

國立臺灣海洋大學食品科學系碩士班
專題討論書面報告

探討不同分析方法對西卡毒素 (CTX) 及其同
類物之定性、定量及結構分析

授課老師：宋文杰 老師

黃崇雄 老師

指導老師：黃登福 老師

學 生：林佩宜 (5103)

學 號：10932023

報告日期：109 年 11 月 18 日

內容 40%	時間掌控 10%	表達能力 30%	投影片 10%	書面資料 10%

指導教授簽名：_____

探討不同分析方法對西卡毒素 (CTX) 及其同類物之定性、定量及結構分析

林佩宜 (5103)

2020/11/18

大綱

一、前言

二、高靈敏度和實用的三明治螢光酵素連結免疫吸附測定法測定西卡毒素

三、使用液相層析串聯質譜儀分析大西洋沿岸受污染魚類樣品中的西卡毒素

四、使用液相層析串聯高解析質譜儀 (LC-HRMS) 和化學衍生化策略闡述加勒比海西卡毒素的結構

五、結論

摘要

西卡魚中毒 (Ciguatera fish poisoning, CFP) 是熱帶和亞熱帶地區的重要議題，儘管在魚類中觀察到的許多西卡毒素 (Ciguartoxin, CTX) 的確切前驅物尚不清楚，但已確定與 CFP 有關的毒素來源與 *Gambierdiscus* 相關。迄今描述的所有 CTX 在其梯形結構以及生物合成來源方面都顯示出相似之處，這些聚醚毒素在自然界中的結構變異性仍然知之甚少，因為即使在高毒性魚類中也僅存在低濃度，使得分離、鑑定和了解其化學特性變得困難。以三明治螢光酵素連結免疫吸附測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測定 CTX，因 CTX 同類物兩末端不同的殘基使其能與不同的 mAbs (Monoclonal antibody, mAbs) 特異性結合，藉由不同 mAbs 組成的酵素抗體複合物進行 ELISA 分析，依測得的螢光強度分辨 CTX 之同類物。以液相層析串聯質譜儀 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 對 CTX 進行定性及定量分析，以正相及逆相固相萃取 (Solid phase extraction, SPE) 機制純化樣品。以 15 克組織作為樣本量並增加離心步驟，可降低基質效應、減少乳狀液，以達到提高回收率及靈敏度的目標。正相 SPE 的梯度沖提使分析物回收率達到 77.2%；逆相 SPE 的梯度沖提使回收率達到 69.3%，包括信號抑制在內，整個 LC-MS/MS 測得回收率為 57.6%。LC-HRMS 探討了 CTX-1/2 的化學衍生化作用，此外也鑑定了 CTX-3/4 之結構。以 N2A 細胞進行細胞存活率分析試驗 (N2A MTT assay, MTT-N2A)，其中 O/V 致敏細胞用於評估 CTX、非 O/V 致敏細胞用於評估樣品萃取物誘導的非特異性活性、CTX3C 系列稀釋液用於繪製標準曲線。經液相層析串聯高解析質譜儀 (Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, LC-HRMS) 分析可推斷羥基化的大概位置；對於 1/2 和兩個 m/z 1143.6463 類似物在三個特定 m/z 處均觀察到較小的 q_{11} 、 q_{12} 和 q_{13} 離子，表明其結構包含一個開放的 N 環；以高碘酸鹽裂解 1/2 及 3/4 的產物可得知，1/2 及 3/4 皆具有末端二醇基，綜合上述各分析結果，可對 CTX-1/2 及 CTX-3/4 進行化學結構之鑑定。比較 CTX 之檢測方法，ELISA 之偵測極限較 LC-MS/MS 低，而 LC-MS/MS 較 ELISA 省時，兩者皆對 CTX 具有高特異性。

