



doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2020.05.012

直接稀释/超高效液相色谱-串联质谱法 测定河豚鱼与织纹螺中2种河豚毒素

王兴龙¹, 蔡强¹, 诸寅¹, 保聪², 桂文锋³, 任一平^{1*}

(1. 浙江清华长三角研究院 分析测试中心, 浙江 嘉兴 314000; 2. 瓦赫宁根大学 海洋动物生态组, 海尔德兰 瓦赫宁根 6708 WD, 荷兰; 3. 上海师范大学 环境与地理科学学院, 上海 200233)

摘要: 建立了直接稀释/超高效液相色谱-串联质谱测定河豚鱼与织纹螺中2种河豚毒素 TTX 和 4, 9-anh TTX 的方法。样品经乙酸-甲醇(1:99)溶液提取, 高速离心, 上清液用 80% (体积分数) 甲醇水溶液稀释和过滤后直接进样分析。以 0.5 mmol/L 甲酸铵的 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液为流动相, 采用梯度洗脱方式在 ACQUITY BEH Amide 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)上分离, 以电喷雾离子源正离子模式 (ESI⁺) 扫描, 多反应监测 (MRM) 模式采集, 外标法定量。TTX 和 4, 9-anh TTX 分别在 0.5~100 μg/L、0.5~50 μg/L 质量浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数(r^2)均大于 0.99, 检出限 (LOD, $S/N \geq 3$) 为 100~150 μg/kg, 定量下限 (LOQ, $S/N \geq 10$) 为 300~450 μg/kg。在河豚鱼、织纹螺基质中, 3 个浓度水平下的加标回收率为 75.4%~96.8%, 日内相对标准偏差 (RSD) 为 2.3%~9.5%, 日间 RSD 为 5.3%~9.2%。该方法简便、高效、节约成本, 适用于河豚鱼、织纹螺中 2 种河豚毒素的快速准确检测。

关键词: 直接稀释; 河豚毒素; 超高效液相色谱-串联质谱; 河豚鱼; 织纹螺

中图分类号: O657.7; TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)05-0640-06

Analysis of Two Kinds of Tetrodotoxins in Puffer Fish and Nassarius by Ultra High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry with Direct Dilution Approach

WANG Xing-long¹, CAI Qiang¹, ZHU Yin¹, BAO Cong², GUI Wen-feng³, REN Yi-ping^{1*}

(1. Analysis and Test Center, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314000, China; 2. Marine Animal Ecology Group, Wageningen University, Wageningen 6708 WD, Holland; 3. School of Environmental and Geographical Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200233, China)

Abstract: An ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (UPLC – MS/MS) method was established for the determination of two tetrodotoxins (TTXs), eg TTX and 4, 9-anhTTX, in puffer fish and nassarius with a direct dilution technique. Samples were extracted with acetic acid – methanol (1 : 99, by volume). After centrifuged and diluted by 80% methanol solution, the extract was separated on an ACQUITY BEH Amide(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column by gradient elution, with 0.1% formic acid solution containing 0.5 mmol/L ammonium formate – 0.1% formic acid acetonitrile solution as mobile phases, analyzed in ESI⁺ mode under multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by external standard method. There were good linear relationships in the range of 0.5 – 100 μg/L for TTX and 0.5 – 50 μg/L for 4, 9-anhTTX, with their correlation coefficients(r^2) larger than 0.99. The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) were in the ranges of 100 – 150 μg/kg and 300 – 450 μg/kg, respectively. Recoveries at three spiked levels ranged from 75.4% to 96.8%, with intra-day relative standard deviations (RSD) and inter-day RSD of 2.3% – 9.5% and 5.3% – 9.2%, respectively. The method was simple and high sensitive, and was suitable for the determination of two TTXs in puffer fish and nassarius.

