐先生、海洋生物学系李冠国教授审阅,中国科学院动物研究所严绍颐教授提了宝贵意见;本文基于作者在1965年底就此毒素当时的研究进展写的综述,曾蒙程伊洪教授审阅,谨此一并致谢。

注1 河里的水,都变作血了。河里的鱼死了,河也腥臭了,埃及人就不能吃这河里的水……。

——《旧约》:《出埃及记·第七章》,转引自文献[11]。

注2 为了提取1克纯净的石房蛤毒素,有时需要处理自8吨毒贝中取得的600磅吸水管(Siphons)^[14]。

注3 失能剂(Incapacitating agents):使作战对象的精神或躯体暂时失去正常功能但不造成死亡或永久性损伤的战剂^[6]。

基础理论研究的重要方面^[7],是防治赤潮危害、保护海洋环境、保护水产资源和人体健康的基础工作,是正在成长中的环境生物化学的一个组成部分。

赤潮浮游生物 *Gonyaulax catenella* 产生的毒素即石房蛤毒素 (Saxitoxin), 石房蛤毒素是一种神经毒素,分子量不大^[8,9]而性质剧毒,家兔静注致死剂量为 3—4 微克/公斤体重^[8,9],小鼠最低致死剂量 (MLD) 为 8—10 微克/公斤体重 (腹腔),约为人工合成的军用神经剂 DFP (Diisopropylfluorophosphate) 的 1/330^[10]。石房蛤毒素的分子结构问题在近年得到了彻底解决,在人们研究过的几种赤潮生物毒素中这是第一个,迄今为止也是唯一的一个。关于石房蛤毒素的其他生物来源问题^[8,9]、结构类似物的问题以及药理学、毒物学、化学测定和生物测试等问题,国外都有不少研究报告而本文概未述及。McFarren 等^[5]、Halstead^[11]、Schantz^[12,13] 等曾在不同时期对石房蛤毒素的研究工作进行详尽的综述, Kao^[14,15]、Scheuer^[16]、Russel^[17]、Narahashi^[18]、Baslow^[19] 等也曾写过述评。

二、石房蛤毒素的发现和确认

一百多年以来国外书刊时有记载,某些地区沿海居民食用海生软体动物,某些贝类,散发性地发生神经中毒。患者口唇、齿龈、舌和面部麻木或有烧灼感,逐渐扩展至颈项和四肢,据中毒剂量,可在 12 小时内以呼吸麻痹导致死亡^[12,13]。上述症状与胃肠性即霍乱性贝中毒或红斑性 (Erythematous) 即过敏性贝中毒明显不同,在临床上被称为麻痹性贝中毒 (Paralytic Shellfish Poisoning)^[11]。六十年代以前,国外作者主要从下述二种海洋软体动物中分离出麻痹性贝毒 (Paralytic Shellfish Poisons, 略作 PSP)^[12]:

Mytilus californianus, 加州贻贝; *Saxidomys giganteus*, 石房蛤属的一种,美俗称阿拉斯加奶油蛤 (Alaska butter clams), 简称奶油蛤

(Butter clams)。

研究人员逐渐注意到一个现象,即只是在赤潮暴发的情况下,该海区的软体动物才会变成有毒的动物。1937 年,美国加州大学生物化学家 H. Sommer 等^[20]报告,他们用加州贻贝和北美太平洋沿岸的重要赤潮浮游生物,双鞭毛藻纲中膝沟藻属的一种, *Gonyaulax catenella* 为材料,证实了贝毒的出现与赤潮浮游生物的依存关系。在实验室中用新鲜海水培养 *G. catenella*, 把正常无毒的贻贝放养其中,贻贝变为毒贝,毒性的增强与 *G. catenella* 的细胞数量相关;使用没有 *G. catenella* 的海水或仅在水中培养无毒的浮游生物,放养其中的贻贝保持正常。这就说明了毒物产生于赤潮浮游生物 *G. catenella* 之中,从而揭开了赤潮浮游生物与麻痹性贝毒的密切关系。1949 年, Riegel 和 Sommer 等^[21]从天然生长在海水的 *G. catenella* 中分离出了毒素。Burke 等^[22] 1960 年报告得到了 *G. catenella* 的无菌纯培养,并从其中分离出了毒素。他们把得自 *G. catenella* 的毒素和自加州贻贝分离出的毒素作比较,发现二者都是可透析的,有一致的纸层析行为,注入小鼠腹腔,生物效应一致。

