

膝沟藻毒素液质联用快速检测及其在海洋生物体内的累积*

陈桃英¹ 柳俊秀¹ 李水军² 刘利平¹ 何培民¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 上海市徐汇区中心医院中心实验室 上海 200031)

提要 采用高效液相色谱-质谱联用技术分析了微小亚历山大藻中的膝沟藻毒素(Gonyautoxin, GTX_{1,4}和 GTX_{2,3})以及蒙古裸腹溞和菲律宾蛤仔摄食该藻后对膝沟藻毒素的累积状况。结果表明,采用高效液相色谱-质谱联用方法,可快速(4h 内)检测出这三种海洋生物中的膝沟藻毒素,且培养的微小亚历山大藻每个细胞的膝沟藻毒素含量为 9.46fmol。蒙古裸腹溞摄食微小亚历山大藻 2h、18h、24h 后,其体内 GTX_{1,4}的含量分别为 4.8908、12.6241、31.4968mg/g, GTX_{2,3}的含量分别为 1.656、3.8533、10.9026 mg/g,且对 GTX_{1,4}积累量比 GTX_{2,3}高,在 24h 内 GTX_{1,4}含量是 GTX_{2,3}的 2.89 倍。菲律宾蛤仔摄食微小亚历山大藻 2h、24h 和 48h 后,肌肉中 GTX_{1,4}含量分别为 3.1271、3.6709 和 4.6906 μg/g, GTX_{2,3}含量分别为 7.1874、8.1675 和 9.1476 μg/g; 内脏团中 GTX_{1,4}含量分别为 4.7088、4.2178 和 5.5064 μg/g, GTX_{2,3}含量分别为 7.6774、9.1476 和 13.066 μg/g,表明 GTX_{1,4}和 GTX_{2,3}在肌肉中含量逐步增加,且 GTX_{2,3}积累量比 GTX_{1,4}高,在 48h 内肌肉 GTX_{2,3}含量是 GTX_{1,4}的 1.95 倍,内脏团 GTX_{2,3}含量是 GTX_{1,4}的 2.37 倍。在停食净水培养 96h 后,内脏团和肌肉对 GTX_{1,4}消解率已达 100%,而肌肉和内脏团对 GTX_{2,3}消解率分别为 16.1%和 45%。本文结果表明采用高效液相色谱-质谱联用方法能快速测定赤潮藻、浮游动物和贝类中的膝沟藻毒素含量,但不同生物对膝沟藻毒素有不同的累积方式。

关键词 高效液相色谱-质谱联用,微小亚历山大藻,蒙古裸腹溞,菲律宾蛤仔,膝沟藻毒素,累积
中图分类号 X55

麻痹性贝类毒素(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)是目前已知的赤潮生物毒素中,发生次数最频繁,对人类影响最严重的一种(Hallegraeff, 1995; Landsberg, 2002),该毒素主要通过污染水产品对人类产生影响,目前最受关注的是双壳类。各国均已投入了大量的人力物力进行这方面的研究,并制定出了贝类卫生质量标准 and 相应的法律法规,例如美国的 National Shellfish Sanitation Program (NSSP)计划、欧盟的 91/492/EEC 指令等,然而我国在此领域还相对落后。据报道,我国从南至北均有 PSP 毒素污染的

贝类分布(Zhou *et al*, 1999)。而我国海洋生物毒素的检测分析方面比较落后,尚未建立起有效的生物毒素测试方法,因此,为保障水产品食用安全,加强对海洋生物毒素的检测分析工作是非常必要的。

目前,小鼠生物测试法和高效液相色谱是 PSP 毒素最常用的分析手段。其中小鼠生物测试法存在如重现性差、易产生假阳性结果、耗时长等缺点,而且还受到动物保护人士的谴责。色谱能有效分离混合物,但难以得到物质的结构信息。质谱能够提供物质的结构信息,且用样量非常少,但其分析的样品需要进行

