

网状原角藻中虾夷扇贝毒素提取与纯化

姚敬元^{1,2,3}, 金 薇^{1,2,3}, 陈文博⁴, 官长宝^{1,3,5},
贾宝林^{1,3}, 隋世峰^{1,3}, 冯少姝^{1,3}, 韩 蕾^{1,3},
梁玉波^{1,3}, 吕颂辉²

(1.国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 2.暨南大学, 广东 广州 510632; 3.大连市藻毒素重点实验室, 辽宁 大连 116023; 4.大连市现代农业生产发展服务中心, 辽宁 大连 116023; 5.大连理工大学, 辽宁 大连 116024)

摘 要:通过批量培养可产生虾夷扇贝毒素的网状原角藻,对获得的藻泥细胞超声破碎后,用甲醇提取;用大孔吸附树脂(HP20)吸附网状原角藻分泌于培养液中的胞外毒素,用70%的乙醇洗脱吸附于树脂上的毒素。采用高效液相色谱-串联质谱法,在网状原角藻毒素提取液中,发现9种虾夷扇贝毒素及其类似物,其中虾夷扇贝毒素YTX占总量95.1%,41YTX占3.65%,其他类似物共占1.25%。采用高效制备液相色谱分离纯化5次,获得的虾夷扇贝毒素经高分辨质谱法确认其分子量为1142.4747,分子式为C₅₅H₈₂O₂₁S₂,定量核磁法检测其纯度超过99%,满足虾夷扇贝毒素标准物质制备要求。

关键词:网状原角藻; 毒素提取与纯化; 高纯度虾夷扇贝毒素

中图分类号:X174 文献标识码:A 文章编号:1007-6336(2021)01-0101-06

Extraction and purification of yessotoxin in the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*

YAO Jing-yuan^{1,2,3}, JIN Wei^{1,2,3}, CHEN Wen-bo⁴, GONG Chang-bao^{1,3,5},
JIA Bao-lin^{1,3}, SUI Shi-feng^{1,3}, FENG Shao-shu^{1,3}, HAN Lei^{1,3},
LIANG Yu-bo^{1,3}, LV Song-hui²

(1.National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 2.Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3.Dalian key laboratory of algal toxin, Dalian 116023, China; 4.Dalian modern agricultural production development service center, Dalian 116023, China; 5.Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* producing yessotoxins was mass cultured. Then obtained algal cells were extracted by ultrasonic crushing with methanol for yessotoxins. Macroporous adsorption resin (HP20) was used to adsorb the extracellular toxin secreted in the culture medium, and the yessotoxins adsorbed on the resin were eluted with 70% ethanol. Nine of yessotoxin and their analogues were detected by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in extracts. The toxin of yessotoxin accounted for 95.1% of the total toxin group in the extracts, derivative 41YTX accounted for 3.65%, and other trace analogues accounted for 1.25%. Yessotoxin was purified through high performance preparation

收稿日期:2019-06-26, 修订日期:2019-09-06

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFF0201104, 2017FYC1404303); 国家自然科学基金项目(41576120, 41276099); 国家海洋局海洋赤潮灾害立体监测技术与应用重点实验室开放基金项目(MAYTHAB201605); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室开发基金项目(201613)

作者简介:姚敬元(1982—),女,辽宁大连人,博士,主要从事海洋生物毒素标准物质研究, E-mail: jingyuanqq@163.com

通讯作者:梁玉波(1962—),男,研究员,博士,主要从事海洋生物毒素研究, E-mail: ybliang@nmec.org.cn

吕颂辉(1963—),男,教授,博士,主要从事海洋赤潮生态研究, E-mail: lusonghui1963@163.com

liquid chromatography for 5 times. The molecular weight and molecular formula was confirmed as 1142.4747 and $C_{55}H_{82}O_{21}S_2$, respectively, by high resolution mass spectrometry. The purity of yessotoxin detected by quantitative nuclear magnetic method was more than 99%, meeting the requirement for preparation of yessotoxin standard material.