以上这些研究结果说明, *G. catenella* 毒素是浮游生物自身的代谢产物,它的形成与共生细菌无关。加州贻贝毒素与 *G. catenella* 毒素是相同的化学成份。正常情况下无毒的贻贝之变为毒贝,是它们在赤潮暴发时大量摄食有毒的 *G. catenella* 的结果。Schantz 和 Mold 等^[23] 比较了加州贻贝毒素和奶油蛤毒素的氧化物和氢化物(二氢衍生物)的紫外吸收光谱和红外吸收光谱, Mold 和 Schantz 等^[24] 比较了这二个来源不同的毒素及毒素的二氢

注 4 已知的最烈毒物是肉毒毒素 A (Botulinus toxin A), 小鼠最低致死剂量 0.00003 微克/公斤体重(腹腔), 分子量约 900,000^[10]; 石房蛤毒素, $[C_{16}H_{17}N_7O_4]^{2+}$, Mw. 299.30。

注 5 另一种重要的赤潮浮游生物 *Gonyaulax tamaris* 产生石房蛤毒素及另一毒性化合物^[1,29]。

衍生物在几个溶剂系统中的纸层析行为,指出了贻贝毒素和奶油蛤毒素的化学性质和物理性质极其类似。

1966年, Schantz 和 Rapoport 等^[25]用 *G. catenella* 的无菌培养物为材料, 确证了 *G. catenella* 毒素和加州贻贝毒素以及奶油蛤毒素是相同的化合物。用相同的方法对三种来源的生物毒素进行纯化, 比较它们的红外吸收、紫外吸收、扩散系数、pKa 和比旋度等, 比较三者在不同溶剂系统中的纸层析行为, 用动物做了毒性试验, 结果无不一致。把三种来源的生物毒素分别以相同的条件进行化学降解, 降解产物各自的和混合的熔点相同, 以相同的条件分别使之氧化, 三个氧化产物的紫外吸收、红外吸收、核磁共振数据和纸层析 R_f 值也都一样。根据对 *G. catenella* 毒素的元素分析, 以二盐酸盐的形式计算了它的分子式, 求出了分子量, 与对加州贻贝毒素和奶油蛤毒素分析计算得到的数据是相同的。总之, 通过长时期的大量工作, 结论是, 贻贝毒和奶油蛤毒全都来源于赤潮浮游生物 *G. catenella*, *G. catenella* 只产生一种^[26]毒性化合物^[1]。Schuett 和 Rapoport^[26]根据这个毒性化合物的生物来源之一 *Saxidomus giganteus* 的属名 *Saxidomus* 一词, 最先把这个毒性化合物称做 *Saxitoxin*, 石房蛤毒素。这个名称后来逐渐为文献所接受, 从而逐渐改变了本毒素在文献中名称混乱的现象。

三、分离和纯化

1944年, 加州大学的 H. Sommer 等人在美国陆军支持下开始进行麻痹性贝毒的分离和纯化工作, 这是在以后持续多年的石房蛤毒素大规模生化研究工作的开端。Sommer 等起初用人造沸石^[27]或活性炭吸附层析^[28]的方法浓缩加州贻贝消化腺 (*Hepatopancreas*) 酸性乙醇提取物中的毒素, 结果不够理想, 后来 Detrick 要塞的 Schantz 等人先用羧酸型阳离子树脂作柱层析, 再用酸性氧化铝柱进

一步纯化, 分离出了纯净的毒素^[29]。把用上述方法制备的蛤毒盐酸盐以铂黑催化氢化, 还原成二氢衍生物, 用逆流分溶 (Counter Current Distribution) 法研究其纯度, 发现该化合物的分溶曲线与计算得出的单一化合物的理论分溶曲线密切吻合^[24]。Schantz 等在五十年代发展的这一分离制备蛤毒的技术, 在七十年代文献中仍被沿用, 方法基本未变^[29]。

