

河鲀中河鲀毒素检测研究进展

刘铭丽^{1,2}, 孔聪^{1,3*}, 杨光昕¹, 沈晓盛¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部水产品质量安全风险实验室(上海), 上海 200090;
2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 3. 上海市法医学重点实验室, 司法鉴定科学研究院, 上海 200063)

摘要: 河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)是一种毒性极强的天然小分子生物碱, 无特效解毒剂, 中毒潜伏期短, 在水产品质量安全领域受到极大关注。本文总结了河鲀毒素的毒性、相关法规、化学性质和反应特点, 并对河鲀毒素检测过程中样品前处理以及检测方法进行了总结, 并详细综述了河鲀毒素常用的生物检测法、液相色谱荧光检测法、气相色谱串联质谱法、液相色谱串联质谱检测法和免疫及电化学检测方法应用情况, 尤其对免疫检测与电化学技术结合的方法进行了分类分析。最后, 本文分析了免疫分析过程中竞争型和非竞争型免疫的区别与优缺点, 并对新型电化学免疫快速检测的方法开发进行了展望, 以期对检测 TTX 等小分子化合物的新型检测技术的开发提供参考。

关键词: 河鲀毒素; 水产品; 食品有害物质检测; 生物毒素; 免疫电化学检测

Research progress of tetrodotoxin detection in pufferfish

LIU Ming-Li^{1,2}, KONG Cong^{1,3*}, YANG Guang-Xin¹, SHEN Xiao-Sheng¹

(1. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Fishery Sciences, East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai 200090, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Academy of Forensic Science, Shanghai 200063, China)

ABSTRACT: Tetrodotoxin (TTX) is a highly toxic natural molecule alkaloid with no special antidote and short incubation period. It has attracted great attention in the field of aquatic product safety. In this review, the toxicity, related laws and regulations, chemical structure and properties, and its reaction property of tetrodotoxin were summarized. Furthermore, the development of sample pretreatment method for various detection techniques was introduced. The review also detailed the technology of common bioassay, liquid chromatography with fluorescence detection, gas chromatography-tandem mass spectrometry, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, as well as the rapid immunoassay, and the electrochemical method. In particular, the various electrochemistry involved immunoassay were categorized and compared in detail. Finally, the differences, advantages and disadvantages of competitive and non-competitive immunoassay were elaborated and the new electro-immunoassay for TTX was proposed in order to provide a possible strategy for the detection of TTX and other small molecules.

KEY WORDS: tetrodotoxin; aquatic product; harmful residue detection of food; biotoxin; electrochemical immunoassay

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701698)、上海市法医学重点实验室(司法鉴定科学研究院, 开放课题)(KF1910)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31701698), Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine (Academy of Forensic Science) (KF1910)

***通讯作者:** 孔聪, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量安全与风险评估。E-mail: kongcong@gmail.com

***Corresponding author:** KONG Cong, Ph.D, Research Assistant, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.300, Jungong Road, Yangpu District, Shanghai 200090, China. E-mail: kongcong@gmail.com

1 引言

河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)为氨基全氢喹啉型化合物, 分子式为 $C_{11}H_{17}N_3O_8$, 分子量 319.27, 是一种毒性极强的小分子非蛋白类神经毒素, 存在于河鲀鱼等鲀科鱼类、织纹螺(*Nassariidae*)、蝾螈(*Cynops*)、斑足蟾(*Atelopus*)等动物体内^[1]。河鲀鱼体内 TTX 主要存在于鱼体内脏(包括卵巢、脾脏、肝脏、肠胃等)及血液等, 不同河鲀鱼种类和季节性变化是导致其含量差异的主要因素。TTX 对人体的毒性比氰化钠强 1250 倍^[2], 中毒潜伏期短, 且无特效解毒药, 被摄入吸收后可高亲和性阻断神经细胞膜上的 Na^+ 通道, 主要表现为神经中枢和神经末梢麻痹, 呼吸困难, 腹痛腹泻。

日本现行的《食品卫生法》规定了允许食用的河鲀鱼品种及部位、养殖、专业处理方法和操作人员要求等, 并根据不同地域的差别修改细则, 从整体上完善河鲀鱼管理办法和标准^[3,4]。韩国水产品管理法规中规定了河鲀鱼肉和皮中的 TTX 含量不得超过 10 MU/g, 并对从中国进口的河鲀鱼在品种、产品类型和合格证书等方面作出特殊规定^[5]。1990 年, 我国卫生部颁布的《水产品卫生管理办法》中禁止河鲀鱼流入市场, 2010 年该禁令被解除。2011 年国家食品药品监督管理局规定严禁任何餐饮服务提供加工制作鲜河鲀鱼, 2016 年原农业部和国家食品药品监督管理局决定有条件放开养殖红鳍东方鲀(*Takifugurubripes*)和养殖暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)加工经营, 规定河鲀产品的 TTX 含量不得高于 2.2 mg/kg^[6]。

