

河鲀鱼基质中河豚毒素标准样品的研制

王伟^{1#}, 尹新颖^{2#}, 西日尼阿衣·阿里甫², 徐敦明³, 肖晶^{1*}, 曹际娟^{2*}

(1. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100023; 2. 大连民族大学生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600; 3. 厦门海关技术中心, 厦门 361013)

摘要: 目的 研制基于河鲀鱼基质的河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)定量分析标准样品。**方法** 以野生河鲀鱼肝脏、卵巢、精巢和肌肉组织为基料, 利用正己烷脱脂分离处理后, 经两次冷冻干燥制备河鲀鱼基质的 TTX 标准样品, 采用液相色谱-串联质谱法进行定性确证。样品分装成 500 瓶后, 进行均匀性、稳定性检验和定值分析。

结果 经确证该基体标准样品中含有 TTX; 从基体标准样品中随机抽取 15 瓶进行均匀性检验, 经 F 检验表明在 95% 的置信区间范围内样品均匀性良好; 长期稳定性考察在 0~4 °C 低温条件下历经了长时间保存, 短期稳定性在 -80~55 °C 范围内进行运输条件下的考察, 结果表明在考察期间内样品稳定性良好; 经国内 8 家实验室进行协同定值, 评定了定值结果的不确定度, 该基体标准样品中 TTX 特性值及不确定度为 (5.20 ± 0.03) mg/kg ($k=2$)。

结论 该基体标准样品达到国家标准样品的技术要求, 可用于对水产品中河豚毒素检测过程的方法验证与质量控制等活动。

关键词: 河鲀鱼基质; 河豚毒素; 基体标准样品; 制备

Preparation of matrix reference material for tetrodotoxin in *Tetraodontidae*

WANG Wei^{1#}, YIN Xin-Ying^{2#}, XIRINIAYI A-Li-Fu², XU Dun-Ming³, XIAO Jing^{1*}, CAO Ji-Juan^{2*}

(1. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100023, China; 2. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 3. Technology Center of Xiamen Customs District, Xiamen 361013, China)

ABSTRACT: Objective To develop a matrix reference material for quantitative analysis of tetrodotoxin (TTX) based on *Tetraodontidae* matrix. **Methods** Based on puffer fish matrix, the liver, ovary, testis and muscle tissue of wild puffer fish were used as base materials, degreased and separated with n-hexane, and then freeze-dried twice to prepare the matrix reference material of TTX in *Tetraodontidae*, which was qualitatively confirmed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. After the sample was sub packed into 500 bottles, the uniformity, stability test and fixed value analysis were carried out. **Results** The matrix reference materia had been confirmed to contain TTX; 15 bottles were randomly selected from the matrix reference material for uniformity test, and the F test

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFF0305002)、辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC2002106)

Fund: Support by the National Key Research and Development Program of China (2020YFF0305002), and the “Rejuvenating Liaoning Talents Plan” of Liaoning Province (XLYC2002106)

#王伟、尹新颖为共同第一作者

WANG Wei and YIN Xin-Ying are Co-first Authors

*通信作者: 肖晶, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。E-mail: xiaojing@cfsa.net.cn

曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

*Corresponding author: XIAO Jing, Ph.D, Professor, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100023, China. E-mail: xiaojing@cfsa.net.cn

CAO Ji-Juan, Ph.D, Professor, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China. E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

showed that the sample uniformity was good within the confidence interval of 95%; the long-term stability was investigated under the low temperature of 0-4 °C for a long time and the short-term stability was investigated under the transportation condition within the range of -80-55 °C, the results showed that the stability of the samples were good during the investigation; the collaborative setting by 8 laboratories in China were conducted to assess the uncertainty of the calibration result, the TTX characteristic value and uncertainty of the matrix reference material were (5.20±0.03) mg/kg ($k=2$). **Conclusion** The matrix reference material meets the technical requirements of the national reference material, and can be used for method verification and quality control of TTX detection process in aquatic products.

KEY WORDS: *Tetraodontidae* matrix; tetrodotoxin; matrix reference material; preparation

0 引 言

在很长一段时间内,人们认为河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是河鲀鱼特有的一种毒性物质,最早由日本学者 Yoshizumi Tahara 从河豚鱼的卵巢中发现^[1],因此用河鲀鱼的名字来命名。直到 1964 年,从加利福尼亚的一种蝶螺体内检测到 TTX,才改变了这种说法。在后来的研究中发现,TTX 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物体内,除常见的河鲀鱼之外,在扁形虫^[2]、纽形虫^[3]、软体动物^[4]、节肢动物^[5]、棘皮动物^[6]、尾索动物^[7]和两栖动物^[8]等某些生物中也有分布。在软体动物中,含有 TTX 的生物主要属于腹足纲,如织纹螺科、骨螺科、蛙螺科、玉螺科、法螺科和峨螺科中的部分生物,能够产生或者积累 TTX 造成食用者中毒。TTX 可通过食物链传递,在一些海洋动物体内可大量富集^[9],OKABE 等^[3]发现可食双壳类中 TTX 积累的主要来源是有毒的扁形虫幼虫。近几年,英国、荷兰和意大利沿岸海域的贻贝、牡蛎等贝类体内均检出 TTX,螺类体内的 TTX 浓度远高于双壳类^[10]。由腹足纲软体动物引起的中毒事件在中国台湾和日本均有报道^[11-12]。我国福建、浙江和江苏近海的螺类体内 TTX 污染较重,其污染在春夏季达到最高水平,辽宁和天津近海的河豚鱼体内 TTX 含量较高^[13]。TTX 是一种非蛋白质、高活性的神经毒素,进入人体后可使神经中枢和血管神经中枢出现麻痹,危及生命^[14]。

