

中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告 — 3 — 2008

动物性食品中玉米赤霉醇残留检测 ——酶联免疫吸附法和气相色谱—质谱法

Determination of zeranol residues in animal derived food
ELISA method for quick analysis and GC/MS method for confirmation

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出和归口。

本标准起草单位：中国农业大学。

本标准主要起草人：沈建忠、肖希龙、丁双阳、李晓薇、史为民、江海洋、李建成。

本标准系首次发布的国家标准。

动物性食品中玉米赤霉醇残留检测 ——酶联免疫吸附法和气相色谱—质谱法

第一法 ELISA 快速检测法

1 范围

本标准规定了动物源食品中玉米赤霉醇残留量的制样和酶联免疫吸附测定快速检测方法(ELISA 法)。

本标准适用于牛尿和牛肌肉中玉米赤霉醇残留量的检测。

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)或修改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 分析实验室用水规则和实验方法

3 制样

3.1 样品的制备

取新鲜或解冻的空白或供试动物组织,剪碎,置于组织匀浆机中高速匀浆。

取新鲜或解冻的尿液,6 000 r/min 离心 5 min,取清亮上清液。

3.2 样品的保存

-20℃冰箱中贮存备用。

4 测定方法

4.1 方法原理或提要

基于抗原抗体反应进行竞争性抑制测定。酶标板的微孔包被有偶联抗原,加标准品或待测样品,再加玉米赤霉醇单克隆抗体和酶标记物。包被抗原与加入的标准品或待测样品竞争抗体,酶标记物与抗体结合。通过洗涤除去游离的抗原、抗体及抗原抗体复合物。加入底物液,使结合到板上的酶标记物将底物转化为有色产物。加入终止液,在 450 nm 处测定吸光度值,吸光度值与试样中玉米赤霉醇浓度的自然对数成反比。

4.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.2.1 三氯甲烷

4.2.2 正己烷

4.2.3 乙腈

4.2.4 玉米赤霉醇检测试剂盒

2℃~8℃保存。

4.2.4.1 包被有玉米赤霉醇偶联抗原的 96 孔板 规格为 12 条×8 孔

4.2.4.2 玉米赤霉醇系列标准溶液 浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{g}/\text{L}$

4.2.4.3 酶标记物工作液

4.2.4.4 玉米赤霉醇抗体工作液

4.2.4.5 底物液 A 液

4.2.4.6 底物液 B 液

4.2.4.6 终止液

4.2.4.7 2 倍浓缩缓冲液

4.2.4.8 20 倍浓缩洗涤液

4.2.5 β -葡萄糖苷酸酶或芳基硫酸酯酶

4.2.6 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,调 pH 至 4.8,缓冲液工作液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 1 个月。

4.2.7 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 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 1 个月。

4.3 仪器和设备

4.3.1 酶标仪 配备 450 nm 滤光片

4.3.2 匀浆器

4.3.3 振荡器

4.3.4 离心机

4.3.5 微量移液器 单道 20 μL ~200 μL 、200 μL ~1 000 μL 、多道 250 μL

4.3.6 天平 感量 0.01 g

4.3.7 分析天平 感量 0.000 01 g

4.3.8 氮气吹干装置

4.4 试料的制备

试料的制备包括:

——取制备后的供试样品,作为供试试料。

——取制备后的空白样品,作为空白试料。

——取制备后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.5 测定步骤

4.5.1 牛尿前处理步骤

取尿液 2 mL 于离心管中,4 000 r/min 离心 10 min;取尿样 1.0 mL 于另一离心管中,加葡萄糖苷酸酶或芳基硫酸酯酶 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h,加三氯甲烷 5 mL,振荡 10 min,室温 4 000 r/min,离心 10 min,取下层有机相 2.5 mL 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干;用缓冲液工作液 1 mL 溶解残留物;取溶解后的提取液 50 μL 与缓冲液工作液按 1 : 4 体积比进行稀释(样本提取液 50 μL +缓冲液工作液 200 μL 充分混合);取 50 μL 作为试样用于分析。稀释倍数为 10 倍。

