

食品中海洋生物毒素之檢驗方法—神經性貝類毒素之檢驗

Method of Test for Marine Biotoxins in Foods-

Test of Neurotoxic Shellfish Poison

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於貝類中神經性貝類毒素(neurotoxic shellfish poison, NSP)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以小鼠生物試驗(mouse bioassay)之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.2. 減壓濃縮機(Rotary evaporator)。
 - 2.1.3. 振盪器(Shaker)。
 - 2.1.4. 離心機：可達6000×g以上。
 - 2.2. 試藥：鹽酸、無水乙醚、Tween-60、氯化鈉及次氯酸鈉均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心瓶：500 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：100 mL及1000 mL。
 - 2.3.3. 分液漏斗：500 mL。
 - 2.3.4. 燒杯：500 mL。
 - 2.3.5. 減壓濃縮瓶：500 mL。
 - 2.3.6. 布氏漏斗。
 - 2.3.7. 金屬篩網：孔徑2 mm。
 - 2.3.8. 刀片或小刀。
 - 2.3.9. 注射針：1 mL，針頭25 G以上。
 - 2.3.10. 計時器。
 - 2.4. 試驗動物：ICR品系雄性小鼠，體重14~20 g。
 - 2.5. 試劑之調製：
 - 2.5.1. 0.85%氯化鈉溶液：

稱取氯化鈉0.85 g，以去離子水溶解使成100 mL。
 - 2.5.2. 1% Tween-60氯化鈉溶液：

稱取Tween-60 1 g，以0.85%氯化鈉溶液溶解使成100 mL。
 - 2.5.3. 5%次氯酸鈉溶液：

稱取次氯酸鈉50 g，以去離子水溶解使成1000 mL。
 - 2.6. 檢體前處理^(註1)：

2.6.1. 生鮮含殼貝類檢體：

用水將檢體外殼徹底洗淨，以刀片或小刀切斷閉殼肌開殼，用水沖洗內部去除泥沙及其他外來物。將閉殼肌和連接在絞合部之組織分開，取出貝肉，勿割破肉體。開殼前不可加熱或使用麻醉劑。稱取貝肉200 g置於金屬篩網上，瀝水5分鐘，去除碎殼等雜物，將貝肉均質後備用。

2.6.2. 冷凍檢體：

檢體於室溫下退冰成半冷凍狀態。帶殼檢體按2.6.1.節清洗、開殼、沖洗取出貝肉及除去貝肉外部附著之冰片，擦乾水分後於室溫下回溫。稱取貝肉200 g置於金屬篩網上，瀝水5分鐘，將貝肉均質後備用。

2.6.3. 貝類罐頭：

將檢體內容物瀝乾水分，倒入均質機均質後備用。

2.6.4. 貝類乾製品：

稱取檢體100 g，加入足量清水，於4°C冷藏浸泡24~48小時，瀝乾水分後均質備用。

2.6.5. 醃漬品：

檢體先以水洗，去除鹽分，瀝乾水分後均質備用。

註1：每種貝類檢體至少要取10個以上，且貝肉需達200 g以上。

冷凍檢體送驗時須為冷凍狀態或運送溫度應保持0~10°C。

2.7. 檢液之調製：

取2.6.節均質後檢體100 g，置於燒杯中，加入氯化鈉5 g及鹽酸1 mL，加熱攪拌至沸騰，轉小火煮5分鐘，冷卻至室溫，移入離心管瓶，以無水乙醚50 mL清洗燒杯，洗液併入離心瓶中，再加入無水乙醚100 mL，蓋上蓋子充分振盪，以6000 ×g離心15分鐘。將上層液移至分液漏斗中，殘渣再以無水乙醚250 mL分三次重複萃取，將無水乙醚層併入分液漏斗中，輕輕振搖，避免生成乳濁液，靜置分層，去除下層水層及貝肉碎片，將上層無水乙醚層移入減壓濃縮瓶中，於35°C減壓濃縮去除無水乙醚，殘留物以1% Tween-60氯化鈉溶液清洗至最終體積為10 mL，混合均勻，供作檢液。

2.8. 小鼠生物試驗操作：

取檢液各1 mL，分別注入3隻小鼠腹腔^(註2)，觀察是否使試驗動

物產生特異性臨床徵狀，如呼吸困難、步履蹣跚、翻滾、四肢抽搐等，並以計時器記錄致死時間。自注射起連續觀察930分鐘，若小鼠的中間致死時間(第2隻小鼠死亡時間)在2小時以內，則用1% Tween-60氯化鈉溶液稀釋檢液後重新注射另外3隻小鼠，直到小鼠的中間致死時間在2~6小時內。另取1% Tween-60氯化鈉溶液1 mL作空白對照組，同檢液組操作。

註2:注射時若有檢液溢出，須將該小鼠丟棄，並重新注射一隻。

2.9. 檢體毒素劑量之計算：

由檢液組或稀釋液組中各小鼠死亡時間參照致死時間—小鼠單位換算表(附表一)，查出對應之小鼠單位，與小鼠體重—小鼠單位校正表(附表二)之校正係數相乘，求得各小鼠 $CMU_{(i)}$ ，取各小鼠 $CMU_{(i)}$ 之中位數($CMU_{(g)}$)^(註3)，並依下列計算式求出檢體毒素劑量(MU/kg)：

$$\text{檢體毒素劑量(MU/kg)} = \frac{CMU_{(g)} \times F}{W \times 1000}$$

$CMU_{(g)}$ ：檢液組或稀釋液組中各小鼠 $CMU_{(i)}$ 之中位數(MU/mL)

F：檢液稀釋倍數

W：檢液1 mL相當之檢體重量(g/mL)

註3：若檢液組或稀釋液組僅2隻小鼠於930分鐘內死亡，計算2隻小鼠 $CMU_{(i)}$ ，取較小 $CMU_{(i)}$ 為 $CMU_{(g)}$ ，計算檢體毒素劑量；若檢液組僅1隻小鼠於930分鐘內死亡，或所有小鼠均不死亡，則檢體毒素劑量以 $< 100 \text{ MU/kg}$ 表示。

附註：手套、玻璃製品等用過器材，及廢棄萃取液應浸泡5%次氯酸鈉溶液1小時以上，使毒素分解，再作清洗或丟棄。

參考文獻：

1. American Public Health Association. 1970. Recommended procedures for the examination of sea water and shellfish. 4th Edition. pp. 61-66. APHA. New York, NY, USA.
2. 國家食品藥品監督管理總局。2016。食品安全國家標準貝類中神經性貝類毒素的測定。中華人民共和國國家標準。GB5009.261。

附表一、神經性貝類毒素之致死時間—小鼠單位換算表

致死時間(分鐘)	MU	致死時間(分鐘)	MU
8	10.0	105	3.0
10	9.0	140	2.8
12	8.0	180	2.6
14	7.0	234	2.4
16	6.0	300	2.2
18	5.0	360	2.0
20	4.5	435	1.8
30	4.0	540	1.6
38	3.8	645	1.4
45	3.6	780	1.2
60	3.4	930	1.0
83	3.2		

附表二、小鼠體重—小鼠單位之校正表

小鼠體重(g)	體重校正係數	小鼠體重(g)	體重校正係數
14	0.63	18	0.87
15	0.69	19	0.94
16	0.75	20	1.00
17	0.81		