



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202306

生鲜乳和畜肉中氨基糖苷类药物的 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

生鲜乳和畜肉中氨基糖苷类药物的 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氨基糖苷类药物残留量的胶体金免疫层析检测方法。

本方法适用于牛奶、猪肉、牛肉和羊肉等畜肉中链霉素、双氢链霉素、新霉素、大观霉素、庆大霉素和卡那霉素 6 种氨基糖苷类药物残留量的快速定性检测。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的氨基糖苷类药物经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合,从而抑制抗体与试纸条检测线(T 线)上的包被抗原结合,导致 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,对样品中氨基糖苷类药物进行定性判定。

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 甲醇(CH_3OH)。
- 3.1.2 氯化钠(NaCl)。
- 3.1.3 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.4 二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.5 三氯乙酸($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)。
- 3.1.6 氯化钾(KCl)。
- 3.1.7 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 3.1.8 氢氧化钠(NaOH)。

3.2 试剂配制

3.2.1 样品提取液(畜肉样品专用):称取 3.0 g 三氯乙酸(3.1.5),用水溶解后转移至容量瓶内定容至 100 mL,即为样品提取液。

3.2.2 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 4.0 g 氢氧化钠(3.1.8)于 250 mL 小烧杯中,加入 80 mL 水,充分搅拌至溶解,待冷却至室温后转移至 100 mL 容量瓶内。再向小烧杯内加入少量水润洗 3 次,洗涤水一并转移至容量瓶内。加水定容至刻度,混匀后转入塑料瓶内保存。

3.2.3 样品稀释液 I (牛奶检测专用):准确称取 8.765 g 氯化钠(3.1.2)、5.8 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.3)、0.595 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.4),用水溶解后转移至容量瓶内定容至 1 000 mL,再称取 30 g 脱脂奶粉(3.5.2),充分混匀,即样品稀释液 I。

3.2.4 样品稀释液 II (链霉素/双氢链霉素畜肉组织检测专用):准确称取 10 g 氯化钾(3.1.6)、143 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.3)、13.5 g 磷酸二氢钾(3.1.7),用水溶解后转移至容量瓶内并定容至 100 mL,

即样品稀释液Ⅱ。

3.2.5 样品稀释液Ⅲ(新霉素/庆大霉素畜肉组织检测专用):准确称取 5.843 g 氯化钠(3.1.2)、29.01 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.3)、2.963 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.4),用水溶解后转移至容量瓶内定容至 1 000 mL,依次加入 10 g 脱脂奶粉(3.5.2)、50 g 氢氧化钠溶液(3.2.2),充分混匀,即样品稀释液Ⅲ。

3.2.6 样品稀释液Ⅳ(大观霉素畜肉组织检测专用):准确称取 8.765 g 氯化钠(3.1.2)、5.8 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.3)、0.595 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.4),用水溶解后转移至容量瓶内定容至 1 000 mL,再称取 10 g 脱脂奶粉(3.5.2),充分混匀,即样品稀释液Ⅳ。

3.2.7 样品稀释液Ⅴ(卡那霉素猪肉组织检测专用):准确称取 29.22 g 氯化钠(3.1.2)、43.515 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.3)、4.445 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.4),用水溶解后转移至容量瓶内定容至 1 000 mL,即样品稀释液Ⅴ。

3.3 参考物质

氨基糖苷类药物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 $\geq 92\%$ 。

注:或等同可溯源物质。

表 1 氨基糖苷类药物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
链霉素硫酸盐	Streptomycin Sulfate Salt	3810-74-0	$C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$	728.69
双氢链霉素硫酸盐	Dihydrostreptomycin Sulfate	5490-27-7	$C_{21}H_{41}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$	730.71
新霉素硫酸盐	Neomycin sulfate	1405-10-3	$C_{23}H_{46}N_6O_{13} \cdot H_2SO_4$	712.72
大观霉素盐酸盐	Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate	22189-32-8	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$	495.35
卡那霉素硫酸盐	Kanamycin sulfate	25389-94-0	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	582.58
庆大霉素硫酸盐	Gentamycin sulfate	1405-41-0	$C_{60}H_{125}N_{15}O_{22} \cdot H_2SO_4$	1 506.8

3.4 标准溶液配制

3.4.1 5 种氨基糖苷类药物标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$):分别准确称取适量经纯度折算后的每种氨基糖苷类药物(链霉素硫酸盐、双氢链霉素硫酸盐、新霉素硫酸盐、卡那霉素硫酸盐和庆大霉素硫酸盐)标准物质(3.3),置于小烧杯中,用水溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,再用水定容,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2 大观霉素标准储备液(1 mg/mL):准确称取适量经纯度折算后的大观霉素标准品(3.3),置于小烧杯中,用甲醇(3.1.1)溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,再用甲醇(3.1.1)定容,摇匀,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 6 个月。

3.4.3 大观霉素标准工作液(100 $\mu\text{g/mL}$):精密量取大观霉素标准储备液(3.4.2)1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 7 d。

