



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112444622 A

(43)申请公布日 2021.03.05

(21)申请号 201910795537.4

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2019.08.27

B03C 1/32(2006.01)

B03C 1/01(2006.01)

(71)申请人 中国水产科学研究院

地址 100141 北京市丰台区永定路南青塔村150号

(72)发明人 李晋成 刘欢 韩刚

(74)专利代理机构 北京元周律知识产权代理有限公司 11540

代理人 张莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测孔雀石绿的方法、一种基于磁分离前处理的试剂盒及其应用

(57)摘要

本申请公开了一种检测孔雀石绿的方法,包括:a)提供动物肌肉组织匀浆;b)向动物肌肉组织匀浆中加入试剂1、试剂2和磁性材料,混合后通过施加外界磁场实现动物组织匀浆溶液的固液分离,得到上清液;c)对所述上清液中孔雀石绿进行检测。本申请还公开了一种包括上述试剂1、试剂2和磁性材料的试剂盒以及试剂盒在检测孔雀石绿的方法中的应用。本申请提供了一种混合溶液提取,磁性分离的快速相分离、十八烷基键合硅胶颗粒净化、采用肉眼直接测定动物肌肉组织中孔雀石绿的方法,该方法的前处理简便、高效、节省溶剂,灵敏度高和成本低。

1. 一种检测孔雀石绿的方法,其特征在于,包括:
 - a) 提供动物肌肉组织匀浆;
 - b) 向所述动物肌肉组织匀浆中加入试剂1、试剂2和磁性材料,混合后通过施加外界磁场实现动物组织匀浆溶液的固液分离,得到上清液;
 - c) 对所述上清液中孔雀石绿进行检测。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述试剂1为缓冲液。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述试剂2为乙腈;
优选地,按照重量份数计,所述磁性材料包括3-5份的CaCl₂、3-5份的中性氧化铝和1-2份的Fe₃O₄;
优选地,所述外界磁场包括由铁磁体产生的磁场或者电流产生的磁场;
优选地,在所述步骤c)中,还包括向所述上清液中加入二氯二腈基苯醌溶液;
优选地,在所述步骤c)中,还包括向所述上清液中加入十八烷基键合硅胶颗粒;
优选地,在所述步骤c)中,还包括浓缩所述上清液浓缩以去除溶剂,加入复溶液溶解浓缩物,然后用胶体金免疫层析试纸条进行检测。
4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述缓冲液的配制方法包括:
将对甲苯磺酸、盐酸羟胺和乙酸铵溶解于水中,用氢氧化钠溶液调节pH至4-5,得到所述缓冲液,其中,在所述缓冲液中,所述对甲苯磺酸的浓度为5-15mg/ml,所述盐酸羟胺的浓度为0.1-0.3mg/ml,所述乙酸铵的浓度为0.2-0.6mg/ml,所述碱性溶液的浓度为3-5mol/L。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述复溶液的配制方法包括:将氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠、吐温-20溶解于水中,用酸性溶液调节pH至7-8得到所述复溶液,其中,在所述复溶液中,所述氯化钠的浓度为9-10g/L,所述氯化钾的浓度为0.2-0.3g/L,所述磷酸二氢钾的浓度为0.2-0.3g/L,所述十二水合磷酸氢二钠的浓度为2-3g/L,所述吐温-20的浓度为0.3-0.7ml/L。
6. 一种试剂盒,其特征在于,包括:权利要求1-5中任一项所述的试剂1、试剂2和磁性材料。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,还包括二氯二腈基苯醌溶液。
8. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,还包括十八烷基键合硅胶颗粒。
9. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,还包括权利要求9或10所述的复溶液以及胶体金免疫层析试纸条。
10. 根据权利要求6-9中任一项所述的试剂盒在检测孔雀石绿的方法中的应用。

一种检测孔雀石绿的方法、一种基于磁分离前处理的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及一种检测孔雀石绿的方法、一种基于磁分离前处理的试剂盒及其应用,属于分析检测领域。

