

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.09.1148

海洋生物毒素检测技术研究进展

孟文琪, 裴志鹏, 冯雍炜, 孙铭学, 鄂鹏飞, 杨玉彦, 赵 杰, 肖 凯*

第二军医大学热带医学与公共卫生学系防化医学教研室, 上海 200433

[摘要] 海洋生物毒素具有分布广、毒性强及解毒难等特性, 对我国公共安全和人民健康造成极大的威胁。为了保护我国的公共安全, 保障人民健康, 对海洋生物毒素检测的研究已经越来越多。目前, 海洋生物毒素的检测方法有生物检测法、免疫分析法、液相色谱法、酶活力抑制分析法、细胞毒性试验等。本文将对海洋生物毒素检测技术的研究进展作一综述。

[关键词] 海洋生物毒素; 生物学鉴定法; 免疫测定; 液相色谱法

[中图分类号] R 836 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)09-1148-011

Recent technique development in marine biotoxin analysis and detection

MENG Wen-qi, PEI Zhi-peng, FENG Yong-wei, SUN Ming-xue, E Peng-fei, YANG Yu-yan, ZHAO Jie, XIAO Kai*

Department of Chemical Defense Medicine, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Widespread distribution, strong toxicity, and difficulty to detoxicate make marine biotoxins a great threat to the nation's public security and health. To meet this threat, great endeavor has been devoted to marine biotoxin analysis. Up to now the methods for marine biotoxins analysis include bioassay test, immunoassay, liquid chromatography, enzyme activity assay, cytotoxicity test, etc. In this review, we summarized the major technique developments in marine biotoxins analysis.

[Key words] marine biotoxins; biological assay; immunoassay; liquid chromatography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(9): 1148-1158]

海洋生物毒素是研究进展最为迅速的海洋生物活性物质, 绝大部分海洋生物毒素仅为海洋生物特有, 在陆生动物中极为罕见。海洋生物毒素对受体作用具有高选择性和高亲和性, 通常特异作用于神经和肌肉, 可兴奋细胞膜的关键靶点, 如神经系统受体或离子通道, 从而影响与受体有关的一系列细胞调控活动。海洋生物毒素有多种不同的分类方法。依据化学结构, 可分为多肽类毒素、聚醚类毒素、生物碱类毒素等; 根据最初分离得到的来源, 可分为河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)、西加鱼毒素(ciguatoxin, GTX)、芋螺毒素(conotoxin, CTX)等; 在与人类饮食密切相关的贝类毒素中, 根据毒性作用机制可将海洋毒素分为腹泻性贝毒(diarrhetic

shellfish poisoning, DSP)、麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)、神经性贝毒(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)和失忆性贝毒(amnesic shellfish poisoning, ASP)等^[1]。

由于海洋生物毒素具有分布广、毒性强及解毒难等特性, 美、日等国在第二次世界大战之前就对以海洋有毒鱼类为主的海洋生物毒素进行了广泛的调查研究, 获得了大量资料; 禁止化学武器组织也将部分海洋生物毒素如石房蛤毒素(saxitoxin, STX)列入禁止化学品的第一类清单中; 尽管目前全世界大部分国家已经签署了《禁止化学武器公约》, 但随着世界多极化格局的发展, 在复杂的国际环境下, 恐怖分子利用海洋生物毒素的威胁是明显存在的^[2]。此

[收稿日期] 2016-05-05 **[接受日期]** 2016-06-24

[基金项目] 国家科技新药创制重大专项(2013ZX09J13103-02C), 全军后勤科研项目重大子项(AWS11C004 重大子项-08), 上海市卫生和计划生育委员会公共卫生建设三年行动计划, 上海市卫生计生系统核生化支撑项目。Supported by National Science and Technology Major Project for Drug Discovery (2013ZX09J13103-02C), Sub Item of the Major Project of PLA Logistic Research (AWS11C004 sub item-08), Public Health Construction "Three-year Action" Plan of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning, and NBC Supporting Program from Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning.

[作者简介] 孟文琪, 硕士, 助教, E-mail: cbpe201201@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871771, E-mail: kaixiaocn@163.com

外,近年来海洋污染日趋严重,有害赤潮频发,直接影响了海洋产品的食用安全,存在极大的安全隐患。基于上述背景,近年来针对海洋生物毒素检测的研究进展迅猛。传统海洋生物毒素的检测方法是生物检测法,随着研究者对海洋生物毒素作用机制认识的逐渐深入,不断有新的检测方法被开发出来。本文将对海洋生物毒素检测技术的相关研究进行综述。

1 生物检测法

生物检测法主要采用小鼠生物检测法(mouse bioassay, MBA)。该方法由美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)于1980年进行了标准化,是最早用于海洋生物毒素检测的一种经典方法,其原理是将毒素注射入小鼠体内,根据注射后小鼠的存活时间和中毒症状来评价毒性,通常用鼠单位(mouse unit, MU)来表示。目前我国贝类毒素的测定标准中,MBA仍然占有较大比例,如国家标准《GB/T 5009. 212-2008 贝类中腹泻性贝类毒素的测定》和《GB/T 5009. 213-2008 贝类中麻痹性贝类毒素的测定》,行业标准《SC/T 3023-2004 麻痹性贝类毒素的测定 生物法》《SC/T 3024-2004 腹泻性贝类毒素的测定 生物法》《SN/T 1573-2005 贝类中神经性贝类毒素检验方法 小鼠生物法》等。该方法的优势在于不需要复杂的设备、有历史数据、应用广泛^[3],但也存在一定缺点与不足:只能测出毒性的大小,无法确知其组成及含量;所测得的毒性和小鼠的品系、状态、体质量等有关,不确定因素多;毒性测定结果重复性差^[4]。同时由于每年有大量小鼠被用于贝类毒素的日常检验,在学术界已引起伦理学的争论^[5]。

2 免疫分析法

免疫分析法是基于抗体与抗原或半抗原之间的高选择性反应而建立起来的一种生物化学分析法,即根据抗原-抗体反应,采用特异性抗体来检测药物、激素、蛋白质、微生物等物质的定量分析方法。免疫分析法主要包括酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、放射性免疫法、荧光免疫法等,具有方便、快速的特点,但也存在一定的缺点,如费用较高、毒素之间的交叉反应难避免、实验结果重现性较差等。