一、前言

西卡魚中毒 (Ciguatera fish poisoning, CFP) 由食用累積了西卡毒素 (CiguaToxins, CTX) 的各種魚類所引起。CTX 主要存在於太平洋、加勒比海和印度洋地區，並被分類為太平洋 P-CTX、加勒比海 C-CTX 和印度洋 I-CTX (Lewis, 2000)。CFP 造成的症狀包括胃腸道、心血管和神經系統疾病，可能持續數月甚至數年，據估計，全球每年有超過 5 萬人患有 CFP，使其成為最常見的非細菌性食物中毒類型之一 (Scheuer, 1994; Lewis, 2001; Dickey and Plakas, 2010)。CTX1B 被認為是毒性最高的同類物，美國食品和藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 對太平洋地區魚類中 CTX 發布了 0.01 ppb CTX1B 當量毒性的濃度限制，然而聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, UNFAO) 和世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 等官方組織則尚未發布魚類中 CTX 的法規限制 (Dickey and Plakas, 2010)。

迄今為止，已開發了多種檢測 CTX 之分析方法，如傳統小鼠生物測定法 (Yasumoto *et al.*, 1984)、神經母細胞瘤細胞試驗 (Manger *et al.*, 1995)、酵素連結免疫吸附測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (Tsumuraya *et al.*, 2014)、放射性和螢光受體結合測定 (Poli *et al.*, 1997; Dechraoui *et al.*, 1999; Hardison *et al.*, 2016)、高效液相層析 (High performance liquid chromatography, HPLC) (Yasumoto *et al.*, 1995)、質譜法 (Mass spectrometry, MS) (Lewis and Jones, 1997; Lewis *et al.*, 1999; Yasumoto *et al.*, 2000) 和液相層析串聯質譜儀 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) (Hamilton *et al.*, 2002^a; Hamilton *et al.*, 2002^b; Lewis *et al.*, 2009; Otero *et al.*, 2010; Yogi *et al.*, 2011; Yogi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015; Diogene *et al.*, 2017)、高解析質譜儀 (High resolution mass spectrometry, HRMS) (Silva *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2017) 等。本報告探討了使用 LC/MS/MS、LC-HRMS 及 ELISA 進行 CTX 同類物之定性、定量及結構分析。

二、高靈敏度和實用的三明治螢光酵素連結免疫吸附測定法測定西卡毒素

CTX 之結構為 3 nm 長的梯形多環醚 (Yasumoto and Murata, 1993; Michio and Yasumoto, 2000; Yasumoto, 2001)，CTX1B 及其同類物 (Fig. 1) 對哺乳動物具有高毒性。本篇作者認為基於抗體的免疫分析法可提供 CTX 準確、靈敏、簡易和便攜的檢測方法，因此作者製備了幾種針對 CTX 任一側的四種特異性單株抗體 (mAbs；10C9、3D11、8H4 和 3G8) (Fig. 2)。此外，還建立了一種三明治 ELISA，利用兩種不同的 mAbs 特異性結合 CTX 的兩個側翼，藉此檢測 CTX 及其同類物。

本研究將 8H4、3G8、3D11 及 10C9 四種不同的 mAbs 分別與 ALP 結合。依目標物不同使用不同 mAbs 塗佈的 ELISA 微盤及 mAb-ALP 複合物，並於檢測 54-deoxyCTX1B 及 CTX3C 時以免疫反應增強劑取代樣品稀釋緩衝液。除上述四個 CTX 同類物外，還依照 ELISA 分析步驟分析了其他海洋毒素。為提升檢測的方便性，本研究以 3G8 及 10C9 mAbs 塗佈 ELISA 微盤，製備了單個

