

假睛东方鲀肝脏中河豚毒素的分离纯化

王瑞瑞¹, 张小军^{2,3}, 曾军杰², 卢义博¹, 方双琪¹, 陈思²

(1. 浙江省海洋大学食品与药学院, 浙江舟山 316021) (2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316021)

(3. 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室, 浙江舟山 316021)

摘要: 本文主要研究分子层析柱对河鲀鱼肝脏中河豚毒素分离纯化效果, 为河豚毒素分离纯化工艺提供参考。本实验以假睛东方鲀肝脏为原料, 对肝脏中的 TTX 进行提取, 然后利用柱层析技术, 确定了中性氧化铝柱、活性炭柱、CM HF 和 D152 弱酸性阳离子交换树脂柱的上样液最适 pH、吸附率、回收率。并根据四种柱子的吸附率和净化回收率的结果综合评定, 其中 D152 弱酸性阳离子交换柱吸附率和回收率分别为 91.97% 和 93.98%, 且该柱子纯化河豚毒素的效果好, 损失率低, 最后得到产物多, 因此选择 D152 柱作为分离纯化河豚毒素粗提液纯化柱。最后以假睛东方鲀肝脏为原料, 将肝脏匀浆得到的粗提液经 D152 柱纯化分离后, 结晶析出得到河豚毒素粗品, 纯度为 80%。此研究为河豚毒素分离纯化工艺提供有益参考。

关键词: 假睛东方鲀; 河豚毒素; 分离纯化; 柱层析

文章编号: 1673-9078(2021)05-117-122

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0991

Separation and Purification of Tetrodotoxin from the Liver of *Takifugu pseudommus*

WANG Rui-rui¹, ZHANG Xiao-jun^{2,3}, ZENG Jun-jie², LU Yi-bo¹, FANG Shuang-qi¹, CHEN Si²

(1. School of Food and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China)

(2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China) (3. Key Laboratory of Sustainable Utilization Technology of Marine Fishery Resources of Zhejiang, Zhoushan 316021, China)

Abstract: The separation and purification effect of chromatographic column on tetrodotoxin was studied, which provided a reference for the separation and purification process of tetrodotoxin. The raw material for this experiment was the liver of *Takifugu pseudommus*, TTX was extracted from the liver, and the column chromatography technology by the loading of neutral alumina column, activated carbon column, CM HF and D152 weak acid cation exchange resin column was used to determine the optimal pH, adsorption rate and recovery rate of liquid. According to the results of the adsorption rate and purification recovery rate of the four columns, the adsorption rate and recovery rate of the D152 weakly acidic cation exchange column were 91.97% and 93.98%, respectively, and the column was effective in purifying tetrodotoxin with low loss rate. Finally, by D152 column the crude tetrodotoxin extract was separated and purified. The raw material was *Takifugu pseudommus* liver. The crude extract obtained from liver homogenization was purified and separated by D152 column, and then was crystallized to obtain crude tetrodotoxin with a purity of 80%. This study provides a useful reference for the separation and purification process of tetrodotoxin.

Key words: *Takifugu pseudommus*; tetrodotoxin; separation and purification; column chromatography

引文格式:

王瑞瑞, 张小军, 曾军杰, 等. 假睛东方鲀肝脏中河豚毒素的分离纯化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 117-122

WANG Rui-rui, ZHANG Xiao-jun, ZENG Jun-jie, et al. Separation and purification of tetrodotoxin from the liver of *Takifugu pseudommus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 117-122

投稿日期: 2020-10-27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1600701)

作者简介: 王瑞瑞 (1993-) 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品质量与安全

通讯作者: 张小军 (1982-) 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 水产品加工及质量安全

河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 是一种非蛋白的神经毒素, 毒性很强的生物碱^[1]。TTX 得分子结构为氨基全氢喹啉型化合物, 分子式为 C₁₁H₁₇O₈N₃, 相对分子质量为 319.30。TTX 不溶于水和有机试剂, 溶于弱酸性水溶液和醇溶液, 在强酸和强碱溶液中容易被破坏, 有机酸条件下可稳定存在。河豚毒素最早是