Key words: *Protoceratium reticulatum*; extraction and purification for toxin; high purity yessotoxin

虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)是一种硫酸酯聚醚类的海洋生物毒素(见图1)^[1],已报道的YTX及其类似物有百余种,称为虾夷扇贝毒素组(yessotoxins, YTXs)^[1-3]。虾夷扇贝毒素对人体的心脏、肝脏、胰脏和神经系统等组织器官可造成损伤,潜在威胁人类健康剂量为80~750 mg/kg^[4]。欧盟规定,海产品中虾夷扇贝毒素安全食用限量为3.75 mg/kg^[5]。虾夷扇贝毒素主要由网状原角藻(*Protoceratium reticulatum*)、多边舌甲藻(*Lingulodinium polyedrum*)和具刺膝沟藻(*Gonyaulax spinifera*)等海洋甲藻产生。网状原角藻是常见的产YTXs的微藻,分布于新西兰、日本、挪威、意大利、英国、加拿大、西班牙和美国等近岸海域^[6]。不同海域的网状原角藻中,YTXs的组成不同,一般YTX为其主要组分,但在日本^[7]和西班牙^[8]近岸海域网状原角藻以homoYTX组分为主。不同株系的网状原角藻单细胞产毒量变动很大,0~79 pg不等^[4],其产毒能力可受到温度、光照强度、生长时期和营养条件等多种因素影响^[6,9-11]。虾夷扇贝毒素属于脂溶性毒素,可存在于藻细胞内及细胞外。胞内毒素可采用甲醇溶液超声提取^[2,3,8,12-13];胞外毒素可采用大孔吸附树脂(HP20)富集^[1,14],这类树脂主要为苯乙烯聚合物,依靠范德华力和氢键吸附毒素,可富集水中的大田软海绵酸及鳍藻毒素等脂溶性毒素^[15-16]。海洋脂溶性毒素纯化可采用低压柱,填料有三氧化二铝、C18等^[17],但填装常压柱费时费力,且重复性差。制备液相色谱问世以来,有效地解决了这一问题,现已广泛应用于海洋生物毒素纯化^[18]。虾夷扇贝毒素可用高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)法检测^[2,19],其分子量可通过高分辨质谱(High resolution mass spectrometry, HRMS)测定^[20-21],其纯度可通过核磁共振波谱(Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)确定^[1,22]。

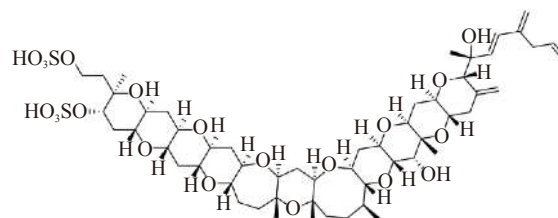


图1 虾夷扇贝毒素化学结构式^[1]

Fig. 1 Chemical structural formula for yessotoxin^[1]

近几年,在我国近海虾夷扇贝、栉孔扇贝、牡蛎、贻贝等双壳贝类体内虾夷扇贝毒素常有检出^[2,19,23-25],在北黄海虾夷扇贝消化腺中YTX时有超出欧盟限量标准^[2]。海水酸性条件下,网状原角藻产毒量明显增多^[26]。海水中磷比例降低有利于网状原角藻细胞内的毒素产生^[9,10,27]。全球气候变暖、海水酸化及营养盐比例失调等因素,使我国近海虾夷扇贝毒素的污染有不断加重的趋势。因此,加强海洋生物(虾夷扇贝)毒素的监测,保障我国海产品食用和生态环境的安全是非常必要的。然而,我国至今尚无虾夷扇贝毒素标准物质(有证参考物质),严重制约了我国虾夷扇贝毒素日常检测工作的开展。标准物质的制备需要毫克级以上的高纯度毒素,本研究通过批量培养网状原角藻,提取纯化其胞内和胞外毒素,可满足标准物质制备的需求。

1 材料与方法

1.1 试剂

无水甲醇(CH_3OH)、乙醇(CH_3CH_2OH)为分析纯,购自天津市科密欧化学试剂公司;大孔吸附树脂(HP20)购自日本三菱化学株式会社;虾夷扇贝毒素标准物质购自加拿大海洋生物科学研究所;乙腈为色谱纯,购自德国Merck公司;氨水为色谱纯,购自天津市科密欧化学试剂公司;色谱仪器用水均为蒸馏水,购自屈臣氏公司;0.22 μm 孔径滤膜,购自上海兴亚净化材料厂。

