

FSLB/SJ

佛山市食用农产品快速检测联盟标准

FSLB/SJ 13—2017

禽畜产品及水产品中氯霉素残留的快速检测

2017-10-30 发布

2017-10-31 实施

佛山市食用农产品快速检测标准联盟 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》规定编写。

本标准由佛山市食品药品监督管理局提出和归口管理。

本标准起草单位：佛山市质量和标准化研究院、佛山市食品药品检验检测中心、广东汇信农产品检验有限公司、华南农业大学食品学院、广州万联生物科技有限公司、广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司、深圳市易瑞生物技术有限公司、广州安诺食品科学技术有限公司、佛山职业技术学院。

本标准主要起草人：郭友珍、陈瑞莲、伍志权、杨金易、吴文玲、谢俊平、金虹、马丽、郑琳。

本标准为首次发布。

引 言

氯霉素(Chloramphenicol)属广谱类抗生素药物，因其抗菌效果好而在养殖业中有广泛的应用。但氯霉素有严重的副作用，它能抑制人体骨髓造血功能而引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等疾病，因此动物食品中的氯霉素残留对人类的健康构成了潜在危害。中华人民共和国农业部公告第235号《动物性食品中兽药最高残留限量》规定氯霉素不得检出。

本标准提供氯霉素残留快速检测方法，能快速检测禽畜产品及水产品中的氯霉素残留，以便及时发现问题，采取措施，控制高残留氯霉素禽畜产品和水产品上市，保障食品安全。同时，为佛山市农贸市场对禽畜产品及水产品中氯霉素残留量的快速检测提供技术依据。

禽畜产品及水产品中氯霉素残留的快速检测

1 范围

本标准规定了禽畜产品及水产品中氯霉素残留的快速检测方法。

本标准适用于畜、禽的尿样、动物组织（肝、肌肉）等中氯霉素残留的快速筛选测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/ T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

食药监科〔2017〕49号《总局关于规范食品快速检测方法使用管理的意见》

第一法 胶体金免疫层析法

3 原理

应用胶体金竞争抑制免疫层析法的原理，样品中残留的待测物与检测线上的待测物抗原共同竞争胶体金标记的特异性抗体，通过检测线与控制线颜色深浅比较，对样品中待测物的含量进行定性判定。

4 试剂与材料

4.1 除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水为 GB/T 6682 规定的至少三级的水。

4.2 提取剂。

4.3 样品复溶液。

4.4 氯霉素检测卡。

4.5 氯霉素标准液：采用具有标准物质证书的氯霉素标准液，具体纯度和不确定度以标准物质证书为准。

5 仪器设备

5.1 电子天平：感量 0.01g。

5.2 离心机： ≥ 4000 rpm。

5.3 涡旋振荡器。

5.4 微量移液器：单道 200 μ L、1000 μ L。

5.5 氮吹仪。

6 分析步骤

6.1 样品前处理

6.1.1 组织样品（畜禽肌肉、肝脏、水产品）：称取2g（精确至0.01 g）均质好的样本至15mL离心管中，加入3mL提取剂，用涡旋仪涡动2min，室温（20℃~25℃）下以3000r/min以上转速离心5min，移取全部

上清液（大约2mL）至10mL离心管中，于50℃～60℃水浴氮气流或空气流下吹干；加入200 μL样本复溶液，用涡旋仪涡动30s后待检。

6.1.2 水样：可以直接取用进行实验；如水样混浊，室温，4000r/min以上转速离心5 min后取用实验。

6.1.3 动物尿样：可以直接取用进行实验；如样品混浊，室温，4000r/min以上转速离心5min后取用实验。

6.2 测定

样品检测：取约100μL（或用滴管取2～3滴）待检液滴入氯霉素检测卡样品孔中，10min后开始观察结果，30min后结果无效。

7 质控实验

7.1.1 空白对照：取约100μL(或用滴管取2～3滴)样品复溶液滴入氯霉素检测卡样品孔中,5min～10min后开始观察结果，30min后结果无效。

7.1.2 阴性对照：取约100μL（或用滴管取2～3滴）阴性样品对照液（取2g阴性组织样品，若无阴性组织样品，取2mL纯净水或代替组织样品，其他制备过程参照6.1.1，水样和动物尿液可以直接用样品复溶液作为阴性对照液）滴入氯霉素检测卡样品孔中，5min～10min后开始观察结果，30min后结果无效。

