



中华人民共和国国家标准

GB/T 21330—2007

动物源性食品中链霉素残留量测定方法 酶联免疫法

Method for the determination of streptomycin residues in animal original food—
Enzyme-linked immunosorbent assay

2007-10-31 发布

2008-04-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

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：中华人民共和国浙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：施伟良、张晓峰、朱振江、黎昊雁、吴姗。

本标准系首次发布的国家标准。

动物源性食品中链霉素残留量测定方法

酶联免疫法

1 范围

本标准规定了肉类、内脏、水产品、牛奶和奶粉中链霉素残留量的酶联免疫测定方法。

本标准适用于肉类、内脏、水产品、牛奶和奶粉中链霉素残留量的测定。

本标准的方法检出下限：肉类、内脏和水产品为 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；牛奶和奶粉为 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379(所有部分) 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

3 原理

微孔板中包被有绵羊抗兔 IgG 抗体，加入特异性抗体（兔抗链霉素抗体）、酶标记链霉素、链霉素标准品或样品提取液后，特异性抗体与包被的绵羊抗兔 IgG 抗体结合，同时游离链霉素和酶标记链霉素竞争性的与特异性抗体结合。通过洗涤除去未结合的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(组成参见附录 A)。
- 4.2 三氯乙酸。
- 4.3 氯化钠。
- 4.4 氯化钾。
- 4.5 磷酸二氢钾。
- 4.6 磷酸氢二钠。
- 4.7 磷酸二氢钠。
- 4.8 吐温-80。
- 4.9 3%三氯乙酸：称取 3 g 三氯乙酸(4.2)，用水定容至 100 mL。
- 4.10 PBS 缓冲液：8.5 g 氯化钠，1.15 g 磷酸氢二钠，0.27 g 磷酸二氢钠，用水定容至 1 L。
- 4.11 SDB 缓冲液：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。
- 4.12 正己烷。
- 4.13 链霉素标准物质：纯度大于等于 98%。
- 4.14 链霉素标准品溶液的配制：用灭菌水作为溶剂配制成 25 mg/mL 的储存液，于 -20°C 条件下保存。

5 仪器

- 5.1 酶标仪。
- 5.2 8道移液器:50 μL ~300 μL 。
- 5.3 单道移液器:5 μL ~50 μL ,100 μL ~1 000 μL 和2 mL~10 mL。
- 5.4 混合振荡器。
- 5.5 离心机。
- 5.6 具塞试管:20 mL、50 mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

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

对牛奶和奶粉:从原始包装中取有代表性样品,充分混匀,用四分法缩分出不少于500 g试样,装入清洁密闭容器,加封后标明标记。

6.2 试样的保存

将样品于 -18°C ~ -20°C 条件下保存。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 组织

称取2.5 g去脂肪均质样品,精确到0.1 g,置于50 mL具塞试管中,加入5 mL PBS缓冲液(4.10)振荡10 min,加入10 mL的3%三氯乙酸(4.9)涡旋10 min,6 000 r/min离心15 min。取3 mL上清液于干净试管中,再加入2 mL正己烷(4.12);3 000 r/min离心10 min,吸取150 μL 下层液体加950 μL 的SDB(4.11)缓冲液,调节pH至7.5左右。最后稀释倍数为50。

7.1.2 牛奶

牛奶样品先离心去脂肪,然后以SDB缓冲液(4.11)直接做10倍稀释;对于奶粉则可以先用与样品质量相等的水进行稀释溶解,离心去脂,然后再以SDB缓冲液(4.11)做5倍稀释,调节pH至7.5左右,最后稀释倍数为10。

7.2 测定条件

7.2.1 酶标仪测定条件

酶标仪测定波长为450 nm。

7.2.2 洗板条件

7.2.2.1 人工洗涤次数5次以上,每次注水量为250 μL 。

7.2.2.2 自动洗板可以预定5次周期。

7.2.3 操作条件

所有操作应在室温下(20°C ~ 24°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°C ~ 24°C)后方可使用。

7.3 测定步骤¹⁾

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。

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操作步骤的认可。如果其他产品的操作步骤有不同,需经实验评估后采用。

7.3.2 吸取 100 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：0.25、0.5、1.0、2.0、10.0、20.0 ng/mL）于孔 C1、C12—H1、H2；吸取 50 μL 样品溶液于其余微孔中。

7.3.3 分别吸取 25 μL 链霉素酶标记物溶液于除 A1、A2 外的每一个微孔。

7.3.4 分别吸取 25 μL 链霉素抗体溶液于除 A1、A2 外的每一个微孔。

7.3.5 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。

7.3.6 将酶标板置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。

7.3.7 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。再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。

7.3.8 迅速加入 100 μL 底物溶液于每一个微孔底部，持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后，于 20 $^{\circ}\text{C}$ ~24 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。

7.3.9 迅速加入 100 μL 反应终止液于每一个微孔，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（加入反应终止液后应在 30 min 内读取吸光度）。

注：测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头。

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标准（4.14）的样品，添加浓度为相应产品的最高残留限量。

8 结果计算

从含有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%（最大吸光度值），其他 OD 值为最大吸光度值的百分数。

在半对数坐标纸上，以吸光度值为纵坐标（%），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）。

注：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

如被测样品中链霉素残留量的值大于限量要求时，应用其他方法进行确证。

回收率参见附录 B。

附录 A
(资料性附录)
链霉素试剂盒²⁾

- A.1 预包被抗体的 96 孔板:12 条×8 孔。
- A.2 链霉素标准溶液:0、0.25、0.5、1.0、2.0、10.0、20.0 ng/mL。
- A.3 链霉素酶标记物冻干粉: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。
- A.4 抗链霉素抗体冻干粉:根据链霉素试剂盒中说明,可用稀释缓冲液配制成抗链霉素抗体溶液。
- A.5 底物 TMB 溶液。
- A.6 稀释缓冲液:根据链霉素试剂盒中说明,可用水配制成洗涤缓冲液。
- A.7 洗涤浓缩液(10 倍浓缩):可用水稀释后使用。
- A.8 反应终止液。

注:试剂盒应在 4℃~8℃ 避光条件下保存,溶解后的酶标记物和抗体溶液需在 -15℃ 条件下冻存。

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。

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中链霉素添加浓度及回收率的试验数据:

- a) 组织样品(包括水产品):
- 添加量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 85.9%~96.3%;
 - 添加量为 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 87.7%~92.7%;
 - 添加量为 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 88.7%~92.1%。
- b) 牛奶样品:
- 添加量为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 89.4%;
 - 添加量为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 92.6%;
 - 添加量为 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 90.3%。
-