Mold 和 Schantz 等^[24]曾经发展了石房蛤毒素的分析规模的纸层析法, Casselman 和 Bannard^[30]将 Mold 和 Schantz 法略加变通, 发展了一个纯化蛤毒的半微量纸层析法。Bannard 和 Casselman 还发展了一个制备规模的纸层析法^[31], 又以纸电泳法纯化用纸层析法不能再提高其毒性的蛤毒^[32]。Buckley 等用薄层层析法根据 R_f 值和显色反应确认石房蛤毒素^[29], 又循次以弱酸性阳离子交换树脂、凝胶过滤、聚丙烯酰胺凝胶柱体、薄层层析法对毒素进行分离, 用荧光扫描技术予以鉴定^[33]。相信, 如高速液相色谱这样现代的分析分离技术, 将会在赤潮生物毒素的分离分析方面作出积极贡献。

四、结构研究

四十年代至六十年代, 持续进行本毒素的分离纯化工作的主要目的, 是制备纯品以研究这个天然化合物的分子结构。

自 1944 年 H. Sommer 领衔使用近代生物化学技术对麻痹性贝毒进行分离和提纯, 至 1974 年 Schantz 等^[1]制得石房蛤毒素对-溴苯磺酸盐晶体, 中间经历了三十个年头。1957 年 Schantz 等制得前已述及的石房蛤毒素二盐酸盐^[23], 则是这段漫长时间内一个重要的发展里程碑。石房蛤毒素二盐酸盐以其固有的非晶性、强极性和不挥发性, 使得结构分析极为困难^[34, 35]。但是, 关于本毒素结构

注 6 有的赤潮浮游生物产生一种以上的毒性化合物, 参见注 5。

研究的大量基础工作,都是使用这个化合物进行的。

1. 物化性质和结构推测

石房蛤毒素二盐酸盐易溶于水及甲醇,微溶于乙醇和冰醋酸,不溶于脂溶剂^[36],用比毒性 (Specific toxicity) 5500 MU/mg^[26],比旋度 $[\alpha]_D^{25} + 133^\circ$ 的纯净的石房蛤毒素二盐酸作元素分析,计算分子式为 $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2HCl$,分子量 372^[23,25]。用冰点降低法和扩散分析测定分子量,与元素分析计算值大体一致^[23]。

电位滴定结果表明,本化合物有二个可滴定的官能团, PK_{a1} 8.2—8.3, PK_{a2} 11.5—11.6 (在水中)^[25,34]。

在中性、酸性或碱性溶液中,1大气压氢气条件下,以铂黑催化氢化形成二氢衍生物, $C_{10}H_{19}N_7O_4 \cdot 2HCl$ ^[24],氢化后毒力丧失,失活程度与氢吸收平行^[36],达到最高值,每克分子毒素1克分子氢时,毒力丧失95—100%^[25]。

在碱性溶液中暴露于空气发生氧化作用,氧化后毒力丧失,其程度与氧吸收成正比,等克分子量的氧耗使毒素完全失活^[8,36]。

比旋度 $[\alpha]_D^{25} + 130 \pm 5^\circ$ ^[23],被还原成无毒的二氢衍生物后比旋度不变,氧化失活后比旋度下降至 0^[8,36]。

石房蛤毒素二盐酸盐没有紫外吸收峰,氧化失活后形成二个紫外吸收峰:

$[\lambda_{max} 235_{nm} (\epsilon 7000); \lambda_{max} 333_{nm} (\epsilon 5200)]$ ^[36]。

石房蛤毒素二盐酸盐在 3, 6, 9 μ 处有强烈的红外吸收^[8,30,36],其二氢衍生物在 5.65 和 8.75 μ 处的红外吸收消失^[25,36]。

用 Kjeldahl 法可将本化合物的氮全部转化成氨,据此推测它不含有硝基、连氮、偶氮或重氮基团,这就意味着可能是若干个氮原子处于一个杂环结构中^[8,36],化合物的强碱性也说明有一个胍基,它就在这个杂环之内^[36]。