1.2 网状原角藻培养

网状原角藻分离自獐子岛海域^[2],在实验室

连续培养。一般 20 d 左右浓度可达到 10^4 cells/mL, 经连续流离心机浓缩, 收集藻泥用于胞内毒素提取; 收集海水培养液用于胞外毒素富集。

1.3 网状原角藻胞内虾夷扇贝毒素提取

称取 6 份网状原角藻藻泥, 每份 5 g, 分别添加 0%、20%、40%、60%、80% 和 100% 的甲醇溶液各 15 mL, 涡旋混合均匀后超声破碎, 功率为 20 W, 脉冲间歇时间为 3 s, 破碎时间为 12、24 和 36 min 时分别取样, 10000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 通过减压旋转蒸发仪、氮吹仪去除有机溶剂, 冷冻干燥去除水分, 甲醇重溶, 过 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径有机滤膜后, 高效液相色谱-串联质谱法分析毒素组成及含量, 确定最佳胞内毒素提取方法, 用该法提取剩余藻泥中的毒素, 去除水分后的毒素干粉于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 暂时保存, 待进一步分离纯化。

1.4 网状原角藻胞外虾夷扇贝毒素富集

网状原角藻培养液离心后的海水经过大孔吸附树脂 (HP20) 层析柱 ($76\ \text{mm}\times 500\ \text{mm}$) 富集胞外毒素, 流速约为 6 L/h, 过滤后, 5 倍柱体积纯水冲洗除盐后, 将填料混匀, 湿法填装成小柱 ($32\ \text{mm}\times 160\ \text{mm}$), 分别用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 的 500 mL (约四倍柱体积) 乙醇水溶液洗脱毒素, 由洗脱液中 YTX 的含量来判断洗脱效果。将含 YTX 的洗脱液旋蒸浓缩, 去除有机溶剂, 冷冻干燥去除水分, 毒素干粉于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 暂时保存, 待进一步分离纯化。

1.5 虾夷扇贝毒素分离纯化

将 1.3 节和 1.4 节中得到的毒素干粉用初始流动相 (20% 乙腈) 重溶, 过 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径有机滤膜后通过制备液相色谱 (谱道 P2100) 对虾夷扇贝毒素进行两次分离纯化。A 流动相为乙腈, B 流动相为水。最大上样量为 10 mL。第一次纯化, 每 3 min 收集一次。合并所有含有 YTX 的收集液, 旋转蒸发去除有机相后冷冻干燥。20% 乙腈重新溶解后, 过 $0.22\ \mu\text{m}$ 有机滤膜, 每次制备的收集液均按此方法处理。第二次纯化, 每 1 min 收集一次。

采用半制备液相色谱仪 (安捷伦 1260) 再进行 3 次分离纯化。最大上样量为 $100\ \mu\text{L}$ 。A 流

动相为乙腈+1%氨水, B 流动相为水+1%氨水。少量分流由单四级杆质谱检测器监测 YTX 碎片 $m/z=570$ 。第三、四、五次分离纯化均手动收集虾夷扇贝毒素洗脱液。

1.6 虾夷扇贝毒素检测方法

YTXs 检测方法及数据处理参考 Liu 等^[2]。对获得的高纯度虾夷扇贝毒素通过四级杆飞行时间高分辨质谱法 (HRMS) 确认分子量及分子式, 通过定量核磁法进行纯度鉴定。

2 结果与讨论

2.1 网状原角藻中的虾夷扇贝毒素及其类似物

本研究中的网状原角藻藻泥经甲醇超声提取, 高效液相色谱-串联质谱分析检测到 9 种毒素组分 (见图 2), 各组分相对百分含量从高到低依次为: YTX (95.10%), 41YTX (3.65%), homoYTX (0.79%), 45、46、47-trinorYTX (0.22%), 45、46、47-trinorhomo YTX (0.08%), 45-OH YTX (0.06%), 45-OH homo YTX (0.04%), 38YTX (0.03%), 49YTX (0.03%)。与 Liu 等^[2] 所用藻种源自同一株系, 但发现毒素组分由原来的 15 种减少至 9 种。与一株源自日本的网状原角藻中 4 个主要组分 YTX, homoYTX, 45、46、47-trinorYTX, 45、46、47-trinorhomoYTX 相似, 但不包含组分 noroxoYTX enone^[3]。