在食品安全检测体系中,标准样品对整个检测质量控制体系起到核心作用,用以确保检测方法及数据可靠性、可比性、可追溯性^[15]。食品标准样品研制已成为近年来的研究热点。目前 TTX 检测主要使用纯品 TTX 标准品进行添加回收实验^[16]。陈伟珠等^[17]以河豚鱼卵巢为原料,提取纯化 TTX 的一种重要衍生物 4,9-脱水 TTX 来制备纯品标准样品。在国际上,一种毒素残留量的分析方法的建立需要经 3 种类型的样品测试:受控组织或液体、用药物强化至或接近最大容许水平(maximum residue limit, MRL)的样品和本身具有毒素残留的组织基料样品,从而保证分析方法能具有一定的样品基质适用范围和重复性。欧盟对兽药等残留分析方法与结果表达的法规(2002/657/EC)中

明确指出了需要采用组织基料实物标准样品进行检测过程控制,可见,组织基料基体标准样品在残留检测中具有十分重要的意义。

鉴于此,在农兽药残留检测领域,多位研究人员曾研制基体标准物质/标准样品,涉及茶叶^[18]、鸡肉^[19]、黄瓜^[20]、羊奶^[21]、蜂蜜^[22]等基体;在重金属检测领域,也有报道开展粮食^[23]、干基蔬菜^[24]基体标准样品的制备研究;在生物毒素检测领域,也见研制贝类基体贝类毒素^[25]、饲料基体黄曲霉毒素^[26]、玉米粉基体伏马毒素^[27]等标准样品。现阶段,尚未见河豚鱼粉基体河豚毒素标准样品研制的报道。本研究以野生河鲀鱼肝脏、卵巢、精巢和肌肉组织为基料,介绍了河鲀鱼基质 TTX 标准样品研制过程,制备流程简单可靠、目标物与基体结合与真实检测样品一致,可用于食品分析方法确认和质量控制,可有效避免基体效应对物质成分检测的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

API4000 液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源(美国应用生物系统公司);CHRiST Epsilon2-6D 冷冻干燥机(德国 Marin Chris 公司);Purospher Star PR-18e C₁₈ 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、C₁₈ 固相萃取小柱(德国默克公司);Atlantis TM HILIC Silica 质谱色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm)(美国 Waters 公司)。

甲醇、乙腈、乙酸铵(色谱纯,美国 Burdick Jackson 公司);纯品 TTX 标准品(甲醇/水中 TTX 溶液,纯度≥99%,天津阿尔塔科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 基体标准样品的制备

野生河鲀鱼由大连天正实业有限公司提供,要求个体大小均一、均重约 1.5 kg,剔除受伤不健康的野生河鲀鱼。将野生河鲀鱼去头、去皮、去骨处理,取肝脏、卵巢、精巢和肌肉组织,经均质匀浆、预冷冻、预真空冷冻干燥、正己烷浸泡脱脂、再次均质匀浆、再次真空冷冻干燥,制

成冻干粗粉;再取冻干粗粉,采用中药粉碎机粉碎,组织研磨机细磨,过30目筛,取筛下部分再过80目筛,弃筛下部分,取样品颗粒大小在30~80目之间的冻干细粉,分装于带有铝箔垫片的白色聚乙烯塑料瓶中,每瓶装2g冻干细粉,电磁感应封盖,2~8℃冷藏保存。同一批制备的基质标准样品共500瓶。

1.2.2 定性分析

基质标准样品中TTX定性分析采用GB 5009.206—2016《食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定》中的第二法即液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)进行分析,即:样品中含有的TTX采用酸性甲醇提取,提取液浓缩后,过C₁₈固相萃取小柱净化,液相色谱-柱后衍生荧光法测定,LC-MS/MS确证。

1.2.3 均匀性检验

标准样品均匀性是指特性量值在空间分布的均匀程度,是标准样品的重要质量指标之一^[17]。按照GB/T 15000.3—2008《标准样品定值的一般原则和统计方法》规定进行取样和均匀性检验。本研究从分装成最小包装单元的候选标准样品中随机抽取15支标准样品进行均匀性检验,每支样品重复检验2次,测定方法采用GB 5009.206—2016中的第二法即LC-MS/MS。检测数据用单因素方差分析法(*F*检验)来统计检验标准样品的均匀性,通过组间方差和组内方差的比较来判断各组测量之间有无系统偏差。

