

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2018.03.016

• 综述 •

## 河豚毒素的检测与制备方法研究进展

李来好<sup>1</sup>, 孙博伦<sup>1,2</sup>, 赵东豪<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室, 广东省渔业生态环境重点开放实验室, 广东广州 510300; 2. 浙江海洋大学, 浙江舟山 316021)

**摘要:** 河豚毒素为一类自然界广泛分布的神经性毒素, 毒性极强, 可通过阻碍钠离子通道而抑制神经传导, 使神经麻痹而导致死亡, 成为威胁水产品质量安全的重要风险隐患之一, 受到国际社会重点关注而被严格管控。同时, 河豚毒素具有镇静、镇痛和麻醉等药理作用, 在临床医疗方面应用前景广泛。河豚毒素的检测方法主要有生物法、免疫法和仪器分析法等 3 大类。但由于缺乏高获得率、高分离度的纯化工艺和制备技术, 难以大批量生产高纯度的河豚毒素, 成为临床应用和安全管控的难点。文章概述了河豚毒素检测和制备方法的研究进展, 并对各种方法的适用性及存在的问题进行了综述。

**关键词:** 河豚毒素; 检测方法; 制备; 纯化

中图分类号: TS 207.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2018)03-0126-07

## Research progress in detection and preparation methods for tetrodotoxin

LI Laihao<sup>1</sup>, SUN Bolun<sup>1,2</sup>, ZHAO Donghao<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture; Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology Environment; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China)

**Abstract:** Tetrodotoxin is a widely distributed neurogenic toxin with severe toxicity which can lead to nerve paralysis and cause death by blocking sodium channels and nerve conduction. As one of the most critical risks that threaten the safety of aquatic products, it is strictly controlled by international community. Meanwhile, tetrodotoxin can be used in clinical practice for sedation, analgesia and anesthesia, and has comprehensive application foreground. There are three main methods to detect tetrodotoxin (bioassay, immunoassay and instrumental method). However, it is difficult to produce high-purity tetrodotoxin in enormous quantity because of lack of purification and preparation technology with high separation efficiency and high yield. The paper reviews the research progress in the determination and preparation of tetrodotoxin method, and summarizes the applicability and problem of each method, which provides references for further study.

**Key words:** tetrodotoxin; detection method; preparation; purification

河豚毒素 (TTX) 属于氨基全氢喹啉化合物, 是一种笼形原酸酯类生物碱, 分子式为  $C_{11}H_{17}N_3O_8$ 。尽管 TTX 的分子量只有 319.27, 但其结构复杂 (图 1), 带有复氧环己

烷, 碳环中的每个碳原子都存在不对称取代, 极性很强。TTX 同时拥有胍基和邻位酸官能团, 能以两性离子的形式存在, 故其在强酸和强碱下都不稳定。TTX 的粗品为棕黄

收稿日期: 2017-11-28; 修回日期: 2018-01-28

资助项目: 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2016HY-ZD1102, 2017HY-YJ0203); 国家自然科学基金项目 (31571869)

作者简介: 李来好 (1963—), 男, 博士, 研究员, 从事水产品加工与质量安全研究。E-mail: laihao@163.com

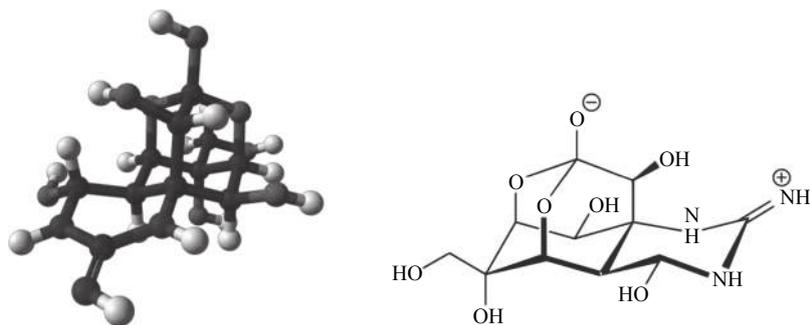


图1 TTX结构图 (图片来源于网络)

Fig.1 Structure diagram of TTX (the figure comes from internet)

色粉末, 纯品为白色晶体, 呈针状或菱形, 无臭无味, 容易吸湿和潮解, 不溶于乙醚、苯等有机溶剂, 微溶于水, 易溶于稀酸水或醇溶液, 且在弱酸条件下状态稳定, 因此多用醋酸水溶液进行提取。TTX 在弱碱环境下会分解沉淀, 成为无毒的 C<sub>9</sub> 碱 (2-氨基-6-羟甲基-8-羟基喹啉)<sup>[1]</sup>。

作为典型的非蛋白类神经毒素, TTX 的毒性是氰化物的 1 250 多倍, 其通过与钠离子通道上的受体结合, 导致神经和肌肉麻痹、肢体无力、瘫痪等, 中毒严重的患者会因中枢神经麻痹、呼吸停止而死亡, 无特效解毒剂<sup>[2]</sup>。TTX 不能被体内的消化酶分解, 暴晒和盐腌均不能完全破坏其毒性, 在加压锅内加热 2 h 后可失去毒性。

