



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202302

动物肌肉组织中链霉素和庆大霉素的 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

动物肌肉组织中链霉素和庆大霉素的 快速检测 胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了动物肌肉组织中链霉素(以链霉素和双氢链霉素之和计)、庆大霉素的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于猪肉、牛肉、鸡肉、羊肉等动物肌肉组织中链霉素的快速测定,适用于猪肉、牛肉、鸡肉、火鸡肉等动物肌肉组织中庆大霉素的快速测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的链霉素、双氢链霉素和庆大霉素经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制抗体和检测线(T线)上抗原的结合,从而导致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,对样品中链霉素和双氢链霉素总量、庆大霉素进行定性判定。

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 规定的二级水。

3.1 试剂

3.1.1 三羟甲基氨基甲烷($C_4H_{11}NO_3$),即 Tris 碱。

3.1.2 盐酸(HCl,37%)。

3.2 试剂配制

3.2.1 盐酸溶液(2 mol/L):量取盐酸(3.1.2)16.7 mL,用水稀释至 100 mL,混匀,冷却待用。

3.2.2 缓冲液(pH 8.5,0.1 mol/L):称取 12.1 g Tris 碱(3.1.1),加约 950 mL 水溶解,混匀,用盐酸溶液(3.2.1)调节 pH 至 8.5,用水定容至 1 L。

3.3 参考物质

链霉素、庆大霉素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,纯度均 $\geq 98\%$ 。

注:或等同可溯源物质。

表 1 参考物质信息

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
硫酸链霉素	Streptomycin sulfate	3810-74-0	$C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$	728.69
硫酸双氢链霉素	Dihydrostreptomycin sulfate	5490-27-7	$C_{21}H_{41}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$	730.71
硫酸庆大霉素	Gentamycin sulfate	1405-41-0	$C1;C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot H_2SO_4$	C1;575.68
			$C1a;C_{19}H_{39}N_5O_7 \cdot H_2SO_4$	C1a;547.62
			$C2;C_{20}H_{41}N_5O_7 \cdot H_2SO_4$	C2;561.65

3.4 标准溶液配制

3.4.1 链霉素标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$,以链霉素计):准确称取硫酸链霉素参考物质(3.3)12.5 mg,精确至 0.01 mg,用水溶解后,移入 100 mL 容量瓶,定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素标准储备液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2 链霉素标准工作液(10 $\mu\text{g/mL}$):吸取链霉素标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.1)1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素标准工作液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 1 个月。

3.4.3 庆大霉素标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$,以庆大霉素计):准确称取适量硫酸庆大霉素参考物质(3.3),用水溶解后,移入 100 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的庆大霉素标准储备液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 6 个月。

3.4.4 庆大霉素标准工作液(10 $\mu\text{g/mL}$):吸取庆大霉素标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.3)1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的庆大霉素标准工作液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 1 个月。

3.5 材料

链霉素胶体金免疫层析试剂盒,庆大霉素胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔、试纸条。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量为 0.01 mg 和 0.01 g。

4.2 移液器:200 μL 、1 mL 和 10 mL。

4.3 pH 计:测量精度 0.02 pH 单位。

4.4 组织粉碎机或搅拌机。

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

4.6 涡旋振荡器。

4.7 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

环境温度 10 $^{\circ}\text{C}$ ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取约 100 g 具有代表性的肌肉组织样品,搅碎并使均质,备用。

6.2 试样提取

称取均质混匀的试样 2.0 g(精确至 0.1 g)于 15 mL 离心管,加入 8 mL 缓冲液(3.2.2),涡旋震荡 2 min, 4000 r/min 离心 2 min,上清液即为待测液。

6.3 测定步骤

6.3.1 链霉素测定步骤

吸取 200 μL 上述待测液于金标微孔中,上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀。室温温育 3 min,将试纸条插入到金标微孔中,反应 4 min 后,从微孔中取出试纸条,拭去试纸条下端的样品垫,10 min 内进行结果判定。

6.3.2 庆大霉素测定步骤

吸取 100 μL 缓冲液(3.2.2)于金标微孔中,加入 100 μL 上述待测液,上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀。室温温育 3 min,将试纸条插入到金标微孔中,反应 4 min 后,从微孔中取出试纸条,拭去试纸条下端的样品垫,10 min 内进行结果判定。