ELISA 是检测海洋生物毒素所采用的主要免疫方法。该技术可用目测,也可用酶标仪测定光密度值,具有易定性定量的优点^[6]。Tsao 等^[7]采用单克隆抗体 ELISA 检测法检测 ASP 中的软骨藻酸(domoiic acid, DA),并建立了基于单克隆抗体的胶体金免疫条检测法;该方法的检测限为 5 ng/mL,在 10 min 内就可完成测定,提示免疫条检测可用来快速检测贝类样品中的 DA。也有研究者建立了基于基因工程单链抗体竞争 ELISA 检测方法,该方法最大的优势是毒素可在大肠杆菌中快速、大量得到表达,且容易和其他小分子融合,形成融合蛋白以用于检测或其他用途;对该方法进行验证发现,其与标准高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)检测结果有较好的相关性^[8]。李军涛等^[9]建立 DSP 免疫荧光层析试纸条检测方法,灵敏度可达 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$,达到我国贝类产品中 DSP 所允许的限量。Dubois 等^[10]建立了间接竞争 ELISA 方法检测 STX,该方法用毒素的偶联物免疫产生的抗体来检测贻贝、牡蛎和扇贝中的 STX 类毒素;在检测之前,用 90% 的乙醇溶液将 STX 类毒素从贝类组织里快速提取出来,该方法的最低检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Garthwaite 等^[11]也建立了 4 类贝毒的 ELISA 方法,均可满足贝类提取物中样品的鉴定,且样品回收率较高。TTX 为氨基全氢喹啉型化合物,是自然界中所发现的毒性最大的神经毒素之一^[12]。Thattiyaphong 等^[13]建立了一种侧流免疫层析技术来实现 TTX 的快速检测,并运用该方法检测了河鲀及食用鱼中 TTX 的含量;与液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)相比,该方法的灵敏度为 94.0%,特异性为 92.4%。总的来说,侧流免疫层析技术可用于大批量样本的筛选,阳性结果的样本再使用 LC-MS/MS 进行确认,减少了 LC-MS/MS 的测试量,降低了检测成本。Reverte 等^[14]开发了一种基于双硫醇自组装单分子膜的新 ELISA 方法,该方法可用于检测河鲀中 TTX 的含量,检测限为 0.23 mg/kg,其与 LC-MS/MS 法的相关性为 0.991。

大田软海绵酸(okadaic acid, OA)是 DSP 中的主要成分,属于聚醚类海洋生物毒素,尚无致死病例,但长期摄入可以致畸及致癌^[15]。刘仁沿等^[16]通过细胞融合,制备抗 OA 单克隆抗体和胶体金标记

抗体,建立快速检测 OA 的免疫层析试纸条分析方法,该方法检出限为 500 ng/mL。该研究组在此基础上进行改进,使用卵清蛋白合成高耦联比的包被抗原,以硝酸纤维素膜为载体,改进后方法检测限达 12 ng/mL^[17]。张洋等^[18]采用自行研发的免疫胶体金试纸条对双贝壳类 DSP 的主要成分 OA 的污染情况进行调查,通过与 ELISA 检测法的结果进行比较,发现该方法检测结果准确可靠,未出现假阳性结果。Johnson 等^[19]对 4 种已经商业化的快速检测试剂盒是否可检测英国双壳贝类中的 DSP 进行验证。这 4 种试剂盒包括 1 种 ELISA 试剂盒、1 种蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 试剂盒以及 2 种侧流免疫测定 (lateral flow immunoassay, LFI) 试剂盒。实验结果表明,ELISA 与 LC-MS/MS 具有较好的相关性,且不存在结果偏大的情况,但是存在假阴性结果;2 种 LFI 试剂盒与 LC-MS/MS 检测结果大部分具有一致性,但存在假阴性结果。总的来说,选择何种方法去检测 DSP 主要取决于检测要求、实验室的条件、实验人员是否经过训练以及对结果的要求是半定量的还是定性的。

Jellett 快速检测试纸条 (Jellett rapid test strip, JRT) 是一种现场检测 PSP 的有效手段,该方法是通过样品中的 PSP 与结合到检测线上的毒素竞争结合标记的抗 STX 抗体来实现。为了达到敏感度水平,试纸条上添加的抗体总量是一定的,随着样品中毒素浓度的增加检测线逐渐消失。该方法的检测限与 MBA 相似,同时与 MBA 有很好的相关性^[20]。Costa 等^[21]将 JRT 与其他 PSP 检测法进行比较,结果表明,HPLC 适用于每一种 PSP 的检测,但是 HPLC 耗时较长、仪器要求高以及需要一定专业知识的技术人员。JRT 和受体结合分析法都是基于抗体的检测方法。JRT 是实现快速筛查的一种有效手段,但是由于该检测方法假阳性率较高,在该方法检测出阳性结果之后有必要再使用 HPLC 进一步确认,从而避免不必要的误报;受体结合分析法也可实现高通量筛查 PSP 且未发现假阳性结果,但是该方法需要放射性材料因而限制了其使用;ELISA 无法检测阿留申岛贝类中的 PSP,可能是由于阿留申岛贝类 PSP 衍生物较多,而 ELISA 法更适合毒素衍生物成分较少的贝类检测。从日常大批量检测的角度考虑,JRT 可用于现场初步筛查,接着使用受体结合分析法和 HPLC 检测结果进行确认。

适配体 (aptamer) 是单链或双链 DNA 或 RNA,是基于指数富集的配体系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX),从随机寡核苷酸库中通过多轮循环筛选所富集获得^[22]。筛选过程就是利用不同核酸序列,形成特异空间构象,通过分子间的密切适应,得到与靶分子强特异性、高亲和力结合的特异核酸分子,即适配体。与经典抗体相比,适配体具有明显的特性。现在报道的适配体靶分子既有蛋白质等生物大分子,又有燃料、金属离子、药物、氨基酸等小分子,甚至还有病毒、孢子、完整细胞等。因此,基于适配体可以建立各种生物毒素的检测技术^[23]。2013 年美国 FDA 的研究人员报道通过 SELEX 筛选出了特异结合 STX 的适配体^[24]。焦炳华教授课题组^[25]利用 STX ELISA 试剂盒 (Abraxis LLC, 产品编号: 52255B),在优化的适配体与 STX 结合缓冲液中分析适配体与 STX 的结合情况。结果发现:适配体与试剂盒中的标准 STX 和酶标的 STX 都能特异结合,并呈剂量依赖关系;适配体能阻断 STX 的溶红细胞作用,还能抑制 STX 对藜芦定和哇巴因激活的钠离子通道的阻断作用,以及延长 STX 对小鼠的毒性等。利用生物膜干涉技术测定亲和常数,发现适配体的 K_d 值为 7.44 μmol/L,通过优化适配体的序列和结构,一条预测能形成 G 四联体的序列 K_d 值为 128 nmol/L,由此得到了一条与 STX 亲和力提高了 40 倍的新适配体^[25]。该课题组还验证了 OA 适配体 OA34 也能与 OA 特异结合,并拟进一步筛选包括游离 GTX、TTX 以及与磁珠定向耦合的 GTX、BTX 等毒素的适配体^[23]。2015 年,该课题组^[26]基于 SELEX 开发了一条新的 STX 适配体 M-30f,该适配体的 K_d 值为 133 nmol/L,与之前 Handy 研究组^[24]报道的 STX 适配体 APTSTX1 相比,亲和力提高了 30 倍,有较好的应用前景。