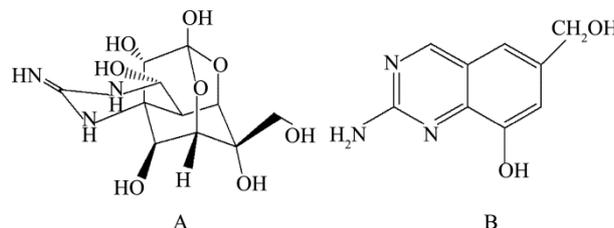
TTX 的产生及在河鲀鱼体内的积累传递机制尚不明确, 由于 TTX 毒性极高, 且缺乏快速有效的救治措施, 需对 TTX 进行准确定性定量, 因此开发多种检测技术极为重要。本文围绕 TTX 的性质结构、样品前处理方法、常用检测技术和新型检测技术对比展望 4 个方面进行综述, 对 TTX 快速检测及痕量分析方法进行了总结探讨, 以期为今后河鲀鱼等水产品质量监管和 TTX 及小分子免疫电化学检测方法开发提供思路。

2 TTX 性质及结构

TTX 无臭无味, 微溶于水, 溶于醇和酸性水溶液, 不溶于其他有机溶剂, 在强碱或强酸溶液中易破坏活性^[7]。TTX 部分衍生物如 1-Hydroxy-5, 11-dideoxytetrodotoxin、5,11-dideoxy-TTX 等也有一定毒性, 已在织纹螺和蝾螈等体内检出^[8]。基于 TTX 影响神经肌肉细胞膜阻断兴奋传导的特性, 可作为神经生理学和肌肉生理学的研究工具, 应用于局部麻醉剂、止痛剂、镇静剂、抗癌药、降压药等药物研究, 在医学领域发挥作用^[9-11]。

TTX 结构如图 1a 所示, 具有胍基、羟基、半糖酸内

酯等特征性结构, 由于胍基与氮原子质子化带正电荷, 正碳酸被离解为阴离子, 化合物整体呈电中性, 是一种特殊的内盐有机化合物^[12]。TTX 化学性质稳定, 在日光下曝晒 20 d 或高浓度盐环境 30 d 仍不能完全去除毒性, 而 90~100 °C 下在 5% KOH 溶液中可加热分解为 2-氨基-6 羟甲基-8 羟基-喹啉^[13](C_9 碱, 黄色结晶, 图 1b)。



注: a 河鲀毒素化学结构^[12], b 河鲀毒素在碱性溶液中分解后的 C_9 碱结构式^[13]。

图 1 结构式

Fig.1 Structural formula

3 样品前处理技术

TTX 不溶于有机溶剂, 极易溶于乙酸水溶液, 对酸作用稳定, 前处理中常用乙酸-甲醇溶液或乙酸水溶液提取样品组织中的 TTX。免疫亲和柱(immunoaffinity column, IAC)具有特异性选择识别功能, 专一性强, 与固相萃取柱相比有更好的吸附净化效果。严忠雍等^[14]对比了 MCX 柱、SCX 柱、 C_{18} 柱和免疫亲和柱对 TTX 回收率的影响, 结果表明经免疫亲和柱净化的样品在液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)下的目标峰易与杂峰分离, 回收率较高, 提高了方法精密度和灵敏度。

在实际研究中的净化处理阶段, 固相萃取柱的选择可随样品进行调整优化, 如孙博伦等^[15]采用羧基化和羟基化多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotube, MWCNTs)对织纹螺样品溶液净化洗脱, 并与 MCX 和 WCX 固相萃取柱吸附净化效果对比, 发现多壁碳纳米管小柱有较大上样量, 对样品溶液中的 TTX 吸附能力较强, 可减少淋洗过程中 TTX 的损失, 将 TTX 完全洗脱后过膜可直接上机检测。在样品前处理中, 以乙酸作为主要酸性提取剂和免疫亲和柱净化的方法经不断优化, 已成为目前广泛使用的方法, 快速有效提取生物样品中的 TTX。样品中河鲀毒素常用前处理技术对比见表 1。

4 TTX 检测技术

4.1 生物检测法

生物检测法主要是小鼠生物检测法。日本官方最早用此法来检测 TTX, 该方法通过对小鼠腹腔注射 TTX, 出现

表 1 河鲀毒素样品常用前处理技术
Table 1 Pretreatment technique for tetrodotoxin samples

检测技术	提取方法	优点	缺点	前处理时间	参考文献
小鼠生物法	0.5%乙酸萃取, 二次煮沸辅助提取, 高速离心, 收集上清液	高浓度乙酸、二次煮沸和高速离心有利于 TTX 溶出	样液中可能存在其他有毒物质, 提取溶剂对可能影响小鼠的生理反应	1.5 h	[16] [17]
LC-MS/MS	1%乙酸-甲醇萃取, 水浴加热取上清液, 免疫亲和柱净化洗脱, 氮吹复溶	可净化、富集待测物, 获得纯净样品, 降低基质效应	前处理过程较复杂, 耗时较长, 免疫亲和柱成本较高	2.5 h	[16]
液相色谱-荧光检测法				3 h	[16]
酶联免疫吸附测定 (enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)	0.1%乙酸溶液煮沸提取, 乙醚脱脂, 调 pH 至 6.5~7.0, PBS 稀释定容	弱酸性缓冲液环境有利于抗原抗体的特异性结合	样液中可能存在 TTX 衍生物或类似物与抗体反应	1.5 h	[16]
胶体金免疫层析 (gold immunochromatography assay, GICA)	0.1%乙酸溶液加热煮沸提取, 高速离心收集上清液	提取步骤简单省时, 成本较低		40 min	[42]