在河豚鱼中发现的,毒素主要分布在卵巢、肝脏、皮肤等组织中^[2]。不同生长期的河豚鱼体内毒素分布并不相同,幼年时期的河豚鱼的卵巢发育不成熟,TTX主要蓄积在皮肤中;而成年河豚鱼的主要蓄积器官是卵巢,肝脏次之^[3]。除河豚鱼外,在其他动物体内也检测到了TTX及其衍生物的存在,如蓝环章鱼^[4]、蝾螈^[5]、纽虫^[6]、织纹螺^[7]等。在日本、中国、东南亚等地常有误食河豚鱼中毒事件发生^[8],近些年来我国沿海地区也有食用织纹螺、河豚鱼导致中毒的案例,其中毒表现通常为口腔麻木感觉异常,运动性麻痹,身体不协调,言语不清,严重者出现缺氧,心率过缓,意识不清,最终因呼吸衰竭和心脏衰竭而死亡^[9]。虽然摄入过量的河豚毒素会导致肌体中毒,但它也具有重要的药用价值。河豚毒素具有高效选择性和高效亲和性,可迅速阻断神经纤维上的钠离子通道,从而抑制神经和肌肉间的兴奋传导,使神经和肌肉麻痹^[10]。河豚毒素可作用于特定的钠离子通道(VGSCs)亚型, VGSCs在疼痛中起着关键作用,河豚毒素具有高度选择性可阻断VGSCs超蛋白家族,使其在缓解疼痛方面有潜在作用^[11]。因此经过提纯的TTX也常用于镇痛、镇静和麻醉等神经性病患的治疗^[12]。

河豚毒素的生产最早起源于日本,1909年田原良纯以红鳍东方鲀的卵巢首次提取出河豚毒素粗品,并命名为河豚毒素(Tetrodotoxin)。1950年,一些日本学者横尾晃、津田恭介、河村正郎等也相继分离出河豚毒素^[13]。1958年我国上海水产研究院开始相关TTX的提取工作。70年代末,由解放军药物化学研究所与河北省水产研究所合作共同研制出生产TTX的新工艺^[14]。随着TTX的进一步研究,Noguchi^[15]等从石灰藻及毒蟹中分离出能产生TTX的细菌。Thuesen^[16]和Wu^[17]等人也从携带河豚毒素的生物体内分离到越来越多的产毒菌株。Yasumoto^[18]等人利用微生物发酵法生产得到TTX,岳田芳等人^[19]利用海藻希瓦氏菌(*Shewanella alga*)发酵得到TTX。发酵法通过产毒菌株代谢来获得TTX,在一定程度上是节省资源,减少了对环境和生态系统的破坏,但是细菌生产的TTX产量低,不能工业化发酵生产。2019年日本的Keigo Murakami等人通过一系列化学合成了一种TTX^[20],但TTX同系物种类多,结构复杂,目前人工合成TTX的方法操作难度大,合成经验不足,尚不能推广应用。TTX纯品生产工艺复杂,产量低,价格昂贵,限制了河豚毒素在医疗等领域的推广应用。本文以假睛方鲀肝脏为原料,对肝脏中的河豚毒素进行粗提,在中性氧化铝、活性炭、离子交换树脂和Bio-Gel P2凝胶柱中选取合适的纯化柱对河豚毒素粗提液进行在分离纯

化,确定分离纯化过程中柱子的最适pH、洗脱液浓度,回收率等条件,研究出一种操作简单,成本低廉,更容易大量得到河豚毒素的工艺流程。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

假睛东方鲀(*Takifugupseudommus*),2018年采购于浙江舟山、温州等地。经浙江省海洋水产研究所专家对假睛方鲀进行确认后,将鱼体解剖取出肝脏,用干净无污染的绞肉机将肝脏混合搅拌均匀后,保存在-20℃冷库中备用。

