

FSLB/SJ

佛山市食用农产品快速检测联盟标准

FSLB/SJ 13—2018

畜禽产品及水产品中喹诺酮类药物残留 的快速检测方法

2018—06—08 发布

2018—06—28 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。

本标准主要起草单位：佛山市标准化协会、佛山市质量和标准化研究院、佛山职业技术学院、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。

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

本标准首次发布。

引 言

喹诺酮类 (Quinolones, QNs) 药物是人工合成的具有 1, 4-二氢-4-氧代喹啉-3-羧酸结构基本结构的一类抗菌兽药的总称, 主要包括恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、氟罗沙星等, 是近 20 年来迅速发展起来的一类十分重要的广谱抗生素, 能抑制细菌 DNA 螺旋酶, 抗菌谱广、高效、低毒、组织穿透力强。已成为兽医临床和水产养殖中最重要的抗感染药物之一, 被大量用于治疗、预防和促生长, 由于其耐药性和潜在的致癌性引起广泛的关注。由于喹诺酮类药物在预防和治疗过程中的不规范使用, 许多动物源性食品常存在该类药物的残留。喹诺酮类药物若在人体内残留蓄积, 可能引起人体的耐药性, 并能引起轻度胃肠道刺激或不适, 头痛、头晕、睡眠不良等, 大剂量或长期摄入可能引起肝损害。鉴于长期食用可能导致的健康危害, 我国农业部第 235 号公告规定动物肌肉组织中环丙沙星、恩诺沙星、达氟沙星、二氟沙星和恶喹酸的最高残留限量 (Maximum residue limit, MRL) 在 100~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。农业部公告第 2292 号规定禁止在食品动物中使用洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星等 4 种原料药的各种盐、脂及其各种制剂。”

本标准提供喹诺酮类残留快速检测方法, 能快速检测禽畜产品中的喹诺酮类药物残留, 以便及时发现, 采取措施, 控制高残留喹诺酮类畜禽产品及水产品的上市, 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喹诺酮类残留量的快速检测提供技术依据。

畜禽产品及水产品中喹诺酮类药物残留的快速检测方法

1 范围

本标准规定了禽畜产品及水产品中喹诺酮类药物残留的快速检测方法。

本标准适用于猪、牛、鸡等畜禽肌肉组织及鱼、虾、蟹等水产品中喹诺酮类药物的定性或定量筛查检测。

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，样品中残留的喹诺酮类药物与检测线上的喹诺酮类药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 喹诺酮类药物提取剂；
- 4.3 样品稀释液；
- 4.4 喹诺酮类药物检测卡；
- 4.5 喹诺酮类药物标准液：采用标准物质，并列出具体的喹诺酮种类和 CAS 编号，标准溶液由试剂盒提供。

5 仪器设备

- 5.1 电子天平：感量 0.01 g ；
- 5.2 离心机：≥4000 rpm/min ；
- 5.3 计时器 ；
- 5.4 微量移液器：单道 200 μL、1000 μL ；
- 5.5 氮（空）气吹干机；
- 5.6 涡旋仪；

5.7 匀浆机。

6 分析步骤

6.1 样品前处理

取10 g以上已去脂肪的有代表性的样品搅碎均质，称取4 g $\pm$ 0.05 g匀浆后的样品加入到15 mL离心管中。向离心管中准确加入3 mL喹诺酮类提取剂，将瓶塞盖紧密封，用涡旋仪涡动2 min。将样本以4000 rpm/min转速离心5 min，用长吸管吸取全部上清液体（约2 mL~2.5 mL）至10 mL离心管中，于50℃~60℃水浴氮气（空气）流下吹干。吹干后，加入0.3 mL的样品稀释液，用涡旋仪涡动1 min，待测。

6.2 测定

使用前将检测卡恢复至室温。从包装袋中取出检测卡和微孔，用移液器准确量取100 μ L待测液于微孔中，反复吹打3~5次，静置 2 min，取约100 μ L（或用滴管取2~3滴）混合均匀待测液体加至喹诺酮类药物检测卡样品孔中，5 min~10 min后开始观察结果，30 min后结果无效。

