

高效液相色谱-串联质谱法检测河豚毒素的方法研究

吴佳俊^{1,2}, 黄文雯¹, 肖陈贵³, 岳振峰³, 林群声^{1,2}, 陈荔^{1,2*}

(1. 深圳市海洋生物多样性可持续利用重点实验室, 香港城市大学深圳研究院海洋与人类健康研究中心, 深圳 518057;
2. 香港城市大学海洋污染国家重点实验室, 香港 999077; 3. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心
深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 深圳 518045)

摘要: **目的** 建立了一种河豚中河豚毒素(TTX)的高效液相色谱-串联质谱检测方法。**方法** 取适量样品, 在0.03 mol/L乙酸溶液中均质后超声提取样品中的河豚毒素。粗提液低速离心, 取上清液加入等量甲醇充分混匀后进行高速离心。高速离心后上清液过0.22 μm滤膜后待测。采用Waters ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱分析柱, 含0.1%甲酸的MilliQ水及乙腈溶液为流动相, 电喷雾正离子模式进行分析。**结果** 河豚毒素在5~1000 ng/mL的范围内线性关系良好, 相对回收率为83.3%~93.2%, 绝对回收率为47.8%~48.9%, 检出限为5 μg/kg, 定量限为20 μg/kg。**结论** 与以往检测TTX的LC-MS/MS方法相比, 新建方法操作简单、快速、准确、灵敏并且实验成本低, 为河豚中TTX的定量检测提供了有效的实用技术手段。**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 河豚毒素; 河豚; 亲水性色谱分析柱

Determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WU Jia-Jun^{1,2}, HUANG Wen-Wen¹, XIAO Chen-Gui³, YUE Zhen-Feng³,
LAM Kwan-Sing^{1,2}, CHAN Lai^{1,2*}

(1. Shenzhen Key Laboratory for Sustainable Use of Marine Biodiversity, Research Centre for the Oceans and Human Health, City University of Hong Kong Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518057, China; 2. State Key Laboratory in Marine Pollution, City University of Hong Kong, Hong Kong 999077, Hong Kong S.A.R.; 3. Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

ABSTRACT: Objective To establish a new method for determination of tetrodotoxin (TTX) in puffer fish by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **Methods** The sample was sonicated after homogenizing with 0.03 mol/L acetic acid solution. After a low-speed centrifugation, the supernatant was mixed with equivalent methanol. With a subsequent high-speed centrifugation, the supernatant was filtered through a 0.22 μm membrane filter before injection. LC-MS/MS analysis was conducted by Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column with the mobile phase of 0.1% formic acid in water and acetonitrile at positive mode. **Results** There was a good linearity of TTX in the range of 5~1000 ng/mL. The matrix recoveries was 85.8%~93.2% and the absolute recoveries was 47.8%~48.9%. The detection limit is 5

*通讯作者: 陈荔, 博士, 研究员, 主要研究方向为藻毒素合成机制及对生态系统的影响。E-mail: leochan@cityu.edu.hk

*Corresponding author: CHAN Lai, Research Professor, Shenzhen Key Laboratory for Sustainable Use of Marine Biodiversity, Research Centre for the Oceans and Human Health, City University of Hong Kong Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518057, China. E-mail: leochan@cityu.edu.hk

$\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limit of quantification is $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** Compared with the previous methods, the new method is simple, rapid, accurate, sensitive and at low cost for the determination of TTX in aquatic products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; tetrodotoxin; aquatic products; hydrophilic interaction chromatography column

1 引言

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是一种非蛋白类的低分子量神经毒素^[1],是毒性极强的生物毒素之一^[2],化学性质稳定,通过烹调无法去除毒素,并且也无有效的解毒方法,因食河豚中毒的患者病死率高达60%^[3]。据统计,我国因食用河豚鱼中河豚毒素而死亡的人数每年都在100人以上^[4]。河豚毒素中毒后发病迅速且症状剧烈,通常在食用10~45 min内即发生不适,4~8 h内死亡^[5]。目前我国还没有制定关于河豚毒素的限量标准,国际上有关TTX限量标准是以麻痹性贝毒的限量标准($800 \text{ ng}/\text{g}$)作为参考进行制定的^[6]。目前TTX的化学检测手段主要采用液质联用法(LC-MS/MS)^[7-9]和柱后衍生高效液相色谱法(HPLC-FLD)^[10-14]。LC-MS/MS方法的灵敏性较高,但由于TTX的水溶性极强,以反相柱为分析柱时,其保留时间极短,不利用于分析,必须采用亲水柱。同时为了降低基质效应的影响,通常会采用较为昂贵且不可重复利用的超滤管或固相萃取柱去除杂质。HPLC-FLD方法最为常用,但其进行测定时需要将河豚毒素进行衍生化处理,实验步骤较为复杂且实验结果不易控制,不适用于大批量样品的检测。本研究从色谱柱、提取方法、进样溶剂等方面对检测河豚毒素的LC-MS/MS方法进行了优化和进一步的开发,建立了适合大批量检测河豚中河豚毒素含量的高效液相色谱—串联质谱检测法。该方法快速有效并且成本低廉,适合常规大批量检测的需求。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

