

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2215—2008

进出口动物源性食品中吩噻嗪类 药物残留量的检测方法 酶联免疫法

Determination of phenothiazines residues
in animal original food for import and export—
Enzyme-linked immunosorbent assay

2008-11-18 发布

2009-06-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国浙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张晓峰、施伟良、汪云泉、朱振江、方莹。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口动物源性食品中吩噻嗪类 药物残留量的检测方法 酶联免疫法

1 范围

本标准规定了动物源性产品中吩噻嗪类抗生素残留量的酶联免疫测定方法。

本标准适用于肉类、内脏、水产品 and 牛奶中氯丙嗪、乙酰丙嗪、丙酰丙嗪、丙嗪和三氟丙嗪残留总量的测定。

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—2008, ISO 3696:1987, MOD)

3 样品的制备和保存

3.1 样品制备

组织样品:从全部样品中取有代表性样品约 500 g,用组织捣碎机充分捣碎均匀,均分成两份,分别装入容器中,密封,并标明标记。

牛奶和奶粉:从原始包装中取有代表性样品约 500 g,充分混匀,均分成两份,分别装入容器中,密封,并标明标记。

3.2 样品保存

将样品于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

4 方法提要

本标准以碱性乙腈提取样品中残留的氯丙嗪、乙酰丙嗪、丙酰丙嗪、丙嗪和三氟丙嗪。微孔板中包被有氯丙嗪抗体,加入氯丙嗪标准品或样品提取液和酶标物后,游离氯丙嗪或提取液中残留物和酶标记氯丙嗪竞争性的与抗体结合。通过洗涤除去未结合的氯丙嗪和酶标记物,然后加入底物显色,用酶标仪测定吸光度,根据吸光度值得出样品中残留物的含量。

5 试剂和材料

除注明外,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 吩噻嗪检测试剂盒(参见附录 A)。

5.2 乙腈。

5.3 40%氢氧化钠溶液:准确称取 40.0 g 氢氧化钠,用水溶解并定容到 100 mL。

5.4 标准品:氯丙嗪,纯度 $\geq 98\%$;乙酰丙嗪,纯度 $\geq 98\%$;丙酰丙嗪,纯度 $\geq 98\%$;丙嗪,纯度 $\geq 98\%$;三氟丙嗪,纯度 $\geq 98\%$ 。

5.5 标准品溶液

5.5.1 标准品储备液:分别称取 5 mg(精确到 0.1 mg)的氯丙嗪、乙酰丙嗪、丙酰丙嗪、丙嗪、三氟丙嗪,用甲醇溶解并定容至 10 mL,得到质量浓度为 500 mg/L 的标准储备溶液。该储备液可以在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光条件下保存 12 个月。

5.5.2 混合标准品中间液:分别吸取各种标准品储备液 0.2 mL(丙嗪为 0.1 mL)于棕色定容量瓶,用

甲醇定容至 10 mL,各种酚噻嗪类药物浓度为 10 mg/mL,可在-20 ℃避光条件下保存 3 个月。

5.5.3 混合标准品工作液:根据需要以试剂盒中样品稀释缓冲液配制。

6 仪器

6.1 酶标仪:具 450 nm 波长。

6.2 8 道移液器:10 μL~100 μL。

6.3 单道移液器:10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL 和 2 mL~10 mL。

6.4 高速低温离心机:8 000 r/min。

6.5 电子天平:感量 0.1 mg。

6.6 氮吹仪。

6.7 组织捣碎机。

6.8 漩涡混合器。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 5.0 g 样品(精确到 0.1 g),置于 50 mL 具盖聚丙烯酰离心管中,加入 20 mL 乙腈(5.2)和 0.5 mL 40%氢氧化钠溶液(5.3),漩涡混合 2 min,超声提取 10 min。6 000 r/min 离心 5 min,吸取 2 mL 上清液于干净试管,氮气吹至将干(注意不能吹干),用样品稀释缓冲液(试剂盒提供)定容到 1.0 mL,即可供 ELISA 检测用。最后稀释倍数为 2。

7.2 测定条件¹⁾

7.2.1 酶标仪测定条件

酶标仪测定波长为 450 nm。

7.2.2 洗板条件

人工洗涤次数 5 次,每次加入洗涤液量为 250 μL。自动洗板可以预定 5 次周期。

7.2.3 操作条件

所有操作应在室温下(20 ℃~25 ℃)进行,试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温(20 ℃~25 ℃)后方可使用。

7.3 测定步骤

7.3.1 将测定需用的微孔板备齐并插入微孔架上,记录标准溶液及样品提取液等在微孔架上的位置。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头。

7.3.2 吸取 50 μL 稀释缓冲液于孔 A1、A2;分别吸取 50 μL 氯丙嗪标准溶液(浓度分别为:0.05、0.1、0.2、0.3、0.6、1.25 和 2.5 ng/mL)于孔 B1、B2—H1、H2;吸取 50 μL 样品溶液于其余微孔中。

7.3.3 分别吸取 100 μL 酶标记物溶液于每一个微孔。

7.3.4 用封口膜封孔条,并持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀,室温(20 ℃~25 ℃)避光孵育 10 min。

7.3.5 倒出孔中的液体,将微孔架反扣在吸水纸上反复拍打,以除去孔中过多的残液,但不能使微孔干燥,然后立即用洗涤缓冲液按 7.2.2 条件进行洗板。

7.3.6 迅速加入 100 μL 底物溶液于每一个微孔,然后持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后,于室温(20 ℃~25 ℃)避光孵育 10 min。

7.3.7 加入 100 μL 反应终止液于每一个微孔,混匀后将微孔架置于酶标仪中,在 450 nm 处测量吸光度(应在加入反应终止液 30 min 内读取吸光度)。