4.5.2 牛肌肉前处理步骤

称取(1 \pm 0.01)g 试样,加 2.0 mL 水,加葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶 8 μL 混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解 2 h;取出,加乙腈 8 mL,振荡 10 min,4 000 r/min 离心 5 min;取上清 5.0 mL,加入三氯甲烷 2 mL,加正己烷 6 mL,涡动振荡 10 min,4 000 r/min 离心 5 min;去上层正己烷,取中间层吹干;加缓冲液工作液 1.0 mL 涡动溶解,取 200 μL ,加缓冲液工作液 800 μL 混合;取 50 μL 分析。稀释倍数为 10 倍。

4.5.3 测定

- 4.5.3.1 使用前将试剂盒在室温(19℃~25℃)下放置 1 h~2 h。
- 4.5.3.2 按每个标准溶液和试样溶液至少做两个或两个以上平行实验,计算所需酶标板条的数量,插入板架。
- 4.5.3.3 加系列标准溶液或试样液 50 μL/孔,再加入 50 μL/孔的玉米赤霉醇抗体工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板,37℃反应 30 min。
- 4.5.3.4 倒出孔中液体,将酶标板倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体,加 250 μL 洗涤液工作液至每个孔中,5 秒钟再倒掉孔中液体,将酶标板倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。再加 250 μL 洗涤液工作液,重复操作两遍以上(或用洗板机洗涤)。
- 4.5.3.5 加酶标记物工作液 100 μL/孔,用盖板膜盖板,37℃反应 30 min。
- 4.5.3.6 取出酶标板,重复洗板步骤。
- 4.5.3.7 每孔加底物 A 液 50 μL 和底物 B 液 50 μL,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板,37℃避光显色 15 min。
- 4.5.3.8 每孔加 50 μL 终止液,轻轻振荡混匀,置酶标仪于 450 nm 处测量吸光度值。

4.6 结果判定与表述

用所获得的标准溶液和试样溶液吸光度值的比值进行计算。见式(1):

$$\text{相对吸光度值(\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

B——为标准(试样)溶液的吸光度值;

B₀——空白(浓度为 0 标准溶液)的吸光度值。

将计算的相对吸光度值(%)对应玉米赤霉醇标准品浓度(μg/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。

方法筛选结果为阳性的样品,需要用确证方法确证。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在牛尿、牛肌肉中玉米赤霉醇的检出限为 0.6 μg/kg(L)。

5.2 准确度

本方法在 1 μg/kg(L)~4 μg/kg(L)添加浓度水平上的回收率为 60%~120%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数≤15%,批间变异系数≤20%。

第二法 气相色谱-质谱确证法(GC-MS)

6 范围

本部分规定了动物源食品中玉米赤霉醇及其相关物残留量的制样和气相色谱-质谱确证检测方法。本部分适用于牛尿、牛肌肉和牛肝脏中玉米赤霉酮、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇残留量的确证检测。

7 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)或修改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 分析实验室用水规则和实验方法

8 制样

8.1 样品的制备

取新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎并使均匀。

8.2 样品的保存

-20℃冰箱中贮存备用。

9 测定方法

9.1 方法原理或提要

试样经甲醇提取,与正己烷液液分配去脂,氨基固相萃取柱净化;尿液样品经乙腈提取,C₁₈固相萃取柱和中性氧化铝固相柱取柱净化。气相色谱-质谱检测,色谱保留时间和质谱选择离子共同定性,外标法定量。

9.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

9.2.1 玉米赤霉酮对照品(Zearalanone) 纯度≥99%。

9.2.2 α-玉米赤霉醇对照品(α-Zeranol) 纯度≥99%。

9.2.3 β-玉米赤霉醇对照品(Taleranol) 纯度≥99%。

9.2.4 正己烷 色谱纯。

9.2.5 乙酸乙酯 色谱纯。

9.2.6 甲醇 色谱纯。

9.2.7 无水硫酸钠

9.2.8 衍生化试剂

N,O-双三甲基硅烷基-三氟乙酸胺+三甲基氯硅烷=99+1,即 BSTFA+TMCS(99:1)。

9.2.9 氨基固相萃取柱 500 mg/6cc。

9.2.10 C₁₈固相萃取柱 500 mg/6cc。

9.2.11 中性氧化铝柱固相萃取柱 500 mg/6cc。

9.2.12 95%丙酮

取 95 mL 丙酮和 5 mL 水,混匀。

9.2.13 玉米赤霉醇、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇标准贮备液(100 μg/mL)

