

DB34

安 徽 省 地 方 标 准

DB 34/T 1421—2011

水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量的 快速筛选测定-酶联免疫吸附法

Quick Screening of residues of malachite green and its metabolite in aquatic products
ELISA

2011 - 05 - 10 发布

2011 - 06 - 10 实施

安徽省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由安徽省渔业环境监测中心提出。

本标准由安徽省质量技术监督局批准。

本标准起草单位：安徽省渔业环境监测中心。

本标准主要起草人：孙德祥、鲍鸣、周作友、董星宇、杨瑞、程金明。

水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量的 快速筛选测定-酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了水产品中孔雀石绿(*Malachite green, MG*)及其代谢物隐色孔雀石绿(*Leucomalachite green, LMG*)残留总量的酶联免疫吸附(ELISA)检测方法。

本标准适用于水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿的快速筛选测定。阳性样品须用液相色谱-串联质谱法(LC/MS-MS)确证。

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,仅所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(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SC/T 3016-2004 水产品抽样方法

3 原理

本方法基于竞争性酶联免疫方法原理。样品中 MG 或 LMG 经提取液和乙腈等提取纯化后, LMG 通过氧化剂被氧化为 MG, 与 MG-生物素竞争微孔板上包被的 MG 抗体, 没有结合的 MG-生物素在洗板中被去除。再加入过量的酶标记的链亲和素, 与结合了抗体的 MG-生物素结合, 多余的酶标记的链亲和素在洗板中被去除。结合的酶使随后加入的 HRP 底物(TMB)显色, 样品中 MG 和 LMG 含量越少, 则结合的酶越多, 颜色则越深, 反之, 颜色则越浅。

结果用酶标仪在波长 450 nm 处, 测定吸光度值, 在一定浓度范围内吸光度值与样品中 MG 和 LMG 含量成反比。

4 试剂和材料

4.1 实验室用试剂: 所用试剂除另有规定外, 均为分析纯。水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.2 乙腈。

4.3 正己烷。

4.4 孔雀石绿标准溶液: 0 ng/mL、0.05 ng/mL、0.15 ng/mL、0.5 ng/mL、1.5 ng/mL、4.5 ng/mL。

4.5 孔雀石绿酶联免疫试剂盒

应在有效期内。超过 1 个月不使用, 生物素耦合物、辣根过氧化物酶标记的链亲和素以及标准品应保存在 -20℃。其它试剂应在 2℃~8℃ 的温度下贮存。不同批次的试剂盒不可混用。

4.5.1 微孔板: 包被有孔雀石绿抗体。

4.5.2 提取液 A: 使用前, 取出提取物 A, 用 90 mL 双蒸馏水溶解至完全溶解。

4.5.3 提取液 B: 使用前, 根据需要量, 用双蒸馏水稀释 10 倍。

- 4.5.4 纯化试剂。
- 4.5.5 氧化剂液：使用前，根据需要量，用乙腈稀释 10 倍。
- 4.5.6 提取液 C：使用前，根据需要量，用双蒸馏水稀释 10 倍。
- 4.5.7 MG-生物素耦合剂稀释液。
- 4.5.8 MG-生物素耦合剂：使用前 5 min 根据需要量，用 MG-生物素耦合剂稀释液（4.3.7）稀释 100 倍。
- 4.5.9 辣根过氧化物酶标记的链亲和素稀释液。
- 4.5.10 辣根过氧化物酶标记的链亲和素：使用前 10 min 根据需要量，用辣根过氧化物酶标记的链亲和素稀释液（4.3.9）稀释 100 倍。
- 4.5.11 洗液。使用前 10 min，用双蒸馏水稀释 20 倍。
- 4.5.12 TMB 底物。
- 4.5.13 终止液。

5 仪器和设备

- 5.1 酶标仪：配备 450 nm 滤光片。
- 5.2 分析天平：感量 0.001 g，感量 0.0001 g。
- 5.3 恒温培养箱。
- 5.4 均质器。
- 5.5 旋涡振荡器。
- 5.6 离心机：离心力 ≥ 4000 g。
- 5.7 氮吹仪
- 5.8 微量单道/多道移液器：10 μL ~100 μL ；100 μL ~1000 μL ；50 μL ~300 μL 。
- 5.9 水浴锅。
- 5.10 聚四氟乙烯离心管：5 mL，50 mL，具塞。

