ICS 67.180.10
X 31

CBPA

中 国 蜂 产 品 协 会 团 体 标 准

T/CBPA XXXX—2018

蜂胶中氯霉素残留量快速检测方法
——胶体金免疫层析法

Fast detection of chloramphenicol residue in propolis- Colloidal gold immunochromatographic method

(征求意见稿)

2018-XX-XX 发布　　2018-XX-XX 实施

中国蜂产品协会发布

前　言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国蜂产品协会提出并归口。

本标准起草单位：杭州碧于天保健品有限公司、杭州天厨保健品有限公司、南京老山药业股份有限公司、中国蜂产品协会蜂胶专业委员会

本标准主要起草人：×××、×××、×××、×××、×××

本标准为首次发布。

蜂胶中氯霉素残留量快速检测方法——胶体金免疫层析法

1 范围

本标准规定了蜂胶中氯霉素（Chloramphenicol，CAP）残留的检测——胶体金免疫层析法的原理、试剂和材料、仪器和设备、测定步骤、结果判断及表述、结果确证的方法。

本标准适用于蜂胶原料、蜂胶乙醇提取物中氯霉素残留的快速筛查检测。

本方法的检出限：蜂胶原料为0.1 μg/kg，蜂胶乙醇提取物为0.2 μg/kg。

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 18932.19 蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法 液相色谱-串联质谱法

3 原理

本法为竞争抑制法，将氯金酸用还原法制成一定直径的金溶胶颗粒，标记抗体。样品中残留的氯霉素，经蜂胶溶解，沉淀、过滤、乙酸乙酯提取，吹干，盐析净化，加氯霉素复溶液反复冲洗残渣，将样液滴加在氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板的加样孔中，利用微孔膜的毛细管作用缓慢向另一端渗移，在移动过程中，样品溶液中的氯霉素与胶体金标记的特异性单克隆抗体结合，从而抑制了抗体和检测线上特异性结合抗原的结合，未被氯霉素结合的抗体与检测线上的抗原反应，并通过胶体金的颜色而显示红色条带。目测比较板上控制线（C 线）和检测线（T 线）上红色条带的有无及颜色的相对深浅进行判定。当试样中的氯霉素含量达到或超过本方法检出限时，检测线较控制线显色淡甚至无显色，判定为阳性；反之，当试样中的氯霉素含量在本方法检出限以下或无残留时，检测线与控制线显色一致或偏深，判定为阴性。

4 试剂和材料

4.1. 娃哈哈纯净水或相当者

4.2. 蜂胶溶解液 A：取分析纯氢氧化钠 5g 加水（4.1）90g 搅拌溶解混合，冷却后定容到 100mL。

4.3. 蜂胶沉淀剂 B：取分析纯高氯酸 10mL 加水（4.1）40mL 混合溶解。

4.4. 碱化剂 C：取分析纯氢氧化钠 40g 加水（4.1）50g 于玻璃烧杯中搅拌溶解混合，冷却后定容到 100mL。

4.5. 氯化钠溶解液：称取 5.85g 氯化钠加 5ml 乙醇，用水定容至 100mL。

4.6. 乙酸乙酯，AR

4.7. 正己烷，AR

4.8. 氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板

4.9. 复溶液，氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板中配备

4.10. 定性滤纸，11 cm

4.11. 塑料离心管，50 mL，最小刻度 0.5 mL；15 mL，最小刻度 0.5 mL

4.12. 一次性塑料滴管，1mL，3mL

4.13.蒸发皿，90 mm

5 仪器和设备

5.1.电子天平：感量 0.1 g
5.2.榨汁机
5.3.电吹风机

6 测定步骤

6.1.试样制备

取蜂胶原料适量于榨汁机于塑料杯中（榨汁机配件，用于小量粉碎），盖上底盖并拧紧，粉碎 30 秒取下塑料杯混合一次继续粉碎 30 秒，如此 3～5 次，取砂粒状较细的物料用于检测。胶含量大于 30%时，需要冷藏 2 小时再进行粉碎。