7.1.3 阳性对照：取约100μL（或用滴管取2～3滴）氯霉素标准液滴入氯霉素检测卡样品孔中，5min～10min后开始观察结果，30min后结果无效。

7.1.4 每批检测试剂到货后，必须进行质控实验，如果质控实验不达标，不能投入使用。

7.1.5 每次实验样品超过30份，必须进行质控试验。

8 结果判定

8.1 观察步骤如图 1。

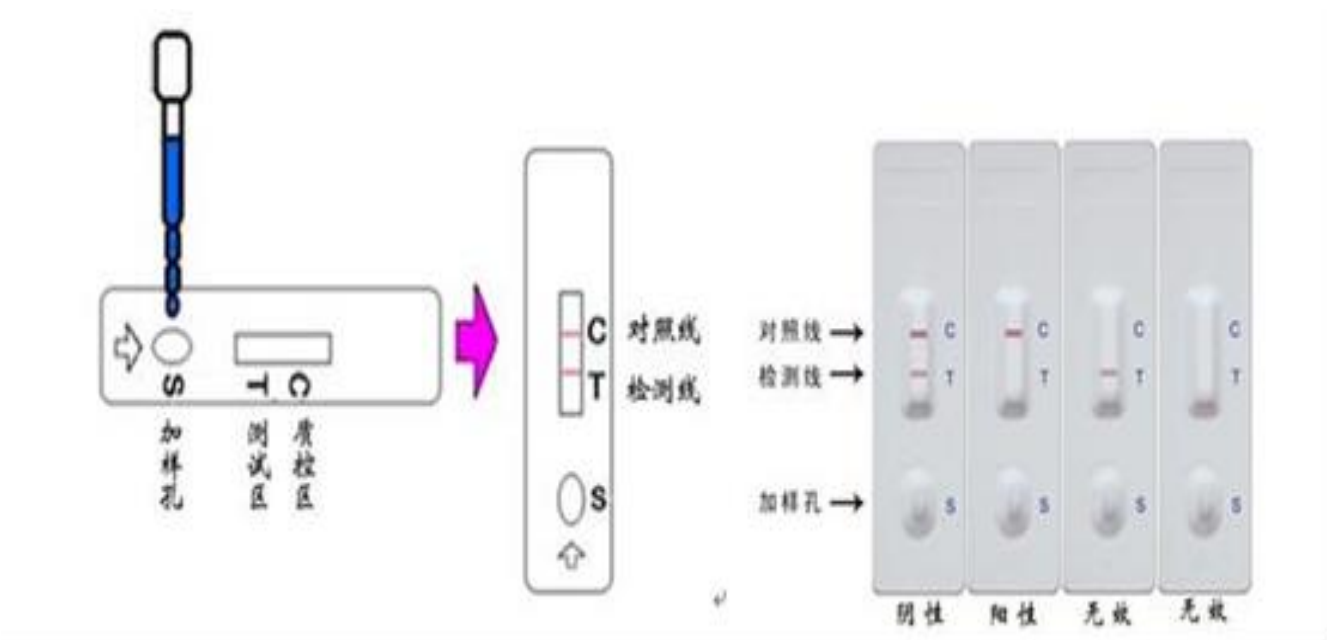


图1 检测结果判定图

8.2 阴性（—）：在规定时间内，只要 T 线（检测线）显色，检测结果为阴性，说明样品中氯霉素的含量低于检出限。

8.3 阳性(+)：C线(对照线)出线，T线(检测线)不显色，说明样品中氯霉素的含量高于或等于检出限。

8.4 无效：未出现C线，表示操作不正确或测试板已变质失效。在此情况下，应根据检测步骤对样品进行重新制备，并用新的测试卡重新试验。

9 检出限

本方法组织中检出限为 0.5μg/kg，水中检出限为 0.3μg/L，尿中检出限为 0.5μg/L。

10 特异性

应符合表1规定。

表1 胶体金免疫层析法特异性

编号	物质名称	交叉率(%)	编号	物质名称	交叉率(%)
1	氯霉素	100	4	氟甲砜霉素	<0.1
2	氯霉素碱	<0.1	5	甲砜霉素	<0.5
3	甲基氯霉素	<0.1	6	氟苯尼考	<0.1

