

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.02.015

神经性贝类毒素免疫亲和柱的制备与应用

The preparation and application of immunoaffinity column for neurotoxic shellfish poisoning

董 昕¹ 白景妙² 吴海燕³DONG Xin¹ BAI Jing-miao² WU Hai-yan³

(1. 品测[上海]检测科技有限公司, 上海 201108; 2. 山东美正生物科技有限公司, 山东 青岛 266000;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266000)

(1. *Quality [Shanghai] Testing and Technology Co., Ltd., Shanghai 201108, China*; 2. *Shandong Meizheng Bio-Tech Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266000, China*; 3. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266000, China*)

摘要:通过纯化 PbTX-2 单克隆抗体,以琼脂糖凝胶(sepharose 4B)为载体制备神经性贝类毒素(NSP)免疫亲和柱,并建立 NSP 的免疫亲和柱净化—液相色谱—串联质谱分析方法。样品以含 80% 甲醇水溶液提取, PBS 缓冲液稀释, 经过 NSP 免疫亲和柱净化和富集后进行 LC-MS/MS 测试分析。同时对上样液、淋洗液、洗脱液等亲和柱参数进行优化。结果表明: NSP 免疫亲和柱对贝类样品有很好的净化作用, 降低了贝类基质中脂肪、蛋白质、色素、分泌黏液等杂质干扰, 提高了样品回收率。在 40~800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内样品加标平均回收率为 82.95%~112.95%, 相对标准偏差为 1.27%~2.94%。该 NSP 免疫亲和柱净化效果强、灵敏度高且受基质干扰小, 适用于贝类中神经性贝类毒素的分析测定。

关键词:免疫亲和柱; 液相色谱—串联质谱; 短裸甲藻毒素; 神经性贝类毒素

Abstract: Objective: Prepare immunoaffinity column (IAC) for pre-processing Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) samples, and to establish a method of IAC purification LC-MS/MS spectrometry for the NSP. Method: The IAC for the NSP was prepared by purification of PbTX-2 monoclonal antibody and agarose gel (Sephacrose 4B) as carrier. The samples were extracted with 80% methanol aqueous solution, diluted with PBS buffer, purified and enriched by the IAC, and analyzed by LC-MS/MS. Meanwhile, the parameters of IAC such as sample solution and eluent were optimized. The results showed: The IAC for the NSP had a good purification effect on shellfish samples, reduced the interference of fat, protein, pigment, mucus and other impurities

作者简介:董昕(1966—), 女, 品测(上海)检测科技有限公司高级工程师。E-mail: dongxin5397364@163.com

收稿日期: 2020-01-16

in shellfish matrix, and improved the recovery. In the range of 40~800 ng, the average recovery of standard addition was 82.95%~112.95%, and the relative standard deviation was 1.27%~2.94%. Conclusion: The IAC for the NSP can meet the needs of daily monitoring, with small matrix interference, strong purification effect and high sensitivity. It's suitable for the analysis and determination of the NSP.

Keywords: immunoaffinity column; LC-MS/MS; brevetoxin; neurotoxic shellfish poisoning

贝类毒素亦称赤潮生物毒素,是由有害赤潮生物产生的天然活性物质。赤潮是在特定的环境下,海水中原生生物、浮游生物或细菌爆发性增殖造成水体变色的生态现象。在 5 000 多种海洋微藻中,可以形成赤潮的微藻至少有 180 种,其中有有毒的藻类占据近 1/2,已被证实含有毒素或者能够分泌毒素的有 30~40 种^[1]。因研究人员最早从贝类体内发现赤潮毒素,故称此类毒素为贝类毒素。赤潮毒素随着滤食性鱼、虾、贝类的滤食活动被富集在体内,造成海产品毒化。毒化的海产品通过食物链的传递最终导致人体中毒。

