

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4143—2015

### 出口动物及其制品中玉米赤霉醇残留量 检测方法 酶联免疫法

Determination of zearanol residues in animal-derived products for export—  
Enzyme-linked immunosorbent assay

2015-09-02 发布

2016-04-01 实施



中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：顾鸣、韩伟、王赢、朱坚。

# 出口动物及其制品中玉米赤霉醇残留量 检测方法 酶联免疫法

## 1 范围

本标准规定了动物及其制品中玉米赤霉醇残留量的抽样、制样和酶联免疫测定方法。

本标准适用于动物及其制品(牛、猪、兔等内脏组织与肌肉组织)、乳粉和动物尿液中玉米赤霉醇残留量的筛选检验,阳性结果须用其他方法进行确证。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 试样的缩分和保存

### 3.1 试样制备

3.1.1 对组织样品:从全部样品中取有代表性样品,去除脂肪、充分绞碎、混匀,用四分法缩分出不小于1 000 g 试样,密封并加以标识。

3.1.2 对动物尿样:从饲养现场收集动物尿液,充分混匀、澄清后,装入清洁密闭容器,试样不小于50 mL,加封后标明标识。

### 3.2 样品容器

样品应装于合适的清洁干燥容器中,以保持样品的完整性和可追溯性。可采用聚乙烯塑料容器,玻璃容器等惰性材料容器(不允许使用橡胶容器)盛装样品,然后再放入较大的干净容器中密封装运。

### 3.3 样品封识

应在每个样品容器的外表贴上标签,标签上注明样品名、样品编号、生产批号、抽样日期、抽样地点、堆位、抽样人员,并由抽样人员或官方人员加封。

### 3.4 样品保存

3.4.1 抽样后样品应立即在-18℃以下冷冻保存,0℃~5℃条件下48 h内送达实验室。

3.4.2 在抽样和制样过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

## 4 测定方法

### 4.1 原理

本方法的测定基础是竞争性酶联免疫反应。微孔板上包被有固相化的抗玉米赤霉醇抗体的二抗,

当加入玉米赤霉醇酶标记物、游离玉米赤霉醇(玉米赤霉醇标准或样液)和玉米赤霉醇特异性抗体后,特异性抗体与二抗相结合,游离玉米赤霉醇与玉米赤霉醇酶标记物竞争数量有限的抗体结合位点,通过洗涤除去未结合的玉米赤霉醇酶标记物,然后加入底物和发色剂孵育显色,用酶标仪测定吸光度,根据吸光度值得出试样中玉米赤霉醇的含量。

## 4.2 试剂和材料

除去另外说明外,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1  $\beta$ -葡萄糖醛酶。

4.2.2 乙醚。

4.2.3 甲醇。

4.2.4 90%乙酸溶液。

4.2.5 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.8)。

4.2.6 1 mol/L 氢氧化钠溶液。

4.2.7 玉米赤霉醇酶联免疫定量测定试剂盒:应能满足本方法测定低限要求,参见附录 A 和附录 B。

4.2.8 玉米赤霉醇标准品。

## 4.3 仪器和设备

4.3.1 酶标仪。

4.3.2 均质器。

4.3.3 离心机。

4.3.4 氮气挥发器。

4.3.5 振荡器。

4.3.6 微量加样器:10  $\mu$ L~100  $\mu$ L,20  $\mu$ L~200  $\mu$ L。

4.3.7 微量多通道加样器:10  $\mu$ L~100  $\mu$ L。

4.3.8 自动洗板机。

## 4.4 分析步骤

### 4.4.1 提取

#### 4.4.1.1 组织样品(肌肉、肝脏、肾等)

称取 1 g 去除脂肪的已粉碎样品,加 2 mL 蒸馏水,均质(对肝、肾组织需添加 8  $\mu$ L  $\beta$ -葡萄糖醛酶,置 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h);加 10 mL 乙醚,用振荡器振荡 30 s,再上下振荡 10 min,然后在 15  $^{\circ}$ C 3 000g 离心 10 min。—25  $^{\circ}$ C 放置 60 min 或—60  $^{\circ}$ C 放置 30 min,冻结水相,收集乙醚层。在剩余水相中加 5 mL 乙醚,重复提取步骤;合并二次乙醚提取物,置 60  $^{\circ}$ C 氮气流中吹蒸干;加 1 mL 三氯甲烷溶解固体残渣。加 3 mL 1 mol/L NaOH,用力振荡 30 s,在 15  $^{\circ}$ C 2 000g 离心 10 min;吸取上层 NaOH 溶液相,置于含有 250  $\mu$ L 90%乙酸溶液的玻璃瓶中;加 5 mL 乙醚,用振荡器振荡 30 s,在 15  $^{\circ}$ C 2 000g 离心 10 min;—25  $^{\circ}$ C 放置 60 min 或—60  $^{\circ}$ C 放置 30 min,收集乙醚层。置 60  $^{\circ}$ C 氮气流中吹蒸干;加 0.5 mL 样品缓冲液溶解固体残渣供测定用。最后样品稀释倍数为 0.5。