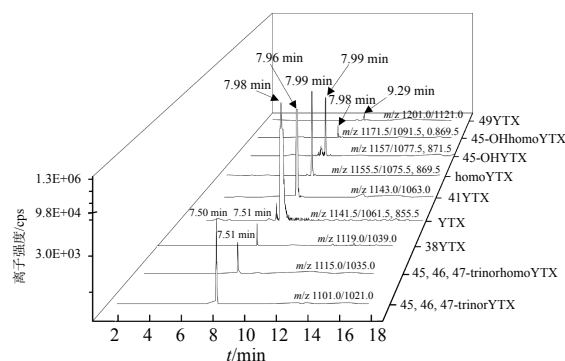


图 2 网状原角藻中虾夷扇贝毒素多重反应监测色谱
Fig. 2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram showing the presence of numerous yessotoxins in the strain *Protocercarium reticulatum* cells

根据毒素量及细胞数可知, 本研究中网状原角藻胞内 YTX 含量为 (2.2 ± 0.7) pg/cell, 胞外为 (1.7 ± 0.6) pg/cell。比 Liu 等^[2] 研究中的胞内及胞

外 YTX 毒素含量大幅度降低,这可能是由本藻株经室内条件下长时间培养,产毒能力明显下降所致。意大利东岸的一株网状原角藻培养于 f/2 营养液中,指数期胞内 YTX 含量为 (5.60 ± 0.36) pg,胞外含量为 (1.60 ± 0.13) pg;稳定期胞内含量为 (14.1 ± 1.3) pg,胞外为 (8.1 ± 0.8) pg^[10]。北海德国湾的网状原角藻中的 YTX 占 YTXs 总量的 94% 以上,指数期末的胞内 YTX 含量为 (7.22 ± 0.20) pg^[27]。西班牙的 3 株网状原角藻进入稳定期的时间及 YTX 含量均不同^[6]。在营养盐磷限制条件下培养,胞内毒素含量都有明显增加^[9-10,27]。虽然与其他海域株系相比,本实验室的网状原角藻产毒量略低,但 YTX 占总毒素的 95% 以上,且已适应室内高密度培养,因此适用于虾夷扇贝毒素提取。

2.2 网状原角藻胞内虾夷扇贝毒素的提取方法

5 g 藻泥分别用 0%、20%、40%、60%、80% 和 100% 的甲醇-水作为提取溶液,超声 12 min、24 min 和 36 min 后检测 YTX 含量($n=3$)。结果表明,采用 100% 甲醇超声破碎 24 min 得到的毒素含量最高,每克藻泥可获得大约 (91 ± 31) μ g YTX(见图 3)。高莉媛等^[28]采用异丙醇、甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醇和丙酮 6 种溶剂,超声波辅助提取海洋微藻中的脂溶性毒素时发现甲醇对脂溶性藻毒素的提取效果最好。郭萌萌等^[29]提取贝类样品中的 YTX 时,二氯甲烷提取液含有悬浮物,不利于后续净化;甲醇和 80% 甲醇水的提取率分别为 90% 和不足 80%。Liu 等^[2]和 Sala-Pérez 等^[12]在提取脂溶性毒素时均选用

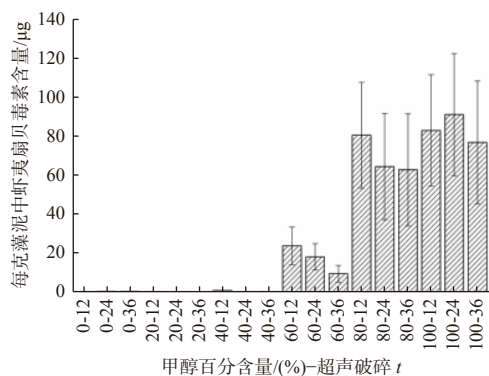


图 3 不同提取条件下每克藻泥中的 YTX 含量

Fig. 3 The content of YTX per gram of algal mud under different extraction conditions