ELISA 試驗其可同時檢測四個 CTX 同類物。此外，為確認此 ELISA 的適用性，進行了標準添加試驗，於未受污染的樣品中添加 CTX1B 標準品，經萃取純化後，取最終萃取物進行 ELISA 分析。在萃取純化對基質效應之影響的評估試驗中，分為兩種方法，一是於樣品中添加 CTX1B，接著取每步驟之萃取物進行 ELISA 分析，二是於每步驟之萃取物中加入 CTX1B 後進行 ELISA 分析。於四種 mAbs 檢測 CTX 之實驗中使用 3G8 塗佈 ELISA 盤，並以鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 與 mAbs 8H4 結合，以 2'-[2-Benzothiazoyl]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate (BBTP) 作為螢光基質，檢測 CTX1B (Fig. 3) 其偵測極限為 0.16 pg/mL、定量極限為 0.49 pg/mL。另外，以 10C9 塗佈 ELISA 盤與 8H4-ALP 複合物檢測 51-HydroxyCTX3C (Fig. 4A)，偵測極限為 0.1 pg/mL、定量極限為 0.3 pg/mL。然而以 10C9 塗佈 ELISA 盤與 3D11-ALP 複合物檢測 CTX3C 之偵測極限約為 2 pg/mL，且背景值高，推測可能因 3D11 對 CTX3C 的親和力較差 (Oguri *et al.*, 2003)，於 ELISA 微盤中加入免疫反應增強劑，發現偵測極限降低為 0.090 pg/mL、定量極限為 0.27 pg/mL (Fig. 4B)。以 3G8 塗佈 ELISA 盤與 3D11-ALP 複合物檢測 54-deoxyCTX1B，並於 ELISA 中添加免疫反應增強劑，可顯著改善偵測靈敏度，偵測極限為 0.11 pg/mL、定量極限為 0.32 pg/mL (Fig. 4C)。

由螢光三明治 ELISA 之交叉反應試驗之結果可觀察到其他海洋毒素與此 ELISA 分析並無交叉反應 (Fig. 5)，且對其他 CTX 同類物的特異性之實驗結果顯示，每種 ELISA 皆嚴格區分 CTX1B 及 CTX3C 兩種不同系列之 CTX (Fig. 6)，mAb 3G8 特異性識別 CTX1B 和 54-脫氧 CTX1B (Fig. 6A、D)，而 mAb 10C9 特異性識別 CTX3C 和 51-hydroxyCTX3C (Fig. 6B、C)。此外，與 ALP 結合的 8H4 於 M 環羥基的缺乏之情況下仍可識別 CTX 的右翼 (Fig. 6A、C) (Oguri *et al.*, 2003; Tsumuraya *et al.*, 2006; Tsumuraya *et al.*, 2010; Tsumuraya *et al.*, 2012; Tsumuraya *et al.*, 2014)。

於單個 ELISA 試驗同時檢測四個 CTX 同類物之實驗中，以 10C9 和 3G8 的混合物塗佈 ELISA 微盤，並以 8H4-ALP 複合物作為檢測抗體檢測 CTX1B，結果顯示其他三個同類物可同時被檢測，且隨著濃度變化，這些同類物提供了相似的螢光強度曲線 (Fig. 7)。於 ELISA 適用性評估試驗中，將含有 0.01ppb CTX1B 的樣品以 ELISA 分析，最終萃取物及其 10 倍稀釋液中 CTX1B 之濃度分別為 17 pg/mL 和 20 pg/mL。此結果顯示 CTX1B 之回收率分別為 34% 和 40%，證實 ELISA 能可靠地檢測到魚肉中的 CTX1B。於基質效應評估試驗中，方法一各步驟收集之萃取物經 ELISA 分析後 CTX1B 濃度依序為 2.3 pg/mL (回收率為 9%)、2.5 pg/mL (回收率為 10%)、2.7 pg/mL (回收率為 11%) 和 8.0 pg/mL (回收率為 32%) 在萃取過程的早期階段，檢測到的 CTX1B 濃度顯著降低至最初添加濃度的 10%。方法二將各步驟之萃取液添加 CTX1B 後進行 ELISA 分析，其濃度依序為 3.2 pg/mL、5.3 pg/mL、7.7 pg/mL 和 25 pg/mL，分別檢測到添加的 CTX1B 的 13%、21%、31% 和 100%。

綜合上述分析可知，本研究開發出的高靈敏度螢光三明治 ELISA 可準確檢測出四個主要的 CTX 同類物，且與相關的海洋毒素無交叉反應。此螢光三明治 ELISA 之偵測極限 (LOD) 小於 1 pg/mL，證實了其高靈敏度，且只需進行簡單萃取即可檢測被 CTX1B 污染的魚。

