

前言

本标准是按照GB/T1.1—1993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则 第1部分：标准编写的基本规定》及SN/T 0001—1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》的要求而进行编写的。其中测定方法是在原科研成果的基础上，参照国内外有关资料，经改进并验证后制定的。本标准同时制定了抽样和制样方法。

测定低限是根据国际上对肉品中雌二醇残留量的最高限量和测定方法灵敏度而制定的。
本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出并归口。
本标准起草单位：中华人民共和国天津进出口商品检验局。
本标准主要起草人：刘克、张凤才、李剑影、戚玉凤、俞润民。
本标准系首次发布的行业标准。

1 范围

本标准规定了出口肉及肉制品中雌二醇残留量检验的抽样、制样和放射免疫测定方法。
本标准适用于出口冻牛肉中雌二醇残留量的检验。

2 抽样和制样

2.1 检验批
以不超过2500件为一检验批。
同一检验批的商品应具有相同的特征，如包装、标记、产地、规格和等级等。

2.2 抽样数量	
批量, 件	最低抽样数, 件
1~25	1
26~100	5
101~250	10
251~500	15
501~1000	17
1001~2500	20

2.3 抽样方法
按2.2规定的抽样件数随机抽取，逐件开启。从每件中至少取一袋作为原始样品。如每件中无小包装或有小包装，但每袋小包装重量超过2kg，则可用灭菌刀具从每件中割取不少于100 g，混合后置于清洁容器内，作为混合原始样品。混合原始样的总量不少于2kg。加封后，标明标记，及时送交实验室。
2.4 试样制备
从混合原始样品中取出部分有代表性样品，将可食部分放入绞碎机中绞碎，充分混匀，用四分法缩分至不少于500 g，均分成两份。装入清洁容器内作为试样，加封并标明标记。
2.5 试样保存
将试样于－18℃以下冷冻保存。
注：在抽样和制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

3 测定方法

3.1 方法提要
试样中残留的雌二醇，用二氯甲烷提取。提取液经蒸干，残渣用甲醇水溶液浸出。浸出液经C ₁₈ 柱净化后，加入雌二醇抗体及标记的雌二醇溶液，置4℃静置后加分离剂，离心，取上清液，用液体闪烁分析仪进行测定。
3.2 试剂和材料
除另有规定外，试剂均为分析纯，水为重蒸馏水。
3.2.1 磷酸氢二钠溶液：取35.81g磷酸氢二钠(Na ₂ HP0 ₄ ·12H ₂ O)，溶解于水中并稀释至500mL。
3.2.2 磷酸二氢钠溶液：取5.52g磷酸二氢钠(NaH ₂ P0 ₄ ·2H ₂ O)，溶解于水中并稀释至200mL。
3.2.3 磷酸盐缓冲溶液：取400mL磷酸氢二钠溶液、100 mL磷酸二氢钠溶液及9g氯化钠，充分溶解，并加水至1000 mL(pH7.1±0.1)。
3.2.4 磷酸盐—明胶缓冲液：取0.1g明胶置于100 mL磷酸盐缓冲溶液中，加热溶解。
3.2.5 活性炭：60目。
3.2.6 葡聚糖：G200。
3.2.7 分离剂(活性炭—葡聚糖溶液)：取100 mg葡聚糖，溶解于100 mL磷酸盐—明胶缓冲液中，然后加1g活性炭，电磁搅拌1h，置于锥形瓶中于4℃保存，临测定前用磷酸盐—明胶缓冲液稀释4倍。
3.2.8 甲醇水溶液：20%(V/V)。
3.2.9 甲醇—磷酸盐—明胶缓冲液；甲醇水溶液+磷酸盐—明胶缓冲液(1+4)。
3.2.10 冰乙酸—乙醇溶液：冰乙酸+无水乙醇(1+80)。
3.2.11 氢氧化钠溶液：0.1mol/L。
3.2.12 二氯甲烷：重蒸馏。
3.2.13 2，5-二苯基噁唑。
3.2.14 1,4-双[2'-(4'-甲基-5'-苯基噁唑)]-苯。
3.2.15 闪烁液：取4g2，5-二苯基噁唑和0.2g1，4-双[2'-(4'-甲基-5'-苯基噁唑)]-苯，溶于1000 mL二甲苯中，充分混匀，置于棕色瓶内，静置三日后即可使用。
3.2.16 雌二醇-6-羧甲基-BSA抗血清(E ₂ -Ab)：上海市内分泌研究所制品或相当者，4℃保存。
3.2.17 雌二醇标准品：纯度≥99%(USA Sigma公司提供或相当者。)
3.2.18 雌二醇标准储备液：取适量雌二醇标准品，用无水甲醇配成浓度为1mg/mL的标准储备液，密封，置4℃保存。
3.2.19 雌二醇标准工作液：取一定量的雌二醇标准储备液，用甲醇—磷酸盐—明胶缓冲液(3.2.9)稀释成10，20，50，100，200，400 pg/100 μL的标准工作液。
3.2.20 雌二醇标记物(³ H-E ₂ =38Ci/mmol)：英国放化中心Amersham生产，或相当者。取一定的原液吹至近干，加入磷酸盐缓冲溶液(3.2.3)配成7000cpm/100μL工作液，置4℃保存(有效期内使用)。
3.2.21 净化柱：Sep-pak C ₁₈ 小柱。
3.2.22 氮气。

