



中华人民共和国国家标准

GB/T 21319—2007

动物源食品中阿维菌素类药物 残留的测定 酶联免疫吸附法

Determination of avermectins residues in foodstuffs of animal origin—
Enzyme linked immunosorbent assay

2007-10-29 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

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中国农业大学、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：沈建忠、史为民、万宇平、何方洋、吴聪明、张素霞、冯才伟、彭涛、国伟。

动物源食品中阿维菌素类药物 残留的测定 酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了动物源食品中阿维菌素类药物残留量的酶联免疫吸附测定法。

本标准适用于牛肉和牛肝中阿维菌素、伊维菌素和埃普利诺菌素残留量的测定。

本标准的方法检测限：阿维菌素类药物在牛肝组织和牛肉组织中的检测限均为 $2\ \mu\text{g/kg}$ 。

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（GB/T 6682—1992，neq ISO 3696:1987）

3 原理

采用间接竞争 ELISA 方法，在微孔条上包被偶联抗原，试样中残留的阿维菌素类药物与酶标板上的偶联抗原竞争阿维菌素抗体，加入酶标记的抗体后，显色剂显色，终止液终止反应。用酶标仪在 $450\ \text{nm}$ 处测定吸光度，吸光值与阿维菌素类药物残留量成负相关，与标准曲线比较即可得出阿维菌素类药物残留含量。

4 试剂和材料

4.1 阿维菌素类药物试剂盒

4.1.1 96 孔板（12 条 $\times$ 8 孔）包被有阿维菌素偶联抗原。

4.1.2 阿维菌素标准溶液（至少有 5 个倍比稀释浓度水平，外加 1 个空白）。

4.1.3 阿维菌素抗体溶液。

4.1.4 过氧化物酶标记物。

4.1.5 底物显色溶液 A 液：过氧化尿素。

4.1.6 底物显色溶液 B 液：四甲基联苯胺。

4.1.7 反应终止液： $1\ \text{mol/L}$ 硫酸。

4.1.8 缓冲液（2 倍浓缩液）。

4.1.9 洗涤液（20 倍浓缩液）。

4.2 乙腈、正己烷、无水硫酸钠（分析纯）。

4.3 碱性氧化铝柱 Sep-Pak Vac 12 cc（2 g）。

4.4 水：GB/T 6682 规定的一级水。

4.5 缓冲液工作液：用水将 2 倍的浓缩缓冲液按 1：1 体积比进行稀释（1 份 2 倍浓缩缓冲液+1 份水），用于溶解干燥的残留物，缓冲液工作液在 4°C 可保存一个月。

4.6 洗涤液工作液：用水将 20 倍的浓缩洗涤液按 1：19 体积比进行稀释（1 份 20 倍浓缩洗涤液+19 份水），用于酶标板的洗涤，洗涤工作液在 4°C 可保存一个月。

5 仪器

- 5.1 酶标仪(配备 450 nm 滤光片)。
- 5.2 超声波清洗器。
- 5.3 离心机。
- 5.4 氮气吹干仪。
- 5.5 匀浆机。
- 5.6 振荡器。
- 5.7 涡旋式混合器。
- 5.8 微量移液器:单道 20 μL 、50 μL 、100 μL ,多道 50 μL ~300 μL 可调。

6 试样制备与保存

取新鲜或解冻的动物组织,剪碎,10 000 r/min 匀浆 1 min。—20℃下保存。

7 试样测定

7.1 提取

称取牛肉、牛肝试样 3.0 g $\pm$ 0.05 g 于 50 mL 聚苯乙烯离心管中,加 9 mL 乙腈、3 mL 正己烷,置于振荡器上振荡 10 min,加 3 g 无水硫酸钠,再振荡 10 min,3 000 r/min 以上,15℃离心 10 min,去除上层正己烷,取下层 4.0 mL 提取液备用。

称取 3 g 无水硫酸钠平铺在碱性氧化铝柱 Sep-Pak Vac 上,加 10 mL 乙腈洗柱,再加 4.0 mL 提取液,开始收集滤液,待提取液流干后,再加入 4 mL 乙腈清洗柱子,合并洗液和滤液至 10 mL 干净的玻璃试管中,于 50℃~60℃水浴氮气流下吹干。

取 1.0 mL 缓冲液工作液溶解干燥的残留物,涡动 1 min,超声 10 min,涡动 1 min。取溶解后的样品液 100 μL 加入 100 μL 缓冲液工作液,充分混合,取 20 μL 用于分析。

7.2 测定

使用前将试剂盒在室温(19℃~25℃)下放置 1 h~2 h。

- 7.2.1 将标准和试样(至少按双平行实验计算)所有数量的孔条插入微孔架,记录标准和试样的位置。
- 7.2.2 加 20 μL 系列标准溶液(4.1.2)或处理好的试样溶液到各自的微孔中。标准和试样至少做两个平行试验。
- 7.2.3 加抗体工作液(4.1.3)80 μL 到每一个微孔中,充分混合,于 37℃恒温箱中孵育 30 min。
- 7.2.4 倒出孔中液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。用 250 μL 洗涤液工作液充入孔中,再次倒掉微孔中液体,再重复操作两遍以上(或用洗板机洗涤)。
- 7.2.5 加 100 μL 过氧化物酶标记物(4.1.4),37℃恒温箱中孵育 30 min。
- 7.2.6 倒出孔中液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。用 250 μL 洗涤液工作液充入孔中,再次倒掉微孔中液体,再重复操作两遍以上(或用洗板机洗涤)。
- 7.2.7 加 50 μL 底物显色液 A 液(4.1.5)和 50 μL 底物显色液 B 液(4.1.6),混合并在 37℃恒温箱避光显色 15 min~30 min。
- 7.2.8 加 50 μL 反应终止液(4.1.7),轻轻振荡混匀,用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度值。

8 结果计算

用所获得的标准溶液和试样溶液吸光度值与空白溶液吸光度值的比值进行计算,见式(1):

$$A_r = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A_r ——相对吸光度值, %;

B ——标准(试样)溶液的吸光度值;

B_0 ——空白(浓度为 0 的标准溶液)的吸光度值。

将计算的相对吸光度值(%)对应阿维菌素($\mu\text{g/L}$)的自然对数作半对数坐标系统曲线图, 对应的试样浓度可从校正曲线算出, 见式(2):

$$X = \frac{A \times f}{m \times 1000} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——试样中阿维菌素类的含量, 单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);

A ——试样的相对吸光度值(%)对应的阿维菌素类含量, 单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

f ——试样稀释倍数;

m ——试样的取样量, 单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后两位。阳性结果应用确证法确证。

9 交叉反应

阿维菌素: 100%;

埃普利诺菌素: 130%;

伊维菌素: 33%;

多拉菌素: 5%;

泰乐菌素: $<0.1\%$;

替米考星: $<0.1\%$ 。

10 精密度

本方法的批内变异系数 $\leq 30\%$, 批间变异系数 $\leq 45\%$ 。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
动物源食品中阿维菌素类药物
残留的测定 酶联免疫吸附法
GB/T 21319—2007

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

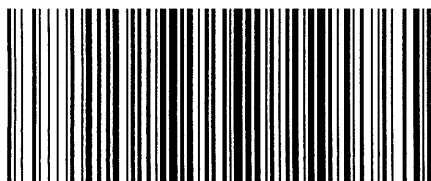
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 7 千字
2008年3月第一版 2008年3月第一次印刷

*

书号: 155066·1-30860 定价 10.00 元



GB/T 21319-2007

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533