三、使用液相層析串聯質譜法分析大西洋沿岸污染魚類樣品中的西卡毒素

CTX 為熱和 pH 穩定的親脂性聚醚化合物，以大型藻類作為食物網中動物群的傳播媒介，引起毒素生物累積和代謝轉化 (Lewis and Holmes, 1993)。本研究的目的為使用 LC-MS/MS，分析大西洋沿岸受污染魚樣品中的 CTX。

本研究根據 Yogi 等人最初提出的條件進行樣品預處理之優化，經正相 (Florisil) 及逆相 (C18) 固相萃取 (SPE) 機制純化樣品，去除干擾值。LC-MS/MS 分析根據兩種不同的方法進行，第一種方法以穩定性高的 $[M+Na]^+$ 作為前驅物離子及產物離子，監測特定離子的鈉結合物。為使所有化合物之分析達最佳靈敏度，於正電離化模式下分析 CTX，同時進行了離子源及介面條件的優化與調整。第二種方法用於 CTX 之定性分析，樣品經多重反應監測 (MRM) 模式分析，以 $[M+H-H_2O]^+$ 作為前驅物離子，監測三種脫水離子和兩個 C-CTX1 碎片。

通過標準添加法的回收率實驗評估萃取效率，進行樣品預處理時，以 15 克組織作為樣本量可最大程度地降低基質效應，萃取過程中增加了離心步驟，可減少乳狀液，提高分析物回收率及靈敏度。Florisil SPE 的梯度沖提使分析物回收率提高到 77.2%，且與基質脂質分離效果較佳；C18 SPE 沖提之回收率達到 69.3%。通過與純溶液標準品進行比較，評估了整個純化步驟，在標準添加樣品中的回收率為 56.7% (Table 1)。

本研究使用 CTX1B 標準品添加到未經污染的魚組織以 SPE 預處理魚萃取物，評估基質對質譜的影響。於 C18 SPE 預處理的最終沖提液加入已知量的 CTX1B，並通過 LC-MS/MS 分析。將標準品添加試驗的信號強度與相同濃度下的純標準品進行比較，觀察到 22% 的信號抑制，包括信號抑制在內的整個 LC-MS/MS 分析的回收率相當於 57.6%。

於 LC-MS/MS 中第一種方法使用了含有甲酸銨和甲酸改性劑的甲醇-水流動相，產生高強度 $[M+Na]^+$ 離子，通過 MRM 選擇高度穩定的 $[M+Na]^+$ 作為前驅物離子和產物離子，簡化了 CTX 類似物的鑑定和定量。使用此方法可提升靈敏度進而減少進樣量和相關的基質效應。透過滯留時間的比較，使用參考標準鑑定 CTX 類似物 (Fig. 8)。在 0.28-27.88 ng/mL ($R^2 = 0.999$) 的濃度範圍內評估 CTX-1B 的線性關係 (Fig. 9)。通過在九個不同日期注射的斜率變化對穩定性進行最低限度評估，並且隨時間觀察到靈敏度的增加。第二種方法使用 CTX-3C 作為來源和介面條件的優化，實驗結果得知 $[M+NH_4]^+$ m/z 1128.6 是 CTX-1B 檢測到的主要離子、CTX-3C 為 $[M+H]^+$ m/z 1023.6、C-CTX1 為 $[M+H-H_2O]^+$ m/z 1123.6，因此選擇 $[M+H-H_2O]^+$ m/z 1123.6 於多重反應監測分析中監測 C-CTX1。在高能量碰撞獲得的 C-CTX1 的 MS/MS 數據顯示，C-CTX1 的 N 環可能是七元環，並獲得 C-CTX1 結構片段 (Fig. 10)。Table 2 列出使用 LC-MS/MS 量

