



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 3023—2004

麻痹性贝类毒素的测定 生物法

Determination of paralysis shellfish poison Bioassay

2004-01-07 发布

2004-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准参考了美国公职分析化学家协会《公定分析方法》(AOAC, 1995 年版) 中 959.08 《麻痹性贝类毒素 生物法》。

本标准的附录 A、附录 D 为资料性附录, 附录 B、附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位: 国家水产品质量监督检验中心、中国水产科学研究院东海水产研究所。

本标准主要起草人: 王联珠、袁骐、李晓川、陈亚瞿、冷凯良、蒋玫。

麻痹性贝类毒素的测定 生物法

1 范围

本标准规定了麻痹性贝类毒素(PSP)的测定方法——生物法。

本标准适用于软体动物贝类可食部分中麻痹性贝类毒素(PSP)的测定,其他贝类食品中 PSP 的测定可参照执行。

2 原理

根据小鼠注射贝类抽取液后的死亡时间,查出鼠单位,并按小鼠体重,校正鼠单位,计算确定每 100 g 贝肉内的 PSP 的含量。所测定结果代表存在于贝肉内各种化学结构的麻痹性贝类毒素的总量。

3 定义

下列定义适用于本标准。

鼠单位 mouse unit, MU

对体重为 20 g 的小鼠腹腔注射 1 mL 麻痹性贝类毒素后,小鼠在 15 min 时死亡所需的最低毒素量。

4 试剂

4.1 盐酸溶液:0.1 mol/L。

4.2 盐酸溶液:5 mol/L。

4.3 氢氧化钠溶液:0.1 mol/L。

4.4 麻痹性贝类毒素(Saxitoxin)标准溶液:100 $\mu\text{g/mL}$,经酸化,含有 20% 的乙醇作为保护剂,冷藏保存,无限期稳定。

5 仪器和设备

5.1 均质器。

5.2 天平(感量 0.1 g)。

5.3 离心机。

5.4 pH 计。

5.5 秒表。

5.6 玻璃皿:烧杯、量筒、容量瓶、搅拌棒等。

5.7 注射器:1 mL。

5.8 注射器针头:8#。

5.9 小鼠:体重为 19 g~21 g 的健康 ICR 系雄性小鼠,若体重 < 19 g 或 > 21 g,查表 C.1 的校正系数便可得到实际的死亡时间,体重 > 23 g 或已用过的小鼠则不能使用。

6 ICR 系小鼠毒性单位的确定

6.1 PSP 工作标准溶液

用移液管取 100 $\mu\text{g/mL}$ Saxitoxin 标准液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,加入用盐酸酸化至 pH 为 3 的蒸馏

水并定容。该液为 $1\mu\text{g/mL}$ Saxitoxin 标准液, pH 在 2.0~4.0 之间。在 $3^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下能稳定数周。

6.2 测定用标准溶液

分别用 10 mL、15 mL、20 mL、25 mL 和 30 mL 水稀释 10 mL 浓度为 $1\mu\text{g/mL}$ 的 Saxitoxin 标准液, 稀释液的 pH 应为 2~4。

6.3 中值死亡时间的标准液选择

6.3.1 将按 6.2 配制的各浓度的标准稀释液各 1 mL 腹腔注射小鼠数只, 选择中值死亡时间为 5 min~7 min 的浓度。如某浓度稀释液已达到要求, 还需以 1 mL 水的增减量进行补充稀释试验。

例如: 用 25 mL 水稀释的 10 mL 标准液在 5 min~7 min 杀死小鼠, 还需进行 24 mL+10 mL 和 26 mL+10 mL 的稀释度的试验。

6.3.2 先将小鼠称重(精确到 0.5 g), 以 10 个小鼠为一组。用中值死亡时间在 5 min~7 min 内的各种浓度的标准稀释液两份(最好是三份)注射小鼠, 测定并记录每只小鼠腹腔注射完毕至停止呼吸的所需死亡时间。

6.3.3 记录注射完毕至死亡时间的最短间隔为 5 s, 即 7 s 记为 5 s, 8 s 记为 10 s(见附录 B)。

6.4 毒素转换系数(CF)的计算

6.4.1 小鼠中值死亡时间的选择

若注射某浓度标准稀释液的 10 只小鼠中值死亡时间 $<5\text{ min}$ 或 $>7\text{ min}$ 则弃去该组结果; 若注射另一浓度标准稀释液的 10 只小鼠中值死亡时间在 5 min~7 min, 即使个别小鼠死亡时间 $<5\text{ min}$ 或 $>7\text{ min}$, 也应使用该组的数据。但是若注射某浓度标准稀释液后, 10 只小鼠中有 3 只以上存活, 则要另取 10 只小鼠进行重复试验。

