

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4537.2—2016
代替 SN/T 2058—2008

商品化试剂盒检测方法 氯霉素 方法二

Commercial kit method—
Chloramphenicol—Test method II

2016-12-12 发布

2017-07-01 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

SN/T 4537《商品化试剂盒检测方法 氯霉素》共分为 3 部分：

——SN/T 4537.1:方法一；

——SN/T 4537.2:方法二；

——SN/T 4537.3:方法三。

本部分为 SN/T 4537 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替了 SN/T 2058—2008《进出口蜂王浆中氯霉素残留量的测定方法 酶联免疫法》，与 SN/T 2058—2008 相比，主要技术变化如下：

——部分名称由《进出口蜂王浆中氯霉素残留量的测定方法 酶联免疫法》改为《商品化试剂盒检测方法 氯霉素 方法二》。

——附录中增加了试剂盒的评价结果。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、荷兰 EURO-PROXIMA 公司。

本部分主要起草人：张晓峰、吴姗、邵宏宏、帅江冰、李可。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——SN/T 2058—2008。

商品化试剂盒检测方法

氯霉素

方法二

1 范围

SN/T 4537 的本部分规定了蜂王浆及冻干粉中氯霉素残留量的酶联免疫测定方法。
本部分适用于蜂王浆及冻干粉中氯霉素残留量的筛选测定。

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

SN/T 2775 商品化食品检测试剂盒评价方法

3 方法提要

本标准以三氯乙酸来沉淀蜂王浆的蛋白和提取蜂王浆中氯霉素,然后以固相萃取柱净化。微孔板中包被有绵羊抗兔 IgG 抗体,加入特异性抗体(兔抗氯霉素抗体)、酶标记氯霉素、氯霉素标准品或样品提取液后,特异性抗体与包被的绵羊抗兔 IgG 抗体结合,同时游离氯霉素和酶标记氯霉素竞争性的与特异性抗体结合。通过洗涤除去未结合的氯霉素和酶标记氯霉素,然后加入底物显色,用酶标仪测定吸光度,根据吸光度值得出试样中氯霉素的含量。

4 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。

4.1 氯霉素检测试剂盒。

本试剂盒按照 SN/T 2775 由国家认监委商品化食品检测试剂盒评价专家委员会评价。具体评价参见附录 A。试剂盒组成如下:

- 预包被抗体的 96 孔板:12 条×8 孔。
- 氯霉素标准溶液:0.025 ng/mL、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、2 ng/mL 和 100 ng/mL。
- 重组/零标准缓冲液。
- 氯霉素酶标记物冻干粉:根据氯霉素试剂盒中说明,可用重组/零标准缓冲液配制成氯霉素酶标记物溶液。
- 抗氯霉素抗体冻干粉:根据氯霉素试剂盒中说明,可用重组/零标准缓冲液配制成抗氯霉素抗体溶液。
- 底物 TMB 溶液。

- g) 稀释缓冲液:可用水4倍稀释后使用。
- h) 洗涤浓缩液:可用水10倍稀释后使用。
- i) 反应终止液:试剂盒应在4℃~8℃避光条件下保存,溶解后的酶标记物和抗体溶液需-15℃条件冻存。