称取玉米赤霉酮、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇对照品各 0.01 g 于 100 mL 容量瓶,用甲醇溶解稀释定容。-20℃保存,有效期 6 个月。

9.2.14 玉米赤霉醇、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇标准贮备液(1 μg/mL)

取 100 μg/mL 玉米赤霉醇、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇标准储备液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释定容,4℃保存,有效期 1 个月。

9.2.15 标准工作液

取适量 1 μg/mL 混合标准储备液,用甲醇稀释成 50、100、200、500、1 000 和 2 000 ng/mL 的标准溶液。

9.3 仪器和设备

9.3.1 气相色谱-质谱联用仪 配电子轰击离子源(EI)。

9.3.2 组织匀浆机

9.3.3 天平 感量 0.01 g。

9.3.4 分析天平 感量 0.000 01 g。

9.3.5 离心机

9.3.6 涡旋混合器

9.3.7 旋转蒸发器

9.3.8 固相萃取装置

9.3.9 恒温箱

9.4 试料的制备

试料的制备包括:

——取制备后的供试样品,作为供试试料。

——取制备后的空白样品,作为空白试料。

——取制备后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

9.5 测定步骤

9.5.1 提取和净化

9.5.1.1 牛组织

9.5.1.1.1 提取

称取(5±0.05)g 试样于 50 mL 离心管中,加 20 mL 甲醇,涡动 1 min,3 900 r/min 离心 10 min。取上层有机相于离心管中,重复提取一次,合并提取液。加 20 mL 正己烷,手摇 20 次,3 500 r/min 离心 5 min,弃上层正己烷。加 15 mL 正己烷重复脱脂一次,下层转至 100 mL 鸡心瓶中,50℃水浴下旋蒸至近干。加 5 mL 乙酸乙酯,涡动 1 min,静置 10 s,转至 50 mL 离心管中,鸡心瓶中再加 10 mL 正己烷,涡动 30 s,静置 10 s,转至同一离心管中,涡动 30 s,静置 1 min,除去正己烷层,乙酸乙酯层用 10 mL 正己烷重复脱脂一次,为备用液。

9.5.1.1.2 净化

取氨基固相萃取柱于固相萃取装置上,加无水硫酸钠 2 g,用玻璃棒敲匀,依次用乙酸乙酯 5 mL,正己烷 5 mL 预洗,将备用液通过小柱,依次用正己烷 10 mL 和正己烷-乙酸乙酯(70+30,v/v)5 mL 洗涤,乙酸乙酯 5 mL 洗脱,50℃水浴下氮气吹干。

9.5.1.2 牛尿液

9.5.1.2.1 提取

取 5 mL 尿液于离心管中,涡旋混匀 30 s,静置 10 min,加乙腈 5 mL,涡旋混匀 10 s,4 000 r/min 离心 5 min。取上清液,加 15 mL 水涡旋混匀 30 s,为 C₁₈ 固相萃取柱上样液。取 C₁₈ 固相萃取柱,依次用甲醇 4 mL 和水 5 mL 平衡,将上清液通过固相萃取柱,加水 4 mL 洗涤,甲醇 3 mL 洗脱,收集流出液,50℃水浴下氮气浓缩至约 100 μL。

9.5.1.2.2 净化

加水 4 mL,涡旋 30 s,为二次上样液。取 C₁₈ 固相萃取柱,依次用甲醇 4 mL 和水 5 mL 平衡,将二次上样液通过小柱,水 4 mL 洗涤,甲醇 3 mL 洗脱,收集流出液,50℃水浴下氮气浓缩至干。

取 95%丙酮溶液 300 μL 充分溶解残留物,涡旋混匀 30 s,备用。取氧化铝固相萃取柱,用 95%丙酮溶液 3 mL 平衡,加备用液,加 95%丙酮溶液 3 mL 洗脱,收集流出液,50℃水浴下氮气浓缩至干。

