

中华人民共和国国家标准

农业部 1163 号公告 — 1 — 2009

动物性食品中己烯雌酚残留检测 酶联免疫吸附测定法

Determination of diethylstilbestrol residue in animal derived food
Enzyme linked immunosorbent assay method

2009-02-06 发布

2009-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国农业大学动物医学院、山东省兽药监察所。

本标准主要起草人：沈建忠、高迎春、陈玲、冯修光、万宇平、张素霞、何方洋、魏秀丽、冯才伟。

本标准系首次发布的国家标准。

动物性食品中己烯雌酚残留检测 酶联免疫吸附测定法

1 范围

本标准规定了动物性食品中己烯雌酚残留量的制样和快速检测—酶联免疫吸附测定方法。

本标准适用于猪肉、猪肝、虾样本中己烯雌酚残留量的快速筛选检测。可疑样品应用仪器方法进行确认。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规则和实验方法

3 制样

3.1 样品的制备

取新鲜或解冻的空白或供试动物组织,剪碎,置于组织匀浆机中高速匀浆。

3.2 样品的保存

-20℃以下冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法提要 and 原理

采用间接竞争 ELISA 方法,在微孔条上包被偶联抗原,试样中残留的己烯雌酚与酶标板上的偶联抗原竞争己烯雌酚抗体,加入酶标记的羊抗鼠抗体后,显色剂显色,终止液终止反应。用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度,吸光度值与己烯雌酚残留量成负相关,与标准曲线比较即可得出己烯雌酚残留含量。

4.2 试剂和材料

以下所有试剂,均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.2.1 乙腈。

4.2.2 丙酮。

4.2.3 三氯甲烷。

4.2.4 氢氧化钠。

4.2.5 磷酸(85%)。

4.2.6 己烯雌酚检测试剂盒:2℃~8℃保存。

4.2.6.1 96 孔板(12 条×8 孔):包被有己烯雌酚偶联抗原。

4.2.6.2 己烯雌酚系列标准溶液:0 μg/L>0.1 μg/L>0.3 μg/L>0.9 μg/L>2.7 μg/L>8.1 μg/L。

4.2.6.3 己烯雌酚抗体工作液。

4.2.6.4 酶标记物工作液。

4.2.6.5 2 倍浓缩缓冲液。

4.2.6.6 20 倍浓缩洗涤液。

4.2.6.7 底物液 A 液。

4.2.6.8 底物液 B 液。

4.2.6.9 终止液。

4.2.7 乙腈-丙酮溶液(84+16, v/v):取乙腈 84 mL 和丙酮 16 mL,混匀。

4.2.8 2 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 8.0 g 氢氧化钠,用 100 mL 水溶解,冷却至室温。

4.2.9 6 mol/L 磷酸溶液:100 mL 磷酸加去离子水 150 mL,混合均匀。

4.2.10 缓冲液工作液:用水将 2 倍浓缩缓冲液按 1:1 体积比进行稀释(1 份 2 倍浓缩缓冲液+1 份水)用于溶解干燥的残留物。2℃~8℃保存,有效期 1 个月。

4.2.11 洗涤液工作液:用水将 20 倍浓缩洗涤液按 1:19 体积比进行稀释(1 份 20 倍浓缩洗涤液+19 份水)用于酶标板的洗涤。2℃~8℃保存,有效期 1 个月。

4.3 仪器与设备

4.3.1 酶标仪:配备 450 nm 滤光片。

4.3.2 匀浆器。

4.3.3 涡旋振荡器。

4.3.4 离心机。

4.3.5 微量移液器:单道 20 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 1 000 μ L;多道 250 μ L。

4.3.6 天平:感量 0.01 g。

4.3.7 分析天平:感量 0.000 01 g。

4.3.8 氮气吹干装置。

4.4 试料的制备

试料的制备包括:

——取制备后的供试样品,作为供试试料;

——取制备后的空白样品,作为空白试料;

——取制备后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.5 测定

4.5.1 提取

称取(2 $\pm$ 0.02) g 匀浆后的试料,加乙腈-丙酮(84+16, v/v) 6 mL,振摇 10 min, 15℃, 3 000 r/min 离心 10 min;取上清液 3.0 mL, 60℃水浴下氮气吹干;加氯仿 0.5 mL,涡动 20 s,加 2 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL,涡动 30 s, 3 000 r/min 离心 5 min;取上清液 1.0 mL,加 6 mol/L 磷酸溶液 200 μ L,涡动 5 s,加乙腈 3.0 mL 萃取,振荡 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min;取上层有机相 1.0 mL, 60℃水浴下氮气吹干;用缓冲工作液 1.0 mL 溶解残留物,取 50 μ L 作为试样液分析。本方法的稀释倍数为 6 倍。

4.5.2 试样测定

4.5.2.1 将试剂盒在室温(19℃~25℃)下放置 1 h~2 h。

4.5.2.2 按每个标准溶液和试样溶液做 2 个或 2 个以上的平行实验,计算所需酶标板条的数量,插入板架。

4.5.2.3 加系列标准液或试样液 50 μ L 到对应的微孔中,随即加己烯雌酚抗体工作液 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 37℃避光反应 30 min。

4.5.2.4 倒出孔中液体,将酶标板倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中液体,加洗涤液工作液

250 μL /孔, 5 s 再倒掉孔中液体, 将酶标板倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。重复操作 2 遍以上(或用洗板机洗涤)。

4.5.2.5 加酶标记物工作液 100 μL /孔, 用盖板膜盖板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。

4.5.2.6 取出酶标板, 重复 4.5.2.4 洗板步骤。

4.5.2.7 依次加底物液 A 液和 B 液各 50 μL /孔, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光显色 15 min。

4.5.2.8 加终止液 50 μL /孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪在 450 nm 波长处测量吸光度值。

4.6 结果判定和表述

用所获得的标准溶液和试样溶液吸光度值的比值进行计算, 见式(1):

$$\text{相对吸光度值}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

B ——为标准(试样)溶液的吸光度值;

B_0 ——空白(浓度为 0 标准溶液)的吸光度值。

将计算的相对吸光度值(%)对应己烯雌酚标准品浓度($\mu\text{g/L}$)的自然对数作半对数图, 对应的试样浓度可从校正曲线算出, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中己烯雌酚的实际浓度。

方法筛选结果为阳性的样品, 需要用确证方法进行验证。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在猪肉、猪肝、虾样品中己烯雌酚的检测限均为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在 3 $\mu\text{g/kg}$ ~12 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率均为 60%~110%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $\leq 20\%$, 批间变异系数 $\leq 30\%$ 。