收稿日期: 2019-12-19; 修回日期: 2020-03-02

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1601300); 研究院青年业务骨干教育培养(A类)

* 通讯作者: 任一平, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品安全检验, E-mail: renyiping@263.net

Key words: direct dilution; tetrodotoxin; ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry; puffer fish; nassarius

河豚毒素(Tetrodotoxins, TTXs)是一类毒性非常强的小分子海洋生物毒素,目前发现天然存在的种类超过40余种,其中TTX毒性较强,大约2 mg即可将50 kg体重的成年人致死^[1-2],且一般的烹饪温度很难降低其毒性。TTX同时拥有胍基和邻位酸官能团,通常以内盐形式存在,故其在强酸强碱环境下性质均不稳定。它们作用于细胞膜上的钠离子通道,影响动作电位的传导,产生严重的神经系统、呼吸系统等急性中毒症状,从而导致死亡^[3]。与某些微藻来源的海洋毒素不同,TTX通过食物链聚集或与其共生的微生物产生,涉及的微生物包括假单胞菌属、弧菌属、希瓦氏菌属、芽孢杆菌属等^[4-5]。近年来,我国浙江^[6]、福建^[7-8]、广东^[9]、四川^[10]等地发生多起误食河豚鱼、织纹螺的中毒事件。河豚毒素中毒后无特效治疗药物^[11]。我国暂未设定水产品中TTX的限量,而日本、韩国设定河豚鱼可食部分中TTX的限量为2 mg/kg^[4]。欧盟禁止河豚鱼流入市场,规定贝类组织中TTX的含量低于44 μg/kg^[12]。伴随河豚市场的开放以及水产品中TTX风险评估的不断深入,我国水产品中TTX的限量标准将会不断完善,检测目标逐渐实现由单一向多种类同时检测转变,复杂耗时的前处理技术向简单、高效方向转变。

河豚毒素的检测方法主要有小鼠生物法^[2,13]、酶联免疫吸附法^[14]、免疫层析法^[15-17]、液相色谱-荧光检测法^[18-19]、气相色谱-串联质谱法^[13]、液相色谱-串联质谱法^[18,20]等。小鼠生物法操作相对简单,但易受个体差异的影响,费时费力。酶联免疫吸附法、免疫层析法特异性强,灵敏度高,定性检测方面优势明显,但标记物的稳定性较难控制。液相色谱-荧光检测法与气相色谱-串联质谱法具有分离度好、灵敏度高等优点,但均需衍生,且前处理过程繁琐。而液相色谱-质谱联用法无需衍生化处理,具有选择性好、灵敏度高、可实现多种TTX类似物同时检测的优点,逐渐成为河豚毒素的首选检测方法。目前,水产品中河豚毒素定量检测主要针对1种TTX,样品前处理多采用反向固相萃取柱、超滤离心柱、免疫亲和柱等。由于商业化的标准品仅有河豚毒素(TTX)与4,9-脱水河豚毒素(4,9-anhTTX)(化学结构如图1),且两种毒素可能会存在于同一样品中,为全面掌握河豚毒素的污染状况,需建立这两种河豚毒素同时定量检测的方法。

现有河豚毒素检测的前处理技术复杂、耗时,无法满足批量样品快速、准确的检测需求。针对这一现状,本研究优化了稀释溶剂、稀释倍数、液相色谱及质谱检测等条件,建立了测定河豚鱼与织纹螺中TTX与4,9-anhTTX的超高效液相色谱-串联质谱法。本方法简单、高效、成本低,适用于批量河豚鱼、织纹螺中河豚毒素的检测。

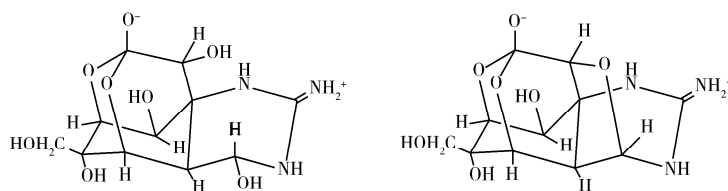


图1 河豚毒素与4,9-脱水河豚毒素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of TTX and 4,9-anhTTX

