附件6

动物源性食品中喹诺酮类物质的快速检测

胶体金免疫层析法

（征求意见稿）

1. 范围

本方法规定了动物源性食品中喹诺酮类物质的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于生乳、巴士杀菌乳、灭菌乳、猪肉、猪肝、猪肾中洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、二氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氟甲喹、恶喹酸残留的快速测定。

1. 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的喹诺酮类物质与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制了抗体和检测线（T线）上抗原的结合，从而导致检测线颜色深浅的变化，通过检测线与控制线（C线）颜色深浅比较，对样品中喹诺酮类物质进行定性判定。

1. 试剂和材料

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。

* 1. 试剂
     1. 乙腈。
     2. 甲酸。
     3. 分散固相萃取剂I：分别称取硫酸镁18g、醋酸钠4.5g放于研钵中研碎。
     4. 分散固相萃取剂II：分别称取硫酸镁27g、N-丙基乙二胺（PSA）4.5g放于研钵中研碎。
     5. 甲酸-乙腈溶液：98mL乙腈中加入2mL甲酸，混匀。
     6. 甲醇L。
     7. 稀释液：脱脂奶粉︰水（1︰10）。
  2. 参考物质

喹诺酮类参考物质的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量见表1，纯度≥99%。

表1 喹诺酮类参考物质的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子量 |
| 1 | 洛美沙星 | lomefloxacin | 98079-51-7 | C17H19F2N3O3 | 351.35 |
| 2 | 培氟沙星 | pefloxacin | 6159-55-3 | C17H20FN3O3 | 333.36 |
| 3 | 氧氟沙星 | ofloxacin | 82419-36-1 | C18H20FN3O4 | 361.37 |
| 4 | 诺氟沙星 | norfloxacin | 70458-96-7 | C16H18FN3O3 | 319.33 |
| 5 | 达氟沙星 | danofloxacin | 112398-08-0 | C19H20FN3O3 | 357.38 |
| 6 | 二氟沙星 | difloxacin | 5522-39-4 | C28H33N3F2 | 449.58 |
| 7 | 恩诺沙星 | enrofloxacin | 93106-60-6 | C19H22FN3O3 | 359.16 |
| 8 | 环丙沙星 | ciprofloxacin | 85721-33-1 | C17H18FN3O3 | 331.13 |
| 9 | 氟甲喹 | flumequine | 42835-25-6 | C14H12FNO3 | 261.25 |
| 10 | 恶喹酸 | oxolinic acid | 14698-29-4 | C13H11NO5 | 261.23 |

注：或等同可溯源物质。

* 1. 标准溶液的配制

3.3.1喹诺酮类物质标准储备液（1mg/mL）：分别精密称取喹诺酮类参考物质（3.2）适量，置于50mL烧杯中，加入适量甲醇（3.1.6）超声溶解后，用甲醇转入10mL容量瓶中，定容至刻度，摇匀，配制成浓度为1mg/mL的喹诺酮标准储备液。-20 ℃避光保存，有效期6个月。

3.3.2喹诺酮类物质标准中间液（1μg/mL）：分别吸取喹诺酮类标准储备液（1mg/mL）（3.3.1）100μL于100mL容量瓶中，用甲醇（3.1.6）稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为1μg/mL的喹诺酮类标准中间液。

* 1. 材料
     1. 金标微孔（含胶体金标记的特异性抗体）。
     2. 试剂条或检测卡。

1. 仪器和设备
   1. 移液器：100μL、200μL和1 mL。
   2. 涡旋混合器。
   3. 离心机：转速≥4000 r/min。
   4. 电子天平：感量为0.01 g。
   5. 孵育器：可调节时间、温度，控温精度±1℃。
   6. 读数仪。
   7. 氮吹仪。
   8. 环境条件：温度15℃～35℃，湿度≤80%（采用孵育器与读数仪时可不要求环境温度）。
2. 分析步骤
   1. 试样制备

液体乳直接用于测定，猪肉、猪肝、猪肾用组织捣碎机等搅碎后备用。

* 1. 试样的提取

5.2.1 生乳、巴士杀菌乳、灭菌乳

分别吸取同等体积的液体乳样品与稀释液混合后为待测液。

5.2.2 猪肉、猪肝、猪肾

准确称取2.5±0.01g均质后的组织样品于15mL离心管中，加入5mL甲酸-乙腈溶液（3.1.5），涡旋混合1min，振荡5min，4000rpm离心5min。将上清液2mL转入10mL 离心管中，分别加入0.6g分散固相萃取剂I(3.1.3)漩涡混合1min、再加入0.6g分散固相萃取剂II(3.1.4)后漩涡混合1min，静止分层后取1mL于10mL 离心管中，于氮吹仪60℃吹干后用1mL样品稀释液溶解作为待测液。