早在公元前 2500 年, 埃及就有关于河鲀等有毒鱼类的记载<sup>[3]</sup>。1909 年日本科学家田原良纯首次从河鲀卵巢中提取到 TTX<sup>[4]</sup>, 随后研究人员相继在蝾螈、虾虎鱼、青蛙 (*Rana nigromaculata*) 等体内也发现了 TTX 或者 TTX 类似物<sup>[5]</sup>, 说明 TTX 并不仅仅存在于河鲀体内。事实上 TTX 存在于甲藻、红藻、扁形虫、织纹螺、章鱼、海星等一系列不同进化水平的海洋生物和少量两栖动物体内。一般认为河鲀体内的 TTX 主要是通过食物链摄食含有该毒素的鱼、虾、蟹、贝类及藻类等, 在体内富集产生的<sup>[6]</sup>。由于 TTX 毒性极强, 每年都会发生因食用河鲀而中毒的案例, 国内一度禁止河鲀的食用。近年来相关部门的连续监测表

明, 人工养殖的红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 和暗纹东方鲀 (*T. obscurus*) 2 个品种 TTX 含量极低, 经加工处理后, 对人没有毒性<sup>[7]</sup>, 河鲀被部分解禁, 但野生河鲀仍被严禁食用。因此, 开发特异性强、灵敏度高、准确性好的 TTX 检测方法, 对保障食品安全至关重要。

此外, TTX 在医疗卫生行业用途广泛。利用其选择性抑制钠离子通道的独特机理, TTX 被作为工具药应用于生理学、药理学等研究领域<sup>[8]</sup>。Hagen 等<sup>[9]</sup>和王冠男等<sup>[10]</sup>研究表明, TTX 能缓解大部分患者的中度至重度疼痛, 无成瘾性, 可作为毒品戒断药有效抑制戒毒过程中产生的不适症状。

鉴于高纯度 TTX 在医疗卫生和食品安全领域的特殊作用和商业价值, 近年来关于该毒素检测方法与制备工艺的研究越来越多, 文章就其研究进展进行综述, 以期为后续的方法研究提供参考。

## 1 TTX 的检测方法研究进展

根据不同方法的检测原理, 可将目前常见的 TTX 检测方法归纳为生物法、免疫法和仪器分析法三大类, 其原理和优缺点见表 1。

### 1.1 生物检测法

1.1.1 小鼠生物法 小鼠生物法是目前中国和日本等国的

表1 不同TTX检测方法的原理及优缺点比较

Tab.1 Comparison of principles, advantages and disadvantages of different TTX detection methods

检测方法 detection method	类型 type	原理 principle	优点 advantage	缺点 disadvantage
生物法 bioassay	小鼠生物法、离体组织法、组织培养法、生物检测器法	基于TTX阻断Na <sup>+</sup> 通道的特性	操作简便, 无需特殊设备	重现性差, 结果不稳定
免疫法 immunoassay	酶联免疫吸附法、免疫层析法	利用抗原、抗体的高度特异性结合反应	简单快捷, 单次检测成本低	抗体制备困难, 易出现假阳性
仪器分析法 instrumental method	荧光分光光度法、色谱法 色谱-质谱联用法	基于TTX的理化性质	灵敏度高、特异性强、重现性好	检测成本高、耗时长, 对设备要求高

法定 TTX 检测方法,也是最常用的生物检测法,其原理是给一定体质量的小鼠注射毒素提取液后,根据毒素的注射剂量与小鼠死亡时间的线性关系,通过观察小鼠的死亡时间推算 TTX 的含量。通常以样品提取液完全注入小鼠腹腔开始计时,到小鼠停止呼吸作为判断小鼠死亡的标准。在小鼠中毒期间,TTX 会麻痹运动神经,表现为呼吸急促、反应迟钝、抽搐等中毒症状<sup>[11]</sup>。TTX 的毒力用鼠单位(MU)表示,采用 20 g 雄性 ddy 品系小鼠,以 30 min 死亡的剂量规定为 1 个鼠单位(1 MU 约等于 0.178  $\mu\text{g}$  TTX)<sup>[12]</sup>。小鼠生物法以生物体的反应作为指标测定毒素含量,是最直观的检测方法,但该方法操作繁琐,易受主观因素干扰,检测结果不稳定,重复性较差,且在伦理方面存在争议,此外还需考虑提取溶剂对小鼠生理反应的影响。