3 酶活力抑制分析法

PP2A 酶是主要的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶,作用于磷酸酶的 α 亚单位,广泛存在于生物的细胞组织中,占细胞总蛋白质的 0.05%~0.25%。DSP 能够高效抑制 PP2A 酶的活性,造成细胞内磷酸化蛋白的急剧增加,从而改变肠细胞钠的分泌和细胞膜的通透性,导致腹泻。因此可以利用该类毒素抑制 PP2A 酶活力的特性,选择一种在酶催化反应后能

产生荧光产物的物质作为底物,依据酶反应过程中产物产生的速率来指示酶活力受抑制的程度,进而计算抑制剂的浓度。

Ikehara 研究组^[27]利用杆状病毒表达系统,通过遗传工程技术合成了人重组 PP2A 催化亚基 (recombinant catalytic subunit of human PP2A, rhPP2Ac),并定量检测了水中微囊藻素的含量^[28]。2010年,该课题组又采用 PP2A 酶抑制法检测了扇贝和贻贝中的 OA 含量^[29],结果显示该方法检测扇贝和贻贝中 OA 的检测限为 0.034 8 $\mu\text{g/g}$ 和 0.061 1 $\mu\text{g/g}$,低于欧盟标准(0.16 $\mu\text{g/g}$),且 PP2A 酶抑制法与 LC-MS 结果有较好的相关性。孙海燕等^[30]基于 DSP 抑制 PP2A 酶活性的原理构建了固定化 PP2A 酶生物传感器并对时间、pH 和温度等影响电流响应的参数进行了优化,以构建的传感器对 OA 进行检测,采取 4 参数 logistic 曲线法进行标准曲线拟合,曲线的 R^2 值达 0.994 7,拟合度较好,OA 的检测限为 10.07 $\mu\text{g/L}$,组间 RSD 为 8.3%,在 4℃ 放置 7 d 后,其响应电流为初始电流的 87%,与 HPLC 检测结果相比具有较好的相关性,可用于 OA 的快速检测。李爱峰等^[31]利用 PP2A 酶活力法检测了 3 个牡蛎样本中的 OA 含量,实验结果表明样本中不含 OA 和鳍藻毒素 (dinophysistoxin, DTX),但水解后可检出 OA 毒性,其中 2 个牡蛎水解样品的毒性当量分别为 1.81 和 1.21 $\mu\text{g/kg}$ 贝组织。Prassopoulou 等^[32]的实验结果也表明,PP2A 酶活力抑制分析法检测结果与 HPLC-荧光检测法 (fluorimetric detection, FLD) 的结果有较好的相关性。有研究者将 PP2A 酶活力测试试剂盒与其他 3 种商业化的快速检测试剂盒包括 1 种 ELISA 试剂盒以及 2 种 LFI 试剂盒进行了比较,实验结果表明,PP2A 试剂盒是唯一没有假阴性结果的方法,且与 LC-MS/MS 结果相关性较好,缺点是检测出来的毒性偏大^[19]。

4 细胞毒性试验

PSP 类毒素具有钠离子通道阻滞剂的特性,可拮抗箭毒、藜芦碱的作用,减少细胞形态的改变及细胞裂解死亡,拮抗作用与 PSP 类毒素的量呈剂量反应关系。细胞毒性试验即利用 PSP 的钠离子通道阻滞剂的特性,使用钠离子通道激活剂箭毒、藜芦碱协同开放成神经细胞瘤细胞钠离子通道,通过检测

细胞的死亡情况来判断 PSP 类毒素的毒性。早期方法是用显微镜计数活细胞数以检测 PSP 类毒素的量,检测时间长,操作烦琐。20 世纪 90 年代初,研究者对此方法进行改进,应用结晶紫对细胞进行染色,用酶标仪进行测定。该方法实现了检测的自动化,可批量检测样品,但需要对细胞染色,多次洗板,并固定、干燥、裂解细胞,仍存在操作烦琐的缺点^[33]。后来,研究者们对该方法进一步改进,用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 代替结晶紫。该方法操作简便、操作时间短、方法易掌握,不仅可检测 PSP 类毒素,还可以检测钠离子通道激活剂 NSP 和 GTX 等,检测限分别为 0.25 ng/mL 和 0.01 ng/mL^[34]。陈洋^[35]用小鼠皮肤细胞、人肝细胞、人肝癌细胞和小鼠神经瘤细胞作为受试细胞对 DSP 的重要组分 OA 和其他几种成分进行 MTT 比色细胞毒性试验,结果表明,OA 对这 4 种细胞的增殖呈显著抑制作用,且抑制作用与毒剂剂量呈正相关。

研究者们还发现细胞生物传感器可动态、实时监测细胞的新陈代谢以及细胞的激活与阻滞。2015 年,Zou 等^[36]开发了一种可检测 PSP 的细胞生物传感器,该传感器是基于成神经瘤细胞,检测限为 0.03 ng/mL,较之前的检测方法,其在灵敏度和选择性上皆有大幅提高。2016 年,Zou 等^[37]在前期研究基础上,设计了基于 HeLa 细胞和 HepG2 细胞的生物传感器,该传感器可检测 DSP 代表毒素 OA,检测限分别为 10.2 $\mu\text{g/L}$ 和 3.3 $\mu\text{g/L}$,灵敏度远高于传统的细胞测试法 (HeLa 细胞检测限为 21.2 $\mu\text{g/L}$ 、HepG2 细胞检测限为 9.8 $\mu\text{g/L}$)。