* 上海市优秀学科带头人计划项目,08XD14037 号;上海市青年科技启明星计划项目,08QA1405900 号;上海市登山计划项目,06dz12015 号;上海市教委重点科研项目,科 04-131 号;上海市重点学科建设项目,Y1101 号;上海市教委重点学科项目,J50701 号;上海市优秀青年教师选拔基金项目,科 07-10 号;上海海洋大学博士启动基金项目,科 06-310 号。陈桃英,博士,讲师,E-mail:tychen@shou.edu.cn

通讯作者:何培民,E-mail:pmhe@shou.edu.cn

收稿日期:2007-11-17,收修改稿日期:2008-01-23

纯化。因此,将色谱和质谱联接起来使用可以弥补这两种仪器各自的缺点,液相色谱和质谱两种技术联用在海洋生物毒素的检测分析已表现出强大的优势(Tsai *et al.*, 2005; Tsuruda *et al.*, 2002; Oikawa *et al.*, 2002)。本实验中主要采用高效液相色谱-质谱联用技术初步分析了微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)细胞中的膝沟藻毒素含量,以及蒙古裸腹蚤(*Moina mongolica* Daday)和菲律宾蛤仔[*Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve)]摄食微小亚历山大藻后对膝沟藻毒素的累积状况,以建立藻毒素液相色谱-质谱技术联用快速检测技术,为我国水产品贝类中海洋生物毒素的检测分析工作提供理论依据和技术指导。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

微小亚历山大藻为中国科学院海洋研究所生态毒理实验室赠送。蒙古裸腹蚤和海水小球藻(*Chlorella* spp.)由上海海洋大学海洋生物实验室提供。菲律宾蛤仔从上海市图门路集市购买,其壳长(3.12 ± 0.22)cm,体重(5.92 ± 0.88)g。微小亚历山大藻和海水小球藻均采用 *f/2* 培养液培养,温度为(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照强度为3000—4000 lx。蒙古裸腹蚤用海水小球藻喂养。

1.2 微小亚历山大藻细胞毒素提取

藻毒素提取方法见文献(张清春等, 2005)。取50ml和100ml指数生长期的微小亚历山大藻,于显微镜下计数密度,并用超微滤膜低真空抽滤收集藻细胞,剪碎滤膜于7ml离心管中,加入4ml 0.05mol/L乙酸溶液,用超声波处理破碎细胞,6000r/min离心10min,收集上清液,用0.22 μm 超微滤膜过滤,收集滤液,即为PSP毒素提取液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 蒙古裸腹蚤组织中毒素提取

用20 μm 筛绢过滤收集蒙古裸腹蚤,置于密度大约为5000cells/ml微小亚历山大藻培养液中。摄食2h、18h和24h后,用20 μm 筛绢收集蒙古裸腹蚤,用滤纸吸干水分,置于7ml离心管中,加2ml 0.05mol/L乙酸溶液,用超声波处理破碎组织,12000r/min离心10min,收集上清液,取1ml上清液,加100 μl 三氯乙酸的饱和溶液,于12000r/min离心12min,收集上清液,即为PSP毒素提取液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 菲律宾蛤仔染毒及组织中毒素提取

用海水洗净菲律宾蛤仔表面的泥沙,置于密度大约为5000cells/ml微小亚历山大藻培养液中,分别在摄食2h、24h、48h及停食后96h各取样40个菲

律宾蛤仔,所有样品均保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。将菲律宾蛤仔解冻,洗干净和称重后,取出全部组织,并将肌肉和内脏团分开,分别称取2g置于10ml的离心管中,加入3ml 0.05 mol/L乙酸,剪碎并研磨至匀浆,沸水浴10 min,然后冷却并6000 r/min离心12 min,取上清液,分别加三氯乙酸饱和溶液300 μl 于上清液中以去除蛋白质,然后12000 r/min离心12 min,取上清液即PSP毒素提取液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,直至上机分析。

称取3份2g无毒的肌肉匀浆液,其中一份加入GTX_{1,4}和GTX_{2,3}的标准品各10 μl ,一份加入GTX_{1,4}和GTX_{2,3}的标准品各40 μl ,一份作为空白对照。