1.1.2 离体组织法 离体组织法包括竞争取代法和移位测定法等,原理是往离体组织滴加 TTX,阻断钠离子通道,动作电位发生改变,迷走神经的信号传递被阻断,引起肌肉收缩<sup>[13]</sup>。竞争取代法是根据石房蛤毒素(saxitoxin, STX)与 TTX 相似的作用机理,采用 TTX 置换与鼠脑膜受体结合的<sup>3</sup>H-STX,再用液闪仪测定<sup>3</sup>H-STX 来间接测定 TTX 的含量,灵敏度为 0.8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[14]</sup>。该方法操作简单,但是无法测定作用位点不同的毒素,也不能测定含盐量高的样品。移位测定法是通过测定脑细胞膜上被放射性标记的 TTX 的移位情况来检测 TTX。Davio 和 Fontelo<sup>[15]</sup>通过检测 STX 和 TTX 在大鼠脑细胞膜受体上<sup>[3</sup>H]蛤蚌毒素的竞争移位情况,来测定两者的含量。该方法灵敏度高,缓冲液中 STX 和 TTX 的检测限分别为 0.15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和 0.8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,人血浆样品的检测限则分别为 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和 0.6  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.1.3 组织培养法 组织培养法的原理是乌本苷会抑制  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的活性,藜芦定能刺激神经细胞的钠内流和动作电位的去极化,钠离子的大量流入使细胞肿胀而死,而 TTX 可以结合受体阻断这种作用。依据细胞存活率与 TTX 含量之间的相关性测定 TTX<sup>[16]</sup>。该方法简单方便,检测限为 96  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,但不能区分 TTX、STX 及其衍生物,特异性差。

在仪器分析法尚未普及的年代,生物检测法在 TTX 的检测方面发挥了重要作用。仪器分析法通常只能检测已知的某种或几种水产品生物毒素,而含有 TTX 的水产品,有时也会有 STX、膝钩藻毒素(GTX)等其他毒素,生物检测法这种“以身试毒”的检测原理,在判断样品是否含有毒素时具有独特的优势。此外,离体组织法和组织培养法可以用于研究 TTX 的药理和毒理作用。

## 1.2 免疫检测法

免疫检测法主要有酶联免疫吸附法(enzyme linked im-

munosorbent assay, ELISA)和免疫层析法(immunochromatography, ICA),在食品和农产品残留检测中比较常用,其原理是通过抗原抗体的高度特异性结合,对样品中的 TTX 进行定性或定量分析,该技术涉及抗原与抗体的分子间立体化学、电荷等综合技术的运用<sup>[17]</sup>。免疫检测法具有广阔的市场前景,目前已有多个关于 TTX 的专利。

1.2.1 ELISA 法 ELISA 法结合了抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化作用,分为固定化抗原竞争抑制吸附和固定化抗体直接竞争吸附 2 种类型,在食品安全领域有着非常广泛的应用,灵敏度可以达到 ng 级,能对目标物进行定性和定量分析。Watabe 等<sup>[18]</sup>通过牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)连接河豚酸和 TTX 衍生物作为抗原获得单克隆抗体,每孔的毒素为 0.03~100  $\mu\text{g}$  时,小鼠腹水中产生的单克隆抗体能与 TTX 产生特异性反应,检测限为 300  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Reverte 等<sup>[19]</sup>改进的 ELISA 法对 TTX 具有更高的灵敏度和选择性,最低检测限可达 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,且与麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning, PSP)无交叉反应,也不受精氨酸的干扰,特异性强。需要注意的是,采用该方法测定牡蛎等贝类样品中的 TTX 含量时,样品提取液需用固相萃取法(solid phase extraction, SPE)净化后测定,否则基质效应太强,此与液质法(high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定 TTX 时的情况相似。

1.2.2 ICA 法 ICA 法是一种将免疫技术和色谱层析技术相结合的快速检测方法,以纤维素层析材料为固相,利用毛细管作用使得样品溶液在层析条上涌动,通过免疫亲和作用将待测物富集于某一特定区域,借助显色反应即可快速观察检测结果<sup>[20]</sup>。ICA 标记物主要有纳米金颗粒和纳米磁珠 2 种,以层析柱、层析纸或层析棒等形式,在农产品和食物有毒污染物的测定方面应用较多<sup>[21]</sup>。Zhou 等<sup>[22]</sup>建立了竞争性免疫分析法快速测定河鲀组织中 TTX,该方法基于金纳米粒子标记单克隆抗体技术,使用了 2 种抗体,当组织样品中的 TTX 与固定化的 TTX-BSA 竞争性结合于金标记单克隆抗体后,可被固定在诊断硝酸纤维素膜的另一个抗体捕获,检测限为 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;Ling 等<sup>[23]</sup>将骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞融合,获得的单克隆杂交瘤细胞与 TTX 具有很高的亲和力,基于该单克隆抗体建立的 ELISA 法和 ICA 法,对 TTX 的检测限分别为 4.44  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;与前述 2 种方法不同,Shen 等<sup>[24]</sup>建立了荧光猝灭免疫层析传感器(FQ-ICS)检测 TTX 的方法,采用荧光共振能量转移技术(FRET),在 12 min 内即可完成测定,与传统的 ICA 法相比,该方法的灵敏度提高 20 倍以上,检测限低至 0.78  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,加标回收率为 61.3%~70.4%。

免疫检测法操作方便, 通常不需要复杂的仪器设备, 检测人员经过简单培训后, 即可用于养殖场、农贸市场等的现场快速检测, 便于在基层检测机构推广使用。但免疫检测法特异性较差, 筛选出的阳性样品应采用仪器法进行确证分析。

