



# 中华人民共和国国家标准

GB 5009.206—2016

---

## 食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

---

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会  
国家食品药品监督管理总局 发布

## 前 言

本标准代替 GB/T 23217—2008《水产品中河豚毒素的测定 液相色谱-荧光检测法》、GB/T 5009.206—2007《鲜河豚鱼中河豚毒素的测定》和 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》。

本标准与 GB/T 5009.206—2007 相比，主要变化如下：

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定”；
- 增加了净化步骤；
- 修改了酶联免疫吸附法。

# 食品安全国家标准

## 水产品中河豚毒素的测定

### 1 范围

本标准规定了水产品中河豚毒素的测定方法。

本标准第一法适用于河豚鱼肌肉、肝脏、皮肤和性腺组织中河豚毒素的测定。第二法适用于河豚鱼肌肉、肝脏、皮肤和性腺组织中河豚毒素的测定。第三法适用于河豚鱼、织纹螺、虾、牡蛎、花蛤和鱿鱼中河豚毒素的测定。第四法适用于河豚鱼肌肉、肝脏、皮肤和性腺组织中河豚毒素的测定。

### 第一法 小鼠生物法

### 2 原理

根据河豚毒素易溶于酸性溶液原理,试样制备后经两次乙酸溶液(0.5%)煮沸提取,20 000 g 离心收集上清液,将两次上清液合并定容至 25 mL,用于小鼠生物试验。根据小鼠注射试样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。

### 3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水为 GB 6682 规定的三级水。

#### 3.1 试剂

3.1.1 冰乙酸(CH<sub>3</sub>COOH)。

3.1.2 氢氧化钠(NaOH)。

#### 3.2 试剂配制

3.2.1 乙酸溶液(0.5%):将 5 mL 冰乙酸用水稀释至 1 L。

3.2.2 氢氧化钠溶液(1 mol/L):将 40 g 氢氧化钠用水溶解并定容至 1 000 mL。

#### 3.3 标准品

河豚毒素(C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>,CAS 号:4368-28-9),纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

#### 3.4 实验动物

小白鼠:体重 19.0 g~21.0 g,无特定病原体级(SPF)昆明系雄性健康小鼠。

### 4 仪器和设备

4.1 均质器:≥12 000 r/min。

- 4.2 电子天平:感量 0.1 g。  
4.3 离心机:离心力 $\geq 30\,000\text{ g}$ 。  
4.4 秒表。

## 5 分析步骤

注:为避免毒素的危害,应戴手套进行检验操作。移液器吸头等用过的器材、废弃的提取液等应在氢氧化钠溶液(1 mol/L)中浸泡 1 h 以上,以使毒素分解。

### 5.1 试样制备

#### 5.1.1 冷冻河豚鱼样品

将样品装于密封塑料袋内于自来水水流下快速解冻。解冻后用水洗净,用滤纸吸干,分解成肌肉、肝脏、皮肤等部分。分别称量后将各组织剪碎,充分均质。

#### 5.1.2 新鲜河豚鱼样品

将样品用水洗净后用滤纸吸干,分解成肌肉、肝脏、皮肤等部分,分别称量后将各组织剪碎,充分均质。

### 5.2 试样提取

#### 5.2.1 肌肉组织试样

准确称取试样 10 g(精确至 0.1 g)于 50 mL 离心管中,加入乙酸溶液(0.5%)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。冷却至室温,20 000 g 高速离心 20 min,移取上清液于 25 mL 容量瓶中。向沉淀中加入乙酸溶液(0.5%)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。冷却至室温,20 000 g 高速离心 20 min,移取上清液。合并上清液,混匀,用乙酸溶液(0.5%)定容至 25 mL。此提取液 1 mL 相当于 0.4 g 试样。

#### 5.2.2 肝脏组织试样

准确称取 10 g(精确至 0.1 g)试样于 50 mL 离心管中,加入乙酸溶液(0.5%)8 mL,充分混匀,室温下 20 000 g 高速离心 20 min,移取上清液于 25 mL 容量瓶中。用 8 mL 乙酸溶液(0.5%)重复提取 1 次。合并上清液,混匀,用乙酸溶液(0.5%)定容至 25 mL。此提取液 1 mL 相当于 0.4 g 试样。

#### 5.2.3 皮肤组织试样

准确称取 10 g(精确至 0.1 g)试样于 50 mL 离心管中,加入乙酸溶液(0.5%)11 mL,充分混匀,室温下 20 000 g 高速离心 20 min,移取上清液于 25 mL 容量瓶中。用 11 mL 乙酸溶液(0.5%)重复提取 1 次。合并上清液,用乙酸溶液(0.5%)定容至 25 mL。此提取液 1 mL 相当于 0.4 g 试样。

