SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3038—2011

出口海产品中西加毒素的检测 小鼠生物法

Detection of ciguatoxin in marine products for import and export—Mouse bioassay

2011-09-09 发布　　2012-04-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：范放、朱海、侯乐锡、汤慕瑾、郑晓燕、赵芳、洪小柳、匡燕云、刘慧玲、叶雪梅。

出口海产品中西加毒素的检测 小鼠生物法

1 范围

本标准规定了出口海产品中西加毒素的小鼠生物检测方法。

本标准适用于出口海产品可食部分中西加毒素的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 5009.213 贝类中麻痹性贝类毒素的测定

SN/T 0376 出口水产品检验抽样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

西加毒素 ciguatoxin;CTX

化学结构以太平洋西加毒素(P-CTX-1)为代表的，摄食后可产生西加毒素中毒症状的存在于鱼类体内的海洋生物毒性物质的总称。

3.2

鼠单位 mouse unit;MU

一个鼠单位是对体重 20 g 小鼠腹腔注射西加毒素溶液的 LD_{50} 剂量。

3.3

药物半数致死量 lethal dose 50%;LD_{50}

LD_{50} 是指使一组受试动物死亡 50%的剂量。

3.4

校正鼠单位 corrected mouse unit;CMU

若试验小鼠体重小于或大于 20 g，则根据表 A.1 查出质量校正系数 C，质量校正系数乘以该只小鼠的 MU 便得到 CMU。

3.5

中位数 median

把变量值按大小次序排列，居于中间位置的那个数值就是中位数。

4 试剂和材料

4.1 吐温-60。

4.2 生理盐水。

4.3 苦味酸。
4.4 丙酮(AR)。
4.5 甲醇(AR)。
4.6 正己烷(AR)。
4.7 乙醇(AR)。
4.8 乙醚(AR)。
4.9 三氯甲烷(AR)。
4.10 5%次氯酸钠溶液。
4.11 小鼠:体重为18 g～22 g的昆明系健康雄性小鼠。

5 仪器和器皿

5.1 电子天平(0.1 g～0.01 g)。
5.2 均质器。
5.3 水浴箱(70 ℃±1 ℃)。
5.4 自动旋转蒸发仪。
5.5 真空氮气吹干仪。
5.6 玻璃器皿:量筒、烧杯、移液管、磨口烧瓶、布氏漏斗、分液漏斗、容量瓶,刻度样品瓶(具塞)等。
5.7 1 mL注射器。

6 测定方法

6.1 方法提要

本方法采用鼠单位(MU)测定,对西加毒素(CTX)予以定量。采用P-CTX-1作为毒素的标准品,用毒理学方法确定一个MU所对应的P-CTX-1剂量值,建立西加毒素致小鼠死亡时间-鼠单位关系方程,根据该方程编制西加毒素死亡时间-鼠单位关系对照表。根据小鼠注射海产品提取液后的死亡时间,查出鼠单位,并按小鼠体重校正鼠单位,计算确定每50 g海产品中CTX的含量。所测定结果代表存在于海产品中各种化学结构的CTX的总量。

6.2 试样制备

按照SN/T 0376规定的方法制备检样。

6.3 毒素提取

6.3.1 取绞碎的新鲜样品200 g置于塑料袋内,70 ℃水浴15 min。
6.3.2 取出冷却后,加丙酮400 mL,在均质器中均质10 min,用布氏漏斗抽滤并收集滤液。肉渣再重复萃取两次。
6.3.3 合并滤液分次移入500 mL或1 000 mL磨口烧瓶中,经旋转蒸发仪55 ℃减压浓缩,去除丙酮和水。
6.3.4 加入100 mL 90%甲醇溶液溶解,转移到500 mL分液漏斗,再加入100 mL正己烷,充分振荡混匀萃取,静置约30 min以上,待分层完全,弃去上层正己烷层,收集下层甲醇-水层。再加入100 mL正己烷重复萃取甲醇-水层一次。
6.3.5 甲醇-水层移入250 mL磨口烧瓶中,在旋转蒸发仪中55 ℃减压浓缩,去除甲醇和水。
6.3.6 浓缩物加入100 mL 25%乙醇溶液溶解。再加入100 mL乙醚在分液漏斗中充分振荡萃取,静

置 10 min 以上，待分层完全，收集上层乙醚层。下层的乙醇-水层再用乙醚萃取两次，弃去下层。

6.3.7 合并乙醚萃取液分次移入 250 mL 磨口烧瓶中，在旋转蒸发仪中减压浓缩去除乙醚，温度从 40 ℃逐渐上升至 55 ℃（如起始温度过高，乙醚会沸腾溅出）。浓缩物内含有 CTX。

6.3.8 浓缩物用三氯甲烷：甲醇(97：3)溶液溶解并转移至刻度试管中。要少量多次用三氯甲烷：甲醇溶液从烧瓶中溶解浓缩物，直至浓缩物被完全溶出。三氯甲烷：甲醇溶液用量约 4 mL～5 mL，然后用恒流氮气 45 ℃～50 ℃吹干，－20 ℃储存备用。

6.3.9 为避免毒素的危害，应戴手套进行操作，用过的器材应在 5%次氯酸钠溶液中浸泡 1 h 以上，以使毒素分解。废弃的提取液要收集后按照有机试剂的废液处理方法处理或交专业废液处理公司集中处理。

6.4 小鼠试验

6.4.1 将 6.3.8 提取物用吐温 60-生理盐水（用 0.9%的生理盐水将吐温 60 稀释为 1%～5%溶液）定容至 2 mL，充分振荡，待用。此时 0.5 mL 试液相当于 50 g 样品中的毒素含量。

