

超高效液相色谱-串联质谱法同步测定贝类水产品中 4 种脂溶性藻毒素

黄碧慧*

(厦门市食品药品质量检验研究院, 厦门 361004)

摘 要: **目的** 建立一种超高效液相色谱-串联质谱法同时测定贝类产品中 4 种脂溶性藻毒的方法。**方法** 样品采用甲醇均质提取, 用 HLB 小柱净化, 在乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液体系中, 经 Kinetex C₁₈ 柱(150 mm×3 mm, 2.6 μm)梯度洗脱, 实现了 4 种藻毒素的良好分离。采用了电喷雾正负离子同时监测模式对 4 种脂溶性藻毒素进行外标法定量测定。**结果** 目标化合物的检出限为 2.3~20.7 pg/g, 在 3.8~1378.0 pg/g 浓度范围内线性良好, 相关系数 r^2 在 0.99407~0.99923 之间, 同时以贝类产品为基底的 4 种化合物在高、中、低 3 个加标水平浓度下的回收率为 70%~95%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.3%~7.7%。**结论** 该方法灵敏、准确、高效, 适用于贝类水产品食用安全的日常风险监测项目中。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 贝类产品; 脂溶性藻毒素; 电喷雾电离; 正负离子模式; 同时监测

Simultaneous determination of 4 types of lipophilic algae toxins in shellfish products using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

HUANG Bi-Hui*

(Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361004, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 4 kinds of lipophilic algae toxins in shellfish products using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were first extracted by methanol, followed by a purification using an Oasis HLB SPE column. Further separation of the 4 targets compound was achieved on a Kinetex C₁₈ column (150 mm×3 mm, 2.6 μm) via UPLC by gradient elution with acetonitrile and 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution as mobile phase. Quantification of the 4 targets was performed on a mass spectrometry, which simultaneously carried out by means of electrospray ionization in positive (ESI⁺) and negative ion mode (ESI⁻) mode with an external standard. **Results** The method showed a good linearity in the concentration range of 3.8–1378.0 pg/g, with the detection limits of 2.3–20.7 pg/g. The correlation coefficients (r^2) were between 0.99407–0.99923 for 4 toxins. The average recoveries for the high, medium and low concentrations of external standard were between 70%–95% with the relative standard deviations(RSD) 2.3%–7.7%. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, with high efficiency and is suitable for

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(S2019MK238)

Fund: Supported by the Science and Technology Program of State Administration for Market Regulation (S2019MK238)

*通讯作者: 黄碧慧, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: hbh_uk@163.com

*Corresponding author: HUANG Bi-Hui, Engineer, Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, No.33, Haishan Road, Huli District, Xiamen 361000, China. E-mail: hbh_uk@163.com

the daily risk monitoring project of shellfish food safety.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; shellfish products; lipophilic algae toxins; electrospray ionization; positive and negative ion mode; simultaneous determination