5 HPLC

生物分析法注重的是样品的毒性,在专一性和灵敏性方面存在一定的不足。化学分析方法一般以液相色谱分离原样或净提取物为基础,然后用物理化学方法进行特异性毒素检测。HPLC 是目前检测海洋生物毒素最常见的化学分析方法之一,已被包括中国在内的多个国家列为国家标准方法。HPLC 具有灵敏、准确、可靠、能确定各种毒素成分、使用广泛、易校正、所需检测的样品量少等优点。近年来随着色谱-质谱联用技术的飞速发展,HPLC-MS 及 HPLC-MS/MS 已经成为毒素分析的一种主流技术。HPLC-MS 联用技术可以不使用毒素标准品和衍生试剂,相比其他检测器具有很大的优势。

罗璇等^[38]建立了可用于微量 DSP 分析的 HPLC-MS 联用技术,并首次报道了我国近海渐尖鳍藻产毒状况,在渐尖鳍藻样品中检测到了 OA、DTX 和扇贝毒素 2(pectenotoxin 2, PTX2)等毒素成分,含量分别为 2.54、4.04 和 1.73 $\mu\text{g}/\text{cell}$ 。于慧娟等^[39]建立了 HPLC-MS 检测方法,并以虾夷扇贝和非律宾蛤仔为测试对象,对方法的有效性进行了评价。结果显示,STX、脱酰基甲酸石房蛤毒素(decarbamoyl saxitoxin, dcSTX)和新石房蛤毒素(neosaxitoxin, neoSTX)检测限为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, GTX1 ~ GTX5、脱酰基甲酸西加毒素 2(decarbamoyl ciguatoxin 2, dcGTX2)和 dcGTX3 检测限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2014 年,曹文卿等^[40]采用 HPLC-MS/MS 方法进行了河鲀鱼肝脏中 TTX 含量的快速检测研究。研究表明,该方法检测限为 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在 50 ~ 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性关系良好。该研究组还建立了 QuEChERS/LC-MS 方法^[41],该方法也可实现快速检测红鳍东方鲀肉中 TTX 的含量,采用外标法基质标准曲线定量方法的检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,检测限为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。为了能更好地完成日常监测 DA 和脂类海洋毒素的任务,McCarron 等^[42]在采用液相色谱与混合三重四极杆离子阱质谱仪联用技术的同时,还引入了选择反应监测技术和数据相关采集扫描功能,分析了 DA、OA、DTX、PTX、原多甲藻酸贝类毒素、虾夷扇贝毒素等海洋毒素。实验结果表明,该方法的检测限、灵敏度、可信度均较好。2015 年,李军等^[43]建立了快速、准确检测红鳍东方鲀中 TTX 的 HPLC-MS/MS 的分析方法,选择正离子多反应监测(MRM)模式进行 HPLC-MS/MS 测定,外标法定量。结果表明,该方法检测 TTX 在 5 ~ 100 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,检测限为 5 ng/mL ,适用于检测红鳍东方鲀中的 TTX。王丽英等^[44]建立准确、快速检测 TTX 的超高效液相色谱-串联质谱的分析方法,以了解市售烤鱼片、鱿鱼干制品和鱼丸中 TTX 的污染状况。结果市售的 107 份样品中,鱿鱼干制品和鱼丸中没有检出 TTX; 64 份烤鱼片样品中检出 16 份含有 TTX。Tsuji-mura 和 Yamanouchi^[45]建立了一种 LC-MS/MS 快速检测 TTX 的方法,该方法只需很小体积的血液就可检测出 TTX,且检测限低达 0.5 ng/mL 。Vlami-s 等^[46]通过超高效液相色谱-串联质谱首次检

测到希腊贝类中存在 TTX。

除了建立新的方法,也有研究者对已经建立的 LC-MS 方法进行了改进。STX 和大部分衍生物都是通过 LC-MS/MS 进行定性和定量。传统的前处理过程一般是在溶液中加入盐酸来萃取 STX,Harju 等^[47]认为盐酸具有较强的基质抑制效应,不适合作为萃取溶剂,通过实验发现 1% 乙酸是最佳的 STX 萃取剂;研究者还尝试了很多纯化的方法,发现最合适的方法是使用乙腈沉淀。优化后的方法可定性并定量检测 STX 及衍生物,检测结果与 HPLC-FLD 法基本一致。由于 LC-MS/MS 样品处理过程需要旋蒸等一系列操作,耗时较长,因此临床上 TTX 中毒的快速诊断一直难以实现。Saito 等^[48]使用羧基键合相和酰胺键合相的 SPE 小柱提取尿液、血浆中的 TTX,用 10% 乙酸溶液 0.1 mL 作为洗脱液洗脱柱子得到 TTX,使用 LC-MS/MS 直接分析洗脱液,避免了大量烦琐的前处理步骤。美国疾控中心合成了 15N4-STX,以此作为内标建立了一种在线固相萃取-LC-MS 联用技术,可检测人尿液中 STX 和 neoSTX。与之前报道的人工前处理相比,在线固相萃取节省了 70% 的处理时间。该方法的 STX 和 neoSTX 检测限分别为 1.01 ng/mL 与 2.62 ng/mL ^[49]。

免疫亲和柱(IAC)是一种基于抗原抗体反应的新型层析柱,利用生物大分子具有对一类生物大分子特异识别和可逆结合的特性制作而成,具有独特的选择专一性和良好的吸附净化性能。严忠雍等^[50]基于 LC-MS 的高灵敏度和精确性,利用 IAC 的独特选择识别性,建立了一种快速、简便、高效测定海洋生物中 TTX 的分析方法并应用该方法对鹰爪虾、对虾、海鳗、曼氏无针乌贼、贻贝、花蛤等共计 13 种样品进行了检测,其中织纹螺、花蛤、圆尾鲎样品中检出 TTX,浓度依次为 56.4、2.43 和 174 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实验结果表明采用 IAC 净化、LC-MS 法检测海洋生物中 TTX 的方法灵敏度高,精密度和回收率均能满足检测分析的要求。

HPLC-FLD 也是检测海洋生物毒素常用方法,通过使用衍生剂将毒素衍生成含荧光基团的物质,用荧光检测器进行检测,在毒素分子上引入荧光基团可使检测灵敏度提高。我国检测 TTX 和 PSP 的国家标准中均有 HPLC-FLD。Sayfritz 等^[51]通过 HPLC-FLD 将 STX 的检测限降低到 89 $\mu\text{g}/\text{kg}$,可

