

超高压液相色谱-高分辨质谱快速筛查和确证食用贝类中多种原多甲藻酸贝类毒素

韩 深, 刘 鑫, 李建辉, 王珮玥, 古 瑾, 张朝晖*

(北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026)

摘 要: 建立超高压液相色谱-高分辨质谱快速筛查和确证贻贝、牡蛎、蚌类、扇贝等食用贝类及其制品中3种天然形式的原多甲藻酸贝类毒素的检测方法。样品中的原多甲藻酸采用乙腈-水体系均质提取, 应用改进型QuEChERS技术净化, 在乙腈-水(含5 mmol/L醋酸铵和0.1%甲酸)体系经Acquity HSS T3柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)梯度洗脱, 实现了3种原多甲藻酸贝类毒素的基线分离。该方法基于电喷雾正离子模式, 采用高分辨质谱一级全扫描和数据依赖扫描, 对食用贝类及其制品样品中的原多甲藻酸贝类毒素进行检测。3种贝类毒素的定量限均为10 μg/kg ($R_{SN} > 10$); 在10~500 μg/L范围内线性关系良好, 相关系数(R^2)均大于0.99。应用该方法对国内外多个地区的贝类产品进行了筛查及确证, 其中部分样品检出原多甲藻酸贝类毒素。该方法灵敏度高, 重复性好, 操作简便、快捷, 适用于食用贝类及其制品中多种原多甲藻酸贝类毒素的筛查分析。

关键词: 原多甲藻酸贝类毒素; 超高压液相色谱-高分辨质谱; QuEChERS

Rapid Profiling and Confirmation of Azaspiracids in Edible Shellfishes by Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry

HAN Shen, LIU Xin, LI Jian-hui, WANG Pei-yue, GU Jin, ZHANG Zhao-hui*

(Testing Center, Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: An ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometric method (UHPLC-LTQ/Orbitrap) was developed for the rapid profiling and confirmation of 3 natural azaspiracids (AZAs) (AZA-1, AZA-2 and AZA-3) in edible shellfishes including mussels, oysters, clams and scallops as well as related products. Samples were homogeneously extracted with acetonitrile-water. The diluted supernatants were then purified with a modified QuEChERS method. The separation was performed on an Acquity HSS T3 column (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) by gradient elution with acetonitrile in water containing 5 mmol/L ammonium acetate and 0.1% formic acid. The high-resolution mass spectrometry was carried out by means of electrospray ionization in positive ion mode (ESI⁺). The AZAs were detected by high-resolution MS under full scan and data-dependent scan modes, respectively. The limits of quantification (LOQ, $R_{SN} > 10$) were 10 μg/kg for all the 3 AZAs. The calibration curves showed good linearity within the concentration range of 10 μg/L to 500 μg/L with correlation coefficients (R^2) more than 0.99. Shellfish samples from home and abroad were profiled and confirmed by the established method. AZAs were found in some samples. Therefore this method is easy, sensitive, reproducible and efficient, and can be applied to profile and confirm AZAs in edible shellfishes and related products.

Key words: azaspiracids shellfish toxins; high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; QuEChERS

中图分类号: O657.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)04-0116-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201404024

自20世纪末期, 随着全球工业化进程飞速发展, 海洋环境遭受严重污染, 其中由有毒赤潮产生的藻毒素成为污染海水养殖环境的新要素, 严重威胁到水产品食用安全^[1]。原多甲藻酸贝类毒素(azaspiracids shellfish

toxins, AZAs)是近年来先于欧洲发现的一类新型聚醚类生物毒素^[2], 1995年在爱尔兰Killary海湾的紫贻贝中首次被检测到, 它是一种具有6,5,6-三螺环和环胺结构的亲脂性聚醚类海洋生物毒素^[3-4], 结构式见表1。

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011IK193; 2012IK145); 国家质检总局质检行业公益性科研专项(201210029)

作者简介: 韩深(1981—), 男, 工程师, 本科, 研究方向为食品安全检测。E-mail: hansh@bjciq.gov.cn

*通信作者: 张朝晖(1968—), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: zhangzh@bjciq.gov.cn