9.5.2 衍生化

加 50 μL 衍生化试剂,涡动 1 min,封口,60℃衍生化 15 min,冷却至室温后 GC/MS 测定。

9.5.3 测定

9.5.3.1 气相色谱条件

气相色谱柱:DB-5MS 柱,30 m×0.25 mm×0.25 μm。

载气:氦气。

载气流速:1.0 mL/min。

进样口温度:250℃。

进样量:1 μL,不分流。

柱温程序:初始温度 80℃,保持 0.5 min,15℃/min 升至 280℃,保持 10 min。

9.5.3.2 质谱条件

电子轰击离子源(EI)。

电子轰击能:70 eV。

离子源温度:230℃。

四极杆温度:150℃。

溶剂延迟:7 min。

检测模式:选择离子检测。

定性离子和定量离子见表 1。

表 1 定性离子和定量离子

药物名称	定性离子,m/z	定量离子,m/z
玉米赤霉酮	449,450,451,464	449
α-玉米赤霉醇	335,433,523,538	433
β-玉米赤霉醇	335,433,538,523	433

9.5.4 测定法

9.5.4.1 定性测定

根据试样溶液中药物的含量,选择峰面积相近的标准工作液和样品溶液等体积参插进样。通过气相色谱保留时间与质谱选择离子共同定性。样品中待测药物与标准物质的保留时间相对偏差不大于 2.5%,而且其选择离子的相对丰度的差异不大于 20%。标准溶液和试样溶液总离子流子色谱图见图 A.1 至 A.3。

9.5.4.2 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的标准工作液,作单点校准或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,试样液进样过程中应参插标准工作液,以便准确定量。

9.6 结果计算和表述

试样中药物的含量 X,以质量分数毫克每千克(μg/kg)或毫克每升(μg/L)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C——试样液中对应的玉米赤霉醇药物的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V——试样液总体积,单位为毫升(mL);

m——试样质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

10 检测方法灵敏度、准确度、精密度

10.1 灵敏度

本方法在牛肌肉、牛肝脏中玉米赤霉酮、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇的检测限均为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限均为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；牛尿液中玉米赤霉酮、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇的检测限均为 $0.5 \mu\text{g}/\text{L}$ ，定量限均为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $1 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L}) \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法的批内变异系数 $\leq 15\%$ ，批间变异系数 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液总离子流色谱图

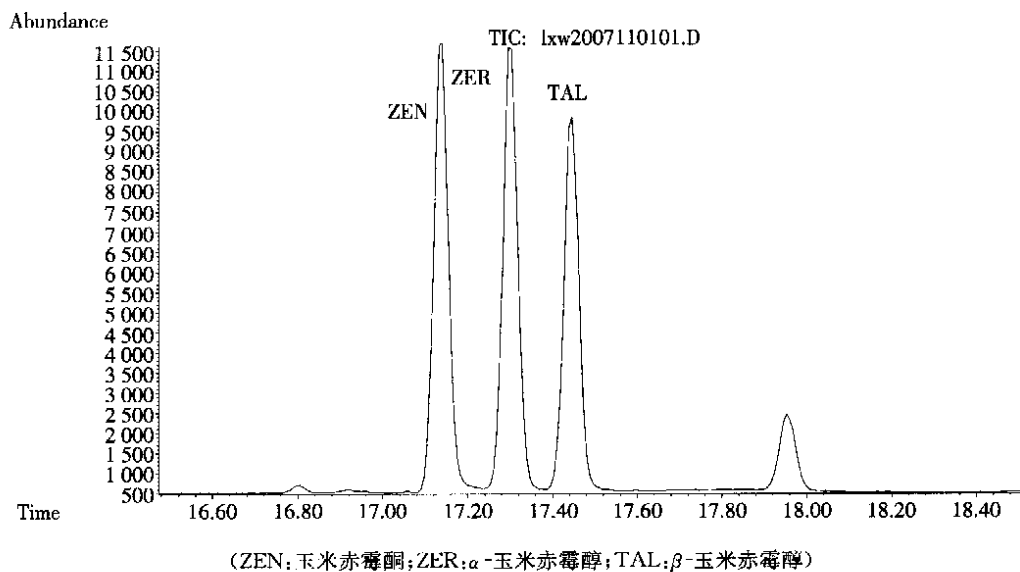


图 A. 1 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 玉米赤霉醇及其相关物标准溶液选择离子色谱图

