DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01714

液相色谱-串联质谱检测贝类组织中 5 种脂溶性贝毒素

姚建华[1,2]　谭志军[1]　周德庆*[1]
[1](中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛 266071)
[2](上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘　要　建立了液相色谱-串联质谱分析贝类组织中米氏裸甲藻(GYM) 贝毒素、螺环内酯毒素(SPX1) 、大田软骨酸(OA) 贝毒素、蛤毒素(PTX2) 、原多甲藻酸(AZA1) 贝毒素的方法。用甲醇-水(4∶1, *V*/*V*) 溶液对贝类组织中 GYM, SPX1, OA, PTX2 和 AZA1 进行提取,MAX 阴离子交换柱净化后,采用液相色谱分离,除 OA 以负离子选择反应监测外,GYM, SPX1, PTX2 和 AZA1 以电喷雾离子源正离子选择反应监测模式进行质谱分析。5 种脂溶性贝毒素 GYM, SPX1, OA, PTX2 和 AZA1 在各自相应浓度范围内线性良好,相关系数 >0.99。扇贝闭壳肌空白样品添加 5 种贝毒素的提取率均为 78.6% ~94.4% (n = 6) ; 精密度(RSD) 为 6.8% ~ 14.9%。贝类组织中 5 种贝毒素 GYM, SPX1, OA, PTX2 和 AZA1 的检出限分别为 0.10, 0.21, 2.00, 0.32 和 0.04 μg/kg。

关键词　脂溶性贝毒素; 贝类组织; 液相色谱-串联质谱

1　引　言

随着海洋环境的恶化,有害赤潮频繁暴发,人们陆续发现了一批新型贝毒素。原多甲藻酸(Azaspirzcids,AZA) 贝毒素、米氏裸甲藻(Gymnodimine ,GYM) 贝毒素、螺环内酯毒素(Spirolides ,SPX) 是 20 世纪 90 年代在检测腹泻性贝毒素(Diarrhetic shellfish poisoning,DSP) 过程中新发现的脂溶性贝毒素[1~6]。按 FAO/IOC/WHO 在 2004 年 3 月都柏林(Dublin) 贝类生物毒素会议以化学结构将贝类生物毒素分为 8 组的分类方法[7],AZA1 属于原多甲藻酸(Azaspirzcids) 组,GYM 和 SPX 属于环亚胺(Cyclicimine) 毒素组,OA 属于软海绵酸毒素(Okadaic acid) 组,PTX2 属于蛤毒素(Pectenotoxins) 组。前两组毒素的致毒机理与 DSP 完全不同,AZA1 可引起恶心、呕吐、腹泻、胃痉挛等中毒症状,GYM 和 SPX 可作用于呼吸道神经系统,引起与麻痹性贝毒素相似的中毒症状,SPX 小鼠腹腔注射可致使小鼠在数分钟内死亡。OA 能引起腹泻、腹痛等肠胃疾病; PTX 虽不会引起腹泻,但会损伤肝脏[8]。欧盟对 AZA 及 OA 的安全限量均为 160 μg/kg 贝类组织[9]; 对环亚胺类毒素(GYM, SPX) 尚未规定安全限量[10]; PTX 的安全限量为150 μg/kg 贝类组织。

我国已报道了一些贝类毒素分离、提取和检测的方法,例如, 江涛等[11] 采用不同浓度的 HCl 和 HAc 作提取液提取贝类中多种麻痹性贝类毒素; 刘仁沿等[12] 在广西北海发现了含 GYM 的牡蛎,在我国尚未见 SPX1 的报道。本课题组已建立了 AZA1 的液相色谱-串联质谱检测方法,并在采自大连、广州的贝类中检测出 AZA1。目前,已建立了多种生物毒素的 LC-MS 检测方法[13,14],但是仅比较了不同固相萃取小柱的提取率,前处理方法尚需进一步完善。本研究建立了同时检测 5 种脂溶性贝毒素 GYM, SPX1, OA, PTX2 和 AZA1 的液相色谱-串联质谱法,完善了前处理方法,对于提高检测效率,监测贝类产品贝毒素状况具有重要意义。

2　实验部分

2.1　仪器、试剂与材料

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪,配有电喷雾(ESI)

2010-02-01 收稿; 2010-05-18 接受
本文系国家 863 计划(No. 2007AA09Z438) ,国家科技支撑计划项目(No. 2008BAA94B09) 资助
* E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