神经性贝类毒素(Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP)是由短裸甲藻、剧毒冈比甲藻等藻类在细胞裂解、死亡时会释放出一组效力较大的神经毒素。高浓度的神经毒素很容易造成鱼类的大批量死亡,相反牡蛎、蛤类和贻贝对该毒素不敏感,外表上完全呈现出健康状态^[2]。神经性贝类毒素是一类脂溶性环状聚醚类毒素,可造成误食者神经系统和胃肠道不适,引发恶心、呕吐、腹泻、痉挛、支气管收缩、麻痹、抽搐和昏迷等症状。其中短裸甲藻毒素(Brevetoxin, BTX)是主要的一类毒素成分,主要由裸甲藻、海洋卡盾藻和赤潮异弯藻产生,其基本结构分

为 A 型(BTX-A, 即 PbTX-A)和 B 型(BTX-B, 即 PbTX-B), 包含数十种衍生物, 以 BTX-2(即 PbTX-2)最为常见^[3-4]。

目前美国、澳大利亚和新西兰等国家规定小鼠生物法安全标准为 20 MUs/100 g, 相当于 800 μg PbTX-2/kg 贝肉组织^[5], 而中国尚无针对此类毒素的限量标准, 一般针对此类毒素的限量值是参考欧美限量。

国际上普遍采用小鼠生物法、免疫分析法、细胞毒性检测法及理化分析方法等手段来检测贝类并作出预警预报^[6-10]。小鼠生物法是检测贝类毒素发展最早、应用最广泛的分析方法, 但存在灵敏度差、步骤繁琐、无法确定毒素组分、重复性差(不同批次、不同品系小鼠)、易导致假阳性结果等问题。酶联免疫法虽检测时间短、成本低, 但易受交叉反应的影响而出现假阳性或者假阴性的问题。液相色谱法需要复杂的前处理, 且缺乏准确的定性能力。液相色谱—质谱联用技术结合了液相色谱优越的分离能力与质谱高灵敏度的定性定量功能, 应用越来越广泛。但市场上存在的一些固相萃取柱产品, 回收率低、样品基质干扰仍较严重, 大大降低了方法的应用率^[11-13]。免疫亲和柱(immunoaffinity column, IAC)是一种基于抗原抗体反应的新型层析柱, 可选择性吸附样品提取液中的目标化合物, 在特异性富集毒素的同时净化样品基质, 净化效果好。作为新型高效的前处理净化技术, 免疫亲和柱净化技术正在不断改进发展, 在生物毒素检测领域应用越来越广泛^[14-16]。

试验拟以 PbTX-2 为研究对象, 研制 NSP 免疫亲和柱的装柱, 并建立 NSP 的免疫亲和柱净化—液相色谱—串联质谱分析方法, 以期经免疫亲和柱净化的样品提取液可直接用于 LC-MS/MS 分析, 达到快速检测和提高检测方法灵敏度、准确性的目的。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

贻贝、蛤蜊、牡蛎、扇贝样品: 市售;

PbTX-2 标准品: 纯度 99.5%, 美国 LKT LABS 公司;

甲酸、甲酸铵: 色谱纯, 美国 Sigma 公司;

甲醇、乙腈: 色谱纯, 德国 Merck 公司;

十二水合磷酸氢二钠、氯化钠、盐酸、碳酸氢钠、二水合磷酸二氢钠: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

BCA 蛋白质定量检测试剂盒: 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

琼脂糖凝胶: 上海通用电器有限公司;

0.22 μm 有机微孔滤膜: 上海安普科学仪器有限公司;

试验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

液相色谱—四极杆/离子阱复合质谱: AB 5500

QTrap 型, 美国 SCIEX 公司;

纯水仪: MILLI-Q 型, 美国 Millipore 公司;

分析天平: ME204 型, 瑞士梅特勒—托利多公司;

旋窝振荡器: Talboys 型, 美国 Talboys 公司;

高速离心机: Himac CR 22G II 型, 日立 Hitachi 公司;