* 1. 测定步骤

5.3.1 检测卡测定步骤

5.3.1.1将检测卡平放入孵育器中。小心撕开检测卡的薄膜至指示线处，避免提起检测卡和海绵。

5.3.1.2用移液器取待测液（5.2）300μL，避免产生泡沫和气泡。竖直缓慢的滴加至检测卡两侧任意一侧的凹槽中，将粘箔重新粘好。

5.3.1.3盖上孵育器的盖子，孵育器上的计时器自动开始计时，红灯闪烁，孵育3分钟。

5.3.1.4 取出检测卡，不要挤压样品槽放于读数仪中，读数前保持样品槽一端朝下直到在读数仪上读取结果，或从孵育器上取出后直接目视法进行结果判定。

5.3.2试剂条与金标微孔测定步骤

吸取300μL待测液（5.2）于金标微孔（3.4.1）中，抽吸5～10次使混合均匀，将试剂条（3.4.2）吸水海绵端垂直向下插入金标微孔中，孵育5～8min，从微孔中取出试剂条，进行结果判定。

注：试剂条（或检测卡）具体检测步骤可参考相应的说明书操作。

* 1. 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

* + 1. 空白试验

称取空白试样，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

* + 1. 加标质控试验

准确称取空白试样（精确至0.01g）置于具塞离心管中，加入一定体积的诺氟沙星标准中间液，使诺氟沙星终浓度为6μg/kg，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

1. 结果判定
   1. 读数仪测定法

按读数仪说明书要求操作直接读取并进行结果判定，

* 1. 目视法

通过对比控制线（C线）和检测线（T线）的颜色深浅进行结果判定。目视判定示意图见图1。

* + 1. 无效

控制线（C线）不显色，表明不正确操作或试剂条/检测卡无效。

* + 1. 阴性

检测线（T线）颜色比控制线（C线）颜色深或者检测线（T线）颜色与控制线（C线）颜色相当，表明样品中喹诺酮类低于方法检测限，判定为阴性。

* + 1. 阳性

检测线（T线）不显色或检测线（T线）颜色比控制线（C线）颜色浅，表明样品中喹诺酮类的含量高于方法检测限，判定为阳性。

* 1. 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。



图1 目视判定示意图

1. 结论

当检测结果为阳性时，应对结果进行确证。

1. 性能指标
   1. 检测限：生乳、巴士杀菌乳、灭菌乳、猪肉、猪肝、猪肾中洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、二氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氟甲喹、噁喹酸为3μg/kg。
   2. 灵敏度：灵敏度应≥99%
   3. 特异性：特异性应≥95%。、
   4. 假阴性率：假阴性率应≤1%。
   5. 假阳性率：假阳性率应≤5%。

注：性能指标计算方法见附录A。

1. 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，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准为GB/T 21312-2007 《动物源性食品中14种喹诺酮药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》附录A

定性方法性能指标计算方法

表A.1 性能指标计算表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品情况a | 检测结果b | | 总数 |
| 阳性 | 阴性 |
| 阳性 | N11 | N12 | N1.=N11+N12 |
| 阴性 | N21 | N22 | N2.=N21+N22 |
| 总数 | N.1=N11+N12 | N.2=N21+N22 | N=N1.+N2.或N.1+N.2 |
| 显著性差异（х2） | χ2=（|N12-N21|-1）2/（N12+N21），  自由度（df）=1 | | |
| 灵敏度（p+，%） | p+=N11/N1. | | |
| 特异性（p-，%） | p-=N22/N2. | | |
| 假阴性率（pf-，%） | pf-=N12/N1.=100-灵敏度 | | |
| 假阳性率（pf+，%） | pf+=N21/N2.=100-特异性 | | |
| 相对准确度，%c | （N11+N22）/（N1.+N2.） | | |
| 注：  a由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果；  b由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。  N：任何特定单元的结果数，第一个下标指行，第二个下标指列。例如：N11表示第一行，第一列，N1.表示所有的第一行，N.2表示所有的第二列；N12表示第一行，第二列。  C为方法的检测结果相对准确性的结果，与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。 | | | |

本方法负责起草单位：黑龙江省质量监督检测研究院。

验证单位：国家农林副产品质量监督检验中心、国家乳制品质量监督检验中心、海南省药品检验所。

主要起草人：佟晓芳，杨光，赵平，陈薇薇，李春娟，姜金斗，王玉芝，陈坚。