目前已确定化学结构的原多甲藻酸贝类毒素已有11种,其中属AZA-1、AZA-2及AZA-3是最常见且毒性最大的3种^[3,5]。AZAs主要引起人体胃肠道紊乱,通常在进食12~24 h后发作,此外,AZAs还能导致多种器官损伤,且这类毒素相对比较稳定,在酸性、碱性和高温条件都不能使其毒性降低^[6]。据估算,当摄入AZA-1剂量为23 μg/人和86 μg/人时,致毒概率分别为5%和95%,对人的平均致毒剂量为51.7 μg/人^[7]。2004年,由联合国粮农组织、世界卫生组织和政府间海洋委员会共同组建了服务于渔业和水产品法典委员会的双壳软体生物毒素工作组,将原多甲藻酸归为八大类贝类生物毒素之一^[8]。鉴于原多甲藻酸贝类毒素的危害性,欧盟立法机构确立双壳软体动物中AZAs的最大允许限量是160 μg/kg^[9]。

目前报道的原多甲藻酸的检测方法主要包括:生物测试法、液相色谱-质谱联用法等。采用生物法进行检测,往往会产生假阴性结果而造成实验结果不准确^[10]。液相色谱技术是分析生物毒素的一类高效的手段,但由于AZAs毒素在波长大于210 nm的范围缺少特征吸收峰,因此目前还未见相关采用液相色谱分析AZAs的报道。随着液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)技术的发展和不断完善,人们逐渐尝试建立了一些LC-MS分析方法来测定这类毒素^[11-16],由于贝类海产品及其制品基质较为复杂,采用单级质谱测定的结果可能会产生假阳性。线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱由于具有质量分辨率高和精确分子质量的功能,最近成为人们研究和应用的新热点。该方法在全扫描模式下采集的数据可以根据检测需求反复调用,因此其可以弥补传统低分辨质谱方法无法应对法规更新频繁的不足;其数据依赖性扫描可以在筛查的同时,通过碎片离子进行定性确证。

本实验基于QuEChERS前处理技术,运用超高效液相色谱和高分辨率质谱联用技术,对贻贝、牡蛎、蚌类、扇贝等食用贝类及其制品中3种天然形式的原多甲藻酸贝类毒素进行分析测定。相比低分辨率质谱,运用高分辨质谱一级全扫描和数据依赖扫描进行检测分析,在很大程度上降低了出现假阳性结果的可能性,使检测更加准确。同时,采用超高压液相色谱系统进行分离,不但节省试剂消耗,更提高了分析效率,3个毒素化合物在10 min内可完成分析,较好地实现了对贻贝、蚌类等的可食用贝类及其制品基体中3种AZAs贝类毒素的分析与测定。

1 材料与与方法

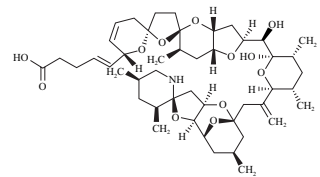
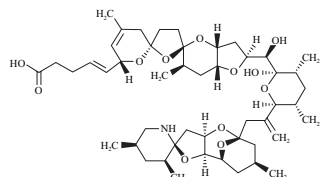
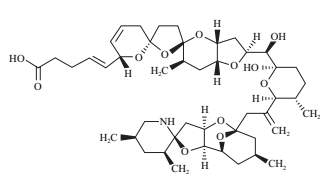
1.1 材料、试剂与仪器

贻贝、牡蛎、象拔蚌和扇贝4种食用贝类及其制品市售。

3种原多甲藻酸标准品AZA-1、AZA-2和AZA-3(纯度均≥99.0%) 美国Supelco公司(表1);乙腈、乙酸铵、甲醇、乙酸乙酯(均为色谱纯) 美国Fisher公司;甲酸(色谱纯) 美国Tedia公司;无水硫酸镁、氯化钠(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;C₁₈基质固相分散萃取分散剂 美国Agilent公司;微纤维滤纸 美国Vicom公司;微孔滤膜(0.2 μm) 美国Whatman公司;超纯水(电阻率为18.2 MΩ)经Milli-Q净化系统过滤。用甲醇配制3种原多甲藻酸贝类毒素的标准储备液,于-20℃条件下保存,保存期为6个月;配制标准工作曲线时,根据要求将储备液稀释成不同质量浓度,于-20℃条件下保存,工作曲线现用现配。

