

ICS 67.040  
C 53



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.206—2007

---

## 鲜河豚鱼中河豚毒素的测定

Determination of tetrodotoxin in fresh pufferfish

2007-10-29 发布

2008-04-01 实施

---

中华人民共和国卫生部  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人：计融、李凤琴、王健伟、罗雪云、江涛、韩春卉、张靖。

## 鲜河豚鱼中河豚毒素的测定

### 1 范围

本标准规定了鲜河豚鱼中河豚毒素(tetrodotoxin,简称为 TTX)的测定方法。

本标准适用于鲜河豚鱼中 TTX 的测定。

本标准对 TTX 的检出限为 0.1  $\mu\text{g/L}$ ,相当于样品中 1  $\mu\text{g/kg}$  的 TTX,标准曲线线性范围为 5  $\mu\text{g/L}$ ~500  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2 原理

样品中的河豚毒素经提取、脱脂后与定量的特异性酶标抗体反应,多余的游离酶标抗体则与酶标板内的包被抗原结合,加入底物后显色,与标准曲线比较来测定 TTX 含量。

### 3 试剂

除 TTX 标准品外,实验所用的化学试剂均为分析纯。

- 3.1 抗河豚毒素单克隆抗体:杂交瘤技术生产并经纯化的抗 TTX 单克隆抗体。
- 3.2 牛血清白蛋白(BSA)。
- 3.3 人工抗原:牛血清白蛋白-甲醛-河豚毒素连接物(BSA-HCHO-TTX), $-20^{\circ}\text{C}$ 保存,冷冻干燥后的人工抗原可室温或 $4^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 3.4 河豚毒素标准品:纯度 98%。
- 3.5 乙酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )。
- 3.6 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )。
- 3.7 乙酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )。
- 3.8 乙醚。
- 3.9 *N,N*-二甲基甲酰胺。
- 3.10 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB): $4^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- 3.11 辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 TTX 单克隆抗体: $-20^{\circ}\text{C}$ 保存,冷冻干燥后的酶标抗体可室温或 $4^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 3.12 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )。
- 3.13 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )。
- 3.14 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )。
- 3.15 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )。
- 3.16 氯化钠( $\text{NaCl}$ )。
- 3.17 氯化钾( $\text{KCl}$ )。
- 3.18 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): $4^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- 3.19 纯水(Milli Q 系统净化)。
- 3.20 吐温-20(Tween-20)。
- 3.21 柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )。
- 3.22 98%浓硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )。

## 4 溶液配制

### 4.1 0.2 mol/L pH 4.0 乙酸盐缓冲液的制备

4.1.1 0.2 mol/L 乙酸钠:16.4 g 乙酸钠加纯水溶解并定容至 1 000 mL。

4.1.2 0.2 mol/L 乙酸:11.4 g 乙酸加纯水溶解并定容至 1 000 mL。

4.1.3 0.2 mol/L pH 4.0 乙酸盐缓冲液:取 0.2 mol/L 乙酸钠 2.0 mL 和 0.2 mol/L 乙酸 8.0 mL 混合而成。

### 4.2 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)的制备

分别称取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 g、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g,加纯水溶解并定容至 1 000 mL。

### 4.3 TTX 标准储备溶液的制备

将河豚毒素标准品溶于 0.2 mol/L pH 4.0 乙酸盐缓冲液中,配成浓度为 1.0 g/L 的标准储备液,密封后 4℃ 保存备用。

### 4.4 TTX 标准工作溶液的制备

将 TTX 标准储备液用 0.01 mol/L PBS 配制成浓度分别为 5 000.00  $\mu\text{g/L}$ 、2 500.00  $\mu\text{g/L}$ 、1 000.00  $\mu\text{g/L}$ 、500.00  $\mu\text{g/L}$ 、250.00  $\mu\text{g/L}$ 、100.00  $\mu\text{g/L}$ 、50.00  $\mu\text{g/L}$ 、25.00  $\mu\text{g/L}$ 、10.00  $\mu\text{g/L}$ 、5.00  $\mu\text{g/L}$ 、1.00  $\mu\text{g/L}$ 、0.50  $\mu\text{g/L}$ 、0.10  $\mu\text{g/L}$ 、0.05  $\mu\text{g/L}$  的 TTX 标准工作溶液,工作溶液现用现配。

### 4.5 包被缓冲液(pH 9.6 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)的制备

分别称取  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g、 $\text{NaHCO}_3$  2.93 g,加纯水溶解并定容至 1 000 mL。

### 4.6 封闭液的制备

2.0 g BSA 加 PBS 溶解并定容至 1 000 mL。

### 4.7 洗液的制备

999.5 mL PBS 溶液中加入 0.5 mL 的吐温-20。

### 4.8 抗体稀释液的制备

1.0 g BSA 加 PBS 溶解并定容至 1 000 mL。

### 4.9 底物缓冲液的制备

4.9.1 0.1 mol/L 柠檬酸溶液:21.01 g 柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )加纯水溶解并定容至 1 000 mL。

4.9.2 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液:71.6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  加纯水溶解并定容至 1 000 mL。

4.9.3 底物缓冲液:将 0.1 mol/L 柠檬酸溶液、0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液和纯水按照 24.3 : 25.7 : 50 的比例现用现配。

### 4.10 底物溶液的制备

4.10.1 TMB 储存液:200 mg TMB 溶于 20 mL *N,N*-二甲基甲酰胺中而成,4℃ 避光保存。

4.10.2 底物溶液:将 75  $\mu\text{L}$  TMB 储存液、10 mL 底物缓冲液和 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  混合而成。

