SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1569.2—2013

出口河豚鱼中河豚毒素检测方法 第2部分：小鼠生物法

Determination of tetrodotoxin in puffer fish for export—Part 2: Method of mouse bioassay

2013-03-01 发布　　2013-09-16 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

SN/T 1569《出口河豚鱼中河豚毒素检测方法》分为两个部分：

——第1部分：ELISA法；

——第2部分：小鼠生物法。

本部分为SN/T 1569的第2部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：王静、杨丽君、刘和平、李兆杰、胡巧茹、丛伟红、时文春、甄理、刘玉敏。

出口河豚鱼中河豚毒素检测方法 第2部分：小鼠生物法

1 范围

SN/T 1569的本部分规定了出口河豚鱼中河豚毒素的小鼠生物检测方法。

本部分适用于出口河豚鱼中肌肉组织、肝脏、皮肤中河豚毒素的检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

河豚毒素 tetrodotoxin；TTX

豚毒鱼类及其他生物体内含有的一种剧毒的生物碱，又称蜍螈毒素、东方鲀毒素等，分子式为$C_{11}H_{17}O_8N_3$，相对分子质量319，是一种通过阻断钠离子通道抑制神经冲动的非蛋白类神经毒素。

3.2

毒力 toxicity

药剂对特定生物发生直接作用的性质和程度。

3.3

鼠单位 mouse unit；MU

对体重为20 g的无特定病原体级(SPF)昆明系雄性小鼠腹腔注射1 mL河豚毒素提取液，使其在30 min内死亡所需的最小毒素量。

3.4

中间致死时间 median death time

将小鼠死亡时间按变量值大小次序排列，居于中间位置的那个数值就是中间致死时间。

4 样品保存

送检样品如不能立即检验，应分别用标签注明来源、取样日期、品种及编号，装塑料袋密封。抽样后样品应立即置于－18 ℃以下冷冻保存。

5 测定方法

5.1 方法提要

根据河豚毒素易溶于酸性溶液的原理，试样制备后经2次0.5%乙酸溶液煮沸提取，20 000 g离心

收集上清液，将2次上清液合并并定容至25 mL，用于小鼠生物试验，根据小鼠注射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，计算确定河豚毒素含量。

5.2 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682中三级水的要求。

5.2.1 0.5%乙酸溶液：将5 mL乙酸($C_2H_4O_2$)用水稀释至1 L。

5.2.2 小白鼠：28日龄，体重19 g～21 g的无特定病原体级(SPF)昆明系雄性健康小鼠。

5.3 仪器和设备

5.3.1 均质器。

5.3.2 电子天平：感量0.1 g。

5.3.3 离心机：离心力≥20 000 g。

5.3.4 秒表。

5.3.5 玻璃器皿：烧杯、量筒、容量瓶、搅拌棒等。

5.3.6 一次性注射器：1mL。

5.3.7 电炉。

5.3.8 剪刀。

5.3.9 镊子。

5.3.10 手术刀。

5.3.11 微量移液器：1 mL。

5.4 测定步骤

5.4.1 样品中毒素的提取

5.4.1.1 冷冻样品装于密封塑料袋内于流水下急速解冻，蒸馏水洗净后用滤纸吸干，分解成肌肉组织、肝脏、皮肤等部分，分别称量后将各组织剪碎，充分均质。

5.4.1.2 对于肌肉组织，准确称取样品10.0 g于50 mL离心管中，加入0.5%乙酸溶液11 mL，充分混匀，沸水浴中煮沸10 min，不断搅拌以防止组织结块。

5.4.1.3 冷却至室温，20 000 g高速离心20 min，移取上清液于50 mL离心管中。

5.4.1.4 向沉淀中加入0.5%乙酸溶液11 mL，充分混匀，沸水浴中煮沸5 min，不断搅拌以防止组织结块。

5.4.1.5 冷却至室温，20 000 g高速离心20 min，取上清液，将2次离心上清液合并混匀，用0.5%乙酸定容至25 mL。此提取液1 mL相当于原脏器或者组织的0.4 g。

