

KJ

食品快速检验方法

KJ 202105

水产品中地西洋残留的快速检测 胶体金免疫层析法

2021-××-××发布

国家市场监督管理总局 发布

水产品中地西洋残留的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了水产品中地西洋胶体金免疫层析快速检测方法。
本方法适用于鱼、虾中地西洋的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中地西洋经有机试剂提取,固相萃取柱净化,浓缩复溶后,地西洋与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制抗体和检测卡中检测线(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,对样品中地西洋进行定性判定。

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(CH₃OH)。
3.1.2 乙腈(CH₃CN)。
3.1.3 二水合磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·2H₂O)。
3.1.4 十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)。
3.1.5 氯化钠(NaCl)。
3.1.6 合成硅酸镁吸附剂(MgO₃Si),125 μm~500 μm。
3.1.7 石墨化碳黑吸附剂(GCB),38 μm~125 μm。

注:合成硅酸镁吸附剂和石墨化碳黑吸附剂,颗粒较细,谨防吸入。

3.2 参考物质

地西洋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≥99%。

注:或等同可溯源物质。

表1 地西洋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
地西洋	Diazepam	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284.74

3.3 溶液配制

复溶溶液:磷酸盐缓冲液(10 mmol/L),称取 8.0 g 氯化钠(3.1.5)、2.77 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.4)、0.352 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.3),用水溶解并定容至 1 L。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 地西洋标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):精密称取地西洋参考物质(3.2)10 mg,精确至 0.01 mg,置于小烧杯中,用甲醇(3.1.1)溶解,定量转移至 100 mL 容量瓶中,再用甲醇(3.1.1)定容,摇匀,配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地西洋标准储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2 地西洋标准中间液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):精密量取地西洋标准储备液(3.4.1) 500 μL 加入 50 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容,摇匀,配制成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地西洋标准中间液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光保存,有效期 6 个月。

3.4.3 地西洋标准工作液(10 ng/mL):精密量取地西洋标准中间液(3.4.2)500 μL 加入 50 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容,摇匀,配制成 10 ng/mL 地西洋标准工作液,临用现配。

3.4.4 标准溶液为外部获取时,管理及使用应符合相关规定。

3.5 材料

3.5.1 地西洋胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔、胶体金检测卡,适用于水产品,按产品要求保存。

3.5.2 固相萃取柱:固相萃取柱套筒(12 mL 体积)中塞入筛板,称取 0.8 g 合成硅酸镁吸附剂(3.1.6)加入柱内,使填料密实且表面水平,再塞入筛板压实,即完成固相萃取柱制备。若用于检测虾、黄鳝等含色素的样品,则填料为 0.8 g 合成硅酸镁吸附剂(3.1.6)、0.1 g~0.2 g 石墨化碳黑吸附剂(3.1.7),混合均匀加入柱内,使填料密实且表面水平,再塞入筛板压实,制成固相萃取柱。或者使用同类商品化固相萃取柱。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量为 0.01 g 和 0.01 mg。

注:当实验室可获得符合规定的标准溶液时,无需配备感量为 0.01 mg 的天平。

4.2 离心机:转速 $\geq 4\ 000$ r/min。

4.3 移液器:量程为 10 μL 、200 μL 、1 mL、5 mL。

4.4 涡漩仪。

4.5 氮吹仪。

4.6 孵育器:可控温 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.7 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度 15 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $\leq 80\%$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

水产品取可食用部分,称取约 200 g 具有代表性的样品,充分均质混匀,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于一 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.2 试样提取

准确称取试样 2 g(精确至 0.01 g)于 15 mL 离心管中。加入 0.4 mL 水、6 mL 乙腈(3.1.2),涡漩混合 3 min。加入约 0.4 g 氯化钠(3.1.5),涡漩混合 30 s。4 000 r/min 离心 3 min,上清液备用。固相萃取柱(3.5.2)使用前加入 3 mL 乙腈(3.1.2),使乙腈流过并弃去以活化固相萃取柱。将离心管中上清液转移至固相萃取柱(3.5.2),过柱并用空气压力将柱内残留液体全部吹出,收集所有样液。样液于 40 °C~50 °C 水浴氮气吹干,加入 300 μ L 复溶液(3.3),涡漩混合 30 s,作为待测液。

注:可用洗耳球或其他等效装置产生空气压力。

6.3 测定步骤

测试前,将未开封的金标微孔和检测卡恢复至室温。吸取 200 μ L 待测液置于金标微孔(3.5.1)中,反复抽吸 4~5 次,使微孔中试剂充分混匀,于孵育器中 20 °C~25 °C 孵育 3 min。吸取 100 μ L 混匀液垂直滴于检测卡(3.5.1)加样孔中,于孵育器中 20 °C~25 °C 反应 5 min,根据示意图判定结果,在 1 min 内进行判读。

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。

空白试样应经参比方法检测且未检出地西洋。

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 15 mL 离心管中,加入 100 μ L 地西洋标准工作液(3.4.3),使试样中地西洋含量为 0.5 μ g/kg,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