满足标准低于 313 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的要求。James 等^[52]将 DA 与荧光显色剂 NBD-F 反应,生成荧光 DA 衍生物,该方法检测限为 6 ng/g 贝类组织。Maroulis 等^[53]对该方法进行了改进,用 NBD-Cl 替换 NBD-F,结果显示改进后的方法检测限低至 25 ppb。Chan 等^[54]对该方法预处理过程进行了改进,即在 SPE 柱中加入 TiO_2 ,可以更好地吸附 DA,并探讨了最佳 pH 值。Prassopoulou 等^[32]采用 MBA、PP2A 法以及 HPLC-FLD 3 种方法,首次检测了希腊贻贝中 OA 的酯化形式,实验结果表明,3 种方法的结果具有较好的相关性,其中 HPLC-FLD 的检测限为 5.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

6 毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 法

CE 是近年来发展速度最快的高效技术之一,它是一类以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力、以样品的多特征(如电荷、大小、等电点、极性、亲和行为等)为依据的液相微分离分析技术。CE 是继 HPLC 之后的又一重大进展^[55]。

CE 技术最初为配有紫外检测器的毛细管胶束电动电泳。Li 等^[56]优化了该方法的实验条件,建立了检测 OA 与 DTX-2 的毛细管胶束电动色谱技术,该方法检测限为 3.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。李大志等^[57]通过萃取、离子交换等技术,建立了毛细管电泳/紫外检测法分析 ASP 的主要成分 DA 的方法,结果表明 DA 在 0.2~50 mg/L 时具有良好的线性关系,检出限为 0.063 mg/L 。利用该方法对 5 种经济贝类样品进行了测定,该方法简单、灵敏、高效、成本低,对 DA 的检测和监控具有重要意义。

Keyon 等^[58]将 CE 分别与电容耦合非接触电导 (capacitively coupled contactless conductivity, C4D)、FLD、UV 吸收检测和 MS 联用进行检测。考虑到氧化后的毒素是中性的,一般采用胶束动毛细管电泳法 (MEKC) 进行海洋毒素的分离检测。Keyon 等^[58]比较了 CZE-UV、CZE-C4D、CZE-MS 和 MEKC-FLD 检测 PSP 的能力,样品中 PSP 含量在 800 ng/mL 左右,CZE-UV 和 CZE-MS 在检测范围上不能满足 PSP 的检测要求,CZE-C4D 和 MEKC-FLD 的检测可基本满足要求。CZE-C4D 可在几分钟内检测出大部分样品,但是由于背景干扰过强,无法应用于 PSP 的检测。此外,由于 CZE 本身的特性使得 CZE 无法检测分离 C1 和 C2 毒素。

MEKC-FLD 可检测各种 PSP 样本包括 C1 和 C2。与 HPLC-FLD 相比,尽管 MEKC-FLD 灵敏度低,但是 MEKC-FLD 可以直接定量检测 3 种毒素,而 HPLC-FLD 一次只能检测一种毒素。MEKC-FLD 可作为一种快速大批量的筛选手段。李大禹^[59]通过 CE 法对 CTX 的 3 个不同半胱氨酸保护策略线形肽空气氧化成单环肽进行跟踪检测,得到反应动力学数据及其方程;还通过图形工作站的构相预测软件对其结构及其单环肽进行了结构预测,得到了低能量下的构象。

7 拉曼光谱法

表面增强拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS) 技术因其灵敏、快速、便携等特性,在化学恐怖物质的侦检领域逐渐受到重视。目前的便携式拉曼光谱仪一般以近红外激光为光源,仅针对样品表面做无接触、无损探测,能够提供仅与样品振动转动有关的特征性拉曼光谱,其特异性可与 MS 媲美,且谱峰清晰尖锐,更适合定量和数据库搜索,是突发事件应急检测的重要工具之一。

2008 年, Pearman 等^[60]以银纳米粒子为基底进行了 STX 的 SERS 检测,其检测限为 3 nmol/L ,定量限为 20 nmol/L ,显示出 SERS 技术在低浓度海洋生物毒素水溶液检测中的潜力。2009 年, Lin 等^[61]以平板印刷技术制得的尺寸、形状、形状可控的纳米阵列作为基底,进行了 TTX 的 SERS 检测,检测限可达 0.9 $\mu\text{g}/\text{L}$,并对 SERS 谱图的主要峰位进行了归属。2012 年, Zhu 等^[62]建立了一种全新、快速、超灵敏的对微囊藻毒素 LR 的 SERS 免疫检测方法。以金纳米棒作为 SERS 活性基底,金纳米棒通过其上配基的免疫识别富集形成链状结构,修饰在金纳米棒上的探针分子由于金纳米棒之间的热点的 SERS 增强作用而被检测。利用该法,微囊藻毒素 LR 的线性范围为 0.01~5 $\mu\text{g}/\text{L}$,最低检测限可达 5 ng/L ,具有较高的灵敏度,极具应用价值。

表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 与 SERS 均具有强烈的纳米尺寸依赖性,研究认为 SERS 与 SPR 具有一定的关联性^[63]。Campbell 等^[64]开发了分子作用仪和 SPR 技术,并用来检测藻类毒素以及新毒素——海葵毒素。结果表明,由于时间限制,分子作用仪不适用于藻类毒素以及海葵毒素的检测;SPR 技术可较好地检测

藻类毒素以及海葵毒素,该仪器还具有 GPS 芯片,可完成远程样品分析。Garibo 等^[65]通过 SPR 免疫传感器检测贻贝中的 OA,该方法只需少量的样本以及较短的时间就可检测出样本中的 OA 含量,且与 LC-MS/MS 结果有较好相关性;但该方法的主要缺点是灵敏度较低。Stevens 等^[66]建立了一个 SPR 生物传感器系统,该系统可检测贝类、藻类以及海水中 4~60 ppb 的 DA。