注 1: 试样制备时,冷冻样品需在半解冻状态下进行操作。试样若不能及时检验,应于 4 °C 保存,在 24 h 内检验。

注 2: 如果河豚鱼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,需适量减少乙酸溶液(0.5%)的加入量。

注 3: 提取液中应不含有离心分离液表面上被分离出来的油状物、胶状物或者脂质类。

### 5.3 小鼠试验

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,称量并记录体重。随机分

为实验组和空白对照组两组,每组 3 只。对每只试验小鼠腹腔注射 1 mL 试样提取液或乙酸溶液(0.5%)(空白对照液)。若注射过程中注射液溢出,须将该只小鼠丢弃,并重新注射一只小鼠。记录注射开始和完毕时间,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)。

若注射试样提取液后,小鼠死亡时间小于 7 min,则按附录 A 中表 A.1 计算出 1 mL 试样提取液的毒力,以此为基准,配制出使小鼠在 7 min~13 min 死亡所需的稀释液,采用乙酸溶液(0.5%)进行稀释,将稀释液再注射至少 3 只小鼠以确定试样的毒力。具体示例见附录 B。若注射试样溶液后,小鼠的死亡时间大于或等于 7 min,则直接根据中位数致死时间确定试样的毒力。

小鼠中毒死亡症状:被注射了河豚毒素的小鼠初期安静,随后出现呼吸困难,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,2~3 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。

## 6 分析结果的表述

### 6.1 毒力的计算

根据小鼠试验中得到的小鼠致死时间,计算出中位数致死时间,然后按表 A.1 计算出毒力(若中位数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,则取更接近于中位数致死时间的时间值)。若小鼠体重不正好为 20.0 g,则按表 A.2 对鼠单位(MU)进行校正,通过校正后的鼠单位表示出提取液的毒力。

1 MU 的定义为使体重为 20.0 g 的无特定病原体级(SPF)昆明系雄性小鼠 30 min 死亡的毒力,相当于 0.18 μg 河豚毒素。

试样中河豚毒素的含量按式(1)计算:

$$X = M \times E \times f \times W \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$X$  ——试样中河豚毒素的含量,单位为鼠单位每克(MU/g);

$M$  ——1 mL 注射液的鼠单位数,单位为鼠单位(MU);

$E$  ——提取系数,本方法提取系数为 3.11;

$f$  ——试样提取液的稀释倍数;

$W$  ——小鼠体重校正系数。

### 6.2 结果报告

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

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。

若小鼠的死亡时间小于 30 min,结果按式(1)计算得到实际结果报告,待测样品中河豚毒素含量为  $\times\times\times$  MU/g 肌肉组织/肝脏/皮肤。

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 只小鼠的中位数致死时间判定结果。

## 7 其他

本方法的检出限为 3.11 MU/g。

## 第二法 液相色谱-串联质谱法

### 8 原理

试样经 1% 乙酸-甲醇溶液提取, 免疫亲和柱净化, 液相色谱-串联质谱法测定, 外标法定量。

### 9 试剂和材料

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯, 实验用水为 GB 6682 规定的一级水。

#### 9.1 试剂

- 9.1.1 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): 色谱纯。
- 9.1.2 乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ ): 色谱纯。
- 9.1.3 甲酸( $\text{HCOOH}$ ): 色谱纯。
- 9.1.4 冰乙酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ): 优级纯。
- 9.1.5 乙酸铵( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ): 色谱纯。
- 9.1.6 十二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )。
- 9.1.7 二水合磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。
- 9.1.8 氯化钠( $\text{NaCl}$ )。
- 9.1.9 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )。

#### 9.2 试剂配制

- 9.2.1 乙酸-甲醇溶液(1+99): 将冰乙酸和甲醇按 1 比 99 的体积比混合均匀。
- 9.2.2 乙酸-甲醇溶液(2+98): 将冰乙酸和甲醇按 2 比 98 的体积比混合均匀。
- 9.2.3 甲酸溶液(1+999): 将 1 mL 甲酸加入到 999 mL 水中, 混匀。
- 9.2.4 含 5 mmol/L 乙酸铵的 0.1% 甲酸溶液: 称取 0.19 g 乙酸铵, 加入 0.1% 甲酸溶液定容至 500 mL。
- 9.2.5 甲酸溶液(0.1%)-乙腈溶液(1+1): 甲酸溶液(0.1%) 与乙腈等体积混合均匀。
- 9.2.6 磷酸盐缓冲溶液(PBS 溶液): 称取十二水合磷酸氢二钠 6.45 g、二水合磷酸二氢钠 1.09 g、氯化钠 4.25 g, 用水溶解并定容至 500 mL。
- 9.2.7 氢氧化钠溶液(1 mol/L): 准确称取 20.0 g 氢氧化钠, 用水溶解并定容至 500 mL。

#### 9.3 标准品

河豚毒素( $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$ , CAS 号: 4368-28-9), 纯度  $\geq 98\%$ , 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