1 引言

藻毒素是海洋中藻类或微生物产生的一类次生代谢物^[1]。贝类动物对有毒藻的摄入使得藻毒素能够在其消化腺中富集^[2]。这类毒素对大部分贝类动物无明显的毒性,但人类食用了这种含藻毒素的贝类则可能引起中毒反应^[3]。按其溶解性的不同,藻毒素可分为水溶性藻毒素和脂溶性藻毒素,其中脂溶性藻类毒素比例约占90%,主要有大田软海绵酸(okadaic acid, OA)系列毒素、蛤毒素(pectenotoxin, PTX)系列毒素、虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)系列毒素、原多甲藻酸(azaspiracid, AZA)系列毒素、短裸甲藻毒素(brevetoxin, BTX)系列毒素,以及环亚胺毒素(gymnodimme, GYM)和螺环内酯毒素(spirolides, SPX)系列毒素^[4-9]。由于这些藻毒素的危害性大,因此若发生水产品中毒事件,藻毒素的检测是工作中的重点。但目前脂溶性藻毒素只有OA系列有相应的国家标准^[10],而针对其他几种脂溶性藻毒素,目前尚无国家标准的检测方法,也无相应的限量规定,因此建立一种可对脂溶性藻毒素进行准确检测的方法显得尤为必要。目前在国内外对于藻毒素的检测方法有:(1)小鼠生物法。此法最初是由Yasumoto等^[11,12]在1978年建立,是一种应用广泛的传统生物测试法,但此法特异性较差,无法确证样品中存在哪种藻类毒素;(2)酶联免疫吸附法。此法应用某些藻毒素的高特异性单克隆抗体进行酶联免疫吸附实验,目前已有商业化试剂盒投入市场中。但此法的假阳性率也是我们不可忽略的方面^[13,14];(3)液相色谱法。利用毒素分子上的特定基团与荧光物质发生衍生化反应生成强荧光性物质,进行荧光检测^[15,16]。但此法除了需要开发相匹配的衍生剂外,对于结构相似且在色谱上保留时间极为相近的同系物而言,其衍生物也不一定能达到分离的目的。(4)高效液相色谱-串联质谱法。因其高稳定、重现性高、特异性强的特点,近年来被广泛应用于各种化合物的检测中^[17-19]。(5)高效液相色谱-高分辨质谱法。此法虽然能达到高灵敏度、高特异性,但若用于日常检测过程中,存在仪器成本过高,不利于推广的缺点,同时毒素本身也存在一定的致毒计量,并不需要很高的灵敏度^[20]。因此本研究采用超高效液相色谱-串联质谱技术,建立一种能够同时检测贝类水产品中4种脂溶性藻毒素:虾夷扇贝毒素、类虾夷扇贝毒素(homo-yessotoxin, hYTX)、蛤毒素2(pectenotoxin2, PTX2)、环亚胺毒素的方法,对于日常对水产品的风险监测有很大的指导意义。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

标准品: 虾夷扇贝毒素[YTX, (4.92±0.2) μg/mL]、类虾夷扇贝毒素[hYTX, (5.8±0.3) μg/mL]、蛤毒素2[PTX2, (4.4±0.2) μg/mL]、环亚胺毒素[GYM, (2.50±0.13) μg/mL] (加拿大海洋生物科学研究所); 乙腈、甲醇、正己烷(色谱纯, 美国默克公司); 氨水(分析纯, 上海沪试实验室器材股份有限公司); 乙酸铵(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 实验用水为自制 Mill-Q 超纯水。

2.2 仪器与设备

1290 超高压液相色谱分离系统、Vac Elut20 固相萃取装置(美国安捷伦公司); API5500Q Trap 型三重四级杆质谱仪(美国 AB 公司); SQP 型电子天平(德国 Sartorius 公司); MS3 型旋涡混匀器、T18 型高速均质机(德国 IKA 有限公司); CF15RN 型高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司); MV5 氮吹浓缩仪(美国 LabTech 公司); 明澈-D 型超纯水净化装置(美国 Millipore 公司)。固相萃取柱: Oasis HLB(3cc/60 mg, 美国 Waters 公司); 液相色谱柱 Kinetex C₁₈(150 mm×3 mm, 2.6 μm, 美国 Phenomenex 公司)

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液的配制

标准储备液: 标准品均为0.5 mL的藻毒素液体, 本实验将其转移到5 mL容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得到4种标准品的储备液, 其中虾夷扇贝毒素(YTX)492 μg/L、类虾夷扇贝毒素(hYTX)580 μg/L、蛤毒素2(PTX2)440 μg/L、环亚胺毒素(GYM)250 μg/mL, 置于0~4℃避光储存。

标准工作使用液: 按照一定的比例分别吸取4种毒素的单标储备液, 转移至10 mL容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度线, 得到4种毒素的混合标准储备液, 其中YTX、hYTX、PTX2、GYM的浓度分别为4.9、5.8、4.4、5.0 μg/L, 并置于-20℃条件下储存备用。

2.3.2 色谱条件

柱温: 35℃; 流速0.3 mL/min, 进样量: 2.0 μL。流动相为: 5 mmol/L 乙酸铵(A1)和乙腈(B1); 梯度洗脱程序为0~1 min, 35% B1; 1~5 min, 35%~90% B1; 5~8 min, 90% B1; 8.1~12 min, 35% B1。