气控操作架: HM09004-1 型, 北京美正生物科技有限公司。

1.3 NSP 免疫亲和柱的制备

1.3.1 PbTX-2 单克隆抗体制备 采用动物体内诱生单克隆抗体法合成 PbTX-2 全抗原对小鼠进行免疫, 取小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞 Sp2/0 进行融合, 筛选出特异性强、灵敏度高、能分泌抗 PbTX-2 的单克隆抗体细胞株, 通过液体石蜡注射到小鼠腹腔内致命, 然后将分泌抗 PbTX-2 的细胞接种到小鼠体内, 制备抗 PbTX-2 的单克隆抗体腹水。使用 Protein G 柱进行抗体纯化^[17]。

1.3.2 PbTX-2 抗体蛋白浓度测定 将 PbTX-2 抗体溶液用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒进行蛋白浓度测定。测得该 PbTX-2 抗体溶液蛋白浓度为 2 mg/mL。

1.3.3 NSP 免疫亲和柱的制备 将纯化后的 PbTX-2 抗体加入处理好的 Sepharose CL 4B 凝胶中^[18], 具体步骤:

(1) 凝胶制备: 将 2 g 溴化氢活化的 Sepharose CL 4B 干粉加入到 25 mL 1 mmol/L 的 HCl 溶液中溶胀, 将胶转入砂芯漏斗中, 然后用 200 mL 1 mmol/L 的 HCl 清洗, 再用 200 mL 反应缓冲液(0.1 mol/L 碳酸氢钠)清洗充分。

(2) 偶联: 清洗完后抽干, 将胶加入 10 mL 含有 0.5 mg/mL PbTX-2 的抗体偶联缓冲液溶液中, 室温温和搅拌 2 h 或过夜反应, 反应完成后静置, 收集上清, BCA 法测定上清液中未偶联蛋白含量, 按式(1)计算偶联率, 经测定制备的 NSP 抗体与凝胶的偶联率为 100%。

$$p = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

p ——偶联率, %;

m_1 ——偶联前抗体总量, mg;

m_2 ——未偶联抗体总量, mg。

(3) 洗涤: 用反应缓冲液洗涤反应后的胶, 将胶加入 15 mL Tris-HCl (0.1 mol/L, pH 8.0) 缓冲液中, 室温下温和搅拌 2 h。用 600 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.5) 和 Tris-HCl 先后交替进行洗涤 4~6 次。

(4) 装柱: 洗涤后的凝胶用 250 mL PBS 充分平衡后装柱, 取 3 mL 空柱管压好底部筛板, 然后将胶平均装到 10 支 3 mL 柱管中, 堵好上下堵头, 做好标识, 储存于 2~8 °C。每根柱凝胶体积为 0.5 mL, 相当于每根柱含有 0.3 mg NSP 抗体。

1.3.4 NSP 免疫亲和柱的柱容量验证 为了评价自制

NSP 免疫亲和柱的效果,通过不同上样量的回收试验,测试自制柱的柱容量。分别移取 1 mL 浓度为 200, 400, 1 000, 1 600 ng/mL 的 PbTX-2 标准溶液与 20 mL PBS 溶液混合均匀,全部添加到制备的免疫亲和柱上,以 1 mL/min 的流速流出,然后用 6 mL 20% 甲醇水溶液淋洗免疫亲和柱,流速 2~3 滴/s,流干柱内残留液,并弃去以上全部流出液。最后用 3 mL 甲醇洗脱,流速 1 滴/s,收集洗脱液,室温中氮吹至小于 1 mL,用甲醇补至 1 mL。混匀后用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后进行检测。计算柱容量,具体数据见表 1。

表 1 PbTX-2 上样量与回收率

Table 1 The Sample loading and recovery of pbtX-2 ($n=3$)

PbTX-2 上样量/ng	平均测定值/ng	回收率/%
200	209.6	104.80
400	360.6	90.15
1 000	912.1	91.21
1 600	1 167.7	72.98