#### 9.4 标准溶液配制

- 9.4.1 河豚毒素标准储备液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确称取河豚毒素标准品 10 mg(精确至 0.1 mg), 用少量甲酸溶液(0.1%) 溶解, 以甲醇定容至 100 mL,  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  以下避光保存。
- 9.4.2 河豚毒素标准中间液(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确量取河豚毒素标准储备液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 适量, 以甲酸溶液(0.1%)-乙腈溶液(1+1) 稀释并定容, 配制成为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准中间液,  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  以下避光保存。
- 9.4.3 河豚毒素标准系列工作液: 准确吸取河豚毒素标准中间液(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 适量, 以甲酸溶液(0.1%)-

乙腈溶液(1+1)稀释并定容,得到浓度为 $1\ \mu\text{g/L}\sim 1\ 000\ \mu\text{g/L}$ 的标准系列工作液,现用现配。

## 9.5 材料

9.5.1 河豚毒素免疫亲和柱:柱规格 $3\ \text{mL}$ ,最大柱容量 $1\ 000\ \text{ng}$ ,或等效柱。

9.5.2  $0.22\ \mu\text{m}$ 有机相微孔滤膜。

## 10 仪器和设备

10.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

10.2 分析天平:感量为 $0.1\ \text{mg}$ 和 $0.01\ \text{g}$ 。

10.3 均质机: $\geq 12\ 000\ \text{r/min}$ 。

10.4 涡旋振荡器。

10.5 高速冷冻离心机:转速 $\geq 8\ 000\ \text{r/min}$ 。

10.6 固相萃取装置。

10.7 氮吹仪。

## 11 分析步骤

注:为避免毒素的危害,应戴手套进行操作。移液器吸头等用过的器材、废弃的提取液等应在氢氧化钠溶液( $1\ \text{mol/L}$ )中浸泡 $1\ \text{h}$ 以上,以使毒素分解。

### 11.1 试样制备

用水清洗鱼体表面的污物,滤纸吸干鱼体表面的水分后用剪刀将鱼体分解成肌肉、肝脏、皮肤和性腺(精巢或卵巢)等部分,各部分组织分别用水洗去血污,滤纸吸干表面的水分后将各组织剪碎,充分均质,装入清洁容器内,并标明标记。

### 11.2 试样提取

称取 $5\ \text{g}$ (精确到 $0.01\ \text{g}$ )匀浆试样于 $50\ \text{mL}$ 具塞离心管中,加入 $11\ \text{mL}$ 乙酸-甲醇溶液(1+99),涡旋振荡 $2\ \text{min}$ , $50\ ^\circ\text{C}$ 水浴超声提取 $15\ \text{min}$ ,以 $8\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$ ,转移上清液于 $25\ \text{mL}$ 容量瓶中。向残渣中加入 $11\ \text{mL}$ 乙酸-甲醇溶液(1+99),重复提取一次,合并上清液,用乙酸-甲醇溶液(1+99)定容至 $25\ \text{mL}$ 。移取约 $10\ \text{mL}$ 提取液至另一 $50\ \text{mL}$ 具塞离心管中, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冷冻 $30\ \text{min}$ ,再以 $8\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$ ,准确移取 $5\ \text{mL}$ 上清液,加入 $20\ \text{mL}$  PBS 溶液进行稀释,用氢氧化钠溶液( $1\ \text{mol/L}$ )调 pH 在 $7\sim 8$ 范围内,待净化。

### 11.3 试样净化

将免疫亲和柱中封存的 PBS 溶液以自然流速放出,移入待净化液,以 $1\ \text{滴/s}$ 的流速过柱,再用 $10\ \text{mL}$ 水淋洗,抽干,用 $5\ \text{mL}$ 乙酸-甲醇溶液(2+98)洗脱,洗脱液于 $45\ ^\circ\text{C}$ 氮气吹干,加入 $1.0\ \text{mL}$ 甲酸溶液(0.1%)-乙腈溶液(1+1)溶解残渣,超声 $1\ \text{min}$ ,过 $0.22\ \mu\text{m}$ 的有机相微孔滤膜后,供液相色谱-串联质谱分析。

### 11.4 仪器参考条件

#### 11.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件列出如下:

- a) 色谱柱:Gel Amide-80 柱,柱长 150 mm,内径 2 mm,粒径 5  $\mu\text{m}$ ,或等效柱。  
 b) 流速:0.3 mL/min。  
 c) 柱温:40  $^{\circ}\text{C}$ 。  
 d) 进样量:10  $\mu\text{L}$ 。  
 e) 流动相及梯度洗脱条件见表 1。流动相 A 液:含 5 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸溶液;流动相 B 液:乙腈。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
0.0	10	90
2.0	10	90
2.1	90	10
6.0	90	10
6.1	10	90
8.0	10	90