背景技术

[0002] 随着人民的生活水平的不断提高,动物源性食品的消费量越来越大。为了满足不断增长的消费需求,提高动物的养殖产出,人们在其养殖过程中加入很多禁限用药物,以保证其存活率,如孔雀石绿。养殖过程中所涉及的药物会通过食物链在生物体内累积浓缩并最终传递到人体,对人的食用安全带来了潜在危害。孔雀石绿是一种化工产品,不仅具有高毒、高残留特点,还可以致畸、致癌和致突变。自2002年起,我国就将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中,在动物性食品中不得检出,在我国农业行业标准《无公害食品渔用药物使用准则》(NY 5071-2002)中将孔雀石绿列为水产养殖禁用药物。但是由于孔雀石绿具有价格低、效果好,其在水产等各种动物的养殖环节中的应用仍然是屡禁不止。虽然动物体内孔雀石绿的分析方法有高效液相色谱(HPLC)、高效液相色谱三重四级杆串联质谱(HPLC-MS/MS)、酶联免疫检测方法、胶体金免疫层析快速检测方法等检测方法,但由于动物组织样品的脂肪和蛋白质等干扰物质含量高,导致样品制备方法复杂:需采用溶剂萃取、离心分离、固相萃取净化等多种前处理技术进行纯化、富集。因此,亟需要一种简单、高效且成本低廉的孔雀石绿的检测方法。

发明内容

[0003] 根据本申请的第一个方面,提供了一种检测孔雀石绿的方法,该方法克服了现有的方法前处理过程步骤多、耗时长缺点,基于溶剂处理能够使动物肌肉组织匀浆中蛋白质变性成团并将磁性材料包裹在内,在外界磁场作用下可以实现固液分离的原理,提供了一种混合溶液提取,磁性分离的快速相分离、采用肉眼直接测定动物肌肉组织中孔雀石绿的方法,该方法的前处理简便、高效、节省溶剂、灵敏度高和成本低。

[0004] 所述检测孔雀石绿的方法,其特征在于,包括:a)提供动物肌肉组织匀浆;b)向所述动物肌肉组织匀浆中加入试剂1、试剂2和磁性材料,混合后通过施加外界磁场实现动物组织匀浆溶液的固液分离,得到上清液;c)对所述上清液中孔雀石绿进行检测。

[0005] 作为一种优选的实施方式,所述试剂1为缓冲液。

[0006] 优选地,所述试剂2为乙腈。

[0007] 优选地,所述缓冲液的配制方法包括:将对甲苯磺酸、盐酸羟胺和乙酸铵溶解于水中,用碱性溶液调节pH至4-5,得到所述缓冲液,其中,在所述缓冲液中,所述对甲苯磺酸的浓度为5-15mg/ml,所述盐酸羟胺的浓度为0.1-0.3mg/ml,所述乙酸铵盐的浓度为0.2-0.6mg/ml,所述碱性溶液的浓度为3-5mol/L。

[0008] 具体地,所述缓冲液的配制方法包括:将对甲苯磺酸、盐酸羟胺和乙酸铵溶解于水

中,用4mol/L氢氧化钠溶液调节pH至4.5,得到所述缓冲液,其中,在所述缓冲液中,所述对甲苯磺酸溶液的浓度为10.32mg/ml,所述盐酸羟胺的浓度为0.2mg/ml,所述乙酸钠的浓度为0.4mg/ml。

[0009] 本申请中,“磁性材料”,是指可用于待检肌肉组织匀浆中提取目标物过程中,在使用包括乙腈和缓冲液的溶剂时,能将待检肌肉组织匀浆中蛋白质变性成团,磁性材料包裹在蛋白质变性物质团内形成磁性待检样品固体部分,在外界磁场作用下实现固液分离的磁性物质。在本申请中,所述磁性材料包括但不限于按照重量份数计的3-5份CaCl₂,3-5份中性氧化铝,1-2份Fe₃O₄。