Orbitrap超高压液相色谱-高分辨质谱联用仪 美国Thermo Fisher Scientific公司;高速均质机 美国Waring公司;离心机 美国Sigma公司;漩涡混匀器 德国IKA公司;旋转蒸发仪 日本Eyela公司;Milli-Q超纯水装置 美国Millipore公司。

表1 3种原多甲藻酸贝类毒素标准对照品信息
Table 1 Information about 3 azaspiracid standards

化合物名称及 (CAS编号)	分子式	相对分子质量	结构式
原多甲藻酸-1 (214899-21-5)	C ₄₇ H ₇₁ NO ₁₂	841.497 1	
原多甲藻酸-2 (265996-92-7)	C ₄₈ H ₇₃ NO ₁₂	855.512 7	
原多甲藻酸-3 (265996-93-8)	C ₄₆ H ₆₉ NO ₁₂	827.481 4	

1.2 方法

1.2.1 色谱-质谱条件

1.2.1.1 色谱条件

色谱柱: Acquity HSS T3柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)和水溶液(含5 mmol/L乙酸铵和0.1%甲酸)(B); 流速: 250 μL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30℃。梯度洗脱程序: 0~1 min, 20%~50% A; 1~6 min, 50%~90% A; 6~7 min, 90% A; 7~7.5 min, 90%~20% A。

1.2.1.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（electrospray ion source, ESI）；扫描方式：正离子扫描；鞘气流量：35 arb；辅助气流量：6 arb；喷雾电压：4.8 kV；毛细管温度：350 ℃；毛细管电压：30 V；透镜电压：55 V；分辨率：60 000；HCD相对碰撞能量：23%；鞘气、辅助气、C-trap碰撞气类型：氮气。

1.2.2 样品前处理

由于AZAs在贝类的肌肉和内脏等组织中的富集程度各不相同，如AZA-1主要分布于消化腺，而AZA-3则主要分布于消化腺以外的其他组织^[3]，因此在取样时，应取除外壳的整个部分（包含肌肉和内脏）作为试样，以确保样品的均一性和代表性。

1.2.2.1 试样制备

用尖锐物品将试样去壳，将沙土及其他固体颗粒用清水冲洗去掉，沥干后称取200 g洗净的样品，置于洁净的密封袋中，放入-20 ℃的冰箱中保存，避免试样间的交叉污染。

可直接食用的样品直接称取即可。

1.2.2.2 提取和净化

准确称取制备好的试样10 g（精确至0.01 g）于均质杯中，分别加入25 mL 85%乙腈-水提取液，5 g无水硫酸镁和2 g氯化钠，在20 000 r/min条件下均质60 s，用微纤维滤纸过滤，取10 mL滤液至离心管中，加入0.5 g C₁₈基质固相分散萃取净化剂和1 g无水硫酸镁，旋涡振荡1 min，7 000 r/min离心5 min，取5 mL清液移至锥形瓶中，40 ℃条件下旋转蒸发至近干，以0.8 mL乙腈和0.2 mL水溶解，旋涡振荡30 s，过0.2 μm微孔滤膜，待仪器分析测定。

1.2.3 空白实验及回收率实验

选用不含上述3种原多甲藻酸贝类毒素的扇贝样品，分别添加3个水平（50、75 μg/kg和100 μg/kg）的原多甲藻酸标准物质，按上述步骤进行实验，计算回收率结果。