#### 11.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件列出如下:

- a) 离子源:电喷雾源(ESI);  
 b) 扫描模式:正离子扫描;  
 c) 喷雾电压:4 800 V;  
 d) 鞘气流量:12 L/min;  
 e) 辅助气流量:2 L/min;  
 f) 离子传输管温度:350  $^{\circ}\text{C}$ ;  
 g) 源内碰撞诱导解离电压:10 V;  
 h) 扫描模式:选择反应监测模式,选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 2;  
 i) 碰撞气压力:氩气,1.5 mTorr。

表 2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

目标化合物	母离子/ ( $m/z$ )	子离子/ ( $m/z$ )	碰撞能量/ (CE/eV)
河豚毒素	320	162*	39
		302	25
* 定量离子。			

#### 11.5 标准曲线的制作

将河豚毒素标准系列工作液分别注入液相色谱-串联质谱仪中,测定相应的峰面积,以标准系列工作液中河豚毒素的浓度为横坐标,以河豚毒素色谱峰的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

#### 11.6 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中,得到响应的峰面积,根据标准曲线得到待测液中河豚毒

素的浓度。河豚毒素标准溶液的提取离子色谱图参见附录 C 中图 C.1。

### 11.7 定性

在同样测试条件下,试样溶液中与标准溶液中河豚毒素的保留时间相比,偏差在±2.5%以内,且检测到的离子相对丰度,应当与浓度相近的标准工作液中离子相对丰度一致,其丰度比偏差应符合表 3 要求。

表 3 相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~≤50%	>10%~≤20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

### 11.8 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

## 12 分析结果的表述

试样中河豚毒素的含量按式(2)计算:

$$X = \frac{c \times V \times f}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

$X$  —— 试样中河豚毒素的含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );

$c$  —— 试样待测液中河豚毒素的浓度,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );

$V$  —— 定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$f$  —— 试液稀释倍数,按照 11.2 进行试样前处理时为 5;

$m$  —— 试样的称样量,单位为克( $\text{g}$ )。

计算结果保留三位有效数字。

### 13 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

### 14 其他

本方法的检出限为  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 第三法 液相色谱-荧光检测法

### 15 原理

采用酸性甲醇溶液提取试样中的河豚毒素,提取液经旋转蒸发至干,用 2 mL 乙酸溶液(1%)溶解残渣,再用磷酸盐缓冲溶液复溶,调 pH 至 6.0~7.0,经免疫亲和柱净化,液相色谱-柱后衍生荧光法测

定,以保留时间定性,外标法定量。

## 16 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水为 GB 6682 规定的一级水。

### 16.1 试剂

- 16.1.1 甲醇(CH<sub>3</sub>OH):色谱纯。
- 16.1.2 甲酸(CHOOH):色谱纯。
- 16.1.3 乙腈(CH<sub>3</sub>CN):色谱纯。
- 16.1.4 冰乙酸(CH<sub>3</sub>COOH):色谱纯。
- 16.1.5 乙酸铵(CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>):色谱纯。
- 16.1.6 十二水合磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O)。
- 16.1.7 二水合磷酸二氢钠(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)。
- 16.1.8 氯化钠(NaCl)。
- 16.1.9 氢氧化钠(NaOH)。
- 16.1.10 庚烷磺酸钠(C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NaO<sub>3</sub>S)。
- 16.1.11 碳酸钠(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)。

### 16.2 试剂配制

- 16.2.1 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠,加水溶解稀释至 1 000 mL。
- 16.2.2 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液):分别称取 6.45 g 十二水合磷酸氢二钠、1.09 g 二水合磷酸二氢钠、4.25 g 氯化钠,用水溶解并定容至 500 mL。
- 16.2.3 乙酸-甲醇溶液(1+99):将冰乙酸和甲醇按 1 比 99 的体积比混合均匀。
- 16.2.4 乙酸-甲醇溶液(2+98):将冰乙酸和甲醇按 2 比 98 的体积比混合均匀。
- 16.2.5 乙酸铵缓冲液:称取 4.6 g 乙酸铵和 2.02 g 庚烷磺酸钠,加入约 700 mL 水溶解,用冰乙酸调节 pH 为 5.0,用水稀释至 1 L。
- 16.2.6 氢氧化钠溶液(4 mol/L):称取 160 g 氢氧化钠,用水溶解并稀释至 1 L。
- 16.2.7 乙酸溶液(1%):冰乙酸和水按 1 比 99 的体积比混合均匀。

### 16.3 标准品

河豚毒素(C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>,CAS 号:4368-28-9),纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