8 结 语

已报道的海洋生物毒素检测技术由于检测原理不一,优缺点也各不相同(表 1)。MBA 法虽然灵敏度较低且需要大量动物,但是具有可靠性强、有历史

数据、仪器要求低、使用广泛等优点。此外,MBA 法是检测不常见毒素和新毒素必需的方法。HPLC 具有准确、灵敏、可靠、能确定各种毒素成分等优点,已成为国际标准方法,是对海洋生物毒素进行准确性鉴别的有力工具。但是该方法也存在仪器设备要求较高、需要专门的技术人员等不足,在一定程度上限制了该方法的推广和运用。免疫分析法具有快速、特异性强、可实现大批量样品检测、操作简单等优点,但该方法存在交叉反应,不能全面体现出样本的毒性。研究者们陆续开发出的一些新技术如细胞毒性试验、酶活力抑制分析法、CE 法、拉曼光谱法等,各有优势,但也都还存在各自的不足之处,仍需进一步改进和完善。

表 1 海洋生物毒素检测方法的优缺点和适用环境比较

方法	优点	缺点	适用环境	文献
生物检测法	不需要复杂的设备;有历史数据;可检测毒性大小	无法确知其组成及含量;不确定的因素多;结果重复性差	水产品毒素毒性检测	[3,5]
免疫分析法				
ELISA	方便快捷;不同种类的毒素间特异性较好;易定性定量	制作费用较高;存在同类毒素间的交叉反应	水产品初步定量筛查;实验室毒素定量检测	[7,20,14]
免疫试纸条	可实现快速筛查;不同种类的毒素间特异性较好	制作费用较高;假阳性率较高;同类毒素间的交叉反应	大批量样本样品定性初步筛查	[9,17]
适配体	稳定性好;免疫原性低;易于自动化学合成	筛选适配体困难	水产品初步定量筛查;实验室毒素定量检测	[26]
酶活力抑制分析法	灵敏度较高;假阴性结果较少	仅能检测腹泻性毒素	水产品中腹泻性毒素初步定量筛查;实验室腹泻性毒素定量检测	[29]
细胞毒性试验				
细胞毒性试验	减少实验动物的使用;可在一定程度上评价毒素毒性	可检测毒素种类较少;重现性差	离子通道激动或阻断剂类毒素的实验室定量检测	[34]
细胞生物传感器	检测速度快;操作系统简单,易实现自动分析	检测稳定性低;生物识别与案件再生以及可重复利用问题无法解决	离子通道激动或阻断剂类毒素的实验室定量检测	[36-37]
HPLC				
HPLC-MS/ HPLC-FLD	灵敏、准确、可靠;能确定各种毒素成分;使用广泛、易校正;所需检测的样品量少	需要仪器较复杂;需要专门的技术人员	水产品中毒素定量检测;实验室定量检测	[44,48,50-51,53]
CE	自动化程度高;快速;缓冲液较少	制备能力差;电渗会因组成而变化,影响分离重现性	实验室定量检测	[56-57]
拉曼光谱法				
SERS	可完成现场、无损检测;测试速度快;不用制备样品	灵敏度低	现场检测	[60-61]
SPR	可实现实时检测;只需少量样品;不需要制备样品	稳定性差;检测效率偏低	生物学实时检测	[66]

ELISA: 酶联免疫吸附法; HPLC: 高效液相色谱法; MS: 质谱; FLD: 荧光检测法; CE: 毛细管电泳; SERS: 表面增强拉曼散射检测; SPR: 表面等离子体共振

海洋生物毒素毒性强烈,对国家公共安全以及人民健康构成较大威胁,因此海洋生物毒素的检测方法研究尤其重要。未来此领域的研究将主要集中于以下2个方面:一是高灵敏度、高稳定性、重复性好、普适性强的 HPLC-MS 研究。海洋生物毒素具有毒性强、半数致死量低的特点,所以建立灵敏度高、稳定性好的检测方法是海洋生物毒素检测发展的重要方向。HPLC-MS 因具有灵敏度高、专一性强、准确性高、分离效果好、结果稳定重复性好、能够全面提供毒素信息等优势,现已成为国际标准方法。另一方面则是便携性好、操作简便、抗干扰能力强、可自动调谐的适用于现场工作的 SERS 光谱仪的研制。SERS 技术以其快速、便携等特性,在海洋生物毒素的现场侦检中具有显著优势,极具开发潜力。

[参考文献]

- [1] TURNER A D, HIGGINS C, DAVIDSON K, VESZELOVSZKI A, PAYNE D, HUNGERFORD J, et al. Potential threats posed by new or emerging marine biotoxins in UK waters and examination of detection methodology used in their control: brevetoxins[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13: 1224-1254.
- [2] 高敬,郭磊,李春正,陈佳,谢剑炜. 表面增强拉曼光谱在化学恐怖物质检测中的应用进展[J]. *军事医学*, 2012, 36: 476-479.
- [3] ROSSINI G P. Functional assays in marine biotoxin detection[J]. *Toxicology*, 2005, 207: 451-462.
- [4] 吴多加,李凤琴. 软骨藻酸与人类健康关系研究进展[J]. *卫生研究*, 2005, 34: 378-381.
- [5] HESS P, GRUNE B, ANDERSON D B, AUNE T, BOTANA L M, CARICATO P, et al. Three Rs approaches in marine biotoxin testing. The Report and recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 54)[J]. *Altern Lab Anim*, 2006, 34: 193-224.
- [6] LI Y, CASSONE V M. A simple, specific high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of melatonin in cell culture medium[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28: 230-234.
- [7] TSAO Z J, LIAO Y C, LIU B H, SU C C, YU F Y. Development of a monoclonal antibody against domoic acid and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunostrip [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 4921-4927.
- [8] SHAW I, O'REILLY A, CHARLETON M, KANE M. Development of a high-affinity anti-domoic acid sheep scFv and its use in detection of the toxin in shellfish[J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 3205-3212.
- [9] 李军涛,候水平,姬泽薇,陈守义. 腹泻性贝类毒素的免疫荧光层析检测方法的初步建立[J]. *热带医学杂志*, 2015, 15: 189-192.
- [10] DUBOIS M, DEMOULIN L, CHARLIER C, SINGH G, GODEFROY S B, CAMPBELL K, et al. Development of ELISAs for detecting domoic acid, okadaic acid, and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2010, 27: 859-868.
- [11] GARTHWAITE I, ROSS K M, MILES C O, BRIGGS L R, TOWERS N R, BORRELL T, et al. Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand[J]. *J AOAC Int*, 2001, 84: 1643-1648.
- [12] YAMADA-HANFF J, BEAN B P. Activation of Ih and TTX-sensitive sodium current at subthreshold voltages during CA1 pyramidal neuron firing [J]. *J Neurophysiol*, 2015, 114: 2376-2389.
- [13] THATTIYAPHONG A, UNAHALEKHAKA J, MEKHA N, NISPA W, KLUENGLANGDON P, ROJANAPANTIP L. Efficiency of a rapid test for detection of tetrodotoxin in puffer fish [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2014, 35: 111-119.
- [14] REVERTE L, DE LA IGLESIA P, DEL RIO V, CAMPBELL K, ELLIOTT C T, KAWATSU K, et al. Detection of tetrodotoxins in puffer fish by a self-assembled monolayer-based immunoassay and comparison with surface plasmon resonance, LC-MS/MS, and mouse bioassay[J]. *Anal Chem*, 2015, 87: 10839-10847.
- [15] SCHMIDT K N, TRAENCKNER E B, MEIER B, BAEUERLE P A. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF- κ B[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 27136-27142.
- [16] 刘仁沿,梁玉波,陈冰君,许道艳,梁斌. 胶体金免疫层析方法快速检测腹泻性贝毒软海绵酸的初步研究

