

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4542.1—2016

代替 SN/T 2059—2008

商品化试剂盒检测方法 链霉素和双氢链霉素 方法一

Commercial kit method—

Streptomycin and dihydrostreptomycin—Test method I

2016-08-23 发布

2017-03-01 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

本部分为 SN/T 4542 的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 SN/T 2059—2008《进出口蜂王浆中链霉素和双氢链霉素残留量的测定方法 酶联免疫法》。

本部分与 SN/T 2059—2008 主要技术变化如下：

——标准名称改为《商品化试剂盒检测方法 链霉素和双氢链霉素 方法一》。

——附录中增加了试剂盒的评价结果。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、浙江迪恩生物科技股份有限公司。

本部分主要起草人：张晓峰、邵宏宏、李可、吴姗、帅江冰、王旻子。

商品化试剂盒检测方法

链霉素和双氢链霉素

方法一

1 范围

SN/T 4542 的本部分规定了蜂王浆和王浆冻干粉中链霉素和双氢链霉素残留量的酶联免疫测定方法。

本部分适用于蜂王浆和王浆冻干粉中链霉素和双氢链霉素残留量的筛选检测。

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

SN/T 2775 商品化食品检测试剂盒评价方法

3 方法提要

本部分以酸性缓冲液来沉淀蜂王浆中蛋白质、提取残留的链霉素和双氢链霉素,提取液过 HLB 柱净化处理。净化后样液中的链霉素和双氢链霉素与酶标记链霉素共同竞争结合链霉素抗体,同时链霉素抗体结合至包被有绵羊抗兔 IgG 的抗体的微孔板上。通过洗涤除去未结合的链霉素、双氢链霉素和酶标记链霉素,然后加入底物显色,用酶标仪测定吸光度,根据吸光度值得出试样中链霉素和双氢链霉素的含量。

4 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。

4.1 链霉素检测试剂盒参考 SN/T 2775 由国家认监委商品化食品检测试剂盒评价专家委员会组织评价。具体评价参见附录 A。试剂盒应在 4℃~8℃ 闭光条件下保存,溶解后的酶标记物需 -15℃ 条件冻存。试剂盒组成如下:

- 预包被抗体的 96 孔板:12 条×8 孔。
- 链霉素标准溶液:0 ng/mL、0.5 ng/mL、1.5 ng/mL、4.5 ng/mL、13.5 ng/mL、40.5 ng/mL。
- 链霉素酶标记物浓缩液:根据链霉素试剂盒中说明,可用稀释缓冲液配制成链霉素酶标记物溶液。
- 酶标物稀释液。
- 样品稀释液:根据链霉素试剂盒中说明,可用去离子水稀释成样品稀释工作液。

- f) 显色剂应避免光线直照。
- g) 清洗液(20倍浓缩):可用水稀释后使用。
- h) 反应终止液。

4.2 磷酸氢二钠。

4.3 磷酸二氢钾。

4.4 氯化钾。

4.5 氯化钠。

4.6 吐温-80。

4.7 磷酸。

4.8 甲醇。

4.9 氢氧化钠。

4.10 庚烷磺酸钠[$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$]。

4.11 磷酸钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

4.12 SDB缓冲液:称取1.15 g磷酸氢二钠,0.2 g磷酸二氢钾,0.2 g氯化钾,30 g氯化钠,0.5 mL吐温-80,用水定容至1 L,用磷酸/氢氧化钠调节pH至7.5。

4.13 庚烷磺酸钠缓冲液:称取10.1 g庚烷磺酸钠(4.10),11.4 g磷酸钠(4.11)用水溶解并定容至1 000 mL,用磷酸调节pH至2.0。

4.14 10%甲醇:量取10 mL甲醇(4.8)用水定容至100 mL。

4.15 HLB小柱:Oasis(或相当产品),3 mL(60 mg)。

4.16 链霉素和双氢链霉素标准物质:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.17 链霉素和双氢链霉素标准品溶液的配制:称取0.25 g链霉素或双氢链霉素,用甲醇定容至10 mL,配制成25 mg/mL的储存液,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存。

5 仪器

5.1 酶标仪。

5.2 8道移液器:10 μL ~100 μL 。

5.3 单道移液器:10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,100 μL ~1 000 μL 和2 mL~10 mL。

5.4 混合振荡器。

5.5 高速低温离心机(15 $^\circ\text{C}$,6 000 r/min以上)。

5.6 固相萃取装置。

5.7 氮吹仪。

5.8 具塞试管:50 mL。

5.9 电子天平:0.01 g~100 g。

5.10 酸度计:精确到0.1。

6 试样的制备和保存

6.1 试样的制备

原始样品总量不得少于200 g,蜂王浆充分搅拌均匀后,将样品分成两等份;冻干粉采用四分法,将样品分成两等份。分好的样品装入洁净容器,加封并做标识。

6.2 试样的保存

试样放置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 2.0 g 蜂王浆样品,置于 50 mL 具塞试管中,加入 8 mL 庚烷磺酸钠缓冲液(4.13),充分混匀,15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 6 000 r/min 离心 10 min 直至清亮,取上层备用。HLB 小柱(4.15),依次用 1 mL 甲醇(4.8)和 1 mL 水活化,吸取 1.5 mL 样品提取液上柱,然后 3 mL 水洗,1 mL 10%甲醇(4.14)洗柱,去除残留的液体,氮气吹 2 min 干燥柱子。然后以 2 mL 甲醇(4.8)洗脱,将样品收集于干净塑料试管,氮气吹干。以 3 mL SDB 缓冲液(4.12)溶解吹干残留物,用于 ELISA 检测。最后稀释倍数为 10。王浆冻干粉则用水以 1:2 比例稀释,充分浸泡(2 h 以上)后,称取 2.0 g 按照上述王浆前处理方法进行提取,最后以 2 mL SDB 缓冲液溶解吹干残留物,最后样品稀释倍数为 20。