6.4.2 校正鼠单位(A)

根据注射毒素后中值死亡时间为 5 min~7 min 的 10 只小鼠的个别死亡时间, 由附录 B 分别查出鼠单位(M), 再由附录 C 查出小鼠的重量校正因子(k), 每毫升标准稀释液的校正鼠单位(A)按公式(1)计算。

$$A = k \times M \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——校正鼠单位(MU);

M ——鼠单位(MU);

k ——小鼠的重量校正因子。

6.4.3 毒素转换系数(F)

毒素转换系数(F)按公式(2)计算。

$$F = C/A \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

F ——毒素转换系数;

C ——每毫升实际毒素含量($\mu\text{g SAX/mL}$);

A ——校正鼠单位(MU)。

6.4.4 计算每组 10 只小鼠的平均毒素转换系数值($\bar{f}$), 再计算各组间的平均毒素转换系数值($\bar{F}$), 并以此为标准做常规检测。

6.5 毒素转换系数(F)值的定期检查

6.5.1 如 PSP 检测间隔时间较长, 每次测定时要用适当的标准稀释液注射 5 只小鼠, 重新测定 $\bar{F}$ 值。如果一周有几次检测, 则用中值死亡时间 5 min~7 min 的标准稀释液每周检查一次, 测得的 $\bar{F}$ 值应在原测定 $\bar{F}$ 值的 $\pm 20\%$ 范围内。

6.5.2 若结果不符, 用同样的标准稀释液另外注射 5 只小鼠, 综合先前注射的 5 只小鼠结果, 算出 $\bar{f}$

值。并用同样的标准稀释液注射第二组 10 只小鼠,将第二组求出的 $\bar{f}$ 值和第一组的 $\bar{f}$ 值进行平均,即为一个新的 $\bar{F}$ 值。

6.5.3 重复检查的 $\bar{F}$ 值通常在原结果的 $\pm 20\%$ 之内,若经常发现有较大偏差,在进行常规检测前应调查该方法中是否存在未控制或未意识到的可变因素。

7 样品的测定

7.1 检样的制备

7.1.1 牡蛎、蛤及贻贝

用清水彻底洗净贝类外壳,切断闭壳肌,开壳,用清水淋洗内部去除泥沙及其他外来杂质,仔细取出贝肉,切勿割破肉体。收集贝肉沥水 5 min(避免贝肉堆积),检出碎壳等杂物,将贝肉均质。开壳前不能加热或用麻醉剂。

7.1.2 扇贝

取可食部分(闭壳肌)用作检测。沥干及均质过程同 7.1.1 的规定。

7.1.3 贝类罐头

将罐内所有内容物(包括贝肉组织及汁液)于均质器中均质。

大容量的罐头,则过滤分离贝肉及汁液,分别称重,将固形物和汤汁按比例混合,充分均质。

7.1.4 冷冻贝类

在室温下,使冷冻的样品(带壳或脱壳的)呈半冷冻状态,按 7.1.1 规定的方法清洗、开壳、淋洗、取肉、均质。

7.2 提取

7.2.1 取 100 g 按 7.1 处理的样品于 800 mL 烧杯中,加 0.1 mol/L HCl 溶液 100 mL 充分搅拌,检查 pH(pH 应为 2.0~4.0)。需要时,可逐滴加入 5 mol/L HCl 溶液或 0.1 mol/L NaOH 溶液调整 pH,加碱时速度要慢,同时需不断搅拌,防止局部碱化破坏毒素。

7.2.2 将混合物加热,并徐徐煮沸 5 min,冷却至室温,调节 pH 至 2.0~4.0(切勿 >4.5)。将混合物移至量筒中并稀释至 200 mL。

7.2.3 将混合物倒回烧杯,搅拌至均质状,使其沉降至上清液呈半透明状,不能堵塞注射针头即可,必要时将混合物或上清液以 3 000 r/min 离心 5 min,或用滤纸过滤。保留进行小鼠注射用的足量液体。