第二法 酶联免疫法

11 原理

应用免疫学直接竞争法的原理，固相载体微孔板上包被有氯霉素抗原，加入待测氯霉素标准品或样品溶液及氯霉素酶标记抗体，包被在微孔板上的氯霉素抗原和标准品或样品中的氯霉素竞争性地与氯霉素酶标记抗体结合，形成复合物；再洗涤后加入显色剂，结合的酶标记物将无色的显色剂转化为蓝色的产物；加入反应终止液后使颜色由蓝色变为黄色；在450nm波长进行检测，样品中的氯霉素浓度与吸收光强度成反比。

12 试剂与材料

12.1 除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水为 GB/T 6682 规定的至少三级的水。

12.2 抗原包被板 8 孔×12 (包被有氯霉素半抗原与 OVA 偶联的抗原)。

12.3 复溶液。

12.4 酶标记物(辣根过氧化物酶标记氯霉素单克隆抗体)。

12.5 洗液。

12.6 底物缓冲液。

12.7 底物液。

12.8 终止液。

12.9 氯霉素标准品：标准物质要求是基准试剂，或者采用具有标准物质证书的氯霉素标准液或者标准品。氯霉素，纯度≥98%，具体纯度和不确定度以标准物质证书为准。

13 仪器设备

13.1 酶标仪(具有 450nm 波长)。

13.2 电子天平：感量 0.01g。

13.3 离心机。

13.4 微量移液器：单道 200μL、1000μL。

13.5 氮吹仪。

13.6 振荡器。

14 分析步骤

14.1 样品前处理

14.1.1 动物尿样（稀释倍数为1）。澄清样品可以直接取用进行实验，如样品混浊，室温，以5000 r/min 转速离心5min后取上清液进行实验。

14.1.2 组织（鸡肉，鱼肉，虾肉，猪肉）（稀释倍数为0.5）。称取3g（精确至0.01 g）均质好的样品，加入6 mL乙酸乙酯，震荡10min后，室温，以5000 r/min转速离心10min或2000 r/min转速离心15min；吸取上清液4 mL，40℃氮气吹干或旋转蒸发至干；加入1 mL正己烷涡旋振荡1min，溶解干燥物，再加入1 mL稀释好的复溶液复溶；以5000 r/min转速离心10 min后取下层清液大于80 μL进行实验。

14.1.3 肝脏（猪肝）（稀释倍数为1）。按14.1.2处理。

14.2 测定

14.2.1 加样：将所需数量的板条固定于板架，加80 μL样品或标准品到微孔板中，再加入20 μL酶标记物工作液到微孔板中，充分振荡混匀，用盖板膜盖好。

14.2.2 温育：置于室温（10~30℃）温育20min。

14.2.3 洗涤：弃去孔内液体，将稀释后的洗液注满各孔，静置30~60s，弃去孔内洗液。重复洗4次后拍干。

14.2.4 显色：每孔加入底物缓冲液50 μL，再加入底物液50 μL，振荡混匀（或将底物缓冲液和底物液以1:1比例混合后，再加入100 μL显色液），置室温（20~25℃）温育10 min。

14.2.5 终止：每孔加入终止液50 μL，轻拍混匀。

14.2.6 读值：用酶标仪读值，在单波长450 nm或双波长450nm/630 nm下读取各孔A值。

15 结果计算

利用试剂盒厂家配备软件绘制标准曲线并计算样品检测结果。

16 检测参数

16.1 灵敏度：0.025 μg/kg。

16.2 半抑制浓度（IC50）：≤0.2 μg/kg。

16.3 标准曲线范围：0.025~2.025 μg/kg。

16.4 精确度：板内变异误差小于7%，板间变异误差小于10%。

16.5 准确性（回收率）：尿液、组织：100±20%。

17 检出限

样本定量检测下限：尿样0.025 μg/L，鸡肉/鸡肝、猪肉/猪肝、虾、鱼0.0125 μg/kg。

18 特异性

应符合表2规定。

表2 酶联免疫法特异性

编号	物质名称	交叉率（%）	编号	物质名称	交叉率（%）
1	氯霉素	100	4	氟甲砜霉素	<0.1
2	氯霉素碱	<0.1	5.	甲砜霉素	<0.5
3	甲基氯霉素	<0.1	6.	氟苯尼考	<0.1