4.2 三氯乙酸。

4.3 甲醇。

4.4 异辛烷。

4.5 三氯甲烷。

4.6 5%三氯乙酸:5.0 g三氯乙酸(4.2)以水溶解并定容至100 mL。

4.7 30%甲醇:30.0 mL甲醇(4.3)以水定容至100 mL。

4.8 异辛烷-三氯甲烷混合液:异辛烷、三氯甲烷以2:3(体积比)的比例混合。

4.9 HLB固相萃取柱:Oasis(或相当产品),3 mL(60 mg)。

4.10 氯霉素标准品:纯度≥98%。

4.11 氯霉素标准品溶液的配制:称取0.01 g氯霉素标准品,以甲醇定容至100 mL,配制成100 μg/mL的工作液,于4℃~8℃条件下保存。

4.12 空白样品:选取已确切知道不含有氯霉素滴蜂王浆样品,作为空白样。用于随样测试的加标监控实验。

5 仪器

5.1 酶标仪。

5.2 8道移液器:10 μL~100 μL。

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

5.4 混合振荡器。

5.5 高速低温离心机(6 000 r/min以上)。

5.6 固相萃取装置。

5.7 氮吹仪。

5.8 具塞试管:50 mL。

5.9 电子天平:0.01 g~100 g。

6 试样的制备和保存

6.1 试样的制备

原始样品总量不得少于200 g,蜂王浆充分搅拌均匀后,将样品分成两等份;冻干粉采用四分法,将样品分成两等份。分好的样品装入洁净容器,加封并做标识。

6.2 试样的保存

试样放置-20℃~-18℃条件下保存。

7 分析步骤¹⁾

7.1 提取

称取 2.0 g 蜂王浆样品,置于 50 mL 具塞试管中,加入 8 mL 5%三氯乙酸(4.6),充分混匀,6 000 r/min 离心 10 min,取上层备用。HLB 固相萃取柱(4.9)先依次用 1 mL 甲醇(4.3)和 1 mL 水活化,取 2.5 mL 上层液上柱,依次以 3 mL 水,1 mL 30%甲醇(4.7)洗柱,去除残留的液体,再用 2 mL 甲醇(4.3)洗脱,将洗脱液收集于一干净试管,氮气吹干,以 0.5 mL 样品稀释缓冲液(试剂盒提供)溶解残留物,最后加入 0.5 mL 异辛烷-三氯甲烷混合液(4.8)萃取,3 000 r/min 离心 10 min,取上层水相进行分析供 ELISA 检测用,最后稀释倍数为 1。王浆冻干粉则用水以 1:2 比例稀释,充分浸泡(2 h 以上)后,称取 2.0 g 按照上述王浆前处理方法进行提取,最后稀释倍数为 3。

7.2 测定条件

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 次以上,每次加入洗涤液量为 250 μ L。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 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C)进行,氯霉素试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温(20 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C)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,记录标准品及样品等在微孔架上的位置。

7.3.2 吸取 100 μ L 零标准缓冲液于孔 A1、A2;并吸取 50 μ L 零标准缓冲液于孔 B1、B2;分别吸取 50 μ L 氯霉素标准溶液(浓度分别为:0.025 ng/mL、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、2.0 ng/mL)于孔 C1、C2~H1、H2;吸取 50 μ L 样品溶液于其余微孔中。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头。

7.3.3 分别吸取 25 μ L 氯霉素酶标记物溶液于除 A1、A2 外的每一个微孔。

7.3.4 分别吸取 25 μ L 氯霉素抗体溶液于除 A1、A2 外的每一个微孔。

7.3.5 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。

7.3.6 将酶标板置于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。

7.3.7 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。要注意不能使微孔干燥。

7.3.8 迅速加入 100 μ L 底物溶液于每一个微孔底部,然后持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后,于 20 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。

7.3.9 迅速加入 100 μ L 反应终止液于每一个微孔,然后持微孔板在台面上以圆周运动方式混匀后,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。

SN/T 4537.2—2016

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两孔平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

7.6 监控实验

每次测定均应做一个用空白样品添加氯霉素标准(4.11)的监控样品测定,以确定实验过程的准确性。

8 结果计算

从含有标准品和样品的板孔的吸光度(OD)值中,减去空白孔 A_1 、 A_2 的平均 OD 值。标准品和样品的 OD 平均值除以零标准(B_1 、 B_2)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),其他 OD 值为最大吸光度值的百分数。

以吸光度百分比值(B/B_0)为纵坐标(%),氯霉素标准溶液浓度(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试样中相应的氯霉素浓度后,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 ——样品中氯霉素的残留量,单位为微克每千克($\mu g/kg$);

c ——从标准工作曲线上得到的样品中氯霉素浓度,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。

9 确证试验

如被测样品为阳性结果时,应用其他方法进行确证。

10 方法性能指标

10.1 检出限和定量限

检出限 $0.1 \mu g/kg$,定量限 $0.3 \mu g/kg$ 。

10.2 交叉反应率

氯霉素 100%;氯霉素-葡萄糖苷酸 65%;氯霉素-碱 $<0.1\%$;甲砒氯霉素 $<0.1\%$;氟苯尼考 $<0.1\%$ 。

附 录 A
(资料性附录)
氯霉素试剂盒评价结果²⁾

- A.1 线性:氯霉素的线性范围均为 0.25 ng/mL~2 ng/mL,相关系数 $R \geq 0.98$ 。
A.2 交叉反应率:氯霉素 100%;甲砷氯霉素 $<0.1\%$;氟苯尼考 $<0.1\%$ 。
A.3 检出限和定量限:检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 。

2) 本评价结果仅适用于荷兰 EURO-PROXIMA 公司的氯霉素试剂盒。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
商品化试剂盒检测方法
氯霉素
方法二

SN/T 4537.2—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2018年3月第一版 2018年3月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32428 定价 16.00 元



SN/T 4537.2-2016