2.3.3 质谱条件

离子源: 电喷雾电离源, 其中PTX2、GYM采用正离子模式(electrospray ionization positive, ESI⁺)检测, YTX,

hYTX 采用负离子模式(electrospray ionization negative, ESI⁻)检测,扫描方式:正/负离子扫描,多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式,质谱参数详见表 1。目标物的质谱参数定性、定量离子对,去簇电压(decustering potential, DP)及碰撞电压(collision energy, CE)参数见表 2。

2.3.4 样品前处理

(1)样品的制备

未煮贝类:采取足够的贝类样品个数,并使贝肉达到 400 g 以上,去壳,取可食用部分,用超纯水冲洗样品中的泥沙,用搅拌机绞碎后备用。

熟制贝类:将 1 kg 样品置于 2~3 L 煮沸的超纯水中继续加热 3 min 左右,捞出,冷却至室温,去壳,取可食部分,重复几次使贝肉达到 400 g 以上,用搅拌机搅碎后备用。

(2)样品的提取

称取 2.0 g 制备后的样品于 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 8 mL 甲醇后均质 2 min,超声 20 min 后在 4 ℃,12000 r/min 条件下离心 5 min,重复以上操作 1 次,合并上清液,转移滤液至 20 mL 容量瓶中用甲醇定容至刻度,准确吸取上述提取液 5.0 mL 待固相萃取(solid phase extraction, SPE)净化。

(3)样品的净化

将上述 5.0 mL 上清液于 40 ℃氮吹干后,加入 2 mL,25%(V:V,下文同)的甲醇水溶液复溶,再加入 5 mL 正己烷,振摇后弃去正己烷层,重复一次正己烷除油步骤。依次以 3 mL 甲醇和 3 mL 25%的甲醇溶液活化 HLB 小柱后,将除油净化后的复溶液上样,再用 3 mL 25%的甲醇溶液进行淋洗,抽干后,用 5 mL、1%(V:V)氨水甲醇进行洗脱,收集洗脱液在 40 ℃氮吹浓缩至干,用 1.0 mL 甲醇复溶,涡旋混匀上机测定。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

本研究采用了 Phenomenex 的 Kinetex C₁₈液相色谱柱,能有效分离 4 种亲脂类藻毒素。质谱采集采用了正负离子同时监测的 MRM 模式,由于正离子模式的流动相可以靠加酸来促进离子化效率,提高响应,但在酸性流动相下负离子模式的目标物会被抑制,因此在选择流动相体系时,应同时兼顾,让各化合物都能达到良好的响应。乙腈-0.1%甲酸水(V:V)体系是质谱中常用的正离子流动相体系,但是实验表明,在乙腈-0.1%甲酸水流动相体系中正离子模式下的 PTX2、GYM 可以有很好的灵敏度和峰形,但是负离子模式下的 YTX、hYTX 会有响应低、灵敏度差的情况。甲醇-水体系是质谱中常用的负离子流动相体系,在甲醇-水流动相体系中负离子模式下的 YTX、hYTX 可以有很好的灵敏度和峰形,但是正离子模式下的 PTX2、GYM 会有峰形拖尾的情况。因此本研究采用了乙腈-乙酸铵流动相体系,乙酸铵具备稳定的 pH 和洗脱环境,能够提高目标物离子化效率,显著改善 4 种目标化合物的峰形和响应值。4 种脂溶性藻毒素定量离子 MRM 图见图 1。

