



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202303

动物源性食品中四环素类药物的 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

动物源性食品中四环素类药物的 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四环素类药物的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于生乳、灭菌乳、巴氏杀菌乳、乳粉、猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉中四环素、金霉素、土霉素、多西环素的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争免疫层析原理。样品中四环素类药物经提取后,与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制抗体与试纸条中检测线(T线)上抗原的结合,从而导致试纸条上检测线颜色深浅的变化。通过检测线与控制线(C线)颜色深浅比较,对样品中四环素类药物残留量进行定性判定。

3 试剂与材料

3.1 试剂

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水为 GB/T 6682 规定的二级水。

- 3.1.1 乙腈(CH_3CN)。
- 3.1.2 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 优级纯)。
- 3.1.3 一水合柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.4 氢氧化钠(NaOH)。
- 3.1.5 盐酸(HCl , 37%)。
- 3.1.6 乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.7 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.8 二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.9 氯化钠(NaCl)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 乙腈溶液:分别量取 180 mL 乙腈(3.1.1)和 20 mL 水,混合均匀。
- 3.2.2 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L):称取 28.41 g 磷酸氢二钠(3.1.2)于 500 mL 烧杯中,加入 200 mL 水,充分搅拌至溶解,加水定容至 1 L。
- 3.2.3 柠檬酸溶液(0.1 mol/L):称取 21.01 g 一水合柠檬酸(3.1.3)于 500 mL 烧杯中,加入 200 mL 水,充分搅拌至溶解,加水定容至 1 L。
- 3.2.4 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 4.00 g 氢氧化钠(3.1.4)于 50 mL 烧杯中,加入 20 mL 水,充分搅拌至溶解,待冷却至室温,加水定容至 100 mL。
- 3.2.5 样品提取液:分别量取 625 mL 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L)(3.2.2)和 1 000 mL 柠檬酸溶液(0.1 mol/L)(3.2.3)混合均匀,加入适量盐酸(3.1.5)或氢氧化钠溶液(1 mol/L)(3.2.4)将 pH 调节至

4.0, 再加入 60.50 g 乙二胺四乙酸二钠(3.1.6)充分搅拌至溶解。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒配套提取液。

3.2.6 乳品样本稀释液:分别称取 5.80 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.7), 0.60 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.8), 8.77 g 氯化钠(3.1.9)于 500 mL 烧杯中,加入 200 mL 水,充分搅拌至溶解,加入适量盐酸(3.1.5)或氢氧化钠溶液(1 mol/L)(3.2.4)将 pH 调节至 7.4,加水定容至 1 L。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒配套稀释液。

3.2.7 组织样本稀释液:分别称取 29.01 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.7), 2.96 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.8), 5.84 g 氯化钠(3.1.9)于 500 mL 烧杯中,加入 200 mL 水,充分搅拌至溶解,加入适量氢氧化钠溶液(1 mol/L)(3.2.4)将 pH 调节至 8.0,加水定容至 1 L。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒配套稀释液。

3.3 标准物质

四环素类药物标准物质的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 1,纯度 $\geq 95\%$ 。

注:或等同可溯源物质。

表 1 四环素类药物标准物质信息

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
四环素	Tetracycline	60-54-8	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.44
金霉素	Chlortetracycline	57-62-5	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	478.88
土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460.43
多西环素	Doxycycline	564-25-0	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.44

3.4 标准溶液配制

3.4.1 四环素类药物标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$):分别准确称取适量四环素类药物标准物质(3.3)于烧杯中溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,用乙腈溶液(3.2.1)溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素类药物标准储备液。此溶液密封后避光 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 6 个月。

3.4.2 四环素类药物标准工作液 A(1 $\mu\text{g/mL}$):分别准确移取四环素类药物标准储备溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.1)1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈溶液(3.2.1)稀释至刻度,摇匀,配制成 1 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素类药物标准工作液 A。此溶液密封后避光 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 7 d。

3.4.3 四环素类药物标准工作液 B(0.21 $\mu\text{g/mL}$):分别准确移取四环素类药物标准工作液 A(1 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.2)21 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈溶液(3.2.1)稀释至刻度,摇匀,配制成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素类药物标准工作液 B。临用现配。

3.5 材料

四环素类药物胶体金免疫层析试剂盒:金标微孔(含胶体金标记的特异性抗体)、试纸条及配套试剂。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量为 0.01 g。

4.2 离心机:转速 $\geq 4\ 000\text{ r/min}$ 。

4.3 微量移液器:100 μL 、200 μL 、1 mL 和 5 mL。

4.4 均质器。

4.5 孵育器:可控温 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.6 涡旋混合器。

4.7 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度 15 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 生乳、灭菌乳、巴氏杀菌乳

取约 20 mL 具有代表性的样品,充分混匀,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记,置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

6.1.2 乳粉

取约 100 g 具有代表性的样品,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记,置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

6.1.3 猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉

取约 100 g 具有代表性的样品(去皮去脂肪),用均质器制成糜状,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。

6.2 试样提取

6.2.1 生乳、灭菌乳、巴氏杀菌乳

吸取 200 μL 试样于 5 mL 离心管中,加入 800 μL 乳品样本稀释液(3.2.6),涡旋混匀 30 s,为待测液。

6.2.2 乳粉

准确称取 1 g $\pm$ 0.05 g 试样于 10 mL 离心管中,加入 8 mL 水,混匀,吸取 200 μL 混匀后的溶液于 5 mL 离心管中,加入 2500 μL 乳品样本稀释液(3.2.6),涡旋混匀 30 s,为待测液。