7.3 小鼠试验

7.3.1 以感量为 0.1 g 的天平将小鼠称重并记录重量。每个样品注射 3 只小鼠。

7.3.2 对每只试验小鼠腹腔注射 1 mL 提取液。注射时若有一滴以上提取液溢出,须将该只小鼠丢弃,并重新注射一只小鼠。

7.3.3 记录注射完毕时间,仔细观察并用秒表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)。

7.3.4 若注射样品原液后,1 只或 2 只小鼠的死亡时间大于 7 min,则需再注射至少 3 只小鼠以确定样品的毒力。

7.3.5 若小鼠的死亡时间小于 5 min,则要稀释样品提取液后,再注射另一组小鼠(3 只),得到 5 min~7 min 的死亡时间;稀释提取液时,要逐滴加入 0.1 mol/L 或 0.01 mol/L HCl 溶液,调节 pH 至 2.0~4.0。

8 结果的计算与判断

8.1 毒力的计算

8.1.1 根据小鼠的死亡时间,在附录 B 中查出相应的每毫升注射液的鼠单位数 M ,将存活鼠的死亡时

间视为大于 60 min即相当于<0.875 MU。

8.1.2 若试验动物重量<19 g 或>21 g,则根据附录 C 查出重量校正系数 k 。

8.1.3 样品中 PSP 的含量按公式(3)计算。

$$X = \frac{\sum k_i M_i}{i} \times D \times 200 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- X ——样品中 PSP 含量,每百克样品中鼠单位(MU/100 g);
- k_i ——每只小鼠的重量校正系数;
- M_i ——每只小鼠的鼠单位数,鼠单位(MU);
- D ——样品提取液的稀释倍数;
- 200——样品量,克(g)。

8.2 毒力单位转换

样品中的毒力单位按公式(4)计算。

$$F \times 80 \mu\text{g}/100 \text{ g} = 400 \text{ MU}/100 \text{ g} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- F ——毒素转换系数;
- 80 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ——样品中 PSP 限量($\mu\text{g}/100 \text{ g}$);
- 400 MU/100 g——样品中 PSP 限量(MU/100 g)。

附 录 A

(资料性附录)

麻痹性贝类毒素标准物质的浓度及毒性

A.1 加拿大海洋研究所麻痹性贝类毒素标准物质的浓度

- A.1.1 石房蛤毒素(STX)的浓度:140 $\mu\text{g/mL}$ 。
- A.1.2 新石房蛤毒素(Neo)的浓度:140 $\mu\text{g/mL}$ 。
- A.1.3 膝沟藻毒素 1(GTX-1)的浓度:74 $\mu\text{g/mL}$ 。
- A.1.4 膝沟藻毒素 2(GTX-2)的浓度:120 $\mu\text{g/mL}$ 。
- A.1.5 膝沟藻毒素 3(GTX-3)的浓度:29 $\mu\text{g/mL}$ 。
- A.1.6 膝沟藻毒素 4(GTX-4)的浓度:32 $\mu\text{g/mL}$ 。

以上 6 种毒素分别贮存于 4 个安瓿瓶中,每个安瓿中有 0.2 mL 溶解于 0.1 mol/L 醋酸的各种毒素标准。

A.2 麻痹性贝类毒素各成分的毒性强度

麻痹性贝类毒素各成分的毒性强度见表 A.1。

表 A.1 麻痹性贝类毒素各成分的毒性强度

成 分	毒 性 μg	相对于 STX 的毒性
Saxitoxin	8.3	100
Neosaxitoxin	7.3	88
GTX-1	6.0	72
GTX-2	2.3	28
GTX-3	4	48
GTX-4	4.4	53
GTX-5(B1)	0.42	5.1
GTX-6(B2)	0.27	3.3
C-1	0.03	0.36
C-2	0.5	60
C-3	0.07	0.8
C-4	0.29	3.5
dc-STX	5.0	60
dc-Neo	4.7	57
dc-GTX-1	3.7	45
dc-GTX-2	4.6	55
dc-GTX-3	5.3	64
dc-GTX-4	3.7	45