6.4 质控试验

6.4.1 通则

每批样品应同时进行基质空白试验和阳性质控试验。

6.4.2 基质空白试验

称取空白试样,按照 5.2 和 5.3 步骤与样品同法操作。

6.4.3 阳性质控试验

分别称取链霉素为 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、庆大霉素为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的质控样,按照 5.2 和 5.3 步骤与样品同法操作。

或称取空白试样,分别加入适量链霉素和庆大霉素标准工作液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.2 和 3.4.4),使链霉素的添加量为 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$,庆大霉素的添加量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

7 结果判定要求

7.1 通则

根据读数仪/胶体金免疫层析试剂盒说明书要求操作,并直接读数表示结果;或采用目视法观察结果。

7.2 目视法结果判定

通过对比控制线(C 线)和检测线(T 线)的颜色深浅对结果进行判读。目视判定示意图见图 1。结

果有以下几种：

- a) 无效：控制线(C线)不显色，无论检测线(T线)是否显色，均表示实验结果无效。
- b) 阳性结果：控制线(C线)显色，检测线(T线)不显色或颜色浅于控制线(C线)，表示试样中含有待测组分且其含量高于方法检出限，视为阳性。
- c) 阴性结果：控制线(C线)显色，检测线(T线)颜色深于或等于控制线(C线)，表示试样中不含有待测组分或其含量低于方法检出限，视为阴性。

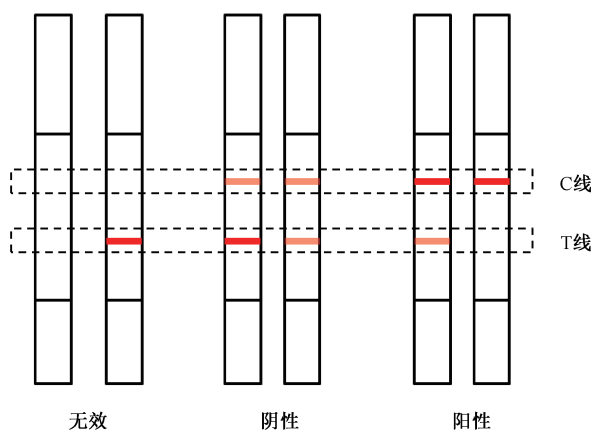


图 1 目视判定示意图

7.3 质控试验要求

基质空白试验测定结果应为阴性，阳性质控试验测定结果应为阳性。

8 结论

当检测结果为链霉素阳性时，应采用参比方法同时对链霉素和双氢链霉素含量进行确证；当检测结果为庆大霉素阳性时，应采用参比方法同时对庆大霉素 C1、C1a 和 C2 三个组分含量进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

链霉素为 $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ (以链霉素和双氢链霉素之和计)，庆大霉素为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 灵敏度

灵敏度链霉素 $\geq 95\%$ ，庆大霉素 $\geq 95\%$ 。

9.3 特异性

特异性链霉素 $\geq 90\%$ ，庆大霉素 $\geq 95\%$ 。

9.4 交叉反应率

双氢链霉素交叉反应率为 100% ，其他氨基糖苷类药物交叉反应率 $< 0.1\%$ 。

9.5 假阴性率

链霉素 $\leq 5\%$,庆大霉素 $\leq 5\%$ 。

9.6 假阳性率

链霉素 $\leq 10\%$,庆大霉素 $\leq 5\%$ 。

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、试剂盒或操作前,应对其进行步骤前,应对其进行考察,以满足本方法规定的各项性能指标。

本方法链霉素的参比方法为 GB/T 21323—2007《动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱/质谱法》(包括所有修改单)。本方法庆大霉素的参比方法为中华人民共和国农业农村部公告第 350 号《鸡可食性组织中庆大霉素残留检测方法液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法》(包括所有修改单)。

本方法起草单位:广东省食品检验所(广东省酒类检测中心)。

本方法验证单位:广州质量监督检测研究院、浙江省食品药品检验研究院、华南农业大学、广东省药品检验所、广东省食品工业研究所有限公司。

本方法主要起草人:蔡若纯、刘海虹、黎佩锦、刘耀慧、齐春艳、雷毅、雷红涛、梁明。