1.5 膝沟藻毒素标准品处理与质谱参数优化及藻毒素检测

1.5.1 膝沟藻毒素标准品处理与质谱参数 将膝沟藻毒素标准品用水稀释成GTX_{1,4}浓度为0.00564、0.0282、0.282、2.82 $\mu\text{mol/L}$ 和GTX_{2,3}浓度为0.00628、0.0314、0.314、3.14 $\mu\text{mol/L}$ 的标准液,在负离子模式下进行Q1(母离子)和Product Ion(碎片离子)质谱扫描。然后在MRM(多反应监测)扫描模式下优化GTX_{1,4}和GTX_{2,3}的质谱参数,建立二者的定量方法。GTX_{1,4}的离子通道 *m/z* 为410.2/367.3和410.2/349.1amu, GTX_{2,3}为394.0/351.0和394.0/333.1amu。

1.5.2 样品膝沟藻毒素检测 藻毒素检测方法主要参考李爱峰等(2007)方法。采用API3000串联四极杆质谱仪(美国Applied Biosystems公司); Shimadzu液相色谱仪(LC 20AD输液泵, SCL 10A VP控制器, DGU 20A脱气机,日本岛津公司); CTC PAL自动进样器(瑞士CTC公司)。流动相:乙腈-水(各含0.1%甲酸)=2:98;分析柱:Capcell Pak C18 (2.1 \times 100 mm, 5 μm ,日本资生堂精细化工);流速:0.25 ml/min;进样量:10 μl 。

2 结果

2.1 标准品 GTX_{1,4} 与 GTX_{2,3} 液-质联用检测

采用负离子扫描以及碎片离子扫描标准品GTX_{1,4}和GTX_{2,3}的质谱结果表明,可以采用负离子扫描对膝沟藻毒素GTX_{1,4}与GTX_{2,3}进行定性定量检测。

2.2 微小亚历山大藻细胞毒素含量快速分析

通过显微镜计数,培养的微小亚历山大藻细胞浓度为9330cells/ml。通过采用高效液相色谱-质谱分析,50ml微小亚历山大藻中,GTX_{1,4}和GTX_{2,3}含量分别为1.08和0.48 $\mu\text{mol/L}$;100ml微小亚历山大藻中

GTX_{1,4} 和 GTX_{2,3} 含量分别为 2.03 和 0.92 μmol/L。表明培养的微小亚历山大藻细胞毒素含量为 9.46fmol/cell。从微小亚历山大藻收集到高效液相色谱-质谱检测出膝沟藻毒素全过程所需时间为 150min, 其中真空抽滤收集藻细胞大约需 30min, 用超声波细胞破碎仪破碎藻细胞提取 GTX 粗毒素大约需要 60min, 高效液相色谱-质谱联用检测 GTX 需要 60min。

2.3 蒙古裸腹溞摄食微小亚历山大藻后 GTX 的累积

蒙古裸腹溞能摄食微小亚历山大藻(陈桃英, 2006¹⁾)。由图 1 可知, 在 24h 内, 随着摄食时间的延长, 蒙古裸腹溞对微小亚历山大藻细胞中的膝沟藻毒素 GTX_{1,4} 和 GTX_{2,3} 的累积量逐步增加, 且 GTX_{1,4} 在蒙古裸腹溞体内的积累量比 GTX_{2,3} 更高, 摄食 24h 后, GTX_{1,4} 和 GTX_{2,3} 累积量分别为 31.4968mg/g 和

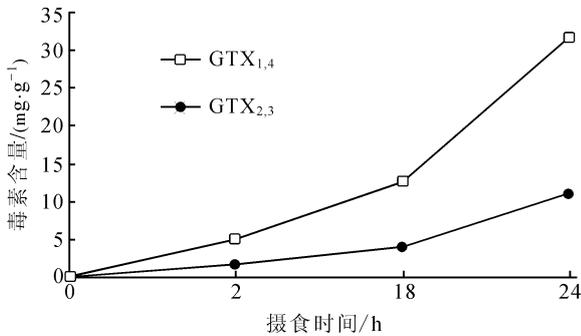


图 1 蒙古裸腹溞对微小亚历山大藻 GTX 毒素的累积
Fig.1 The gonyautoxin content of *M. mongolica* exposed to *A. minutum* for 2h, 18h and 24h