### 16.4 标准溶液配制

- 16.4.1 标准储备液(100 μg/mL):准确称取河豚毒素标准品 10 mg(精确至 0.1 mg),用少量水溶解。以甲醇定容至 100 mL。置于 4 ℃ 中可保存一个月。
- 16.4.2 标准工作液:根据需要取适量标准储备液,以乙酸溶液(1%)稀释成适当浓度的标准工作液。临用现配。
- 16.4.3 基质匹配标准系列工作液:以空白基质溶液配制适当浓度的标准系列工作液。现用现配。

### 16.5 材料

- 16.5.1 河豚毒素免疫亲和柱:柱规格 3 mL,最大柱容量 1 000 ng,或等效柱。

16.5.2 0.22  $\mu\text{m}$  水相微孔滤膜。

## 17 仪器和设备

17.1 液相色谱仪:配有荧光检测器与柱后衍生装置。

17.2 电子天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

17.3 组织捣碎机。

17.4 振荡器。

17.5 超声波发生器。

17.6 固相萃取装置。

17.7 离心机: $\geq 8\ 000$  r/min。

17.8 氮吹仪。

## 18 分析步骤

注:为避免毒素的危害,应戴手套进行操作。移液器吸头等用过的器材、废弃的提取液等应在 1 mol/L 氢氧化钠溶液中浸泡 1 h 以上,以使毒素分解。

### 18.1 试样制备

用水清洗鱼体表面的污物,滤纸吸干鱼体表面的水分后用剪刀将鱼体分解成肌肉、肝脏、皮肤和性腺(精巢或卵巢)等部分,各部分组织分别用水洗去血污,滤纸吸干表面的水分后将各组织剪碎,充分均质,装入清洁容器内,并标明标记。

### 18.2 试样提取

称取 2 g(精确到 0.01 g)试样置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 乙酸-甲醇溶液(1+99),振荡 2 min,60  $^{\circ}\text{C}$  水浴超声提取 30 min,4 500 r/min 离心 5 min。上清液于 60  $^{\circ}\text{C}$  旋转蒸发浓缩至近干,加入 2 mL 乙酸溶液(1%)充分溶解残渣,转移至 10 mL 聚丙烯离心管中,加入 8 mL PBS 溶液稀释,用氢氧化钠溶液(1 mol/L)调节 pH 至 7~8,待净化。

### 18.3 试样净化

将免疫亲和柱回温至室温,去掉亲和柱堵头,放出柱内保存液后,移入 10 mL 待净化液。净化液全部流出后,用 10 mL 水淋洗,适当施压挤干柱内液体。用 4 mL 乙酸-甲醇溶液(2+98)洗脱,收集的洗脱液于 50  $^{\circ}\text{C}$  氮气吹干,用乙酸溶液(1%)溶解并定容至 1 mL,经 0.22  $\mu\text{m}$  的水相微孔滤膜过滤,滤液供液相色谱-荧光法分析。

## 18.4 仪器参考条件

### 18.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件列出如下:

- 色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5  $\mu\text{m}$ ,或等效柱。
- 流动相:乙腈-乙酸铵缓冲液(5+95,体积比)。
- 流速:1.0 mL/min。
- 柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ 。
- 检测波长:激发波长 385 nm,发射波长 505 nm。

f) 进样量:40  $\mu\text{L}$ 。

#### 18.4.2 柱后衍生参考条件

柱后衍生参考条件列出如下:

- a) 衍生溶液:氢氧化钠(4 mol/L)。
- b) 衍生溶液流速:0.5 mL/min。
- c) 衍生管温度:110  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 18.5 标准曲线的制作

将基质匹配标准系列工作液分别注入液相色谱中,测定相应的峰面积,以标准工作液中河豚毒素的浓度为横坐标,以河豚毒素色谱峰的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。河豚毒素标准溶液的液相色谱图参见图 C.2。

#### 18.6 试样溶液的测定

将试样待测液注入液相色谱中,以保留时间进行定性(试样待测液中河豚毒素色谱峰的保留时间与标准溶液相比,偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内),测定相应的峰面积,根据标准曲线得到试样待测液中河豚毒素的浓度。

#### 18.7 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

### 19 分析结果的表述

试样中河豚毒素的含量按式(3)计算:

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times f}{m} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $X$  —— 试样中河豚毒素的含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );  
 $C$  —— 试样待测液中河豚毒素的浓度,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );  
 $C_0$  —— 空白待测液中河豚毒素的浓度,单位为微克每升( $\mu\text{g}/\text{L}$ );  
 $V$  —— 定容体积,单位为毫升(mL);  
 $f$  —— 稀释倍数;  
 $m$  —— 试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

### 20 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

### 21 其他

本方法的检出限为 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 第四法 酶联免疫吸附法

### 22 原理

试样中的河豚毒素经提取、脱脂后与定量的特异性抗体反应,多余的游离抗体则与酶标板内的包被抗原结合,然后加入酶标二抗与结合到酶标板上的抗体反应,加入底物显色,与标准曲线比较测定河豚毒素含量。