6.2.样品处理

向 50 mL 塑料离心管中加入 8 mL 蜂胶溶解液 A（4.2）和 8 mL 水（4.1），混合均匀，称入蜂胶原料 4g（蜂胶乙醇提取物称取 3g），拧紧瓶盖，在掌心上轻轻拍打，使用蜂胶溶解 5 min，加入 4 mL 蜂胶沉淀剂 B（4.3），用手不停用力震荡 1min，使蜂胶分散。将样液倒入滤纸中过滤于 50 mL 带刻度的塑料离心管中，取全部滤液。用 1 mL 一次性滴管向滤液加入 0.25 mL 碱化剂 C（4.4），混合均匀，加入 16 mL 乙酸乙酯，充分振荡 1 min，静置 2～5min 使乙酸乙酯分层，用 3 mL 一次性滴管吸出上层液体于 90 cm 蒸发皿中，用电吹风机吹干，加入 4 mL 氯化钠溶解液(4.5)，用 3 mL 一次性滴管反复吹吸溶解液至残留物全部溶解，转入 15mL 塑料离心管中，加 4 mL 乙酸乙酯，充分振荡 1 min，静置 2～5min 使乙酸乙酯分层并澄清，如果没有分层完全，用手指轻拍管壁可促进分层，用 3 mL 一次性滴管吸出上层液体于 90 mm 蒸发皿中，用电吹风机吹干，用 1 mL 一次性滴管加入 5 滴复溶液（4.9），并用 1 mL 一次性滴管反复吹吸蒸发皿上的残渣，直到全部溶解，加入 1mL 正己烷(4.7)，反复吹吸样液和正己烷，静置分层 2min。

6.3.测定

6.3.1取出氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板，恢复至室温，置于水平台面上。吸取6.2中蒸发皿中全部样液，加至氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板的加样孔中，避免加入正己烷，在10 min后目测读取结果。
6.3.2空白对照：每批样品需做一孔空白对照，以复溶液（4.9）代替试样提取液，按6.3.1进行。
6.3.3平行测定：每个样品的平行样数量≥2，各自按6.2和6.3.1进行。

注：不同试剂板制造商的产品组成和操作会有细微的差别，应严格按说明书要求规范操作。

7 结果判断及表述

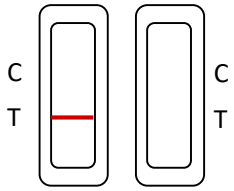
7.1.试剂板有效性判定

7.1.1失效检测试剂板：空白对照控制线（C线）不出现红色条带（如图1），则检测试剂板失效，不能进行检测。
7.1.2 有效检测试剂板：空白对照控制线（C线）和检测线（T线）均出现红色条带，而且T线比C线颜色深或一样深（如图2），则检测试剂板有效，可进行检测。

7.2. 结果及表述

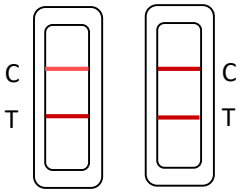
7.2.1 阴性：试样检测线（T 线）出现红色条带，且颜色比控制线（C 线）深或一样深（如图 2），结果为阴性（蜂胶原料氯霉素残留量<0.1 μg/kg，蜂胶乙醇提取物<0.2 μg/kg）。

7.2.2 阳性：试样检测线（T 线）出现红色条带，但颜色比控制线（C 线）浅或检测线（T 线）未出现红色条带（如图 3），结果为阳性（蜂胶原料氯霉素残留量≥0.1 μg/kg，蜂胶乙醇提取物≥0.2 μg/kg）。



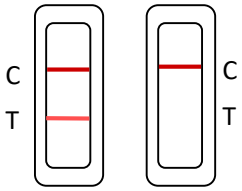
无效

图1



阴性

图2



阳性

图3

8 结果确证

本方法检测结果为阳性的样品，需将阳性样品用本方法6.2条款进行样品处理，所得残渣用1mL乙腈+水（20+80）超声溶解，过0.22μm滤膜后用GB/T 18932.19规定的液相色谱质谱条件上机检测确证。