离子源; CR22G 型高速离心机(日本日立公司) ; Tailboys VX-3000 型漩涡混合器(美国 Troemner 公司) ; KQ-600DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司) ; Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司) ; N-EVAP112 氮吹仪(美国 Organomation 公司) ; T18 basic 型均质机(德国 IKA 公司) ; MAX 阳离子交换柱(美国 Waters 公司) 。

甲醇、乙酸乙酯(色谱纯,德国 Merk 公司) ; 乙腈(色谱纯,德国 CNW 公司) ; 甲酸、甲酸铵(色谱纯,德国 Fluka 公司) ; 实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

贝毒素标准品 GYM, SPX1, OA, PTX2, AZA1 购自于加拿大海洋生物科学研究所(The National Research Council Canada, Marine Analytical Chemistry Standards Program, Halifax NS, Canada) 。

贝类样品主要是菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*) 、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) 、长牡蛎(*Crassostrea gigas*) ,栉江珧(*Atrina pectinate*) ,2009 年 1 月 ~7 月购于大连、烟台及广州的水产品市场,每月中旬采样一次,立即运回实验室,于 -20 ℃冷冻保存待用。

2.2　LC-MS/MS 分析条件

2.2.1　色谱条件　色谱柱: Atlantis dC_{18}(150 mm × 4.6 mm,5.0 μm,Waters 公司) ; 柱温: 35 ℃; 样品室温度 4 ℃; 进样量: 10 μL; 流动相 A 为乙腈-水(95∶5, *V/V*) ,B 为水,两者均含有 50 mmol/L 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵溶液, 采用梯度洗脱方式: 0.0 ~2.0 min,60% A; 2.1 ~6.0 min, 5% A; 6.1 ~8.0 min, 60% A; 流速: 0.2 mL/min。

2.2.2　质谱条件　电喷雾离子源 ESI; 反应检测模式(SRM) ; 电喷雾电压: 4000 V; 毛细管温度: 350 ℃; 辅助气压力: 172.4 kPa; 鞘气压力: 68.9 kPa。扫描宽度(*m/z*) : 0.01; 扫描时间: 0.5 s。其它质谱参数详见表 1。

表 1　5 种脂溶性毒素的质谱参数

Table 1　Mass spectrometric parameters for five lipophilic marine toxins

毒素 Toxin	保留时间 Retention time (min)	电离源模式 EIS mode		母离子 Parent ion (*m/z*)	子离子 Production (*m/z*)	碰撞能量 Collision energy (eV)
米氏裸甲藻贝毒素 Gymnodimine (GYM)	2.5	ESI^+	$[M+H]^+$	508.3	174.2	38
					490.6*	23
螺环内酯毒素 Spirolide-1 (SPX1)	3.6	ESI^+	$[M+H]^+$	692.5	444.5	34
					674.0*	23
大田软海绵酸毒素 Okadaic acid (OA)	6.0	ESI^-	$[M-H]^-$	803.0	208.8	49
					255.0*	47
蛤毒素 Pecenotoxin-2 (PTX-2)	6.3	ESI^+	$[M+NH_4]^+$	876.0	212.8	36
					823.2*	21
原多甲藻酸 Azaspiracid-1 (AZA1)	6.7	ESI^+	$[M+H]^+$	842.5	672.4	38
					824.5*	30

* 定量离子(Quantitative ion)

2.3　样品制备

2.3.1　贝类毒素的提取　取贝类组织 100 g,以 10000 r/min 均质 5 min,准确称取均质后的样品 2.00 g 于 15 mL 离心管中,加入 6 mL 80% 甲醇水溶液,旋涡振荡 1 min,超声提取 10 min,以 7000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至试管中。重复上述操作两次, 合并上清液,用甲醇-水溶液(90∶10, *V/V*) 定容至 20.0 mL。混匀后量取 5.0 mL 于 10 mL 玻璃管中,40 ℃氮气吹至少于 0.5 mL,加入 2 mL 乙酸乙酯后旋涡 1 min 进行萃取,以 3000 r/min 离心 5 min,重复上述操作,合并乙酸乙酯层后于 40 ℃用氮气吹干,加 300 μL 甲醇,旋涡混匀,再加入 700 μL 水,待净化。