选取纯水代替试样，按照上述步骤进行空白实验。

2 结果与分析

2.1 提取条件的选择

经查阅相关文献，原多甲藻酸贝类毒素是一类脂溶性聚醚化合物，易溶于甲醇、乙腈、乙酸乙酯等有机溶剂，实验分别考察乙酸乙酯、甲醇、乙腈3种提取液的提取效率，结果表明，乙腈的提取效率相比较好。但由于贝肉中富含大量的蛋白质、氨基酸等杂质，使用100%乙腈进行提取时，会增加粗提液中干扰杂质的比例，给净化步骤增加难度，因此，实验还比较了85%乙腈-水体系的

提取效果，结果表明，85%的乙腈-水体系的提取效果与乙腈体系相当，但更有利于净化，见表2。

表2 加标量均为100 μg/kg的牡蛎样品在不同提取条件下3种AZAs的检测结果 (n=6)

Table 2 Recovery of 3 AZAs extracted from oyster samples spiked at 100 μg/kg by different methods under different conditions (n=6)

化合物	提取溶液				提取方法			提取时间/s			提取温度/℃		
	乙酸乙酯	甲醇	乙腈	乙腈-水	振荡	超声	均质	20	60	120	室温	40	70
AZA-1	68.9	71.3	82.5	82.2	55.3	78.0	90.5	56.7	83.4	84.5	78.1	83.2	78.1
AZA-2	70.9	69.8	81.2	85.4	53.2	77.1	82.3	55.4	82.1	80.8	75.1	85.6	83.1
AZA-3	56.7	62.3	77.4	78.9	45.9	65.5	80.6	54.6	88.2	88.1	74.2	80.7	79.3

常见的样品提取方式主要有振荡提取、均质提取、超声提取等，实验分别考察不同提取方式对提取的影响，且在同一条件下，还考察了提取时间和温度的影响，结果表明，均质提取的效果较好，延长提取时间在一定程度上能够帮助提高提取效率，提取温度对效率的影响不显著，见表2。

通过正交试验最终确定了前处理条件，室温条件下，以乙腈-水溶液作为提取液，采用高速均质仪器将样品均质60 s，待净化。

2.2 分散剂和盐的用量对提取效率的影响

QuEChERS净化技术是一种通用性强、快速且简便的前处理方法，近几年来被广泛应用于农药残留、兽药残留、毒素等检测中^[17-22]，本实验以贝类样品的基质特点为基础，参照QuEChERS的基本原理进行了改进，并得到了较为满意的结果。

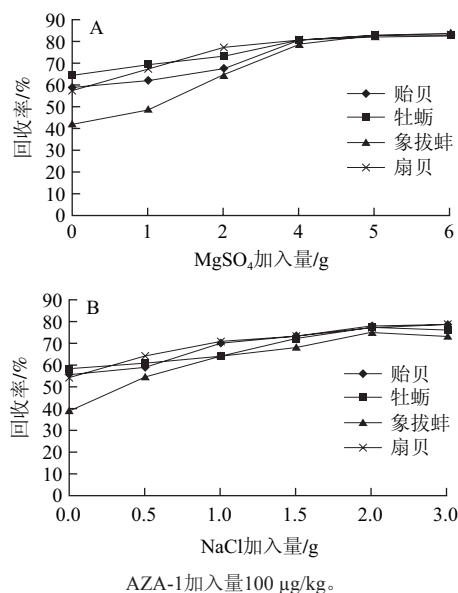


图1 MgSO₄加入量 (A) 和NaCl加入量 (B) 对4种贝类产品基质中AZA-1提取效率的影响

Fig.1 Effects of the amounts of added MgSO₄ and NaCl on extraction efficiency of AZA-1 in 4 shellfish matrixes spiked at 100 μg/kg

为了帮助提高提取效率,实验加入了无水硫酸镁和氯化钠。无水硫酸镁能够帮助目标化合物在提取溶液中更好的分散,使提取更加容易;氯化钠则能够使溶液体系中的水趋于相饱和,促使目标化合物分散至有机相并有助于水和乙腈相分层,从而提高提取效率^[23-27]。实验分别考察了无水硫酸镁和氯化钠的加入量对提取效率的影响,结果表明,5 g无水硫酸镁和2 g氯化钠的加入即能够获得较好地提取效率,见图1。