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与耗材

Acquity H超高效液相色谱仪、Waters TQD三重四极杆串联质谱仪(美国沃特世公司); Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司); 涡旋振荡器(德国海道夫公司); 高速冷冻离心机(德国Sigma公司); 免疫亲和净化柱(江苏美正生物科技有限公司)。

TTX和4,9-anhTTX混合标准物质(西班牙Laboratorio CIFGA S. A.); 乙腈、甲醇(均为色谱纯,德国Merck公司); 甲酸、乙酸、甲酸铵(均为色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司), 0.22 μm尼龙针式滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司); 超纯水(由Milli-Q超纯水仪制备)。

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 TTX标准储备液 移取适量的TTX标准品溶液,用1 mmol/L乙酸稀释至10 mL,配制成质量

浓度为 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的标准储备液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 4, 9-anhTTX 标准储备液 移取适量的 4, 9-anhTTX 标准品溶液, 用 1 mmol/L 乙酸稀释至 5 mL, 配制成质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 的标准储备液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 标准工作溶液 分别准确移取适量的 TTX、4, 9-anhTTX 标准储备液, 用 1 mmol/L 乙酸逐级稀释, 配制成 0.5、2、10、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的 TTX 标准工作溶液与 0.5、1、5、20、50 $\mu\text{g/L}$ 的 4, 9-anhTTX 标准工作溶液。

1.3 仪器条件

1.3.1 液相色谱条件 ACQUITY BEH Amide 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样体积为 10 μL ; 流速为 0.4 mL/min; 流动相: A 为 0.5 mmol/L 甲酸铵的 0.1% 甲酸水溶液, B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。洗脱条件: 0 ~ 1.0 min, 20% A; 1.0 ~ 5.0 min, 20% ~ 50% A; 5.0 ~ 7.0 min, 50% A; 7.0 ~ 9.5 min, 20% A。

1.3.2 质谱条件 正离子扫描, 电喷雾离子源(ESI), 毛细管电压为 3.0 kV, 离子源温度为 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气温度为 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流速为 800 L/h, 锥孔反吹气流速为 30 L/h, 多反应监测模式(MRM)采集。

1.4 样品前处理

1.4.1 直接稀释法 称取 2 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 20 mL 乙酸-甲醇(1:99)溶液, 旋转振荡提取 20 min 后, 以 8 500 r/min 离心 10 min。准确转移 0.1 mL 上清液于 5 mL 离心管中, 加入 2.9 mL 80% 甲醇水溶液, 旋涡混匀后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 11 000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待测。

1.4.2 免疫亲和柱净化法 准确转移 1 mL 前述上清液于 15 mL 聚丙烯离心管中, 加入 9 mL 水混匀, 用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7~8, 待净化。将免疫亲和柱回温至室温, 放出柱内保存液后, 待净化液全部上样。净化液全部流出后, 用 10 mL 水淋洗, 4 mL 乙酸-甲醇溶液(2:98)洗脱, 收集洗脱液于 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 用 80% 甲醇水溶液溶解并定容至 1 mL, 过 0.22 μm 的有机相微孔滤膜, 待上机。

2 结果与讨论

2.1 稀释溶剂的选择

实验发现, 当进样体积一定时, 进样溶液中甲醇比例越低, 溶剂效应越明显。以 10 $\mu\text{g/L}$ 标准品为例, 通过改变稀释溶液中甲醇的比例(50%、60%、70%、80%), 对 2 种河豚毒素的溶剂效应进行了考察。由图 2 可知, 当甲醇比例达到 80% 时, 可明显消除溶剂效应, 因此确定稀释溶剂为 80% 甲醇。

2.2 流动相条件的优化

流动相 pH 值影响 BEH Amide 色谱柱对目标化合物的保留以及仪器的响应强度。当流动相中甲酸浓度为 0.1% 时, 考察了水相中不同浓度甲酸铵(0、0.2、0.5、1、2 mmol/L)对标准溶液、样品溶液出峰时间和响应强度的影响。结果发现, 随着甲酸铵浓度的增大, 响应强度减小, 出峰时间延长。当甲酸铵浓度为 2 mmol/L 时, 响应强度约为未加甲酸铵的 1/2; 当甲酸铵浓度为 0 时, 虽具有最强的响应强度, 但样品溶液与标准溶液的色谱峰出峰时间不一致, 偏差为 0.15 min。当甲酸铵浓度为 0.5 mmol/L 时, 样品溶液与标准溶液的出峰时间一致, 响应强度未受明显影响, 所以水相中甲酸铵的浓度选择为 0.5 mmol/L。