注意：滴加样品的滴管应一次性使用，防止出现交叉污染。

7 质控实验

7.1 空白对照：取约 100 μ L（或用滴管取 2~3 滴）样品稀释液滴入喹诺酮类药物检测卡样品孔中，5 min~10 min 后开始观察结果，30 min 后结果无效。

7.2 阴性对照：取约 100 μ L（或用滴管取 2~3 滴）阴性样品对照液（取 4 g $\pm$ 0.05 g 阴性组织样品，若无阴性组织样品，取 4 mL 纯净水代替组织样品，其他制备过程参照 6.1。水样可直接用样品稀释液作为阴性对照液滴入喹诺酮类药物检测卡样品孔中，5 min~10 min 后开始观察结果，30 min 后结果无效。

7.3 阳性对照：取约 100 μ L（或用滴管取 2~3 滴）喹诺酮类药物标准液滴入喹诺酮类药物检测卡样品孔中，5 min~10 min 后开始观察结果，30 min 后结果无效。

7.4 每批检测试剂到货后，应进行质控实验，如果质控实验不达标，不应投入使用。

7.5 每批次样品或每 30 个样品，应做一个质控试验。

8 结果判定

8.1 观察步骤如图 1。

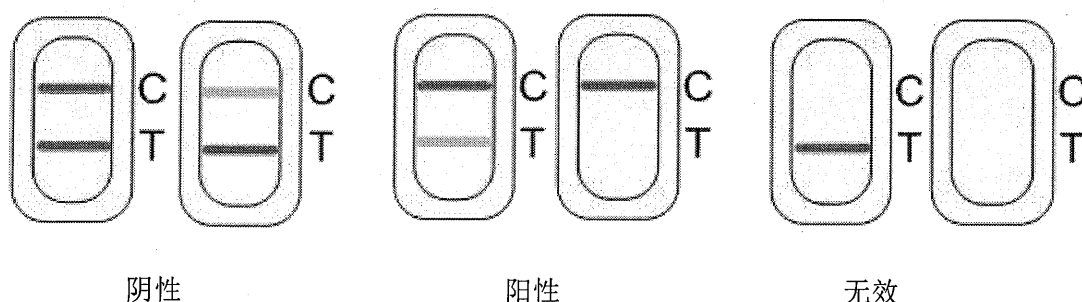


图1 检测结果判定图

8.2 阴性（-）：在规定时间内，若 T 线显色（检测线）比 C 线（质控线）深或一样深，说明样品中不含喹诺酮类药物或浓度低于检测下限。

8.3 阳性（+）：在规定时间内，若 T 线显色比 C 线浅，或 T 线无显色，表示样品中喹诺酮类药物浓度高于检测限，T 线显色越浅，表示样品中喹诺酮类含量越高。

8.4 无效：若质控线（C 线）不显色，表示存在不正确的操作过程或检测卡已变质失效。在此情况下，应再次仔细阅读说明书，并用新的检测卡重新测试。

9 检出限

本方法组织中检出限为诺氟沙星 5 $\mu\text{g/kg}$ ，恩诺沙星为 5 $\mu\text{g/kg}$ ，沙拉沙星为 5 $\mu\text{g/kg}$ ，达氟沙星为 5 $\mu\text{g/kg}$ ，环丙沙星为 5 $\mu\text{g/kg}$ ，双氟沙星 5 $\mu\text{g/kg}$ ，培氟沙星 5 $\mu\text{g/kg}$ ，氧氟沙星 5 $\mu\text{g/kg}$ 。

10 注意事项

10.1 贮藏条件和有效期：检测卡储存条件为常温（4℃~30℃）下，阴凉避光干燥处，有效期为 12 个月，不得冻存。

10.2 使用前应将检测卡恢复至室温。

10.3 应尽量不触摸检测卡中央的白色膜面。

10.4 禁止使用过期的检测卡。

第二法 酶联免疫法

11 原理

酶联免疫法试剂盒基于间接竞争 ELISA 方法，在酶标板微孔条上预包被偶联抗原，样本中的残留物喹诺酮类药物和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗喹诺酮类药物抗体，加入酶标二抗后，用底物液显色，样本吸光值与其所含残留喹诺酮类药物的含量成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中喹诺酮类药物的残留量。