10.9026mg/g, GTX_{1,4} 的累积量是 GTX_{2,3} 的 2.89 倍。从蒙古裸腹溞收集到高效液相色谱-质谱检测出膝沟藻毒素全过程所需时间为 150min, 其中收集染毒的蒙古裸腹溞大约需 30min, 用超声波细胞破碎仪破碎藻细胞提取 GTX 粗毒素大约需 60min, 高效液相色谱-质谱联用检测毒素需 60min。

2.4 菲律宾蛤仔摄食微小亚历山大藻后 GTX 的累积

菲律宾蛤仔能摄食微小亚历山大藻, 从其粪便团中可见大量聚集成团、没被很好消化的微小亚历山大藻细胞(图 2)。菲律宾蛤仔肌肉累积微小亚历山大藻的膝沟藻毒素结果见图 3。由图 3 可知, 菲律宾蛤仔对微小亚历山大藻毒素有很强的累积能力。摄食 2h 后, 肌肉中已经开始累积 GTX 毒素, 在 48h 内, 随着摄食时间延长, GTX_{1,4} 和 GTX_{2,3} 毒素在肌肉中含量逐步增加, 并且 GTX_{2,3} 在菲律宾蛤仔组织中累积量高于 GTX_{1,4}, 且内脏团毒素积累量比肌肉更高, 其中在 48 h 后, 肌肉中 GTX_{1,4} 和 GTX_{2,3} 毒素含量分别为 4.6906 μg/g 和 9.1476 μg/g, GTX_{2,3} 毒素含量是 GTX_{1,4} 的 1.95 倍; 而内脏团中 GTX_{1,4} 和 GTX_{2,3} 毒素含量分别为 5.5064 μg/g 和 13.068 μg/g, GTX_{2,3} 毒素含量是 GTX_{1,4} 的 2.37 倍。在停食净水培养 96h 后, 在内脏团和肌肉中均不能检测到 GTX_{1,4}, 而 GTX_{2,3} 仅稍微降低, 表明菲律宾蛤仔停食 96h 后肌肉和内脏团对 GTX_{1,4} 的消解率达到 100%, 而肌肉和内脏团对 GTX_{2,3} 的消解率分别为 21.4%和 40%。

从收集染毒菲律宾蛤仔到高效液相色谱-质谱检

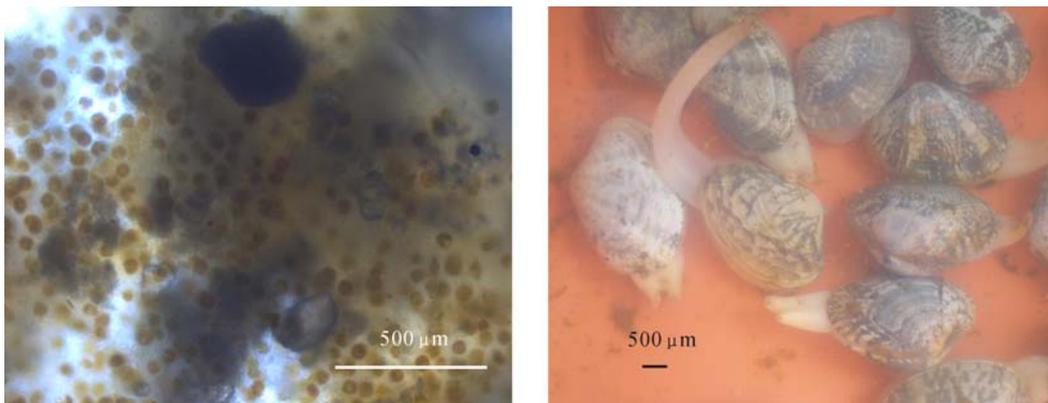


图 2 菲律宾蛤仔对微小亚历山大藻的摄食

Fig.2 Feeding of *R. philippinarum* on *A. minutum*

注: 比例尺 = 500 μm。右图表示菲律宾蛤仔摄食微小亚历山大藻, 左图表示粪便团中未被消化的微小亚历山大藻

1) 陈桃英, 2006. 亚历山大藻对海产贝类胚胎和蒙古裸腹溞的影响及致毒机制研究. 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 67

