

ELISA 法测定牛奶中链霉素不确定度的评定

赵媛*, 张燕宾, 解鑫, 李海礁, 齐文静, 喻东威, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘要: **目的** 对酶联免疫吸附法(ELISA)测定牛奶中链霉素残留量的测量不确定度进行评定。**方法** 分析了该方法的不确定度来源, 建立数学模型, 并进行分析后找到主要影响因素。**结果** 当牛奶中链霉素含量为 7.7 ng/mL 时, 其扩展不确定度为 1.52 ng/mL ($k=2$)。其中, 测量样品重复性、反应温度及回收率影响较大。**结论** 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定牛奶中链霉素含量应保证实验具有良好的重复性, 严格控制实验反应条件, 并且保证样品回收率符合要求。

关键词: 链霉素; 酶联免疫吸附法; 牛奶; 不确定度

Evaluation of the uncertainty in measuring streptomycin in milk by ELISA

ZHAO Yuan*, ZHANG Yan-Bin, XIE Xin, LI Hai-Jiao, QI Wen-Jing,
YU Dong-Wei, SONG Xiao-Dong

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd., Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective The uncertainty in detecting streptomycin in milk by ELISA was evaluated. **Methods** The source of uncertainty of the whole determination procedure was analyzed, and the mathematical model was developed. **Results** The main influencing factors and the combined uncertainty were obtained. The expanded uncertainty was 1.52 ng/mL ($k=2$) with 7.7 ng/mL of the content of streptomycin. The major sources of uncertainty of measurement were the measuring repeatability and the reaction temperature, and the sample recovery rate. **Conclusion** It is necessary to control repeatability of measurement and experimental reaction conditions to make sure the testing results are accurate by ELISA. It also should ensure that the sample recovery rate could meet the requirements.

KEY WORDS: streptomycin; ELISA; milk; uncertainty

1 引言

酶联免疫吸附法测定是以免疫学反应为基础将抗原抗体的特异性反应与酶底物的高效催化产物作用相结合的一种敏感性很高的检测技术^[1-3], 具有灵敏度高、特异性强、速度快和成本低等优点, 可用于大量样品的筛选检测^[4-6], 目前广泛用于药物残留快速初筛检测^[7,8]。本文采用酶联免疫吸附法在牛奶中

链霉素残留量的测定^[9], 结合 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[10], 对检测结果进行不确定度分析评定, 找出检测结果的主要影响因素, 并对检测结果的准确度提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

酶标仪(BioTek, ELx808); 高速冷冻离心机(Heal

*通讯作者: 赵媛, 硕士, 主要研究方向为乳品分析。E-mail: zhaoyuan1@mengniu.cn

*Corresponding author: ZHAO Yuan, Master, Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd., Hohhot 011500, China. E-mail: zhaoyuan1@mengniu.cn

3.4.3 回收率引入的标准不确定度

由经验知, 本法链霉素的加标回收率为 120%~150%, 回收率是不对称分布, 其上界为 150%, 下界为 120%, 半宽度为 $\frac{150-120}{2} \times 100 = 15\%$, 由此引起的标准不确定度为: 假设为均匀分布, 包含因子 $k=\sqrt{3}$, 其标准不确定度为:

$$u(R) = \frac{15}{\sqrt{3}} = 8.7\%$$

则相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(R) = \frac{8.7}{100} = 0.087$$

3.4.4 标准物质引入的标准不确定度

标准物质校准证书上给出的允许误差为 0.005 ng/mL, 假设为均匀分布, 包含因子 $k=\sqrt{3}$, 其标准不确定度为:

$$u(C) = \frac{0.005}{\sqrt{3}} = 0.0029 \text{ ng/mL}$$

浓度为 5.0 ng/mL, 其相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(C) = \frac{0.0029}{5.0} = 0.00058$$

3.4.5 酶标仪测定和反应温度引入的标准不确定度

(1)酶标仪校准证书上给出的波长测量结果不确定度 $U=1.3 \text{ nm}$, 波长为 450 nm, 其相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(\lambda) = \frac{1.3}{450} = 0.0029$$