无水甲醇作为提取溶液。另外,100% 甲醇提取液易于浓缩,有利于后续净化。因此,100% 甲醇为超声辅助提取胞内脂溶性毒素的最佳溶剂。

2.3 网状原角藻胞外虾夷扇贝毒素的富集

海水培养液(离心后,约 290 L)经大孔树脂(HP20)吸附后,用纯水冲洗去盐,湿法填装小柱,分别用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 乙醇-水溶液洗脱 YTX。结果表明,500 mL 70% 乙醇的洗脱液中 YTX 含量最高,可达 (304 ± 113) μ g;而 50% 以下的乙醇洗脱液几乎检测不到 YTX(见图 4)。HP20 广泛用于富集 YTX。MacKenzie 等^[30]首次提出原位监测有毒藻赤潮,并发现 DIAION[®]HP20、DIAION[®]SP70 和 DIAION[®]HP2MG3 种吸附树脂对 YTX 的平均相对回收率分别为 100%、36% 和 62%。Rundberget 等^[31]使用 HP20 树脂成功监测到 YTX 等 9 种藻毒素。宿志伟等^[15]使用 HP20 在黄海牡蛎养殖区水体中检测到 4 种脂溶性毒素。渠佩佩等^[14]使用 HP20 在浙江南鹿海域监测到 7 种脂溶性毒素(含 YTX)。Miles 等^[1]用 HP20 吸附藻滤液中的 YTX。Rundberget 等^[16]亦采用 HP20 成功吸附大量海水中的多种脂溶性毒素。虽然从 HP20 上洗脱 YTX 多用甲醇^[1,16],但乙醇毒性小,本文中 70% 乙醇对 YTX 在 HP20 上的解吸能力最强。

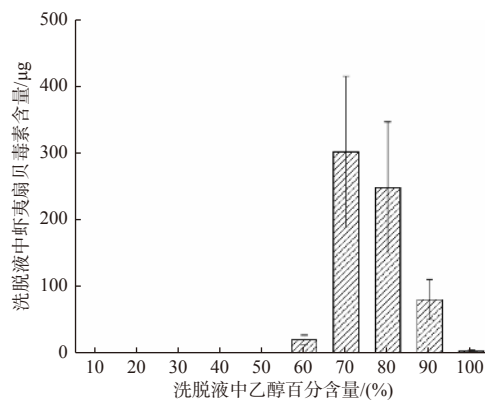


图 4 大孔树脂 HP20 吸附柱上虾夷扇贝毒素的乙醇洗脱效率

Fig. 4 Ethanol elution efficiency of yessotoxins on macroporous resin HP20 adsorption column

2.4 高效制备液相色谱分离纯化虾夷扇贝毒素效果

经过高效制备液相色谱 5 次分离纯化(见表 1),

最终获得高纯度的 YTX 固体。第一次制备杂质最多, 有机相初始比例设定较低 (20%), 洗脱时间最长达 40 min; 第二次制备有机相初始比例提

高到 38%; 第三次采用粒径 (5 μm) 更小的制备柱实现分离纯化; 第四次通过降低流速实现分离; 第五次通过缩短采集时段提高 YTX 纯度。

表 1 虾夷扇贝毒素通过高效制备液相色谱纯化的条件及收集时间

Tab.1 Purification conditions and collection time of YTX via high performance preparation liquid chromatography

制备次数	使用仪器	使用制备柱	洗脱条件	收集/min
第一次	谱道P2100	Welch Ultimate XB-C18, 粒径 10 μm , 20 \times 250 mm	A相, 20%~80%梯度洗脱0~40 min, 流速15 mL/min	18~27
第二次	谱道P2100	同上	A相, 38%~58%梯度洗脱0~20 min, 流速15 mL/min	10~12
第三次	安捷伦1260	Welch Xitimate C18, 粒径 5 μm , 10 \times 250 mm	A相, 20%~90%梯度洗脱0~15 min, 流速4 mL/min	7~10
第四次	安捷伦1260	同上	A相, 40%~70%梯度洗脱0~15 min, 流速2.36 mL/min	4~9.6
第五次	安捷伦1260	同上	同上	4.2~9.6