由表 1 可知,自制免疫亲和柱的上样量在 1 000 ng 以下回收率均达到 90% 以上,而上样量在 1 000 ng 以上时,回收率下降。因此自制免疫亲和柱的最大柱容量为 1 000 ng。

1.4 NSP 免疫亲和柱的应用

1.4.1 NSP 标准溶液的配制 称取一定量的 PbTX-2 粉末,用纯甲醇稀释至 1 mg/mL, -18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 1 年。根据 PbTX-2 在 LC-MS/MS 上响应值和线性相关性,将母液稀释浓度为 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng/mL 的标准工作溶液。

1.4.2 样品前处理 准确称取已充分均质样品 2.00 g 于 50 mL 具塞试管中,加入 8 mL 80% 甲醇水溶液,涡旋震荡 2 min,超声提取 10 min, 8 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至 20 mL 刻度玻璃管中。然后加入 8 mL 80% 甲醇水溶液重复提取一次,合并两次提取液,用 80% 甲醇水溶液定容至 20 mL。移取 5 mL 提取液,加入 20 mL PBS 溶液稀释(稀释 2 倍),全部过免疫亲和柱净化。

取出免疫亲和柱去掉上方塞子,安装上转接头,将转接头另一端与针筒连接固定后使用。将柱子直接与气控操作架上的针筒连接固定,处理后的溶液上样,上样结束后用 6 mL 20% 甲醇水溶液淋洗免疫亲和柱,流速 2~3 滴/s,流干柱内残留液,并弃去以上全部流出液。最后用 3 mL 甲醇洗脱,流速 1 滴/s,洗脱液定容至 4 mL,混匀后用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后进行检测。

1.4.3 NSP 仪器检测条件

(1) 色谱条件:色谱柱为 Kinetex, XB-C₁₈ 柱(100 mm \times

2.1 mm, 2.6 μm); 进样体积 5 μL ; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速 0.3 mL/min; 流动相 A 为去离子水(含 50 mmol/L 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵); 流动相 B 为 95% 乙腈水溶液(含 50 mmol/L 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵); 洗脱条件 0.0 min (80% A) \rightarrow 5.0 min (10% A) \rightarrow 10.0 min (10% A) \rightarrow 10.1 min (80% A) \rightarrow 12.0 min (80% A)。

(2) 质谱条件:检测类型为电喷雾离子源,正离子扫描模式(Electrospray ionization, ESI+);检测方式为多反应监测模式(Multiple Reaction Monitor, MRM);毛细管电压 5 500 V;离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$;气帘气压力 206 kPa;雾化气压力 345 kPa;辅助加热气压力 345 kPa;碰撞气 CAD 中等流量;定量离子对 895.4 > 877.4,碰撞能量 26 eV;定性离子对 895.4 > 859.6,碰撞能量 30 eV。

2 结果与分析

2.1 免疫亲和柱的制备

2.1.1 凝胶溶胀溶液体积的选择 将 2 g 溴化氢活化的 Sepharose CL 4B 干粉分别加入 15, 20, 25, 30 mL 1 mmol/L 的 HCl 溶液中溶胀。试验结果显示溶胀液体积在 25 mL 以下干粉溶胀不完全,因此选择 25 mL 溶胀液对 Sepharose CL 4B 干粉进行溶胀。

2.1.2 偶联反应方式 选用室温温和搅拌 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 h 使其充分偶联,经测定室温搅拌 2~4 h 的偶联率均为 100%,而搅拌 1 h 以下的偶联率低于 80%,所以选择室温偶联时间为 2 h。

2.2 免疫亲和柱的应用优化

2.2.1 稀释缓冲液的确定 抗体对有机溶剂的敏感性是免疫亲和柱净化和富集过程中的一个重要因素,影响免疫反应的活性。抗体对甲醇溶液有一定程度的耐受能力,若上样液中甲醇浓度过高会破坏抗原抗体的结合。因此选择适合的缓冲液稀释是获得高回收率的关键。PBS 磷酸盐缓冲溶液具有盐平衡、可调整的适宜 pH 缓冲作用,所以选择 PBS 样品稀释缓冲液。

