



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202304

动物源性食品中红霉素、螺旋霉素、 泰乐菌素、替米考星的快速检测 胶体金免疫层析法

2023-06-13 发布

国家市场监督管理总局 发 布

动物源性食品中红霉素、螺旋霉素、 泰乐菌素、替米考星的快速检测 胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了动物源性食品中红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于牛奶、鸡蛋以及鸡肉、猪肉和牛肉等动物肌肉组织中红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星的快速定性检测。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。鸡蛋和动物肌肉组织试样中红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星经样品提取液提取,并经样品稀释液稀释后(牛奶试样直接用样品稀释液稀释),与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制抗体和试纸条中硝酸纤维素膜检测线(T线)上的抗原结合,从而导致试纸条检测线(T线)颜色变化。通过检测线(T线)与控制线(C线)颜色深浅比较,对试样中红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星进行定性判定。

3 试剂与材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的三级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 甲醇(CH_3OH)。
- 3.1.2 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 3.1.3 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。
- 3.1.4 氯化钾(KCl)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液:称取磷酸二氢钾(3.1.2)13.5 g,磷酸氢二钠(3.1.3)56.8 g,氯化钾(3.1.4) 10.0 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。
- 3.2.2 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(样品稀释液):准确量取 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(3.2.1)40 mL,用水定容至 1 000 mL。
- 3.2.3 样品提取液:准确量取甲醇(3.1.1)50 mL 和 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(3.2.2)50 mL,混匀。

3.3 参考物质

红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星参考物质的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 1,纯度 $\geq 98\%$ 。

注:或等同可溯源物质。

表 1 红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星参考物质的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、
相对分子质量

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
红霉素	Erythromycin	114-07-8	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	733.94
螺旋霉素	Spiramycin	8025-81-8	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	843.05
泰乐菌素	Tylosin	1401-69-0	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	916.10
替米考星	Tilmicosin	108050-54-0	$C_{46}H_{80}N_2O_{13}$	869.15

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液(1.0 mg/mL):精密称取红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星参考物质(3.3)各 50 mg (精确至 0.01 mg),分别用甲醇(3.1.1)溶解并定容至 50 mL 棕色容量瓶中,摇匀。红霉素、泰乐菌素、螺旋霉素、替米考星标准储备液于-20 ℃以下避光保存,有效期 3 个月。

3.4.2 标准中间液(100 μg/mL):准确量取红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星标准储备液(3.4.1)各 5.0 mL,分别置于 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容,摇匀。4 ℃以下避光保存,有效期 1 个月。

3.4.3 标准工作液(红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素分别为 10 μg/mL,替米考星为 1.0 μg/mL):准确量取红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素标准中间液(3.4.2)各 1 mL 和替米考星标准中间液(3.4.2)100 μL,分别置于 10 mL 棕色容量瓶中,用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(3.2.2)定容,摇匀。使用当天配制。

3.4.4 标准溶液为外部获取时,管理及使用应符合相关规定。

3.5 材料

3.5.1 红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔(含胶体金标记的特异性抗体)、胶体金检测卡配套的样品提取液和样品稀释液,按产品要求保存和使用。

3.5.2 替米考星胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔(含胶体金标记的特异性抗体)、胶体金检测卡配套的样品提取液和样品稀释液,按产品要求保存和使用。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.01 mg。

4.2 涡旋混合器。

4.3 移液器:量程为 10 μL、200 μL、1 mL 和 5 mL。

4.4 离心机:转速 $\geq 4\,000$ r/min。

4.5 组织匀浆机。

4.6 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度 10 ℃~40 ℃。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 牛奶

取均匀样品约 200 g 分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于 4 ℃ 保存,可保存 5 d~7 d。

6.1.2 鸡蛋

鸡蛋除去蛋壳,用组织匀浆机充分搅拌均匀,称取均匀样品约 200 g 分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于一20 ℃ 保存。

6.1.3 动物肌肉组织

取鸡、猪、牛的肌肉组织,称取约 200 g 具有代表性的样品,充分均质混匀,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于一20 ℃ 保存。

6.2 试样提取及稀释

6.2.1 试样提取

6.2.1.1 牛奶:无需提取,混匀后直接吸取牛奶试样备用。

6.2.1.2 鸡蛋和动物肌肉组织:准确称取 1 g±0.05 g 试样于 15 mL 离心管中,加入 2 mL 相应的样品提取液(3.2.3 或 3.5.1、3.5.2),涡旋振荡提取 3 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液即为试样提取液。