将高纯度 YTX 固体溶于甲醇中, 高分辨质谱扫描的主要质谱峰 $m/z=1141.4747$ 为分子离子峰 (M-H) (见图 5), 分子量为 1142.4747, 分子式为 $\text{C}_{55}\text{H}_{82}\text{O}_{21}\text{S}_2$, 同 YTX 一致。核磁谱图亦证实了该物质为 YTX (见图 6), 由定量核磁法测得 YTX 的纯度为 99.3%。

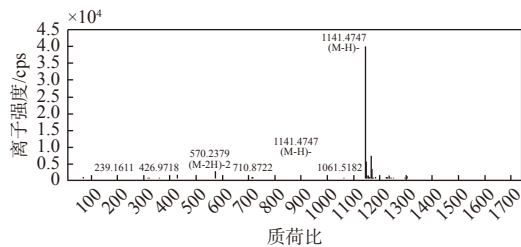


图 5 YTX 的高分辨质谱

Fig. 5 High resolution mass spectra of YTX

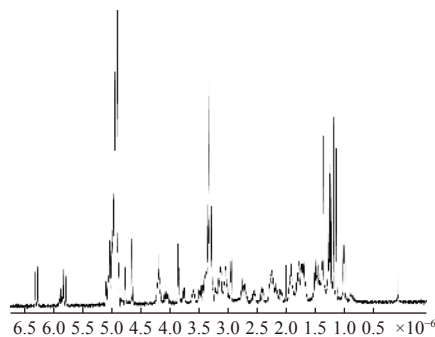


图 6 虾夷扇贝毒素的核磁共振波谱氢谱

Fig. 6 Hydrogen spectra of yessotoxin by NMR spectroscopy

3 结论

(1) 本研究中的网状原角藻, 适宜批量培养, 所含毒素以虾夷扇贝毒素为主, 可用作获得高纯

毒素的原料。

(2) 100% 甲醇-超声波辅助提取是网状原角藻胞内毒素的适宜提取方式。

(3) 大孔吸附树脂 HP20 适用于胞外虾夷扇贝毒素富集, 70% 乙醇是富集于树脂上虾夷扇贝毒素的适宜洗脱溶剂。

(4) 经过高效制备液相色谱 5 次分离纯化, 可获得纯度超过 99% 的虾夷扇贝毒素。

参考文献:

- [1] MILES C O, SAMDAL I A, AASEN J A G, et al. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*[J]. *Harmful Algae*, 2005, 4(6): 1075-1091.
- [2] LIU L, WEI N, GOU Y X, et al. Seasonal variability of *Protoceratium reticulatum* and yessotoxins in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in northern Yellow Sea of China[J]. *Toxicon*, 2017, 139: 31-40.
- [3] SUZUKI T, HORIE Y, KOIKE K, et al. Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1142(2): 172-177.
- [4] PAZ B, DARANAS A H, NORTE M, et al. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview[J]. *Marine Drugs*, 2008, 6(2): 73-102.
- [5] (EU) No 786/2013, Amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs[S].
- [6] PAZ B, BLANCO J, FRANCO J M. Yessotoxins production during the culture of *Protoceratium reticulatum* strains isolated from Galician Rias Baixas (NW Spain)[J]. *Harmful Algae*, 2013, 21-22: 13-19.