### 1.3 仪器分析法

随着仪器分析技术的不断发展进步, TTX 的理化检测方法越来越多, 主要有荧光分光光度法、气相色谱法、液相色谱法及质谱联用技术等。

1.3.1 荧光分光光度法 荧光分光光度法是较早建立的用于定量检测 TTX 的仪器分析方法。TTX 加碱可水解生成  $C_9$  碱, 该物质为荧光化合物, 可通过测定衍生物含量来对 TTX 进行定量分析。Nuñez 等<sup>[25]</sup>用强碱处理 TTX 后, 发现衍生物的荧光强度与 TTX 在一定浓度范围内线性关系良好。样品与  $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液混合后, 置于  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴反应 45 min, 最大激发波长 370 nm, 最大发射波长 495 nm, 检测限为  $0.34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

作为早期的仪器检测方法, 荧光分光光度法操作简便, 但检测限高, 灵敏度低, 难以测定 TTX 含量较低的样品。但在高效液相色谱法 (HPLC) 普及后, 其荧光检测器 (FLR) 和紫外检测器 (UV) 可用来测定水产品中 TTX 含量, 且检测原理与分光光度法基本一致。

1.3.2 HPLC 法 HPLC 法是常用的仪器检测方法, 其原理是待测组分随着流动相在固定相上的吸附与解吸, 不同组分的保留时间不同, 从而实现样品的分离, 是目前分析领域最为广泛使用的技术手段之一。Nakayama 和 Terakawa<sup>[26]</sup>用 Finepak SIL- $C_{18}$  柱分离提取液中的 TTX, UV 法测定, 检测波长为 230 nm, 回收率高于 90%, 且化合物分离所需时间小于 15 min。Bontemps 等<sup>[27]</sup>认为 TTX 在 230 nm 处没有明显紫外吸收, 对 Nakayama 和 Terakawa 的实验进行改进, 采用 MLtrasphere-ODS 柱, 以  $\text{H}_3\text{PO}_4$  作为流动相, 在 195 nm (或 200 nm) 处检测, 检测限为  $0.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于在稀酸环境中比较稳定, 不能在基质中残留的 TTX 一般在酸性条件下提取。河鲀肌肉中的 TTX 用 2% 乙酸甲醇提取后, 依次用  $C_{18}$  小柱和 WCX 小柱净化处理, 以  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢铵- $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  庚烷磺酸钠溶液作为流动相, 在 GraceSmart RP-18 柱上分离后, HPLC-UV 法测定, 检测波长为 200 nm, 检测限为  $0.02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 回收率为 75%~82%<sup>[28]</sup>。大鼠血浆中的 TTX, 也在酸性条件下用有机溶剂沉淀蛋白, 以 10% 乙腈和 90% 的  $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  庚烷磺酸钠与  $0.005\%$  三氟乙酸混合溶液为流动相, 经  $C_{18}$  柱分离后, HPLC-UV 法在 196 nm

处测定, 血浆中 TTX 的检测限为  $0.105 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[29]</sup>。

TTX 本身不发荧光, HPLC-UV 法检测时, 由于其最大吸收波长为 195~200 nm, 波长较短易受溶剂干扰, 灵敏度低, 难以测定较低含量的 TTX, 将其衍生化后可以采用 HPLC-FLR 法测定。尿样中的 TTX 先用免疫层析柱净化, 检测限可低至  $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与 UV 法相比, 灵敏度有了显著提高<sup>[20]</sup>。用 0.1% 乙酸提取河鲀和织纹螺中的 TTX, 经  $C_{18}$  柱净化处理, 使用  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  庚烷磺酸钠、 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸铵缓冲液和 2% 乙腈作为流动相, 在  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 条件下柱后衍生成  $C_9$  碱, FLR 法测定, 回收率为 80.9%~91.2%, 定量限为  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[30]</sup>。将 NaOH 更换为邻苯二甲醛, 与伯胺反应产生荧光物质, 用 HPLC-FLR 法测定, 检测限为  $0.32\sim 0.64 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 可用于小体积 TTX 的定量分析<sup>[31]</sup>。前述方法都只检测 TTX, Tanis 等<sup>[32]</sup>建立了 HPLC 法同时测定有毒兔头鲀体内的 TTX 和 4,9-脱水 TTX 含量, 目标物以挥发性离子对试剂全氟庚酸铵作为流动相, 在  $C_{18}$  柱上分离, 柱后衍生 FLR 法测定, TTX 和 4,9-脱水 TTX 的检测限分别为  $12 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $26 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 回收率为 90.7%~93.6%。