以添加量为 200 ng 的扇贝样品提取液为基准,用 PBS 进行不同倍数稀释,通过比较不同稀释倍数下样品回收率,确定最佳稀释比例。具体数据见图 1。

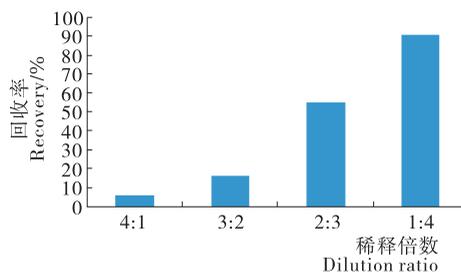


图 1 PBS 不同稀释比例对回收率的影响

Figure 1 The influence of different dilution ratio of PBs on recovery

由图 1 可得,NSP 免疫亲和柱对甲醇的耐受能力在 20%左右,随着上样液中甲醇浓度的增加,破坏了抗原抗体的特异性结合,使部分毒素结合不牢固而流失,造成样品回收率降低。当样品液:PBS 体积比为 1:4 时样品回收率达到 90%以上。因此选择稀释比例为 1:4。

2.2.2 淋洗液的确定 考虑到 PbTx-2 的溶解性,为验证淋洗过程中淋洗液(20%甲醇水溶液)是否会造成损失,收集全部 6 mL(2 倍柱体积)淋洗液进行 LC-MS/MS 测试,结果发现淋洗过程中无损失,当淋洗液中甲醇浓度 <

20%时,不能使 PbTx-2 溶解,而当淋洗液中甲醇浓度 > 20%时,破坏了抗原抗体的特异性结合,PbTx-2 的回收率明显降低,故最终选择 6 mL 20%甲醇水溶液淋洗免疫亲和柱。

2.2.3 洗脱液的确定 对 PBS 溶液进行加标(加标量 200 ng),不添加样品基质以排除基质干扰,以水、50%甲醇水溶液、甲醇、2%氨水甲醇溶液作为洗脱液,做 3 组平行试验,同时采用不同洗脱体积进行洗脱收集,以回收率为指标筛选出最佳洗脱液和洗脱体积,结果见表 2。

表 2 洗脱液对回收率的影响

Table 2 The effect of different eluents on recovery

洗脱液	理论值/ng	定量结果/ng			平均回收率/%
		1	2	3	
水(3 mL)	200	1.79	1.84	2.46	1.02
甲醇(2 mL)	200	151.13	148.22	146.25	74.27
甲醇(3 mL)	200	175.24	185.72	180.45	90.24
甲醇(4 mL)	200	176.25	184.46	175.55	89.38
50%甲醇水溶液(3 mL)	200	120.11	109.12	113.44	57.11
2%氨水甲醇溶液(3 mL)	200	2.63	2.79	3.39	1.47

由表 2 可知,用水、50%甲醇水溶液、2%氨水甲醇溶液洗脱时,PbTX-2 的回收率分别为 1.02%,57.11%,1.47%,回收率均偏低;分别用 2,3,4 mL 甲醇洗脱,回收率分别为 74.27%,90.24%,89.38%。试验表明:洗脱液体积 ≥ 3 mL 时,PbTX-2 能被洗脱出来。洗脱液体积过多时会造成试剂浪费,故最终选择 3 mL 甲醇作为洗脱溶剂。