2.3.2　净化处理　MAX 固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水进行预处理,然后加入上样液,依次用 1 mL 5% 氨水、2 mL 甲醇-水溶液(30∶70, *V/V*) 淋洗,最后用 1 mL 甲酸-甲醇(2∶98, *V/V*) 洗脱。洗脱液于 40 ℃用氮气吹干,准确加入 200 μL 甲醇定容,旋涡 1 min 后过孔径为 0.22 μm 有机滤膜,滤液供 LC-MS/MS 分析。

3 结果与讨论

3.1 提取条件的选择

3.1.1 提取剂的选择 分别以甲醇、80%甲醇为提取剂，以3倍体积提取3次。结果显示，两种提取试剂均能得到理想的提取效果(表2)，但以80%甲醇为提取剂，可以减少粗提液中杂质的含量，因此选择80%甲醇为提取剂。

表2 提取试剂对5种脂溶性毒素提取率的影响($n=3$)

Table 2 Influence of extractant on recoveries of five lipophilic marine toxins($n=3$)

提取剂 Extractant	提取率 Recovery(%)				
	米氏裸甲藻贝类毒素 GYM	螺环内酯毒素 SPX1	大田软海绵酸贝类毒素 OA	蛤毒素-2 PTX2	原多甲藻酸贝类毒素 AZA1
80%甲醇 80% Methanol	97.9	95.8	94.5	121.1	91.0
甲醇 Methanol	87.7	102.5	93.3	125.4	86.7

3.1.2 提取方式、用量及次数的优化 比较了以3倍体积的80%甲醇提取1、2和3次的提取效果。结果表明，提取3次，5种脂溶性毒素的提取率均大于90%(表3)。

表3 不同提取次数对5种脂溶性毒素的提取率的影响($n=3$)

Table 3 Influence of different extraction time to the recoveries of five lipophilic marine toxins($n=3$)

提取次数 Times of extraction	提取率 Recovery(%)				
	米氏裸甲藻贝类毒素 GYM	螺环内酯毒素 SPX1	大田软海绵酸贝类毒素 OA	蛤毒素-2 PTX2	原多甲藻酸贝类毒素 AZA1
1	63.5	78.2	86.0	75.7	69.7
2	86.2	92.1	89.9	94.3	83.0
3	97.9	95.8	94.5	121.1	91.0

3.2 净化方法的选择

贝类样品中因含有大量的蛋白质、脂肪等杂质，加之内脏团中色素的影响，需对粗提液进行进一步净化处理。本研究考察了不同的液-液萃取及固相萃取方法对净化效果和提取率影响。

在液-液萃取实验中，分别以二氯甲烷和乙酸乙酯为萃取剂，两种试剂均可将毒素从水中萃取出来，同时去除部分脂质。除OA外，乙酸乙酯对各毒素的萃取效果均优于二氯甲烷(见表4)，且由于乙酸乙酯毒性远小于二氯甲烷，因此本研究选择乙酸乙酯为萃取剂。

表4 乙酸乙酯和二氯甲烷对回收率的影响

Table 4 The influence of Dichloromethane and Ethyl Acetate to the recoveries of five lipophilic marine toxins

试剂 Reagant	回收率 Recovery(%)				
	米氏裸甲藻贝类毒素 GYM	螺环内酯毒素 SPX1	大田软海绵酸贝类毒素 OA	蛤毒素-2 PTX2	原多甲藻酸贝类毒素 AZA1
乙酸乙酯 Ethyl Acetate	116.2	118.4	52.0	62.8	103.6
二氯甲烷 Dichloromethane	64.3	106.9	62.7	56.2	98.4

在空白样品的甲醇粗提液中，添加适量的GYM，SPX1，OA，PTX2和AZA1的标准样品，使粗提液中各标准毒素的浓度分别为12.55，17.65，100.00，21.45和2.44 μg/L。取3 mL粗提液，加水定容至10 mL，使粗提液中甲醇比例占30%，以此粗提液进行固相萃取实验，测试HLB固相萃取柱的提取率，以及MAX、MCX固相萃取柱分别在酸性、中性、碱性条件下洗脱的提取率。各固相萃取小柱预先用3 mL甲醇、3 mL 30%甲醇溶液活化，加入200 μL粗提液，具体淋洗及洗脱方法见表5。各种固相萃取小柱在相应条件下做3个平行，平均提取率见表6。

研究表明，MAX阳离子交换柱酸性洗脱条件下可使各毒素取得理想的净化效果，GYM，SPX1，PTX2，AZA1的提取率大于95%，OA的提取率大于70%。与之相比，HLB固相萃取柱对GYM的提取率小于80%；MAX阳离子交换柱在碱性洗脱条件下仅有PTX2得到理想的提取率，在中性洗脱条件下

