

前言

本标准是根据GB/T 1.1—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》的要求进行编写的。其中测定方法是参考国内外有关文献，经研究、改进和验证后而制定的。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中残留量的最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。

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。

本标准由中华人民共和国吉林进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：荣会、李庆才、牟峻。

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丙酸睾丸酮残留量的抽样、制样和放射免疫测定方法。

本标准适用于出口分割牛肉、清蒸牛肉罐头中丙酸睾丸酮残留量的检验。

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。
- 肉及肉制品(罐头除外)：从每件中取一袋作为原始样品，其总量不少于2kg，放入清洁容器内，加封后，标明标记，及时送交实验室。
- 如每件中无小包装或有小包装但每袋重量超过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。混合原始样的重量不少于2kg。加封后，标明标记，及时送交实验室。
- 罐头：从每件中随机取一罐。
- 所抽取的样品应标明标记，及时送交实验室。
- 2.4 试样制备
- 肉及肉制品(罐头除外)：从所取全部样品中缩分出有代表性样品约1000 g，充分搅碎，装入洁净容器内。密封，作为试样，标明标记。
- 罐头：将所取罐全部样品开罐取出后，充分搅碎、混匀，缩分至1 000g，均分成两份，装入洁净容器内，作为试样。密封，标明标记。
- 2.5 样品保存将试样于-18℃以下冷冻保存。
- 注：在抽样及制样的操作过程中，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
- 试样中残留的丙酸睾丸酮采用甲醇提取，提取液经与石油醚、再与乙腈进行液—液分配。所得乙腈溶液经蒸干，残渣用甲醇—水溶液(1+1)浸出，经PT-C₁₈柱净化。用甲醇洗脱，洗脱液经蒸发、定容后，用丙酸睾丸酮放射免疫分析试剂分析，用γ放射免疫计数器测定。
- 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 乙腈：用石油醚饱和。
- 3.2.2 石油醚。
- 3.2.3 甲醇。
- 3.2.4 甲醇-水(1+1)。
- 3.2.5 氯化钠。
- 3.2.6 氯化钠饱和水溶液。
- 3.2.7 PT-C₁₈柱：净化用，2g。
- 3.2.8 丙酸睾丸酮标准品：纯度≥99% (美国SIGMA公司提供或相当者)。
- 3.2.9 丙酸睾丸酮标准储备液：称取一定量(精确至0.0001g)的丙酸睾丸酮标准品，用少量甲醇溶解并准确定容至100 mL，摇匀，得浓度为0.100 mg/mL标准储备液。根据需要再配制成适用浓度的标准工作溶液。
- 3.2.10 标记物：含¹²⁵I放射性标记的丙酸睾丸酮衍生物(有效期内使用)。
- 3.2.11抗血清：含兔抗人丙酸睾丸酮抗血清0.25% (V/V)的牛血清白蛋白(BSA)，1.0 mg/mL的脂酶和0.1% (m/V)的叠氮钠。
- 3.2.12 PEG-分离剂。
- 3.2.13 磷酸二氢钠溶液：取5.52g磷酸二氢钠(含12个结晶水)，于200 mL水中溶解。
- 3.2.14 磷酸氢二钠溶液：取35.83g磷酸氢二钠(含1个结晶水)，于500 mL水中溶解。
- 3.2.15 磷酸盐缓冲溶液：取400 mL磷酸氢二钠溶液、100 mL磷酸二氢钠溶液、9g氯化钠及500 mL水，混匀(pH7.0～7.2)。
- 3.3 仪器和设备
- 3.3.1 γ—放射免疫计数器。
- a)温度：4～10℃；