6.2.3 猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉

准确称取 1 g $\pm$ 0.05 g 试样于 10 mL 离心管中,加入 3 mL 样品提取液(3.2.5),振荡提取 2 min,4 000 r/min 离心 5 min,取 200 μL 上清液,按照样品种类加入不同体积(猪肉:100 μL ,牛肉、鸡肉:200 μL ,鱼肉:400 μL)的组织样本稀释液(3.2.7),涡旋混匀 10 s,为待测液。

6.3 测定步骤

6.3.1 生乳、灭菌乳、巴氏杀菌乳、乳粉

吸取 200 μL 上述待测液(6.2.1 或 6.2.2)于金标微孔中,抽吸至孔底的紫红色颗粒完全溶解,于孵

育器中 20℃~25℃ 孵育 3 min, 将试纸条下端插入到金标微孔溶液底部, 于孵育器中 20℃~25℃ 反应 5 min, 拔出试纸条, 刮掉下端样品垫, 判读结果。

6.3.2 猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉

吸取 150 μL 上述待测液(6.2.3)于金标微孔中, 抽吸至孔底的紫红色颗粒完全溶解, 于孵育器中 20℃~25℃ 孵育 3 min, 将试纸条下端插入到金标微孔溶液底部, 于孵育器中 20℃~25℃ 反应 5 min, 拔出试纸条, 刮掉下端样品垫, 判读结果。

6.4 质控试验

6.4.1 通则

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

6.4.2 空白试验

称取空白试样, 按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

6.4.3 加标质控试验

6.4.3.1 生乳、灭菌乳、巴氏杀菌乳: 吸取空白试样 200 μL 于 5 mL 离心管中, 加入 10 μL 的四环素类药物标准工作液 B(0.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.3), 使试样中四环素类药物含量为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

6.4.3.2 乳粉: 准确称取 1 g $\pm$ 0.05 g 试样于 10 mL 离心管中, 加入 50 μL 的四环素类药物标准工作液 A(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.2), 使试样中四环素类药物含量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

6.4.3.3 猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉: 准确称取 1 g $\pm$ 0.05 g 试样于 10 mL 离心管中, 加入 100 μL 的四环素类药物标准工作液 A(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.2), 使试样中四环素类药物含量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

注: 获取同类基质的空白试样, 经参比方法验证无四环素类污染或四环素类含量远低于检出限。

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。

- a) 无效结果: 控制线(C 线)不显色, 表明操作不正确或试纸条已失效, 检测结果无效。
- b) 阳性结果: 控制线(C 线)显色, 检测线(T 线)不显色或比控制线(C 线)颜色浅, 表明样品中四环素类含量高于方法检出限, 判为阳性。
- c) 阴性结果: 控制线(C 线)显色, 检测线(T 线)颜色比控制线(C 线)颜色深或者与控制线(C 线)颜色相当, 表明样品中四环素类含量低于方法检出限, 判为阴性。

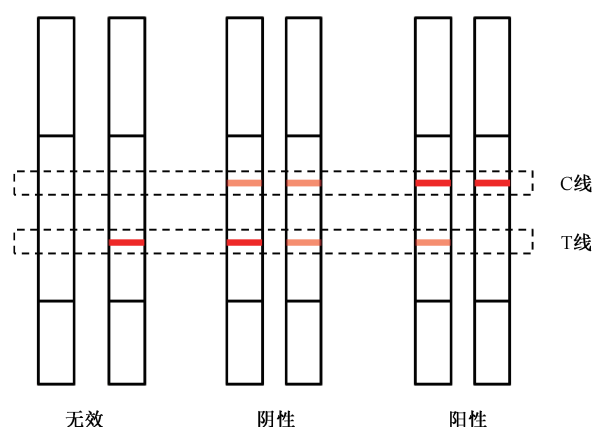


图1 目视判定示意图

7.2 质控试验要求

空白试验测定结果应为阴性,加标质控试验测定结果应为阳性。

8 结论

当检测结果为阳性时,应以参比方法对结果进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

生乳、灭菌乳、巴氏杀菌乳中四环素、金霉素、土霉素、多西环素为 $10 \mu\text{g/L}$;乳粉中四环素、金霉素、土霉素、多西环素为 $50 \mu\text{g/kg}$;猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉中四环素、金霉素、土霉素、多西环素为 $100 \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 99\%$ 。

9.3 特异性

特异性 $\geq 95\%$ 。

甲烯土霉素、地美环素交叉反应率分别为 200% 、 10% 。

9.4 交叉反应率

甲烯土霉素 $\leq 200\%$,地美环素 $\leq 10\%$,罗利环素、米诺环素 $\leq 1\%$,替加环素、奥玛环素、红霉素、庆大霉素、氯霉素、环丙沙星、磺胺二甲基嘧啶 $\leq 0.1\%$ 。

9.5 假阴性率

假阴性率 $\leq 1\%$ 。

9.6 假阳性率

假阳性率 $\leq 5\%$ 。

10 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息、操作步骤及结果判定要求是为给方法使用者提供方便,在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前,应对其进行考察,应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法灭菌乳、巴氏杀菌乳、乳粉参比方法为 GB/T 22990—2008《牛奶和奶粉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定 液相色谱-紫外检测法》,猪肉、牛肉、鸡肉、鱼肉参比方法为 GB/T 21317—2007《动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法》(包括所有的修改单)。

本方法起草单位:中国检验检疫科学研究院。

本方法验证单位:江西省食品检验检测研究院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中国农业大学、国家粮食和物资储备局科学研究院、中国海关科学技术研究中心、广东省微生物研究所。

本方法主要起草人:许秀丽、张峰、邓伟、谢昀、许博舟、温凯、杨柳。