AB Sciex 3200QTRAP型高效液相色谱-串联质谱仪(AB SCIEX, USA),液相色谱仪为Agilent 1290(Agilent Technologies, USA);配有电喷雾离子源;Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$);IKA T18均质机(IKA, Germany);Beckman Coulter Allegra X-22R型及Microfuge

22R型离心机(Beckman Coulter, USA);CREST 950D型超声仪(CREST, USA)。

乙腈、甲酸、甲醇、乙酸购自(Sigma-Aldrich, St.Louis,MO, USA),色谱纯;正己烷、二氯甲烷购自RCI Labscan (Bangkok, Thailand),色谱纯,TTX标准品($1 \text{ mg}/\text{瓶}$)购于Calbiochem公司,纯度99.8%。

标准储备液的配制:取TTX标准品一瓶,用 $0.03 \text{ mol}/\text{L}$ 的乙酸水溶液配制成 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。

2.2 检测条件

色谱条件:色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH Amide ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$),柱温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

流动相:A为含0.1%甲酸的MilliQ水溶液,B为含0.1%甲酸的乙腈溶液;洗脱程序为0~3 min,B从90%降至60%;4~9 min,保持B为60%;9~12 min,B从60%升至90%,之后保持B 90% 4 min以平衡柱子,恢复初始状态。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源,扫描方式为正离子模式,电离电压为 5500 V ,离子源温度为 $400 \text{ }^\circ\text{C}$,碰撞气为纯氮气,气帘气流速为 $10 \text{ L}/\text{min}$ 。TTX的定量离子参数为 m/z $320.1 > 302.2$, DP 51, CE 33;定性离子参数为 m/z $320.1 > 162.1$, DP 51 CE 45。

2.3 样品前处理

称取饲养的无毒河豚鱼肉(*Takifugu obscurus*, 暗纹东方豚)试样 2 g (精确至 0.01 g)于 50 mL 螺旋盖聚乙烯离心管中,分别精密加入TTX标准溶液($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) $4 \mu\text{L}$ 、 $80 \mu\text{L}$ 和 $160 \mu\text{L}$,使空白样品的标准含量达到 $20 \text{ ng}/\text{g}$ 、 $400 \text{ ng}/\text{g}$ 及 $800 \text{ ng}/\text{g}$ 。样品静置30 min后,加入 10 mL $0.03 \text{ mol}/\text{L}$ 乙酸溶液进行均质,均质每次10 s,共3次。均质后的混合溶液在常温下超声提取10 min。提取液在 $4500 \text{ r}/\text{min}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心10 min后取上清液 0.5 mL ,加入 0.5 mL 甲醇,充分混匀后在 $12000 \text{ r}/\text{min}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心20 min。最后取上清液过 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

3 结果与分析

3.1 分析色谱柱的选择

TTX 是水溶性毒素, 根据其特性并参考相关文献^[6, 16-17], 选取了 4 根亲水性色谱分析柱(HILIC 柱)对 TTX 进行了加标样品的分析, 包括 Tosoh TSK-GEL amide 80 (2.0 mm×250 mm, 5 μL) 柱; Phenomenex Kinetex HILIC (3.0 mm×150 mm, 2.6 μL) 柱; Merck ZIC-HILIC (2.1 mm×150 mm, 3.5μL) 柱以及 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.0 mm×250 mm, 1.7 μL)柱。研究发现当以 Tosoh 柱子为分析柱来检测加标样品时(图 1 a), TTX 的峰形好, 质谱响应值高, 但是由于河豚鱼肉的成份较复杂, 易造成分析柱的柱压升高, 而 Tosoh 柱的最大耐受压只有 2200 Psi, 在采用 UPLC-MS/MS 的检测过程中经常会出现柱压过高的现象。采用 Phenomenex 柱子和 Merck 柱子作为分析柱时, TTX 的响应值偏低, 尤其是 phenomenex 柱, 无论采用加酸或者加盐的缓冲溶液, 都无法改善其质谱响应的强度及峰形(图 1 b 及图 1 c)。Waters 柱子的质谱响应值与峰形均较好(图 1 d)。通过比较 TTX 在这四根不同 HILIC 柱子上的色谱行为, 我们发现不同亲水色谱柱的填料对 TTX 的分析起着关键性作用。Tosoh 柱及 Waters 柱均是采用氨基甲酰键合硅胶填料, Merck 与 Phenomenex 柱