TTX 中毒典型症状后记录小鼠的死亡时间来计量检测^[18]。张理等^[19]对比了北京 ICR 小鼠和昆明小鼠对 TTX 的敏感度和 TTX 剂量与死亡时间的关系, 结果表明北京 ICR 小鼠对 TTX 较为敏感, 2 种小鼠的死亡时间在 5~8 min 内变量关系最佳, 与日本 ddy 系小鼠和台湾 ICR 小鼠的比较结果符合良好。纪元等^[20]应用小鼠检测法对不同地域、不同品种的养殖河鲀鱼进行 TTX 测定, 同时应用 ELISA 试剂盒进行大规模监测, 发现两者相关性显著, 结果一致性较高, 但检测原液中的无机盐、疏水氨基酸和 TTX 衍生物等会影响 TTX 的相对毒性, 造成偏差, 应尽量减少提取液中无关基质的影响。小鼠生物法是目前国内外常用的标准检测方法, 实验现象直观, 实验数据易得, 但前处理较复杂, 且需消除个体差异带来的影响, 减少样品基质效应, 且检出限较高, 耗时较长, 不可区分 TTX 类似物, 不适合快速检测应用, 检测结果一般作为参考, 阳性及定量结果仍需进一步确认。

4.2 色谱法

4.2.1 薄层色谱法

薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)适合较高浓度 TTX 检测, 操作方便, 显色较快, 分辨力较高^[21]。林乐明等^[22]建立的板上碱反应/薄层色谱荧光扫描法实现了对 TTX 的定量测定, 荧光强度与 TTX 含量线性关系良好, 可实现的最小检测量为 40 ng。岳田芳^[23]对林乐明等建立的薄层色谱扫描法进行了优化, 以海藻希瓦氏菌(*Shewanella alga*)为研究对象, 测定发酵产物中菌体和菌液的色谱斑点的吸光度, 利用 C₉碱的吸光度与浓度的线性方程计算样品浓度。TLC 方法适用于检测相对含量较高的 TTX 样品, 仅在微生物发酵产 TTX 粗提物的定性研究中有所应用, 在河鲀中 TTX 的检测应用仍需验证。

4.2.2 液相色谱荧光检测法

TTX 本身无荧光性, 可利用 C₉碱的荧光特性对 TTX 定量^[24]。另外辛少平等^[25]对液相色谱荧光检测法(liquid chromatography with fluorescence detection, LC-FLD)进行了优化, 建立了一种新型柱前衍生-高效液相荧光检测方法。TTX 在一定温度的稀碱环境下与次溴酸钠和尿素反应生成一种新的荧光产物, 该方法降低了假阳性率, 方法检出限为 20 μg/kg, 相比国标检出限降低了 60%, 同时可结合紫外测定法^[26]提高实验结果的准确性和稳定性。郑典元^[27]比较了小鼠生物检测法和荧光光度法, 发现 2 种方法均有较高的准确性。然而液相色谱荧光检测法对基质的要求较高, 结果易受其他荧光杂质干扰, 且对 TTX 的类似物不具有分辨能力, 在实际定性及定量检测应用中应谨慎选择。

4.2.3 液相色谱-质谱联用法

液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)可实现高通量和痕量分析, 具有高信噪比和高灵敏度等特点^[28]。王智等^[29]建立的 TTX 超高效液相色谱-串联质谱(ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)分析方法, TTX 含量在 2~200 ng/mL 内线性关系良好, 方法定量限为 10 μg/kg, 加标回收率在 71.2%~102%之间, 适用于水产品批量抽检的快速分析。吴佳俊等^[30]建立的 UPLC-MS/MS 方法在 5~1000 ng/mL 范围内线性关系良好, 检出限为 5 μg/kg, 回收率为 83.3%~93.2%。Knutsen 等^[31]用 LC-MS/MS 法测定了欧洲水域内腹足类和双壳类海洋生物中 TTX 及其类似物的含量, 检出限介于 0.1~25 μg/kg。Nzoughet 等^[32]建立的 UPLC-MS/MS 方法比高效液相色谱-串联质谱法分离时间短, 提供更高的分离效率和分辨率, 检出限为 1.46 ng/mL, 并获得较好的回收率(80%~92%)。基于 LC-MS/MS 得出的 TTX 检出限数量级较低, 回收率较

高, 对 TTX 类似物具有较好的分辨力, 普遍适用于 TTX 确证及痕量分析。

4.2.4 气相色谱-串联质谱法

气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS)以分析气体和挥发性有机物为主, TTX 本身对热稳定, 不易挥发, 一般将其碱解生成 C₉碱或其衍生物, 利用衍生物性质进行 GC-MS 检测。Che 等^[33]建立的方法前处理中用乙酸提取横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*)、月尾兔头鲀(*Lagocephalus lunaris*)和绿河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)样品中的 TTX, 60 °C 下 MSTFA 衍生 30 min 后进行 GC-MS 检测, 方法检出限为 1.34~1.71 μg/g, 检测时间 8.2 min, 与小鼠检测法(0.44~14.74 μg/g)和 LC-MS/MS(1.64 μg/g)相比, 稳定性更好, 检出限更低, 且精密度较高, 前处理中溶剂和衍生剂用量较少, 可满足 TTX 常规检测需求。然而, 相对于液质法, 该方法需要衍生, 对 TTX 类似物不具备分辨能力, 在应用中需考虑以上因素。

4.3 免疫快速检测法

4.3.1 酶联免疫吸附检测法

酶联免疫吸附检测法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是目前广泛使用的免疫学分析方法之一, 有双抗体夹心法^[34]、竞争法^[35]、间接法^[36]、捕获法^[37]等多种检测方式, 以此为基础的 ELISA 检测试剂盒技术较成熟, 广泛投入商业应用^[38,39]。