2.3 净化方式的选择

本实验采用了基质固相分散萃取技术进行净化处理,分析比较Florisil、C₁₈、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)、石墨化碳黑(graphitized carbon blacks, GCB)等几种常用净化剂的净化效果^[28-34],Florisil作为强极性吸附剂,无法去除提取液中的脂类杂质,AZAs的回收率偏低;GCB通常用于去除色素成分,因其可吸附较强的带苯环官能团的化合物^[35],且AZAs的结构中含有大量苯环,因此3种AZAs的回收率小于40%;PSA能有效去除基质中的脂肪酸和甾醇类杂质,但考虑到PSA作为碱性吸附填料对酸性化合物有较强吸附作用,AZAs恰好属于酸性化合物,因此吸附较为牢固,若要使用该类型的净化剂,提取时需添加一定的酸以减少损失^[36];C₁₈可有效去除脂类、糖类等亲脂型杂质,对AZAs这类化合物的适用性较好,但过量的C₁₈也会吸附目标化合物而使回收率降低,因此,需要对C₁₈净化剂的使用量进行优化。几种净化剂各有特点,需要在检测灵敏度、最佳净化效果和合理回收率之间寻求平衡点。因此,实验通过优化最终确定了使用C₁₈净化剂(按照实验确定的最终前处理步骤,每20 g样品加入1 g净化剂),并配以1 g无水硫酸镁可以达到较好的净化效果。

2.4 色谱条件的优化

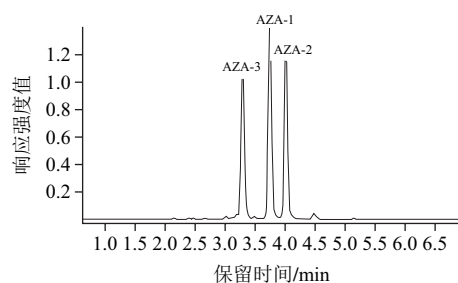


图2 3种AZAs的参考色谱图
Fig.2 Chromatograms of three AZAs standards

为了获得目标化合物最好的色谱分析效果,考察了乙腈-水和甲醇-水两种混合溶剂体系作为流动相时目标化合物的色谱行为。结果表明,使用甲醇-水体系作为流动相时,85%以上比例的甲醇才可目标化合物洗脱下来,当甲醇比例达到90%时,3种原多甲藻酸贝类毒素就无法实现基线分离了,由于乙腈的洗脱能力较强,当采用乙腈-水体系作为流动相时,3种AZAs在7 min内可实现基线分离,见图2。

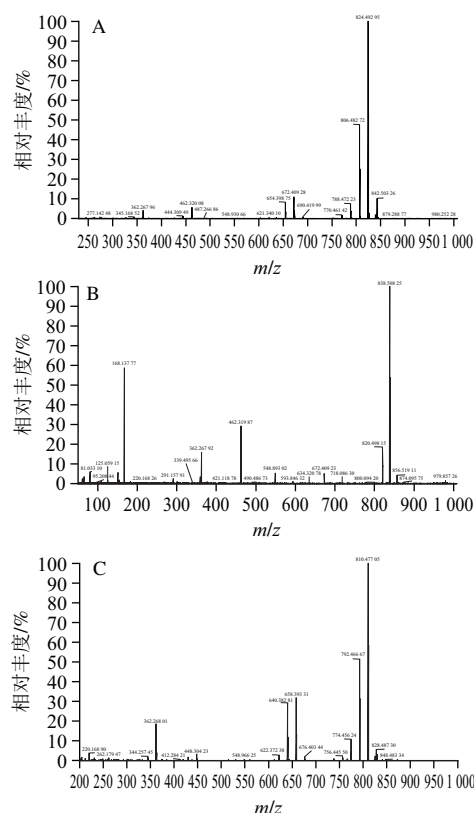
2.5 质谱条件的确定

根据欧盟2002/657/EC指令,采用三重四极杆质谱仪的SRM模式对目标化合物进行确证需要至少两个碎片离子,质谱仪属于高分辨质谱仪,因此,仅需要一个高分辨母离子和一个高分辨子离子就可以满足对目标化合物的确证要求。在本研究中,将全扫描模式的母离子作为定量离子,将峰丰度最高的HCD数据依赖性扫描碎片离子作为定性离子,并与理论值进行了对照,见表3。