与质谱法相比, HPLC 法具有准确性高、精密度好的优点, 在需要对样品进行准确的定量分析时, 如 TTX 纯度的测定等, 难以被其他方法完全取代。

1.3.3 气相色谱法 (GC) 与气质联用法 (GC-MS) Suenaga 和 Kotoku<sup>[33]</sup>于 1980 年在尸检材料中将 TTX 的衍生物通过碱解生成  $C_9$  碱, 建立了气相色谱检测 TTX 及其衍生物的方法。色谱法前处理复杂、检测限偏高、易受基质干扰, 而色谱-质谱联用技术具有特异性强、灵敏度高等优点, 能够更加准确的检测多种基质中 TTX 的残留量。在 GC 法的基础上, 研究人员又相继建立了 GC-MS 测定河鲀组织、水、药物和血浆中 TTX 含量的方法<sup>[34-35]</sup>。将 TTX 碱解生成的  $C_9$  碱, 经 MCX 小柱净化, 双 (三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺衍生后, GC-MS 法测定, 回收率为 64.0%~92.8%, 检测限为  $5.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[36]</sup>。受方法原理所限, 无论是 GC 法, 还是 GC-MS 法检测 TTX, 均需将其衍生后才能测定。与 HPLC-FLR 的柱后衍生不同, GC 法均需柱前衍生, 反应过程中引入的杂质或生成的副产物可能影响色谱分离。因此, 目前采用 GC 法和 GC-MS 法检测 TTX 的文献较少, 且大多只存在于研究层面, 较少应用于实际样品的测定。

1.3.4 LC-MS/MS 法 与 GC-MS 法相比, LC-MS 法不需要衍生化即可用于 TTX 的测定。用甲醇提取尿液和血液中的 TTX 后, 经  $C_{18}$  层析柱净化, 洗脱液离心过滤冷冻干

燥, 蒸馏水溶解后, LC-MS 法检测, 回收率超过 88.9%。该方法使用的是单级质谱, 检测限约为  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 灵敏度太低, 不能用于河鲀中低含量 TTX 的残留分析, 在定性分析的准确度方面也不如多级质谱<sup>[37]</sup>。采用液相色谱串联三重四极杆质谱和傅立叶变换离子回旋共振质谱测定河鲀和贝类中的 TTX, 定量限可低至  $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 还能进行确证分析<sup>[38]</sup>。在前人研究基础上, Shalabai 等<sup>[39]</sup>建立了高效液相色谱串联高分辨质谱 (HPLC-HRMS) 对河豚毒素进行定性和定量分析方法, 样品在 HILIC 柱上梯度洗脱, 对目标组分进行分离, 河豚毒素在  $150 \sim 250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的质量浓度范围内线性关系良好。含有 TTX 的水产品中可能会残留多种生物毒素, 采用 LC-MS/MS 法可同时测定 TTX 和 PSP。腹足类生物的肌肉组织样品用 1% 乙酸提取后, 经  $\text{C}_{18}$  小柱净化后测定, 其毒素组成为 STX 占 73%~82%, GTX 2 和 GTX 3 占 12%~22%, TTX 占 5%~6%<sup>[40]</sup>。

在国内, 骆和东等<sup>[41]</sup>建立了织纹螺中 TTX 的 LC-MS/MS 测定方法, 样品采用  $\text{C}_{18}$  小柱净化后, 再用超滤管过滤, 以甲醇和含七氟丁酸的甲酸铵溶液为流动相, 经 Inertsil ODS-3 柱分离, 检测限为  $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 回收率为 72.5%~80.4%。TTX 的极性很强, 其在  $\text{C}_{18}$  柱上不能有效保留, 使用七氟丁酸等挥发性离子对试剂, 虽然能增强 TTX 的保留, 但离子对试剂容易影响质谱的性能, 因此, 对 TTX 等强极性化合物, 应选用 HILIC 或 Amide<sup>[42]</sup> 等色谱柱。采用 LC-MS/MS 法测定 TTX, 基质效应对检测结果影响很大。将样品用专一性好、特异性强的免疫亲和柱净化后, 能有效去除基质干扰, 近年来常被用于 TTX 的样品前处理<sup>[43-44]</sup>, 但该小柱价格较贵, 是普通离子交换 SPE 小柱的 6~10 倍。

LC-MS/MS 法灵敏度高、选择性好, 适用于测定复杂样品基质中痕量及超痕量的 TTX 残留。此外, 对于其他检测方法测出的阳性样品, 也可以用 LC-MS/MS 法进行确证分析, 以减少误判。上述 TTX 的检测方法, 均有各自的优缺点, 目前国内使用最多的还是小鼠生物法, 但随着检测技术的不断进步, 可以预见的是, LC-MS/MS 法和 ELISA 法等, 将与小鼠生物法一起, 被越来越多地用于 TTX 的测定。

## 2 TTX 的制备方法研究进展

TTX 的化学结构特殊复杂, 合成难度较大。1972 年首次人工合成了外消旋 TTX<sup>[45]</sup>, 之后又发明新的方法立体选择性合成了 TTX 及其衍生物<sup>[46]</sup>, 2003 年通过逆合成分析法实现了 TTX 的不对称合成<sup>[47]</sup>。

尽管已有较多 TTX 成功合成的报道, 但目前 TTX 的主要来源仍依赖于从生物样品中提取。从河鲀卵巢和肝脏中提取的毒素, 经净化处理后可用于 TTX 纯品的制备。TTX 的粗提液中含有较多的蛋白质、脂类等, 净化步骤繁琐, 晶体纯度低, 田原良纯最初从河鲀卵巢内提取的 TTX, 纯度只有 0.2%<sup>[3]</sup>, 直到 20 世纪中叶才发明了 TTX 晶体的制备方法<sup>[48]</sup>。上海水产学院于 1958 年在国内率先开展 TTX 的提取纯化工作<sup>[49]</sup>。