SPX1，PTX2 和 AZA1 可得到较高的提取率; MCX 阴离子交换柱在碱性洗脱条件下 SPX1 提取率小于 60%，在中性条件下 OA 和 PTX2 可得到理想的提取率，提取率均在 90% 以上; 在酸性洗脱条件下仅有 PTX2 和 AZA1 的提取率较为理想。因此实验最终选择 MAX 阳离子交换柱，在酸性洗脱条件下对提取液进行净化。

表 5　固相萃取小柱的淋洗及洗脱方法

Table 5　Washing and elution methods for different solid phase extraction columns

	HLB	MAX 柱 MAX column			MCX 柱 MCX column		
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
淋洗方法 Wash method	1 mL B	1 mL E; 1 mL B	1 mL B	1 mL C; 1 mL B	1 mL E, 1 mL B	1 mL B	1 mL C; 1 mL B
洗脱方法 Elution method	1 mL A	1 mL D	1 mL A	1mL F	1 mL D	1 mL A	1mL F

注(Note): Ⅰ. 酸性淋洗和碱性洗脱(Acid washing and alkaline elution); Ⅱ. 中性淋洗和中性洗脱(Neutral washing and neutral elution); Ⅲ. 碱性淋洗和酸性洗脱(Alkaline washing and acid elution)。A. 甲醇(Methanol); B. 30% 甲醇(Methanol); C. 2% 甲酸(Aminic acid); D. 2% 酸化甲醇(Acidified methanol); E. 5% NH_4OH; F. 5% 氨化甲醇(Ammoniated methanol)。

表 6　5 种脂溶性贝类毒素在不同固相萃取小柱及洗脱方式时的提取率

Table 6　Recoveries of five lipophilic marine toxins cleaned by different solid phase extraction columns with different elution method($n=3$)

毒素 Toxin	HLB	提取率 Recoveries (%)					
		MAX			MCX		
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
米氏裸甲藻贝毒素 GYM	73.8	0.0	67.4	102.3	102.7	0.0	0.0
螺环内酯毒素 SPX1	101.4	0.0	104.8	101.8	52.1	0.0	36.2
大田软海绵酸毒素 OA	70.7	0.0	0.0	72.9	74.6	94.65	32.4
蛤毒素 PTX2	104.3	100.9	101.3	101.2	80.3	0.0	102.0
原多甲藻酸贝类毒素 AZA1	104.1	48.2	102.4	109.6	102.3	107.5	90.7

注(Note): Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ同表 4(Ⅰ，Ⅱ and Ⅲ are the same as in Table 4)。

3.3　液相色谱串联质谱分析条件的确定

3.3.1　质谱条件的优化　采用注射泵直接进样方式，以 10 μL/min 将 GYM，SPX1，OA，PTX2，AZA1 的标准溶液注入串联质谱的离子源中。实验发现，GYM，SPX1，PTX2 和 ZA1 在 ESI(+) 电离模式下质谱信号强。OA 在 ESI(−) 电离模式下质谱信号强，正离子扫描方式对 GYM，SPX1，PTX2，AZA1 进行一级质谱分析，确定 GYM，SPX1 和 AZA1 的母离子均为 $[M+H]^+$，PTX2 的母离子为 $[M+NH_4]^+$; 负离子扫描方式对 OA 进行一级质谱扫描，确定 OA 的母离子为 $[M-H]^-$，然后分别针对电喷雾电压、离子源温度、辅助气压力、鞘气压力等参数进行了优化，最佳工作参数见 2.2.2 节。对被测物的母离子进行二级质谱分析，得到二级质谱图(图 1)。

3.3.2　色谱条件的确定　选用 Atlantis dC_{18} 色谱柱，以含有 50 mmol/L 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵溶液的乙腈-水(95:5，V/V)(A)、水(B)为流动相。实验发现，较之单纯以乙腈、水为流动相，实验所用流动相可以提高离子化效率，改善峰形，增加了 GYM 与 SPX1 的分离度; 当有机相的比例为 80% 时，虽然 AZA1 能在适宜的时间出峰，但是 GYM 和 SPX1 的出峰时间均小于 2 min，不易与杂质分离，影响了分析效果。通过设置梯度洗脱，延长了 GYM 和 SPX1 的出峰时间，同时可在 8 min 内完成5 种目标物的分析，各组分保留时间见表 1。