7.2 测定条件

7.2.1 操作条件

所有操作应在室温下(20 $^{\circ}\text{C}\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$)进行,链霉素试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温(20 $^{\circ}\text{C}\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$)后方可使用。

7.2.2 洗板条件

人工洗涤次数 5 次以上,每次注水量为 250 μL ;自动洗板可以预定 5 次周期。

7.2.3 酶标仪测定条件

酶标仪测定波长为 450 nm。

7.3 测定步骤

7.3.1 将测定需用的微孔板备齐并插入微孔架上,记录标准品及样品等在微孔架上的位置。

7.3.2 吸取 150 μL 零浓度标准品于孔 A1、A2;并吸取 50 μL 零浓度标准品于孔 B1、B2;分别吸取 50 μL 链霉素标准溶液(浓度分别为:0.5 ng/mL、1.5 ng/mL、4.5 ng/mL、13.5 ng/mL、40.5 ng/mL)于孔 C1、C2—H1、H2;吸取 50 μL 样品提取液于其余微孔中。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头。

7.3.3 分别吸取 100 μL 链霉素酶标记物溶液于除 A1、A2 外的每一个微孔。

7.3.4 用封口膜封孔条,并持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀。

7.3.5 将酶标板置于 20 $^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,避光孵育 30 min。

7.3.6 倒出孔中的液体,将微孔架反扣在吸水纸上反复拍打,以除去孔中过多的残液,但不能使微孔干燥。然后立即用洗涤缓冲液按 7.2.2 条件进行洗板。要注意不能使微孔干燥。

7.3.7 迅速加入 100 μL 显色剂溶液于每一个微孔底部,然后持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后,于 20 $^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min。

7.3.8 加入 100 μL 反应终止液于每一个微孔,然后持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后,将微孔架置于酶标仪中,在 450 nm 处测量吸光度(应在加入反应终止液后 10 min 内读取吸光度)。

SN/T 4542.1—2016

7.4 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 2 孔平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

7.6 监控试验

每次测定均应做一个添加链霉素和双氢链霉素标准溶液(4.17)的监控样品测定,以确定实验过程的操作准确性。

8 结果计算

从标准品和样品的板孔的吸光度(OD)值中,减去空白孔 A1、A2 的平均 OD 值。标准品和样品的 OD 平均值除以零标准(B1、B2)的平均 OD 值,再乘以 100。零标准为 100%(最大百分比吸光度值),其他 OD 值为最大吸光度值的百分数。

以百分比吸光度值为纵坐标(%),链霉素标准溶液浓度(ng/mL)为横坐标,绘制标准工作曲线。从标准工作曲线上得到试样中相应的链霉素浓度后,结果按式(1)进行计算:

$$X = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——样品中链霉素的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c ——从标准工作曲线上得到的样品中链霉素/双氢链霉素浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样品溶液的最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品溶液所代表的最终试样质量,单位为克(g)。

也可以用各种酶标仪的数据处理软件进行计算。所得结果表示至一位小数。

9 确证试验

如被测样品中为阳性结果时,应用其他方法进行确证。

10 方法性能指标

10.1 检出限和定量限

检出限 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限 $12.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 交叉反应率

链霉素 100%; 双氢链霉素 163.38%; 四环素 $<0.1\%$; 氨苄青霉素 $<0.1\%$; 新霉素 $<0.1\%$; 庆大霉素; 卡那霉素 $<0.1\%$ 。

附 录 A
(资料性附录)
链霉素试剂盒评价结果¹⁾

- A.1 线性:链霉素和双氢链霉素的线性范围均为 0.5 ng/mL~40.5 ng/mL,相关系数 $R \geq 0.98$ 。
- A.2 交叉反应率:链霉素 100%;双氢链霉素 163.38%;四环素 $< 0.1\%$;氨苄青霉素 $< 0.1\%$;新霉素 $< 0.1\%$;庆大霉素;卡那霉素 $< 0.1\%$ 。
- A.3 检出限和定量限:链霉素和双氢链霉素的检出限均为 4.0 $\mu\text{g/kg}$,定量限均为 12.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

1) 本评价结果仅适用于浙江迪恩生物科技股份有限公司的链霉素试剂盒。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
商品化试剂盒检测方法
链霉素和双氢链霉素
方法一

SN/T 4542.1—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2017年12月第一版 2017年12月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-32441 定价 16.00 元



SN/T 4542.1—2016