TTX 的传统制备流程为: 将样品绞碎后用酸浸提, 盐沉淀除去杂质, 氨水沉淀得到粗提液, 冷冻干燥或减压浓缩后, 再经多次层析处理, 即可获得纯度较高的样品。近年来, 随着新材料和新方法应用于样品的净化与提纯, TTX 的回收率有了明显的提高。崔建洲等<sup>[50]</sup>采用醋酸水溶液提取假睛东方鲀 (*T.pseudommus*) 肝脏中的 TTX, 通过筛绢、板框压滤机过滤后, 再用阴离子交换树脂 D201 和阳离子交换树脂 IR-86 净化, 用 Sephadex G-10 脱蛋白、脱盐处理, 调节 pH 为碱性, 冷藏静置析出结晶, TTX 的纯度达到 85.6%, 粗品得率为 84.8%。然后用 HPLC 法对粗品分离纯化, 经氨水和乙醇洗涤再结晶, 真空干燥, 得到的 TTX 纯度为 99.5%, 最终得率为 81.1%。与传统方法使用 D152 树脂相比, 该方法使用了载量更高的 IRC-86 树脂, 再借助于 HPLC, 能获得高纯度的 TTX。易瑞灶等<sup>[51]</sup>以河鲀卵巢和肝脏为原料规模化制备 TTX。首先在样品匀浆液中添加去离子水, 控制 pH 为 2.5~7.5, 成盐低温循环浸提。制备原液采用微滤、超滤、纳滤和反渗透等方法处理以去除杂质, 最后经脱水浓缩, 调节 pH 至 8~10,  $2 \sim 15 \text{ }^\circ\text{C}$  静置析出 TTX 晶体, 再用 HPLC 制备得到纯度大于 99% 的 TTX 结晶。该方法结合使用多种膜分离技术, 使得在常温或低温条件下分离和浓缩大体积的提取液成为可能。

参考 TTX 的制备方法, 以河豚卵巢为原料, 陈伟珠等<sup>[52]</sup>研制了 4,9-脱水 TTX 的标准样品。4,9-脱水 TTX 被从基质中浸提出来后, 依次经预过滤、膜分离去除杂质, 再浓缩获得 TTX 的粗品。然后借助制备液相色谱纯化、制备出高纯度的 TTX, 再经结晶和干燥后, 获得纯度高于 97% 的 4,9-脱水 TTX。由于该方法可能涉及保密, 作者没有具体说明每步操作的条件。

传统的 TTX 制备方法大多是从野生河鲀的内脏提取毒素, 但大量捕杀野生河鲀会对资源造成破坏, 且原料的来源也不稳定。近年来从织纹螺中发现了 TTX 及其衍生物, 分别检测织纹螺食道、内脏和肌肉组织中 TTX 的含量, 发现毒素在不同组织的分布有差异, 尤其以内脏中 TTX 的含

量最高<sup>[53]</sup>。织纹螺因含有 TTX 等生物毒素而被国家卫生部明令禁止销售, 而其在广东、浙江、福建等沿海地区分布广泛, 野生资源丰富, 可以部分代替野生河鲀成为 TTX 的提取原料。此外, 部分弧菌属、希瓦氏菌属和链霉菌属细菌能产生 TTX。吴韶菊<sup>[54]</sup>、岳田方等<sup>[55]</sup>将海藻希瓦氏菌 (*Shewanella alga*) 发酵培养, 并提取检测到 TTX, 但微生物培养产物中的 TTX 含量极低, 仅为 ng 级, 难以成为 TTX 原材料的主要来源。

目前, 从河鲀等生物体提取、制备 TTX 尚存在诸多难点: 1) TTX 只溶于酸性水溶液, 采用苦味酸盐重结晶、溶媒转移时, 苦味酸盐不易除去, 难以批量获得高纯度 TTX 晶体; 2) 使用磷酸盐或庚烷磺酸钠作为流动相制备 TTX, 后续工艺难以去除这些不挥发性盐; 3) 与 TTX 结构相似的同系物, 如 4-*epi*TTX、6-*epi*TTX、11-*deoxy*TTX 等, 在制备过程中难以有效分离; 4) 人工养殖的河鲀无毒或毒性极低, 仅依靠野生河鲀, 原料的来源不稳定。