### 23 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水为 GB 6682 规定的一级水。

#### 23.1 试剂

- 23.1.1 抗河豚毒素单克隆抗体。
- 23.1.2 牛血清白蛋白(BSA)。
- 23.1.3 包被抗原:牛血清白蛋白-甲醛-河豚毒素连接物(BSA-HCHO-TTX), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 23.1.4 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体。
- 23.1.5 冰乙酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )。
- 23.1.6 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )。
- 23.1.7 乙酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )。
- 23.1.8 乙醚( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ )。
- 23.1.9 *N,N*-二甲基甲酰胺( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ )。
- 23.1.10 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB, $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$ )。
- 23.1.11 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )。
- 23.1.12 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )。
- 23.1.13 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )。
- 23.1.14 十二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )。
- 23.1.15 氯化钠( $\text{NaCl}$ )。
- 23.1.16 氯化钾( $\text{KCl}$ )。
- 23.1.17 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )。
- 23.1.18 吐温-20( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ )。
- 23.1.19 一水合柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )。
- 23.1.20 硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )。

#### 23.2 试剂配制

- 23.2.1 乙酸钠溶液(0.2 mol/L):称取 16.40 g 乙酸钠,加水溶解并定容至 1 000 mL。
- 23.2.2 乙酸溶液(0.2 mol/L):量取 11.5 mL 冰乙酸注入水中,并定容至 1 000 mL。
- 23.2.3 乙酸盐缓冲液(pH 4.0):将乙酸钠溶液(0.2 mol/L)和乙酸溶液(0.2 mol/L)按 2 比 8 的体积比混合均匀。
- 23.2.4 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液,pH 7.4):分别称取磷酸二氢钾 0.20 g、十二水合磷酸氢二钠 2.90 g、氯化钠 8.00 g、氯化钾 0.20 g,加水溶解并定容至 1 000 mL。

- 23.2.5 包被缓冲液(pH 9.6):分别称取碳酸钠 1.59 g 和碳酸氢钠 2.93 g,加水溶解并定容至 1 000 mL。
- 23.2.6 封闭液:称取 2.0 g BSA,加 PBS 溶液溶解并定容至 1 000 mL。
- 23.2.7 PBS-T 洗液:吸取 0.5 mL 吐温-20 至 900 mL PBS 溶液中,并用 PBS 溶液定容至 1 000 mL。
- 23.2.8 抗体稀释液:称取 1.0 g BSA,加 PBS 溶液溶解并定容至 1 000 mL。
- 23.2.9 柠檬酸溶液(0.1 mol/L):称取 21.01 g 一水合柠檬酸,加水溶解并定容至 1 000 mL。
- 23.2.10 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L):称取 71.6 g 十二水合磷酸氢二钠,加水溶解并定容至 1 000 mL。
- 23.2.11 底物缓冲液:将柠檬酸溶液(0.1 mol/L)、磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L)和水按 24.3 : 25.7 : 50 的体积混合均匀。现用现配。
- 23.2.12 TMB 储存液:称取 200 mg TMB,用 20 mL *N,N*-二甲基甲酰胺溶解,4 °C 避光保存。
- 23.2.13 底物溶液:将 75 μL TMB 储存液、10 mL 底物缓冲液和 10 μL 过氧化氢混合。
- 23.2.14 硫酸溶液(2 mol/L):吸取 106 mL 硫酸,缓缓加入 500 mL 水中,并用水稀释至 1 000 mL。
- 23.2.15 乙酸溶液(0.1%):吸取 1 mL 冰乙酸加入到 999 mL 水中,混匀。
- 23.2.16 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠,加水溶解并定容至 1 000 mL。
- 23.2.17 抗河豚毒素单克隆抗体工作液:抗河豚毒素单克隆抗体用抗体稀释液稀释至工作浓度。
- 23.2.18 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体工作液:用抗体稀释液将辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体稀释至工作浓度。

### 23.3 标准品

河豚毒素( $C_{11}H_{17}N_3O_8$ , CAS 号:4368-28-9),纯度 $\geq 98\%$ ,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

### 23.4 标准溶液配制

- 23.4.1 河豚毒素标准储备液(1.0 g/L):准确称取适量河豚毒素标准品,用乙酸盐缓冲液(pH 4.0)溶解并定容,配成浓度为 1.0 g/L 的标准储备液,密封后 4 °C 保存备用。
- 23.4.2 河豚毒素标准系列工作液:将河豚毒素标准储备液(1.0 g/L)用 PBS 溶液配制成浓度分别为 5 000.0 μg/L、2 500.0 μg/L、1 000.0 μg/L、500.0 μg/L、250.0 μg/L、100.0 μg/L、50.0 μg/L、25.0 μg/L、10.0 μg/L、5.0 μg/L、1.0 μg/L、0.5 μg/L、0 μg/L 的河豚毒素标准系列工作液,现用现配。