1.2.4 稳定性检验

稳定性是衡量标准样品的另外一个重要参数。标准样品的长期稳定性与贮存条件有关,短期稳定性与样品运输过程中的外部因素有关。按照GB/T 15000.3—2008规定进行长期保存稳定性和短期运输稳定性考察。测定方法采用GB 5009.206—2016中的第二法即LC-MS/MS。本研究所选取的包装好的样品在0~4℃低温条件下历经了长时间保存,第一年每2个月、第二年每3个月,随机选取样品进行长期稳定性实验,每次抽取2支标准样品,每支样品重复测试2次,检测数据用单因素方差分析法(*F*检验)来统计检验标准样品的长期稳定性。采用同步设计方法在-80~55℃范围内(选择-80、-20、4、25、55℃)进行运输条件下短期稳定性实验,每个温度条件下测试3支标准样品,每支重复测试2次,检测数据采用双因素方差分析法(*F*检验)来统计检验标准样品的运输稳定性。

1.2.5 协同定值

采用多个实验室协作实验定值,参加实验室的数目为8个。随机抽取40支样品,每个定值实验室分发5支样品,每支样品平行测定2次。测定方法采用GB 5009.206—2016中的第二法即LC-MS/MS进行定量。8个实验室的定值数据采用夏皮罗-威尔克(Shapiro-Wilk)检验

法考察其正态性。在近似符合正态性的前提下,再经Grubb's法检验确认每个实验室结果是否存在异常值。对数据进行不确定度统计,计算河鲀鱼基质标准样品中TTX含量的标准值及不确定度,该标准样品的特性值采用标准值±扩展不确定度的方式表示。

2 结果与分析

2.1 基质标准样品中TTX的定性分析

欧盟关于食品化学分析方法性能和结果的解释(EC)No.657—2002,规定了使用质谱技术对物质进行确定的识别点系统,至少需要4个识别点,并规定了不同质谱技术能获得识别点的数量。本研究制备的基质标准样品通过采用GB 5009.206—2016中的第二法即LC-MS/MS进行定性分析。

TTX纯品标准品及本研究制备的基质标准样品的质谱多反应监测扫描图(multi reaction monitoring, MRM)见图1中的A和B。由图1可知,本研究制备的基质标准样品与TTX纯品标准品的出峰时间一致,均在3.38 min。LC-MS/MS技术中,1个母离子为1个识别点,1个离子能获得1.5个识别点,本研究检测中采用320.3/162.1和320.3/302.2两对离子对,可满足4个识别点要求。综上所述,可以确证该基质标准样品中含有TTX。

2.2 均匀性实验

均匀性检验是标准样品研制过程中不可缺少的程序,它是对标准样品总体空间分布的评价。因此,在对样品分装500瓶后,随机抽取15支基质标准样品进行TTX均匀性检验,均匀性检验结果见表1、2。由表2可知,经*F*检验,计算*F*比值为1.47,小于 $F_{(14,15)}=2.42$,说明在95%置信概率下,与其他因素对测试结果的影响相比,样品的不均匀性是可接受的,即基质标准样品中TTX是均匀的,样品均匀性标准不确定度为0.0136%。

2.3 稳定性实验

在适宜的环境条件下,标准样品特性值应不会随着贮存时间、运输时间的延长发生显著变化。按1.2.4进行基质标准样品的长期稳定性和短期稳定性考察实验,长期稳定性检验结果见表3、4,短期稳定性检验结果见表5、6。由表4和表6可知,经*F*检验,计算*F*比值均小于*F*临界值,说明在95%置信概率下,基质标准样品中TTX是稳定的,样品长期稳定性标准不确定度为0.0068%,短期稳定性标准不确定度为0.0023%。

2.4 定值结果及其不确定度评定

2.4.1 定值结果

采用多个实验室协作实验定值,参加实验室的数目为8个。对本研究经过均匀性和稳定性检验合格的样品,

按 1.2.5 的协同定值方法开展定值, 定值结果汇总见表 7。汇集各家实验室的检测数据后, 对每家实验室的数据按大小顺序排列, 采用 Shapiro-Wilk 检验法考察其正态性, 定值数据符合正态分布; 再经 Grubb's 法检验确认每个实验室均不存在异常值, 结果没有异常值。对数据进行统计, 经计算 8 家结果的总平均值为 5.195 ± 0.039 , 平均值标准偏差为 0.0038%。

2.4.2 定值结果的不确定度评定

标准样品定值结果的不确定度主要由标准样品定

值过程引入的不确定度、均匀性检验引入的不确定度和稳定性检验引入的不确定度组成^[20-21]。依据全部测定结果, 计算基体标准样品中 TTX 含量的合成标准不确定度及扩展不确定度。对数据进行不确定度统计分析的结果见表 8。将均匀性和稳定性所导致的不确定度与测定不确定度合成, 得到结果的合成标准不确定度, 取包含因子为 $k=2$, 得到结果的扩展不确定度, 河鲢鱼基质的标准样品中 TTX 含量的特性值和扩展不确定度为: $(5.20 \pm 0.03) \text{ mg/kg}$, $k=2$ 。