河豚毒素标准品,TTX免疫亲和柱(3 mL),江苏美正生物科技有限公司;乙腈、甲醇,Merck德国;乙酸铵、甲酸,Sigma美国;乙酸、十二水合磷酸氢二钠、二水和磷酸二氢钠、氯化钠、氢氧化钠、中性氧化铝,AR上海国药集团;CM-High Performance离子交换树脂(简称CM HF),武汉晶诚生物科技有限公司;HILIC亲水树脂,天津艾杰尔科技有限公司;Bio-Gel P2凝胶,美国Bio-Rad公司;D152离子交换树脂,上海一基实验有限公司;活性炭粉末(目数:200)。

1.2 仪器和设备

ACQUITY超高效液相色谱-质谱仪 Quattro Premier XE,美国Waters公司;氮吹仪、MS2涡旋混合器,德国IKA公司;20通道固相萃取装置,美国Supelco公司;Centrifuge5810高速离心机,德国Eppendorf公司;冷冻干燥机,美国LABCONCO公司;层析柱,武汉晶诚生物科技有限公司;旋转蒸发器,瑞士Buchi公司;Waters 600 Controller,美国Waters公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

称取5.00 mg TTX标准品,用0.10%甲酸乙腈-水溶液1:1(V/V)溶解并定容至50 mL,得到浓度为100 μg/mL的标准储备液,-20℃避光保存。用0.10%甲酸乙腈-水溶液1:1(V/V)对储备液逐级稀释,得到100、50、20、10、5、2 ng/mL的标准曲线工作溶液。

1.3.2 TTX提取方法

取匀浆好的肝脏20 g,按液料比1:3(V/W)加入1%乙酸甲醇60 mL,涡旋振荡5 min,在60℃恒温水浴锅内提取20 min,水浴过程中每5 min取出震荡一次,待样品冷却至室温,7000 r/min高速离心6 min,

取上清液, 55 °C 下旋蒸至体积不再变化, 得到假睛方鲀肝脏的粗提液。

1.3.3 样品的纯化

取 100 μg/mL 的 TTX 标准溶液, 用 1 M 氢氧化钠分别将 pH 调为 3、4、5、6、7、8, 将中性氧化铝柱 (2 g)、活性炭柱 (2 g)、CM HF 和 D152 弱酸性阳离子交换树脂树脂 (2 g) 的 4 种柱子分别用两个柱体积的纯净水活化, 随后取 1 mL 上述 TTX 标准溶液 (100 μg/mL) 进行上样吸附, 收集每个组分的淋洗液, 用高效液相色谱法-串联质谱法测定其中 TTX 含量, 计算四种柱子在不同 pH 值下的吸附率。

将装好的中性氧化铝柱 (20 g)、活性炭柱 (20 g)、CM HF (20 g) 和 D152 (20 g) 净化柱用纯水平衡 12 h。取 TTX 标准溶液 (100 μg/mL) 10 mL 用氢氧化钠 (1 mol/L) 调 pH 后上样, 流速为 1 mL/L。上样结束后, 先用纯净水淋洗两个柱体积, 然后用 1%~4% 的乙酸水溶液进行梯度洗脱, 分别洗脱两个柱体积, 流速为 1 mL/min, 收集洗脱液, 每 2 mL 收集一次。最后用高效液相色谱-串联质谱法测定不同浓度洗脱液中 TTX 含量, 并计算 TTX 在中性氧化铝柱、活性炭柱、CM HF 离子交换柱和 D152 离子交换树脂柱中的回收率。

1.3.4 色谱及质谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 初始流动相 (A:B=1:9) A: 0.10% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液, B: 乙腈; 样品室温度: 10 °C; 进样体积: 10 μL; 洗脱方式: 梯度洗脱 (0~0.50 min, 10% A, 90% B; 1.50~4 min, 60% A, 40% B; 4.50~5 min, 10% A, 90% B), 流速: 0.30 mL/min。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子扫描 (ESI⁺); 多反应检测模式; 毛细管电压: 3.50 kV; 脱溶剂气温度: 385 °C; 离子源温度: 119 °C; 锥气孔: 高纯氮气, 流速 55 L/h; 脱溶剂气: 高纯氮气, 流速 800 L/h; TTX *m/z* 320→*m/z* 302.10; 锥孔电压: 30 V; 碰撞能量: 25 V。