6.2.2 试样稀释

根据表 2,吸取相应体积的试样或试样提取液(6.2.1)于 1.5 mL 离心管中,加入相应体积的样品稀释液(3.2.2 或 3.5.1、3.5.2),涡旋混匀 30 s,制备成相应的试样待测液。

表 2 试样待测液的制备

试样	测试项目(红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素)		测试项目(替米考星)	
	试样或试样提取液 体积/ μL	样品稀释液 体积/ μL	试样或试样提取液 体积/ μL	样品稀释液 体积/ μL
牛奶	15	285	20	640
鸡蛋	100	200	200	200
鸡肉	60	240	40	760
猪肉	40	240	70	650
牛肉	60	240	70	650

6.3 检测步骤

按照表 3,吸取相应体积的试样待测液(6.2.2)于金标微孔(3.5.1 或 3.5.2)中,抽吸至微孔的金标颗

粒完全溶解,室温孵育 3 min;孵育结束后,将试纸条样品垫端垂直向下插入金标微孔反应 5 min 或 6 min,从微孔中取出试纸条,除去试纸条下端的样品垫,根据示意图(图 1)判定结果。在 1 min 内进行判读。

表 3 试样的检测

测试项目(红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素)		测试项目(替米考星)	
试样待测液体积/ μL	反应时间/min	试样待测液体积/ μL	反应时间/min
200	鸡蛋试样:6;其他试样:5	150	5

6.4 质控试验

6.4.1 通则

每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。

空白试样应经参比方法检测,红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星含量均小于参比方法检出限。

6.4.2 空白试验

称取同类基质空白试样,按照 6.2 和 6.3 步骤与试样同法操作。

6.4.3 加标质控试验

准确称取同类基质空白试样 $1\text{ g}\pm 0.05\text{ g}$,置于 15 mL 离心管中,分别加入适量红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素标准工作液($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)(3.4.3)或替米考星标准工作液($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)(3.4.3),使各类基质试样中待测组分的含量分别为本方法的检出限值(见表 4),按照 6.2 和 6.3 步骤与试样同法操作。

当测试项目为单一药物时,采用单一药物加标质控试验;当测试项目为多个药物时,采用混标加标质控试验。

7 结果判定要求

7.1 通则

采用目视法对结果进行判读,目视判定示意图如图 1 所示。结果有以下几种:

注:也可使用胶体金读数仪判读,读数仪的具体操作与判读原则参照读数仪的使用说明书。

- 无效:控制线(C 线)不显色,表明不正确操作或检测卡无效。
- 阳性结果:检测线(T 线)不显色或检测线(T 线)颜色比控制线(C 线)颜色浅,表明试样中待测组分含量高于方法检出限,判为阳性。
- 阴性结果:检测线(T 线)颜色比控制线(C 线)颜色深或者检测线(T 线)颜色与控制线(C 线)颜色相当,表明试样中待测组分含量低于方法检出限,判为阴性。

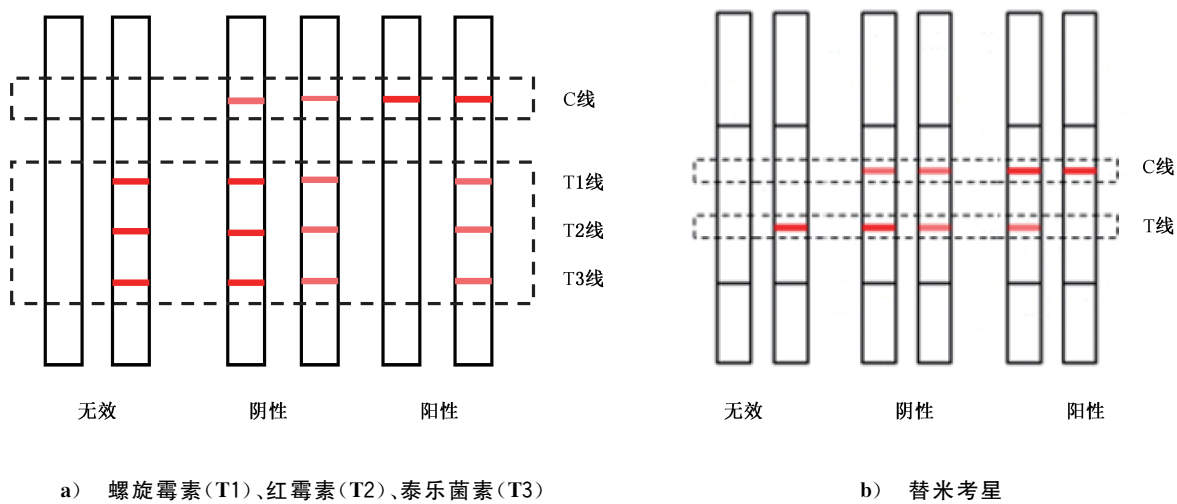


图 1 目视判定示意图(比色法)