3.2 质谱条件的优化

首先对 4 种脂溶性藻毒素标准溶液进行母离子扫描,发现 PTX2 只在正离子模式有信号,主要产生 [M+NH₄]⁺(*m/z* 876.5)离子;GYM 只在正离子模式有信号,主要产生 [M+H]⁺(*m/z* 508.4)离子;YTX 只在负离子模式条件下有信号,主要产生 [M-2H]²⁻(*m/z* 570.2)离子、[M-H]⁻(*m/z* 1141.5)离子;hYTX 也只在负离子模式条件下有信号,主要产生 [M-2H]²⁻(*m/z* 577.2)离子、[M-H]⁻(*m/z* 1155.5)离子。值得注意的是,由于 YTX 和 hYTX 的 [M-2H]²⁻离子峰响应远远高于 [M-H]⁻离子峰的响应,因此最终选择了 [M-2H]²⁻离子作为母离子。

表 1 质谱参数
Table 1 Parameters of mass spectrometry

	气帘气压/MPa	电喷雾电压/V	离子化温度/℃	雾化气压力/MPa	干燥气压力/MPa
正离子模式	30	5500	550	55	55
负离子模式	30	-4500	450	55	55

表 2 4 种脂溶性藻毒素质谱参数
Table 2 Parameters of mass spectrometry of 4 lipophilic algae toxins

化合物	ESI 模式	保留时间/min	母离子/(<i>m/z</i>)	子离子/(<i>m/z</i>)	去簇电压(DP)/V	碰撞能量(CE)/V
GYM	正模式	5.30	508.4	490.3*/162.3	85	33/55
PTX2	正模式	6.98	876.5	823.5*/805.5	110	35/35
YTX	负模式	5.50	570.2	467.4*/396.4	-90	-43/-45
hYTX	负模式	5.51	577.2	474.2*/403.2	-90	-40/-42

注:带“*”号离子代表定量离子。

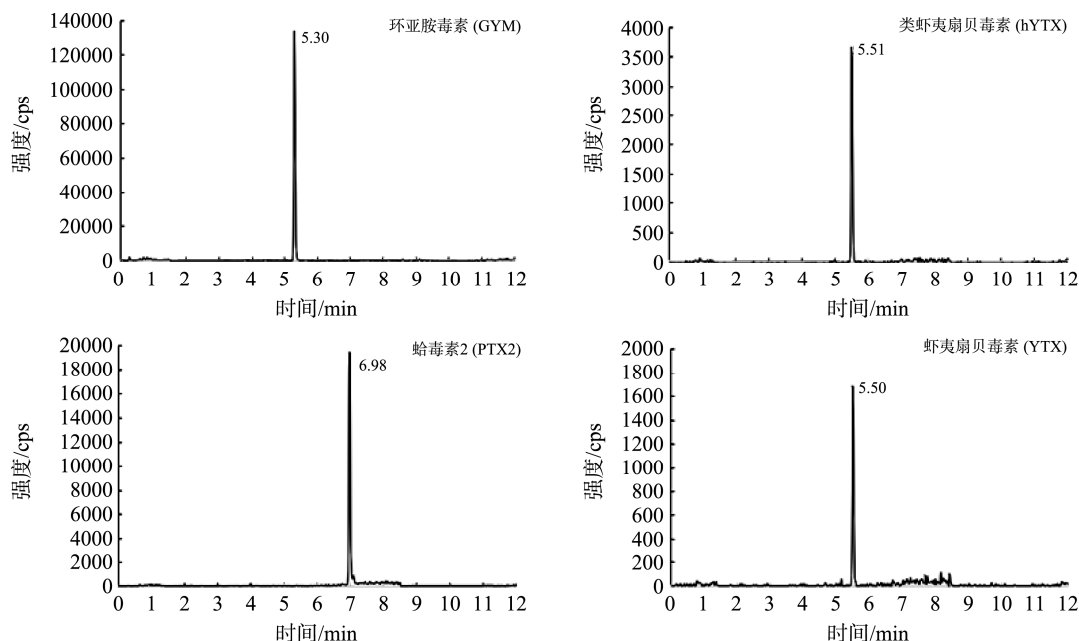


图1 4种脂溶性藻毒素定量离子MRM色谱图
Fig.1 Quantitative ion MRM chromatograms of 4 lipophilic algae toxins

然后用子离子扫描模式,监测二次碎裂产生的子离子峰,选择两个信号强度适宜的子离子组成监测离子对。最终在MRM模式下优化各离子对的去簇电压及碰撞电压,具体参数见表2。

