



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 3020—2004

水产品中己烯雌酚残留量的测定 酶联免疫法

Determination of diethylstilbestrol residues in fishery products
Enzyme linked immuno sorbent assay

2004-01-07 发布

2004-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位：中国水产科学研究院长江水产研究所、农业部淡水鱼类种质监督检验测试中心。

本标准主要起草人：艾晓辉、刘长征、邹世平、徐忠法、李荣。

水产品中己烯雌酚残留量的测定 酶联免疫法

1 范围

本标准规定了水产品中己烯雌酚残留量的酶联免疫测定方法。

本标准适用于水产品肌肉中己烯雌酚的测定。

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。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

测定的基础是竞争性酶联免疫抗原抗体反应,所有的免疫反应都在微孔中进行,加入己烯雌酚标准或样品溶液、己烯雌酚酶标记物、己烯雌酚抗体后,己烯雌酚与己烯雌酚酶标记物相互竞争己烯雌酚抗体的结合位点。结合的己烯雌酚酶标记物可以将无色的发色剂转化为蓝色的产物,在 450 nm 处检测,吸收光强度与样品中的己烯雌酚浓度成反比,按校正曲线定量。

4 试剂和材料

本标准所用试剂除标明外,其他均为分析纯及其更高纯度,试验用水符合 GB/T 6682 一级水标准。

4.1 叔丁基甲基醚:色谱纯。

4.2 石油醚。

4.3 二氯甲烷。

4.4 甲醇:色谱纯。

4.5 氢氧化钠:1 mol/L。

4.6 磷酸:6 mol/L。

4.7 20% 甲醇的 20 mmol/L 三羟基甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液(pH 8.5),40%、70%、80% 的甲醇溶液,此溶液现用现配。

4.8 67 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2):9.61 g 磷酸氢二钠,1.79 g 磷酸二氢钠溶解于蒸馏水,定容至 1 000 mL,此溶液现用现配。

4.9 己烯雌酚酶联免疫定量测定试剂盒,参见附录 A。

5 仪器与设备

5.1 酶标仪:波长 450 nm。

5.2 离心机:转速 4 000 r/min。

5.3 氮吹仪。

5.4 电热恒温水浴锅。

5.5 高速匀浆机。

- 5.6 C₁₈固相提取柱:长 6.5 cm,内径 0.7 cm。
- 5.7 固相萃取器。
- 5.8 微型漩涡混合仪。
- 5.9 振荡器。
- 5.10 微量加样器:20 μL、50 μL、100 μL、250 μL、1 000 μL。
- 5.11 微量多通道加样器:50 μL、100 μL。

6 样品处理

6.1 试样提取

取出鱼、虾、蟹、鳖等水产品肌肉部分,除净脂肪和结缔组织,样品切成不大于 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块后混匀,置冰箱中冷冻备用。

将样品解冻,取 5 g(精确到 0.01 g)样品于匀浆机的玻璃管中,加 10 mL 67 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2),充分匀浆,称取 3 g(精确到 0.01 g)匀浆组织于 20 mL 玻璃离心管中,加入 8 mL 叔丁基甲基醚,强烈振荡 20 min,4 000r/min 离心 10 min,转移出上清液至 20 mL 玻璃离心管中,再用 8 mL 叔丁基甲基醚重复提取沉淀物,将两次提取的醚相合并,70 ℃水浴蒸发至干。

取 70%的甲醇 1 mL 溶解干燥的残留物,加 3 mL 石油醚洗涤甲醇溶液,漩涡混合 1 min,4 000 r/min 离心 1 min,吸除石油醚,置水浴锅中蒸发甲醇溶液,用 1 mL 二氯甲烷溶解,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 3 mL,漩涡振荡后静置,取出上层氢氧化钠溶液,加入 6 mol/L 磷酸 300 μL 中和提取液,用 C₁₈固相提取柱进一步纯化。

6.2 样品纯化

将 C₁₈固相提取柱垂直固定,用 3 mL 无水甲醇洗涤柱子,再用 2 mL 20% 甲醇的 20 mmol/L Tris 缓冲液(pH 8.5)平衡柱子,紧接着将上述用磷酸中和后的氢氧化钠提取液用 1 000 μL 微量加样器全部加入柱中,过柱,然后用 2 mL 20% 甲醇的 20 mmol/L Tris 缓冲液(pH 8.5)洗涤柱子,接着用 3 mL 40% 的甲醇洗涤柱子,弃去过柱的溶液,用正压去除残留的液体并且用空气或氮气吹 2 min 以干燥柱子。

用 2 mL 80% 的甲醇洗脱样品(以上溶液洗柱、平衡柱和提取液过柱的流速皆为 1 滴/s 左右,可用固相萃取器抽真空控制),收集洗脱液,向洗脱液中加入 2 mL 水,取 20 μL 进行酶联免疫测定。

7 酶联免疫测定

检查试剂盒中所有试剂是否齐全完好(参见附录 A)。控制室温至 20℃~24℃,取出足够数量的微孔条插入微孔架中,加入 20 μL 的标准液和处理好的样品到各自的微孔底部,记录各标准液和样品的位置,标准和样品做两个平行实验。每个微孔中加入 50 μL 稀释后的己烯雌酚抗体,微旋振荡混合,置 2℃~8℃ 冰箱中孵育 20 h。