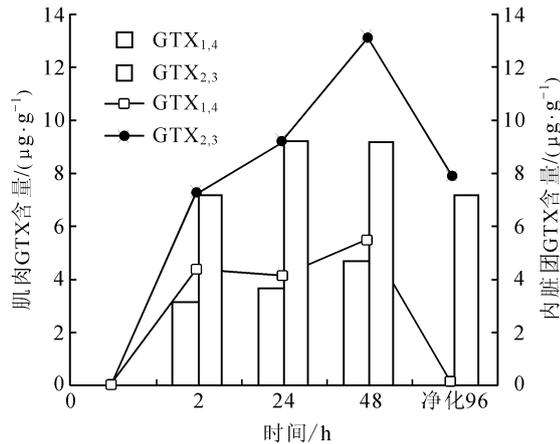


图3 菲律宾蛤仔对微小亚历山大藻毒素含量的累积

Fig.3 The gonyautoxin content of *R. philippinarum* exposed to *A. minutum* for 2h, 24h, 48h and starve for 96h

测出膝沟藻毒素, 全过程所需时间大约为 240min, 其中, 分离菲律宾蛤仔肌肉和内脏团组织需要 60min(50 只贝/人), 组织均浆需 30min, 粗毒素提取需 90min, 高效液相色谱-质谱联用检测毒素需 60min。

3 讨论

3.1 液相色谱-质谱联用技术对海洋生物毒素的检测

目前已有文献报道了应用液-质联用技术分析 PSP 毒素, 如 Jaime 等(2001)通过使用离子交换色谱与电喷雾离子化质谱联用定量分析 PSP 毒素, Dell'Aversano 等(2005)采用此方法一次性同步分析 PSP 毒素中的所有衍生物。采用液-质联用技术除对 PSP 毒素进行分析外, 对河豚毒素(TTX)、腹泻性贝毒(DSP)、记忆缺失性贝毒(ASP)、神经性贝毒(NSP)、西家鱼毒(CFP)以及 AZP、YTX 毒素、PTX 毒素等毒素都进行了比较系统的分析, 在新型海洋生物毒素的发现、结构鉴定等方面, 液-质联用技术也发挥着非常重要的作用(Oikawa *et al.*, 2002; Tsuruda *et al.*, 2002; Vale *et al.*, 2008a, b; Fonfría *et al.*, 2008)。由于 PSP 毒素极性高, 成分复杂, 异构体化合物较多, 对色谱分离条件要求苛刻, 这方面的应用分析发展比较缓慢。在本文中, 作者对此进行了初步尝试, 发现采用高效液相色谱-质谱联用能对微小亚历山大藻、蒙古裸腹溞和菲律宾蛤仔组织中的膝沟藻毒素都能进行分析, 这可以减少标准品的使用, 对保障水产品的食用安全、水产养殖业的健康发展都非常有意义。