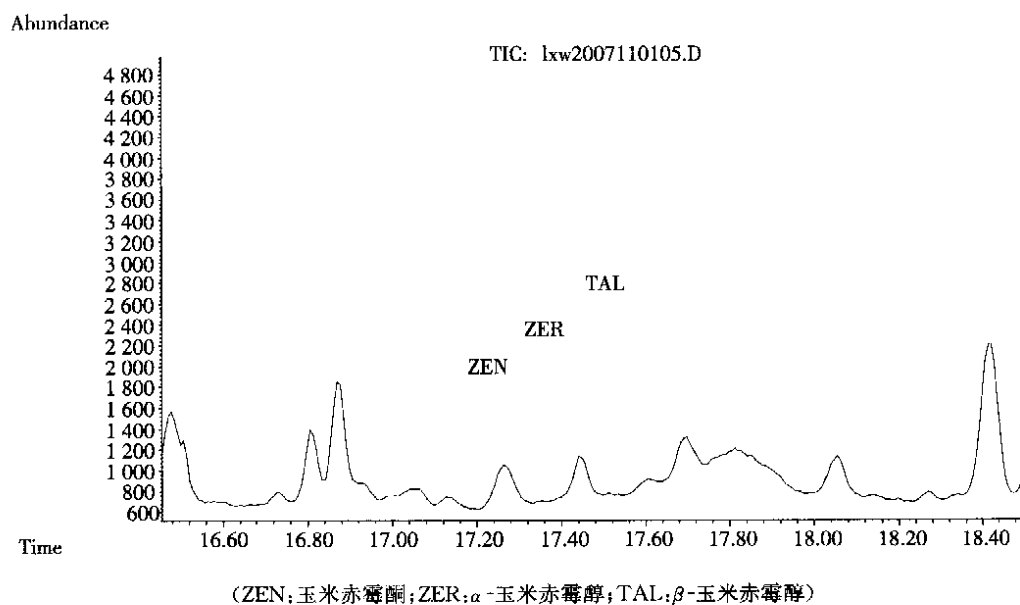
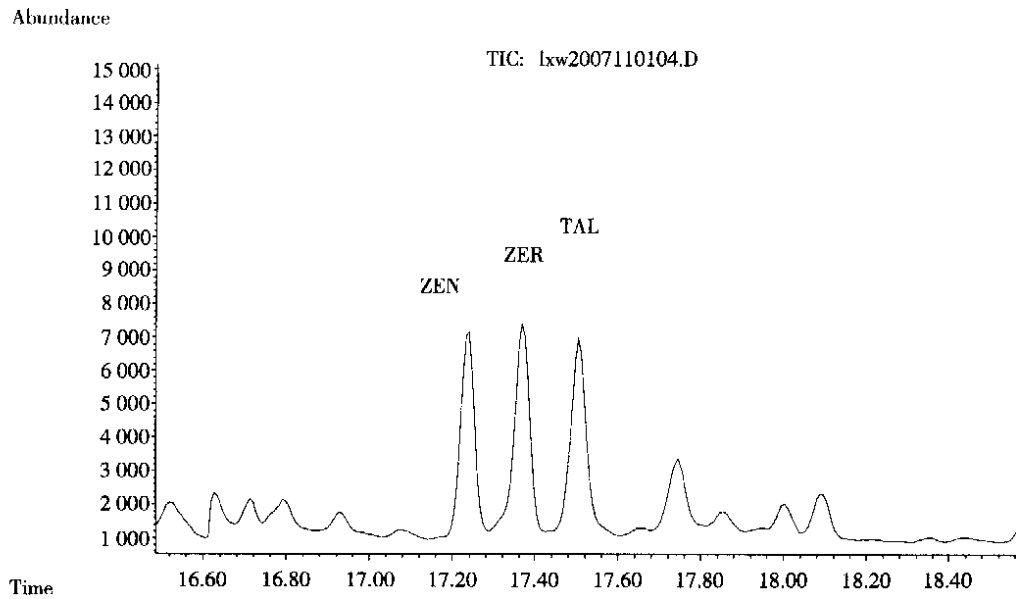


图 A. 2 空白牛肝样品选择离子色谱图



(ZEN: 玉米赤霉酮; ZER: α -玉米赤霉醇; TAL: β -玉米赤霉醇)

图 A.3 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 牛肝添加样品选择离子色谱图