(2)ELISA 法的底物反应温度为 25 ℃, 在使用电热恒温培养箱时, 温度波动范围为 $\pm 1.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 假设为均匀分布, 包含因子 $k=\sqrt{3}$, 其标准不确定度为:

$$u(T) = \frac{1}{\sqrt{3}} = 0.58 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

则相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(T) = \frac{0.58}{25} = 0.023$$

将上述两项相对标准不确定度合成, 得到

$$\begin{aligned} u_{rel}(y) &= \sqrt{u_{rel}^2(\lambda) + u_{rel}^2(T)} \\ &= \sqrt{0.0029^2 + 0.023^2} = 0.023 \end{aligned}$$

3.5 合成标准不确定度

各分量的标准不确定度的汇总如表 2:

按照评定不确定度的测量模型计算链霉素残留量 x 的合成标准不确定度。

表 2 输入量及其相对标准不确定度

Table 2 Input data and the relative standard uncertainty

输入量	输入量说明	输入量数值	相对标准不确定度 u_{rel}
$u(\text{rep})$	重复性	1.0	0.042
$u(V)$	体积	50 μL	0.0000024
$u(R)$	回收率	100 %	0.087
$u(y)$ 合成	波长和温度	450 nm 和 25 $^{\circ}\text{C}$	0.023
$u(C)$	浓度	5.0 ng/mL	0.00058

$$\begin{aligned} u_c(x) &= x \times \sqrt{u_{rel}^2(\text{rep}) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(R) + u_{rel}^2(y) + u_{rel}^2(C)} \\ &= 7.7 \times \sqrt{0.042^2 + 0.0000024^2 + 0.087^2 + 0.023^2 + 0.00058^2} \\ &= 0.76 \text{ ng/mL} \end{aligned}$$

3.6 扩展不确定度

取包含因子 $k=2$, 扩展不确定度为: $U(x)=k \cdot u_c(x) = 2 \times 0.76=1.52 \text{ ng/mL}$

3.7 报告不确定度

用酶联免疫吸附法测定牛奶中链霉素残留量, 测量 2 个样品, 取其平均值报告结果, 平均值的扩展不确定度为 $U(x)=1.52 \text{ ng/mL}$ ($k=2$)。

4 结 论

通过对酶联免疫吸附法(ELISA)测定牛奶中链霉素含量的不确定来源进行分析, 并评定各不确定度分量, 得出该分析方法的扩展不确定度为 1.52 ng/mL, 包含因子 $k=2$; 同时可以看出, 采用酶联免疫吸附法测定牛奶中链霉素含量的不确定来源主要是测定重复性、反应温度及回收率, 而加样体积、标准物质和酶标仪波长导致的不确定度较小。从不确定度结果得出, 采用酶联免疫吸附法测定牛奶中链霉素含量应保证实验具有良好的重复性, 严格控制实验反应条件, 并且保证样品回收率符合要求, 这样对于提高检测的准确性和可靠性具有重要意义。本实验用不确定度的评定方法分析酶联免疫吸附法测定牛奶中链霉素含量, 在分析工作中具有一定的指导意义, 对检测结果的准确度提供了参考。

参考文献

[1] 刘超英. 酶联免疫吸附实验原理和酶标仪原理及维修[J]. 医疗卫生装备, 2009, 30(2): 110-111.
Liu CY. The principle of ELISA method and the principle and