[0010] 具体地,所述磁性材料包括按照重量份数计的4份CaCl₂,4份中性氧化铝,1份Fe₃O₄。其中,中性氧化铝可以通过吸附去除匀浆中的脂肪。

[0011] 优选地,所述外界磁场包括但不限于由铁磁体产生的磁场或者电流产生的磁场。

[0012] 作为一种优选的实施方式,在所述步骤c)中,还包括向所述上清液中加入二氯二腈基苯醌溶液。当孔雀石绿进入生物体内,会产生具有更强危害的隐色孔雀石绿,在本申请中,通过添加二氯二腈基苯醌溶液,可以将上清液中的隐色孔雀石绿氧化成孔雀石绿,从而提高检测准确度。

[0013] 作为一种优选的实施方式,在所述步骤c)中,还包括向所述上清液中加入十八烷基键合硅胶颗粒,以进一步通过吸附去除上清液中的蛋白质、脂肪和其他杂质。

[0014] 作为一种优选的实施方式,在所述步骤c)中,还包括浓缩所述上清液浓缩以去除溶剂,加入复溶液溶解浓缩物,然后用胶体金免疫层析试纸条进行定性分析。

[0015] 优选地,所述复溶液的配制方法包括:将氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠、吐温-20溶解于水中,用酸性溶液调节pH至7-8得到所述复溶液,其中,在所述复溶液中,所述氯化钠的浓度为9-10g/L,所述氯化钾的浓度为0.2-0.3g/L,所述磷酸二氢钾的浓度为0.2-0.3g/L,所述十二水合磷酸氢二钠的浓度为2-3g/L,所述吐温-20的浓度为0.3-0.7ml/L。

[0016] 具体地,将氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠、吐温-20溶解于水中,用酸性溶液调节pH至7.4得到所述复溶液,其中,在所述复溶液中,所述氯化钠的浓度为8g/L,所述氯化钾的浓度为0.2g/L,所述磷酸二氢钾的浓度为0.27g/L,所述十二水合磷酸氢二钠的浓度为2.87g/L,所述吐温-20的浓度为0.5ml/L。

[0017] 根据本申请的第二个方面,提供了一种试剂盒,其特征在于,包括:根据本申请的第一个方面提供的试剂1、试剂2和磁性材料。

[0018] 作为一种优选的实施方式,所述试剂盒还包括二氯二腈基苯醌溶液。

[0019] 作为一种优选的实施方式,所述试剂盒还包括十八烷基键合硅胶颗粒。

[0020] 作为一种优选的实施方式,所述试剂盒还包括根据本申请的第一个方面所述的复溶液以及胶体金免疫层析试纸条。

[0021] 所述胶体金免疫层析试纸条上具有硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜包被有检测线和质控线,所述检测线含有孔雀石绿抗原,所述质控线含有能够与孔雀石绿抗原特异性结合的抗体;

[0022] 若检测线显色比质控线深或一样深,则为阴性,表示基质中孔雀石绿的浓度低于检测限;

[0023] 若检测线显色比质控线浅,或检测限呈绿色,则为阳性,表示基质中孔雀石绿的浓度高于检测限;

[0024] 若质控线未显色,则判断为操作不当或所述胶体金免疫层析试纸条失效。根据本申请的第三个方面,还提供了本申请的第二个方面所述的试剂盒在检测孔雀石绿的方法中的应用。

[0025] 本申请能产生的有益效果包括:

[0026] 1) 本申请基于溶剂处理(诸如乙腈和乙酸盐缓冲液)能够使肌肉组织匀浆基质中蛋白质变性成团并将四氧化三铁磁性颗粒包裹在内,在外界磁场作用下可以实现固液分离的原理,提供了一种混合溶液提取,磁性分离的快速相分离、十八烷基键合硅胶颗粒净化、采用肉眼直接测定动物肌肉组织中孔雀石绿的方法,该方法的前处理简便、高效、节省溶剂,灵敏度高和成本低。

[0027] 2) 本申请提供了一种基于磁分离的动物肌肉组织中孔雀石绿样品前处理试剂盒,样品前处理所用试剂价格便宜、容易获得,无需用固相萃取小柱进行样品净化,成本低廉;该试剂盒将所需试剂整合于一个前处理试剂盒内便于携带和储存。

