



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202301

动物源性食品中甲氧苄啶的快速检测 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

动物源性食品中甲氧苄啶的快速检测
胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了动物源性食品中甲氧苄啶快速检测胶体金免疫层析法。
本方法适用于猪、牛、羊、鸡、鸭、鱼等动物性食品肌肉组织中甲氧苄啶的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理,样品中的甲氧苄啶经提取后与胶体金标记的甲氧苄啶特异性抗体结合,抑制抗体和试纸条或检测卡中检测线(T线)上抗原的结合,从而导致检测线(T线)颜色深浅的变化。通过检测线(T线)与控制线(C线)颜色深浅比较,对样品中甲氧苄啶进行定性判定。

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 无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 3.1.2 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。
- 3.1.3 甲醇(CH_3OH)。

3.2 试剂配制

样品提取液:称取无水磷酸二氢钾(3.1.1)3.40 g 和无水磷酸氢二钠(3.1.2)3.55 g,加水溶解并定容至 1 000 mL,混匀。

3.3 参考物质

甲氧苄啶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 $\geq 99.5\%$ 。
注:或等同可溯源物质。

表 1 甲氧苄啶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
甲氧苄啶	Trimethoprim	738-70-5	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$	290.32

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 甲氧苄啶标准储备溶液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确称取甲氧苄啶参考物质(3.3)10 mg(精确至

0.01 mg), 用甲醇(3.1.3)溶解并定容至 100 mL, 混匀。该标准储备溶液-18 °C 避光保存, 有效期 12 个月。

3.4.2 甲氧苄啶标准工作溶液(1 µg/mL): 准确移取甲氧苄啶标准储备溶液(100 µg/mL)(3.4.1)1 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇(3.1.3)定容至刻度, 混匀。临用现配。

3.4.3 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

甲氧苄啶胶体金免疫层析试剂盒: 一般包含金标微孔、胶体金试纸条或检测卡及配套的试剂, 适用于动物源性食品肌肉组织, 按产品要求保存。

4 仪器和设备

4.1 电子天平: 感量分别为 0.01 g 和 0.01 mg。

注: 当实验室可获得符合规定的标准溶液时, 无须配备感量为 0.01 mg 的电子天平。

4.2 组织匀浆机。

4.3 涡旋混合器。

4.4 离心机: 转速 $\geq 4\,000$ r/min。

4.5 移液器: 100 µL、200 µL、1 mL 和 5 mL。

4.6 胶体金读数仪(可选): 产品配套可使用的检测仪器。

5 环境条件

温度 15 °C ~ 40 °C。

6 分析步骤

6.1 试样制备

畜禽: 去骨、内脏、皮、肥肉、筋膜。

鱼: 去头、骨、内脏、鱼皮。

取约 100 g 肌肉, 用组织粉碎机充分粉碎混匀, 均分成 2 份, 分别装入洁净容器作为试样和留样, 密封, 标记, 于-18 °C 保存。

6.2 试样提取

准确称取试样 1 g(精确至 0.01 g)于 10 mL 离心管中, 加入 5 mL 样品提取液(3.2), 涡旋或振荡提取 5 min, 4 000 r/min 离心 3 min, 上清液即为样品处理液。

6.3 测定步骤

6.3.1 试纸条测定步骤

取 350 µL 样品处理液于 2 mL 离心管, 加入 1.0 mL 样品提取液(3.2), 混匀, 即待测液。吸取 200 µL 待测液于金标微孔中, 反复抽吸 5 次~10 次至微孔试剂混合均匀, 室温孵育 3 min。将试纸条

样品垫插入金标微孔中,室温温育 6 min。从微孔中取出试纸条,按照试剂盒说明书去掉或不去掉试纸条下端的样品垫,进行结果判定。

6.3.2 检测卡测定步骤

取 70 μL 样品处理液于 2 mL 离心管,加入 1.0 mL 样品提取液(3.2),混匀,即待测液。吸取 100 μL 待测液于金标微孔中,反复抽吸 5 次~10 次至微孔试剂混合均匀,室温孵育 3 min。吸取 100 μL 微孔混匀液于检测卡的加样孔中,室温温育 8 min,进行结果判定。

注:若试剂盒冷藏保存,使用前需恢复至环境温度。

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。空白试样应为经参比方法检测未检出甲氧苄啶,且未检出二甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶的同类基质。

6.4.2 空白试验

称取空白试样,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

准确称取空白试样 1 g(精确至 0.01 g)于 10 mL 离心管中,加入 50 μL 甲氧苄啶标准工作溶液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.2),使试样中甲氧苄啶浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按照 6.2 和 6.3 步骤与试样同法操作。

7 结果表示

7.1 通则

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

7.2 目视结果

通过对比控制线(C线)和检测线(T线)的颜色深浅进行结果表示。目视结果示意图见图 1。结果有以下几种:

- 无效结果: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。
- 阳性结果:控制线(C线)显色,若检测线(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。
- 阴性结果:控制线(C线)显色,若检测线(T线)颜色深于或等于控制线(C线),表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检出限,视为阴性。