3.2 微小亚历山大藻的膝沟藻毒素含量以及在生物体内的积累与消解

张清春等(2005)在试验中通过高效液相色谱检测, 测得微小亚历山大藻每个细胞毒素含量在 3.57—18.64fmol 之间, 本文中所测得的含量为 9.46fmol/cell, 这一毒素含量在上述范围之内, 表明试验结果是可靠的。本文中发现, 在微小亚历山大藻中, GTX_{1,4} 的含量约为 GTX_{2,3} 含量的 2.3 倍, 而在蒙古裸腹溞组织中, GTX_{1,4} 的含量约为 GTX_{2,3} 含量的 3 倍, 表明蒙古裸腹溞对 GTX_{1,4} 有较强的累积能力。贝类能储存毒素达好几个月, 但毒素组成在其排毒阶段会发生显著的变化, 其中一个最显著的变化就是 GTX_{1,4} 的减少(傅萌等, 2000)。菲律宾蛤仔摄食微小亚历山大藻后, 从图 3 可以看出, 在肌肉和内脏团中, GTX_{2,3} 的含量比 GTX_{1,4} 要高很多, 表明菲律宾蛤仔对 GTX_{2,3} 有较强的累积能力。江天久等(2006)发现中国龙虾 (*Panulirus stimpsoni*)对 GTX_{2,3} 也有较强的累积能力, 他们认为发生了 GTX_{2,3} 向 GTX_{1,4} 转换的过程, 因为这种还原转化在双壳类和甲壳类的动态代谢中常有发生(Oikawa *et al.*, 2005)。据报道, PSP 沿着食物链向高营养级传递时, 更易发生这类还原反应(Oikawa *et al.*, 2002, 2005)。关于这一现象, 研究者们认为这可能是发生了 GTX_{1,4} 还原成 GTX_{2,3} 的过程, 这可能与生物体内的天然还原剂如谷胱甘肽和半胱氨酸诱导的化学转化或细菌诱导的生物转化有关(江天久等, 2006; 傅萌等, 2000; Oikawa *et al.*, 2002)。至于蒙古裸腹溞在累积藻类毒素的过程中, 并没有出现与贝类和甲壳类相似的情况, 这可能是不同生物对有害赤潮不同的响应所导致的, 但究竟是何种机理, 有待进一步的研究。

目前有关加速贝类体内 PSP 毒素排出的方法有: 将贝类转移至清洁水中使其自净, 温度刺激法, 臭氧法、烹饪法、罐头加工以及盐度刺激法、电刺激法等(Lawrence *et al.*, 1994; 傅萌等, 2000)。本文中作者将摄食微小亚历山大藻 48h 的菲律宾蛤仔停食净水净化 96h 后, 肌肉和内脏团中 GTX_{1,4} 都降为 0, GTX_{2,3} 也有一定程度的下降, 这表明将菲律宾蛤仔转移至清洁水体中可较快的降解掉 GTX_{1,4}。但这种方法需要将贝类大量转移, 这是一件劳动强度大、耗资也大的工作, 因此采用这种方法净化藻毒素需要酌情考虑。

3.3 色谱法对膝沟藻毒素(GTX)的检测时间

在水产品的藻毒素检测中, 检测时间是例行监

测中的重要指标。本文中应用高效液相色谱-质谱联用检测技术,从赤潮藻体和枝角类中检测出膝沟藻毒素全过程需要 1.5h,从贝类中检测出藻毒素全过程需要 4h。本文中从生物体中提取膝沟藻毒素的方法主要参考张清春等(2005)所在实验室采用高效液相色谱分析 PSP 方法,因此采用高效液相色谱法分析膝沟藻毒素和采用高效液相色谱-质谱联用分析膝沟藻毒素所需要的时间相近,但高效液相色谱法一直需要膝沟藻毒素的标准品,目前标准品的获取相当困难,且价钱不菲,而高效液相色谱-质谱联用对标准品使用量很少,因此,本方法更具有实际应用价值。