本研究采用电喷雾离子源正离子模式,通过总离子流扫描可以看出,3种原多甲藻酸贝类毒素形成的准分子离子峰中[M+H]⁺峰丰度最高。采用HCD数据依赖性扫描得到多个碎片离子,形成的碎片离子中[M+H-H₂O]⁺的响应最高,因此选作为定性离子,见图3。

表3 AZA-1、AZA-2和AZA-3的质谱分析参数
Table 3 UPLC-MS/MS parameters of AZAs-1, 2 and 3

化合物	[M+H] ⁺ 理论值 (m/z)	[M+H-H ₂ O] ⁺			碰撞 能量/V
		理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 (×10 ⁻⁶)	
AZA-1	842.504 9	824.494 34	824.492 95	-1.68	35
AZA-2	856.520 6	838.509 99	838.508 25	-2.08	28
AZA-3	828.489 3	810.478 69	810.477 05	-2.02	40



A. AZA-1, [M+H-H₂O]⁺, m/z=824.492 95; B. AZA-2, [M+H-H₂O]⁺, m/z=838.508 25; C. AZA-3, [M+H-H₂O]⁺, m/z=810.477 05。

图3 扇贝样品中添加水平为10 µg/kg的3种AZAs参考二级质谱图
Fig.3 MS² fragmentation of 3 AZAs in scallops at spiked level of 10 µg/kg

2.6 线性范围、测定低限

3种原多甲藻酸贝类毒素采用基质曲线-外标法进行

定量。用空白样品提取液配制质量浓度为10~500 µg/L的混合标准溶液,以质量浓度为横坐标(x , µg/kg)和定量离子对峰面积为纵坐标(y)进行线性回归计算,所得相关系数(R^2)均大于0.99。根据10倍信噪比(R_{SN})确定化合物定量限(LOQ)。样品中3种原多甲藻酸贝类毒素的LOQs均为10 µg/kg,表4列出了线性范围、回归方程、相关系数和LOQs。

表4 扇贝中AZAs的线性范围、回归方程、相关系数和LOQs
Table 4 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients and LOQs for 3 AZAs spiked in scallops

化合物	线性范围/(µg/L)	线性方程	相关系数(R^2)	LOQ/(µg/kg)
AZA-1	10~500	$Y=8\ 833x-44\ 259$	0.995	10.0
AZA-2	10~500	$Y=62\ 729x-12\ 173$	0.996	10.0
AZA-3	10~500	$Y=8\ 787x-39\ 148$	0.996	10.0

2.7 精密度和回收率

经查阅,欧盟确立双壳软体动物中AZAs的最大允许限量为160 µg/kg^[9],实验选用不含上述3种毒素的贝类产品及其制品为空白样品,分3个水平进行添加回收实验,每个添加水平进行6次重复实验,分析并测定其精密度和回收率。3种AZAs在3个水平的添加回收率范围均在76%~103%之间,相对标准偏差小于10%($n=6$),满足分析的要求,见表5。

表5 混合贝类样品基质中3种AZAs的回收率和精密度($n=6$)
Table 5 Recovery ranges and precision of 3 AZAs in mixed shellfish matrices ($n=6$)

化合物名称	加标量/(µg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
AZA-1	50、75、100	77~103	7.27
AZA-2	50、75、100	81~102	8.06
AZA-3	50、75、100	76~95	6.49

2.8 实际样品测定

表6 17份样品测定结果
Table 6 Results obtained by the established method for the determination of AZAs in 17 samples