3.4　方法学验证

3.4.1　标准曲线　在扇贝闭壳肌空白样品中加入梯度系列浓度的 5 种脂溶性贝毒素，按照 2.3 节制备基质校正标准溶液，仪器响应峰面积 Y 对的 5 种脂溶性毒素浓度 X 进行线性回归，5 种贝毒素的线性良好(表 7)，空白样品及加标样品的色谱图见图 2。

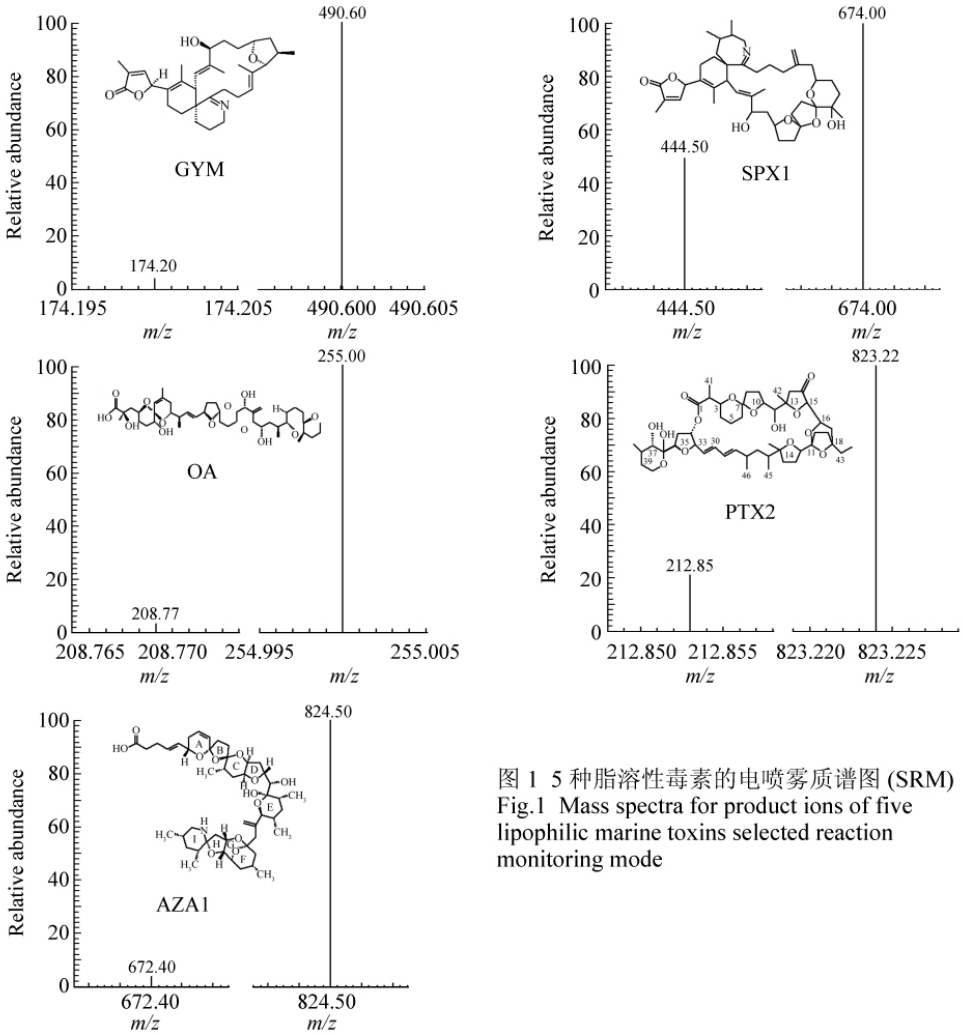

图1 5种脂溶性毒素的电喷雾质谱图(SRM)

Fig.1 Mass spectra for product ions of five lipophilic marine toxins selected reaction monitoring mode

表7 5种脂溶性毒素的回归方程、相关系数和线性范围

Table 7 Regression equation, correlation coefficient and linear range of five lipophilic marine toxins

毒素 Toxin	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range (μg/kg)
米氏裸甲藻贝毒素 GYM	$Y=104934X+7531.1$	0.9971	0.3~2.0
螺环内酯毒素 SPX1	$Y=13110.3X-3722.9$	0.9990	0.71~4.25
大田软海绵酸毒素 OA	$Y=2334X-1322.9$	0.9962	8.0~35.0
蛤毒素 PTX2	$Y=7106.3X-5432.9$	0.9934	1.72~7.5
原多甲藻酸 AZA1	$Y=965.3X+6989.4$	0.9981	0.19~0.84