### 3 小结

TTX 应用前景广阔, 但限于制备技术不够成熟、完善, 其价格长期以来居高不下, 影响了 TTX 在医疗和公共卫生等领域的进一步开发和应用。但随着超临界萃取法、活性炭吸附法、离子交换树脂法、膜分离法等样品前处理技术应用于 TTX 的提取、净化、纯化和制备, 预期在不久的将来能够开发出更加高效的方法, 以批量制备高纯度的 TTX, 逐步解决其供不应求、价格高昂的问题。此外, 继续开发特异性强、灵敏度高、准确性好的检测方法, 将在监控水产品中 TTX 的残留水平、保障食品安全方面发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] 方国锋, 王锡昌, 陶宁萍, 等. 河豚毒素的样品前处理与快速检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2014, 33(12): 1447-1452.
- [2] 郭瑞霞, 李力更, 王磊, 等. 天然药物化学史话: 河豚毒素[J]. 中草药, 2014, 45(9): 1330-1335.
- [3] FUHRMAN F A. Tetrodotoxin, tarichatoxin, and chiriQuitoxin: historical perspectives[J]. Ann New York Acad Sci, 1986, 479: 1-14.
- [4] TAHARA Y. Uber das tetrodongift[J]. Biochem Z, 1910, 30: 255-275.
- [5] MIYAZAWA K, NOGUCHI T. Distribution and origin of tetrodotoxin[J]. J Toxicol: Toxin Rev, 2001, 20(1): 11-33.
- [6] YASUMOTO T, NAGAI H, YASUMURA D, et al. Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin[J]. Ann New York

- Acad Sci, 1986, 479: 44-51.
- [7] 王丽雅, 陶宁萍, 龚玺. 河豚的食用安全性及营养价值研究进展[J]. 上海农业学报, 2012, 28(2): 123-128.
- [8] 代秀梅, 庾莉菊, 张启明, 等. 河豚毒素的医药开发前景[J]. 药品评价, 2008, 5(5): 230-232.
- [9] HAGEN N A, SOUICH P D, LAPOINTE B, et al. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer pain: a randomized, double blind, parallel design multicenter study[J]. J Pain Symptom Manage, 2008, 35(4): 420-429.
- [10] 王冠男, 谢丽萍, 张荣庆. 河豚毒素的分布及动物对它的拮抗作用[J]. 海洋通报, 2007, 26(1): 107-113.
- [11] 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.
- [12] 殷芹. 小鼠法和高效液相色谱法测定野生河鲀不同组织内河豚毒素的含量[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 10-25.
- [13] OGURA Y, MORI Y. Mechanism of local anesthetic action of crystalline tetrodotoxin and its derivatives[J]. Eur J Pharmacol, 1968, 3(1): 58-67.
- [14] VIEYTES M R, CABADO A G, ALFONSO A, et al. Solid-phase radioreceptor assay for paralytic shellfish toxins[J]. Anal Biochem, 1993, 211(1): 87-93.
- [15] DAVIO S R, FONTELO P A. A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin[J]. Anal Biochem, 1984, 141(1): 199-204.
- [16] GALLACHER S, BIRKBECK T H. A tissue culture assay for direct detection of sodium channel blocking toxins in bacterial culture supernates[J]. Fems Microbiol Lett, 1992, 71(1): 101-107.
- [17] 丛蕾. 河豚毒素特异性单克隆抗体的制备[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010: 9-11.
- [18] WATABE S, SATO Y, NAKAYA M, et al. Monoclonal antibody raised against tetrodonic acid, a derivative of tetrodotoxin[J]. Toxicon, 1989, 27(2): 265-268.
- [19] REVERTÉ L, RAMBLA-ALEGRE M, LEONARDO S, et al. Development and validation of a maleimide-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of tetrodotoxin in oysters and mussels[J]. Talanta, 2018, 176: 659-666.
- [20] KAWATSU K, SHIBATA T, HAMANO E. Application of immunoaffinity chromatography for detection of tetrodotoxin from urine samples of poisoned patients[J]. Toxicon, 1999, 37(2): 325-333.
- [21] DZANTIEV B B, BYZOVA N A, URUSOV A E, et al. Immunochromatographic methods in food analysis[J]. TrAC-Trend Anal Chem, 2014, 55: 81-93.
- [22] ZHOU Y, LI Y S, LU S Y, et al. Gold nanoparticle probe-based immunoassay as a new tool for tetrodotoxin detection in puffer fish tissues[J]. Sens Actuators B Chem, 2010, 146(1): 368-372.
- [23] LING S M, CHEN Q A, ZHANG Y M, et al. Development of ELISA and colloidal gold immunoassay for tetrodotoxin detection based on monoclonal antibody[J]. Biosens Bioelectron, 2015, 71: 256-260.