根据氧化或还原后毒力丧失的现象,推测氧化或还原作用是破坏了毒性官能团所必需的一个不饱和键,氧化作用可能就是在这

个不饱和键发生的,还原作用则使它消失了^[8]。何况理论上在双键处建立一个氧桥只需要 1/2 克分子氧,而全部破坏本毒素的毒性,每克分子毒素却需要 1 克分子氧吸收,因此也可假定氧化作用就发生在不饱和键的位置,并且在这个官能键消失的同时发生了另外一个反应^[36]。

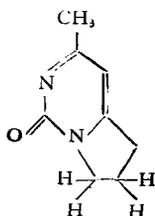
尽管不了解比旋光与毒性之间的确切关系,但由还原物毒性消失而比旋度不变这一点来推测,可能毒性的官能结构,并不在光活性中心 (Optical center)^[8,36]。设若如此,则通过合成途径得到生物活性结构的可能性就是很大的了^[8]。

2. 降解反应

Schantz 等起初试用强氧化剂如过碘酸或高锰酸钾对毒素二盐酸盐作剧烈的氧化处理,自反应液中分离出了胍基丙酸 (Guanidopropionic acid)、尿素、二氧化碳和氨等^[36],根据这些低分子量化合物无法提出结构概念。后来 Schuett 和 Rapoport^[26] 把石房蛤毒素与磷和氢碘酸在醋酸中共热,以 57% 的产率得到一个弱碱性化合物, $C_8H_{10}N_2O$ (I), 熔点 100—102 $^\circ C$,它含有一个 C—CH₃ 基团,可被氧化铂催化氢化,形成四氢衍生物, $C_8H_{14}N_2O$ (II), 熔点 129—131 $^\circ C$,仍含有一个 C—CH₃ 基团。根据化合物 II 的水解产物的性质,以及它不吸收紫外光但在 3410 和 1635 cm^{-1} 处有强烈红外光吸收的特点, Schuett 和 Rapoport 认为它可能是一个饱和的环状脲 (Cyclic urea)。从降解产物 I 的紫外光吸收 $[\lambda_{max}^{CH_3OH} 298_{nm} (\epsilon 6200)]$ 在酸性中移向 305 $_{nm} (\epsilon 8900)$ 的特点,参考已知化合物 1-甲基-2-嘧啶酮 (1-methyl-2-pyrimidone) 的紫外光吸收特性,推测它可能是一个共用一氮原子的吡咯烷-嘧啶酮的耦合化合物。他

注7 MU, Mouse Units, 鼠单位。腹腔注入1毫升毒素溶液,在注入后15分钟使1只体重20克的小白鼠致死的剂量为1 MU, 详见文献[13]。

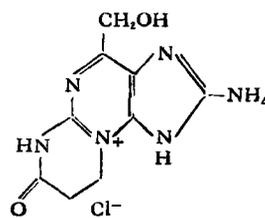
们合成了2-氧代-2,4,5,6-四氢吡咯[1,2-C]嘧啶(III),比较合成物与降解产物1的核磁共振谱发现,区别仅在于化合物1的C8有被甲基取代的特征。于是他们合成了8-甲基-2-氧代-1,2,4,5,6,6a,7,8-八氢吡咯并[1,2-C]嘧啶(IV),这个化合物的红外吸收与石房蛤毒素的8碳降解物的氢化物(II)相一致。在室温条件下将合成化合物IV氧化,得到8-甲基-2-氧代-2,4,5,6-四氢吡咯[1,2-C]嘧啶(8-methyl-2-oxo-2,4,5,6-tetrahydropyrrolo[1,2-C]pyrimidine)。它的熔点、混合熔点、紫外吸收、红外