取出微孔架,回复到室温 20℃~24℃,洗板(甩出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上每行拍打 3 次,以保证完全除去孔中的液体。用 250 μL 蒸馏水充入孔中,再次倒掉微孔中液体,再重复操作两次),加入 50 μL 稀释的酶标记物到微孔底部,微旋振荡充分混合后,置室温孵育 1 h,再洗板后(同上述洗板方法),每个微孔中加入 50 μL 基质和 50 μL 发色试剂,充分混合,并在室温暗处孵育 30 min,每个微孔中再加入 100 μL 反应停止液,混合后在 60 min 内测量并记录每个微孔 450 nm 处的吸光度值。

8 结果计算

8.1 计算相对吸光度值

计算每个己烯雌酚标准液和样液的平均吸光度值,按公式(1)求出己烯雌酚标准液和样液的相对吸光度值。

$$R_i = A_i/A_0 \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

R_i ——相对吸光度值,单位为百分比(%);

A_0 ——空白标准的吸光度值;

A_i ——标准或样品的平均吸光度值。

8.2 绘制校正曲线

以计算的标准液相对吸光度值为纵坐标,以己烯雌酚浓度的对数为横坐标,绘制出己烯雌酚标准液相对吸光度值与己烯雌酚浓度的校正曲线(参见附录B),校正曲线在 $0.05 \mu\text{g/L} \sim 0.4 \mu\text{g/L}$ 范围内应当成为线性,相对应每一个样品的己烯雌酚浓度可以从校正曲线上读出。每次试验均应重新绘制校正曲线。

8.3 结果计算

在8.2绘制的校正曲线上读出的相对应每一个样品的己烯雌酚浓度乘以相对应的稀释系数(本标准所采用的稀释系数为4),即为试样中的己烯雌酚残留量。

9 检测限、回收率

9.1 检测限

本方法的检测限为 $0.6 \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 回收率

本方法的回收率 $\geq 70\%$ 。

附录 A

(资料性附录)

己烯雌酚酶联免疫定量测定试剂盒

A.1 己烯雌酚酶联免疫定量测定试剂盒

己烯雌酚测定试剂盒由德国 R-Biopharm 公司制造¹⁾,可用于肌肉、尿、胆汁、粪便及肝脏中的己烯雌酚残留检测。试剂盒应保存在 2℃~8℃ 的干燥避光环境中,并在有效期内使用,试剂变质应当弃掉²⁾。所有试剂应达到室温 20℃~24℃ 后使用。每个试剂盒包括:

1×框架,96 孔板(12 条×8 孔)包被有兔抗己烯雌酚的抗体(兔 IgG 抗体)。

6×标准液(1.3 mL/瓶),为 40% 的己烯雌酚甲醇水溶液:0 μg/L、0.025 μg/L、0.05 μg/L、0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.4 μg/L。

1×己烯雌酚过氧化物酶标记物浓缩液(0.7 mL)。

1×己烯雌酚抗体浓缩液(0.7 mL)。

1×酶基质(7 mL):含有过氧化脲。

1×发色剂(7 mL):四甲基联苯胺。

1×反应停止液(14 mL):1 mol/L 硫酸。

1×缓冲液(25 mL)。

A.2 己烯雌酚酶标记物的稀释

用试剂盒提供的缓冲液以 1:11 的比例,在玻璃试管中稀释酶标记物浓缩液,轻轻地振摇,充分混匀后使用(由于稀释的酶标记物稳定性不好,所以只稀释实际需用量的酶标记物)。

A.3 己烯雌酚抗体的稀释

用试剂盒提供的缓冲液以 1:11 的比例,在玻璃试管中稀释抗体浓缩液,轻轻地振摇,充分混匀后使用(由于稀释的抗体稳定性不好,所以只稀释实际需用量的抗体)。

1) 德国 R-Biopharm 公司生产的己烯雌酚测定试剂盒是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不排除运用同等性能的其他产品。

2) 发色试剂有任何颜色,表明发色剂已变质;空白标准的吸光度值小于 0.6 个单位($A_{450\text{ nm}} < 0.6$)时,表示试剂可能变质。

附录 B
(资料性附录)
己烯雌酚的标准曲线

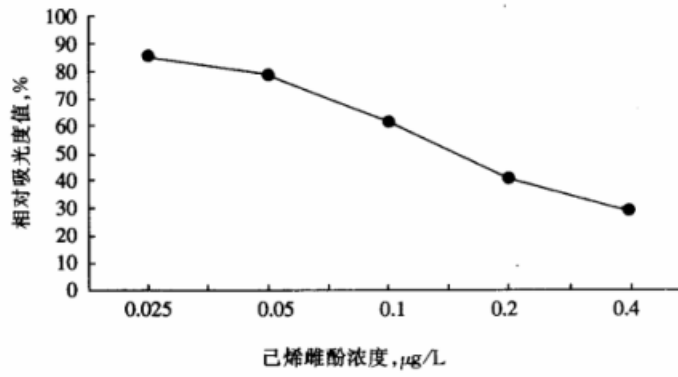


图 B.1 己烯雌酚的标准曲线