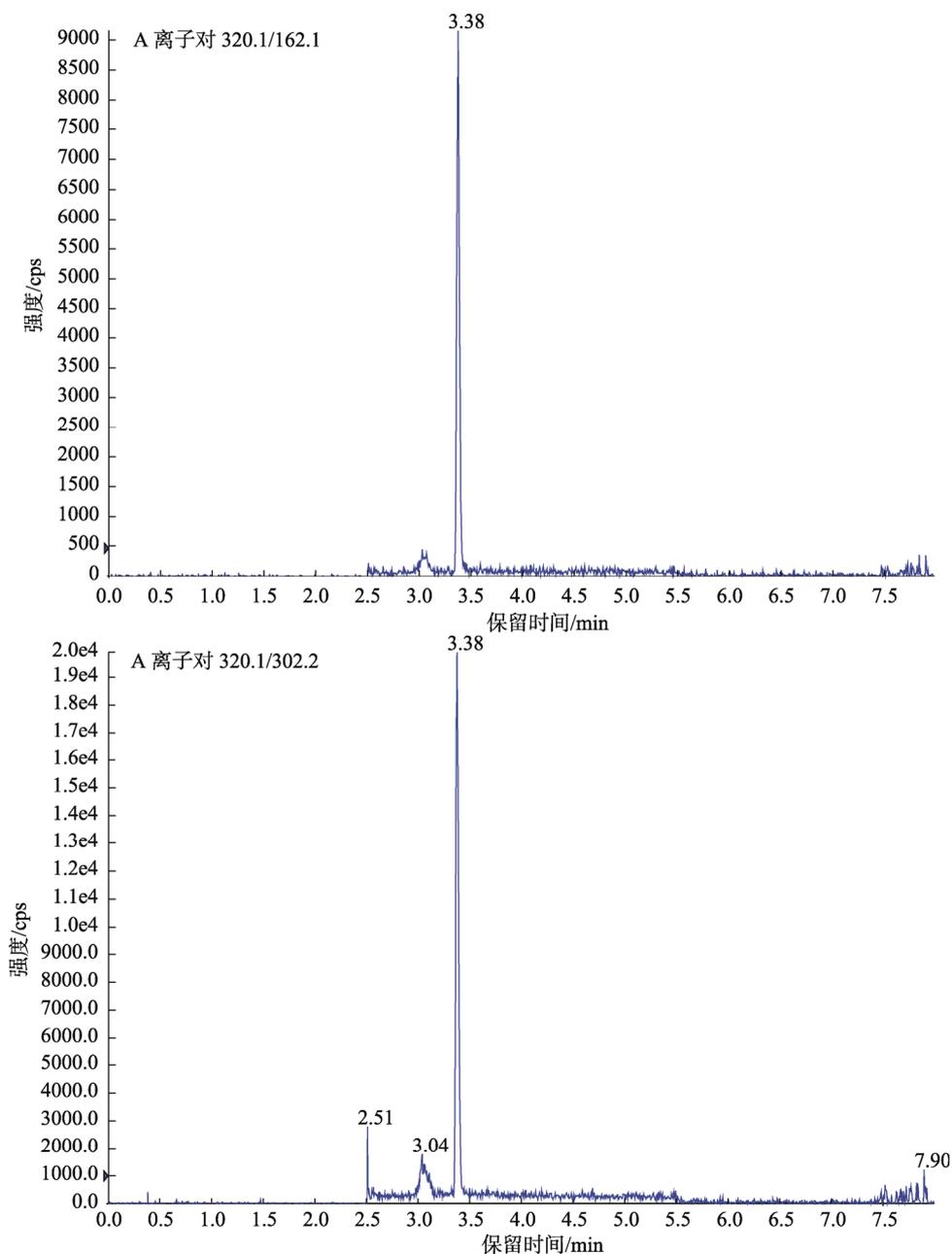


图 1 纯品标准品(A)和基体标准样品(B)中 TTX 的质谱多反应监测扫描图

Fig.1 Mass chromatographs MRM diagram of TTX in pure reference material (A) and matrix reference material (B)