1.3.5 数据处理

TTX 含量以高效液相色谱法检测, 吸附率和回收率曲线由 Origin 9 进行绘制。吸附率和回收率按下列公式计算^[21]:

$$M = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100\%$$

$$N = (n_2 / n_1) \times 100\%$$

式中: M: TTX 的吸附率; m_0 : TTX 上样液浓度; m_1 : TTX 上样接收液浓度; N: 洗脱液回收率; n_1 : TTX 上样液浓度; n_2 : 柱子洗脱液浓度。

2 结果与分析

2.1 上样液 pH 对不同柱子吸附率的影响

如图 1 所示, 中性氧化铝柱在酸性条件下吸附率仅为 35% 左右, 酸性条件下 TTX 不能吸附在中性氧化铝上, 随着 pH 值的增大, 中性氧化铝的吸附能力变大, pH 值为中性时, 吸附率最大为 86.42%; 当 pH=3 时, 活性炭的吸附率最低, 几乎不吸附, 随着 pH 的增大, 河豚毒素在极性变小, 活性炭对 TTX 得吸附量逐渐增加, 在 pH=7 时吸附率最大为 92.73%。CM HF 离子交换柱对 TTX 的吸附率也随 pH 值的增大而增大, 在 pH=7 时最大为 90.15%。D152 柱在 pH=3 时对 TTX 的吸附率较低, pH=5 时, 达到最大吸附率为 91.97%, 当 pH 继续增大, 吸附力变小。综上所述, 中性氧化铝柱、活性炭柱、CM HF 和 D152 离子交换柱的最高吸附率分别为 86.42%、92.73%、90.15%、91.97%, 而此时四种柱子吸附率最高时与之相应的上样液 pH 分别为 7、7、7、5。因此, 为保证上述四种柱子能够最大吸附 TTX, 上样时中性氧化铝柱、活性炭柱和 CM HF 离子交换柱应将 pH 调为 7, D152 离子交换柱上样液 pH 应调为 5。

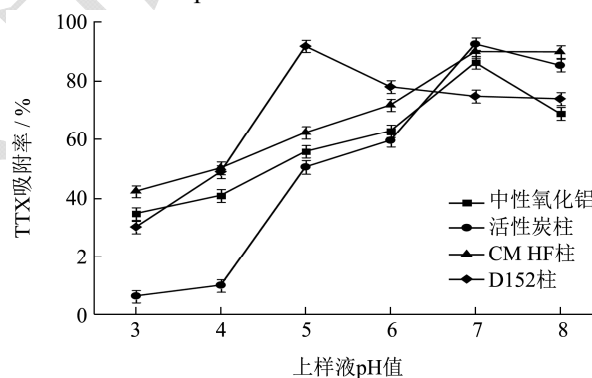


图 1 四种柱子在不同 pH 中的吸附率

Fig.1 Adsorption rates of the four columns at different pH

2.2 不同净化柱对 TTX 回收率条件的影响

假睛东方鲀肝脏粗提液中基质复杂, 含有大量的蛋白质、色素、油脂等大分子杂质, 需要通过层析柱的处理, 对河豚毒素粗提液进行分离纯化, 去除色素、蛋白质等其他杂质, 得到目标物质。本实验比较了 TTX 溶液分别在中性氧化铝柱、活性炭柱、CM HF 和 D152 离子交换柱净化时的效果, 确定不同柱子在洗脱时洗脱液的乙酸浓度, 并根据洗脱液回收率选择适合纯化河豚毒素的柱子。如图 2 所示, 中性氧化铝柱在乙酸浓度为 2%~3% 区间被洗脱出来, 在洗脱液为 2% 乙酸溶液时存在一个较大的洗脱峰, 当洗脱液乙酸