- [J]. 分析试验室, 2008, 27: 26-29.
- [17] 刘仁沿, 梁玉波, 陈媛, 许道艳, 陈冰君, 刘永健. 胶体金免疫层析法快速检测腹泻性贝毒软海绵酸的研究[J]. 分析科学学报, 2010, 26: 31-34.
- [18] 张洋, 贾睿, 何培民. 免疫胶体金试纸条快速检测贝类体内的腹泻性贝毒[J]. 生物技术通报, 2013, 35: 221-225.
- [19] JOHNSON S, HARRISON K, TURNER A D. Application of rapid test kits for the determination of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins in bivalve molluscs from Great Britain[J]. *Toxicon*, 2016, 111: 121-129.
- [20] LAYCOCK M V, DONOVAN M A, EASY D J. Sensitivity of lateral flow tests to mixtures of saxitoxins and applications to shellfish and phytoplankton monitoring[J]. *Toxicon*, 2010, 55(2/3): 597-605.
- [21] COSTA P R, BAUGH K A, WRIGHT B, RALONDE R, NANCE S L, TATARENKOVA N, et al. Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Islands, Alaska[J]. *Toxicon*, 2009, 54: 313-320.
- [22] RADOM F, JUREK P M, MAZUREK M P, OTLEWSKI J, JELEŃ F. Aptamers: molecules of great potential[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31: 1260-1274.
- [23] 王梁华, 胡波, 郑欣, 高顺祥, 刘德婧, 孙铭娟, 等. 建立海洋生物毒素适配体筛选与优化技术平台[C]. 全国海洋生物技术与创新药物学术会议, 2014.
- [24] HANDY S M, YAKES B J, DEGRASSE J A, CAMPBELL K, ELLIOTT C T, KANYUCK K M, et al. First report of the use of a saxitoxin-protein conjugate to develop a DNA aptamer to a small molecule toxin[J]. *Toxicon*, 2013, 61: 30-37.
- [25] 郑欣, 胡波, 高顺祥, 刘德婧, 孙铭娟, 焦炳华, 等. 石房蛤毒素(STX)适配体的鉴定与优化[C]. 全国海洋生物技术与创新药物学术会议, 2014.
- [26] ZHENG X, HU B, GAO S X, LIU D J, SUN M J, JIAO B H, et al. A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation[J]. *Toxicon*, 2015, 101: 41-47.
- [27] IKEHARA T, SHINJO F, IKEHARA S, IMAMURA S, YASUMOTO T. Baculovirus expression, purification, and characterization of human protein phosphatase 2A catalytic subunits α and β [J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 45: 150-156.
- [28] IKEHARA T, IMAMURA S, OSHIRO N, IKEHARA S, SHINJO F, YASUMOTO T. A protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition assay using a recombinant enzyme for rapid detection of microcystins[J]. *Toxicon*, 2008, 51: 1368-1373.
- [29] IKEHARA T, IMAMURA S, YOSHINO A, YASUMOTO T. PP2A inhibition assay using recombinant enzyme for rapid detection of okadaic acid and its analogs in shellfish[J]. *Toxins(Basel)*, 2010, 2: 195-204.
- [30] 孙海燕, 唐文燕, 张晓娟, 袁高峰. 基于固定化酶生物传感器检测大田软海绵酸的研究[J]. *食品科技*, 2015, 40: 321-325.
- [31] 李爱峰, 于仁成, 李钧, 唐祥海, 王云峰, 颜天, 等. 利用蛋白磷酸酶活力抑制法检测牡蛎体内的腹泻性贝毒[J]. *分析化学*, 2006, 34: 283-287.
- [32] PRASSOPOULOU E, KATIKOU P, GEORGANTELIS D, KYRITSAKIS A. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection[J]. *Toxicon*, 2009, 53: 214-227.
- [33] JELLETT J F, MARKS L J, STEWART J E, DOREY M L, WATSON-WRIGHT W, LAWRENCE J F. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated endpoint determination and standardization of the in vitro tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay[J]. *Toxicon*, 1992, 30: 1143-1156.
- [34] MANGER R L, LEJA L S, LEE S Y, HUNGERFORD J M, HOKAMA Y, DICKEY R W, et al. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts[J]. *J AOAC Int*, 1995, 78: 521-527.
- [35] 陈洋. DSP等赤潮藻毒素对哺乳类细胞的毒性效应及机制研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008.
- [36] ZOU L, WU C, WANG Q, ZHOU J, SU K, LI H, et al. An improved sensitive assay for the detection of PSP toxins with neuroblastoma cell-based impedance biosensor[J]. *Biosensors Bioelectron*, 2015, 67: 458-