注(Note): Y: 定量离子对峰面积(Peak area), X: 标准溶液浓度(Concentration of standard solution, μg/kg)。

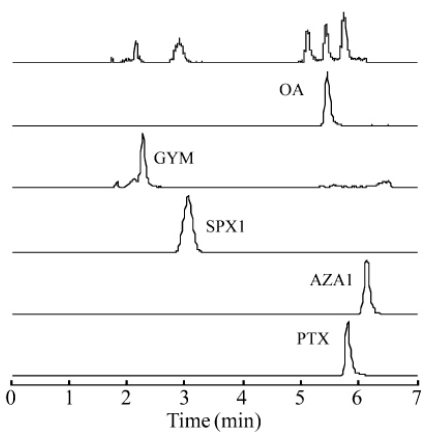

图2 加标扇贝肌肉的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of spiked scallop muscle

3.4.2 检出限、提取率和精密度 以 $S/N=3$ 计算方法的检出限,5种脂溶性毒素在贝类中的检出限分别为0.10,0.21,2.00,0.32和0.04 μg/kg。在扇贝贝壳肌空白样品中,添加3个浓度水平的毒素标准品溶液,每个添加水平平行测定6次,测定结果见表8。实验表明,本方法的提取率为78.6%~94.4%;相对标准偏差(RSD)为6.8%~14.9%。

表 8　空白样品添加 5 种脂溶性毒素的提取率及精密度($n=6$)

Table 8　Recoveries and precisions of five lipophilic marine toxins spiked in blank samples($n=6$)

毒素 Toxins	添加水平 Spiked level (μg/kg)	平均提取率 Mean recovery (%)	RSD (%)	毒素 Toxins	添加水平 Spiked level (μg/kg)	平均提取率 Mean recovery (%)	RSD (%)
米氏裸甲藻贝毒素 GYM	0.25	85.8	8.5	螺环内酯毒素 SPX1	0.88	79.3	7.7
	0.63	91.0	12.4		1.77	93.8	14.9
	1.26	89.7	10.0		3.53	91.9	10.8
大田软骨酸毒素 OA	10	78.6	10.2	蛤毒素 PTX2	2.15	81.1	7.3
	20	88.9	11.7		4.29	89.2	10.8
	30	94.4	11.2		6.44	87.7	6.8
原多甲藻酸 AZA1	0.24	88.70	12.7				
	0.48	89.3	10.1				
	0.72	90.1	13.3				

3.5　贝类样品污染状况调查

利用该方法分析了 2009 年 1 月到 7 月份采自大连、烟台、广州市场上的 112 个贝类样品,其中部分阳性样品毒素种类及含量见(表 9) ,说明该方法适用于实际样品的检测。

表 9　部分阳性样品毒素含量

Table 9　Content of shellfish poisoning in some polluted shellfish

样品 Samples	采样时间 Sampling time/ (day /month/ year)	采样地点 Sampling locations	毒素名称 Toxin	毒素含量 Toxin content (μg/kg)
牡蛎 *Crassostrea gigas*	20/2/2009	广州 Guangzhou	GYM	5.48
	20/1/2009		SPX1	1.16
栉孔扇贝 *Chlamys farreri*	20/6/2009	大连 Dalian	OA	5.27
	15/2/2009	烟台 Yantai	PTX2	8.11
	15/7/2009	大连 Dalian	AZA1	0.09

References

1 Hu T, Curtis J M, Oshima Y, Quilliam M A, Walter J A, Watson Wright W M, Wright J L C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, (20): 2159 ~ 2161

2 Cembella A D, Quilliam M A, Lewis N I, Bauder A G, Wright J L C. *Harmful Algae.*, **1998**: 481 ~ 484

3 Seki T, Satake M, Mackenzie L, Kaspar H F, Yasumoto T. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36(39): 7093 ~ 7096

4 Strling D J. *New Zeal. J. Mar. Freshwat. Res.*, **2001**, 35(5): 851 ~ 857

5 BAO Yi(暴 铱), GUO Lei(郭 磊), CHEN Jia(陈 佳), LIN Ying(林 缨), XIE Jian-Wei(谢剑炜). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(5): 764 ~ 771