### 23.5 材料

定量滤纸。

## 24 仪器和设备

- 24.1 全波长光栅酶标仪或配有 450 nm 滤光片的酶标仪。
- 24.2 电子天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 24.3 高速离心机: $\geq 12\ 000$  r/min。
- 24.4 组织匀浆器。
- 24.5 37 °C 恒温培养箱。
- 24.6 温控磁力搅拌器。

## 25 分析步骤

注:为避免毒素的危害,应戴手套进行操作。移液器吸头等用过的器材、废弃的提取液等应在氢氧化钠溶液(1 mol/L)中浸泡 1 h 以上,以使毒素分解。

## 25.1 试样制备

对新鲜或冷冻后解冻的样品,用水清洗鱼体表面的污物,滤纸吸干鱼体表面的水分后用剪刀将鱼体分解成肌肉、肝脏、肠道、皮肤、卵巢(雄性为精囊)等部分,各部分组织分别用水洗去血污,滤纸吸干表面的水分后称重。

## 25.2 试样提取

将待测河豚鱼组织用剪刀剪碎,加入 5 倍体积的乙酸溶液(0.1%)[即 1 g 组织中加入乙酸溶液(0.1%)5 mL],用组织匀浆器磨成糊状。取相当于 5 g 河豚组织的匀浆糊(即 25 mL)于烧杯中,置温控磁力搅拌器上边加热边搅拌,达到 100 °C 时持续 10 min 后取下,冷却至室温后,8 000 r/min 离心 15 min,快速过滤于 125 mL 分液漏斗中。滤纸残渣用 20 mL 乙酸溶液(0.1%)分次洗净,合并洗液,置温控磁力搅拌器上边加热边搅拌,达到 100 °C 时持续 3 min 后取下,8 000 r/min 离心 15 min,合并上清液。加入等体积的乙醚振荡脱脂,静置分层后,放出水层至另一分液漏斗中并以等体积乙醚再重复脱脂一次,将水层放入 100 mL 锥形瓶中,于 35 °C 旋转蒸发去除其中残存的乙醚,将提取液移入 50 mL 容量瓶中。用氢氧化钠溶液(1 mol/L)调 pH 至 6.5~7.0,并用 PBS 溶液定容至 50 mL,立即用于检测(每毫升提取液相当于 0.1 g 河豚组织试样)。当日不能检测的提取液经减压浓缩去除其中残存的乙醚后不调 pH,密封后-20 °C 冷冻保存,在检测前调节 pH 并定容至 50 mL,立即检测。

## 25.3 测定

### 25.3.1 包被酶标微孔板

用包被抗原包被酶标板,120  $\mu$ L/孔,4 °C 静置 12 h。

### 25.3.2 抗体抗原反应

将抗河豚毒素单克隆抗体工作液分别与不同浓度的河豚毒素标准系列工作液等体积混合于 2 mL 试管内,4 °C 静置 12 h 或 37 °C 温育 2 h,备用。此溶液用于制作河豚毒素的标准曲线。

将抗河豚毒素单克隆抗体工作液与试样提取液等体积混合于 2 mL 试管内,4 °C 静置 12 h 或 37 °C 温育 2 h,备用。此溶液用于测定试样中河豚毒素的含量。

### 25.3.3 封闭

已包被的酶标板用 PBS-T 洗液洗涤 3 次(每次浸泡 3 min)后,加封闭液封闭,200  $\mu$ L/孔,置 37 °C 温育 2 h。

### 25.3.4 显色及测定

封闭后的酶标板用 PBS-T 洗液洗涤 3 次(每次浸泡 3 min),加入 25.3.2 中制备好的抗原抗体反应液(在酶标板的适当孔位加抗体稀释液作为阴性对照),100  $\mu$ L/孔,37 °C 温育 2 h,酶标板用 PBS-T 洗液洗涤 3 次(每次浸泡 3 min)后,加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体工作液,100  $\mu$ L/孔,37 °C 温育 1 h,酶标板用 PBS-T 洗液洗涤 5 次(每次浸泡 3 min),加新配制的底物溶液,100  $\mu$ L/孔,37 °C 温育 15 min 后,每孔加入 50  $\mu$ L 硫酸溶液(2 mol/L)终止显色反应,在波长 450 nm 处测定吸光度值。

## 25.4 标准曲线的制作

根据 25.3.4 中获得的河豚毒素标准系列的吸光度值,以河豚毒素标准系列工作液的浓度的对数值(以 10 为底的对数值)为横坐标,以河豚毒素标准系列工作液的吸光度值与 0  $\mu$ g/L 的河豚毒素标准工