浓度为3%时仍有少量 TTX 被洗出, 计算得到中性氧化铝柱纯化时 TTX 的总回收率为 78.75%; 图 3 为活性炭柱纯化时 TTX 的回收率曲线图, 由图可知, 当洗脱液为 2%乙酸溶液时存在一个洗脱峰, 计算活性炭柱的回收率为 88.57%, 且在洗脱过程中发现有部分活性炭会进入洗脱液中, 增加后续实验难度; 图 4 为 CM HF 柱纯化时洗脱曲线, 由图可知 TTX 在洗脱液浓度为 1%乙酸溶液时较多洗脱出来, 洗脱液乙酸浓度为 2%乙酸溶液时仍有部被洗脱出来, 当浓度继续增加不再有 TTX 洗脱下来, 计算 CM HF 柱纯化时的总回收率为 83.13%; 根据图 5 中 D152 离子交换柱洗脱曲线图可知, TTX 在乙酸浓度为 3%~4%存在洗脱峰, 且测得洗脱液中 TTX 的总回收率总 93.98%。综上所述, D152 离子交换柱在在四种柱子中的回收率最高, 洗脱液浓度为 3%~4%乙酸溶液, 活性炭柱的回收率次之为 88.57%, 为减少纯化过程中有效物质的损失, D152 离子交换柱和活性炭柱更符合纯化柱的选择。中氧化铝柱和 CM HF 柱的回收率较低, 吸附率也较低, 纯化过程中容易造成有效物质的流失, 降低纯化效率, 增加纯化成本, 因此不考虑后两者进行纯化。