3.3 前处理条件的优化

3.3.1 提取溶剂

本文的4种藻毒素均是脂溶性化合物,易溶于甲醇、乙腈、乙酸乙酯等有机溶剂。本实验以文蛤为样品,分别考察了这4种溶剂对这4种藻毒素的提取效率。结果见图2。

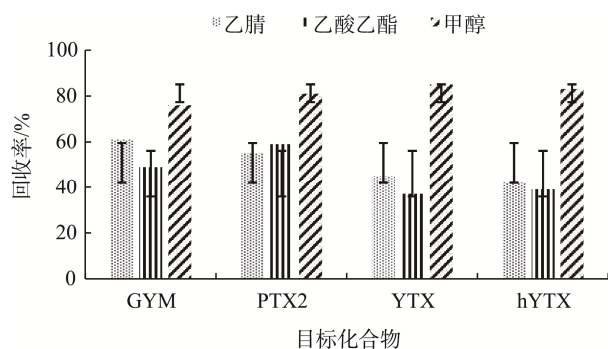


图2 不同萃取溶剂下目标化合物的回收率($n=3$)
Fig.2 Recovery rate of target compounds using different extraction solvents ($n=3$)

从图2可以看出,用乙腈和乙酸乙酯作为提取溶剂效果不是很理想,而甲醇作为提取溶剂的回收率能够符合要求,这可能与这4种化合物的化学性质相关,PTX属于大环内酯聚醚类化合物,YTX、hYTX属于线性聚环醚类化合

物,GYM属于含亚胺的大环结构化合物,大环上有多个羟基和甲基,而甲醇为类质子溶剂,可形成氢键,对于提取电负性强的化合物有良好的选择性。因此最终选择甲醇为提取溶剂。

3.3.2 净化方式的优化

贝类样品中存在大量蛋白质、脂类化合物,如果样品未经净化容易造成样品基线高,干扰大,不易对目标化合物进行准确定性定量。目前,对于贝类毒素的检测也有相关报道,在净化方式的选择上有使用正己烷除油的方式,有使用QuEChERS方法,还有一些采用固相萃取技术进行净化处理。QuEChERS方法虽然前处理简单,但是回收率不高,在吸附杂质的同时,目标物也容易被吸附。本文采用了正己烷除油结合固相萃取方式对样品进行处理。在对比了Oasis HLB柱、Strata-X柱和 C_{18} 柱后发现,经Strata-X柱处理的样品只有PTX2被检出,而经 C_{18} 处理的样品杂质峰较多,基线干扰大。因此本实验选取了HLB固相萃取小柱作为净化小柱。

在提取步骤时使用了纯甲醇,若不进行溶剂的转换,会使目标化合物在HLB固相萃取柱上样时流失,达不到净化样品的目的。因此在使用SPE方法时,先将提取的溶剂氮吹浓缩至干后用甲醇水溶剂复溶,同时为了提高过柱效率,复溶后的样品先用正己烷除油后过固相萃取柱。复溶溶剂中甲醇的含量不能过高,过高会导致上样时目标化合物在固相萃取柱的不保留,过低不利于脂溶性目标物的溶解。因此实验考察了不同浓度的甲醇水溶剂作为复溶溶剂的目标物回收率,结果见图3。