- 464.
- [37] ZOU L, WANG Q, TONG M, LI H, WANG J, HU N, et al. Detection of diarrhetic shellfish poisoning toxins using high-sensitivity human cancer cell-based impedance biosensor[J]. *Sensors Actuators B Chem*, 2016, 222: 205-212.
- [38] 罗璇,于仁成,周名江.应用 LC-MS 联用方法分析青岛近海渐尖鳍藻(*Dinophysis acuminata*)细胞中的毒素成分[J].*海洋环境科学*,2014,33:781-787.
- [39] 于慧娟,蔡友琼,黄宣运,冯兵,史永富.10种麻痹性贝类毒素的固相萃取及液相色谱-串联质谱测定法[J].*海洋渔业*,2015,37:364-371.
- [40] 曹文卿,林黎明,时迪,杨桂朋.液质联用快速测定河鲀鱼肝脏中河鲀毒素含量的方法研究[J].*中国海洋大学学报(自然科学版)*,2014,44:52-58.
- [41] 曹文卿,林黎明,吴振兴,鲍蕾,梁成珠,杨桂朋. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法测定红鳍东方鲀肉中河鲀毒素[J].*分析测试学报*,2014,33:588-593.
- [42] McCARRON P, WRIGHT E, QUILLIAM M A. Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra[J]. *J AOAC Int*, 2014, 97: 316-324.
- [43] 李军,黄莲芝,孙铭英,徐静,曹际娟.超声-固相萃取高效液相色谱-串联质谱法测定红鳍东方鲀中的河豚毒素[J].*食品安全质量检测学报*,2015(1):60-64.
- [44] 王丽英,任贝贝,杨立新,刘印平,常凤启,路杨.超高效液相色谱-串联质谱法检测河鲀毒素[J].*食品安全质量检测学报*,2015,6:60-64.
- [45] TSUJIMURA K, YAMANOUCHI K. A rapid method for tetrodotoxin (TTX) determination by LC-MS/MS from small volumes of human serum, and confirmation of pufferfish poisoning by TTX monitoring[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015, 32: 977-983.
- [46] VLAMIS A, KATIKOU P, RODRIGUEZ I, REY V, ALFONSO A, PAPAZACHARIOU A, et al. First detection of tetrodotoxin in Greek shellfish by UPLC-MS/MS potentially linked to the presence of the dinoflagellate *prorocentrum minimum* [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7: 1779-1807.
- [47] HARJU K, RAPINOJA M L, AVONDET M A, ARNOLD W, SCHÄR M, BURRELL S, et al. Optimization of sample preparation for the identification and quantification of saxitoxin in proficiency test mussel sample using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7: 4868-4880.
- [48] SAITO T, MIURA N, NAMERA A, OTA S, MIYAZAKI S, INOKUCHI S. A rapid sample preparation procedure using monospin CBA and amide columns for tetrodotoxin detection in serum and urine using LC-MS/MS analysis [J]. *Chromatographia*, 2014, 77: 687-693.
- [49] BRAGG W A, LEMIRE S W, COLEMAN R M, HAMELIN E I, JOHNSON R C. Detection of human exposure to saxitoxin and neosaxitoxin in urine by online-solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Toxicon*, 2015, 99: 118-124.
- [50] 严忠雍,张小军,李奇富,王莹,柳家鹏,龙举,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*,2015,43:277-281.
- [51] SAYFRITZ S J, AASEN J A, AUNE T. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection [J]. *Toxicon*, 2008, 52: 330-340.
- [52] JAMES K J, GILLMAN M, LEHANE M, GAGO-MARTINEZ A. New fluorimetric method of liquid chromatography for the determination of the neurotoxin domoic acid in seafood and marine phytoplankton[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 871(1/2): 1-6.
- [53] MAROULIS M, MONEMVASIOS I, VARDAKA E, RIGAS P. Determination of domoic acid in mussels by HPLC with post-column derivatization using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl) and fluorescence detection [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 876: 245-251.
- [54] CHAN I O, TSANG V W, CHU K K, LEUNG S K, LAM M H, LAU T C, et al. Solid-phase extraction-fluorimetric high performance liquid chromatographic determination of domoic acid in natural seawater mediated by an amorphous titania sorbent [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 583: 111-117.
- [55] ZHOU C, LI M, SUN C, ZOU H, WU X, ZHANG L, et al. Identification of *Vibrio cholerae* serotypes in high-risk marine products with non-gel sieving capillary electrophoresis[J]. *Anal Biochem*, 2016, 494: 68-75.

- [56] LI D, SUN L, CHEN Z, HE X, LIN B. Survey of the distribution of red tide toxins (okadaic acid and dinophytoxin-1) in the Dalian Bay sea area of China by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22: 3583-3588.
- [57] 李大志, 祝文君, 宋文斌, 林炳承. 记忆缺失性贝类毒素的主要成分——软骨藻酸的毛细管电泳分析[J]. *色谱*, 2002, 20: 125-128.
- [58] KEYON A S, GUIJT R M, GASPAR A, KAZARIAN A A, NESTERENKO P N, BOLCH C J, et al. Capillary electrophoresis for the analysis of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish: comparison of detection methods[J]. *Electrophoresis*, 2014, 35: 1496-1503.
- [59] 李大禹. 芋螺毒素合成过程中的分离、检测、鉴定方法和结构预测的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2002.
- [60] PEARMAN W F, ANGEL S M, FERRY J L, HALL S. Characterization of the Ag mediated surface-enhanced Raman spectroscopy of saxitoxin[J]. *Appl Spectrosc*, 2008, 62: 727-732.
- [61] LIN W C, JEN H C, CHEN C L, HWANG D F, CHANG R, HWANG J S, et al. SERS study of tetrodotoxin (TTX) by using silver nanoparticle arrays [J]. *Plasmonics*, 2009, 4: 187-192.
- [62] ZHU Y, KUANG H, XU L, MA W, PENG C, HUA Y, et al. Gold nanorod assembly based approach to toxin detection by SERS[J]. *J Mater Chem*, 2012, 22: 2387-2391.
- [63] MCFARLAND A D, YOUNG M A, DIERINGER J A, VAN DUYN R P. Wavelength-scanned surface-enhanced Raman excitation spectroscopy[J]. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 11279-11285.
- [64] CAMPBELL K, MCNAMEE S E, HUET A C, DELAHAUT P, VILARINO N, BOTANA L M, et al. Evolving to the optoelectronic mouse for phycotoxin analysis in shellfish[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 6867-6881.
- [65] GARIBO D, CAMPBELL K, CASANOVA A, IGLESIA P D L, FERNÁNDEZ-TEJEDOR M, DIOGÈNE J, et al. SPR immunosensor for the detection of okadaic acid in mussels using magnetic particles as antibody carriers[J]. *Sensors Actuators B Chem*, 2014, 190: 822-828.
- [66] STEVENS R C, SOELBERG S D, EBERHART B T L, SPENCER S, WEKELL J C, CHINOWSKY T M, et al. Detection of the toxin domoic acid from clam extracts using a portable surface plasmon resonance biosensor[J]. *Harm Algae*, 2007, 6: 166-174.

[本文编辑] 孙岩