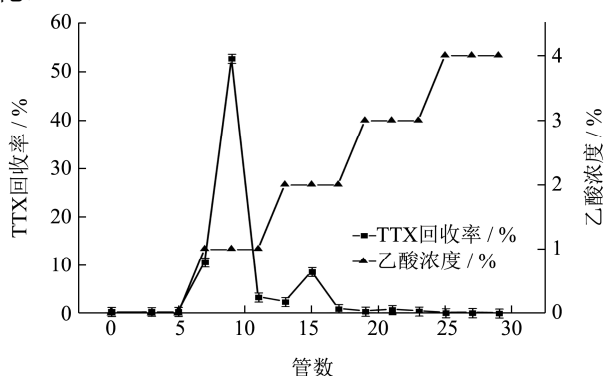


图 2 中性氧化铝柱 TTX 洗脱曲线图

Fig.2 TTX elution diagram of neutral alumina column

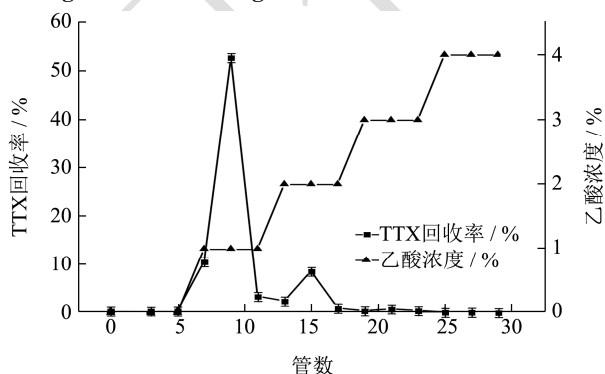


图 3 活性炭柱 TTX 洗脱曲线图

Fig.3 TTX elution diagram of activated carbon column

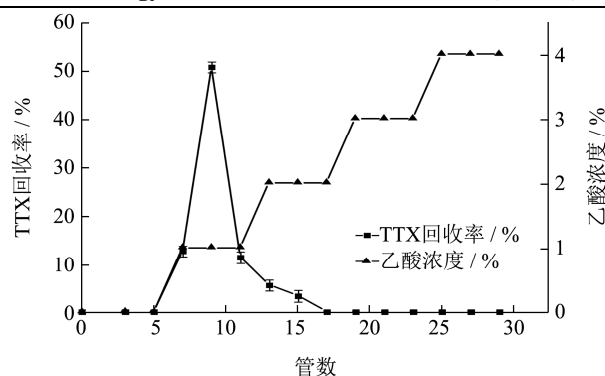


图 4 CMHF 离子交换柱 TTX 洗脱图

Fig.4 TTX elution diagram of activated carbon column

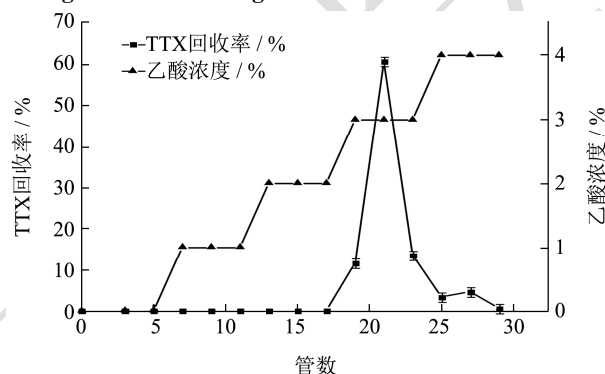


图 5 D152 离子交换柱 TTX 洗脱曲线图

Fig.5 TTX elution diagram of D152 ion exchange column

2.3 实际样品的验证

表 1 不同型号柱子测定结果对比

Table 1 The measurement results of different types of columns were compared

柱子型号	吸附率/%	洗脱率/%
中性氧化铝柱	86.42	78.75
活性炭柱	92.73	88.57
CMHF 柱	90.15	83.13
D152 柱	91.97	93.98

根据表 1 可知, 活性炭柱的吸附率最高, D152 柱的吸附率次之, 但对比两者解吸率 D152 柱的洗脱能力更强一些, 且活性炭柱在洗脱过程中会引入新的杂质, 增加了纯化的难度。在实际应用中, 净化柱的吸附率和洗脱率越高, 其有效成分损失越少, 分离效率越高, 降低了生产成本。综合以上因素, 选用 D152 离子交换柱作为河豚毒素粗提液的纯化。

河豚毒素具有镇痛、麻醉等作用, 在医学领域有重要作用, 但目前河豚毒素纯品稀少, 且价格昂贵, 使河豚毒素应用受到限制。目前河豚毒素的生成方法主要有海洋细菌生物合成法^[22]、人工合成法^[23]和以河

鲉鱼为原料的提取分离法。但微生物生产的 TTX 含量低且存在副产物较多,目前应用于实际生产较为困难;人工合成技术难度较大,且该技术尚未成熟,应用推广难度大,尚不适合工业推广。目前市场河豚毒素的主要来源还是从有毒河鲉中提取和纯化得来的。本实验选取匀浆好的假睛东方鲉肝脏 10 g,按照 1.2.3 步骤进行提取,将粗提液调 pH,然后用 D152 离子交换柱纯化得到洗脱液,最后对洗脱液浓缩,用 8%~10%的氨水调节 pH 至中性,有白色固体析出,将白色固体洗涤 3 遍,进行冷冻干燥,得到 TTX 粗品(粗品中含 TTX 及同系物),纯度达 80%。将纯化后的河豚毒素样品通过超高效液相色谱柱检测,由图 6 可知纯化后的河豚毒素粗品与河豚毒素标准品保留时间相同,是目标产物。