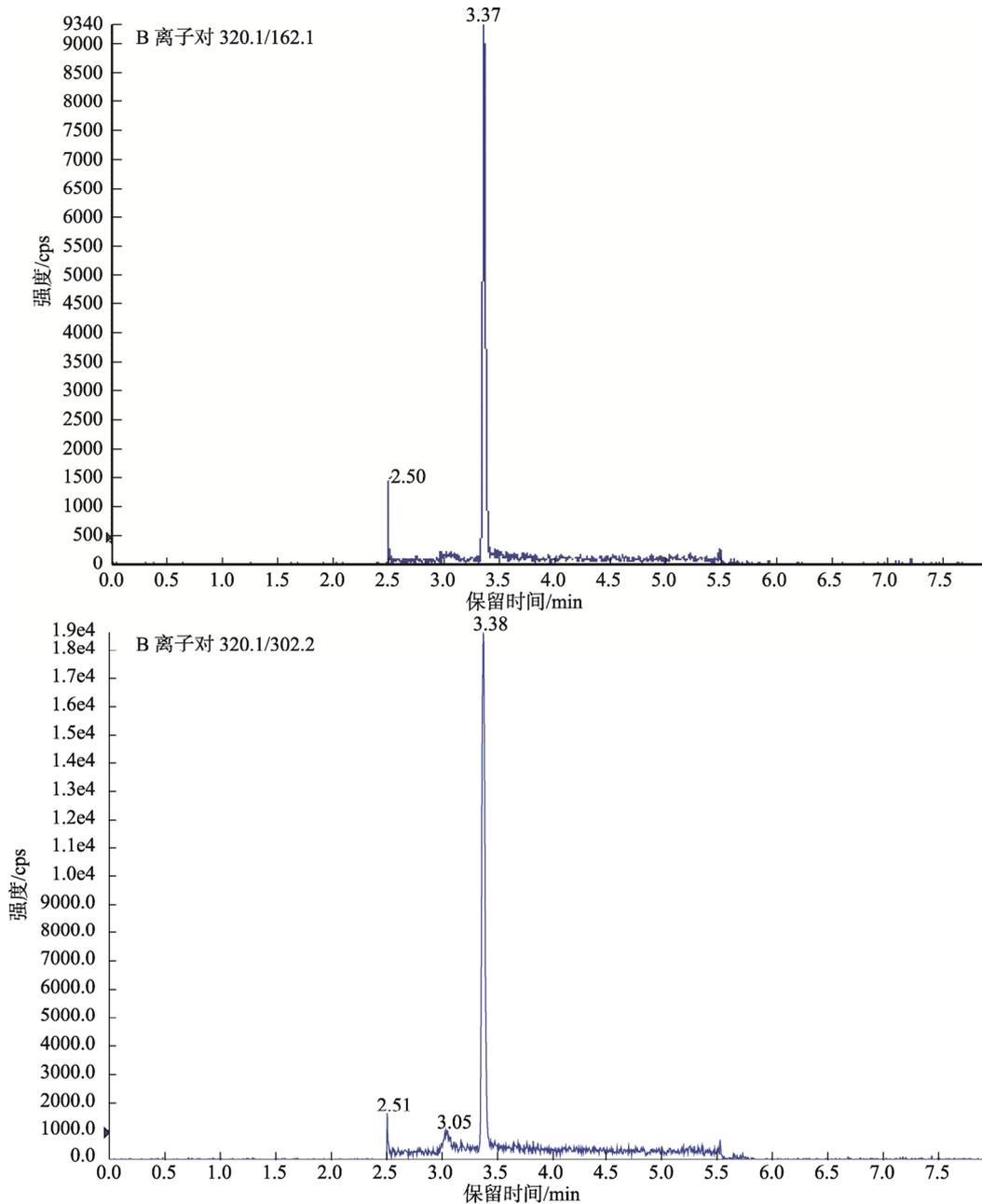


图 1(续) 纯品标准品(A)和基体标准样品(B)中 TTX 的质谱多反应监测扫描图

Fig.1 Mass chromatographys MRM diagram of TTX in pure reference material (A) and matrix reference material (B)

表 1 基体标准样品中 TTX 含量均匀性检验结果(mg/kg)

Table 1 Test results of TTX content uniformity in matrix reference material (mg/kg)

样品编号	测定值		平均值±标准偏差 (n=2)
	子样 1	子样 2	
1	5.12	5.17	5.15±0.04
2	5.17	5.14	5.16±0.02
3	5.18	5.22	5.20±0.03
4	5.11	5.19	5.15±0.06
5	5.14	5.19	5.17±0.04
6	5.13	5.17	5.15±0.03
7	5.19	5.22	5.21±0.02

表 1(续)

样品编号	测定值		平均值±标准偏差 (n=2)
	子样 1	子样 2	
8	5.13	5.13	5.13±0.00
9	5.12	5.15	5.14±0.02
10	5.14	5.12	5.13±0.01
11	5.18	5.15	5.17±0.02
12	5.13	5.17	5.15±0.03
13	5.16	5.19	5.18±0.02
14	5.18	5.21	5.20±0.02
15	5.14	5.18	5.16±0.03

表 2 基质标准样品中 TTX 含量均匀性单因素方差分析结果
Table 2 Results of one-way analysis of variance of TTX content uniformity in matrix reference material

方差来源	平方和(SS)	自由度(df)	均方差(MS)	F 比值/F	F 临界值/ F_{crit}	置信概率/%	样品间标准差/%
组间	0.016187	14	0.001156	1.47	2.42	0.95	0.0136
组内	0.011800	15	0.000787				
总和	0.027987						

3 讨 论

目前,从市场上可获得 TTX 与 4,9 脱水 TTX 两种商业化的纯品标准品,很难获得其他类型标准品,不能满足水产品中 TTX 检测的需要^[28]。更需值得关注的是,基于纯品标准品的检测质量控制主要是通过向样品中添加提纯的 TTX 标准品后进行检测分析,这种分析方法无法代表目标分析物在活体内真实存在的状态,不能真实地重现 TTX 经过自然代谢后在动物体内的提取效率,无法反映水产食品基质中 TTX 检测的准确性。由于目标物和基质结合情形与真实检测样品不完全一致而导致提取、净化等处理结果与日常分析样本存在较大差异,从而影响结果的可靠性和有效性^[25]。