- [24] SHEN H C, ZHANG S W, FU Q Q, et al. A membrane-based fluorescence-quenching immunochromatographic sensor for the rapid detection of tetrodotoxin[J]. Food Control, 2017, 81: 101-106.
- [25] NUÑEZ M T, FISCHER S, JAIMOVICH E. A fluorimetric method to determine tetrodotoxin[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1): 320.
- [26] NAKAYAMA T, TERAKAWA S. A rapid purification procedure for tetrodotoxin derivatives by high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1982, 126(1): 153-155.
- [27] BONTEMPS J, GRANDFILS C, DANDRIFOSSE G, et al. Binding of [<sup>3</sup>H]ethylenediamine di-tetrodotoxin to its solubilized receptor from excitable tissues. Binding measurements by rapid gel-filtration and receptor stabilization by phosphatidylcholine[J]. Arch Int Physiol Biochimie, 1984, 92(1): 39-45.
- [28] 岑剑伟, 李来好, 杨贤庆, 等. 水产品中河鲀毒素的高效液相紫外测定法[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1036-1044.
- [29] 郑雍怡, 王彦, 张计, 等. 反相离子对高效液相色谱法测定 SD 大鼠血浆中河豚毒素的含量[J]. 分析化学, 2008, 36(5): 588-592.
- [30] 刘海新, 张农, 董黎明, 等. 柱后衍生高效液相色谱法测定水产品中河豚毒素含量[J]. 水产学报, 2006, 30(6): 812-817.
- [31] ONOUE Y, NOGUCHI T, NAGASHIMA Y, et al. Separation of tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons by high-performance liquid chromatography with a fluorometric detection using o-phthalaldehyde[J]. J Chromatogr, 1983, 257(2): 373.
- [32] TANIS D, VARELTZIS P, NIKOLAIDES G A, et al. Evaluation of helically coiled and knitted open tubular reactors for the efficient post-column determination of tetrodotoxin by high-performance liquid chromatography[J]. Anal Lett, 2017, 50(2): 271-293.
- [33] SUENAGA K, KOTOKU S. Detection of tetrodotoxin in autopsy material by gas chromatography[J]. Arch Toxicol, 1980, 44(4): 291-297.
- [34] MAN C N, NOOR N M, HARN G L, et al. Screening of tetrodotoxin in puffers using gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(47): 7455-7459.
- [35] STANKOV I N, KONDRATEV V B, DEREVYAGINA I D, et al. Gas-chromatographic determination of trace amounts of tetrodotoxin in water, drugs, and blood plasma[J]. J Anal Chem, 2016, 71(3): 289-296.
- [36] 黄清发, 孙振中, 戚隽渊, 等. 河鲀毒素固相萃取-气相色谱-质谱法研究[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(6): 1058-1063.
- [37] TSAI Y H, HWANG D F, CHENG C, et al. Determination of tetrodotoxin in human urine and blood using C18 cartridge column, ultrafiltration and LC-MS[J]. J Chromatogr B, 2006, 832(1): 75-80.
- [38] BANE V, HUTCHINSON S, SHEEHAN A, et al. LC-MS/MS method for the determination of tetrodotoxin (TTX) on a triple quadrupole mass spectrometer[J]. Food Addit Contam A, 2016, 33(11): 1728-1740.
- [39] SHALABAI V V, TARANCHENKO V F, RYBAL'CHENKO I V, et al. Use of high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry for the identification and quantitative determination of tetrodotoxin in pharmaceuticals[J]. J Anal Chem, 2017, 72(6): 632-638.
- [40] JEN H, NGUYEN T A, WU Y, et al. Tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in gastropod species from Vietnam analyzed by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Food Drug Anal, 2014, 22(2): 178-188.
- [41] 骆和东, 贾玉珠, 朱宝平. 固相萃取-超过滤-液相色谱/质谱联用法测定织纹螺中的河豚毒素[J]. 色谱, 2007, 25(6): 917-921.
- [42] 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.
- [43] 严忠雍, 张小军, 李奇富, 等. 免疫亲和和柱净化-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.
- [44] GUO M M, WU H Y, JIANG T, et al. Simultaneous identification and quantification of tetrodotoxin in fresh pufferfish and pufferfish-based products using immunoaffinity columns and liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry[J]. Chin J Oceanol Limn, 2017, 35(4): 883-893.
- [45] KISHI Y, FUKUYAMA T, ARATANI M, et al. Synthetic studies on tetrodotoxin and related compounds. IV. Stereospecific total syntheses of dl-tetrodotoxin[J]. J Am Chem Soc, 1972, 94(26): 9219-9221.
- [46] SATO K I, AKAI S, SHOJI H, et al. Stereoselective and efficient total synthesis of optically active tetrodotoxin from D-glucose[J]. J Org Chem, 2008, 73(4): 1234-1242.
- [47] KOERT U. Syntheses of tetrodotoxin[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, 43(42): 5572-5576.
- [48] TSUDA K, KAWAMURA M. The constituents of the ovaries of globefish. VII: purification of tetrodotoxin by chromatography. (2)[J]. Yakugaku Zasshi J Pharmaceut Soc Jap, 1952, 72(6): 771-773.
- [49] 李晓川, 林美娇. 河豚鱼及其加工利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 13-15.
- [50] 崔建洲, 宫庆礼, 顾谦群, 等. 一种高效制备河豚毒素 (TTX) 方法的研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(4): 89-94.
- [51] 易瑞灶, 许晨, 洪专, 等. 河豚毒素高纯单体规模化制备方法: 02 121463.8[P]. 2002-12-18.
- [52] 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.
- [53] 李爱峰. 液-质联用技术分析海洋生物毒素的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005: 71-84.
- [54] 吴韶菊. 海藻希瓦氏菌 (*Shewanella alga*) 产河豚毒素 (Tetrodotoxin) 初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005: 15-20.
- [55] 岳田芳, 刘岩, 邓志科, 等. 海藻希瓦氏菌 (*Shewanella alga*) 发酵培养基条件优化的研究[J]. 生物技术, 2007, 17(6): 63-66.