2.2.4 样品提取试剂的确定 PbTx-2 具热稳定性,易溶解于甲醇、乙醚等有机试剂,参考 GB 5009.198—2016 方法中对贝类样品的提取试剂,同时考虑到 DSP 免疫亲和柱的前处理过程^[12],试验比较了 20%甲醇水溶液、50%甲醇水溶液和 80%甲醇水溶液的提取效率。提取加标量为 200 ng 的扇贝作为试验对象,每种提取试剂做 3 次平行试验,结果见表 3。由表 3 可知,80%甲醇水溶液提取效率明显优于 20%甲醇水溶液和 50%甲醇水溶液。因此,选择 80%甲醇水溶液作为提取试剂。

表 3 提取试剂对回收率的影响

Table 3 The effect of different extraction reagents on recovery

提取试剂	理论值/ ng	定量结果/ng			平均回收率/%
		1	2	3	
20%甲醇水溶液	200	101.87	106.15	96.22	50.71
50%甲醇水溶液	200	125.94	123.50	113.18	60.44
80%甲醇水溶液	200	190.24	185.95	189.05	94.21

2.2.5 方法检出限、回收率及精密度结果 PbTx-2 在液相色谱串联质谱仪上最佳响应浓度范围为 5,10,20,50,100,200,500 ng/mL,曲线方程 $y = 10\ 236.300\ 37x - 127\ 631$,相关系数 0.997 92。在曲线最低点浓度处(5 ng/mL)仪器的信噪比 $S/N = 3$,根据取样量 2 g、稀释倍数为 4,最终定容体积 4 mL,计算得方法检出限为 40 μg/kg。图 2 为 20 ng/mL 的 PbTx-2 标准溶液在液相色谱串联质谱仪最佳状态下得到的总离子流图。由图 2 可得,PbTX-2 的总离子流图峰形与响应良好且噪声干扰小,能够满足检测所需。

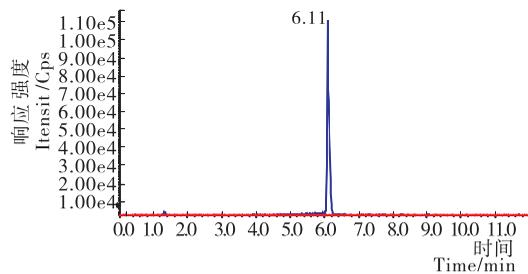


图 2 标准溶液的总离子流图 20 ng/mL PbTX-2
Figure 2 The TIC of the standard solution 20 ng/mL PbTX-2

选择阴性的扇贝和蛤蜊样品为空白基质,分别在 3 个浓度(检出限、5 倍检出限、参考限量限)添加,每个浓度做 6 个平行样品,按上述优化方法进行试验,计算得各添加水平对应的回收率和精密度,结果见表 4。由表 4 可以看

出, PbTx-2 的平均回收率为 82.95%~112.95%, 相对标准偏差为 1.27%~2.94%。方法的回收率与精密度可满足 PBTx-2 的实验室检测要求。

表 4 回收率和精密度结果

Table 4 The results of the recovery and precision (n=6)

样品	加标量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均 回收率/%	RSD/ %
扇贝	40	48.05	112.95	1.27
	200	166.50	83.25	2.20
	800	680.16	85.02	2.16
蛤蜊	40	46.04	115.09	1.46
	200	175.06	87.53	2.94
	800	663.60	82.95	2.58

2.2.6 方法的实际应用 应用试验法对各水产品市场采购蛤蜊、扇贝、贻贝、牡蛎 4 个品种 40 份样品进行检测, 所检测样品中贝类毒素的含量均小于方法检出限。有研究^[1]表明, 神经性贝类毒素常见发生区域为美国沿岸、墨西哥湾沿岸和新西兰沿岸。赤潮虽在中国沿海有分布, 但尚未有检测出该毒素样品的报道。

3 结论

试验建立了 NSP 免疫亲和柱的制备和 NSP 毒素的液相色谱串联质谱检测法, 通过研究 NSP 检测方法中免疫亲和柱的制备、样品的提取和净化、色谱质谱条件, 达到了检测方法的检出限低、稳定性好、抗干扰能力强、定性定量结果准确的效果; 弥补了现行国标 (GB 5009.261—2016) 方法的检测周期长、操作过程相对复杂和无法定量等方面的不足。采用试验方法检测了 4 种中国常见水产品, 与相关文献^[1]检测结果基本相同。

参考文献

[1] 李大志. 以现代分析技术为基础的贝类毒素地理分布、季节变化及致毒机理研究[D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2005: 2-10.