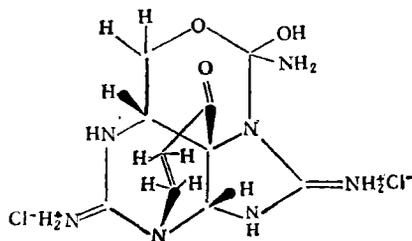
吸收、核磁共振谱和纸层析 R_f 值与石房蛤毒素的8碳降解物(I)无不相一致。Schuett 和 Rapoport 就是这样用石房蛤毒素的降解产物的氢化物反推了它的氧化物也就是这个8碳降解物本身的化学结构。这个降解物含有母体化合物10个碳原子中的8个,提出了它的结构,就为石房蛤毒素的结构勾出了一个轮廓,即使此一降解物在形成过程中发生过严重的结构重排也要。

在这项重要工作发表九年之后,Wong 和 Rapoport^[37]用温和条件得到石房蛤毒素二盐酸盐的一个9碳降解物, $C_9H_{10}N_6O_2 \cdot HCl$,它含有母体化合物中10个碳原子中的9个,7个氮原子中的6个。他们把这个9碳物进一步降解,移出一个3碳残基得到6碳降解物 $C_6H_8N_6O \cdot HCl$,提出了并用合成反应证实了这个6碳碎片的结构,根据这个6碳碎片的结构提出了并用合成反应证实了9碳降解物的结构(见下式)。

根据这个9碳降解物的结构和主要是一些核磁共振数据,Wong 和 Rapoport 等^[27]在



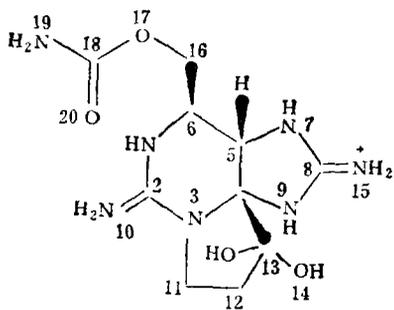
1971年提出了石房蛤毒素的一个完整结构式:



这是美国加州大学伯克利分校化学系的 H. Rapoport 等,受美军化学兵团(U. S. Army Chemical Corps)的支持^[26],从事石房蛤毒素分子结构研究工作多年来第二次提出石房蛤毒素的结构式。1964年,在美国化学会147届年会上,Rapoport 等^[38]根据一系列降解反应、同位素降解反应和光谱数据,曾经提出过石房蛤毒素一个完整结构式,但这一结构在文献上从未得到公认,Rapoport 等也未曾加以坚持。

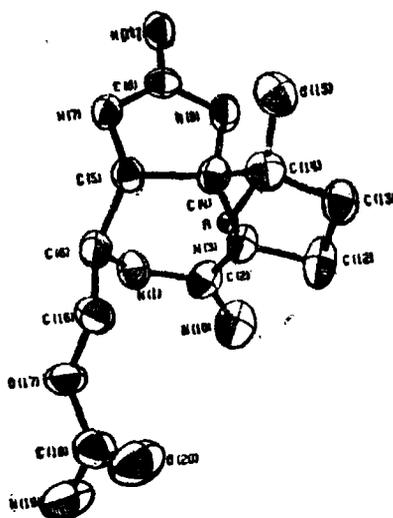
3. X-射线衍射分析和本化合物的全合成

1974年,在美国举行了第一届毒性甲藻赤潮国际学术会议。已经转入威斯康星大学工作的 E. J. Schantz 在会上提出的论文认为,Wong 和 Rapoport 等人1971年提出的结构与石房蛤毒素的物化性质诸多不合,并报告他们以1克分子石房蛤毒素二盐酸盐与2克分子对-溴苯磺酸钠反应,得到石房蛤毒素对-溴苯磺酸盐(P-Bromobenzenesulfonate Saxitoxin)针状结晶,根据对这个结晶物进行X-射线衍射分析的结果,建立了石房蛤毒素的分子结构^[1]。