则是通过两性离子基团共价键合在于多孔硅胶, 填料的差别造成了质谱响应信号的不同。TTX 比较适合采用氨基甲酰键合的硅胶填料亲水柱来分析可能也与其结构中含有多个羟基有关。

同时我们对四根柱子的加标回收率也进行了比较, 其中

相对回收率 = (加标样品的峰面积/标准溶液在空白基质中的峰面积) × 100%

绝对回收率 = (加标样品的峰面积/标准溶液的峰面积) × 100%

从表 1 可知, 用这四根柱子进行加标样品回收率分析时, 其相对回收率达到 80%以上, 但从绝对回收率来看, 只有 Tosoh 和 Waters 柱子可以达到 50%左右, 另两根柱子只有 5%左右。Phenomenex 与 Merck 柱子的基质抑制效应非常明显。色谱柱在检测过程中的稳定性对检测结果起着相当重要的作用, 本研究主要从 TTX 的响应值, 回收率, 柱压, 保留时间四个方面进行了考量。使用 Tosoh 分析柱时, 受样品基质的影响, 在检测过程中 Tosoh 柱的压力会出现较大的波动而不稳定。而使用 Merck 或 Phenomenex 柱进行分析时, 由于 TTX 响应值较低, 波动性大, 使得每次实验结果偏差较大, 实验结果的稳定性差。同时结合回收率, Waters 分析柱在以上四个方面均满足要求。因此综合以上实验结果, 决定选取 Waters 柱为本次实验的分析色谱柱。