7.2 质控试验结果

空白试验检测结果应为阴性,加标质控试验检测结果应为阳性。

8 结论

当检测结果为阳性时,采用参比方法进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

牛奶、鸡蛋、牛肉、猪肉和鸡肉中红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星的方法检出限见表 4。

表 4 方法检出限

试样	检出限/(μg/kg)			
	红霉素	螺旋霉素	泰乐菌素	替米考星
牛奶	40	200	100	50
牛肉、猪肉	200	200	100	100
鸡肉	100	200	100	150
鸡蛋	50	60	300	10

9.2 灵敏度

灵敏度≥95%。

9.3 特异性

特异性≥90%。

9.4 交叉反应率

本方法的红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素胶体金检测卡可能与竹桃霉素、吉他霉素、交沙霉素、3-O-乙酰泰乐菌素、泰万菌素等存在交叉反应。相关药物交叉反应情况详见表 5 和表 6。

表 5 红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素胶体金检测卡交叉反应结果

目标化合物	交叉反应率	兽药种类
红霉素	0.16%~0.2%	竹桃霉素
	<0.1%	(1) 结构类似药物:交沙霉素、林可霉素、依普菌素、泰万菌素、3-O-乙酰泰乐菌素、克林霉素、阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、吉他霉素、替米考星、泰乐菌素、螺旋霉素。 (2) 其他兽药:氯霉素、恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、甲氧苄啶、土霉素、强力霉素、磺胺类药物
螺旋霉素	50%	吉他霉素
	0.3%~1%	交沙霉素
	<0.1%	(1) 结构类似药物:竹桃霉素、林可霉素、依普菌素、泰万菌素、3-O-乙酰泰乐菌素、克林霉素、阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、替米考星、泰乐菌素、红霉素。 (2) 其他兽药:氯霉素、恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、甲氧苄啶、土霉素、强力霉素、磺胺类药物
泰乐菌素	50%~100%	3-O-乙酰泰乐菌素
	12.5%~37.5%	泰万菌素
	0.1%~2.5%	吉他霉素、替米考星
	<0.1%	(1) 结构类似药物:竹桃霉素、交沙霉素、林可霉素、依普菌素、克林霉素、阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、红霉素、螺旋霉素。 (2) 其他兽药:氯霉素、恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、甲氧苄啶、土霉素、强力霉素、磺胺类药物

表 6 替米考星胶体金检测卡交叉反应结果

目标化合物	交叉反应率	兽药种类
替米考星	<0.1%	(1) 结构类似药物:交沙霉素、竹桃霉素、依普菌素、泰万菌素、3-O-乙酰泰乐菌素、林可霉素、克林霉素、阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素、吉他霉素、泰乐菌素、红霉素、螺旋霉素。 (2) 其他兽药:氯霉素、恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、甲氧苄啶、土霉素、强力霉素、磺胺类药物

9.5 假阴性率

假阴性率 $\leq 5\%$ 。

9.6 假阳性率

假阳性率 $\leq 10\%$ 。

10 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便,在使用本方法时不作限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒(包括多合一项目检测产品和单一项目检测产品)或操作步骤前,应对其进行考察,并满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准(方法)为 GB/T 22988—2008《牛奶和奶粉中螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》(牛奶试样)、GB/T 20762—2006《畜禽肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素、交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》(鸡肉、猪肉、牛肉和鸡蛋试样)。

本方法起草单位:广州质量监督检测研究院、华南农业大学。

本方法验证单位:江西省检验检测认证总院食品检验检测研究院、浙江省食品药品检验研究院、广东省食品检验所、广州海关技术中心、河北省食品检验研究院。

本方法主要起草人:吴玉奎、雷红涛、胡均鹏、郭平、温海滨、陈碧莲、沈泓、李向梅、张威、冼燕萍、刘海虹、梁明、陈荣桥、侯向昶、吴钟玲、关甜、徐振林。