

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己烯雌酚残留量的最高限量和测定方法灵敏度制定的。

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天津进出口商品检验局负责起草。

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己烯雌酚残留量检验的抽样、制样和放射免疫测定方法。

本标准适用于出口冻牛肉中己烯雌酚残留量的检验。

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者，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。混合原始样品的总量不少于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

试样中残留的己烯雌酚，用乙醚和氢氧化钠溶液依次提取。氢氧化钠提取液经用正己烷抽去杂质并调整PH后，再用乙醚提取、蒸干，最后用甲醇—磷酸盐明胶缓冲液溶解残渣。加入己烯雌酚氚标记物及抗体，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 磷酸盐缓冲溶液：pH7.2。取1.45g磷酸氢二钠(含12个结晶水)、0.1g磷酸二氢钾(无水)、8.0 g氯化钠，溶解于水中并定容至1000mL。
 - 3.2.2 磷酸盐—明胶缓冲液：取1.0 g明胶用磷酸盐缓冲溶液溶解并稀释至1000 mL。
 - 3.2.3 活性炭：60目。
 - 3.2.4 葡聚糖：G200。
 - 3.2.5 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。
 - 3.2.6 氢氧化钠溶液：0.1mol/L。
 - 3.2.7 无水乙醚。
 - 3.2.8 三氯甲烷。
 - 3.2.9 正己烷。
 - 3.2.10 磷酸溶液：磷酸(85%) +水(1+1)。
 - 3.2.11 甲醇—磷酸盐—明胶缓冲液：甲醇+磷酸盐—明胶缓冲液(1+4)。
 - 3.2.12 2,5-二苯基噁唑。
 - 3.2.13 1,4-双[2'--(4'-甲基-5'-苯基噁唑)]-苯。
 - 3.2.14 闪烁液：取4g 2,5-二苯基噁唑和0.2g1,4-双[2'--(4'-甲基-5'-苯基噁唑)]-苯，溶于1 000 mL二甲苯中，充分混匀，置于棕色瓶内，静置3日后使用。
 - 3.2.15 己烯雌酚标准品：纯度≥99% (USA Sigma公司提供或相当者)。
 - 3.2.16 己烯雌酚标准贮备液：准确称取10 mg己烯雌酚标准品，置于100 mL容量瓶中，用无水乙醇溶解并定容，作为标准贮备液(每毫升含己烯雌酚0.1mg)，密封保存。
 - 3.2.17 己烯雌酚标准工作液：临测定前，精确移取适量的己烯雌酚标准贮备液，用甲醇—磷酸盐—明胶缓冲溶液稀释成浓度为12.5、25、50、100、200、400 pg/100 μL的标准工作液，用以制备标准曲线。
 - 3.2.18 己烯雌酚抗体(DES—Ab)：每瓶含0.05mL(真空冻干)DES—Ab抗血清(CENTRC DE RECH—ER ROUSSEL LICCAF制品或相当者)。
 - 3.2.19 己烯雌酚抗体工作液：取己烯雌酚抗体1瓶加入10 mL磷酸盐缓冲溶液使其完全溶解，该工作液置4℃保存，有效期7天。
 - 3.2.20 己烯雌酚氚标记物(³H—DES)：英国放化中心Amersham生产，或相当者。放射性浓度为37Mbg/mL。
 - 3.2.21 己烯雌酚氚标记物工作液：取己烯雌酚氚标记物，置固定的试剂瓶中，加入磷酸盐缓冲液稀释至放射性浓度为5000 cpm/100 μL的己烯雌酚氚标记物工作液。
- 3.3 仪器和设备
- 3.3.1 液体闪烁分析仪：仪器操作条件是机器运行时，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3500 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)，置于试管中，加入10 mL无水乙醚振荡20 min后，以3500 r/min离心3min，将提取液转移至另一干净试管中，重复上述操作一次。合并乙醚提取液，于40℃水浴中蒸发至近干。用4mL三氯甲烷溶解残渣，然后加4mL氢氧化钠溶液振荡2min，静置分层后将氢氧化钠溶液层转移至另一干净试管内，重复上述操作一次。合并氢氧化钠溶液层。加入8mL正己烷，剧烈振荡，待分层后弃去正己烷层。用磷酸溶液调整溶液pH至7.0。每次用8mL无水乙醚提取两次，合并乙醚层并蒸发至近干。用1mL甲醇—磷酸盐—明胶缓冲液溶解残留物，溶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。分别依次加入1200 μL磷酸盐—明胶缓冲液和100 μL己烯雌酚氚标记物工作液(3.2.21)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700 μL磷酸盐—明胶缓冲液和100 μL己烯雌酚氚标记物工作液(3.2.21)后，于4℃静置12h，加入500 μL分离剂。
- 5号、6号管作为测量特异结合率(*B₀*)用。分别依次加入600 μL磷酸盐—明胶缓冲液、100 μL DES—Ab抗血清和100 μL己烯雌酚氚标记物工作液(3.2.21)后，于4℃静置12h，加入500 μL分离剂。
- 7～18号管作为标准溶液用。选12.5、25、50、100、200、400 pg/100 μL六个浓度标准工作液，每个浓度用两管。分别依次加入500 μL磷酸盐—明胶缓冲液、100 μL标准溶液、100 μL DES—Ab抗体和100 μL己烯雌酚氚标记物工作液(3.2.21)后，于4℃静置12h，加入500 μL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：

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

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，于每只试管中分别加入500 μL磷酸盐—明胶缓冲液，100 μL最终样液，100 μL DES—Ab 抗体及100 μL己烯雌酚氚标记物工作液(3.2.21)后，于4℃静置12h，加入500 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己烯雌酚的浓度。

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)计算试样中己烯雌酚残留含量：

$$X = \frac{c \cdot V}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：X—试样中己烯雌酚残留含量，μg/kg；

c—从标准曲线上查得样液中己烯雌酚浓度，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0.05 μg/kg。

4.2 回收率

牛肉中己烯雌酚添加浓度及其回收率的实验数据：

在0.05 μg/kg时，回收率为86.4%；

在0.10 μg/kg时，回收率为91.7%；

在0.50 μg/kg时，回收率为101.2%。