6 测定方法

6.1 制备与保存

- 6.1.1 抽样：按 SC/T 3016-2004 水产品抽样方法。
- 6.1.2 食用样品取可食部分，匀质到粉碎均匀（糊状），装入干净容器，标明标记， -20°C 保存。
- 6.1.3 苗种样品直接匀质到粉碎均匀（糊状），装入干净容器，标明标记， -20°C 保存。

6.2 提取与纯化

- 6.2.1 操作之前将试剂盒中所有试剂在室温（ 20°C ~ 25°C ）下放置 1 h~2 h。
- 6.2.2 称取 2.00 g（ ± 0.0001 g）匀质好的样品于 50 mL 离心管内，依次加入 1.0 mL 样品提取液 A（4.3.2）、0.4 mL 样品提取液 B（4.3.3）和 6.0 mL 乙腈，涡旋振荡 4 min 或者振摇 20 min。4000 g 离心 10 min，取 2.0 mL 上清液到预先加入 300 mg \pm 20 mg 纯化试剂（4.3.4）的 5 mL 离心管中，2500 r/min 涡旋振荡 1 min，静置 10 min。4000 g 离心 10 min，取 1.0 mL 上清液到另一 5 mL 离心管中，减压蒸馏或者 50°C ~ 60°C 水浴氮气吹干。加入 100 μL 的氧化剂液（4.3.5），涡旋振荡 1 min，4000 g 离心 1 min，静置 15 min。依次加入 400 μL 样品提取液 C（4.3.6）、650 μL 的正己烷，涡旋振荡 1 min 后，4000 g 离心 5 min。弃除上层有机溶液，下清液备用（在 24 h 内有效）。

稀释倍数：1.5。

6.3 酶联免疫测定

- 6.3.1 测定在室温 20℃~25℃ 条件下操作。
- 6.3.2 将测定所需的微孔条插入框架，记录标准和样品的位置，每个标准和样品应作两个平行。
- 6.3.3 分别在各孔中加入 90 μL 标准品或制备好的样品（6.2.2）。
- 6.3.4 分别在各孔中加入 30 μL MG-生物素耦合物（4.3.8），轻敲微孔板边缘混匀 1 min。
- 6.3.5 盖好盖板膜，室温下避光孵育 30 min。
- 6.3.6 倾出微孔中的液体，每孔加入 250 μL 的洗液（4.3.11），轻敲微孔板边缘混匀 1 min。倾出微孔中的洗液，在吸水纸上拍打，彻底清除微孔中的残留液和气泡，重复上述操作 3 次。
- 6.3.7 每孔中加入 100 μL 的辣根过氧化物酶标记的链亲和素（4.3.10），室温下避光孵育 15 min。
- 6.3.8 洗板，方法同 6.3.7，重复操作 3 次。
- 6.3.9 迅速在每孔中加入 100 μL TMB 底物（推荐使用多通道移液器，底物本身是无色的，颜色发生变化则不能使用），轻敲微孔板边缘混匀 1 min，盖好盖板膜，室温下避光孵育 10 min~15 min。
- 6.3.10 迅速在每孔中加入 100 μL 的终止液（4.3.13），5 min 内在 450 nm 处测定 OD 值（吸光度值）。

6.4 结果计算

6.4.1 计算相对吸光度值

分别计算标准和样品的平均吸光值。按下列公式(1)计算标准液和样液的相对吸光度值。

$$A = B / B_0 \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A — 相对吸光度值

B — 标准液和样液的平均吸光度值

B_0 — 0 ng/mL 标准液的平均吸光度值

6.4.2 绘制标准曲线

以相对吸光度值为纵坐标，标准浓度的对数值（log₁₀）为横坐标绘制标准曲线。每次实验均需重新绘制标准曲线。

6.4.3 样品结果计算

通过标准曲线可以计算出样品的浓度值；

样品的孔雀石绿残留的总量按（2）式计算：

$$X = C \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X — 样品待测组分的量，单位为微克每千克（μg/kg）

C — 样品待测组分的浓度

n — 稀释倍数

7 方法的检出限、回收率、重复性

7.1 检出限

本方法孔雀石绿及其代谢残留物的检出限为 0.1 μg/kg。

7.2 回收率

在样品中添加 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度水平时，回收率为 70% ~ 120%。

7.3 重复性

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

8 结果表述

当所对应的样品的测定值小于其检出限时，报告为孔雀石绿未检出。当测定值大于检出限时，报告为孔雀石绿检出。

出现阳性值时（超过相关标准、规定的限量值），需用液相色谱-串联质谱法（LC/MS-MS）加以确证。