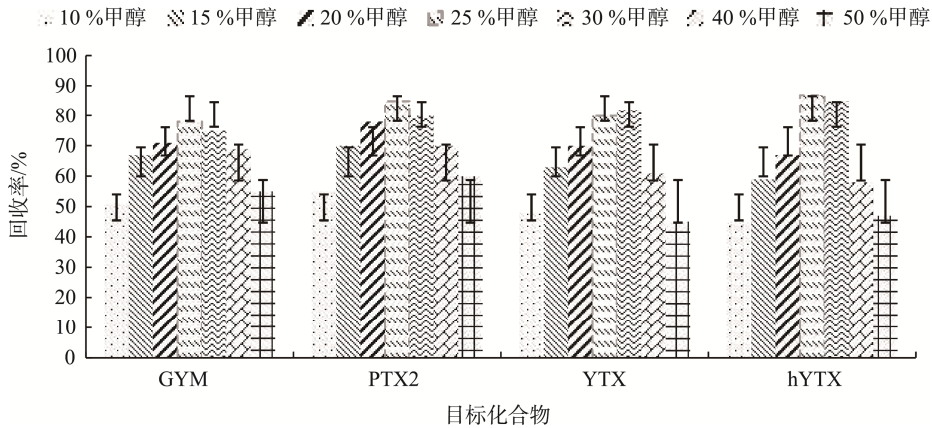


图 3 不同浓度的复溶溶剂下目标化合物的回收率(n=3)

Fig.3 Recovery rate of target Compounds using different resolvents (n=3)

从图 3 可以看到,随着甲醇浓度的增加,回收率也逐渐升高,这是因为甲醇浓度的增加有利于亲脂性化合物的溶解。当甲醇浓度达到 25%时,目标物除了 YTX 在甲醇浓度 30%回收率稍高一些外,其他 3 种化合物的回收率都达到了最高水平,但随后目标物的回收率随着甲醇浓度的增高而降低,这是因为目标物在高甲醇体系中不被固相萃取柱保留的原因。因此,综合实验结果最终选择 25%甲醇溶剂作为复溶溶剂。另有文献表明脂溶性藻毒素在碱性条件下的稳定性相对较好^[21]。因此在本实验中使用了含 1%氨水甲醇作为洗脱溶剂。

3.3.3 方法学评价

(1) 线性范围、检出限

本研究采用基底外标法对目标化合物进行定量分析。选取空白样品作为基底,经与样品相同前处理后,加入系列梯度水平的目标物溶液作为标准溶液。以定量离子峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,以最低浓度响应的 3 倍信噪比($S/N \geq 3$)对应的浓度作为检出限(limit of detection, LOD),以 10 倍信噪比($S/N \geq 10$)对应的浓度作为定量限(limit of quantitation, LOQ)。由于目前国家还没有提到的相关脂溶性藻毒素的限量要求和方法标准,因此本实验在做方法研究的时候考虑了较宽的线性范围,结果见表 3。从表中 3 可以看出 4 种化合物在一定的范围内线性关系良好,其相关系数 r^2 达到了 0.99 以上,负离子模式下采集

的 YTX 与 hYTX 都会比正离子模式采集下的 GYM 与 PTX2 的检出限和定量限高一些,但也能够满足日常工作需求。

(2) 回收率和精密度

用优化后的前处理方法,分别选取牡蛎、贻贝、泥螺空白样品为加标样品,并将这 3 类样品平均分为 2 份,一份按未煮处理,一份按煮熟处理。分别考察了 3 种样品高、中、低不同浓度水平的加标实验,每个添加水平平行测定 6 次(其中生的水产品 3 次,煮熟的水产品 3 次),各化合物回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)测定结果如表 4 所示。结果显示:4 种化合物在牡蛎、贻贝、泥螺空白样品中高、中、低 3 个加标水平浓度下的回收率为 70%~95%,RSD 为 2.3%~7.7%小于 10%($n=6$),满足分析的要求。

3.3.4 实际样品检测

运用本研究建立的方法对市售牡蛎、贻贝、文蛤、螺类各 10 份样品进行 4 种脂溶性藻毒素的检测,检测结果显示 GYM 的检出率最高,有 18 份样品检出,浓度在 0.35~15.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间;其次是 PTX2 的检出率,有 5 份样品检出,浓度在 0.17~2.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间;而 hYTX 和 YTX 都只有 1 份样品检测出,浓度分别为 14.3 和 20.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。表明该检测方法在实际检测工作中能得到有效的应用,可用在贝类水产品食用安全的日常风险监测工作中。

表 3 4 种脂溶性藻毒素的线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限
Table 3 Results of linear ranges, regression equations, correlation coefficients, LODs and LOQs of 4 lipophilic algae toxins