[2] 曹际娟, 赵昕, 郭皓, 等. 神经性贝类毒素[J]. 检验检疫科学, 1999, 6(9): 56-58.

[3] 江涛, 江天久. 贝类体内麻痹性贝类毒素的提取方法研究[J]. 分析化学, 2008, 36(11): 1460-1464.

[4] 李兆新, 张婷婷, 郭萌萌, 等. 贝类毒素固相吸附示踪检测技术研究进展[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(10): 162-165.

[5] 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): 185-186.

[6] 黄宗锈, 林健, 陈冠敏, 等. 麻痹性贝类毒素小鼠生物法检测中位数法与均数法差异性比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 18(2): 369-370.

[7] 黎小正, 黄玉柳, 吴详庆, 等. 腹泻性贝类毒素生物法检测

中的误差原因分析[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(4): 107-109.

[8] 刘淑娟, 赵晓祥, 程金平, 等. 快速检测软骨藻酸的间接 ELISA 方法[J]. 环境科学学报, 2014, 34(2): 404-408.

[9] 陈剑刚, 朱炳辉, 梁素丹, 等. 固相萃取—高效液相色谱—串联质谱法测定贝类产品中麻痹性贝类毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 4-8.

[10] 郭萌萌, 彭吉星, 吴海燕, 等. 麻痹性贝类毒素 GTX1&4 和 GTX2&3 标准样品的制备技术[J]. 中国渔业质量与标准, 2019, 9(2): 62-69.

[11] 严忠雍, 张小军, 李奇富, 等. 免疫亲和净化—液相色谱—串联质谱法测定贝类中腹泻性贝类毒素[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 304-309.

[12] 岳亚军, 朱波, 伦丽丽, 等. 石房蛤毒素免疫亲和柱制备及柱效测试研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4566-4571.

[13] 母清林, 方杰, 万汉兴, 等. 液相色谱—串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素[J]. 分析化学研究简报, 2011, 39(1): 111-114.

[14] 姚佳, 王昕, 张建新, 等. 免疫亲和柱—高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素和玉米赤霉醇及其类似物[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 124-127.

[15] 岳亚军, 张律, 游杰, 等. 免疫亲和柱净化—高效液相色谱—串联质谱法测定鱼肉和肝脏中河鲀毒素[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 214-218.

[16] 于广磊, 刘磊, 于姬, 等. 免疫亲和和色谱分离纯化 PSP 贝毒 GTX2, 3 的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(10): 2424-2426.

[17] 王里奇, 于师宇, 任洪林, 等. 抗神经性贝类毒素 PbTx-2 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 食品科技, 2011, 36(4): 299-303.

[18] 王莹, 路晟, 柳家鹏, 等. 黄曲霉 M1 免疫亲和柱的制备及使用条件优化[J]. 中国奶牛, 2011(1): 44-46.

(上接第 47 页)

[18] SEGURA J, ESCUDERO R, ROMERO de Ávila M D, et al. Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat[J]. Meat Science, 2015, 103: 90-95.

[19] 郝红涛, 赵改名, 柳艳霞, 等. 肉类制品的质构特性及其研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 125-128.

[20] 刘成国, 龙昊, 娄爱华, 等. 热风干燥条件对中式腊肠微生物及质构特性的影响[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 42-46.

[21] PAWLAK B, LINDSAY R, VANDERVORST W, et al. Chemical and electrical dopant evolution during solid phase epitaxial regrowth [J]. Meat Science, 2003, 83(1): 148-154.