表 3 基质标准样品中 TTX 含量的长期稳定性检验结果(mg/kg)
Table 3 Long term stability test results of TTX content in matrix reference material (mg/kg)

测试时间间隔/月	测定值				平均值±标准偏差
	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	
0	5.19	5.20	5.21	5.20	5.20±0.01
2	5.18	5.18	5.20	5.21	5.19±0.02
4	5.19	5.21	5.18	5.18	5.19±0.01
6	5.20	5.21	5.21	5.20	5.21±0.01
8	5.19	5.20	5.21	5.23	5.21±0.02
10	5.20	5.17	5.18	5.18	5.18±0.01
12	5.20	5.21	5.22	5.19	5.21±0.01

表 4 基质标准样品中 TTX 含量的长期稳定性方差分析结果
Table 4 Analysis of variance results of long-term stability of TTX content in matrix reference material

	平方和(SS)	自由度(df)	均方差(MS)	F 比值/F	F 临界值/ F_{crit}	置信概率/%	不稳定标准差/%
组间	0.0021	6	0.000350	2.15	2.57	0.95	0.0068
组内	0.0034	21	0.000163				
总和	0.0055	27					

表 5 同步设计运输条件下的基质标准样品短期稳定性检验结果
Table 5 Short term stability test results of matrix reference material under synchronous design and transportation conditions

温度/°C	测试前时间/d	测定值/(mg/kg)					
		样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
-80	7	5.21	5.20	5.21	5.20	5.19	5.20
-20	45	5.20	5.19	5.20	5.21	5.19	5.20
0~4	>900	5.20	5.21	5.19	5.18	5.21	5.19
25	45	5.18	5.21	5.18	5.19	5.20	5.18
55	7	5.18	5.20	5.18	5.19	5.19	5.18

表 6 基质标准样品的短期稳定性方差分析结果
Table 6 Results of short-term stability analysis of variance of matrix reference material

因素	平方和(SS)	自由度(df)	均方差(MS)	F 比值/F	F 临界值/ F_{crit}	置信概率/%	不稳定标准差/%
温度	0.000761	4	0.000190	1.78	3.06	0.95	0.0023
瓶间	0.001580	10	0.000158	1.48	2.54	0.95	
随机	0.001600	15	0.000107				
总和	0.003941						

表 7 协同实验室定值结果汇总表(mg/kg)
Table 7 Summary of fixed value results of collaborative laboratory (mg/kg)

序号	测定值						平均值±标准偏差
1	5.21	5.18	5.12	5.17	5.23	5.15	5.18±0.04
2	5.17	5.19	5.23	5.21	5.14	5.23	5.19±0.04
3	5.26	5.19	5.17	5.18	5.23	5.24	5.21±0.04
4	5.14	5.18	5.23	5.17	5.22	5.19	5.19±0.03
5	5.19	5.20	5.25	5.21	5.16	5.13	5.19±0.04
6	5.18	5.20	5.27	5.19	5.17	5.23	5.21±0.04
7	5.21	5.27	5.21	5.15	5.18	5.14	5.19±0.05
8	5.22	5.20	5.27	5.17	5.19	5.12	5.19±0.05
总平均值±标准偏差	5.195±0.039						
平均值标准偏差/%	0.0038						

表 8 基体标准样品中 TTX 含量的不确定度分析结果
Table 8 Uncertainty analysis results of TTX content in matrix reference material

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
平均值/(mg/kg)	5.18	5.19	5.21	5.19	5.19	5.21	5.19	5.19
总平均值/(mg/kg)	5.195							
平均值标准偏差/%	0.0038							
瓶间均匀性标准差/%	0.0136							
长期稳定性标准差/%	0.0068							
短期稳定性标准差/%	0.0023							
合成标准不确定度/%	0.0157							
扩展不确定度/(k=2)	0.0314							

我国在纯度标准样品方面的研究已经比较完善,对基体标准样品的研制比较晚,特别是在复杂基体方面的研究与发达国家仍存在一些差距,主要体现在标准样品研制的规划设计、制备技术等方面^[15]。与纯品标准样品相比,基体标准样品为目标化合物和基体结合,与真实检测样品更一致,可以保障测试结果的准确性和质量控制的有效性^[15,29],因而,今后应更多地规划设计、研究开发基体标准样品,为食品安全监测、监督等提供有益的技术支撑。本研究突破常规制备技术,采用正己烷浸泡脱脂工艺制得河鲀鱼粉,既能最大程度保证基质原有 TTX 不被破坏,又能排除因河鲀鱼油脂含量高而限制了冷冻干燥脱水控制较低的水分含量,确保河鲀鱼基体标准具有长期稳定性。随着食品科学技术不断创新,基质越来越复杂。在当今标准样品国际互认的大趋势下,复杂食品基体标准样品的生产质量控制及溯源性尤为重要^[30-31]。