化這些樣品的結果，該表顯示 E1、S1 和 P1 樣品與 CFP 爆發有關。依照第一種方法進行鑑定和定量，樣品經由 MRM 後 C-CTX1 的滯留時間與純標準溶液一致 (Fig. 11)，其濃度範圍為 0.12-0.78 ng C-CTX1/g。使用第二種方法監測 C-CTX1 脫水離子的 m/z 差異， $[M+H-H_2O]^+$ m/z 1123.6、 $[M+H-2H_2O]^+$ m/z 1105.6、 $[M+H-3H_2O]^+$ m/z 1087.6、 $[M+H-4H_2O]^+$ m/z 1069.6，及 C-CTX1 片段 m/z 108.9 和 m/z 191.1，前驅物離子/產物離子的滯留時間和波峰面積比與 C-CTX1 純標準溶液結果一致，證實受污染物與 CTX 類似物的關聯。使用本研究改善過後的 LC-MS/MS 條件鑑定 N2A 試驗中類 CTX 陽性分餾液中於 m/z 1181.7 處之突出離子，其質量對應於 C-CTX 水合物與鈉的結合物離子碎片。在 MS/MS 實驗中證實了 m/z 1181.7 處之離子化合物是 C-CTX1 的水合物 (Fig. 12)。

綜上述分析可知，本研究使用的質譜條件以及加成物和碎片的監測有助於提高靈敏度，且確認了 C-CTX1 為加納利群島受污染樣品中主要的 CTX 類似物。本研究也證實了在 m/z 1181.7 處檢測到離子為 C-CTX1 的水合物。

四、使用液相層析串聯高解析質譜儀 (LC-HRMS) 和化學衍生化策略闡述加勒比海西卡毒素的結構

西卡魚中毒是熱帶和亞熱帶地區的一個重要問題，目前已對 C-CTX1 及 C-CTX-2 進行了結構測定 (Fig. 13) (Lewis *et al.*, 1998)。本研究之目的為分析 C-CTX-1 和 C-CTX-2 的質譜碎裂，以建立碎裂機制，並應用於 C-CTX-3/-4 異構體的結構測定 (Vernoux and Lewis, 1997; Pottier *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2012)。

萃取煮過的均質肌肉組織樣品，以 MTT-N2A 進行毒性評估，選擇具有 CTX 特異性活性超過 2.6 $\mu\text{g/kg}$ CTX3C eq. 的高毒性樣品進行大規模萃取 (Robertson *et al.*, 2014)。藉由 LC-MS 定量，選擇豐度最高的 C-CTX-1/-2 以及 C-CTX-3/-4 萃取物做進一步的儀器分析和化學反應。以 *Scomberomorus cavalla* 及 *Sphyrna barracuda* 製備參考物質，將其重新潤濕萃取後通過 LC-HRMS 分析，以驗證 C-CTX-1/-2。將 N2A 細胞繼代培養至達到穩定的生長速率和細胞活性 (>95%)，在培養基中用 O/V 處理細胞，接著以 CTX3C 標準品、C-CTX 陽性和陰性魚類參考物質和 SPE 分離的魚類萃取物處理細胞，OD_{570 nm} 測 5 分鐘內之吸光值。

用水稀釋甲醇萃取物後進行分餾，0-5 分鐘收集第一個分餾液，接著每 30 秒收集一次分餾液 (#2-#8)，CTX-1/-2 是分餾液 #5 的主要成分，CTX-3/-4 是分餾液 #2 的主要成分。於 #5 的等分試樣中分別添加固體硼氫化鈉及硼氫化鈉進行化學反應後加入乙酸水解剩餘的硼氫化物及硼氫化物，接著以 LC-HRMS/MS 分析混合物，探討硼氫化物還原 C-CTX-1/-2 的化學反應。取分餾液 #2 和 #5 進行高碘酸鹽氧化試驗，以 LC-HRMS/MS 進行結構分析。

在魚類參考物質與樣品萃取離子層析圖中約 10.3 分鐘處產生一個共析峰，於 HRMS 質譜圖中可觀察到 $[M-H_2O+H]^+$ 、 $[M+H]^+$ 及 $[M+NH_4]^+$ 之 m/z 分別為 1123.6225、1141.6326 及 1158.6594。魚類參考物質和魚樣品中 C-CTX-1/-2 的產物離子質譜圖，證實了魚樣品中 C-CTX-1/-2 的存在 (Fig. 14)。根據魚組織