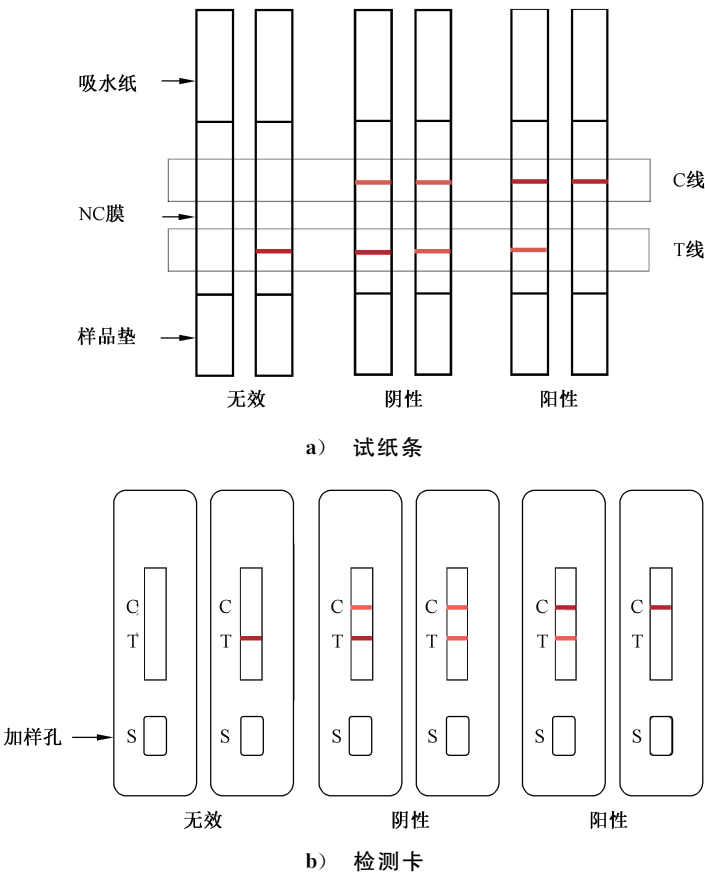


图 1 目视结果示意图

7.3 质控试验结果

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,应对结果进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

检出限 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 95\%$ 。

9.3 特异性

特异性 $\geq 95\%$ 。

9.4 交叉反应率

本方法可能与二甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄氨嘧啶存在交叉反应,相关兽药交叉反应情况见表2。

表2 交叉反应结果

兽药种类	交叉反应率
二甲氧甲基苄氨嘧啶(奥美普林,CAS:6981-18-6)	1%~10%
二甲氧苄氨嘧啶(敌菌净,CAS:5355-16-8)	≤5%
喹诺酮类: 恩诺沙星(CAS:93106-60-6)、诺氟沙星(氟哌酸,CAS:70458-96-7)、培氟沙星甲磺酸盐二水化合物(CAS:149676-40-4)、盐酸环丙沙星(CAS:93107-08-5)、氧氟沙星(氟嗪酸,CAS:82419-36-1)、盐酸沙拉沙星(CAS:91296-87-6)、依诺沙星(CAS:74011-58-8)、盐酸诺美沙星(CAS:98079-52-8)、吡哌酸(CAS:5190-44-4)、萘啶酸(CAS:389-08-2)、奥索利酸(CAS:14698-29-4)、氟甲喹(CAS:42835-25-6)、西诺沙星(CAS:28657-80-9)、丹诺沙星(达氟沙星,CAS:74011-58-8)	≤0.5%
甲硝唑(CAS:443-48-1); 金刚烷胺(CAS:768-94-5); 氟苯尼考(CAS:76639-94-6)、氟苯尼考胺(CAS:76639-93-5); 磺胺类:磺胺醋酰(CAS:144-80-9)、磺胺甲噻二唑(CAS:144-82-1)、磺胺二甲异噁唑(CAS:127-69-5)、磺胺嘧啶(CAS:68-35-9)、磺胺氯哒嗪(CAS:80-32-0)、磺胺甲基异噁唑(CAS:723-46-6)、磺胺噻唑(CAS:72-14-0)、磺胺-6-甲氧嘧啶(CAS:1220-83-3)、磺胺甲基嘧啶(CAS:127-79-7)、磺胺邻二甲氧嘧啶(CAS:2447-57-6)、磺胺吡啶(CAS:144-83-2)、磺胺对甲氧嘧啶(CAS:651-06-9)、磺胺甲氧哒嗪(CAS:80-35-3)、磺胺二甲嘧啶(CAS:57-68-1)、磺胺苯吡唑(CAS:526-08-9)、磺胺间二甲氧嘧啶(CAS:122-11-2)	0

9.5 假阴性率

假阴性率≤5%。

9.6 假阳性率

假阳性率≤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。

本方法参比方法为 GB/T 21316—2007《动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》(包括所有的修改单)。

KJ 202301

本方法起草单位:厦门市食品药品质量检验研究院。

本方法验证单位:广东省食品检验所、深圳市计量质量检测研究院、华南农业大学、厦门海关技术中心和厦门鉴科检测技术有限公司。

本方法主要起草人:骆和东、叶雅真、李平、李玲玲、温海滨、徐振林、张世伟、邱涵。