	µg/kg		
样品名称	AZA-1	AZA-2	AZA-3
扇贝-1	11.2	<10.0	<10.0
扇贝-2	<10.0	<10.0	<10.0
扇贝-3	<10.0	<10.0	<10.0
贻贝-1	<10.0	<10.0	<10.0
贻贝-2	<10.0	<10.0	<10.0
贻贝-3(进口)	<10.0	<10.0	<10.0
牡蛎-1	<10.0	<10.0	<10.0
牡蛎-2	<10.0	<10.0	<10.0
牡蛎-3(进口)	15.2	<10.0	<10.0
象拔蚌-1(进口)	<10.0	<10.0	<10.0
象拔蚌-2(进口)	<10.0	<10.0	<10.0
象拔蚌-3(进口)	<10.0	<10.0	<10.0
贻贝罐头制品	<10.0	<10.0	<10.0
牡蛎罐头	<10.0	<10.0	<10.0
干制扇贝-1	<10.0	<10.0	<10.0
干制扇贝-2	18.3	10.5	<10.0
干制扇贝-3	<10.0	<10.0	<10.0
添加50 µg/kg回收率	78%~101%		
添加100 µg/kg回收率	85%~97%		

采用研究建立的方法对共17份市售和进口贝类产品及其制品进行了测定,其中3份样品检出了AZAs,其中有一份样本同时检出了AZA-1和AZA-2,另外两份只检出AZA-1,但均未超过欧盟制定的安全限量标准,见表6。

3 结论

研究结果表明,通过改进QuEChERS技术和基质分散固相萃取净化技术可有效去除基质中的各类杂质,消除干扰,采用超高压液相色谱-高分辨质谱测定贻贝、牡蛎、蚌类、扇贝等食用贝类及其制品中3种原多甲藻酸贝类毒素具有快速、准确、灵敏度高、重复性好、操作简便等特点,本方法的测定低限能够满足国际上对该类项目的限量要求,适用于分析和测定食用贝类及其制品中原多甲藻酸类贝类毒素。

参考文献:

- [1] 周名江, 于仁成. 有害赤潮的形成机制、危害效应与防治对策[J]. 自然杂志, 2007, 29(2): 72-77.
- [2] JAMES K J, MORONEY C, RODEN C, et al. Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning[J]. Toxicon, 2003, 41(2): 145-151.
- [3] RAFAWL S, URBAN T, UWE J, et al. The role of *Azadinium spinosum* (Dinophyceae) in the production of azaspiracid shellfish poisoning in mussels[J]. Harmful Algae, 2011, 10: 774-783.
- [4] OFUJI K, SATAKE M, MCMAHON T, et al. Structure of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(3): 740-742.
- [5] LEHANE M, SÁEZ M J F, MAGDALENA A B, et al. Liquid chromatography-multiple tandem mass spectrometry for the determination of ten azaspiracids, including hydroxyl analogues in shellfish[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1024(1/2): 63-70.
- [6] JAMES K J, SIERRA M D, LEHANE M, et al. Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry[J]. Toxicon, 2003, 41(3): 277-283.
- [7] EU/SANCO. Report of the meeting of the working group on toxicology of DSP and AZP[R]. Brussels: EU/SANCO, 2001.
- [8] TOYOFUKU H. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report)[J]. Marine Pollution Bulletin, 2006, 52: 1735-1745.
- [9] 进出口食品安全局. 欧盟水产品法规摘编(精编版)[S]. 2009.
- [10] JAMES K J, LEHANE M, MORONEY C, et al. Azaspiracid shellfish poisoning: unusual toxin dynamics in shellfish and the increased risk of acute human intoxications[J]. Food Additive Contamination, 2002, 19(6): 555-561.
- [11] OFUJI K, SATAKE M, OSHIMA Y, et al. A sensitive and specific determination method for azaspiracids by liquid chromatography mass spectrometry[J]. Natural Toxins, 1999, 7(6): 247-250.
- [12] DRAISCI R, PALLESCHI L, FERETTI E, et al. Development of a method for the identification of azaspiracid in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 871(1/2): 13-21.