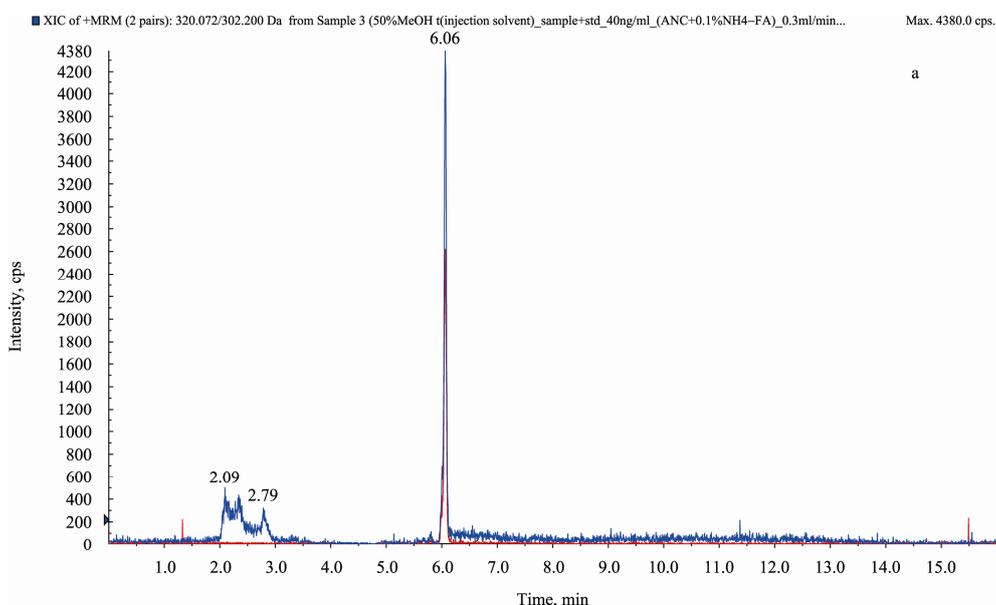
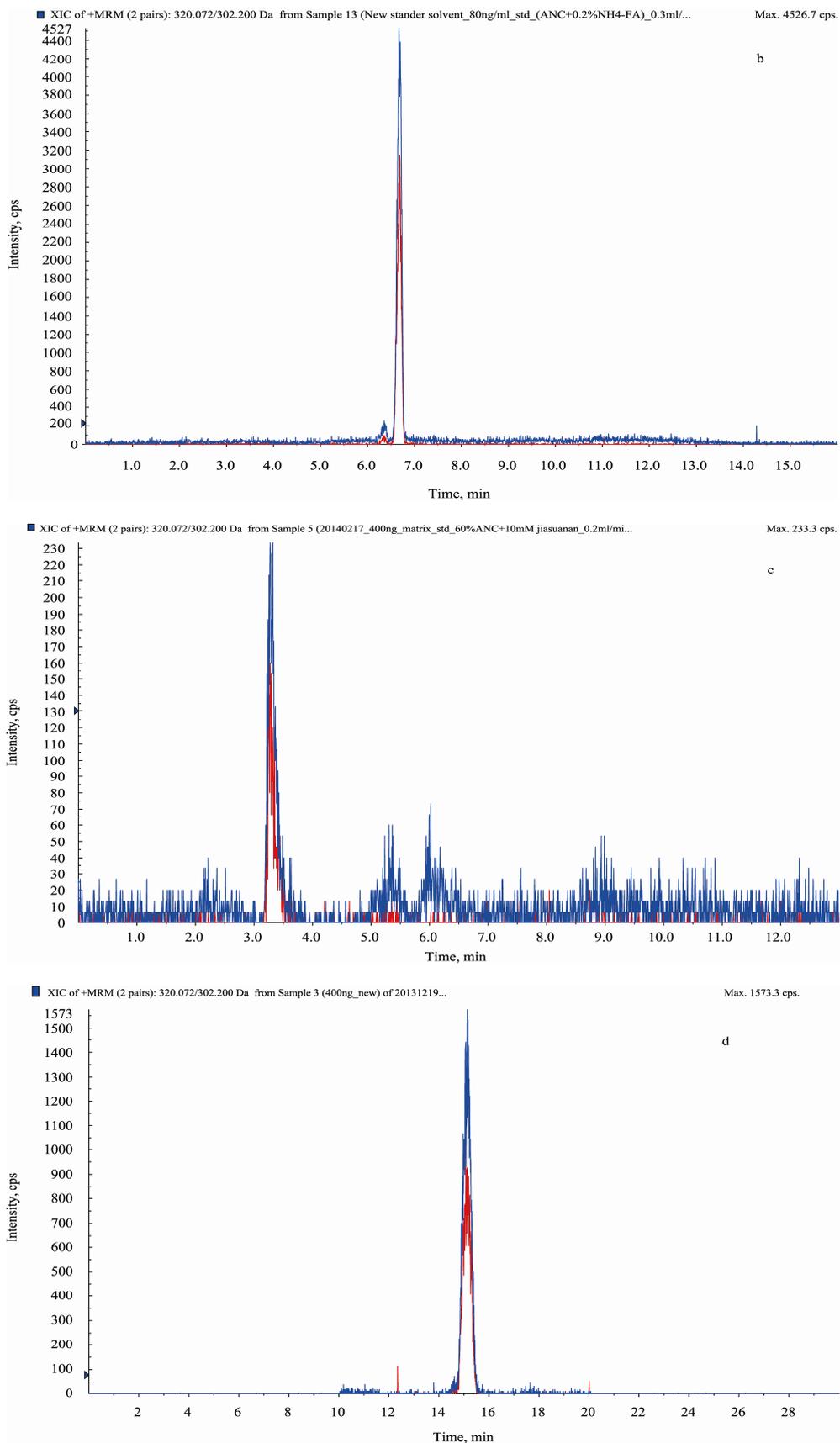


图 1 4 种柱子的空白样品加标色谱图(a-Tosoh 柱, b-Phenomenex 柱, c-Meck 柱, d-Waters 柱, 加标量 400 ng/g)

Fig. 1 Chromatograms of the spiked sample on the four kinds of columns (a- Tosoh column, b- Phenomenex column, c-Merck column, d- Waters column, spike concentration-400 ng/g)



续图 1

表 1 四根色谱柱的空白鱼肉加标样品回收率
(加标量为 400 ng/g)

Table 1 Spike recovery by the nontoxic puffer fish of the four columns (spike concentration is 400 ng/g)

色谱柱	相对回收率(%)	绝对回收率(%)
Tosoh 柱	80±5	50±3
Phenomenex 柱	85±5	6±2
Merck 柱	80±10	5±4
Waters 柱	85±3	45±1

3.2 流动相和进样溶剂的选择

采用水与乙腈为基本的流动相, 分别添加了 0.1%甲酸、1%甲酸、0.1%甲酸+5 mmol/L 甲酸铵、0.1%甲酸+10 mmol/L 甲酸铵比较了酸和缓冲盐对 TTX 色谱行为的影响。实验结果表明流动相中添加甲酸铵缓冲盐, TTX 的响应值会下降, 峰宽变宽, 而使用含甲酸的乙腈水系统时, 可以得到较好的峰型和较高的响应值, 同时酸性强弱带来的影响并不大。因此选用含 0.1%甲酸的乙腈水系统为本方法流动相。

采用单纯的酸性水溶液(0.03 mol/L 乙酸溶液)作为进样溶剂时, TTX 的峰型会出现裂峰或有肩峰的现象, 如图 2(a)所示。Waters 柱子的使用说明中也提到进样溶液中含有有机溶剂可提供较好的峰形, 因此在 TTX 的进样溶液中添加了甲醇。当甲醇比例达 50%时, TTX 的峰型不再有裂峰现象, 且峰形尖锐, 实验结果如图 2(b)所示。因此选择 50%甲醇酸性水溶液为 TTX 的进样溶剂。

3.3 样品前处理方法的选择

TTX 是氨基全氢喹唑啉型化合物, 极易溶于稀酸水溶液, 在中性和酸性条件下稳定, 但在碱水中易分解。多数文献会利用酸性水溶液或醇溶液提取样品中的 TTX^[18-20], 与碱反应生成黄色结晶 2-氨基-6-羟甲基-8-羟基-喹唑啉, 再利用荧光法进行检测; 或者是在提取后利用 SPE 净化柱去除杂质, 超滤管去除样品所含蛋白, 再进行 LC-MS/MS 分析^[21-23]。

本实验首先比较了(1)不同提取液对河豚鱼肉中 TTX 的提取作用, 选取了 0.03 mol/L 乙酸水溶液, 含 0.015 mol/L 乙酸的 50%甲醇水溶液, 含 0.03 mol/L 乙酸的 50%甲醇水溶液, 得到加标样品的回收率结果如表 2 所示。从实验结果可以看出, 当用乙酸-醇溶液作为提取剂时得到的加标样品绝对回收率在 33.5%~35.7%之间, 而用纯乙酸水溶液提取得到的加

标样品绝对回收率则为 45%左右, 因此决定选择 0.03mol/L 乙酸水溶液作为样品的提取剂。(2)另外有研究人员会对样品进行加热提取, 凝固蛋白并提高提取率。本研究采用 0.03 mol/L 乙酸水溶液进行加热提取, 结果表明是否对样品进行热处理并不存在明显差异(表 2)。为了简化方法, 因此前处理方法中我们不对样品进行加热处理。(3)我们同时对比了不同类型的 SPE 柱对样品的净化作用, 包括: Waters Oasis MAX, Waters Sep-Pak C₁₈, Phenomenex Strata NH₂, Supelco PSA and Supelco Envi-carb 共 5 种净化柱, 这五种 SPE 柱加标实验的绝对回收率分别为 33%、5.9%、14.8%、29.4%以及 12.7%。绝对回收率最高的是 MAX 柱, 为 33%, 但不用净化柱的绝对回收率可以达到 50%左右。总体来说, 净化柱的净化效果不显著, 因此决定不使用 SPE 柱。(4)考虑到直接用酸性水溶液提取鱼肉中的 TTX 会同时提取出鱼肉中的部分蛋白质成分, 在批量检测鱼肉样品时, 这些蛋白成分会对检测仪器产生累积性干扰。通过加入一定比例的甲醇, 能够很好地沉淀样品提取液中的蛋白质, 同时兼顾了进样溶剂的选择。(5)我们还尝试了利用二氯甲烷以及正己烷去除样品提取液中的油脂, 但结果表明两者并没能降低样品基质对 TTX 的抑制作用, 同时也并不能提高加标样品的回收率。(6)超滤管主要作用是除去提取液中的大分子物质, 达到净化提取液的效果。本研究也尝试采用超滤管除去提取液中的蛋白质等大分子物质从而降低样品基质的抑制效应, 提高加标样品的绝对回收率。但实验结果表明采用超滤管并不能降低样品基质抑制效应, 因此在本研究中并不采用超滤管进行样品净化。

3.4 方法的线性、定量限及检测限

精密量取标准储备液, 用 50%甲醇乙酸水溶液稀释制成 5 ng/mL、20 ng/mL、200 ng/mL、600 ng/mL、1000 ng/mL 系列浓度的纯溶剂标准溶液, 同时用空白样品的提取液配置 8 ng/mL、80 ng/mL、300 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 系列浓度的空白基质标准溶液, 均按照 2.2 的色谱条件进行色谱分析。实验结果以所得到的系列 TTX 峰面积和其对应浓度分别为纵横坐标做图, 得到纯溶剂标准曲线和空白基质标准曲线如图 3 所示, 从实验结果可知该方法的线性相关性好。通过比较两条标准曲线的斜率, 可知基质效应的影响可降低响应值达 48%。按照信噪比 $S/N = 3$ 得到 TTX 在基质中的最低检出限为 5 ng/g; 按 $S/N = 10$ 得到 TTX 在基质中的最低定量限为 20 ng/g, 优于已文献报道值^[6]。

3.5 方法回收率

在空白河豚鱼肉中加入标准储备溶液, 使样品中 TTX 的含量分别达到 20、400、800 ng/g, 每个加

标浓度重复 3 次, 重复实验 3 次, 按 2.3 及 2.3 中提及的样品处理及检测方法进行操作, 计算相对回收率与绝对回收率, 其测定结果如表 3 所示。从实验结果

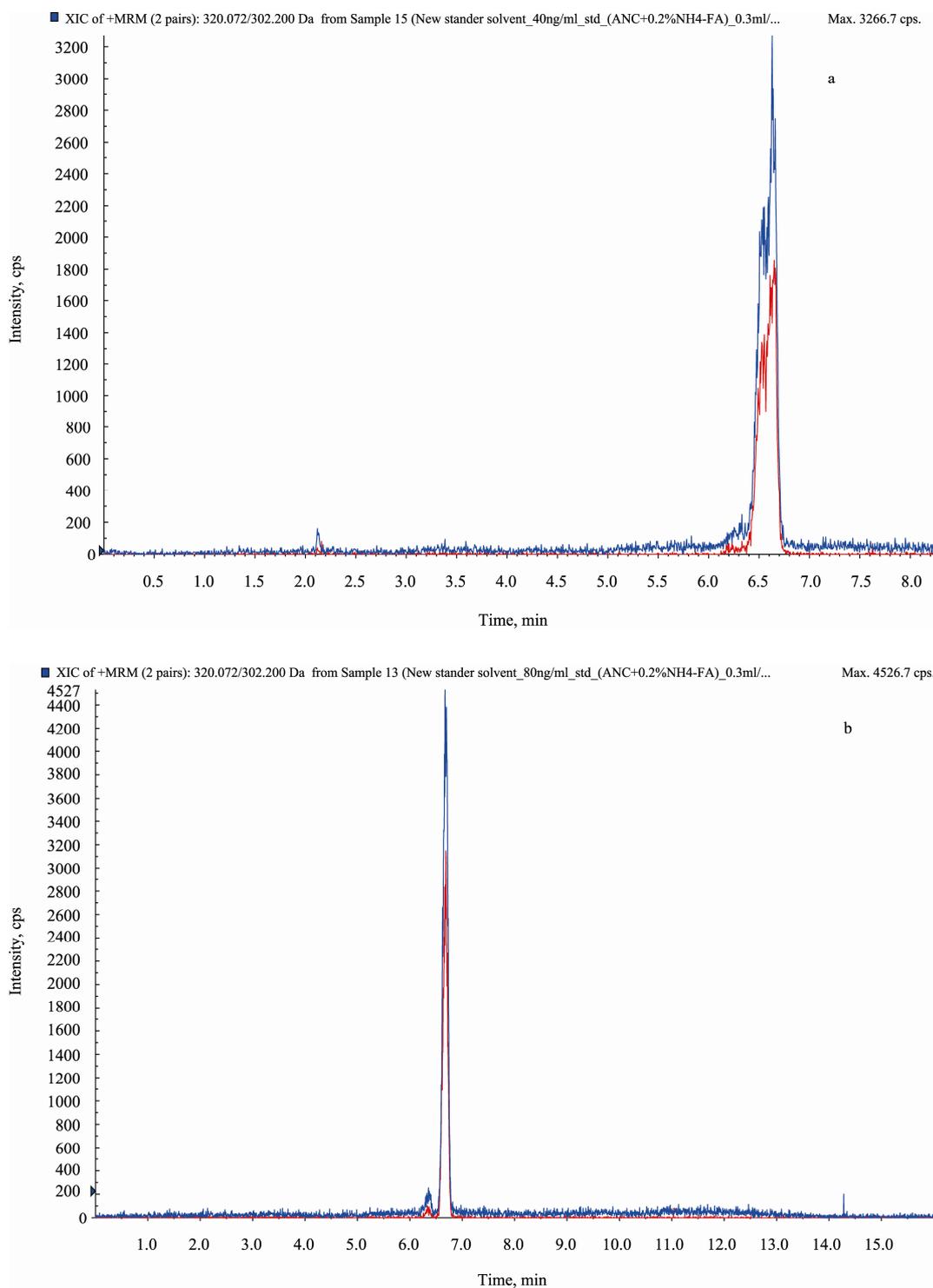


图 2 甲醇对 TTX 峰型的影响(a-无甲醇, b-50%甲醇)

Fig. 2 Effect of MeOH on the peak shape of TTX (a-Without MeOH, b-50%MeOH)

表 2 不同提取剂及热处理操作对提取效果的影响($n=3$)
Table 2 The extraction efficiency of different extract agents and hot treatment ($n=3$)

样品前处理方法	相对回收率		绝对回收率	
	平均值	RSD	平均值	RSD
0.03 mol/L 乙酸水溶液提取	88.8%	1.7%	46.2%	1.7%
含 0.015 mol/L 乙酸的 50%甲醇水溶液提取	85.9%	2.5%	33.5%	2.4%
含 0.03 mol/L 乙酸的 50%甲醇水溶液提取	81.7%	0.6%	35.7%	0.6%
0.03 mol/L 乙酸水溶液热提取	82.3%	1.0%	43.2%	3.0%
超滤管净化	82.7%	2.6%	43.1%	2.6%
Hexane 去脂净化	85.3%	0.3%	39.8%	0.3%
CH ₂ Cl ₂ 去脂净化	70.4%	3.1%	30%	3.1%

表 3 TTX 加标样品回收率分析
Table 3 Spike recoveries of TTX

样品	回收率(相对回收率-R, 绝对回收率-A, 相对标准偏差-RSD)-%									
	1 次		2 次		3 次		R-平均值	RSD	A-平均值	RSD
加标量	R	A	R	A	R	A				
20 ng/g_1	82.1	46.4	81.0	45.8	82.1	46.4	83.3	3.3	47.1	3.3
20 ng/g_2	90.1	50.9	81.2	45.9	83.5	47.2				
20 ng/g_3	83.1	46.9	84.1	47.5	82.4	46.6				
400 ng/g_1	84.7	48.9	84.0	45.6	89.6	48.9	85.8	3.4	47.8	3.0
400 ng/g_2	81.6	47.1	87.3	47.4	86.7	50.6				
400 ng/g_3	82.1	47.4	86.3	46.8	89.6	47.8				
800 ng/g_1	94.2	50.9	94.1	46.6	94.1	50.8	93.2	2.8	48.9	5.6
800 ng/g_2	94.2	50.9	91.5	45.3	96.4	48.8				
800 ng/g_3	95.0	51.3	91.5	45.3	87.7	50.4				

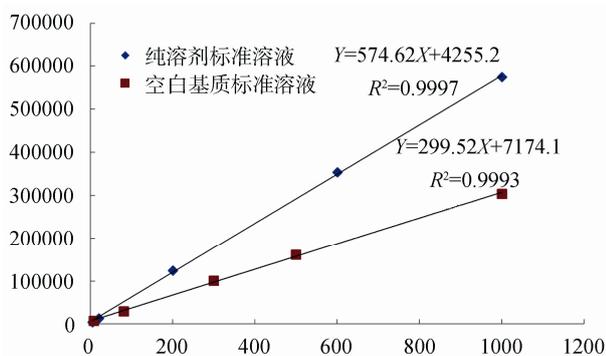


图 3 纯溶剂标准曲线与空白基质标准曲线图
Fig. 3 Calibration curves in solvent and in matrix

可知, 新改进方法的相对回收率在定量限 20 ng/g 的加标量下为 81.0%~90.1%, 在 400 ng/g 的加标量下为 81.6%~89.6%, 在 800 ng/g 的加标量下为 87.7%~96.4%。三种加标浓度下的相对标准偏差在 2.8%~5.6%之间。实验结果表明该方法具有良好的精密度和重现性。

4 结论

本研究建立了一种快速灵敏并且成本低廉的检测河豚中 TTX 的 LC-MS/MS 方法。该方法直接用酸性水溶液对河豚进行提取, 样品不需经过冻干、加热、过 SPE 柱或超滤管等操作, 方便快捷。方法相对回收率在 83.3%~93.2%左右, 绝对回收率为 47.8%~48.9%左右, 最低检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 最低定量限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 远低于限量标准。以往虽有方法直接采用含乙酸的乙腈提取, 沉淀蛋白后进样, 但主要是用于尿液与血液等这类基质影响较小的体液样品, 对于鱼肉等复杂样品仍需经过多种前处理步骤^[17]。新建方法操作简单, 可以大大节省样品处理的时间, 并通过回收率实验验证了该方法的重现性与精密度, 同时在保证高灵敏度的条件下, 降低了实验成本, 非常适合于大批量的对水产品中 TTX 进行的定量测定, 是一种非常实用的食品安全检测手段。

参考文献

- [1] Tsuda K, Tachikawa R, Tamura C, *et al.* On structure of tetrodotoxin [J]. *Chem Pharm Bull*, 1964, (12): 642.
- [2] Noguchi T, Arakawa O. Tetrodotoxin - distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication [J]. *Mar Drugs*, 2008, (6): 220–242.
- [3] 陈素青, 任雷鸣. 河豚毒素的药理作用及临床应用 [J]. *中国海洋药物* 2001, (6): 50–55
Chen SQ, Ren LM. Pharmacological and Clinical Actions of Tetrodotoxin [J]. *Chin J Marine Drugs*, 2001, (6): 50–55
- [4] 许亮亮. 河豚毒素的毒性控制和应用前景 [J]. *化学教学*, 2008, (8): 43–45.
XU LL. Toxicity control and application prospects of tetrodotoxin. [J]. *Educ Chem*, 2008, (8): 43–45
- [5] 李勤, 华元渝. 暗纹东方鲀肝脏热去毒效果的研究 [J]. *水产养殖*, 1999, (6): 17–19.
Li Q; Hua YY. A study on the effect of getting rid of Taifugu obscurus's liver toxin by heating [J]. *J Aquaculture*, 1999, 6: 17–19.
- [6] Nzouheth JK, Campbell K, Barnes P. *et al.* Comparison of sample preparation methods, validation of an UPLC–MS/MS procedure for the quantification of tetrodotoxin present in marine gastropods and analysis of pufferfish [J]. *Food Chem*, 2013, (136): 1584–1589.
- [7] Jen HC, Lin SJ, Tsai YH. *et al.* Tetrodotoxin poisoning evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(1): 95–100.
- [8] Fong BMW, Tam S, Tsui SH. *et al.* Development and validation of a high-throughput double solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of tetrodotoxin in human urine and plasma [J]. *Talanta*, 2011, (83): 1030–1036.
- [9] Nunez MT, Fishcher S, Jaimovich E. A fluorimetric method to determine tetrodotoxin [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1–2): 320–325.
- [10] Chen XW, Liu HX, Jin YB. *et al.* Separation, identification and quantification of tetrodotoxin and its analogs by LC–MS without calibration of individual analogs [J]. *Toxicon*, 2011 (57): 938–943.
- [11] Willams BL, Caldwell RL. Intra-organismal distribution of tetrodotoxin in two species of blue-ringed octopuses (*Hapalochlaena fasciata* and *H. lunulata*) [J]. *Toxicon*, 2009, (54): 345–353.
- [12] Willams BL, Stark MR, Caldwell RL. Microdistribution of tetrodotoxin in two species of blue-ringed octopuses (*Hapalochlaena lunulata* and *Hapalochlaena fasciata*) detected by fluorescent immunolabeling [J]. *Toxicon*, 2012 (60): 1307–1313.
- [13] Yamashita MY, 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): 257–264.
- [14] Yasumoto T, Michishita T. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography [J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(10): 271–273.
- [15] Cho HE, Ahn SY, Son IS *et al.* Determination and validation of tetrodotoxin in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectroscopy and its application [J]. *Forensic Sci Int*, 2012, (217): 76–80.
- [16] McNabb P, Selwood AI, Munday R. Detection of tetrodotoxin from the grey side-gilled sea slug - *Pleurobranchaea maculata*, and associated dog neurotoxicosis on beaches adjacent to the Hauraki Gulf, Auckland, New Zealand [J]. *Toxicon*, 2010, (56): 466–473.
- [17] 张秀尧, 蔡欣欣. 亲水液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测尿液和血浆中河豚毒素 [J]. *分析化学*, 2009(12): 1829–1833.
Zhang XY, Cai XX. Rapid detection of tetrodotoxin in human urine and plasma by Hydrophilic interaction liquid chromatography- triple quadrupole mass spectrometer [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009(12): 1829–1833.
- [18] Do H, Kogure K, Imada C. *et al.* Tetrodotoxin production of actinomycetes isolated from marine sediment [J]. *J Appl Bacteriol*. 1991(70):464–468.
- [19] Matsumura K. A monoclonal antibody against tetrodotoxin that reacts to the active group for the toxicity [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1995, 293: 41–45.
- [20] Xu QH, Zhao XN, Wei CH. *et al.* Immunologic protection of anti-tetrodotoxin vaccines against lethal activities of oral tetrodotoxin challenge in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(7–8): 1213–1224.
- [21] Alcaraz A. Analysis of tetrodotoxin [J]. *Forensic Sci Int*, 1999, 99: 35–45.
- [22] Tatsuno R, Shikina M, Soyano K *et al.* Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the female goby *Yongeichthys criniger* [J]. *Toxicon*, 2013, (63): 64–69
- [23] Huang HN, Lin J, Lin HL. Identification and quantification of tetrodotoxin in the marine gastropod *Nassarius* by LC–MS [J]. *Toxicon*, 2008, (51): 774–779.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



吴佳俊, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为藻毒素分析及毒理研究。
E-mail: jjajunwu@cityu.edu.hk



陈荔, 博士, 研究员, 主要研究方向为藻毒素合成机制及对生态系统的影响。
E-mail: leochan@cityu.edu.hk