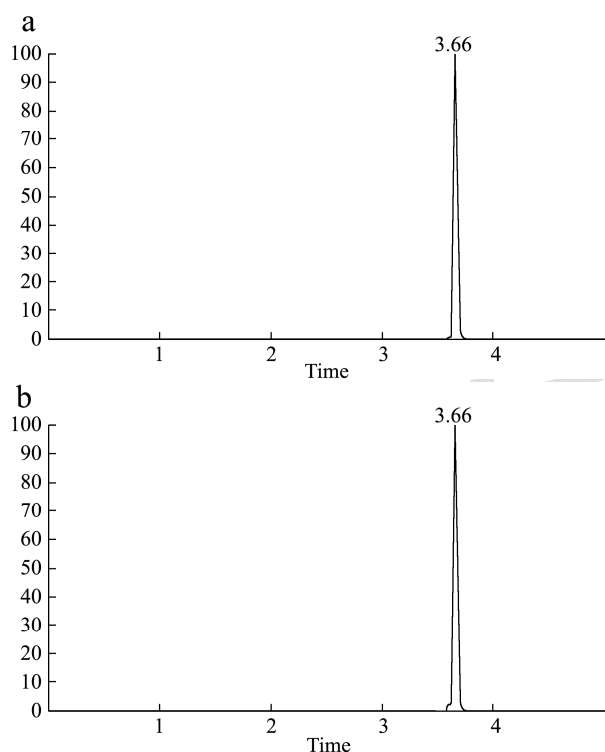


图 6 河豚毒素液相色谱图

Fig.6 Liquid chromatography of tetrodotoxin

3 结论

本实验利用层析技术对河豚毒素进行分离纯化,比较了中性氧化铝柱、活性炭柱、CM HF 柱和 D152 弱酸性阳离子交换柱分别对河豚毒素的纯化效果,最终确定 D152 离子交换柱作为河豚毒素粗提液的纯化柱,其中 D152 柱的上样液最适 pH 为 3,洗脱液为 3%~4%乙酸水溶液两个柱体积。并且经过实际样品验证得到纯度为 80%的河豚毒素粗品。通过一系列的提取,分离纯化等步骤,将肝脏粗提液中的脂类,蛋白质,色素等大分子杂质得以除去,得到白色的河豚毒

素粗品。粗品可经过进一步的分离纯化得到 TTX 纯品及 TTX 同系物纯品,此项技术有待继续研究。本实验以河鲉鱼肝脏为原料提高资源利用率,减少有毒河鲉鱼造成的环境污染,且实验操作流程简单,成本低廉,富集纯化效果好,为进一步制取河豚毒素纯品提供便捷。

参考文献

- [1] Ragelis E P. Report on Seafood Toxins [J]. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 1982, 65(2): 327-331
- [2] Noguchi T, Arakawa O, Takatani T. TTX accumulation in pufferfish [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part D Genomics & Proteomics, 2006, 1(1): 145-152
- [3] Fuchi Y, Narimatsu H, Nakama S, et al. Tissue distribution of toxicity in a Pufferfish, *Arothron firmamentum* ("hoshifugu") [J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 1991, 32(6): 520-524
- [4] Whitelaw B L, Cooke I R, Finn J, et al. The evolution and origin of tetrodotoxin acquisition in the blue-ringed octopus (genus *Hapalochlaena*) [J]. Aquatic Toxicology, 2018, 206: 114-122
- [5] Kim Y, Brown G, Mosher F. Tetrodotoxin: occurrence in atelopid frogs of Costa Rica [J]. Science, 1975, 189(4197): 151-152
- [6] Akyol O, V Ünal, Ceyhan T, et al. First confirmed record of *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in the Mediterranean Sea [J]. Journal of Fish Biology, 2005, 66(4): 1183-1186
- [7] Jeon Joong Kyun, Harita Hiroko, Nara Masato, et al. Occurrence of tetrodotoxin in a gastropod mollusk, "araregai" *Niotha clathrata* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1984, 50(12):2099-2102
- [8] Gao W, Kanahara Y, Yamada M, et al. Contrasting toxin selectivity between the marine Pufferfish *Takifugu pardalis* and the freshwater Pufferfish *Pao suvatii* [J]. Toxins, 2019, 11(8): 470
- [9] How C K, Chern C H, Huang Y C, et al. Tetrodotoxin poisoning [J]. American Journal of Emergency Medicine, 2003, 21(1): 51-54
- [10] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Paralytic shellfish poisons biological method final action [J]. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, 1995, 61(3): 23-32
- [11] Paula A, Louzao M, Alvaro A, et al. Acute oral toxicity of tetrodotoxin in mice: determination of lethal dose 50 (LD50)