- [13] LEHANE M, BRAÑA-MAGDALENA A, MORONEY C, et al. Liquid chromatography with electrospray ion trap mass spectrometry for the determination of five azaspiracids in shellfish[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 950(1/2): 139-147.
- [14] MORONEY C, LEHANE M, BRAÑA-MAGDALENA A, et al. Comparison of solid-phase extraction methods for the determination of azaspiracids in shellfish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 963(1/2): 353-361.
- [15] HESS P, NGUYEN L, AASEN J, et al. Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, *Mytilus edulis*, prior to analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Toxicon*, 2005, 46(2): 62-71.
- [16] LEHOTAY S J, SON K A, KWON H, et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(16): 2548-2560.
- [17] WILKOWSKA A, BIZIUK M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125: 803-812.
- [18] GÖKMEN V, SERPEN A, FOGLIANA V. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20: 278-288.
- [19] KOESUKWIWAT U, LEHOTAY S, MIAO S, et al. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(1/2): 6692-6703.
- [20] SCHWARZ T, SNOW T A, SANTEE C J, et al. QuEChERS multiresidue method validation and mass spectrometric assessment for the novel anthranilic fiamide insecticides chlorantraniliprole and cyantraniliprole[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 814-821.
- [21] 曲斌, 朱志谦, 陆贵萍, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS快速测定猪肝中20种磺胺类药物残留[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(8): 1457-1464.
- [22] 王点点, 石利利, 宋宁慧. QuEChERS-高效液相色谱法测定稻田土壤、糙米和秸秆中的灭草松残留[J]. *分析实验室*, 2012, 31(6): 1-6.
- [23] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中30种激素类及氯霉素类药物残留[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(12): 1329-1337.
- [24] 刘亚伟, 董一威, 孙宝利, 等. QuEChERS在食品中农药多残留检测的应用研究进展[J]. *食品科学*, 2009, 30(9): 285-289.
- [25] AYSAL P, AMBRUS Á, LEHOTAY S J, et al. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 2007, 42: 481-490.
- [26] 张耀海, 焦必宁, 周志钦. 气相色谱-串联质谱法结合QuEChERS方法快速检测软包装饮料中8种光引发剂[J]. *分析化学*, 2012, 40(10): 1536-1542.
- [27] 郭萌萌, 李兆新, 谭志军, 等. 分散固相萃取/液相色谱-串联质谱法测定水产品中的8种青霉素残留[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(9): 969-975.
- [28] 刘茜, 刘晓宇, 邱朝坤, 等. 基质固相分散-高效液相色谱法测定鲫鱼肌肉中残留的辛硫磷[J]. *色谱*, 2009, 27(4): 476-479.
- [29] 耿志明, 李鹏, 陈明, 等. 基质固相分散-高效液相色谱法测定鱼肉中磺胺类药物残留[J]. *江苏农业学报*, 2006, 22(3): 310-312.
- [30] 张毅, 岳振峰, 蓝芳, 等. 分散固相萃取净化与液相色谱/串联质谱法测定牛奶中8类禁用药物残留[J]. *分析化学*, 2012, 40(5): 724-729.
- [31] 李广庆, 马国辉. 固相萃取技术在食品痕量残留和污染分析中的应用[J]. *色谱*, 2011, 29(7): 606-612.
- [32] CHU Xiaogang, HU Xiaozhong, YAO Huiyuan. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1063(1/2): 201-210.
- [33] VALSAMAKI V I, BOTI V I, SAKKAS V A, et al. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 573/574: 195-201.
- [34] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, ŠTAINBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce[J]. *Journal of AOAC International*, 2003, 86(20): 412-431.
- [35] WIEST L, BULETÉ A, GIROUD B, et al. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(34): 5743-5756.
- [36] LI Jianhui, LIU Xin, HAN Shen, et al. Analysis of ochratoxin A in wine by high-resolution UHPLC-MS[J]. *Food Analytical Methods*, 2012, 5(6): 1506-1513.