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 96 孔酶标板；
- 12.3 标准液：0 $\mu\text{g/Kg}$ 、1.2 $\mu\text{g/Kg}$ 、3.6 $\mu\text{g/Kg}$ 、10.8 $\mu\text{g/Kg}$ 、32.4 $\mu\text{g/Kg}$ 、100 $\mu\text{g/Kg}$ 标准液各 1 mL；
- 12.4 酶标记物：5.5 mL；
- 12.5 底物缓冲液：底物 A：6 mL，底物 B：6 mL；
- 12.6 抗体工作液：5.5 mL；
- 12.7 终止液：6 mL；
- 12.8 20 倍浓缩洗涤液：40 mL；
- 12.9 2 倍复溶液：50 mL；
- 12.10 无水乙醇；
- 12.11 正己烷：分析纯；
- 12.12 浓 HCl 溶液；

12.13 溶液配制:

- a) 0.15 M 盐酸溶液: 取 12.5 mL 浓盐酸, 加入去离子水中定容到 1000 mL;
- b) 样本提取液: 量取 10 mL 0.15M 盐酸溶液 (配液 1) 加入到 90 mL 无水乙醇中混合均匀;
- c) 复溶液: 将 5×复溶液用去离子水 5 倍稀释, 用于样本的复溶, 复溶液在 4 °C 环境可保存一个月。

13 仪器设备

13.1 酶标仪 (具有 450 nm 波长或 450 nm/630 nm 波长的酶标读数仪均可使用);

13.2 电子天平: 感量 0.01 g;

13.3 离心机;

13.4 微量移液器: 单道 200 μ L、1000 μ L;

13.5 氮吹仪;

13.6 振荡器;

13.7 均质器。

14 分析步骤

14.1 样本前处理

14.1.1 实验器具必须洁净并使用一次性吸头, 以避免污染干扰实验结果。

14.1.2 动物组织 (鸡肉、猪肉、鱼、虾、蟹) 处理方法:

- d) 称 2.00g $\pm$ 0.05 g 均质过的组织样本于 50 mL 离心管中;
- e) 加入 6 mL 样本提取液 (配液 2), 振荡 5 min, 室温下以 4000 r/min~5000 r/min 转速离心 10 min;
- f) 取 3 mL 清澈上层有机相至洁净干燥的 10 mL 玻璃试管中, 50 °C~60 °C 水浴氮气吹干;
- g) 用 1 mL 复溶工作液溶解干燥的残留物, 再加入 1 mL 正己烷, 振荡 2 min, 再加 1 mL 复溶液 (配液 3), 振荡 30 s, 然后把液体转移到 15 mL 离心管中, 室温下以 4000 r/min~5000 r/min 转速离心 5 min;
- h) 去除上层正己烷, 取下层水相 50 μ L 液体用于分析。样本稀释倍数: 2。

14.2 测定

14.2.1 试剂预处理: 将所需试剂从 4°C 冷藏环境中取出, 置于室温平衡 30 min 以上, 洗涤液冷藏时可能会有结晶需恢复到室温以充分溶解, 每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的微孔板及框架, 将不用的微孔板放入自封袋, 保存于 2°C~8°C。实验开始前, 用去离子水将 20×浓缩洗涤液按 20 倍稀释成工作洗涤液。

14.2.2 编号: 将样本和标准品对应微孔按序编号, 每个样本和标准品做 2 孔平行, 并记录标准孔和样本孔所在的位置。

14.2.3 加样反应: 加标准品或样本 50 μ L 到各自的微孔中, 然后加入 50 μ L 的抗体, 用盖板膜封板, 轻轻振荡 5 s 混匀。

14.2.4 温育: 置于室温 25 °C 反应 15 min~45 min。

14.2.5 洗涤: 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 用工作洗涤液 250 μ L 充分洗涤 5 次, 每次间隔 30 s, 用吸水纸拍干 (拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破)。

