

中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告 — 20 — 2008

动物性食品中四环素类药物残留检测 酶联免疫吸附法

Determination of tetracyclines residue in animal food by immunoassay

132-xcp-01-0362
1/5
2008

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：刘智宏、叶妮、黄耀凌、郭文林、张纯萍、金银珍、王鹤佳。

本标准系首次发布的行业标准。

动物性食品中四环素类药物残留检测

酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了牛、猪、鸡的肌肉、猪的肝脏、牛奶和带皮鱼肌肉组织中四环素、金霉素、土霉素及多西环素残留检测的制样和酶联免疫吸附测定方法。

本标准适用于牛、猪、鸡的肌肉、猪的肝脏、牛奶和带皮鱼肌肉组织中四环素、金霉素、土霉素及多西环素残留量快速筛选检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 1.1—2001 标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则(ISO/IEC Directives, Part 3, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规则和试验方法

农业部农牧发[2003]1 号 兽药残留试验技术规范(试行)

农业部 235 号公告 动物性食品中兽药最高残留限量

3 制样

3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试牛奶。

分别取适量新鲜或冷冻的空白或供试牛、猪、鸡的肌肉、猪的肝脏和带皮鱼肌肉组织，绞碎并使均匀。

3.2 样品的保存

—20℃以下贮存。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试样中残留的四环素类药物经提取与结合在酶标板上的抗原共同竞争抗四环素类药物抗体上有限的结合位点，再通过酶标羊抗兔抗体反应，酶标记物将底物转化为有色产物，有色产物的吸光度值与试样中四环素、金霉素、土霉素及多西环素浓度成反比。

4.2 试剂和材料

以下所有试剂，除特别注明外，均为分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 氢氧化钠。

4.2.2 三氯乙酸。

4.2.3 无水甲醇。

4.2.4 草酸。

4.2.5 柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)。

- 4.2.6 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.2.7 乙二胺四乙酸二钠($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.2.8 草酸甲醇溶液(20 mmol/L)取草酸 1.8 g,加甲醇溶解并稀释至 1000 mL。
- 4.2.9 柠檬酸缓冲液:分别称取柠檬酸 12.9 g,磷酸氢二钠 10.9 g,乙二胺四乙酸二钠 37.2 g,加水 900 mL 溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 3.8,稀释至 1000 mL。
- 4.2.10 3%三氯乙酸溶液:称取三氯乙酸 30 g,加水溶解并稀释至 1000 mL。
- 4.2.11 氢氧化钠溶液(1 mol/L)取氢氧化钠 4.0 g,加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.2.12 四环素类药物检测试剂盒。
- 4.2.12.1 四环素类药物系列标准溶液。
- 4.2.12.2 酶标板。
- 4.2.12.3 抗四环素类药物抗体。
- 4.2.12.4 酶结合物。
- 4.2.12.5 底物。
- 4.2.12.6 标准液及样品稀释缓冲溶液。
- 4.2.12.7 洗液浓缩液。
- 4.2.12.8 底物缓冲溶液。
- 4.2.12.9 终止液。
- 4.3 仪器和设备
- 4.3.1 酶标读数仪(配备 450 nm 滤光片)。
- 4.3.2 天平:感量 0.01 g。
- 4.3.3 离心机。
- 4.3.4 微型振荡器。
- 4.3.5 pH 计。
- 4.3.6 固相萃取柱 C_{10} 100 mg/mL,含碳量 $\geq 16\%$ 。
- 4.3.7 微量移液器 单道 50 μL ,100 μL ;多道 50 μL ~250 μL 。
- 4.4 测定步骤
- 4.4.1 试料的制备
- 试料的制备包括:
- 取供试样品作为供试试料。
 - 取空白样品作为空白试料。
 - 取空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。
- 4.4.2 试样溶液的制备
- 4.4.2.1 牛奶
- 取适量牛奶用稀释液经 10 倍或 10 倍以上稀释后作为试样溶液供酶联免疫法测定。
- 4.4.2.2 组织样品提取方法
- 4.4.2.2.1 提取
- 称取于 10 000 r/min 匀浆 1 min 的试样 $2\text{g} \pm 0.05\text{g}$,加入柠檬酸缓冲液 8.0 mL,涡动混匀后,中速振荡 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。
- 4.4.2.2.2 净化
- C_{18} 固相萃取柱依次用无水甲醇 3 mL、水 2 mL 预洗。取备用液 5.0 mL 过柱,用水 2 mL 淋洗,挤