化合物	线性范围/(pg/g)	回归方程	相关系数 r^2	检出限 LOD/(pg/g)	定量限 LOQ/(pg/g)
GYM	3.8 ~ 152	$Y=224371X-37004.9$	0.99407	2.3	7.6
PTX2	12.2 ~ 480	$Y=45051.3X-6537.3$	0.99904	7.3	24.0
YTX	31.5 ~ 1260	$Y=2680.1X-243.0$	0.99923	18.9	63.0
hYTX	34.5 ~ 1378	$Y=6543.7X-1710.5$	0.99557	20.7	68.9

表 4 不同基质加标回收和精密度实验结果(n=6)
Table 4 Results of recovery and precision in different sample (n=6)

化合物	牡蛎			贻贝			泥螺		
	加标量/(pg/g)	回收率/%	RSD/%	加标量/(pg/g)	回收率/%	RSD/%	加标量/(pg/g)	回收率/%	RSD/%
GYM	5.0	75 ~ 83	4.1	5.0	70 ~ 81	5.6	5.0	77 ~ 85	3.6
	15.0	76 ~ 85	4.4	15.0	71 ~ 82	5.1	15.0	76 ~ 88	5.6
	50.0	83 ~ 88	2.3	50.0	85 ~ 93	3.2	50.0	80 ~ 88	3.7
PTX2	8.8	82 ~ 89	3.4	8.8	81 ~ 90	4.3	8.8	79 ~ 91	5.1
	26.4	82 ~ 90	3.3	26.4	83 ~ 92	3.7	26.4	72 ~ 84	5.7
	88.0	78 ~ 90	5.0	88.0	83 ~ 95	4.9	88.0	74 ~ 90	7.7
YTX	49.2	77 ~ 86	3.8	49.2	75 ~ 86	5.4	49.2	76 ~ 85	4.1
	147.6	75 ~ 85	4.4	147.6	78 ~ 87	4.3	147.6	81 ~ 87	3.0
	492.0	75 ~ 86	4.9	492.0	73 ~ 91	7.6	492.0	76 ~ 93	7.0
hYTX	58.0	79 ~ 85	2.6	58.0	75 ~ 85	4.7	58.0	73 ~ 80	3.3
	174.0	74 ~ 83	4.0	174.0	79 ~ 84	2.4	174.0	78 ~ 89	6.6
	580.0	77 ~ 84	2.8	580.0	80 ~ 95	6.9	580.0	77 ~ 85	4.0

4 结论与讨论

本研究建立了一种超高效液相色谱-串联质谱法同时检测贝类中 4 种脂溶性藻毒素的方法, 该方法简单快捷、灵敏度高、回收率好, 能够满足同时检测贝类样品中 4 种脂溶性藻毒素的要求, 可以应用于贝类产品中 4 种脂溶性藻毒素的检测工作中。

参考文献

[1] 齐雨藻.中国沿海赤潮[M]. 北京: 科学出版社, 2003, 248–256.
Qi YZ. TheredtideincoastalChinaSea[M]. Beijing: Science Press, 2003, 248–256.

[2] Hess P. Requirements for screening and confrmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(5): 1683–1694.

[3] Geress A, Pol-hofstad I, Poelman M. Marine toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection with special reference to the Dutch situation [J]. Toxins, 2010, 2(4): 878–904.

[4] FAO/IOC/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO/World Health Organization) [R]. Dublin, Report of the Joint, 2004.

[5] Torgersen T, Lindegarth S, Ungfors A, et al. Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part I: brown crab(*Cancer pagurus*) [J]. Toxicon, 2008, 52(3): 418–427.

[6] Daranas A, Norte M, Fernandez J. Toxic marine microalgae [J]. Toxicon, 2001, 39(8): 1101–1132

[7] 高春蕾, 刘仁沿, 梁玉波, 等. 虾夷扇贝毒素 yessotoxins (YTXs)—中国沿海贝类中首次发现的一组贝类生物毒素[J]. 海洋学报, 2010, 32(3): 129–137
Gao CL, Liu YR, Liang YB, et al. yessotoxins (YTXs)-A group of shellfish biotoxins found for the first time in coastal shellfish of China [J]. J Oceanogr, 2010, 32(3): 129–137.