1) 给出该信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对某一产品操作步骤的认可。如果其他产品的操作步骤有不同,需经实验评估后采用。

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一标准溶液、同一样品溶液均应进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

7.6 质控试验

每次测定均应做一个用空白样品添加混合标准(5.5.3)的质控样品测定,以确定检测过程的准确性,添加浓度为相应产品的检测低限。

8 结果计算和判定

8.1 结果计算

标准品和待测样品的 OD 平均值除以零标准(B1、B2)的平均 OD 值,再乘以 100。计算出各标准液和样品的百分比吸光度值,零标准为 100%(最大百分比吸光度值)。

以吸光度百分比值为纵坐标(%),氯丙嗪标准溶液浓度(ng/mL)对数值为横坐标,绘制标准工作曲线。从标准工作曲线上得到样品中相应的残留物浓度后,结果按式(1)进行计算:

$$X = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——样品中相应残留物的量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c——从标准工作曲线上得到的样品中残留物浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V——样品溶液的最终定容体积,单位为毫升(mL);

m——样品溶液所代表的最终试样质量,单位为克(g)。

也可以用各种酶标仪的数据处理软件进行计算,所得结果表示至一位小数。

8.2 结果判定

结果大于等于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为阳性样品,结果小于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为阴性样品。

9 确证试验

如被测样品中残留物的值大于测定低限时,应用其他方法进行确证。

10 本方法测定低限和回收率

10.1 方法测定低限

氯丙嗪、乙酰丙嗪、丙酰丙嗪、丙嗪和三氟丙嗪为:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 回收率

回收率见表 1。

表 1 添加浓度及回收率数据($n=15$)

药物名称	添加浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%				
		猪肉	虾仁	猪肝	猪肾	牛奶
氯丙嗪	0.5	64~82	64~86	60~82	62~88	64~84
	10	60~80	66~83	62~80	57~82	62~82
	50	63~80	63~81	63~84	61~77	60~77
乙酰丙嗪	0.5	62~84	68~82	68~84	68~94	60~84
	10	66~83	62~79	60~85	62~77	60~79
	50	66~81	63~82	60~86	65~81	62~77

表 1 (续)

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%				
		猪肉	虾仁	猪肝	猪肾	牛奶
丙酰丙嗪	0.5	64~84	60~86	64~86	66~90	64~86
	10	62~80	63~80	61~86	63~78	60~82
	50	62~82	62~81	64~82	62~82	66~93
丙嗪	0.5	64~85	63~85	63~85	63~85	62~77
	10	64~84	65~85	65~85	67~85	66~77
	50	64~86	67~87	64~84	65~86	62~81
三氟丙嗪	0.5	66~84	66~84	64~84	68~84	68~84
	10	68~83	62~79	60~85	63~77	60~79
	50	64~89	64~82	60~86	66~81	62~78

附录 A
(资料性附录)

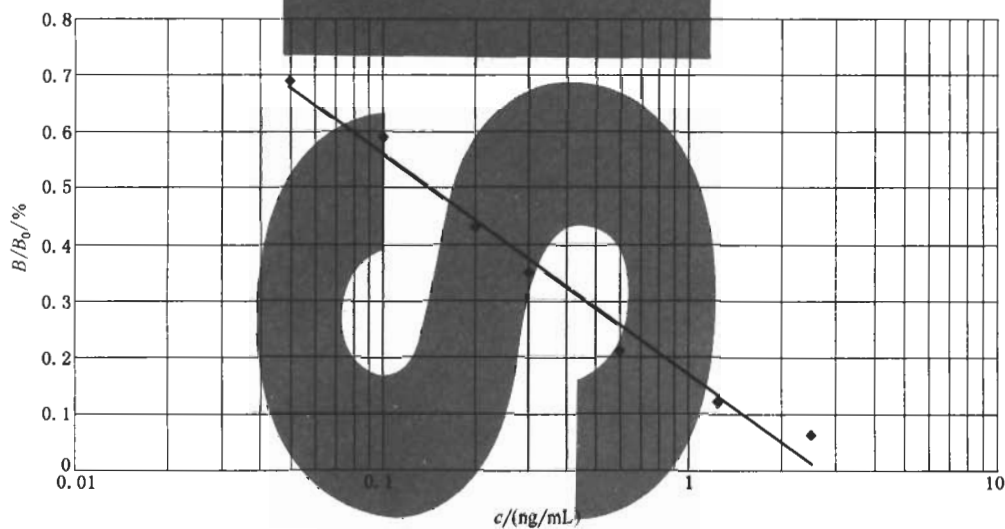
酚噻嗪检测试剂盒(杭州迪恩科技有限公司产品)¹⁾

A.1 试剂盒组成

- A.1.1 预包装抗体的 96 孔板:12 条×8 孔。
 A.1.2 氯丙嗪标准溶液:100 ng/mL 使用前以样品稀释缓冲液稀释到 0.05、0.1、0.2、0.3、0.6、1.25 和 2.5 ng/mL。
 A.1.3 样品稀释缓冲液的浓缩液:可用水 10 倍稀释后使用。
 A.1.4 酶标物冻干粉:根据试剂盒中说明,可用酶标物稀释液配制成酶标记物溶液。
 A.1.5 酶标物稀释液。
 A.1.6 显色剂。
 A.1.7 洗涤浓缩液:可用水 10 倍稀释后使用。
 A.1.8 反应终止液:试剂盒应在 4℃~8℃ 避光条件下保存。

A.2 标准校正曲线

标准校正曲线见图 A.1。



$$y = -0.1694 \ln(x) + 0.1687$$

$$R^2 = 0.9808$$

图 A.1 标准校正曲线

1) 给出该信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对某一产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,需经实验评估后使用这些等效产品。