- maintenance of reader[J]. Chin Med Eq J, 2009, 30(2): 110–111.
- [2] 马颀, 任珊, 许美玉. 酶联免疫吸附技术在食品安全检测中的应用[J]. 食品科技, 2008, 33(1): 200–204.
- Ma Q, Ren S, Xu MY. Application of ELISA technology on food safety detection[J]. Food Sci Technol, 2008, 33(1): 200–204.
- [3] 张占军, 王富花. 酶联免疫吸附技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 157–160.
- Zhang ZJ, Wang FH. The enzyme-linked immunosorbent assay technology and its application in food safety determination[J]. Food Res Dev, 2011, 32(1): 157–160.
- [4] 廖妍俨, 黄家岭. 酶联免疫法检测牛奶中黄曲霉毒素 M1 的应用[J]. 贵州化工, 2012, 37(4): 33–34, 39.
- Liao YY, Huang JL. The application of enzyme-linked immunosorbent assay on aflatoxin M1 in milk[J]. Guizhou Chem Ind, 2012, 37(4): 33–34, 39.
- [5] 高洁, 董文宾, 李菲, 等. ELISA 方法在检测牛乳抗生素残留中的应用[J]. 食品科技, 2008, 33(9): 242–245.
- Gao J, Dong WB, Li F, *et al.* Research progress for technology of immunoassay of ELISA for detection of antibiotics in milk[J]. Food Sci Technol, 2008, 33(9): 242–245.
- [6] 周宏琛, 闫秋成, 田晓林, 等. 动物源性食品安全快速检测及酶联免疫吸附方法的应用[J]. 肉类研究, 2006, (3): 29–32.
- Zhou HC, Yan QC, Tian XL, *et al.* Rapid determination of animal food safety and the application of ELISA[J]. Meat Res, 2006, (3): 29–32.
- [7] 黄瑞蕊, 于振, 李建科. 酶联免疫技术在食品安全检测中的应用[J]. 科技创新与应用, 2013, (13): 84.
- Huang RR, Yu Z, Li JK. ELISA technology application in the food safety testing [J]. Technol Inn Appl, 2013, (13): 84.
- [8] 邵辉, 吴瑕, 王剑飞, 等. 酶联免疫法与乳及乳制品中抗生素残留的检测[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(6): 58–59, 64.
- Shao H, Wu X, Wang JF, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay and detection of antibiotics residues in milk and milk products[J]. China Dairy Ind, 2011, 39(6): 58–59, 64.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21330-2007 动物源性食品中链霉素残留量测定方法 酶联免疫法[S].
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T21330-2007 determination of streptomycin residues in food of animal origin ELISA method [S].
- [10] 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. JJF 1059.1-2012 evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [11] 马小宁, 赵泽, 姬勇. 原子吸收光谱法测定奶粉中铁含量的不确定度评定[J]. 现代测量与实验室管理, 2012, 20(6): 31–33.
- Ma XN, Zhao Z, Ji Y. Determination of iron uncertainty in milk powder by atomic absorption spectrometry[J]. Adv Meas Lab Manage, 2012, 20(6): 31–33.
- [12] 王天西. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B1 不确定度的评定[J]. 农产品加工, 2008, 157(12): 96–98.
- Wang TX. Evaluation of the Uncertainty in Measuring Aflatoxin B1 by ELISA [J]. Acad Periodical Farm Products Proces, 2008, 157(12): 96–98.
- [13] 陈俊玉, 方成俊, 何建顺. ELISA 法测定动物产品中氯霉素不确定度的分析 [J]. 福建畜牧兽医, 2012, 34(6): 12–13.
- Chen JY, Fang CJ, He JS. Uncertain determination of chloramphenicol in animal food by ELISA[J]. Fujian J Animal Husbandry Vet Med, 2012, 34(6): 12–13.
- [14] 赵健亚, 杜方均, 许世勇, 等. 酶联免疫法检测猪肝中 β -兴奋剂残留的不确定度分析[J]. 安徽农业科学, 2012, (18): 9717–9718, 9899.
- Zhao JY, Du FJ, Xu SY, *et al.* Uncertainty Analysis of β -agonists in Pork Liver by ELISA[J]. J Anhui Agric Sci, 2012, (18): 9717–9718, 9899.
- [15] 肖静, 赵健亚, 许世勇, 等. ELISA 检测饲料中莱克多巴胺的不确定度分析[J]. 中国饲料, 2012, (7): 37–39.
- Xiao J, Zhao JY, Xu SY, *et al.* Uncertainty analysis of ractopamine in feed by ELISA[J]. China Feed, 2012, (7): 37–39.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介



赵媛, 硕士, 主要研究方向为乳品分析。

E-mail: zhaoyuan1@mengniu.cn