- and no observed adverse effect level (NOAEL) [J]. *Toxins*, 2017, 9(3): 75-81
- [12] 邓兴朝,陈欢,陈静,等.河豚毒素对敏感性钠离子通道的作用及其与疼痛的关系[J].*生物化工*,2019,5(1):127-131
DENG Xing-chao, CHEN Huan, CHEN Jing, et al. The effect of tetrodotoxin on sensitive sodium channels and its relationship with pain [J]. *Biochemical Engineering*, 2019, 5(1): 127-131
- [13] 李晓川,林美娇.河豚鱼及其加工利用[M].中国农业出版社, 1998
LI Xiao-chuan, LIN Mei-jiao. *Puffer Fish and Its Processing and Utilization* [M]. China Agriculture Press, 1998
- [14] 潘心富,单国强.河豚毒素[J].*河北水产科技*,1981,2:63-75
PAN Xin-fu, SHAN Guo-qiang. Tetrodotoxin [J]. *Hebei Fisheries Science and Technology*, 1981, 2: 63-75
- [15] Noguchi T, Jeon J K, Arakawa O, et al. Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of axanthid crab, *Atergatis floridus* [J]. *Journal of Biochemistry*, 1986, 99(1): 311
- [16] Thuesen E V, Kogure K, Hashimoto K, et al. Poison arrowworms: a tetrodotoxin venom in the marine phylum Chaetognatha [J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 1988, 116(3): 249-256
- [17] Wu Z, Xie L, Xia G, et al. A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes* [J]. *Toxicon*, 2005, 45(7): 851-859
- [18] Yasumoto T, Nagai H, Yasumura D, et al. Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1179(1): 44-51
- [19] 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*,2007,6:63-66
YUE Tian-fang, LIU Yan, DENG Zhi-ke, et al. Study on the optimization of fermentation medium conditions for the seaweed *Shewanella alga* [J]. *Biotechnology*, 2007, 6: 63-66
- [20] Murakami K, Toma T, Fukuyama T, et al. Total synthesis of tetrodotoxin [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(15): 6253-6257
- [21] 陈乃富,张莉,韩邦兴,等.大孔树脂柱层析法纯化蕨菜总黄酮的工艺条件研究[J].*食品与发酵工业*,2007,33(4):141-144
CHEN Nai-fu, ZHANG Li, HAN Bang-xing, et al. Study on the technological conditions for purification of total flavonoids from *Pteridium aquilinum* by macroporous resin column chromatography [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(4): 141-144
- [22] Noguchi T, Hwang D F, Arakawa O, et al. Tetrodotoxin-producing ability of bacteria isolated from several marine organisms [J]. *Toxicon*, 1988, 26(1): 34-34
- [23] Kishi Y, Fukuyama T, Aratani M, et al. Synthetic studies on tetrodotoxin and related compounds. IV. stereospecific total syntheses of DL-tetrodotoxin [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1972, 94(26): 9219-9221

(上接第 144 页)

- [11] 沈月,高美须,杨丽,等.中国主栽青辣椒品种鲜切加工适宜性评价[J].*农业工程学报*,2016,32(增 2):359-368
SHEN Yue, GAO Mei-xu, YANG Li, et al. Suitability analysis of fresh-cut vegetable processing for twenty main green capsicum cultivars in China [J]. 2016, 32(supp.2): 359-368
- [12] 高佳,朱永清,罗芳耀,等.华南型黄瓜鲜切加工适宜性的对比分析[J].*现代食品科技*,2018,34(12):45-52
GAO Jia, ZHU Yong-qing, LUO Fang-yao, et al. Comparative analysis on the suitability of fresh-cut vegetable processing for south China ecotypic cucumber [J]. 2018, 34(12): 45-52
- [13] 冉茂林,刘独臣,叶仁礼,等.加工萝卜品种筛选与加工特性研究[J].*江西农业学报*,2013,25(3):42-45
RAN Mao-lin, LIU Du-chen, YE Ren-li, et al. Study on screening of processing-type radish varieties and their processing features [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2013, 25(3): 42-45
- [14] 路昭亮,刘李旺,龚义勤,等.萝卜干物重和可溶性总糖含量的遗传分析[J].*南京农业大学学报*,2009,32(3):25-29
LU Zhao-liang, LIU Li-wang, GONG Yi-qin, et al. Genetic analysis of dry matter weight and total soluble sugar contents in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2009, 32(3): 25-29