5.4.1.6 肝脏和皮肤的处理方法为：用0.5%乙酸处理后，不需煮沸直接20 000 g高速离心20 min，取上清液，将2次离心上清液合并混匀，用0.5%乙酸定容至25 mL。另外，因肝脏中含有大量水分，在加入乙酸提取时，应尽量减少乙酸溶液体积(8 mL为宜)，以防止TTX提取液稀释倍数过大。

注1：制备样品时，如果样品完全解冻，取样时，组织中的毒素有可能会转移到其他组织中。因此，对于冷冻原料，要在半解冻的情况下进行取样操作。制备样品若不能及时检验，应置于4 ℃冰箱保存，在24 h内检验。

注2：作为样品的脏器或者组织不足10 g的情况下，按照以上方法进行提取操作，适量减少抽出液。

注3：提取液里不含有离心分离液表面上被分离出来的油状物、类似明胶样的物质或者脂质类。

5.4.2 小鼠毒性试验

5.4.2.1 选取19.0 g～21.0 g的无特定病原体级(SPF)昆明系雄性健康小鼠6只，称取并记录质量。随机分为实验组和空白对照组2组，每组3只。

5.4.2.2 对每只试验小鼠腹腔注射 1 mL 提取液或空白对照液(0.5%乙酸)。注射过程中若有 1 滴以上提取液溢出,应将该只小鼠丢弃,并重新注射一只小鼠。

5.4.2.3 记录注射完毕时间,仔细观察并记录小鼠停止呼吸时的死亡时间(到小鼠呼出最后一口气止)。

5.4.2.4 若注射样品原液后,小鼠死亡时间小于 7 min,则按附录 A 中表 A.1 计算出样品原液 1 mL 中所含的毒量,以这个值为基准,配制出使小鼠在 7 min～13 min 死亡所需的稀释液浓度,再注射至少 3 只小鼠以确定样品的毒力。稀释时使用 0.5%乙酸。

5.4.2.5 若注射样品原液后,小鼠的死亡时间大于 13 min,则直接根据中间致死时间确定样品的毒力。

5.4.2.6 小鼠中毒死亡症状:被注射了河豚毒素的小鼠初期安静,呼吸困难、急促,腹部收缩加快,反应迟钝,继而出现突然疾走、急跑急跳、四处乱窜、东倒西歪、翻转乱跳等挣扎动作,数十秒后,小鼠后腿剧烈抽搐,2 次～3 次后爬卧不动,腹部呼吸逐渐微弱减慢,最后死亡。以停止呼吸作为判断死亡的标准。

5.4.3 结果的计算和表述

5.4.3.1 毒力的计算

根据试验中所得的小鼠致死时间,算出中间致死时间,然后按表 A.1 计算出毒量(若中间致死时间刚好处于表 A.1 中给出的两时间中间时,则取两时间中较大的时间值;若介于表 A.1 中给出的两时间中但不正好处于中间时,则取更接近于中间致死时间的值)。若小鼠体重不正好为 20.0 g,则按附录 B 中表 B.1 进行 MU 的误差补正,通过补正后的 MU 中间值表示出稀释液的毒量。1MU 的定义为使体重 20.0 g 的无特定病原体级(SPF)昆明系雄性小鼠 30 min 死亡的毒量。相当于 0.18 μg TTX。用得出的 MU 值乘以稀释倍数计算出 1 g 原样品相对应的 MU。每克样品中河豚毒素的含量按式(1)计算:

$$X = M \times E \times D \times W \quad \cdots\cdots(1)$$

式中:

X ——每克样品中 TTX 的含量,MU;

M ——每毫升注射液的鼠单位数,MU/mL;

E ——提取系数,本方法提取系数为 3.11;

D ——稀释倍数;