[8] Mackenzie L, Holland P, Mcnabb P, et al. Complex toxin profiles in phytoplankton and greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis [J]. Toxicon, 2002, 40(9): 1321–1330.

[9] Twiner MJ, Bottein DMY, Wang Z, et al. Extraction and analysis of lipophilic brevetoxins form the red tide dinoflagellate karenia brevis [J]. Anal Biochem, 2007, 369(1): 128–135.

[10] GB 5009.212-2016 食品安全国家标准 贝类中腹泻性贝类毒素的测定 [S]
GB 5009.212-2016 National food safety standard-Determination of diarrhoeal shellfish toxins in shellfish [S].

[11] 李芳, 李雪梅, 李献刚, 等. 贝类毒素检测方法研究概况[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(23): 184–186.
Li F, Li XM, Li XG, et al. Research on progress of determination of shellfish toxin [J]. Food Res Dev, 2015, 36(23): 184–186.

[12] 李美慧, 李爱峰, 曹际娟, 等. 我国常见的几种脂溶性贝毒的研究进展 [J]. 生命科学, 2016, 28(1): 33–43.
Li MH, Li AF,Cao JJ, et al. Typical lipophilic shellfish toxins distributed in the coastal water of China: A review [J]. Chin Bull Life Sci, 2016, 28(1): 33–43.

[13] Li A, Yu R, Li J, et al. Protein phosphatase inhibition assay for detection of diarrhetic shellfish poison in oyster [J]. Chin J Anal Chem, 2006, 34(3): 283–287.

[14] Kim MH, Choi SJ. Immunoassay of paralytic shellfish toxins by moving

- magnetic particles in a stationary liquid-phase lab-on-a-chip [J]. Biosens Bioelectron, 2015, (66): 136–140.
- [15] 张晓玲, 杨桥, 惠芸华, 等. 超高效液相色谱荧光法检测贝类中三种高毒性麻痹性贝毒[J]. 海洋渔业, 2012, 34(3): 337–341.
- Zhang XL, Yang Q, Hui YH, *et al.* Analysis of three paralytic shellfish poisoning toxins with high toxicity in shellfish by UPLC with fluorescence detection [J]. Mar Fish, 2012, 34(3): 337–341.
- [16] Cho Y, Ozeki R, Yotsu YM, *et al.* Single-cell analysis of paralytic shellfish toxins in *Alexandrium tamarense* by HPLC with post-column fluorescent derivatization [J]. Harmful Algae, 2013, 25(3): 47–53.
- [17] Fux E, Rode D, Bire R, *et al.* Approaches to the evaluation of matrix effects in the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of three regulated lipophilic toxin groups in mussel matrix (*Mytilus edulis*) [J]. Food Addit Contam A, 2008, 25(8): 1024–1032.
- [18] 严忠雍, 张小军, 陈思, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定贝类中 3 种短裸甲藻毒素[J]. 分析测试学报, 2019, 38(2): 224–228.
- Yan ZY, Zhang XJ, Chen S, *et al.* Determination of three brevetoxins in shellfish by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(2): 224–228.
- [19] These A, Scholz J, Preiss WA. Sensitive method for the determination of lipophilic marine biotoxins in extracts of mussels and processed shellfish by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on enrichment by solid-phase extraction [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(8): 4529–4538.
- [20] 宫小明, 万进, 马荣桢, 等. 液相色谱-高分辨质谱测定贝类中的 4 种贝毒素及 16 种兽药残留[J]. 分析测试学报, 2014, 33(8): 881–886.
- Gong XM, Wan J, Ma RH, *et al.* Determination of 4 shellfish biotoxins and 16 veterinary residues in shellfish by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(8): 881–886.
- [21] Gerssen A, Mulder PPJ, McElhinney MA, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(9): 1421–1430.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



黄碧慧, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: hbh_uk@163.com