4 结 论

本研究以野生河鲀鱼肝脏、卵巢、精巢和肌肉组织为基料,利用正己烷脱脂分离处理后,采用两次冷冻干燥程序制备河鲀鱼基质的 TTX 标准样品,采用液相色谱-串联质谱法进行结构确证为含有 TTX,经均匀性、稳定性检验性能良好,经 8 家实验室协同定值及评定定值结果的不确定度,其特性值和扩展不确定度为(5.20±0.03) mg/kg (k=2)。本研究研制的河鲀鱼基体 TTX 基体标准样品可用于水产品中 TTX 检测过程的方法验证与质量控制等,为实验室检测质量控制提供了技术保障和量值溯源保证,具有重要意义。

参考文献

- [1] SUEHIRO M. Historical review on chemical and medical studies of

- globefish toxin before world war II [J]. *Yakushigaku Zasshi*, 1994, 29(3): 428–434.
- [2] STOKES AN, DUCEY PK, NEUMAN-LEE L, *et al.* Confirmation and distribution of tetrodotoxin for the first time in terrestrial invertebrates: Two terrestrial flatworm species (*Bipalium adventitium* and *Bipalium kewense*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100718.
- [3] OKABE T, SAITO R, YAMAMOTO K, *et al.* The role of toxic planoceric flatworm larvae on tetrodotoxin accumulation in marine bivalves [J]. *Aquat Toxicol*, 2021, 237: 105908.
- [4] GERSSEN A, BOVEE THF, KLIJNSTR A MD, *et al.* First report on the occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks in the Netherlands [J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(11): 450–462.
- [5] DAO HV, PHAM KX, HOANG BX, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin in three *Nassarius* gastropod species in Khanh Hoa Province, Vietnam [J]. *Fish Sci*, 2019, 86(1): 181–186.
- [6] SILVA M, AZEVEDO J, RODRIGUEZ P, *et al.* New gastropod vectors and tetrodotoxin potential expansion in temperate waters of the Atlantic Ocean [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(4): 712–726.
- [7] BANE V, LEHANE M, DIKSHIT M, *et al.* Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection [J]. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(2): 693–755.
- [8] YOTSU-YAMASHITA M, GILHEN J, RUSSELL RW, *et al.* Variability of tetrodotoxin and of its analogues in the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens* (Amphibia: Urodela: Salamandridae) [J]. *Toxicon*, 2012, 59(2): 257–264.
- [9] 苏捷, 姜琳琳, 吴靖娜, 等. 动物携带河豚毒素的分子机制与生态作用 [J]. *南方水产科学*, 2013, 9(4): 99–104.
- SU J, JIANG LL, WU JN, *et al.* Molecular mechanism and ecological effects of tetrodotoxin carried by animals [J]. *South China Fish Sci*, 2013, 9(4): 99–104.
- [10] BIESSY L, BOUNDY MJ, SMITH KF, *et al.* Tetrodotoxin in marine bivalves and edible gastropods: A mini-review [J]. *Chemosphere*, 2019, 236: 124404.
- [11] NOGUCHI T, MIYAZAWA K, DAIGO K, *et al.* Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin- and/or tetrodotoxin-contaminated crabs and food poisoning by them [J]. *Toxin Rev*, 2011, 30(4): 91–102.
- [12] LIN WF, HWANG DF. Analysis of poisoning cases, monitoring and risk warning for marine toxins (TTX, PSP and CTXs) in Taiwan [J]. *J Food Drug Anal*, 2012, 20(4): 746–771.
- [13] 姚敬元, 金薇, 宫长宝, 等. 我国近海河豚毒素的分布特征 [J]. *海洋环境科学*, 2021, 40(2): 161–166.
- YAO JY, JIN W, GONG CB, *et al.* Distribution characteristics of tetrodotoxin in coastal waters of China [J]. *Mar Environ Sci*, 2021, 40(2): 161–166.
- [14] LAGO J, RODRÍGUEZ LP, BLANCO L, *et al.* Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: Distribution, toxicity, origin and therapeutical uses [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(10): 6384–6406.
- [15] 刘素丽, 王宏伟, 赵梅, 等. 食品中基质标准物质研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 8–13.
- LIU SL, WANG HW, ZHAO M, *et al.* Research progress of matrix reference materials in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(1): 8–13.
- [16] TANIGUCHI K, TAKAO H, ABE K, *et al.* Simplification of extraction procedure and evaluation of extraction ratio in puffer fish toxin examination method [J]. *Nippon Suisan Gakk*, 2020, 86(5): 410–417.
- [17] 陈伟珠, 谢全灵, 张怡评, 等. 4,9-脱水河豚毒素国家标准样品的研制 [J]. *化学分析计量*, 2014, 23(3): 1–4.
- CHEN WZ, XIE QL, ZHAN YP, *et al.* Preparation of national standard sample of 4,9-dehydrated tetrodotoxin [J]. *Chem Anal Meter*, 2014, 23(3): 1–4.
- [18] 余孔捷, 黄杰, 王丹红, 等. 含毒死蜱残留茶叶的自然基质标准样品研制 [J]. *分析试验室*, 2014, 31(5): 740–742.
- YU KJ, HUANG J, WANG DH, *et al.* Preparation of natural matrix standard sample of tea containing chlorpyrifos residue [J]. *Chin J Anal Lab*, 2014, 31(5): 740–742.
- [19] 刘正才, 杨方, 吕小玲, 等. 鸡肉中金刚烷胺和利巴韦林残留基质标准物质的研制 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(8): 3327–3332.
- LIU ZC, YANG F, LV XL, *et al.* Preparation of matrix reference materials for amantadine and ribavirin residues in chicken [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(8): 3327–3332.
- [20] 成长玉, 钟慈平, 黄丽娟, 等. 黄瓜中毒死蜱残留基质标准物质的研制 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(18): 6356–6361.
- CHEN CY, ZHONG CP, HUANG LJ, *et al.* Preparation of matrix reference material for chlorpyrifos residue in cucumber [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(18): 6356–6361.
- [21] 杨赵伟, 李博, 李宏娟, 等. 冻干羊奶中伊维菌素基质标准物质的研制 [J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(9): 23–27.
- YANG ZW, LI B, LI HJ, *et al.* Preparation of ivermectin matrix reference material in freeze-dried goat milk [J]. *China Dairy Ind*, 2021, 49(9): 23–27.
- [22] 施海燕, 宋美洁, 赵玲玲, 等. 蜂蜜中氯霉素残留基质标准物质的研制 [J]. *中国蜂业*, 2020, 71(11): 64–68.
- SHI HY, SONG MJ, ZHAO LL, *et al.* Preparation of chloramphenicol residue matrix reference material in honey [J]. *Apicul China*, 2020, 71(11): 64–68.
- [23] 潘传荣, 李文辉, 许艇, 等. 用于粮食基质中重金属元素快检法的标准样品制备研究 [J]. *粮食加工*, 2016, 41(2): 68–74.
- PAN CR, LI WH, XU T, *et al.* Preparation of standard samples for rapid detection of heavy metals in grain matrix [J]. *Grain Process*, 2016, 41(2): 68–74.
- [24] 吕飞, 陈晓霞, 黄刚, 等. 干基蔬菜中多种重金属残留基质标准样品的制备及测定 [J]. *惠州学院学报*, 2020, 40(6): 22–26.
- LV F, CHEN XX, HUANG G, *et al.* Preparation and determination of matrix standard samples of various heavy metal residues in dry vegetables [J]. *J Huizhou Univ*, 2020, 40(6): 22–26.
- [25] 傅博强, 唐治玉, 王晶, 等. 腹泻性贝类毒素基质标准物质的研制 [J]. *计量学报*, 2010, 31(z1): 166–169.
- FU BQ, TANG ZY, WANG J, *et al.* Preparation of reference material for diarrhea shellfish toxin matrix [J]. *Acta Metrol Sin*, 2010, 31(z1):