中發現的一對化合物全掃描質譜圖推測其為 CTX， $[M+H]^+$ 的 m/z 為 1143.6463。對於 C-CTX-1/-2 m/z 1123.6463 及 C-CTX-3/-4 m/z 1143.6463 在 m/z 807.4297、877.4716 和 979.5395 處均觀察到較小的 q_{11} 、 q_{12} 和 q_{13} 離子 (Fig. 15, Fig. 16)，表明其結構包含一個開放的 N 環 (Fig. 13)。在所有含 C-CTX-1 和 C-CTX-2 的魚萃取物中均觀察到 m/z 1143.6463 化合物，分別命名為 C-CTX-3 和 C-CTX-4。

硼氫化鈉與含有 C-CTX-1/-2 且不含有 C-CTX-3/-4 的分餾液反應，同時出現了兩個清晰的尖峰，其滯留時間與 MS 和 MS/MS 光譜特徵都跟 C-CTX-3/-4 相同 (Fig. 17, Fig. 18)。LC-HRMS 與 *Sphyræna barracuda* 萃取物的直接比較證實了 C-CTX-1/-2 硼氫化物還原產物與天然的 C-CTX-3/-4 相同，此結果表明 C-CTX-1/-2 經硼氫化物還原後生成一對差向異構體 C-CTX-3/-4 (Fig. 17)。比較使用 C18 層析管柱於酸性及中性流動相中圖譜之峰形，可看出酸性條件加速了 C-CTX-1/-2 於管柱中的平衡，C-CTX-3/-4 則不受影響 (Fig. 19, Fig. 20)。用硼氫化物取代硼氫化物還原魚萃取物中的 C-CTX-1/-2，其產物 (5/6) 滯留時間與天然的 C-CTX-3/-4 相同 (Fig. 21)，但提供更高 m/z 的 $[M+H]^+$ 離子 (Table 3)。此外，5/6 的 $p_{2'}$ 、 $s_{3'}$ 、 $q_{3'}$ 、 $s_{7'}$ 和 $q_{7'}$ 型離子之質量相對於 C-CTX-3/-4 均較高，而 q_{11} 、 q_{12} 和 q_{13} 離子則不受影響 (Fig. 22, Fig. 23)，因此， $NaBD_4$ 反應證實了還原發生在分子的 N 環上。對含 C-CTX-1/-2 的分餾液用高碘酸鹽處理，產生兩個主要反應產物，其 m/z 分別為 1127.6202 (7) 和 1109.6097 (8)，產物 7 的元素組成與 C-CTX-1/-2 的差異相當於 CH_2 的淨損失，表明在 C-CTX-1/-2 的末端存在二醇基。C-CTX-3/-4 與高碘酸鹽的反應生成產物 9，主要提供 m/z 1111.6258 和 1093.6176 的 $[M+H]^+$ 和 $[M-H_2O+H]^+$ 離子，表明了 C-CTX-3/-4 中存在末端二醇基團 (Fig. 17)。

綜上述分析可知，在 LC-HRMS/MS 中，C-CTX 是一種用來定性產物的離子，該分析適用於新 C-CTX 同類物的結構鑑定。此類數據與一系列化學反應的結合使新的 CTX 類似物的結構得以被確定。

五、結論

1. CTX 檢測方法中，ELISA 分析法相對於 LC-MS/MS 分析法具有較低的偵測極限及需花費較多的時間，兩者皆對 CTX 具有高特異性。
2. 利用 ELISA 及 LC-MS/MS 分析法評估樣品預處理對基質效應及分析效率影響，證實只需進行簡單萃取即可有效率地檢測被 CTX1B 污染的魚。
3. LC-HRMS 分析法除定性及定量外，還可進行結構分析，相較於其他分析方法，其可對 CTX 進行較全面的分析。