GB 5009.206-2016 中的 ELISA 方法通过酶标二抗对 TTX 定量的灵敏度和准确性更高, 操作和使用更加经济便捷。Lai 等^[40]建立的对 TTX 的磁酶联免疫吸附法(magnetic enzyme linked immunosorbent assay, mELISA)以单层二硫醇固定在马来酰亚胺板上, 有利于抗原和抗体的特异性结合, 方法检出限为 2.28 ng/mL, 与等离子体共振免疫传感器(surface plasmon resonance, SPR)、先前建立的 mELISA 2 种免疫学工具和 LC-MS/MS 比较得出的实验结果相关性良好。董雪等^[41]建立的单克隆抗体的直接竞争 ELISA 优化了反应时间和温度、包被单抗和酶标抗原的工作液浓度以及包被方法, 检出限为 1.1 μg/L, 实现了 TTX 快速检测。对 TTX 的 ELISA 检测手段经不断优化实现了低检出限和高灵敏度, 在检测时间和检测便宜性具有很好的优势, 可满足较大样本量的检测需求, 但需注意此方法仅作为定性和初步定量使用, 仍需考虑 TTX 类似物干扰及其定量准确性等因素。

4.3.2 胶体金免疫层析检测法

基于胶体金免疫层析检测法(gold immunochromatography assay, GICA)开发的 GICA 层析试纸条将配体固定于微孔薄膜, 用胶体金标记另一配体并固定, 阳性样品通过毛细管作用泳动至胶体金标记处, 待检测受体发生反应形成免疫复合物并在线状包被区富集, 显示

为红色, 游离的胶体金可通过检测带并与标记物自动分离, 完成检测过程。苏捷等^[42]设计的 TTX 胶体金层析快速检测卡的半定量分析检出限为 100 ng/mL, 检测时间 5~12 min, 与小鼠检测法对比结果在检测卡规定范围内。该检测卡保质期长(12 个月), 单次进样量较小(0.5 g), 对提高免疫层析技术的实用性和普及性有重要意义。Ling 等^[43]制备出稳定的抗 TTX 的单克隆杂交瘤细胞 5B9, 将抗体纯化后分别建立竞争 ELISA 和 GICA 实验方法, 检出限分别为 4.44 ng/mL 和 20 ng/mL。方法中的胶体金试纸条可在 10 min 内对 TTX 定性检测。该方法与 ELISA 方法具有类似的优缺点, 但时间响应更短和操作更快捷, 可作为 TTX 的快速检测方法。

4.4 电化学检测技术

4.4.1 电化学免疫传感器

ELISA 特异性强, 设备要求简单, 最终的判定结果依靠光学检测方法, 需避免温度、时间等因素干扰。TTX 的电化学检测方法以 ELISA 中的免疫反应为基础, 通过构建电化学免疫传感器, 将识别元件(抗原或抗体)固定在电极界面上, 转换信号为电化学信号进行下一步分析。Neagu 等^[44]首次提出了碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)在 TTX 检测的免疫传感器中的开发应用, 利用 ALP 标记抗原, 参考 ELISA 直接竞争法建立 TTX 电化学方法, 在丝网印刷电极界面组装免疫传感器, 并用微分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)测试, 所得结果在 2~50 ng/mL 线性关系较好, 检出限为 1 ng/mL。Kreuzer 等^[45]将 TTX-BSA 复合物组装于丝网印刷电极上, 在 ALP 存在的溶液中通过直接竞争法进行测定, 所得检出限为 16 ng/kg, 检测时间 35 min。Zhang 等^[46]经优化建立的新型碳复合电极的电流型免疫传感器与玻碳电极(glassy carbon electrode, GCE)相比, 结合了单壁碳纳米管和离子液体的优点, 以磁性颗粒固定抗原, 参考 ALP 的 ELISA 测定方法, 实现了以电流型电化学免疫传感器对 TTX 的定量检测, 检出限为 5 ng/mL, 检测时间 20 min。电化学免疫传感器可以实现 TTX 检测中高灵敏度需求, 且检测耗时较短, 其开发尚在研究阶段, 实际应用仍有较大发展空间, 目前并未出现成熟市场化的产品。

4.4.2 电化学发光免疫传感器

某些化学物质经电极界面激发后, 完成较高能量电子从激发态向基态转移时光辐射的能量释放过程, 此过程与免疫分析结合组成了特异性识别的光信号响应, 成为电化学发光免疫传感器, 通用发光物质为鲁米诺以及三联吡啶钌体系($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)。刘媛等^[47]利用 Nafion-Ru(bpy)₃²⁺-AuNPs 复合膜修饰 GCE, 构建了对 TTX 的标记的自增强电化学发光免疫传感器, 检测结果在 0.01~1000 μg/L 内线性关系良好, 最低检出限为 10 ng/mL, 重现性较好。Shang 等^[48]以聚醚酰亚胺功能化石墨烯修饰

GCE, 结合捕获探针 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 固定一抗, 经 Luminol-AuNPs 标记的二抗与 TTX 结合, 形成双抗体夹心复合物, 组建超灵敏电化学发光免疫传感器, 检出限为 0.01 ng/mL, 方法稳定性强, 可实现痕量 TTX 检测。电化学发光传感器相比电化学传感器提高了稳定性, 重现性较好, 然而该传感器对仪器有一定依赖, 在便携式、低成本的配套仪器开发及实际应用传感器的开发上仍有很大空间。

