

猪肉中氯丙嗪残留量的快速检测 时间分辨荧光免疫分析法

Rapid determination of chlorpromazine residues in porcine muscle

Time-resolved fluorescence immunoassay

2021-02-03 发布

2021-02-03 实施

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 和 GB/T 20001.4 给出的规则起草。

本标准由南京农业大学提出。

本标准由中国畜产品加工研究会归口。

本标准主要起草单位：南京农业大学、上海雄图生物科技有限公司、无锡雄图食品安全检测有限公司。

本标准主要起草人：王玮、汪劲能、王艳、沈娟、谭祈峻、蒋燊。

本标准为首次发布。

使用本标准应征得发布单位同意。

猪肉中氯丙嗪残留量的快速检测

时间分辨荧光免疫分析法

1 范围

本标准规定了时间分辨荧光免疫分析法快速检测猪肉中氯丙嗪残留量的方法。
本标准适用于猪肉中氯丙嗪残留量的现场快速筛查测定。

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

GB/T 20763 猪肾和肌肉组织中乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟哌啶醇、丙酰二甲氨基丙吩噻嗪、甲苯噻嗪、阿扎哌隆、阿扎哌醇、咪唑心安残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

NY/T 1897 动物及动物产品兽药残留监控抽样规范

3 原理

试样中氯丙嗪与镧离子荧光微球标记的氯丙嗪抗体结合后，抑制了层析过程中抗体与硝酸纤维膜检测线上氯丙嗪-牛血清白蛋白（BSA）偶联物的免疫反应，使检测线上荧光微球发出的时间分辨荧光强度降低，通过检测时间分辨荧光强度变化进行定量测定。

4 试剂和材料

以下所有试剂，均为分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.1 乙腈（ CH_3CN ）。

4.2 甲醇（ CH_3OH ）。

4.3 氢氧化钠（ NaOH ）。

4.4 正己烷（ C_6H_{14} ）。

4.5 十二水合磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.6 二水合磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.7 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 4.00 g 氢氧化钠，用水溶解并定容至 100 mL。

4.8 磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH 7.2）：称取 12.90 g 十二水合磷酸氢二钠和 2.18 g 二水合磷酸二氢钠，用水溶解并定容至 1 L。

4.9 氯丙嗪时间分辨荧光免疫定量试剂盒，2℃~8℃保存。

4.9.1 氯丙嗪标准物质：纯度≥98%。

4.9.2 氯丙嗪标准储备溶液：准确称取适量的氯丙嗪标准物质，用甲醇配成0.1 mg/mL的标准储备溶液。

4.9.3 氯丙嗪标准工作溶液：用0.05 mol/L磷酸盐缓冲液将氯丙嗪标准储备溶液配制成浓度分别为0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL的氯丙嗪标准工作溶液。

4.9.4 氯丙嗪时间分辨荧光免疫定量检测卡：固定有氯丙嗪-BSA偶联物，用于样品中氯丙嗪与镧离子荧光微球标记抗体预反应后再与氯丙嗪-BSA偶联物反应的载体。

5 仪器和设备

5.1 时间分辨荧光检测仪（配LED激发光源）。

5.2 恒温孵育器：室温~100℃，控温精度±0.1℃。

5.3 电子天平：感量0.01 g。

5.4 离心机：转速不低于4000 r/min。

5.5 组织捣碎机。

5.6 氮气吹干装置。

5.7 移液器：单道200 μL，1000 μL。

5.8 漩涡混合器。

5.9 离心管：10 mL，50 mL。

6 试样制备

取新鲜或解冻的猪肉样品约500 g，剔除筋膜，用组织捣碎机充分捣碎均匀，装入洁净容器中，密封，并加以标识，于-18℃以下冷冻存放。

7 样本提取

7.1 称取5 g试样（精确到0.01 g）于50 mL离心管中，加入乙腈10 mL，振荡混合5 min，4000 r/min离心5 min。

7.2 移取上清液（7.1）8 mL于50 mL离心管中，加1 mol/L氢氧化钠溶液2 mL，再加正己烷5 mL，振荡混合2 min，4000 r/min离心2 min。

7.3 移取上清液（7.2）3 mL于10 mL试管中，于60℃水浴下氮气吹干，加0.05 mol/L磷酸盐缓冲液0.5 mL，充分混合，取100 μL用于分析。

8 测定步骤

- 8.1 氯丙嗪时间分辨荧光免疫定量试剂盒和所需试剂的温度均应回升至常温后方可使用，注意每种液体使用前均需摇匀。
- 8.2 打开时间分辨荧光检测仪和恒温孵育器电源开关，开机预热 10 min。
- 8.3 将氯丙嗪时间分辨荧光免疫定量检测卡水平放置于恒温孵育器加热板上，加系列标准工作溶液（4.9.3）或试样液（7.3）100 μL 到对应的检测卡加样孔中，盖上恒温孵育器盖后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温保持 6 min。
- 8.4 恒温结束后，取出氯丙嗪时间分辨荧光免疫定量检测卡，在激发波长 365 nm，检测波长 610 nm 条件下上机检测。

9 平行试验

按以上步骤，对同一标准溶液、同一样品溶液均进行平行试验测定。

10 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤进行。

11 监控试验

每次测定均应做一个添加氯丙嗪标准的空白样品。

12 结果计算

将6个浓度的氯丙嗪的标准工作溶液（0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL）和待测溶液按测定步骤（8）测定相应的时间分辨荧光强度值。根据检测线T信号值与质控线C信号值的比值（T/C）和标准工作溶液的自然对数值（ $\ln c$ ）建立标准曲线。该定标模型在0.1 ng/mL~10 ng/mL 范围内是线性的。在标准曲线中获得待测溶液中氯丙嗪含量。

试样中氯丙嗪含量 X ，以质量分数（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）表示，按式（1）计算。

$$X = \frac{\rho \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——从标准曲线上查得的待测溶液中氯丙嗪含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

n ——试样稀释倍数；

m ——试样的质量，单位为克（g）。

计算结果保留至小数点后两位。

13 确证试验

如被测样品中氯丙嗪残留量的值大于检出限时，应用GB/T 20763中液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）方法进行确证。

14 检测方法灵敏度、准确度、精密度

14.1 灵敏度

本方法在猪肉样品中的检出限为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

14.2 准确度

本方法在0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平的回收率为80%~120%。

14.3 精密度

本方法的批内变异系数和批间变异系数均小于10%。