- b)相对湿度：30%～80%；
- c)使用地点：远离所有放射源。
- 3.3.2 低温离心机：转速不低于10 000 r/min。
- 3.3.3 高速组织捣碎机：转速不低于10 000 r/min。
- 3.3.4 电热恒温器。
- 3.4 测定步骤
- 3.4.1 提取
- 称取试样约20 g(精确至0.1g)于150 mL具塞锥形瓶中，加入50 mL甲醇，振荡提取30 min。将提取液过滤于分液漏斗中，并用50 mL甲醇分二次洗涤残渣，合并滤液于上述分液漏斗中。加入10 mL氯化钠饱和水溶液，用3×20 mL石油醚提取，合并石油醚层于另一分液漏斗中。用3×20 mL石油醚饱和的乙腈提取，合并乙腈层于梨形瓶中，于40℃水浴中减压浓缩至近干，再用氮气流吹干。加入5mL甲醇-水(1+1)以溶解残渣。
- 3.4.2 净化
- 用10 mL甲醇-水(1+1)预洗PT-C₁₈柱，将上述溶液注入接有PT-C₁₈柱的玻璃注射器中过柱，然后依次用10 mL甲醇-水(1+1)、10 mL水、10 mL石油醚淋洗，弃去流出液。用氮气流吹干PT-C₁₈柱后，用10 mL甲醇洗脱，收集洗脱液于试管中，于40℃水浴中用氮气流吹干，加入0.05mL甲醇以溶解残渣，备用。
- 3.4.3 测定
- 3.4.3.1 标准曲线绘制
- a)取二支空白管，每管各加100 μL¹²⁵I-丙酸睾丸酮、100 μL抗血清和100 μL PEG-分离剂(3.2.12)，测其放射计数，取平均值即为0标准管计数(B₀)；
- b)取二支空白管，每管分别加100 μL¹²⁵I-丙酸睾丸酮、100 μL PEG-分离剂(3.2.12)，测其放射计数，取平均值，即为非特异结合计数(MSB)；
- c)应用¹²⁵I-丙酸睾丸酮试剂，分别准确移取一定体积的丙酸睾丸酮标准工作液于一组具塞试管中，相当于丙酸睾丸酮含量为10、20、40、100、200 ng，通入氮气流吹干，加入0.05mL甲醇以溶解残渣。加入0.05mL磷酸盐缓冲液，再加入0.1mL¹²⁵I-丙酸睾丸酮标记物和0.1mL抗血清，充分混匀，于(37±1)℃恒温水浴中放置60 min。加入1.0mL PEG-分离剂，充分混匀2min后，于3500 r/min下离心20 min，弃去上清液。置待测管于仪器中，测定不同浓度的标准管计数，然后分别减去MSB，差值记为B。以B/B₀(%)为纵坐标，丙酸睾丸酮的量为横坐标，在半对数或对数值-对数坐标纸上绘制标准曲线。
- 3.4.3.2 样液测定
- 将全部样液(3.4.2)应用¹²⁵I-丙酸睾丸酮试剂，按3.4.3.1c)操作步骤进行测定，求出B/B₀值，并从标准曲线中查得丙酸睾丸酮含量。
- 3.4.4 空白试验
- 使用经脱激素的样品为空白样品，按上述测定步骤进行。
- 3.5 结果计算和表述
- 按式(1)计算B/B₀(%)值：

$$B/B_0 = \frac{B - MSB}{B_0 - MSB} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：B/B₀—结合率，%；

B—样液每对双管计数均值；

B₀—0标准双管计数均值；

MSB—非特异结合双管计数均值。

按式(2)计算试样中丙酸睾丸酮残留含量：

$$X = \frac{W}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：X—试样中丙酸睾丸酮残留含量，μg/kg；

W—从标准曲线中查得丙酸睾丸酮的量，μg；

m—试样量，kg。

注：计算结果需将空白值扣除。

4 测定低限、回收率

- 4.1 测定低限
- 本方法的测定低限为0.5 μg/kg。
- 4.2 回收率
- 4.2.1 分割牛肉中丙酸睾丸酮的添加浓度及其回收率的实验数据：
- 0.5 μg/kg时，为97.6%；
- 5.0 μg/kg时，为96.0%；
- 50.0 μg/kg时，为97.9%。
- 4.2.2 清蒸牛肉罐头中丙酸睾丸酮的添加浓度及其回收率的实验数据：
- 0.5 μg/kg时，为96.5%；
- 5.0 μg/kg时，为98.4%；
- 50.0 μg/kg时，为95.3%。