

前言

本标准是根据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三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：何霖。
- 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三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三醇残留量的检验。

2 抽样和制样

2.1 检验批

- 以不超过2500件为一检验批。
- 同一检验批内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者，则可用灭菌刀具在抽出的包件中每件割取不少于 100 g，混合后置于清洁容器内，作为混合原始样品。混合原始样的总重量不少于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，用四分法缩分出不少于500 g，均分两份，装入洁净容器内作为试样，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

用无水乙醚提取试样中残留的雌三醇，提取液经蒸干，残渣用缓冲液溶解并定容后与雌三醇抗体及碘标记的雌三醇抗原反应，经保温后，加免疫分离剂并离心，吸弃上清液，残渣用γ—放射免疫计数器进行计数测定，标准曲线法定量。

3.2 试剂和材料

- 除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为重蒸馏水。
- 3.2.1 无水乙醚。
- 3.2.2 无水乙醇。
- 3.2.3 二甲基亚砜。
- 3.2.4 活性炭(60μm)。
- 3.2.5 磷酸盐缓冲液：pH7.4。取81 mL0.02mol/L磷酸氢二钠溶液与19mL0.02mol/L磷酸二氢钠溶液混合。
- 3.2.6 溶液A：含有2‰牛血清蛋白(BSA)和1‰叠氮钠的磷酸盐缓冲液。
- 3.2.7 溶液B：含有2%二甲基亚砜(DMF)的溶液A。
- 3.2.8 雌三醇标准品：纯度≥99%，美国SIGMA公司提供(或相当者)。
- 3.2.9 雌三醇抗体(E₃—Ab)：4℃保存，北京北方免疫试剂研究所提供(或相当者)。
- 3.2.10 雌三醇碘标记物(¹²⁵I—E₃)：4℃保存(有效期内使用)，北京北方免疫试剂研究所提供(或相当者)。
- 3.2.11 分离剂：北京北方免疫试剂研究所提供(或相当者)。
- 3.2.12 雌三醇标准储备液：称取4mg雌三醇标准品(精确至0.1mg)，用无水乙醇溶解并定容至100 mL，－15℃保存(可保存半年)。
- 3.2.13 雌三醇标准中间液：取雌三醇标准储备液1mL于100 mL容量瓶中，吹干后，用溶液A(3.2.6)定容，其浓度为400 ng/mL，4℃保存(新鲜配制)。
- 3.2.14 雌三醇标准工作液：取适当雌三醇标准中间液，用溶液A(3.2.6)稀释成浓度为0，5，10，25，50，100，200 ng/mL标准工作液(当日新配)，用以制备标准曲线。

3.3 仪器和设备

- 3.3.1 γ—放射免疫计数器。
- 3.3.2 均质器：不低于1 5000 r/min。
- 3.3.3 离心机：不低于4000 r/min。
- 3.3.4 电热恒温水浴锅：0～60℃。
- 3.3.5 微量移液管：50～500 μL。
- 3.3.6 涡流混均器。
- 3.3.7 具塞离心瓶：50 mL。
- 3.3.8 刻度移液管：0.5～20 mL。

3.4 测定步骤

3.4.1 样液制备

称取4g试样(精确至0.1g)，置于洁净50 mL具塞离心瓶中。加入10 mL无水乙醚，振荡1 0 min后，3500 r/min离心5min。用尖嘴吸管吸弃水层，分离乙醚提取液于另一洁净50 mL具塞的离心瓶中。再加入1 0 mL无水乙醚，按上述步骤重复提取一次。合并两次乙醚提取液，于(40±1)℃水浴蒸干。测试前准确加入1 mL溶液B(3.2.7)以溶解残渣，制成样液。

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号作为测量非特异结合(NSB)用双管。分别依次加入250 μL溶液A(3.2.6)、100 μL¹²⁵I—E₃(3.2.10)，充分混匀。
- 3号、4号作为测量特异结合(B₀)用双管。分别依次加入50 μL溶液A(3.2.6)、100 μL¹²⁵I—E₃(3.2.10)、200 μLE₃—Ab(3.2.9)，充分混匀。
- 5～1 8号为标准管(B)，分别加入50 μL不同浓度雌三醇标准工作液(3.2.14)(均做双试验)，每管再依次加入1 00 μL ¹²⁵I—E₃、200 μL E₃—Ab，充分混匀。
- 以上各管混匀后，于(37±1)℃水浴中放置1h，最后加入500 μL免疫分离剂(3.2.11)，室温放置15min，3500 r/min离心15min，吸弃上清液，上机测定沉淀物的放射性计数。
- 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，%；
- B₀—特异结合双管(即3号、4号管)计数均值；
- B—标准工作液各浓度双管计数均值；
- NSB—非特异结合双管(即1号、2号管)计数均值。
- 求出标准管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

取两支试管，分别加入50 μL样液、100 μL ¹²⁵I—E₃和200 μLE₃—Ab，按3.4.2操作步骤测定，求出B/B₀值，然后从标准曲线中查出样液中雌三醇的浓度。

3.4.4 空白试验

使用经活性炭脱激素的肉样，按上述测定步骤进行操作。

3.5 结果计算和表述

按式(2)计算试样中雌三醇残留含量：

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

- 式中：X—试样中雌三醇残留含量，μ g/kg；
- c—从标准曲线上查得样液中雌三醇浓度，ng/mL；
- V—样液最终定容体积，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5 μ g/kg。

4.2 回收率

- 牛肉中雌三醇添加浓度及其回收率实验数据：
- 在5 μ g/kg时，回收率为84.8%；
- 在10 μ g/kg时，回收率为88.5%；
- 在20 μ g/kg时，回收率为95.9%。