附图说明

[0028] 图1为本申请一种实施方式中的阳性鱼糜测定结果。

具体实施方式

[0029] 下面结合实施例详述本申请,但本申请并不局限于这些实施例。

[0030] 如无特别说明,本申请的实施例中的原料均通过商业途径购买,使用仪器检测采用厂家推荐的条件和参数。

[0031] 实施例中,胶体金免疫层析试纸条为基于孔雀石绿单克隆抗体制备的试纸条,购于杭州南开日新生物技术有限公司。

[0032] 实施例1

[0033] (1)、试剂配制:

[0034] 缓冲液:称取对甲苯磺酸5.16克,盐酸羟胺0.1克,乙酸铵0.2克,加水溶解,定容至500mL,用4mol/L氢氧化钠调节pH至4.5。

[0035] Fe_3O_4 磁性材料:1g CaCl_2 ,1g中性氧化铝,250mg Fe_3O_4 。

[0036] 复溶液:称取8.00g氯化钠,0.20g氯化钾,0.27g磷酸二氢钾及2.87g十二水合磷酸氢二钠溶解于900mL水中,加入0.5mL吐温-20,用水稀释至1L,混匀,用盐酸调节pH为7.4。

[0037] (2)、制备:动物解剖、肌肉组织匀浆,-20℃冰箱中低温保存;

[0038] (3)、提取:称取5克肌肉糜样品于具盖离心试管中,依次加入1ml缓冲液和5ml乙腈,充分浸润,振荡,加入2.25克 Fe_3O_4 磁性材料混合物,振荡混匀,在外界磁铁作用下快速相分离,将上清液过0.22 μm 有机针式滤膜,待净化;

[0039] (4)、净化:移取2.5mL样品提取液上清液于离心管中,100 μL 浓度为0.001mol/L的二氯二氰基苯醌溶液,震荡混匀后加入300mg十八烷基键合硅胶颗粒(C_{18} 颗粒),氮吹浓缩,加入0.2mL复溶液溶解残杂。

[0040] (5) 向放置有胶体金颗粒的金标微孔中滴加100 μL 上述复溶液,混匀后,滴加至胶

体金免疫层析试纸条进行肉眼直接检测。

[0041] 实施例2

[0042] 分别在空白鱼样品中添加孔雀石绿,得到浓度分别为1,2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的孔雀石绿标样,按照实施例1中所述方法提取、净化后检测,肉眼直接测定,重复6次,其结果如表1所示;其中,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的孔雀石绿标样的肉眼可视化测定结果如图1所示,与空白质控样品对比显示,孔雀石绿标样中T线颜色浅于空白质控样品T线颜色,结果呈阳性。

[0043] 表1

样品中孔雀石绿含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1号	2号	3号	4号	5号	6号
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+

[0045] +阳性

[0046] -阴性

[0047] 结果表明,所建立的方法可靠性很好,能够用于水产品中孔雀石绿快速检测。

[0048] 以上所述,仅是本申请的几个实施例,并非对本申请做任何形式的限制,虽然本申请以较佳实施例揭示如上,然而并非用以限制本申请,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本申请技术方案的范围,利用上述揭示的技术内容做出些许的变动或修饰均等同于等效实施案例,均属于技术方案范围内。

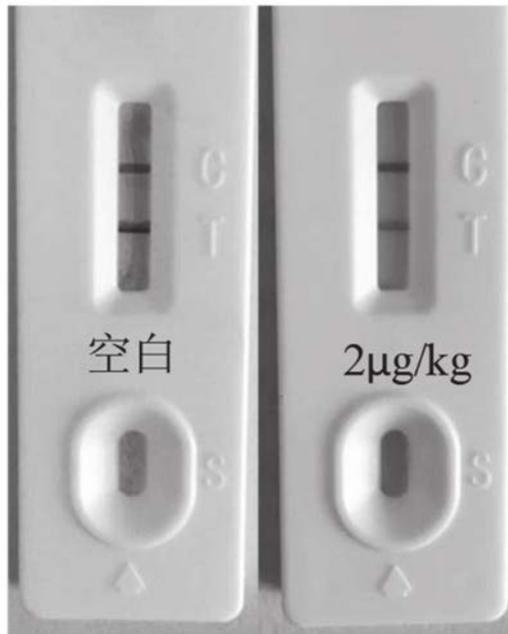


图1