方法三：荧光定量免疫层析法

19 原理

试剂卡采用免疫层析法，在试纸条 T 线上包被氯霉素抗原，并将氯霉素单克隆抗体标记在信号稳定的荧光蛋白上即为 Flu-Ab 复合物。检测时将样本与荧光液（含 Flu-Ab 复合物）混合并加入至试纸条层析。层析过程中，样本中的 CAP 与 T 线包被的 CAP-BSA 竞争结合 Flu-Ab 复合物。当样本中所含 CAP 越多，T 线上检测的 Flu 信号越弱。本试剂适用于动物组织中氯霉素的含量测定。

20 试剂与材料

- 20.1 除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水为 GB/T 6682 规定的至少三级的水。
- 20.2 样品提取液。
- 20.3 样品复溶液A。
- 20.4 样品复溶液B。
- 20.5 氯霉素荧光液。

21 仪器设备

- 21.1 电子天平：感量 0.01g。
- 21.2 离心机： $\geq 4000\text{rpm}$ 。
- 21.3 涡旋振荡器。
- 21.4 微量移液器：单道 100 μL 、1000 μL 。
- 21.5 氮吹仪。
- 21.6 荧光免疫层析分析仪。

22 适用样品范围

适用于水样，畜、禽的尿样和鱼、虾、贝类等水产品中氯霉素残留的定量检测。

23 分析步骤

23.1 样品前处理

- 23.1.1 组织样品（畜禽肌肉、肝脏、水产品）（稀释倍数为1）：取100g以上去皮去脂肪有代表性的样品搅碎，称取2.0g均匀搅碎样品加入到10mL离心管中；加入4mL样品提取液，充分振荡混匀5min后，室温4000r/min，离心5分钟；吸取上清液2ml到5ml离心管中，于50-60℃水浴氮气（空气）下吹干；加入1ml样品复溶液A，500 μL 样品复溶液B，充分震荡摇匀1min；静置分层后，取下层清液60 μL 进行实验。
- 23.1.2 水样（稀释倍数为1）：可以直接取用进行实验；如水样混浊，室温，4000r/min以上转速离心5 min后取用实验。
- 23.1.3 动物尿样（稀释倍数为1）：可以直接取用进行实验；如样品混浊，室温，4000r/min以上转速离心5min后取用实验。

23.2 测定及结果判断

- 23.2.1 使用前将检测卡和 CAP 荧光液恢复至室温。
- 23.2.2 取已处理好的 60 μL 样本待测液于 1.5ml 离心管中，加入 60 μL CAP 荧光液（使用前需要充分摇匀），充分摇匀混合 30s 后，取 80 μL 滴入荧光定量层析卡中。

23.2.3 加样后开始计时，15min后将荧光定量层析卡插入荧光免疫层析分析仪中，按“快速测试”，10s后仪器显示定量检测结果，仪器使用参考仪器使用说明书。

24 性能指标

- 24.1 灵敏度：0.1 μg/kg。
- 24.2 标准曲线范围：0.1-1.0 μg/kg。
- 24.3 精确度：批内变异误差小于 8%。
- 24.4 准确性（回收率）：尿液、组织：100±20%。

25 特异性

应符合表2规定。

表3 荧光定量免疫层析法特异性

编号	物质名称	交叉率（%）	编号	物质名称	交叉率（%）
1	氯霉素	100	4	氟甲砜霉素	<0.1
2	氯霉素碱	<0.1	5	甲砜霉素	<0.5
3	甲基氯霉素	<0.1	6	氟苯尼考	<0.1

26 验证试验

如被测样品中氯霉素检测结果为阳性时，应采用液相色谱-串联质谱法或气相色谱-串联质谱法等方法进行验证检测。

27 快速检测产品评价

- 27.1 检测试剂生产厂家应按《总局关于规范食品快速检测方法使用管理的意见》要求，委托具有资质的检测机构，通过盲样测试、平行送实验室检验等方式对产品进行评价，并将评价报告提供给采购方和试剂使用方。
- 27.2 评价结果显示不符合国家相应要求的，不得采购或应立即停止使用。