以上几种河鲀毒素检测技术要点及方法比较见表 2。

4.5 光电化学免疫传感器

光电化学检测基于光电化学传感器的光诱导电子在界面转移过程开发, 设备简易, 响应迅速, 灵敏度较高。与电化学检测相比, 光电化学传感器的光激发和电化学检测

方式相互独立, 可获得更高的灵敏度和信噪比^[49]。光电化学检测技术多以免疫识别过程为前提, 通过特异结合影响光电化学界面上变化的信号进行分析检测, 构建光电化学免疫传感器。

目前, 基于 TTX 痕量分析的光电化学研究方法还处于开发阶段, 针对 TTX 小分子检测构建的光电化学免疫传感器, 需达到高信号强度、高介电特性等要求, 需找到合适的转换纳米材料和修饰方法。半导体量子点(quantum dots, QDs)的生物相容性、高催化特性和表面修饰能力可作为构建光电化学免疫传感器基底的条件, 将化学反应信号转换为稳定的光电流信号^[50]; 生物素-亲和素识别体系可作为免疫探针与 TTX 抗原抗体复合物偶联介质。例如, 有

表 2 河鲀毒素检测方法及技术特点
Table 2 Detection method and technical characteristics of tetrodotoxin

名称	原理及技术要点	优点	缺点	检出限	检测时间/单样	参考文献
小鼠生物法	对小鼠腹腔注射, 死亡时间的判定条件	实验现象直观, 满足灵敏度要求, 回收率较高	个体差异不易控制, 检出限较高, 不能准确定性, 不区分类似物	0.68 mg/kg	5~10 min	[16] [17]
LC-MS/MS	TSK-gel Amide-80 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 3 μm); 0.1% 甲酸水溶液 (11:9,V/V)-乙腈, 梯度洗脱	分离度较好, 检出限较低, 可准确定量, 回收率较高, 分析时间较短	仪器要求较高, 成本较高, 需降低基质效应	5 μg/kg	20 min	[29]
	GelAmide-80 色谱柱(150 mm×2 mm, 5 μm); 0.1%甲酸(5 mmol/L 乙酸铵)-乙腈, 梯度洗脱			3 μg/kg	20 min	[16]
液相色谱-荧光检测法	Agilent TC-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 50 mmol/L 磷酸氢二铵	利用 TTX 碱解产物 C ₉ 碱的荧光特性, 经换算对 TTX 定量	检测结果易受其他荧光杂质干扰, 不区分类似物	20 μg/kg	20 min	[25]
ELISA	间接竞争 ELISA, 固相抗原 (TTX-BSA、TTX-KLH) 和待测 TTX 与 IgG 单克隆抗体竞争性结合, 经酶标二抗标记, 加入底物显色	设备要求简单, 特异性强, 商业应用率高	依靠光学检测, 需避免温度和时间等因素干扰, 不区分类似物	4.44 ng/mL	1 h	[43]
GICA	制备试纸条(胶体金标记的抗 TTX 单克隆抗体), 将样液转移到纤维膜上反应显色	进样量较小, 使用方便, 显色时间短, 保存期较长	检出限一般高于 ELISA, 需避免交叉反应, 不区分类似物	20 ng/mL	10 min	[43]
电化学检测	以磁性微粒固定抗原, 建立新型碳复合电极, 构建电流型电化学免疫传感器, 在碱性磷酸酶存在的溶液中扫描电信号	灵敏度高, 重复性好, 稳定性强, 体积小, 制作简单, 易于表面修饰	传感器寿命较短, 对温度、pH 等条件敏感, 不区分类似物	5 ng/mL	20 min	[46]
	Nafion-Ru(<i>bpy</i>) ₃ ²⁺ -AuNPs 复合膜修饰 GCE, 构建免标记自增强电化学发光免疫传感器, [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 溶液中扫描电信号			10 ng/kg	/	[47]

机半导体材料中的钉联吡啶配合物($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)等通过生物素-亲和素识别体系在光电界面上结合, 产生放大的光电信号^[51]; 基于生物催化沉积原理, 将 QDs 修饰在电极界面改善界面的光吸收特性, 并基于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶类标记抗原抗体复合物, 催化底物分子转化为电活性产物, 可构建高转化效率的光电化学免疫传感器^[52]。与电化学发光免疫传感器相比, 光电化学免疫传感器在信号增强、检测限提高、检测快速、抗干扰等方面具有优势, 在相关仪器开发、增强材料、光电响应材料应用等领域具有很好的研究价值。

5 TTX 检测方法的总结与展望

目前通用的小鼠生物法、液相色谱-荧光检测法、液相色谱-串联质谱法和免疫分析法是检测 TTX 的标准方法。免疫分析法制备抗体的稳定性和保存期限存在不足, 需避免交叉反应^[53]; 小鼠生物法虽稳定可靠, 但易受个体差异影响, 重现性不高, 难以定性; LC-MS/MS 等仪器分析法降低了检测限, 提高了灵敏度, 由于仪器需求, 检测工作更适合在实验室展开; 基于抗原抗体高特异性结合的免疫学分析法操作简单, 适合大量样本初筛, 在 TTX 的检测领域具有广泛的应用前景。