- 166–169.
- [26] 赵天天, 张伟, 王秀斌, 等. 黄曲霉毒素饲料基标准物质研究[J]. 化学试剂, 2019, 41(4): 343–347.
ZHAO TT, ZHANG W, WANG XP, *et al.* Study on reference material of aflatoxin feed matrix [J]. Chem Reagent, 2019, 41(4): 343–347.
- [27] 牛欣宁, 王步军. 玉米粉中伏马毒素 FB₁ 基标准物质的评价[J]. 作物学报, 2020, 46(7): 1128–1133.
NIU XN, WANG BJ. Evaluation of fumonisin FB₁ matrix reference material in corn flour [J]. Acta Metrol Sin, 2020, 46(7): 1128–1133.
- [28] 王兴龙, 蔡强, 桂文锋, 等. 河鲀毒素及其检测技术研究进展[J]. 水产科学, 2020, 39(3): 447–457.
WANG XL, CAI Q, GUI WF, *et al.* Research progress of tetrodotoxin and its detection technology [J]. Fish Sci, 2020, 39(3): 447–457.
- [29] 尹太坤, 杨方, 刘正才, 等. 鳗鲡肌肉中孔雀石绿代谢物隐性孔雀石绿染料残留标准物质的研制[J]. 水产科学, 2016, 35(3): 272–277.
YIN TK, YANG F, LIU ZC, *et al.* Preparation of residual reference material of malachite green metabolite and recessive malachite green dye in eel muscle [J]. Fish Sci, 2016, 35(3): 272–277.
- [30] OLIVARES IRB, SOUZA GB, NOGUEIRA ARA, *et al.* Trends in analytical chemistry trends in developments of certified reference materials for chemical analysis-focus on food, water, soil, and sediment matrices [J]. Trend Anal Chem, 2018, (100): 53–64.
- [31] NIU Z, ZHANG W, YU C, *et al.* Trends in analytical chemistry recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques

[J]. Trend Anal Chem, 2018, (102): 123–146.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



王 伟, 博士, 副研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: wangweisw@cfsa.net.cn



尹新颖, 硕士研究生, 主要研究方向为生物与食品安全。

E-mail: 2810739130@qq.com



肖 晶, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。

E-mail: xiaojing@cfsa.net.cn



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。

E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn