

ICS

备案号:

DB34

安徽省地方标准

DB 34/T 822- 2020

动物组织中地西洋的残留测定 — 酶联免疫吸附法

Determination of diazepam residue in animal tissues
Enzyme-linked immunosorbent assay

(征求意见稿)

2020-XX-01 发布

2020-XX-01 实施

安徽省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准代替DB/T 822-2008《动物组织中地西洋的残留测定—酶联免疫吸附法》，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 修改了范围（见1）；
- 修改了规范性引用文件（见2）；
- 修改了检测步骤（见5）；
- 修改了结果判断（见6）；
- 修改了结果确认（见7）。

本标准由安徽省兽药饲料监察所提出。

本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：安徽省兽药饲料监察所。

本标准起草人：许世富、。

本标准2008年8月发布，本次为第一次修订。

动物组织中地西洋的残留测定—酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了动物肌肉、肝脏、肾脏中地西洋残留测定的酶联免疫吸附测定方法。
本标准适用于动物肌肉、肝脏、肾脏中地西洋残留的快速测定。

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（包括所有修改单）适用于本文件。

GB 31650 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

残留在组织中的地西洋经样品提取液提取后，用于酶联免疫分析。测定方法是酶联免疫法中的竞争性测定法，其主要原理是：吸附在孔内的地西洋与标准或样品中的地西洋竞争性地与地西洋抗体相结合，与标准品或样品相结合的地西洋抗体被洗涤去除后，只剩下与微孔内药物相结合的抗体，加入一定量的显色底物，酶的颜色变成蓝色，加入终止液后颜色由蓝色变成黄色。在450nm处进行吸光度测量，换算后可以获得样本中地西洋的浓度含量，在一定浓度范围内吸光度的高低与样品中地西洋的含量成反比。

4 试剂和溶液

4.1 除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T6682 规定的二级水。

4.2 竞争酶标免疫法地西洋检测试剂盒 2℃~8℃冰箱中保存。

4.2.1 微孔板：包被有地西洋抗体。

4.2.2 地西洋标准溶液：0.1μg/mL。

4.2.3 酶标物冻干粉。

4.2.4 酶标物溶解液。

4.2.5 浓缩稀释液。

4.2.6 浓缩洗涤液。

4.2.7 显色剂。

4.2.8 终止液。

4.3 地西洋标准工作液：取地西洋标准溶液，用稀释液稀释为浓度分别为：0ng/mL，0.15ng/mL，0.3ng/mL，0.6ng/mL，1.25ng/mL，2.5ng/mL，5ng/mL。

4.4 洗涤液：用水 10 倍稀释厂商提供的浓缩洗涤液。

4.5 稀释液：用水 20 倍稀释厂商提供的浓缩稀释液。

4.6 酶标物溶液：在冻干粉中精确加入 12mL 酶标物溶解液，配制后置于 22℃~25℃充分回温，备用。

4.7 0.1M 氢氧化钠溶液：称取 0.4g 氢氧化钠，加入去离子水定容至 100mL 并充分混匀，备用。

5 仪器设备

5.1 酶标仪（带 450nm 滤光片）。

5.2 匀浆机：≥10 000rpm。

- 5.3 离心机：≥5 000rpm。
- 5.4 分析天平：感量 0.01g。
- 5.5 氮吹仪。
- 5.6 振荡器。
- 5.7 离心管：20mL。
- 5.8 微量加样器及配套吸头：（单道 20μL，50μL，100μL，多道 50μL~300μL）。

6 试样制备

6.1 样品处理

动物肌肉、肝脏、肾脏，去筋后切成小块，制成肉糜后，10000rpm均质2min，取2g±0.1g均质样品，加入0.1M氢氧化钠溶液（4.7）8mL，震荡混匀5分钟，5 000rpm离心10min，取1mL上清液于另一离心管中，加入10mL正己烷，震荡混匀5min，5 000rpm离心5min，取上层正己烷相5mL，50℃氮吹仪吹干，加1mL样品稀释工作液（4.5）溶解，取50μL上清液用于检测。

6.2 样品贮存

将试样按照测试和备用分别存放于-20℃~-16℃条件下保存。

7 测定步骤

7.1 测试程序

- 7.1.1 测定在室温 20℃~25℃条件下操作，测定之前将试剂盒以及所有试剂在室温（20℃~25℃）下放置 1h~2h。
- 7.1.2 将足够标准和样品所用数量的孔条插入微孔架，标准和样品做两个平行实验，记录下标准和样品的位置。
- 7.1.3 分别在各孔中加 50μL 的标准品溶液或样品溶液。
- 7.1.4 在所有孔中加入 100μL 的酶标物溶液（推荐使用多通道加样器）。
- 7.1.5 轻轻晃动反应板，20℃~25℃反应 10min。
- 7.1.6 倾出微孔中的液体，加 300μL 洗涤液，轻轻振荡混匀，倾出微孔中的洗涤液，在吸水纸上拍打，彻底清除微孔中的残留液和气泡，重复洗板 3 遍。
- 7.1.7 立即加 100μL 显色剂（推荐使用多通道加样器），晃动反应板使之彻底混匀，20℃~25℃避光反应 10min。
- 7.1.8 每孔加 100μL 终止液（推荐使用多通道加样器），轻轻振荡混匀，10min 内在 450nm 下检测吸光度。

8 结果判定与表述

用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）：

按下式计算百分吸光度值：

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

式中：

B—标准溶液或供试样品的吸光度值；

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（%）对应地西洋标准溶液浓度（ng/mL）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。结果乘上相应的稀释倍数，即得样品中地西洋药物含量。

9 检测方法灵敏度、准确度、精密度

9.1 灵敏度

本方法在动物肌肉、肝脏、肾脏中的检测限为0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为80%~100%。

9.3 精密度

本方法的批内变异系数CV% \leq 10%，批间变异系数CV% \leq 15%。

10 其他

10.1 本方法动物组织稀释系数为10。

10.2 本方法为快速测定法，检测结果小于0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时可判为未检出，大于0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时认为可疑，需要进一步确认。

10.3 B_0 吸光值应该不低于0.8。

10.4 试剂盒可能存在交叉反应，不同品牌的试剂盒，其操作步骤可能略有差别，具体操作步骤可根据试剂盒使用说明书略作调整。