TTX 属于小分子抗原, 一般不可与多个抗体结合, 在 ELISA 和 GICA 中多选用直接竞争或间接竞争法进行分析, 所得识别信号一般与 TTX 含量负相关, 不利于 TTX 痕量检测。与竞争分析法相比, 非竞争分析法多适用于大分子抗原, 过量抗体加速抗原抗体的特异性结合, 形成免疫复合物, 最终信号与目标物含量正相关, 灵敏度更高, 并扩大检测线性范围^[54]。目前已有对小分子半抗原的非竞争性酶免疫分析研究, 如化学发光免疫法^[55], 小分子肽的异双位点复合物转移免疫法, 开放式夹心免疫分析法和基于生物素亲和素体系的双位点夹心法等^[56]。长远来看, TTX 检测的发展方向可分为 2 大类, 一是以液质联用为主的仪器分析法, 因样品中蛋白质和脂肪含量较高, 需排除基质干扰, 结合免疫亲和柱等步骤优化净化条件, 实现准确定性定量; 二是基于免疫分析的快速检测方法, 包括 ELISA 和 GICA 等成熟方法, 以及与电化学结合的新型检测技术。建立小分子非竞争分析法, 解决小分子半抗原与抗体结合位点受限的问题, 或通过抗原抗体复合物的有效分离来建立小分子化合物与中介复合物的定量关系, 从而构建非竞争型免疫分析方法。通过光学、电化学、电化学发光、光电化学等方式进行非竞争识别信号的检测, 可缩短检测时间, 提高反应速率, 降低检测限, 将更适用于快速简易、高灵敏度、低成本筛查, 为水产品中 TTX 等小分子化合物的检测技术提供研究价值。

参考文献

- [1] Lago J, Rodriguez 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.
- [2] Cohen NJ, Deeds JR, Wong ES, *et al.* Public health response to puffer fish (tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product [J]. *J Food Prot*, 2009, 72(4): 810–817.
- [3] 陈永祥, 陈锐, 王永芳, 等. 日本河豚鱼管理概况[J]. *中国卫生监督杂志*, 2011, 18(4): 313–316.
Chen YX, Chen R, Wang YF, *et al.* Overview of puffer fish management in Japan [J]. *Chin J Health Insp*, 2011, 18(4): 313–316.
- [4] Ministry of health and welfare of Japan. Food hygiene inspection guidelines [M]. Tokyo: Japan Hygiene Association, 2005.
- [5] 王霓霓, 林伟. 韩国食品安全法规标准汇编[M]. 中国标准出版社, 2012.
Wang NN, Lin W. Compilation of Korean food safety regulations [M]. Standards Press of China, 2012.
- [6] 农业部办公厅国家食品药品监督管理总局办公厅关于有条件放开养殖红鳍东方鲀和养殖暗纹东方鲀加工经营的通知[J]. *中华人民共和国农业部公报*, 2016, (10): 20–21.
The ministry of agriculture, notice of ministry of the China food and drug administration on conditionally releasing the processing and management of cultured redfin oriental flycatcher and cultured oriental flycatcher [J]. *Bull Ministry Agric People's Republic of China*, 2016, (10): 20–21.
- [7] Hanifin, Charles T. The chemical and evolutionary ecology of tetrodotoxin (TTX) toxicity in terrestrial vertebrates [J]. *Mar Drugs*, 2010, 8(3): 577–593.
- [8] Hwang, Pai-An, Noguchi T, *et al.* Neurotoxin tetrodotoxin as attractant for toxic snails [J]. *Fish Sci*, 2010, 70(6): 1106–1112.
- [9] Horstick EJ, Tabor KM, Jordan DC, *et al.* Genetic ablation, sensitization, and isolation of neurons using nitroreductase and tetrodotoxin-insensitive channels [J]. *Method Mol Biol*, 2016, 1451: 355–366.
- [10] Nakamura M, Jang IS. Acid modulation of tetrodotoxin-resistant Na^+ channels in rat nociceptive neurons [J]. *Neuropharmacol*, 2015, 90: 82–89.
- [11] Rafael GC, Miguel T, Antonia AC, *et al.* Effects of tetrodotoxin in mouse models of visceral pain [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(6): 188.
- [12] Hinman A, Bois JHD. A stereoselective synthesis of (–)-tetrodotoxin [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(38): 11510–11511.
- [13] 柳洁, 丁文婕, 何碧英, 等. 血浆中河豚毒素的衍生气相色谱质谱分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(14): 2880–2882.
Liu J, Ding WJ, He BY, *et al.* Determination of tetrodotoxin in plasma using gas chromatography/mass spectrometry after derivatization [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2013, 23(14): 2880–2882.
- [14] 严忠雍, 张小军, 李奇富, 等. 免疫亲和柱净化-液相色谱-串联质谱法测定海洋生物中河豚毒素[J]. *分析化学*, 2015, 43(2): 277–281.
Yan ZY, Zhang XJ, Li QF, *et al.* Determination of tetrodotoxin in marine organisms by high performance liquid chromatography-mass spectrometry and cleaned up by immunoaffinity column [J]. *Chin J Anal Chem*, 2015, 43(2): 277–281.
- [15] 孙博伦, 王旭峰, 李来好, 等. 多壁碳纳米管固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定织纹螺中河豚毒素[J]. *南方水产科学*, 2018, 14(5): 103–108.