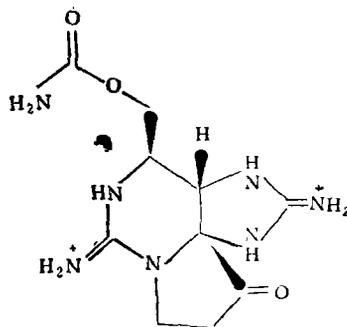


Schantz 等^[35]将他们建立的上述结构简称为 3, 4, 6-三烷基四氢嘌呤 (3, 4, 6-trialkyl tetrahydropurine), 并进一步说明, 3, 4, 6-三烷基四氢嘌呤结构中含有一个三碳碎片在 N 3 和 C 4 位置上建成的原子桥, 构成这个化合物的第 3 个环, 该环含有一个水合酮 (Hydrated Ketone), 这是一个有意义的结构因素。援引 Rapoport 等用稳定性同位素 ^{18}O 标志的水 (H_2^{18}O) 作掺入实验的结果加以推敲, 认为构成水合物的一对羟基中处于分子底面的一个, 即由 O 14 构成的那个羟基, 更容易受到攻击, 可能就是失水变成酮, 得水又变成水合酮的具体部位。Schantz 等暗示石房蛤毒素以水合物的形式与其酮式构型平衡存在, 唯其这样才能与本化合物已知的化学性质和光谱数据完全适合, 并与他们在五十年代使用逆流分溶仪研究石房蛤毒素的纯度时发现的一个现象互相印证: 他们^[24]当时根据理论和实测逆流分溶曲线的特征判断说, 未作氢化处理的石房蛤毒素, 以二个互变异构物的方式存在。

继 Schantz 等的工作发表之后, Bordner 和 Rapoport 等迅即也在有影响的美国化学会志上著文^[39], 发表了他们用 X-射线衍射分析技术得到的石房蛤毒素乙基半缩酮二盐酸盐 (Saxitoxin ethyl hemiketal dihydrochloride) 分子沿 C 轴的立体投影, 并以 ^1H 核磁共振和 ^{13}C 核磁共振数据, 以及在常温下用水处理, 可使石房蛤毒素乙基半缩酮二盐酸盐重新转化为石房蛤毒素的实验证明了石房蛤毒素在形



成半缩酮的过程中, 并未发生过任何形式的结构重排, 从而明确地建立了石房蛤毒素的分子结构。他们又以 ^{13}C 核磁共振数据肯定了, 在水溶状态的石房蛤毒素以水合酮的形式存在, 这个水合酮的具体位置, 就在原子桥靠近 C 4 位置的那个碳原子上。Wong 和 Rapoport 等指出, 在 1775 cm^{-1} 处的微弱红外吸收, 说明石房蛤毒素在水溶状况下也有极小部分为酮式构型; 与其水合酮构型相对而言, 他们将此酮式构型称为石房蛤毒素:



总之, Wong 和 Rapoport 等的上述工作, 肯定了 Schantz 等提出的石房蛤毒素分子结构及关于其存在形式的论述。他们提出的这一分子结构, 由于 1977 年哈佛大学化学系 H. Tanino 等^[40]据以制成了石房蛤毒素立体专一全合成化合物而被完全证实。全合成化合物的核磁共振谱、硅胶薄层层析行为

和生物毒性,与天然石房蛤毒素均属一致.这样,持续工作达30年之久的石房蛤毒素分子结构问题,终于被突破了.这是石房蛤毒素生化研究中一个更重要的发展阶段;是赤潮生物毒素研究中的重大进展;是自从著名的有机化学家 R. B. Woodward 以及另外几组专家在六十年代阐明了河豚毒素分子结构^[41]问题以来,对低分子量生物剧毒研究方面的又一重大进展,在现代海洋生物学、海洋环境生物学基础理论研究以及合成药物新领域的开拓等方面,都有重要意义.