附 录 B
(规范性附录)
麻痹性贝类毒素死亡时间—鼠单位的关系

表 B.1 麻痹性贝类毒素死亡时间—鼠单位的关系

时间 ^a	鼠单位 MU	时间 ^a	鼠单位 MU	时间 ^a	鼠单位 MU
1: 00	100	: 30	2.98	6: 00	1.60
: 10	66.2	: 35	2.88	: 15	1.54
: 15	38.3	: 40	2.79	: 30	1.48
: 20	26.4	: 45	2.71	: 45	1.43
: 25	20.7	: 50	2.63		
: 30	16.5	: 55	2.56	7: 00	1.39
: 35	13.9			: 15	1.35
: 40	11.9	4: 00	2.50	: 30	1.31
: 45	10.4	: 05	2.44	: 45	1.28
: 50	9.33	: 10	2.38		
: 55	8.42	: 15	2.32	8: 00	1.25
		: 20	2.26	: 15	1.22
2: 00	7.67	: 25	2.21	: 30	1.20
: 05	7.04	: 30	2.16	: 45	1.18
: 10	6.52	: 35	2.12		
: 15	6.06	: 40	2.08	9: 00	1.16
: 20	5.66	: 45	2.04	: 30	1.13
: 25	5.32	: 50	2.00		
: 30	5.00	: 55	1.96	10: 00	1.11
: 35	4.73			: 30	1.09
: 40	4.48	5: 00	1.92		
: 45	4.26	: 05	1.89	11: 00	1.075
: 50	4.06	: 10	1.86	: 30	1.06
: 55	3.88	: 15	1.83		
		: 20	1.80	12: 00	1.05
3: 00	3.70	: 30	1.74		
: 05	3.57	: 40	1.69	13: 00	1.03
: 10	3.43	: 45	1.67		
: 15	3.31	: 50	1.64	14: 00	1.015
: 20	3.19				
: 25	3.08			15: 00	1.000

表 B.1 (续)

时间 ^a	鼠单位 MU	时间 ^a	鼠单位 MU	时间 ^a	鼠单位 MU
16:00	0.99	21:00	0.954	30:00	0.917
17:00	0.98	22:00	0.948	40:00	0.898
18:00	0.972	23:00	0.942	60:00	0.875
19:00	0.965	24:00	0.937		
20:00	0.96	25:00	0.934		
^a 以分秒表示。					

附 录 C
(规范性附录)
小鼠体重校正表

表 C.1 小鼠体重校正表

小鼠重 g	小鼠的重量校正因子(k)
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 D

(资料性附录)

本标准与 AOAC 959.08:1995 方法的技术差异及原因

表 D.1 为本标准与美国公职分析化学家协会《公定分析方法》(AOAC, 1995 年版)中 959.08《麻痹性贝类毒素 生物法》方法的技术差异及原因一览表。

表 D.1 本标准与 AOAC 959.08 的技术差异及原因

本标准的章条	技术性差异	原 因
封面、前言、标准的全文	原方法标准的格式与此完全不同	标准格式采用 GB/T 1.1—2000 的规定
6 章~8 章	文字叙述中有部分改动,将原文中的大段文字修改为逐条叙述	按 GB/T 1.1—2000 的要求,将标准条文细化,使其更有逻辑性、更有条理,使用便捷
6.8 章中的公式	对标准中的计算公式的格式进行了简化,用字母代替具体的内容	公式的格式采用 GB/T 1.1—2000 的规定,便于标准使用者计算数据
7.1.4	增加了对冷冻贝类样品的制备	冷冻贝类是贝类中的一大类产品,对此类产品的规定,能规范标准使用者的操作过程
8.2	将原标准中“当最终样品中含有的 PSP>80 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 或 PSP>400 MU/100 g 时,则此贝类产品不适合人类食用。”的规定取消,改为“毒力转换单位,以公式计算, $F \times 80\ \mu\text{g}/100\text{ g} = 400\text{ MU}/100\text{ g}$ 式中: F ——毒素转换系数 80 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ——样品中 PSP 限量($\mu\text{g}/100\text{ g}$) 400 MU/100 g——样品中 PSP 限量, (MU/100 g)	因为此规定不是本标准的范畴,另有产品标准或安全限量标准对此规定,本标准中列出这两种毒力不同表示单位之间的关系,便于计算、转换

中 华 人 民 共 和 国
水 产 行 业 标 准
麻 痹 性 贝 类 毒 素 的 测 定
生 物 法

SC/T 3023—2004

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码: 100026 网址: www.ccap.com.cn)

中国农业出版社印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

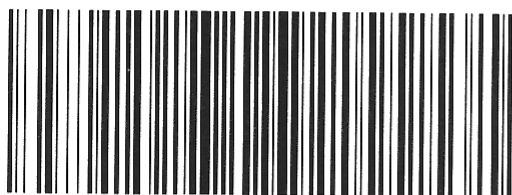
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 14 千字

2004 年 2 月第 1 版 2004 年 2 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·307 印数: 1~1 000 册

定价: 10.00 元



SC/T 3023-2004

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 65005894