- Sun BL, Wang XF, Li LH, *et al.* Determination of tetrodotoxin in nassarius by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with multi-walled carbon nanotubes purification [J]. *South China Fish Sci*, 2018, 14(5): 103–108.
- [16] GB 5009.206–2016 食品安全国家标准水产品中河豚毒素的测定[S]. GB 5009.206–2016 National food safety standard–Determination of tetrodotoxin in aquatic products [S].
- [17] 王静, 杨丽君, 李兆杰, 等. 昆明系小鼠生物法定量测定水产品中河豚毒素[J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 181–184.
Wang J, Yang LJ, Li ZJ, *et al.* Quantitative detection of tetrodotoxin using Kunming strain mice [J]. *Food Sci*, 2011, 32(4): 181–184.
- [18] 食品卫生协会(日). 食品卫生检验手册. 理化检验手册[M]. 天津: 天津科技翻译出版社公司, 1993.
Food hygiene association (Japan). Food sanitation inspection manual. Physical and chemical inspection manual [M]. Tianjin: Tianjin Science & Technology Translation & Publishing Corp, 1993.
- [19] 张理, 谢克勤, 赵金山, 等. 用昆明小鼠定量测试河豚毒素的研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(6): 497–500.
Zhang L, Xie KQ, Zhao JS, *et al.* A study on quantitative detection of tetrodotoxin with Kunming strain male mice [J]. *Chin J Food Hyg*, 2004, 16(6): 497–500.
- [20] 纪元, 刘岩, 宫庆礼. 小鼠生物法和酶联免疫法(ELISA)定量监测沿海 5 省养殖河豚鱼中的河豚毒素(TTX)[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 589–597.
Ji Y, Liu Y, Gong QL. Tetrodotoxin quantitative monitoring of cultured pufferfish collected from five coastal provinces in China by mouse method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *J Fish Chin*, 2010, 34(4): 589–597.
- [21] Tu QT, Hieu DN, Tu NHK. Study of tetrodotoxin detection in cultured medium [J]. *IFMBE Proceedings*, 2013, 40: 198–200.
- [22] 林乐明, 敖丽娟, 张军. 河豚毒素的薄层色谱扫描法测定[J]. *色谱*, 1991, (2): 113–116.
Lin LM, Ao LJ, Zhang J. The determination of the tetrodotoxin by in-situ alkaline reaction/thin-layer chromatographic scanning [J]. *Chin J Chromatogra*, 1991, (2): 113–116.
- [23] 岳田芳. 海藻希瓦氏菌发酵产生河豚毒素的提取与检测[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
Yue TF. Extraction and detection of tetrodotoxin produced by *Shewanella* alga [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [24] Nuñez MT, Fischer S, Jaimovich E. A fluorimetric method to determine tetrodotoxin [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1–2): 320–325.
- [25] 辛少平, 岑剑伟, 李来好, 等. 新型柱前衍生-高效液相荧光检测法检测水产品中河豚毒素[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(1): 139–148.
Xin SP, Cen JW, Li LH, *et al.* Identification of tetrodotoxin in aquatic products by a new method using pre-column fluorimetric-derivatization high-performance liquid chromatography [J]. *J Fish Sci Chin*, 2015, 22(1): 139–148.
- [26] 岑剑伟, 李来好, 杨贤庆, 等. 水产品中河豚毒素的高效液相紫外测定法[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 1036–1044.
Cen JW, Li LH, Yang XQ, *et al.* Detection of tetrodotoxin by HPLC–UV in aquatic product [J]. *J Fish Sci Chin*, 2010, 17(5): 1036–1044.
- [27] 郑典元, 夏依依, 丁占平. 河豚毒素生物检测法与荧光光度法的比较研究[J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(7): 1450–1452, 1455.
Zheng DY, Xia YY, Ding ZP. Comparison of bioassay method and fluorescence spectrophotometry in determining tetrodotoxin [J]. *Hubei Agric Sci*, 2012, 51(7): 1450–1452, 1455.
- [28] 关金龙. 高效液相色谱-质谱联用法在分析检测中的运用分析[J]. *机电信息*, 2015, (5): 40–42.
Guan JL. Application of high performance liquid chromatography–mass spectrometry in analysis and detection [J]. *Mech Electr Inform*, 2015, (5): 40–42.
- [29] 王智, 杨洁, 张颖, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定水产加工食品中的河豚毒素[J]. *中国渔业质量与标准*, 2013, 3(3): 39–43.
Wang Z, Yang J, Zhang Y, *et al.* Determination of tetrodotoxin in processed aquatic product by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin Fish Qual Stand*, 2013, 3(3): 39–43.
- [30] 吴佳俊, 黄文雯, 肖陈贵, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测河豚毒素的方法研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(11): 3529–3536.
Wu JJ, Huang WW, Xiao CG, *et al.* Determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(11): 3529–3536.
- [31] Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, *et al.* Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods [J]. *Efsa J*, 2017, 15(4): 4752.
- [32] Nzougheh, Kouassi J, Campbell, *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(3–4): 1584–1589.
- [33] Che NM, Norjuliana MN, Gam LH, *et al.* Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography–mass spectrometry [J]. *J Chromatogra A*, 2010, 1217(47): 7455–7459.
- [34] Zhu L, He J, Cao X, *et al.* Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus cereus* in food [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 16092.
- [35] Zhong QR, Huang AC, Wang B, *et al.* Development of direct competitive ELISA kit for the detection of tetrodotoxin using HRP labeled antigen [J]. *Advan Mater Res*, 2011, 236–238: 2820–2824.
- [36] Pan M, Yang J, Li S, *et al.* Indirect competitive ELISA and colloidal gold-based immunochromatographic strip for amantadine detection in animal-derived foods [J]. *Anal Method*, 2019, 11(15): 2027–2032.
- [37] Wang R, Zeng L, Yang H, *et al.* Detection of okadaic acid (OA) using ELISA and colloidal gold immunoassay based on monoclonal antibody [J]. *J Hazardous Materials*, 2017, 339: 154–160.
- [38] 符俊超, 方伟, 陆慧琼. 探讨简易 ELISA 定性试剂盒的性能验证方法[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, (A1): 141–143.
Fu JC, Fang W, Lu HQ. Performance verification of ELISA EB NA1 IgA antibody kit for qualitative detection [J]. *Int J Lab Med*, 2019, (A1): 141–143.
- [39] Matabaro E, Ishimwe N, Uwimbabazi E, *et al.* Current immunoassay methods for the rapid detection of aflatoxin in milk and dairy products [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2017, 16(5): 808–820.
- [40] Laia R, Iglesias PDL, Vanessa DR, *et al.* Detection of tetrodotoxins in puffer fish by a self-assembled monolayer-based immunoassay and comparison with SPR, LC–MS/MS and MBA [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(21): 10839–10847.
- [41] 董雪, 钟青萍, 黄安诚, 等. 河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研