参 考 文 献

- 傅 萌, 颜 天, 周名江, 2000. 麻痹性贝毒对海洋贝类的影响及加速贝毒净化的研究进展. 水产学报, 24(4): 382—387
- 江天久, 徐轶肖, 2006. 华贵栉孔扇贝 中国龙虾的麻痹性贝类毒素传递与代谢研究. 海洋学报, 28(6): 169—175
- 李爱峰, 于仁成, 周名江, 2007. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用分析河豚毒素. 分析化学, 35(3): 397—400
- 张清春, 于仁诚, 周名江等, 2005. 不同氮源对微小亚历山大藻生长和毒素产生的影响. 海洋学报, 27(6): 138—145
- Dell'Aversano C, Hess P, Quilliam M A, 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. Journal of Chromatography A, 1081(2): 190—201
- Fonfría E S, Vilariño N, Vieytes M R *et al*, 2008. Feasibility of using a surface plasmon resonance-based biosensor to detect and quantify yessotoxin. Analytica Chimica Acta, 617(1—2): 167—170
- Hallegraef G M, 1995. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraef G M, Anderson D M, Cembella A D ed. Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides. UNESCO, Paris, 33: 1—22
- Jaime E, Hummert C, Hess P, Luckas B, 2001. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. Journal of Chromatography A, 929(1—2): 43—49
- Landsberg J H, 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. Reviews in Fisheries Science, 10(2): 113—390
- Lawrence J F, Maber M, Wright W W, 1994. Effect of cooking on the concentration of toxins associated with paralytic shellfish poisoning in Lobster *Hepatopancreas*. Toxicon, 32(1): 57—64
- Oikawa H, Fujita T, Satomi M *et al*, 2002. Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the edible shore crab *Telmessus acutidens*. Toxicon, 40(11): 1593—1599
- Oikawa H, Satomi M, Watabe S *et al*, 2005. Accumulation and depuration rates of paralytic shellfish poisoning toxins in the shore crab *Telmessus acutidens* by feeding toxic mussels under laboratory controlled conditions. Toxicon, 45(2): 163—169
- Tsuruda K, Arakawa O, Kawatsu K *et al*, 2002. Secretory glands of tetrodotoxin in the skin of the Japanese newt *Cynops pyrrhogaster*. Toxicon, 40(2): 131—136
- Vale P, Bire R, Hess P, 2008a. Confirmation by LC-MS/MS of azaspiracids in shellfish from the Portuguese north-western coast. Toxicon, 51(8): 1449—1456
- Vale P, Botelho M J, Rodrigues S M *et al*, 2008b. Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986—2006): A review of exposure assessment. Harmful Algae, 7(1): 11—25
- Zhou M J, Li J, Luckas B *et al*, 1999. A recent shellfish toxin investigation in China. Marine Pollution Bulletin, 39(2): 331—334

GONYAUTOXIN: HPLC-MS DETECTION AND ACCUMULATION IN MARINE ORGANISMS

CHEN Tao-Ying¹, LIU Jun-Xiu¹, LI Shui-Jun², LIU Li-Ping¹, HE Pei-Min¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306;

2. Central Laboratory, Shanghai Xuhui Central Hospital, Shanghai, 200031)

Abstract The gonyautoxins (GTX, including GTX_{1,4} and GTX_{2,3}) in *Alexandrium minutum*, *Moina mongolica* Daday, and *Ruditapes philippinarum*, which fed with *A. minutum*, were analyzed by HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry). The results showed that the GTX content in these species could be detected with HPLC-MS. The GTX content per cell in *A. minutum* was 9.46fmol. In *M. mongolica* fed with *A. minutum* for 2h, 18h and 24h, GTX_{1,4} content was 4.8908, 12.6241, 31.4968mg/g, and GTX_{2,3} content at 1.656, 3.8533, 10.9026 mg/g, respectively, which indicates that GTX content in *M. mongolica* increased with the exposure time to *A. minutum*, and GTX_{2,3} was 2.89 times of GTX_{1,4} content. In *R. philippinarum* fed with *A. minutum* for 2h, 24h, and 48h, the GTX_{1,4} content in muscles was 3.1271, 3.6709, and 4.6906 $\mu\text{g/g}$, GTX_{2,3} content at 7.1874, 8.1675 and 9.1476 $\mu\text{g/g}$, and GTX_{1,4} content in viscera was 4.7088, 4.2178 and 5.5064 $\mu\text{g/g}$, respectively, indicating that the GTX content in *R. philippinarum* increased with the exposure time to *A. minutum*, and GTX_{2,3} was accumulated more than GTX_{1,4}; and GTX content in viscera was greater than that in mussel: the GTX_{2,3} content in muscles in 48h was 1.95 times of that GTX_{1,4}, and the GTX_{2,3} content in viscera was 2.37 times of that GTX_{1,4}. After animals were starved for 96h, the GTX_{1,4} content in muscles and viscera reduced to 0, and GTX_{2,3} content reduced by 16.1% and 45%, respectively. The results indicate that HPLC-MS can be used to detect rapidly the GTX in alga, zooplankton, and shellfish. The accumulation of GTX was different in higher trophic-level organisms.

Key words HPLC-MS, *Alexandrium minutum*, *Moina mongolica*, *Ruditapes philippinarum*, Gonyautoxin, Accumulation