2.3 稀释倍数的优化

河豚鱼、织纹螺基质中含大量的蛋白质、脂肪、其他杂质等成分, 在 ESI⁺ 模式下, 目标物的离子化效率易受到干扰, 从而影响定量检测。比较了不同稀释倍数(100、200、300 倍)对基质效应的影响, 将织纹螺、河豚鱼空白样品按照本方法处理后, 获得空白基质溶液, 配制基质匹配标准曲线。采用下式

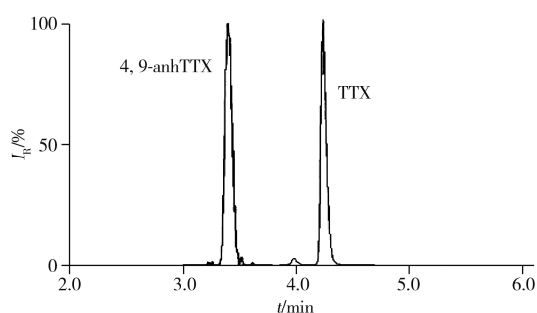


图 2 80% 甲醇对溶剂效应的影响
Fig. 2 Influence of 80% methanol on solvent effect

评估基质效应: $ME/\% = (B - A)/A \times 100\%$ [21], 式中 A、B 分别为标准溶液标准曲线的斜率和基质匹配标准曲线的斜率。当 $ME = 0$ 时, 表明无基质效应; 当 $ME < 0$ 时, 表明基质效应减弱; 当 $ME > 0$ 时, 表明基质效应增强。结果表明, 稀释倍数为 100、200 和 300 倍时的 ME 均小于 0, 说明基质效应使得响应信号降低, 且伴随稀释倍数的增加, 基质效应减弱。当稀释倍数为 300 时, 基质效应为 $-14\% \sim -2.5\%$, 本实验采用基质匹配标准曲线消除基质效应。综合考虑方法灵敏度与减少仪器污染, 将稀释倍数设为 300 倍, 保证实验结果的可靠性。

2.4 质谱参数的优化

在 ESI⁺ 模式下, 对 200 $\mu\text{g/L}$ 的 TTX 与 4, 9-anhTTX 标准溶液分别进行一级质谱全扫描分析, 得到每种目标物的母离子。然后选用选择离子监测 (SIR) 模式, 比较不同锥孔电压下母离子的响应强度, 确定最大响应值时为最佳锥孔电压。再选用子离子 (Daughter) 扫描模式, 比较不同碰撞能量下子离子的响应强度, 选择响应强度较高的两个离子作为定量离子和定性离子, 对应的碰撞能量为最佳优化值。TTX 与 4, 9-anhTTX 的优化质谱参数见表 1。

表 1 TTX 及 4, 9-anhTTX 的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of TTX and 4, 9-anhTTX

Analyte	Mode	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
TTX	M + H	320.14	162.09*, 302.16	50	40, 25
4, 9-anhTTX	M + H	302.10	150.10, 162.18*	55	40, 40

* quantitative ion

2.5 方法学验证

2.5.1 线性范围、检出限与定量下限 按“1.4.1”方法得到织纹螺、河豚鱼的空白基质溶液, 逐级稀释 2 种河豚毒素混合标准储备液, 以目标物的质量浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g/L}$), 对应峰面积为纵坐标 (Y), 绘制基质匹配标准曲线, 分别以 3 倍信噪比 (LOD, $S/N \geq 3$) 和 10 倍信噪比 (LOQ, $S/N \geq 10$) 确定方法检出限与定量下限, 结果见表 2。结果表明, 在河豚鱼和织纹螺基质中, TTX 与 4, 9-anhTTX 分别在 0.5 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 (r^2) 均大于 0.99; LOD 分别为 100、150 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 分别为 300、450 $\mu\text{g/kg}$, 可以满足日常检测的需求。