- [7] KONISHI M, YANG X M, LI B, et al. Highly cytotoxic metabolites from the culture supernatant of the temperate dinoflagellate *Protoceratium cf. reticulatum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(8): 1309-1313.
- [8] PAZ B, RIOBO P, RAMILO I, et al. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA[J]. *Toxicon*, 2007, 50(1): 1-17.
- [9] 高春蕾, 孙萍, 贾智慧, 等. 温度和营养盐限制对网状原角藻生长与产毒的影响[J]. *生态学报*, 2017, 37(12): 4217-4226.
- [10] GUERRINI F, CIMINIELLO P, DELL'AVERSANO C, et al. Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures[J]. *Harmful Algae*, 2007, 6(5): 707-717.
- [11] MITROVIC S M, HAMILTON B, MCKENZIE L, et al. Persistence of yessotoxin under light and dark conditions[J]. *Marine Environmental Research*, 2005, 60(3): 397-401.
- [12] SALA-PEREZ M, ALPERMANN T J, KROCK B, et al. Growth and bioactive secondary metabolites of arctic *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae)[J]. *Harmful Algae*, 2016, 55: 85-96.
- [13] ÁLVAREZ G, URIBE E, DÍAZ R, et al. Bloom of the Yessotoxin producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae) in Northern Chile[J]. *Journal of Sea Research*, 2011, 65(4): 427-434.
- [14] 渠佩佩, 杨晶晶, 徐轶肖, 等. 固相吸附毒素跟踪技术 (SPATT)在浙江南鹿海域的应用[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(4): 795-803.
- [15] 宿志伟, 赵峰, 刘远平, 等. 固相吸附毒素跟踪技术监测牡蛎养殖区中腹泻性贝毒[J]. *渔业科学进展*, 2016, 37(6): 144-150.
- [16] RUNDBERGET T, SANDVIK M, LARSEN K, et al. Extraction of microalgal toxins by large-scale pumping of seawater in Spain and Norway, and isolation of okadaic acid and dinophysistoxin-2[J]. *Toxicon*, 2007, 50(7): 960-970.
- [17] 刘丽. 网状原角藻(*Protoceratium reticulatum*)产毒特性及虾夷扇贝毒素的提取与纯化研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
- [18] 杨林, 荣明强, 刘少华, 等. 舟山黄海葵兴奋性毒素AX-1的分离纯化及鉴定[J]. *中国海洋药物*, 2012, 31(2): 25-33.
- [19] 刘仁沿, 梁玉波, 刘磊, 等. 液相色谱结合串联质谱方法研究中国沿海贝类中脂溶性藻毒素的种类结构和分布规律[J]. *生态环境学报*, 2014, 23(8): 1320-1326.
- [20] ORELLANA G, VAN MEULEBROEK L, VAN VOOREN S, et al. Quantification and profiling of lipophilic marine toxins in microalgae by UHPLC coupled to high-resolution orbitrap mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(21): 6345-6356.
- [21] GERSSEN A, MULDER P P J, DE BOER J. Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 685(2): 176-185.
- [22] BURTON I W, QUILLIAM M A, WALTER J A. Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(10): 3123-3131.
- [23] LIU Y, YU R C, KONG F Z, et al. Contamination status of lipophilic marine toxins in shellfish samples from the Bohai Sea, China[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 171-180.
- [24] 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.
- [25] 陈建华, 于仁成, 孔凡洲, 等. 北黄海海域虾夷扇贝体内脂溶性藻毒素分析[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(4): 855-863.
- [26] MONTECHIARO F, GIORDANO M. Compositional homeostasis of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* grown at three different pCO₂[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(2): 110-113.
- [27] RÖDER K, HANTZSCHE F M, GEBÜHR C, et al. Effects of salinity, temperature and nutrients on growth, cellular characteristics and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*[J]. *Harmful Algae*, 2012, 15: 59-70.
- [28] 高莉媛, 王艳龙, 陈军辉, 等. 高效液相色谱-离子阱质谱法测定海洋微藻藻粉中的8种脂溶性毒素[J]. *海洋科学*, 2016, 40(10): 113-119.
- [29] 郭萌萌, 谭志军, 吴海燕, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定贝类中大田软海绵酸、鳍藻毒素、蛤毒素和虾夷扇贝毒素[J]. *色谱*, 2012, 30(3): 256-261.
- [30] MACKENZIE L, BEUZENBERG V, HOLLAND P, et al. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves[J]. *Toxicon*, 2004, 44(8): 901-918.
- [31] RUNDBERGET T, GUSTAD E, SAMDAL I A, et al. A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers[J]. *Toxicon*, 2009, 53(5): 543-550.