3.5 材料

3.5.1 链霉素/双氢链霉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)、胶体金试纸条等。

3.5.2 新霉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)、胶体金试纸条等。

3.5.3 大观霉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)、胶体金试纸条等。

3.5.4 卡那霉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)、胶体金试纸条等。

3.5.5 庆大霉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)、胶体金试纸条等。

3.5.6 脱脂奶粉:脂肪含量小 1.5%,不含氨基糖苷类药物成分。

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:量程分别为 10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 mL 和 5 mL。

4.3 组织匀浆机。

4.4 离心机:转速 $\geq$ 4 000 r/min。

4.5 涡旋混合器。

4.6 孵育器:温度调控范围,室温 $\sim$ 70 $^{\circ}$ C。

4.7 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度 20 $^{\circ}$ C $\sim$ 40 $^{\circ}$ C。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 牛奶试样

称取约 100 g 具有代表性的牛奶样品,分为 2 份分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于 -18° C 保存。

6.1.2 畜肉组织试样

称取约 200 g 畜肉(除去脂肪),经高速组织匀浆机均匀捣碎,均分成 2 份,装入清洁容器内,分别作为试样和留样,密封,标记。留样置于 -18° C 保存。

6.2 试样提取

6.2.1 牛奶试样提取

称取制备好的试样约 2 g 至 10 mL 离心管,用移液器移取 30 μ L 至 1.5 mL 离心管中,加入 870 μ L 样品稀释液 I (3.2.3),涡旋混合 30 s,作为待测液。

6.2.2 畜肉组织试样提取

准确称取制备好的试样 2 g(精确至 0.01 g)至 10 mL 离心管中,加入 6 mL 样品提取液(3.2.1),涡

旋混合 3 min, 4 000 r/min 离心 3 min, 上清液备用。

6.3 测定步骤

6.3.1 牛奶试样测定

用移液器吸取 200 μL 待测液(6.2.1)于金标微孔(3.5.1)中, 反复吹吸 4 次~5 次使金标微孔试剂完全溶解。金标微孔置于孵育器中 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 min, 试纸条插入金标微孔至底部, 反应 5 min~8 min, 取出试纸条, 刮去下端样品垫, 判定结果。

6.3.2 畜肉组织试样测定

待测液准备: 组织试样提取后的上清液(6.2.2)经过稀释后, 制备成待测液。不同氨基糖苷类药物检测的稀释方式不同, 如表 2 所示。

表 2 氨基糖苷类药物待测液制备方法

氨基糖苷类药物种类	稀释方式
链霉素/双氢链霉素	1.5 mL 离心管中加入 50 μL 上清液, 再加入 600 μL 样品稀释液 II (3.2.4), 涡旋混匀 30 s, 制备成待测液
新霉素、庆大霉素	1.5 mL 离心管中加入 100 μL 上清液, 再加入 200 μL 样品稀释液 III (3.2.5), 涡旋混匀 30 s, 制备成待测液
大观霉素	1.5 mL 离心管中加入 50 μL 上清液, 再加入 750 μL 样品稀释液 IV (3.2.6), 涡旋混匀 30 s, 制备成待测液
卡那霉素	1.5 mL 离心管中加入 100 μL 上清液, 再加入 400 μL 样品稀释液 V (3.2.7), 涡旋混匀 30 s, 制备成待测液

用移液器吸取以上待测液 150 μL 于金标微孔中, 反复吹吸 4 次~5 次使金标微孔试剂完全溶解, 室温温育 3 min, 试纸条插入金标微孔至底部, 反应 5 min~8 min, 取出试纸条, 刮去下端样品垫, 判定结果。

6.4 质控试验

6.4.1 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: 称取同类基质空白试样, 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: 准确称取同类基质空白试样 2 g (精确至 0.01 g) 置于 10 mL 离心管中。牛奶试样加入氨基糖苷类药物标准溶液, 使其浓度水平为: 链霉素/双氢链霉素 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、新霉素 1 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、庆大霉素 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、卡那霉素 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。畜肉组织试样加入氨基糖苷类药物标准溶液, 使其浓度水平为: 链霉素/双氢链霉素 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、新霉素 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大观霉素 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、庆大霉素 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、卡那霉素 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

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: C 线不显色, 无论 T 线是否显色, 判定为无效结果。
- b) 阴性结果: T 线颜色比 C 线颜色深或者 T 线颜色与 C 线颜色相当, 表明样品中氨基糖苷类药物含量低于方法检出限, 判为阴性。
- c) 阳性结果: T 线不显色或 T 线颜色比 C 线颜色浅, 表明样品中氨基糖苷类药物含量高于方法检出限, 判为阳性。