参考文献

- Abraham, A., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Plakas, S.M. and Dickey, R.W. 2012.** Caribbean ciguatoxin profile in raw and cooked fish implicated in ciguatera. *Food Chemistry* 131: 192-198.
- Dechraoui, M.-Y., Naar, J., Paullac, S. and Legrand, A. M. 1999.** Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* 37: 125-143.
- Dickey, R. W. and Plakas, S. M. 2010.** Ciguatera: A public health perspective. *Toxicon* 56: 123-136.
- Diogene, J., Reverte, L., Rambla-Alegre, M., del Rio, V., de la Iglesia, Pl, Campas, M., Plalcios, O., Flores, C., Caixach, J., Ralijanona, C., Razanajatovo, I., Pirog, A., Magalon, H., Arnich, N. and Turquet, J. 2017.** Highly sensitive and practical fluorescent sandwich ELISA for ciguatoxins. *Scientific Reports* 7: 8240.
- Estevez, P., Castro, D., Leao, J. M., Yasumoto, T., Dickey, R. and Gago-Martinez, A. 2019.** Implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of ciguatera fish poisoning in contaminated fish samples from Atlantic coasts. *Food chemistry* 280: 8-14.
- ^a**Hamilton, B., Hurbungs, M., Jones, A. and Lewis, R. J. 2002.** Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish. *Toxicon* 40: 1347-1353.
- ^b**Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J.-P., Jones, A. and Lewis, R. J. 2002.** Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon* 40: 685-693.
- Hardison, D. R., Holland, W. C., McCall, J. R., Bourdelais, A. J., Baden, D. G., Darius, H. T., Chinain, M., Tester, P. A., Shea, D., Quintana, H. A. F., Morris, J. A., Jr. and Litaker, R. W. 2016.** Fluorescent receptor binding assay for detecting ciguatoxins in fish. *PLoS One* 11: e0153348.
- Kryuchkov, F., Robertson, A., Miles, C. O., Mudge, E. M. and Uhlig, S. 2020.** LC-HRMS and Chemical Derivatization Strategies for the Structure Elucidation of Caribbean Ciguatoxins: Identification of C-CTX-3 and-4. *Marine drugs* 18: 182.
- Lewis, R. J. 2000.** Ciguatera management. *SPC Live Reef Fish Information Bulletin* 7: 11-13.
- Lewis, R. J. 2001.** The changing face of ciguatera. *Toxicon* 39: 97-106.
- Lewis, R. J., & Holmes, M. J. 1993.** Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106: 615-628.
- Lewis, R. J. and Jones, A. 1997.** Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners present in ciguateric fish by gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon* 35, 159-168.

- Lewis, R. J., Jones, A. and Vernoux, J.-P. 1999.** HPLC/tandem electrospray mass spectrometry for the determination of sub-ppb levels of Pacific and Caribbean ciguatoxins in crude extracts of fish. *Analytical Chemistry* 71: 247-250.
- Lewis, R. J., Yang, A. and Jones, A. 2009.** Rapid extraction combined with LC-tandem mass spectrometry (CREM-LC/MS/MS) for the determination of ciguatoxins in ciguateric fish flesh. *Toxicon* 54: 62-66.
- Lewis, R.J., Vernoux, J.P. and Brereton, I.M. 1998.** Structure of Caribbean ciguatoxin isolated from *Caranx latus*. *Journal of the American Chemical Society* 120: 5914-5920.
- Manger, R. L., Leja, L. S., Lee, S. Y., Hungerford, J. M., Hokama, Y., Dickey, R. W. and Wekell, M. M. 1995.** Detection of sodium channel toxins: Directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins brevetoxins saxitoxins and seafood extracts. *Journal of AOAC International* 78: 521-527.
- Michio, M. and Yasumoto, T. 2000.** The structure elucidation and biological activities of high molecular weight algal toxins: Maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins. *Natural Product Reports* 17: 293-314.
- Oguri, H., Hirama, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Maruyama, M., Uehara, H. and Nagumo, Y. J. 2003.** Synthesis-based approach toward direct sandwich immunoassay for ciguatoxin CTX3C. *Journal of the American Chemical Society* 125: 7608-7612.
- Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N. N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., Ishihara, Y., Molgó, J. and Botana, L. M. 2010.** First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). *Analytical Chemistry* 82: 6032-6039.
- Poli, M. A., Lewis, R. J., Dickey, R. W., Musser, S. M., Buckner, C. A. and Carpenter, L. G. 1997.** Identification of Caribbean ciguatoxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among US soldiers in Haiti. *Toxicon* 35: 733-741.
- Pottier, I., Vernoux, J.P., Jones, A. and Lewis, R.J. 2002.** Characterisation of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon* 40: 929-939.
- Robertson, A., Garcia, A. C., Quintana, H. A. F., Smith, T. B., II, B. F. C., Reale-Munroe, K. and Klimek, B. J. 2014.** Invasive lionfish (*Pterois volitans*): a potential human health threat for ciguatera fish poisoning in tropical waters. *Marine drugs* 12: 88-97.
- Scheuer, P. J. 1994.** Tetrahedron perspective number 2: Ciguatera and its off-shoots—chance encounters en route to a molecular structures. *Tetrahedron* 50: 3-18.