表 2 2 种河豚毒素的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量下限
Table 2 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients, LODs and LOQs of 2 TTXs

Sample	Analyte	Linear range ($\mu\text{g/L}$)	Linear equation	r^2	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
Nassarius	TTX	0.5 ~ 100	$Y = 74.2X - 2.64$	0.999 1	100	300
	4, 9-anhTTX	0.5 ~ 50	$Y = 69.3X - 1.64$	0.994 6	150	450
Puffer fish	TTX	0.5 ~ 100	$Y = 76.5X - 2.05$	0.995 6	100	300
	4, 9-anhTTX	0.5 ~ 50	$Y = 69.7X - 1.82$	0.993 2	150	450

2.5.2 准确度与精密度 以 2 种河豚毒素为目标物, 对河豚鱼、织纹螺空白基质样品进行加标回收实验, 加标浓度分别为 300、500、1 000 $\mu\text{g/kg}$, 每个加标浓度平行测定 6 次, 考察方法的准确度。方法精密度则通过日内、日间 (连续重复 3 d) 测定结果的相对标准偏差 (RSD) 表示, 结果见表 3。2 种河豚毒素在河豚鱼、织纹螺基质中 3 个加标浓度的回收率为 75.4% ~ 96.8%, 日内、日间 RSD 均小于 10%, 说明该方法准确度和精密度良好, 可满足实际样品的检测要求。

表 3 2 种河豚毒素的加标回收率及相对标准偏差
Table 3 Recoveries and relative standard deviations of 2 TTXs

Analyte	Spiked ($\mu\text{g/kg}$)	Nassarius			Puffer fish		
		Recovery (%)	Intra-RSD (%)	Inter-RSD (%)	Recovery (%)	Intra-RSD (%)	Inter-RSD (%)
TTX	300	89.2	7.9	8.5	90.4	9.5	8.6
	500	85.3	3.6	5.3	90.2	6.0	7.8
	1 000	86.7	2.3	7.4	96.8	5.5	6.4
4, 9-anhTTX	300	79.3	6.5	7.2	84.5	7.3	7.9
	500	75.4	7.3	5.7	78.0	6.9	9.2
	1 000	76.2	9.2	8.1	80.5	8.7	5.6

2.6 前处理方法的比较

GB 5009.206-2016^[22]中采用免疫亲和柱净化的前处理方式,本研究利用简单、快速的直接提取、稀释、冷冻离心的方法进行前处理,通过空白基质加标实验,比较了两种前处理方法的回收率、基质效应和灵敏度。由图3可知,直接稀释法的回收率高于免疫亲和柱净化法,可能是其避免了过程损失,提高了方法准确度。但免疫亲和柱净化后,基本无基质效应,且具有富集目标物的作用,所以灵敏度比直接稀释法高。根据日本、韩国对河豚鱼可食部分中TTX的限量要求,本方法的检出限可满足要求。从实验数据看,河豚鱼样品的加标回收率高于织纹螺,可能由于织纹螺基质更加复杂,基质效应更强所致。

2.7 实际样品分析

利用优化后的方法对2017年3月于东海捕获的7种河豚鱼(34条)不同组织中的TTX、4,9-anhTTX进行检测,结果如图4。结果显示,不同种类的河豚鱼体内TTX、4,9-anhTTX的含量相差较大,月腹刺豚组织中含量最高,其中TTX总含量为60.6 mg/kg,4,9-anhTTX总含量为1.6 mg/kg,超出日本对河豚鱼的限量(2.2 mg/kg)。刺豚的毒素含量最低,各组织均未检出。同种鱼类,不同组织中所含毒素差异也较大。大部分毒素集中于鱼卵、鱼肝中,这与文献研究结果相一致^[23],此研究结果可为有条件开放河豚市场提供参考。同时应用本方法对2017~2018年浙江省沿海地区采集的21份织纹螺样品进行检测,TTX的检出率为95.2%,含量为0.15~16.36 mg/kg;4,9-anhTTX的检出率为27.6%,含量为0.14~1.56 mg/kg。整体来看,织纹螺中河豚毒素含量也较高,存在很大的安全隐患。