作液的吸光度值的比值为纵坐标,绘制标准曲线。

#### 25.5 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

#### 26 分析结果的表述

试样中河豚毒素含量按式(4)计算:

$$X = \frac{c \times V \times f}{m} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- $X$  —— 试样中河豚毒素的含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );
- $c$  —— 由标准曲线得到的试样待测液中河豚毒素的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );
- $V$  —— 定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- $f$  —— 稀释倍数;
- $m$  —— 试样的称样量,单位为克( $\text{g}$ )。

#### 27 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

#### 28 其他

本方法的检出限为 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 附录 A

## 河豚毒素致小鼠死亡时间与鼠单位换算及小鼠体重校正系数

河豚毒素致小鼠死亡时间与鼠单位换算及小鼠体重校正系数见表 A.1 和表 A.2。

表 A.1 河豚毒素致小鼠死亡时间-鼠单位(MU)换算表

致死时间 分:秒	鼠单位(MU)	致死时间 分:秒	鼠单位(MU)	致死时间 分:秒	鼠单位(MU)
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		

表 A.2 小鼠体重-鼠单位校正表

小鼠体重/g	鼠单位(MU)
19.0	0.95
19.5	0.98
20.0	1.00
20.5	1.03
21.0	1.05

**附 录 B**  
**小鼠生物法计算示例**

从 10.0 g 脏器试样提取得到 25 mL 试样溶液对 3 只小鼠进行试验,若中位数致死时间是 5 min 15 s,小鼠体重为 19.5 g,试样提取液的毒力约为 3.58 MU/mL。按表 A.1 可以推测,稀释 1 倍后死亡时间约为 10 min。将试样溶液稀释 1 倍进行试验,若得出中位数致死时间为 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,按表 A.2 的重量校正系数为 0.98,所以毒力计算如下:

$$1 \text{ g 试样的毒力} = 1.80 \times 3.11 \times 2 \times 0.98 = 10.97 \text{ MU}。$$

附录 C  
河豚毒素标准溶液的色谱图

河豚毒素标准溶液的提取离子色谱图见图 C.1。

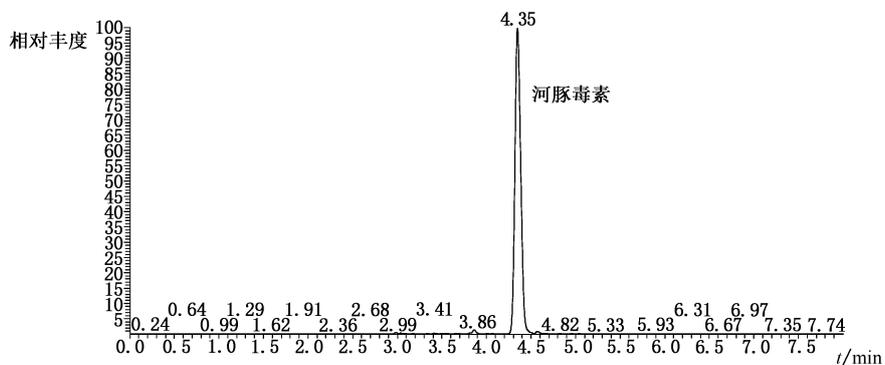


图 C.1 河豚毒素标准溶液的提取离子色谱图

河豚毒素标准溶液的液相色谱图见图 C.2。

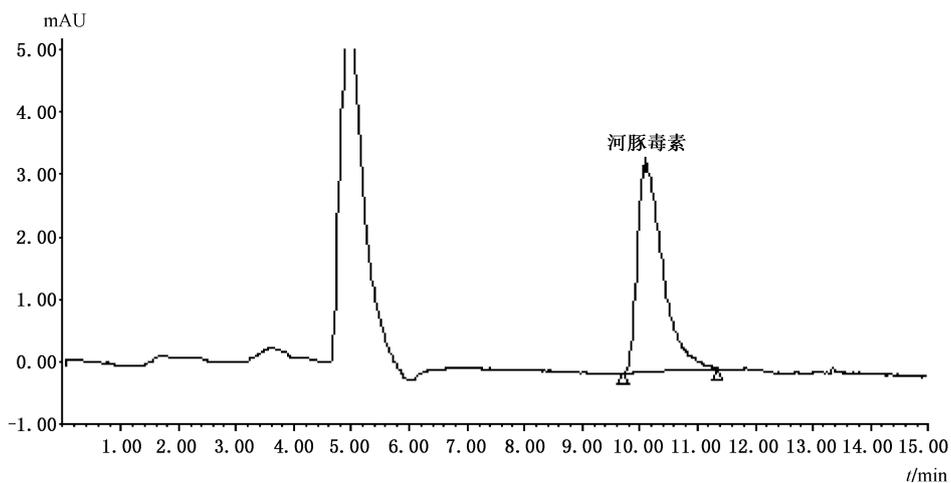


图 C.2 河豚毒素标准溶液的液相色谱图