7 结果判定要求

采用目视法对结果进行判读,目视判定示意图如图 1 和图 2 所示。

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。

7.1 比色法

7.1.1 无效

控制线(C 线)不显色,表明不正确操作或检测卡无效。

7.1.2 阳性结果

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,表明样品中地西洋含量高于方法检测限,判为阳性。

7.1.3 阴性结果

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,表明样品中地西洋含量低于方法检测限,判为阴性。

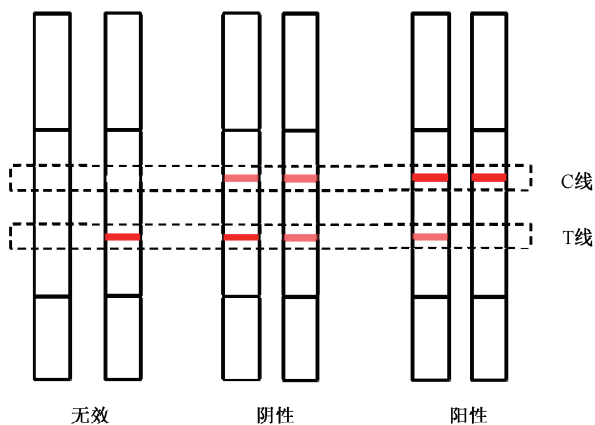


图 1 目视判定示意图(比色法)

7.2 消线法

7.2.1 无效

控制线(C线)不显色,表明不正确操作或检测卡无效。

7.2.2 阳性结果

控制线(C线)显色,检测线(T线)不显色,表明样品中地西洋含量高于方法检测限,判为阳性。

7.2.3 阴性结果

检测线(T线)与控制线(C线)均显色,表明样品中地西洋含量低于方法检测限,判为阴性。

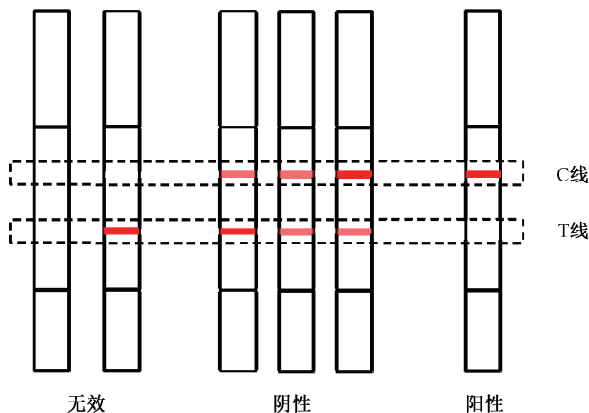


图 2 目视判定示意图(消线法)

7.3 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。

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 性能指标计算方法按照附录 A 执行。
- 9.2 检出限:0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。
- 9.3 灵敏度: $\geq 99\%$ 。
- 9.4 特异性: $\geq 95\%$ 。
- 9.5 假阴性率: $\leq 1\%$ 。
- 9.6 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,应对其进行考察,应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为 SN/T 3235—2012《出口动物源食品中多类禁用药物残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》(包括所有的修改单)。

附录 A

(规范性)

快速检测方法性能指标计算表

性能指标计算方法见表 A.1。

表 A.1 性能指标计算方法

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	N_{11}	N_{12}	$N_{1.} = N_{11} + N_{12}$
阴性	N_{21}	N_{22}	$N_{2.} = N_{21} + N_{22}$
总数	$N_{.1} = N_{11} + N_{21}$	$N_{.2} = N_{12} + N_{22}$	$N = N_{1.} + N_{2.}$ 或 $N_{.1} + N_{.2}$
显著性差异(χ^2)	$\chi^2 = (N_{12} - N_{21} - 1)^2 / (N_{12} + N_{21})$, 自由度(df) = 1		
灵敏度($p+$)/%	$p+ = N_{11} / N_{1.} \times 100$		
特异性($p-$)/%	$p- = N_{22} / N_{2.} \times 100$		
假阴性率($pf-$)/%	$pf- = N_{12} / N_{1.} \times 100 = 100 - \text{灵敏度}$		
假阳性率($pf+$)/%	$pf+ = N_{21} / N_{2.} \times 100 = 100 - \text{特异性}$		
相对准确度 ^c /%	$(N_{11} + N_{22}) / (N_{1.} + N_{2.}) \times 100$		
注：N 为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： N_{11} 表示第一行，第一列； $N_{1.}$ 表示所有的第一行， $N_{.2}$ 表示所有的第二列； N_{12} 表示第一行，第二列。			
^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。			
^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：江西省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、四川省食品药品检验检测院、天津海关动植物与食品检测中心、南昌海关技术中心、江西省产品质量监督检测院。

本方法主要起草人：张威、郭平、张文中、沈泓、姚欢、兰伟、王栋、肖亚兵、占春瑞、万承波、万建春。