6.4.2 实验动物选用昆明系封闭群清洁级(CL)或无特定病原菌级(SPF)、体重 18 g～22 g 的健康雄性小鼠，饲养在通风、透光、清洁的室内环境，实验期间正常供给标准啮齿类动物食物和饮水。

6.4.3 试验组：将小鼠随机分组，每个试样一组 3 只，称量，精确到 0.5 g，并记录质量。用染色法如 3%～5%苦味酸溶液或其他染色剂做好编号，保证号码清楚、易认、耐久。每只试验小鼠腹腔注射 0.5 mL 提取液。注射时若有一滴以上提取液溢出，应将该只小鼠弃去，并重新注射一只小鼠。

6.4.4 溶剂对照组：同时另取 3 只小鼠作为溶剂对照组，腹腔注射 0.5 mL 吐温 60-生理盐水，以排除吐温 60-生理盐水可能产生的影响。

6.4.5 空白对照组：同时另取 3 只小鼠作为空白对照组，不进行腹腔注射，与实验组动物和溶剂对照组动物在相同的环境和条件下饲养。

6.4.6 小鼠体征观察：记录注射完毕时间，精确到分钟，仔细观察并记录小鼠体征。注射后小鼠可能出现以下症状：活动能力异常（减少至不活动）、步态异常（正常：慢走或快走，异常：兴奋的、不稳的）、腹泻、呼吸困难（急促浅的或喘息）、肤色青紫（主要在阴茎、耳、鼻、口、尾部）、竖毛（轻至显著）、颤抖（阵发性或持续）、麻痹（阵发至后腿麻痹）、多涎（可能浸湿脸部和胸前毛）、直至挣扎跳跃最后死亡。小鼠在注射 2 h 内要仔细观察，连续观察 400 min，当小鼠接近死亡时更要密切观察，准确记录死亡时间（到小鼠呼出最后一口气止）。

7 结果计算与判断

7.1 鼠单位(*MU*)的计算

观察从注射开始至 400 min 小鼠的毒效应体症和存活情况，计算出一组 3 只小鼠中死亡 2 只以上的中位数死亡时间。根据中位数死亡时间，在附录 B 中查出相应的 *MU*。若试验小鼠体重小于或大于 20 g，则根据附录 A 查出质量校正系数 *C*。质量校正系数乘以该只小鼠的 *MU* 便得到 *CMU*。计算该组小鼠的 *CMU*，便得到样品中 *CTX* 毒素的含量。每 50 g 样品中 *MU* 的含量按式(1)计算：

$$CMU = MU \times C \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中：

CMU ——校正鼠单位，*MU*/50 g；

MU ——鼠单位；

C ——质量校正系数。

7.2 *CMU* 和 *CTX* 剂量的换算

根据采用标准毒素测定，*CTX* 对我国昆明系体重 20 g 雄性小白鼠 1 *MU* 所代表的剂量约为 9.10 ng。每 50 g 样品中 *CTX* 的含量按式(2)计算：

$$CTX = CMU \times 9.10\ \text{ng} \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

CTX ——西加毒素，ng/50 g；

CMU——校正鼠单位。

7.3 结果判断

7.3.1 小鼠注射后 50 min～400 min 内死亡，可根据附录 B 查出 *MU*，根据小鼠体重在附录 A 中查出对应的 *C*，*MU*×*C* 即可得到该组小鼠的 *CMU*，所测结果代表 50 g 样品中 *MU* 的含量。

7.3.2 小鼠注射后在 400 min 内未死亡，可判断小于 0.98 *MU*/50 g。

7.3.3 如对照组小鼠出现异常，结果判为无效。

附 录 A
（规范性附录）
小鼠体重校正表

表 A.1 小鼠体重校正表

小鼠体重 g	校正系数 *C*
10	0.50
10.5	0.53
11	0.56
11.5	0.59
12	0.62
12.5	0.65
13	0.675
13.5	0.70
14	0.73
14.5	0.76
15	0.785
15.5	0.81
16	0.84
16.5	0.86
17	0.88
17.5	0.905
18	0.93
18.5	0.95
19	0.97
19.5	0.985
20	1.000
20.5	1.015
21	1.03
21.5	1.04
22	1.05
22.5	1.06
23	1.07

附 录 B
（规范性附录）
西加毒素死亡时间-鼠单位的关系

表 B.1 西加毒素死亡时间-鼠单位关系对照表

死亡时间 min	鼠单位 *MU*	死亡时间 min	鼠单位 *MU*
50	10.49	190	2.29
55	9.41	195	2.23
60	8.53	200	2.16
65	7.78	205	2.10
70	7.15	210	2.05
75	6.61	215	1.99
80	6.14	220	1.94
85	5.73	225	1.89
90	5.37	230	1.85
95	5.05	235	1.80
100	4.77	240	1.76
105	4.51	245	1.72
110	4.28	250	1.68
115	4.06	255	1.64
120	3.87	260	1.61
125	3.70	265	1.57
130	3.54	270	1.54
135	3.39	275	1.51
140	3.25	280	1.48
145	3.12	285	1.45
150	3.00	290	1.42
155	2.89	295	1.39
160	2.79	300	1.36
165	2.69	305	1.34
170	2.60	310	1.31
175	2.52	315	1.29
180	2.44	320	1.27
185	2.37	325	1.25

表 B.1（续）

死亡时间 min	鼠单位 *MU*	死亡时间 min	鼠单位 *MU*
330	1.22	370	1.07
335	1.20	375	1.06
340	1.18	380	1.04
345	1.16	385	1.03
350	1.14	390	1.01
355	1.13	395	1.00
360	1.11	400	0.98
365	1.09		