W ——质量校正系数。

示例:从 10.0 g 脏器提取 25 mL 样品原液对 3 只小鼠进行试验,若中间致死时间是 5 min 15 s,小鼠体重为 19.5 g,样品原液的毒力约为 3.58 MU/mL。按表 A.1 可以推测,稀释 2 倍后死亡时间约为 10 min。配制 2 倍稀释液进行试验,若得出中间致死时间为 10 min,则稀释液的毒力即为 1.80 MU/mL。因为稀释倍数是 2,提取系数为 3.11,质量校正系数为 0.98,所以毒力计算如下:

原样品 1 g 的毒力=1.80×3.11×2×0.98=10.97 MU

注:本试验方法的检出限为 3.11 MU/g。

5.4.3.2 结果报告

在空白对照组小鼠正常的情况下,对河豚鱼各组织河豚毒素含量进行如下判断和表述:

a) 若小鼠的死亡时间大于 30 min,结果报告为<3.11 MU/g 肌肉组织/肝脏/皮肤。

b) 若小鼠的死亡时间小于 30 min,结果按照 5.4.3.1 计算得到实际结果报告,待测样品中河豚毒素含量为:×××MU/g 肌肉组织/肝脏/皮肤。

c) 若 3 只小鼠死亡时间不都小于 30 min 或不都大于 30 min,则需重新注射 3 只小鼠,以确保 3 只小鼠死亡时间都小于 30 min 或都大于 30 min,结果据此判定;若重复注射 3 只小鼠,死亡时间仍出现第一次小鼠死亡情况,则需根据第一次注射 3 只小鼠的中间致死时间判定结果。

5.4.4 注意事项

为避免毒素的危害，应戴手套进行检验操作。移液器吸嘴等用过的器材应在浓的氢氧化钠溶液中浸泡 1 h 以上，以使毒素分解。同样，废弃的提取液等也应以浓氢氧化钠溶液处理。小鼠饲养及小鼠使用过程应遵循科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。小鼠尸体应按 GB 14925 要求焚烧处理，其排放物应达到污物焚烧排放规定的要求。

附 录 A
（规范性附录）
河豚毒素致死时间-小鼠单位（MU）换算表

表 A.1 河豚毒素致死时间-小鼠单位（MU）换算表

致死时间	MU	致死时间	MU	致死时间	MU
min:s		min:s		min:s	
4:00	6.13	7:00	2.48	14:00	1.42
:05	5.80	:10	2.42	:30	1.40
:10	5.52	:20	2.36	15:00	1.36
:15	4.11	:30	2.31	:30	1.34
:20	5.06	:40	2.26	16:00	1.32
:25	4.85	:50	2.21	:30	1.29
:30	4.67	8:00	2.18	17:00	1.27
:35	4.52	:15	2.11	:30	1.26
:40	4.35	:30	2.06	18:00	1.24
:45	4.22	:45	2.00	:30	1.22
:50	4.09	9:00	1.95	19:00	1.20
:55	3.96	:15	1.92	:30	1.19
5:00	3.86	:30	1.87	20:00	1.18
:05	3.75	:45	1.84	:30	1.15
:10	3.66	10:00	1.80	21:00	1.14
:15	3.58	:15	1.76	:30	1.13
:20	3.49	:30	1.73	22:00	1.12
:25	3.41	:45	1.71	:30	1.11
:30	3.33	11:00	1.67	23:00	1.09
:35	3.27	:15	1.65	:30	1.08
:40	3.20	:30	1.62	24:00	1.07
:45	3.14	:45	1.60	:30	1.06
:50	3.08	12:00	1.58	25:00	1.06
:55	3.02	:15	1.55	26:00	1.04
6:00	2.96	:30	1.53	27:00	1.02
:10	2.86	:45	1.52	28:00	1.01
:20	2.78	13:00	1.49	29:00	1.01
:30	2.69	:15	1.48	30:00	1.00
:40	2.61	:30	1.46		
:50	2.55	:45	1.45		

附 录 B
（规范性附录）
小鼠体重-小鼠单位补正表

表 B.1 小鼠体重-小鼠单位补正表

小鼠体重 g	MU
19.0	0.95
19.5	0.98
20.0	1.00
20.5	1.03
21.0	1.05