- Silva, M., Rodriguez, I., Barreiro, A., Kaufmann, M., Neto, A. I., Hassouani, M., Sabour, B., Alfonso, A., Botana, L. M. and Vasconcelos, V. 2015.** First report of ciguatoxins in two starfish species: *Ophidiaster ophidianus* and *Marthasterias glacialis*. *Toxins* 7: 3740-3757.
- Suzuki, T., Ha, D. V., Uesugi, A. and Uchida, H. 2017.** Analytical challenges to ciguatoxins. *Current Opinion in Food Science* 18: 37-42.
- Tsumuraya, T., Fujii, I. and Hirama, M. J. 2014.** Preparation of anti-ciguatoxin monoclonal antibodies using synthetic haptens: sandwich ELISA detection of ciguatoxins. *Journal of AOAC International* 97: 373-379.
- Tsumuraya, T., Fujii, I. and Hirama, M. 2010.** Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins. *Toxicon* 56: 797-803.
- Tsumuraya, T., Fujii, I., Inoue, M., Tatami, A., Miyazaki, K. and Hirama, M. 2006.** Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of ciguatoxin 51-hydroxyCTX3C. *Toxicon* 48: 287-294.
- Tsumuraya, T., Sato, T., Hirama, M. and Fujii, I. 2018.** Highly sensitive and practical fluorescent sandwich ELISA for ciguatoxins. *Analytical chemistry* 90: 7318-7324.
- Tsumuraya, T., Takeuchi, K., Yamashita, S., Fujii, I. and Hirama, M. 2012.** Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA. *Toxicon* 60: 348-357.
- U.S. Food and Drug Administration. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 4th ed., Diane Publishing Co.: Philadelphia, 2011.
- Vernoux, J.P. and Lewis, R.J. 1997.** Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). *Toxicon* 35: 889-900.
- Yasumoto, T. 2001.** The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chemical Record* 1: 228-242.
- Yasumoto, T., Fukui, M., Sasaki, K. and Sugiyama, K. 1995.** Determinations of marine toxins in foods. *Journal of AOAC International* 78: 574-581.
- Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T. and Naoki, H. 2000.** Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 122: 4988-4989.
- Yasumoto, T. and Murata, M. 1993.** Marine toxins. *Chemical Reviews* 93: 1897–1909.
- Yasumoto, T., Raj, U. and Bagnis, R. 1984.** *Seafood Poisoning in Tropical Regions*, Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Japan.
- Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., Hirama, M. and Yasumoto, T. 2011.** Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. *Analytical chemistry* 83: 8886-8891.

Yogi, K., Oshiro, N., Matsuda, S., Sakugawa, S., Matsuo, T. and Yasumoto, T. 2013.
Toxin profiles in fish implicated in ciguatera fish poisoning in Amami and
Kakeroma islands, Kagoshima Prefecture, Japan. *Journal of the Food Hygienic
Society of Japan* 54: 385-391.