### 4.11 终止液

2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。取 891.5 mL 98% 的浓硫酸,缓缓加至盛有 108.5 mL 纯水的容量瓶中混匀。

### 4.12 0.1% 乙酸溶液

1 mL 乙酸加到 999 mL 纯水中。

### 4.13 1 mol/L NaOH 溶液

40 g NaOH 加纯水溶解并定容至 1 000 mL。

## 5 仪器

### 5.1 组织匀浆器。

- 5.2 温控磁力搅拌器。
- 5.3 高速离心机。
- 5.4 全波长光栅酶标仪或配有 450 nm 滤光片的酶标仪。
- 5.5 可拆卸 96 孔酶标微孔板。
- 5.6 恒温培养箱。
- 5.7 微量加样器及配套吸头(100  $\mu$ L、200  $\mu$ L 和 1 000  $\mu$ L)。
- 5.8 分析天平(精密度万分之一)。
- 5.9 架盘药物天平。
- 5.10 125 mL 分液漏斗。
- 5.11 100 mL 量筒。
- 5.12 100 mL 烧杯。
- 5.13 剪刀。
- 5.14 漏斗。
- 5.15 10 mL 吸管。
- 5.16 100 mL 磨口具塞锥形瓶。
- 5.17 容量瓶(50 mL、1 000 mL)。
- 5.18 pH 试纸。
- 5.19 研钵。

## 6 分析步骤

### 6.1 样品采集及运输

现场采集样品后立即 4℃ 冷藏,并于当天运至实验室进行检验。如果路途遥远,可于当天进行冷冻,并应保存在冷冻状态中运输至检验实验室。

### 6.2 取样

对冷藏样品或冷冻后解冻的样品,用蒸馏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,各部分组织分别用蒸馏水洗去血污,滤纸吸干表面的水分后称重。

### 6.3 样品提取

6.3.1 将待测河豚组织用剪刀剪碎,加入 5 倍体积 0.1% 的乙酸溶液(即 1 g 组织中加入 0.1% 乙酸 5 mL),用组织匀浆器磨成糊状。

6.3.2 取相当于 5 g 河豚组织的匀浆糊(25 mL)于烧杯中,置温控磁力搅拌器上边加热边搅拌,达 100℃ 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。

6.3.3 滤纸残渣用 20 mL 0.1% 乙酸分次洗净,洗液合并于原烧杯中,置温控磁力搅拌器上边加热边搅拌,达 100℃ 时持续 3 min 后取下,8 000 r/min 离心 15 min 过滤,滤液合并于 6.3.2 分液漏斗中。

6.3.4 在 6.3.2 分液漏斗的清液中加入等体积乙醚振摇脱脂,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,减压浓缩去除其中残存的乙醚后,将提取液移入 50 mL 容量瓶中。

6.3.5 将 6.3.4 的提取液用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 6.5~7.0,并用 PBS 定容至 50 mL,立即用于检测(每毫升提取液相当于 0.1 g 河豚组织样品)。

6.3.6 当天不能检测的提取液经减压浓缩去除其中残存的乙醚后不用 NaOH 调 pH,密封后 -20℃ 以下冷冻保存,在检测前调节 pH 并定容至 50 mL 立即检测。

### 6.4 测定

#### 6.4.1 包被酶标微孔板

用 BSA-HCHO-TTX 人工抗原包被酶标板,120  $\mu$ L/孔,4℃ 静置 12 h。

## GB/T 5009.206—2007

## 6.4.2 抗体抗原反应

将辣根过氧化物酶标记的纯化 TTX 单克隆抗体稀释后分别：

- a) 与等体积不同浓度的河豚毒素标准溶液在 2 mL 试管内混合后, 4℃ 静置 12 h 或 37℃ 温育 2 h 备用。此液用于制作 TTX 标准抑制曲线。
- b) 与等体积样品提取液在 2 mL 试管内混合后, 4℃ 静置 12 h 或 37℃ 温育 2 h 备用。此液用于测定样品中 TTX 含量。

## 6.4.3 封闭

已包被的酶标板用 PBS-T 洗 3 次(每次浸泡 3 min)后, 加封闭液封闭, 200 μL/孔, 置 37℃ 温育 2 h。

## 6.4.4 测定

封闭后的酶标板用 PBS-T 洗 3×3 min 后, 加抗原抗体反应液(在酶标板的适当孔位加抗体稀释液作为阴性对照), 100 μL/孔, 37℃ 温育 2 h, 酶标板洗 5×3 min 后, 加新配制的底物溶液, 100 μL/孔, 37℃ 温育 10 min 后, 每孔加入 50 μL 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色反应, 于波长 450 nm 处测定吸光度值。

## 6.5 结果计算

样品中 TTX 的含量按式(1)计算：

$$X = m_1VD/V_1m \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

*X*——样品中 TTX 的含量, 单位为微克每千克(μg/kg)；

*m*<sub>1</sub>——酶标板上测得的 TTX 的质量, 单位为纳克(ng), 根据标准曲线按数值插入法求得；

*V*——样品提取液的体积, 单位为毫升(mL)；

*D*——样品提取液的稀释倍数；

*V*<sub>1</sub>——酶标板上每孔加入的样液体积, 单位为毫升(mL)；

*m*——样品质量, 单位为克(g)。

---