#### 4.4.1.2 乳粉(奶粉、乳清粉等)

称取 1 g 乳粉样品在 2 mL 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.8)中混匀;加 8  $\mu$ L  $\beta$ -葡萄糖醛酶,置 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 h;加 10 mL 乙醚,用振荡器振荡 30 s,再上下振荡 10 min,然后在 15  $^{\circ}$ C 3 000g 离心 10 min;—25  $^{\circ}$ C 放置 60 min 或—60  $^{\circ}$ C 放置 30 min,冻结水相,吸取乙醚层于试管内;置 60  $^{\circ}$ C 氮气流中



吹干;加 0.5 mL 样品缓冲液溶解固体残渣供测定用。最后样品稀释倍数为 0.5。

#### 4.4.1.3 动物尿样

用 3 mL 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.8)稀释 0.5 mL 尿样;加 8  $\mu$ L  $\beta$ -葡萄糖醛酶,37  $^{\circ}$ C 孵育 3 h;取 C18 柱,用 2 mL 甲醇洗柱,2 mL 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.8)平衡柱;取 0.5 mL 水解产物过柱;2 mL、40%甲醇/水混合液洗柱;1 mL 80%甲醇解离;氮气吹干,加 0.5 mL 样品缓冲液溶解最后样品稀释倍数为 7.0。

#### 4.4.2 测定条件

##### 4.4.2.1 操作条件

所有操作应在室温下(20  $^{\circ}$ C~24  $^{\circ}$ C)进行,玉米赤霉醇酶联免疫测定试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温(20  $^{\circ}$ C~24  $^{\circ}$ C)后方可使用。

##### 4.4.2.2 洗板条件

人工洗涤次数 4 次以上,每次注水量为 300  $\mu$ L;自动洗板可以预定 4 次周期。

##### 4.4.2.3 酶标仪测定条件

酶标仪测定波长为 450 nm。

#### 4.4.3 测定步骤<sup>1)</sup>

4.4.3.1 测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头。

4.4.3.2 将一定数量的微孔条插入框架(标准液和样液分别做平行孔),记录标准液和样液的位置。

4.4.3.3 加 50  $\mu$ L 玉米赤霉醇酶标记物至每个微孔,加 50  $\mu$ L 6 个玉米赤霉醇标准液(0 ng/mL,5 ng/mL,1.0 ng/mL,0.5 ng/mL,0.25 ng/mL,0.125 ng/mL)和样液到各自的微孔。

4.4.3.4 再加 50  $\mu$ L 玉米赤霉醇抗体至每个微孔,轻拍混匀,用粘胶纸封住微孔以防溶液挥发,19  $^{\circ}$ C~25  $^{\circ}$ C 黑暗避光处孵育 2 h。

4.4.3.5 倒掉微孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打数次,以保证完全除去微孔中的液体,每个微孔注满重蒸馏水冲洗后倒掉拍干,再重复以上洗板操作 5 次。

4.4.3.6 加 50  $\mu$ L 底物和 50  $\mu$ L 发色剂至每个微孔中,轻拍混匀,19  $^{\circ}$ C~25  $^{\circ}$ C 黑暗避光处孵育 30 min。

4.4.3.7 迅速加入 100  $\mu$ L 反应终止液至每个微孔中,轻拍混匀后,在 10 min 内以空气为空白调零,测量并记录每个微孔溶液 450 nm 波长的吸光度值。

#### 4.4.4 平行试验

按以上步骤,对同一标准溶液、同一样品溶液均应进行平行试验测定。

#### 4.4.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

#### 4.4.6 质控点试验

每次测定均应做一个添加玉米赤霉醇标准品的样品,添加浓度为相应产品的最高残留限量。

---

1) 给出该信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对某一产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,需经实验评估后使用这些等效产品。