3.3 仪器和设备
3.3.1 液体闪烁分析仪。仪器操作条件：机器运行时，环境温度为15～30℃，相对湿度为30%～80%。确定本仪器地点远离所有的放射源。
3.3.2 绞碎机：电动。
3.3.3 低温离心机：不低于8000 r/min。
3.3.4 水浴锅：恒温温度(40±1)℃。
3.3.5 电磁搅拌器。
3.3.6 微量注射器：50～200 μL。
3.3.7 低钾闪烁瓶。
3.3.8 试管：75mm×16mm，带磨口玻璃塞。
3.4 测定步骤
3.4.1 提取
称取4g试样(精确至0.1g)，置于洁净的50 mL具塞的锥形瓶中，加入0.8mL氢氧化钠溶液(3.2.11)及10 mL二氯甲烷，加盖振摇20 min，于3500r/min离心10 mm，弃去上层氢氧化钠层并分离出二氯甲烷层。于残渣中再加10 mL二氯甲烷，重复上述操作。合并两次二氯甲烷层，加入5mL水，振摇1min后于3500 r/min离心10 min，弃去水层，将提取液置40℃水浴中以氮气流吹至近干。用2mL甲醇水溶液溶解残留物，将溶液注入C ₁₈ 净化柱，用约10 mL水淋洗，弃去流出液。用10 mL冰乙酸—乙醇溶液(3.2.10)进行洗脱，收集10 mL洗脱液于试管中。置40℃水浴中以氮气吹至近干。临测定前加入1 mL甲醇—磷酸盐—明胶缓冲液溶解残渣作为最终样液，供液体闪烁分析仪测定。
3.4.2 标准曲线的绘制
取18只试管并编号，按下述操作过程制备。
1号、2号管作为测量总T数用。分别加入700μL磷酸盐—明胶缓冲液(3.2.4)和50μL雌二醇标记物(3.2.20)后，于4℃静置12h。
3号、4号管作为测量非特异结合率(NSB)用。分别依次加入300 μL磷酸盐—明胶缓冲液(3.2.4)和50μL雌二醇标记物(3.2.20)后，于4℃静置12h，加入400 μL分离剂。
5号、6号管作为测量特异结合率(B ₀)用。分别依次加入100μL磷酸盐—明胶缓冲液(3.2.4)、200 μL雌二醇抗血清和50 μL雌二醇标记物(3.2.20)后，于4℃静置12h，加入400 μL分离剂。
7～18号管作为标准溶液管用。选10，20，50，100，200，400pg/100μL六个浓度标准工作液，每个浓度用两管。分别依次加入100 μL标准工作溶液、200 μL雌二醇抗血清和50μL雌二醇标记物(3.2.20)后，于4℃静置12h，加入400μL分离剂。

以上各管静置30 min后以3500 r/min离心20 min，吸取每管全部上清液，放入闪烁瓶内，加入10 mL闪烁液，静置3h后，在液体闪烁分析仪上测定放射性计数。

总T表示标记物在本次实验中的浓度，该浓度应和样液中被测物浓度保持同一水平，如偏离太远，应适当调节试液浓度。

按式(1)计算B/B₀值：

$$B / B_0 = \frac{B - NSB}{B_0 - NSB} \times 100 \quad \text{----- (1)}$$

式中：B/B₀—结合率，%；

B—标准工作液各浓度双管计数均值；

B₀—特异结合双管(即5号、6号管)计数均值；

NSB—非特异结合双管(即3号、4号管)计数均值。

求得B/B₀(%)值后，以此为纵坐标，各标准工作液浓度为横坐标，在半对数坐标纸上绘制标准曲线。

3.4.3 样液测定
取2只试管编号，于每只试管中分别依次加入100 μL最终样液、200μL雌二醇抗血清及50μL雌二醇标记物(3.2.20)后，于4℃静置12h，加入400 μL分离剂，以下操作方法与制作标准曲线相同。

根据液体闪烁分析仪测定的数据，求得B/B₀(%)值，再从标准曲线上查出样液中雌二醇的浓度。

3.4.4 空白试验
使用经脱激素肉样，按上述测定步骤进行操作。

3.5 结果计算和表述
按式(2)计算试样中雌二醇残留含量：

$$X = \frac{c \cdot V}{m} \quad \text{----- (2)}$$

式中：X—试样中雌二醇残留含量，μg/kg；

c—从标准曲线上查得样液中雌二醇浓度，ng/mL；

V—样液最终体积，mL；

m—所称试样量，g。

注：计算结果应扣除空白值。

4 测定低限、回收率

4.1 测定低限
本方法的测定低限为0.05μg/kg。

4.2 回收率
牛肉中雌二醇添加浓度及其回收率的实验数据：

在0.05μg/kg时，回收率为84.4%；

在0.10μg/kg时，回收率为92.3%；

在0.50μg/kg时，回收率为101.2%。