- 14.2.6 加酶标记物：加酶标记物 100 μL ，用盖板膜封板，轻轻振荡 5 s 混匀。
- 14.2.7 温育：置于室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min。
- 14.2.8 洗涤：小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用工作洗涤液 250 μL 充分洗涤 5 次，每次间隔 30 s，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破）。
- 14.2.9 显色：将底物液 A 与底物液 B 1:1 混合，每孔加入 100 μL ，轻轻振荡 5 s 混匀，25 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。
- 14.2.10 终止：每孔加入终止液 50 μL ，轻轻振荡混匀，终止反应。
- 14.2.11 读数：用酶标仪于 450 nm 处测定每孔吸光度值（建议用双波长 450/630 nm）。测定应在终止反应后 10 min 内完成。

15 结果计算

15.1 百分吸光率的计算

标准液或样本的百分吸光率等于标准液或样本的百分吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准液（0 $\mu\text{g/Kg}$ ）的吸光度值，再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = A / A_0 \times 100\%$$

A— 标准溶液或样本溶液的平均吸光度值；

A_0 —0 $\mu\text{g/Kg}$ 标准溶液的平均吸光度值。

15.2 标准曲线的绘制与计算

以标准液百分吸光率为纵坐标，对应的标准液浓度（ $\mu\text{g/Kg}$ ）的对数为横坐标，绘制标准液的半对数曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中待测物的实际浓度。

16 检测参数

- 16.1 灵敏度：试剂盒灵敏度：0.1ppb ($\mu\text{g/Kg}$)。
- 16.2 半抑制浓度 (IC_{50})： $\leq 10 \mu\text{g/kg}$ 。
- 16.3 标准曲线范围：0.1 $\mu\text{g/kg}$ ~ 8.1 $\mu\text{g/kg}$ 。
- 16.4 精确度：板内变异误差小于 7%，板间变异误差小于 10%。

17 检出限

样本定量检出限：组织（鸡肉、猪肉、鱼、虾）0.3 ppb~1 ppb ($\mu\text{g/Kg}$)。

18 注意事项

18.1 试剂贮藏及保存期

试剂盒于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期为 12 个月，避免冷冻。未使用完的预包被板条应置于有干燥器的封口袋中密封保存。

18.2 试剂使用

18.2.1 从冷藏环境中取出的试剂盒应平衡至室温后方可打开使用。

18.2.2 若 20 倍浓缩液出现结晶，应置于 37℃ 至溶解后使用。

18.3 洗板操作

洗板拍干后应立即进行下一步操作，避免出现板孔干燥的情况。混合应均匀，洗板应彻底。

18.4 温育要求：

在所有温育过程中，应用盖板膜封住微孔板，避免光线照射。

18.5 试剂盒试剂使用要求

不应交换使用不同批号试剂盒中的试剂。

18.6 试剂盒过期判断

空白对照的吸光度值小于 0.5 个单位 ($A_{450nm} < 0.6$) 时，表示试剂可能变质。不应使用过了有效期的试剂盒，显色液若有任何颜色表明变质，应当弃之。

18.7 安全注意事项

18.7.1 反应终止液有腐蚀性，应避免接触皮肤。

18.7.2 乙腈试剂有一定的毒性，氮吹仪的使用应在通风橱中进行。

18.8 可能对实验结果产生影响的因素

18.8.1 不充分的洗涤，如减少浸泡时间或洗液量不足。

18.8.2 洗板机针孔堵塞或位置调节不当，孔底洗液残留量过多。

18.8.3 加样量不准。

18.8.4 试验过程中出现交叉污染及酶结合物和其它试剂的污染。

18.8.5 没有使用正确的波长读数。

18.8.6 测试过程中出现反应孔的干燥。

18.8.7 用混浊的尿样没有离心、含有消毒水和各种微生物污染的尿样会带来不良结果。

19 快速检测产品评价

19.1 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。

19.2 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。