6 Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120(38): 9967 ~ 9968

7 Toyofuku H. *Mar. Pollut. Bull.*, **2006**, 52(12): 1735 ~ 1745

8 Daranas A H, Norte M, Fernandez J. *Toxicon*, **2001**, 39(8): 1101 ~ 1132

9 European Commission, 2002. *Commission Decision* 2002/225/*EC Laying Down Detailed Rules for the Implementation of Council Directive* 91/492/*EEC as Regards the Maximum Levels and the Methods of Analysis of Certain Marine Biotoxins in Bivalve Molluscs*, *Echinoderms*, *Tunicates and Marine Gastropods*, Official Journal of the European Communities, **2002**: 62 ~ 63

10 Alexander J, Audunsson G, Benford D, Cockburn A, Cradevi J P, Dogliotti E, Domenico A D, Fernandez-Cruz M L, Fink-Gremmels J, Furst P, Galli C, Grandjean P, Gzyl J, Heinemeyer G, Johansson N, Mutti A, Schlatter J, Rv L, Peteghem C V, Verger P. *The EFSA Journal*, **2008**, 589: 1 ~ 62

11 JIANG Tao(江 涛), JIANG Tian-Jiu(江天久). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(11): 1460 ~ 1464

12 LIU Ren-Yan(刘仁沿), GAO Chun-Lei(高春蕾), LIANG Yu-Bo(梁玉波), ZHANG Fang(张 芳), LIU Yong-Jian(刘永健), XU Dao-Yan(许道艳). *Acta Oceanologica Sinica*(海洋学报), **2008**, 30(6): 171 ~ 176

13 Gerssen A, McElhinney M A, Mulder P P J, Hess M R B P, Boer J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 394: 1213 ~ 1225

14 These A, Scholz J, Preiss-Weigert A. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(21): 4529 ~ 4538

Determination of Five Lipophilic Marine Toxins in Shellfish by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

YAO Jian-Hua[1,2], TAN Zhi-Jun[1], ZHOU De-Qing*[1]

[1](*Yellow Sea Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Qingdao* 266071)

[2](*College of Food Science and Technology*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306)

Abstract A liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for the determination of five lipophilic marine toxins including Gymnodimine (GYM), Spirolide-1 (SPX1), Okadaic acid (OA) Pecenotoxin-2 (PTX2) and Azaspiracid-1 (AZA1) in shellfish was developed. After being extracted with methanol and water (80/20, *V/V*), the extract was cleaned by solid phase extraction of MAX column, then determined by a reversed phase HPLC gradient program coupled with tandem mass spectrometry in selected-reaction-monitoring mode. GYM, SPX1, OA, PTX2, AZA1 were analyzed in positive ion mode, while OA in negative ion mode. The calibration curves were linear well between LC peak area of the selected ion-pair and the concentration of five lipophilic marine toxins with the correlation coefficient over 0.99. The average recoveries from spiked scallop muscle at the concentration ranged from 78.6% to 94.4% with relative standard deviation from 6.8% to 14.9%. The limits of detection were 0.10, 0.21, 2.00, 0.32 and 0.04 μg/kg for GYM, SPX1, OA, PTX2 and AZA1 respectively.

Keywords Lipophilic marine toxins; Shellfish; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(Received 1 February 2010; accepted 18 May 2010)

《有机农药及中间体质谱手册》

该书是一部有机农药及中间体与代谢物的质谱工具书。全书共收集整理了1412种有机农药及中间体与代谢物，包括有机氯杀虫剂、有机磷杀虫剂、氨基甲酸酯类杀虫剂、沙蚕毒素类杀虫剂、卫生及建筑害虫防治剂、拟除虫菊酯类杀虫剂、其他杀虫剂、杀螨剂、增效剂、杀鼠剂、杀菌剂、除草剂、植物生长调节剂及农药中间体十四部分，几乎每个品种均列出了中文通用名称、英文通用名称、中文化学名称、英文化学名称、中文别名、英文别名、分子式、分子量、CAS登录号、分子结构式和电子轰击质谱图(EIMS)。为便于检索，书后附有中文名称索引、英文名称索引、分子式索引和CAS登录号索引。

该书信息量大、实用性强、索引完备，可供农业、环境保护、检验检疫、医疗卫生、司法鉴定等行业和有关高等院校、科研单位参考。

该书由李宏森、黄克建主编，化学工业出版社于出版，定价135.00元。