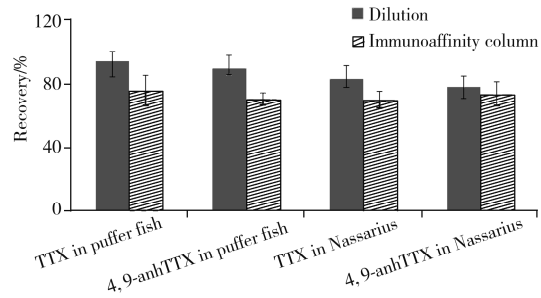


图3 两种前处理方式对河豚毒素的回收率($n=6$)

Fig.3 Recoveries of TTXs with different processing methods($n=6$)

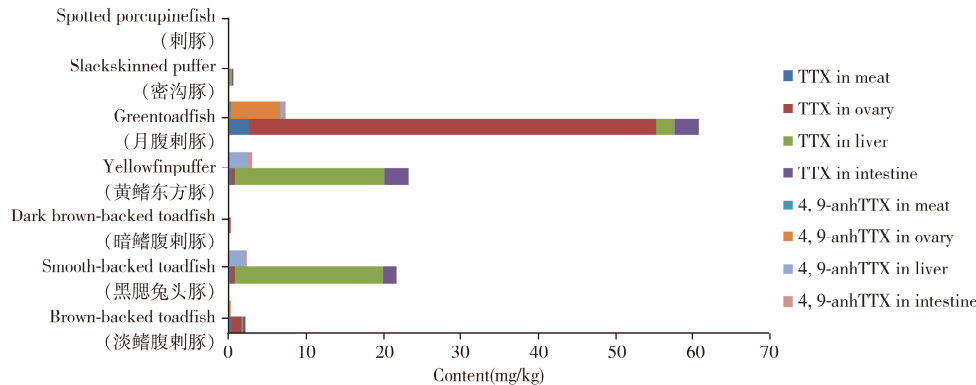


图4 不同河豚鱼组织中河豚毒素的含量

Fig.4 Amounts of TTXs in different kinds of puffer fish tissue

3 结论

本研究采用沉淀、提取、离心、稀释的快速前处理方法,结合超高效液相色谱-串联质谱技术测定河豚鱼与织纹螺中2种河豚毒素的含量。本方法前处理过程简单、高效,降低了检测成本,避免了目标物的损失,适合批量样品中河豚毒素的快速、准确定量检测。

参考文献:

- [1] Vlamis A, Katikou P, Rodriguez I, Rey V, Alfonso A, Papazachariou A, Zacharaki T, Botana A M, Botana L M. *Toxins*, **2015**, 7(5): 1779-1807.
- [2] Asakawa M, Matsumoto T, Umezaki K, Kaneko K, Yu X M, Gomez-Delan G, Tomano S, Noguchi T, Ohtsuka S. *Toxins*, **2019**, 11(5). DOI: 10.3390/toxins11050245.
- [3] Tamele I J, Silva M, Vasconcelos V. *Mar. Drugs*, **2019**, 17(1). DOI: 10.3390/md17010028.
- [4] Blanco L, Lago J, Gonzalez V, Paz B, Rambla-Alegre M, Cabado A G. *Toxins*, **2019**, 11(6). DOI: 10.3390/toxins11060331.