## 5 结果的计算和表述

### 5.1 计算百分比吸光度值

计算玉米赤霉醇标准液和样液的平均吸光度值,按式(1)分别求得每个玉米赤霉醇标准液和样液的百分比吸光度值:

$$A = \frac{S}{S_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A ——百分比吸光度值;

S ——5 ng/mL, 1.0 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.25 ng/mL, 0.125 ng/mL 的玉米赤霉醇标准液或样液的平均吸光度值;

S<sub>0</sub>——0 ng/mL 的玉米赤霉醇标准液的平均吸光度值。

### 5.2 绘制校正曲线

以百分比吸光度值(算术级)为纵坐标,以玉米赤霉醇浓度(ng/g)(对数级)为横坐标,在半对数坐标纸上,绘制出玉米赤霉醇标准液百分比吸光度值与玉米赤霉醇浓度的校正曲线。每次试验均应重新绘制校正曲线。

### 5.3 结果的表述

在 5.2 绘制的校正曲线上读取样液百分比吸光度值所对应的玉米赤霉醇浓度即为试样中的玉米赤霉醇残留量(ng/kg)。当测定值<500 ng/kg 时,为玉米赤霉醇未检出;当测定值≥500 ng/kg 时,为玉米赤霉醇检测结果阳性,阳性结果须用其他方法进行确证。

## 6 确证试验

如被测样品中残留物的残留量大于限量要求时,应用其他方法进行确证。

## 7 本方法测定低限

7.1 组织中玉米赤霉醇残留物测定低限为 0.5 μg/kg。

7.2 乳粉中玉米赤霉醇残留物测定低限为 0.5 μg/kg。

7.3 动物尿样中玉米赤霉醇残留物测定低限为 0.25 μg/kg。

附 录 A  
(资料性附录)  
回 收 率

玉米赤霉醇添加浓度及回收率的试验数据：

a) 肌肉组织：

添加量为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 58%；  
添加量为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 75%；  
添加量为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 107%。

b) 肝脏组织：

添加量为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 62%；  
添加量为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 81%；  
添加量为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 99%。

c) 肾脏组织：

添加量为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 65%；  
添加量为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 76%；  
添加量为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 90%。

d) 尿液：

添加量为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 53%；  
添加量为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 92%；  
添加量为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 103%。

e) 乳粉：

添加量为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 52%；  
添加量为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 66%；  
添加量为 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时，平均回收率为 72%。

附 录 B  
(资料性附录)  
玉米赤霉醇试剂盒<sup>2)</sup>

B.1 试剂盒组成

试剂盒应在 4℃~8℃ 闭光条件下保存,溶解后的酶标记物和抗体溶液需-15℃ 条件冻存。组成如下:

- a) 微孔板:96 孔(12 条×8 孔)包被有羊抗兔多抗;
- b) 玉米赤霉醇酶标记物冻干粉:1 瓶,根据玉米赤霉醇试剂盒中说明,可用酶标物溶解液配制成玉米赤霉醇酶标记物溶液;
- c) 酶标物溶解液:1 瓶 17 mL;
- d) 样品稀释液:1 瓶 50 mL;
- e) 洗涤液:10×,1 瓶 50 mL;
- f) 显色剂:1 瓶 18 mL;
- g) 反应终止液:1 瓶 18 mL;
- h) 玉米赤霉醇标准溶液:1 瓶 5 ng/mL,1 mL。

B.2 试剂盒交叉反应性

见表 B.1。

表 B.1 试剂盒交叉反应性

物质	交叉反应 %
Zeranol(α-玉米赤霉醇)	100.0
Taleranol(β-玉米赤霉醇)	130.0
Zearalanone(玉米赤霉酮)	100.0
Zearalenone(玉米赤霉烯酮)	75.0
α-Zearalenol(α-玉米赤霉烯醇)	90
β-Zearalenol(β-玉米赤霉烯醇)	70
Diethylstilbestrol(己烯雌酚)	<0.02
Hexestrol(己烷雌酚)	<0.02
Dienestrol(双烯雌酚)	<0.02
雌二醇(Oestradiol-17β)	<0.02
Progesterone(孕酮)	<0.02
Testosterone(睾酮)	<0.02
盐酸克仑特罗	<0.01

2) 给出该信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对某一产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,需经实验评估后使用这些等效产品。