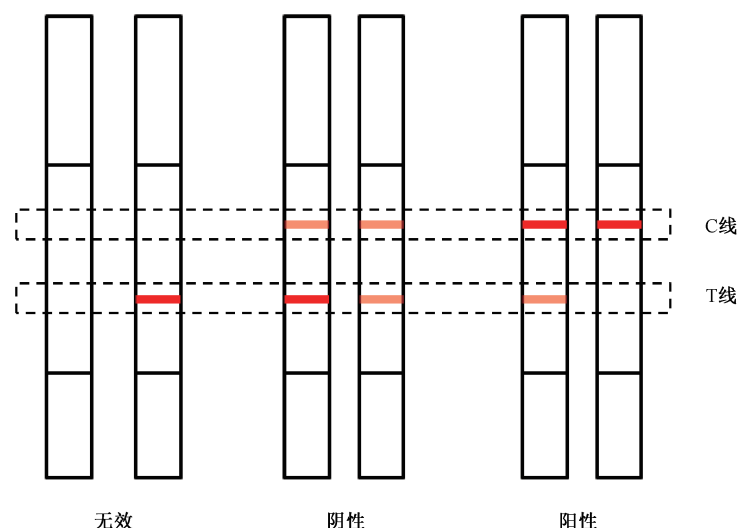


图 1 目视判定示意图

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。质控试验结果不符合要求时, 同批次所有检测结果判定为无效结果。若出现无效结果, 需对同批次样品进行重新检测。

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

本方法牛奶中氨基糖苷类药物的检出限为: 链霉素/双氢链霉素 $200 \mu\text{g/kg}$ 、新霉素 $1500 \mu\text{g/kg}$ 、大观霉素 $200 \mu\text{g/kg}$ 、庆大霉素 $200 \mu\text{g/kg}$ 、卡那霉素 $150 \mu\text{g/kg}$ 。猪肉、牛肉和羊肉中氨基糖苷类药物的检出限为: 链霉素/双氢链霉素 $600 \mu\text{g/kg}$ 、新霉素 $500 \mu\text{g/kg}$ 、大观霉素 $500 \mu\text{g/kg}$ 、庆大霉素 $100 \mu\text{g/kg}$ 、卡那霉素 $100 \mu\text{g/kg}$ 。

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

本方法制定过程中使用的快检产品与巴龙霉素、妥布霉素存在交叉反应,相关化合物交叉反应情况见表 3。

表 3 交叉反应结果

试剂盒种类	交叉反应率	兽药种类
链霉素试剂盒	$\leq 100\%$	双氢链霉素
	$\leq 1\%$	新霉素、大观霉素、庆大霉素、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、巴龙霉素、氟苯尼考、氯霉素、黄曲霉毒素 M ₁ 、红霉素、多西环素、地塞米松、恩诺沙星、替米考星
双氢链霉素试剂盒	$\leq 100\%$	链霉素
	$\leq 1\%$	新霉素、大观霉素、庆大霉素、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、巴龙霉素、氟苯尼考、氯霉素、黄曲霉毒素 M ₁ 、红霉素、多西环素、地塞米松、恩诺沙星、替米考星
新霉素试剂盒	$\leq 400\%$	巴龙霉素
	$\leq 1\%$	链霉素、双氢链霉素、大观霉素、庆大霉素、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、氟苯尼考、氯霉素、黄曲霉毒素 M ₁ 、红霉素、多西环素、地塞米松、恩诺沙星、替米考星
大观霉素试剂盒	$\leq 1\%$	链霉素、双氢链霉素、新霉素、庆大霉素、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、巴龙霉素、氟苯尼考、氯霉素、黄曲霉毒素 M ₁ 、红霉素、多西环素、地塞米松、恩诺沙星、替米考星
庆大霉素试剂盒	$\leq 1\%$	链霉素、双氢链霉素、新霉素、大观霉素、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、巴龙霉素、氟苯尼考、氯霉素、黄曲霉毒素 M ₁ 、红霉素、多西环素、地塞米松、恩诺沙星、替米考星
卡那霉素试剂盒	$\leq 130\%$	妥布霉素
	$\leq 1\%$	链霉素、双氢链霉素、新霉素、大观霉素、庆大霉素、安普霉素、巴龙霉素、氟苯尼考、氯霉素、黄曲霉毒素 M ₁ 、红霉素、多西环素、地塞米松、恩诺沙星、替米考星

9.5 假阴性率

假阴性率 $\leq 5\%$ 。

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,须对其进行考察,应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为 GB 29685—2013《食品安全国家标准 动物性食品中林可霉素、克林霉素和大

观霉素多残留的测定 气相色谱-质谱法》(大观霉素)、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》(链霉素、双氢链霉素、新霉素、庆大霉素、卡那霉素)、GB/T 22969—2008《奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》(链霉素、双氢链霉素、卡那霉素)、农业部 1163 号公告-7-2009《动物性食品中庆大霉素残留检测 高效液相色谱法》(庆大霉素),包括所有的修改单。

本方法使用新霉素试剂盒可能与巴龙霉素存在交叉反应;卡那霉素试剂盒可能与妥布霉素存在交叉反应;当结果判定为阳性应对结果进行确证。

本方法起草单位:江西省检验检测认证总院食品检验检测研究院。

本方法验证单位:浙江省食品药品检验研究院、深圳计量质量检测研究院、南昌海关技术中心、南昌大学、江西农业大学。

本方法主要起草人:郭平、马冰峰、莫惠莹、沈泓、张威、王文君、张世伟、陈碧莲、王伟达、赖卫华、占春瑞、唐丽君、喻俊磊、周晓晴、陈春燕、蓝伟、赵淑娟。