干。用 20 mmol/L 草酸甲醇溶液 1.0 mL 洗脱,挤干,收集洗脱液,摇匀,用稀释液 10 倍稀释后作为试样溶液供酶联免疫法测定。

4.4.2.3 组织样品提取方法二

称取于 10 000 r/min 匀浆 1 min 的试样 1 g±0.05 g,加 3% 三氯乙酸溶液(肌肉 4.0 mL,肝脏 9.0 mL),旋涡混匀,中速颠倒振荡 20 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 于 1.5 mL 离心管中,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 20 μL,混匀,加缓冲液 1(肌肉 180 μL,肝脏 380 μL)混匀,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为试样溶液。

4.4.3 测定

4.4.3.1 四环素类药物检测试剂盒回温至 18℃~30℃后使用,以下所有操作应在 18℃~30℃下进行。

4.4.3.2 洗液按 1 份洗液浓缩液+9 份水进行稀释。四环素标准溶液、抗四环素类药物抗体溶液、酶结合物、底物溶液等均按 1 份试剂+9 份缓冲液进行稀释和制备¹⁾,稀释液均现用现配。

4.4.3.3 依次向微孔中加入标准溶液或试样溶液 50 μL,稀释的抗体 50 μL²⁾,置微型振荡器上振荡 30 s,用封口膜封好,孵育 1 h³⁾。弃去孔内液体,将酶联板倒置在吸水纸上拍打,使孔内没有残余液体。每孔加入洗液 250 μL,弃去孔内液体,再将酶联板倒置在吸水纸上拍打,重复洗板 3 次。每孔加入稀释的酶结合物 100 μL,孵育 30 min,按上述方法洗板 3 次。每孔加底物溶液 100 μL,避光孵育 5 min~15 min。每孔加终止液 100 μL,在 450 nm 波长处测定吸光度值。

4.5 结果计算和表述

按式(1)计算百分吸光度值:

$$\text{百分吸光度值} = B/B_0 \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中:

B —— 为标准溶液或样品的平均吸光度值;

B_0 —— 为 0 浓度的标准溶液平均吸光度值。

以标准溶液中四环素浓度(μg/L)的常用对数为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线。根据试样溶液测得的百分吸光度值从标准曲线上得到相应的四环素类药物浓度,或用相应的软件计算,结果分别按式(2)计算牛奶、鸡肉、猪肉、猪肝、牛肉和鱼肉中四环素类药物残留量:

$$X = c \times f \div n \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X —— 试样中四环素类药物残留量,单位为 μg/kg 或 μg/L;

c —— 从标准曲线中得到试样中四环素类药物含量,单位为 μg/kg 或 μg/L;

f —— 为试样稀释倍数;

n —— 为交叉率⁴⁾。

表 1 不同药物的交叉反应率

药 物	交叉反应率
四环素	100
金霉素	约 100
多西霉素	约 76
土霉素	约 58

4.5.1 结果判定

- 1) 不同品牌试剂盒中试剂的稀释系数略有不同。
- 2) 不同品牌试剂盒中试剂的加入量略有不同。
- 3) 不同品牌试剂盒的孵育温度与时间略有不同。
- 4) 不同品牌试剂盒中各种药物交叉反应率略有不同。

临界值¹⁾按交叉反应率最低的药物(土霉素)计算。在空白牛奶、肌肉和肝脏组织中分别添加土霉素至 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$,各做 20 个平行样品进行测定,重复 3 次,计算含量平均值和标准差。临界值按式(3)计算:

$$L = \bar{X} - 1.64 \times S \dots\dots\dots (3)$$

式中:

L ——临界值;

\bar{X} ——空白添加样品中土霉素含量平均值;

S ——空白添加样品中土霉素含量的标准差。

如被测样品中四环素类药物残留量小于临界值时,判断为阴性;当检测结果大于等于临界值时,则结果可疑,应用确证法进行确证。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在牛奶中的检测限均低于 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

本方法在牛、猪、鸡的肌肉和带皮鱼肌肉组织中的检测限均低于 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法在猪肝组织中的检测限均低于 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5.2 准确度

本方法在牛奶中 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 添加浓度的回收率为 40%~120%。

本方法在牛、猪、鸡肌肉和带皮鱼肌肉组织中 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 40%~120%。

本方法在猪肝组织中 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 40%~120%。

5.3 精密度

本方法的批内变异系数 $CV \leq 20\%$,批间变异系数 $CV \leq 25\%$ 。

1) 不同品牌试剂盒及不同实验室的临界值略有不同。