- [5] Magarlamov T Y, Melnikova D I, Chernyshev A V. *Toxins*, **2017**, 9(5). DOI: 10.3390/toxins9050166.
- [6] Lin B, Lin S C, Qian S Q, Lu Z Q. *Chin. J. Crit. Care Med.* (林碧, 林碎钗, 钱松泉, 卢中秋. 中华危重症医学杂志), **2014**, 7(3): 220-222.
- [7] Lin J. *Strait J. Prev. Med.* (林健. 海峡预防医学杂志), **2014**, 20(3): 11-13.
- [8] Guo S L. *Mod. Prev. Med.* (郭胜利. 现代预防医学), **2012**, 39(14): 3515-3516.
- [9] Zhang X C, Dai L. *J. Qilu Nurs.* (张晓春, 戴莉. 齐鲁护理杂志), **2016**, 22(24): 96-97.
- [10] Chen W, Mao S L, Lan Z, Liu M M, Zhu L, He L, Yang Y, Tong H B, Li Y X, Deng X L, Liu Z Y. *J. Prev. Med. Inf.* (陈文, 毛素玲, 兰真, 刘蒙蒙, 朱岚, 何玲, 杨勇, 童华兵, 李雨芯, 邓晓林, 刘祖阳. 预防医学情报杂志), **2016**, 32(2): 153-155.
- [11] Lago J, Rodriguez L P, Blanco L, Vieites J M, Cabado A G. *Mar. Drugs*, **2015**, 13(10): 6384-6406.
- [12] Helle K K, Jan A, Lars B, Margherita B, Beat B, Sandra C, Bruce C, Michael D, Lutz E, Bettina G K, Christer H, Laurentius H, Carlo S N, Isabelle P O, Martin R, Alain-Claude R, Tanja S, Christiane V, Gunter V, Heather W, Nathalie A, Diane B, Luis B, Barbara V, Davide A, Marco B, Zsuzsanna H, Hans S, Mathijs V M, Annette P. *EFSA J.*, **2017**, 15(4): 1-65.
- [13] Indumathi S M, Khora S S. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **2017**, 10(3): 278-284.
- [14] Reverte L, Rambla-Alegre M, Leonardo S, Belles C, Campbell K, Elliott C T, Gerssen A, Klijnstra M D, Diogene J, Campas M. *Talanta*, **2018**, 176: 659-666.
- [15] Ling S M, Li X L, Zhang D P, Wang K, Zhao W W, Zhao Q, Wang R Z, Yuan J, Xin S J, Wang S H. *Toxicon*, **2019**, 165: 103-109.
- [16] Shen H C, Xu F, Xiao M, Fu Q Q, Cheng Z Z, Zhang S W, Huang C H, Tang Y. *Analyst*, **2017**, 142(23): 4393-4398.
- [17] Zhang S W, Wang S F, Yao T Q, Yang G W, Lai X T. *Food Sci.* (张世伟, 王士峰, 姚添琪, 杨国武, 赖心田. 食品科学), **2017**, 38(20): 312-317.
- [18] Dell'Aversano C, Tattaglione L, Polito G, Dean K, Giacobbe M, Casabianca S, Capellacci S, Penna A, Turner A D. *Chemosphere*, **2019**, 215: 881-892.
- [19] Xin S P, Cen J W, Li L H, Yang X Q, Hao S X, Wei Y, Zhou W J, Wang Z H. *J. Fish. Sci. China* (辛少平, 岑剑伟, 李来好, 杨贤庆, 郝淑贤, 魏涯, 周婉君, 王子怀. 中国水产科学), **2015**, 22(1): 139-148.
- [20] Kosker A R, Ozogul F, Ayas D, Durmus M, Ucar Y, Regenstein J M, Ozogul Y. *Chemosphere*, **2019**, 219: 95-99.
- [21] Fang L, Qiu F M, Yu X W, Zhang Z C. *Chin. J. Food Hyg.* (方力, 邱凤梅, 余新威, 张志超. 中国食品卫生杂志), **2017**, 29(4): 434-438.
- [22] GB5009.206-2016. Determination of Tetrodotoxin in Aquatic Products. National Standards of the People's Republic of China(水产品中河豚毒素的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [23] Itoi S, Ishizuka K, Mitsuoka R, Takimoto N, Yokoyama N, Detake A, Takayanagi C, Yoshikawa S, Sugita H. *Toxicon*, **2016**, 114: 53-58.

(责任编辑: 丁 岩)