- 究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 977-981.
- Dong X, Zhong QP, Huang AC, *et al.* Development of a direct competitive ELISA method for tetrodotoxin detection [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2009, 25(8): 977-981.
- [42] 苏捷, 姜琳琳, 吴靖娜, 等. 河豚毒素胶体金免疫层析快速检测试剂盒的应用研究[J]. *渔业研究*, 2013, 35(4): 323-327.
- Su J, Jiang LL, Wu JN, *et al.* Application of immunochromatography test strip for rapid detection of tetrodotoxin [J]. *J Fish Res*, 2013, 35(4): 323-327.
- [43] Ling SM, Chen QA, Zhang YM, *et al.* Development of ELISA and colloidal gold immunoassay for tetrodotoxin detection based on monoclonal antibody [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 71: 256-260.
- [44] Neagu D, Micheli L, Palleschi G. Study of a toxin-alkaline phosphatase conjugate for the development of an immunosensor for tetrodotoxin determination [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385(6): 1068-1074.
- [45] Kreuzer MP, Pravda M, O'Sullivan CK, *et al.* Novel electrochemical immunosensors for seafood toxin analysis [J]. *Toxicon: J Int Soc Toxicology*, 2002, 40(9): 1267-1274.
- [46] Zhang Y, Fan Y, Wu J, *et al.* An amperometric immuno sensor based on an ionic liquid and single-walled carbon nanotube composite electrode for detection of tetrodotoxin in pufferfish [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(36): 6888-6894.
- [47] 刘媛, 王遂. 免标记自增强电化学发光免疫传感器超灵敏检测河豚毒素[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(6): 676-681.
- Liu Y, Wang S. A label-free self-enhanced electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive detection of tetrodotoxin [J]. *J Inst Anal*, 2018, 37(6): 676-681.
- [48] Shang F, Liu Y, Wang S, *et al.* Electrochemiluminescence immunosensor based on functionalized graphene/Fe₃O₄-Au magnetic capture probes for ultrasensitive detection of tetrodotoxin [J]. *Electroanalysis*, 2017, 29(9).
- [49] 赵玉婷, 沈艳飞. 光电化学传感器及其在生物分析中的应用研究进展[J]. *材料导报*, 2017, 31(13): 138-145.
- Zhao YT, Shen YF. Photoelectrochemical sensor and its application in bioanalysis: a review [J]. *Mate Rev*, 2017, 31(13): 138-145.
- [50] Chan WC. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. *Sci*, 1998, 281(5385): 2016-2018.
- [51] Haddour N, Cosnier S, Gondran C. Electrogeneration of a biotinylated poly(pyrrole-ruthenium(II)) film for the construction of photoelectrochemical immunosensor [J]. *Chem Commun*, 2004, (21): 2472.
- [52] 赵伟伟, 马征远, 徐静娟, 等. 光电化学免疫分析研究进展[J]. *科学通报(中文版)*, 2014, 59(2): 122-132.
- Zhao WW, Ma ZY, Xu JJ, *et al.* Progress in photoelectrochemical immunoassay [J]. *Chin Sci Bull (Chin)*, 2014, 59(2): 122-132.
- [53] Bane V, Lehane M, Dikshit M, *et al.* Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection [J]. *Toxins*, 2014, 6(2): 693-755.
- [54] Kobayashi N, Goto J. Noncompetitive immunoassays for small molecules with high sensitivity and specificity [J]. *Adv Clin Chem*, 2001, 36(36): 139-170.
- [55] 杨唐斌, 曾昆, 戴钟铨, 等. 小分子抗原酶免疫分析方法研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(6): 1-6.
- Yang TB, Zeng K, Dai ZQ, *et al.* Research progress in small molecule antigen immunoassay [J]. *J Chin Biotechnol*, 2005, 25(6): 1-6.
- [56] 王亚辉, 李彦伸, 宋丽廷, 等. 小分子化合物非竞争免疫检测方法研究概述[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(2): 113-121.
- Wang YH, Li YS, Song LT, *et al.* A review of non-competitive immunoassays for small molecule compounds [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2017, 36(2): 113-121.

(责任编辑: 王欣)

作者简介



刘铭丽, 硕士研究生, 主要研究方向为河鲀毒素电化学检测。
E-mail: liumngli26@163.com



孔聪, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量安全及风险评估。
E-mail: kongcong@gmail.com