参 考 文 献

- [1] Schantz, E. J., et al., In: V. R. LoCicero (ed.), *Proc. 1st Int. Conf. on Toxic Dinoflagellate Blooms*, Mass. Sci. Technol. Found., Wakefield, Mass., p. 267—274. (1975).
- [2] Sweeney, B. M., *Ibid.*, p. 225—234, (1975).
- [3] Hartwell, A. D., *Ibid.*, p. 47—68, (1975).
- [4] 国家海洋局编译, 海洋污染概况, 石油化学工业出版社, 第1版, 139—145页, 1975年.
- [5] McFarren, E. F., et al., *Adv. Food Res.*, **10**, 135 (1960).
- [6] Fellenz, L. E., *Ordnance*, **49**, 610 (1964).
- [7] 郑重, 自然杂志 **1** (2), 118 (1978)
- [8] Schantz, E. J., et al., *Jour. Med. Pharm. Chem.*, **4**, 459 (1961).
- [9] Murtha, E. F., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90**, 820 (1960).
- [10] Mosher, H. S., et al., *Science*, **144**, 1100 (1964).
- [11] Halstead, B. W., *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*, Vol. 2., U. S. Government Printing Office, Washington, D. C., (1967).
- [12] Schantz, E. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90**, 843 (1960).
- [13] Schantz, E. J., In: S. Kadis et al. (eds.), *Microbial Toxins*, Academic Press, p. 3—23 (1971).
- [14] Kao, C. Y., *Pharmacol. Rev.*, **18**, 997 (1960).
- [15] Kao, C. Y., *Fed. Proc.*, **31**, 1117 (1972).
- [16] Scheuer, P. J., *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, **22**, 265 (1964).
- [17] Russel, E. F., *Fed. Proc.*, **26**, 1206 (1967).
- [18] Narahashi, T., *Ibid.*, **31**, 1124 (1972).
- [19] Baslow, M. H., *Marine Pharmacology*, Robert E. Krieger Pub. Co., Huntington, New York, p. 38—42, 146, 162 (1977).
- [20] Sommer, H., et al., *Am. Med. Ass. Arch. Path.*, **24**, 537 (1937).
- [21] Riegel, B. H., et al., *Jour. Biol. Chem.*, **177**, 7, (1949).
- [22] Burke, J. M., et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90**, 837 (1960).
- [23] Schantz, E. J., J. D. Mold, et al., *Jour. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5230 (1957).
- [24] Mold, J. D., E. J. Schantz et al., *Ibid.*, **79**, 5235 (1957).
- [25] Schantz, E. J., et H. Rapoport, *Biochemistry*, **5**, 1191 (1960).
- [26] Schuett, W., et H. Rapoport, *Jour. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2266 (1962).
- [27] Sommer, H., et al., *Ibid.*, **70**, 1015 (1948).
- [28] Sommer, H., et al., *Ibid.*, **70**, 1019 (1948).
- [29] Buckley, L. J., et al., In: V. R. LoCicero (ed.), *Proc. 1st Int. Conf. on Toxic Dinoflagellate Blooms*, Mass. Sci. Technol. Found., Wakefield, Mass., p. 423—431, (1975).
- [30] Casselman, A. A., et R. A. B. Bannard, *Can. Jour. Chem.*, **38**, 1275 (1960).
- [31] Bannard, R. A. B., et A. A. Casselman, *Ibid.*, **39**, 1879 (1961).
- [32] Bannard, R. A. B., et A. A. Casselman *Ibid.*, **40**, 1649 (1962).
- [33] Buckley, L. J., et al., *Jour. Agri. Food Chem.*, **24**, 107 (1976).
- [34] Wong, J. L., R. Oesterlin, et H. Rapoport, *Jour. Am. Chem. Soc.*, **93**, 7344 (1971).
- [35] Schantz, E. J., et al., *Ibid.*, **97**, 1238 (1975).
- [36] Schantz, E. J., et al., *Can. Jour. Chem.*, **39**, 2117 (1961).
- [37] Wong, J. L., H. Rapoport, et al., *Jour. Am. Chem. Soc.*, **93**, 4633 (1971).
- [38] Rapoport, H., et al., *Abstracts of Papers*, 147th Natl. meet., Am. Chem. Soc., Philadelphia, Pa., p. 3N, 7 (1964).
- [39] Erdner, J. H. Rapoport, et al., *Jour. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6008 (1975).
- [40] Tanino, H., et al., *Ibid.*, **99**, 2818 (1977).
- [41] Woodward, R. B., *Pure Appl. Chem.*, **9**, 49 (1964).