



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202202

豆芽中甲硝唑的快速检测 胶体金免疫层析法

2022-12-05 发布

国家市场监督管理总局 发 布

豆芽中甲硝唑的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了豆芽中甲硝唑的快速检测胶体金免疫层析法。

本方法适用于绿豆芽、黄豆芽等豆芽中甲硝唑的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中甲硝唑经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制抗体和检测线(T线)上抗原的结合,从而导致检测线(T线)颜色深浅的变化。通过检测线(T线)与控制线(C线)颜色深浅比较,对样品中甲硝唑进行定性判定。

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 规定的三级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇(CH_3OH)。

3.1.2 盐酸(HCl , 37%)。

3.1.3 三羟甲基氨基甲烷($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$),即 Tris 碱。

3.2 试剂配制

3.2.1 盐酸溶液(2 mol/L):量取盐酸(3.1.2)16.7 mL,用水稀释至 100 mL。

3.2.2 提取液(pH=8.0, 0.1 mol/L):称取 12.1 g Tris 碱(3.1.3),加约 900 mL 水溶解,混匀,用盐酸溶液(3.2.1)调节 pH 至 8.0,用水定容至 1 L。

3.3 标准品

甲硝唑($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$, CAS 号:443-48-1):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 甲硝唑标准储备液(1 000 $\mu\text{g/mL}$):准确称取甲硝唑标准品(3.3)10 mg,用甲醇(3.1.1)溶解,全部转移至 10 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。—18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2 甲硝唑标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$):准确移取甲硝唑标准储备液(3.4.1)100 μL 置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准中间液。—18 $^{\circ}\text{C}$ 及以下避光保存,临用现配。

3.4.3 甲硝唑标准工作液(100 $\mu\text{g/L}$):准确移取甲硝唑标准中间液(3.4.2)100 μL 置于 10 mL 容量瓶

中,用甲醇(3.1.1)定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 $100\ \mu\text{g/L}$ 的标准工作液,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

甲硝唑胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔、试纸条或检测卡等。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 $0.0001\ \text{g}$ 和 $0.1\ \text{g}$ 。

4.2 移液器: $200\ \mu\text{L}$ 、 $1\ \text{mL}$ 、 $5\ \text{mL}$ 。

4.3 离心机:转速 $\geq 4\ 000\ \text{r/min}$ 。

4.4 涡旋混合器。

4.5 pH 计:测量精度 $0.02\ \text{pH}$ 单位。

4.6 孵育器。

4.7 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

环境温度 $10\ ^\circ\text{C}\sim 30\ ^\circ\text{C}$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取约 $500\ \text{g}$ 具有代表性的样品,将其剪碎成 $0.5\ \text{cm}\sim 1\ \text{cm}$ 长度的小段,均分成两份,分别装入洁净容器中作为试样和留样,密封,标记。留样置于 $-18\ ^\circ\text{C}$ 及以下保存。

6.2 试样提取

称取 $2\ \text{g}$ (精确至 $0.1\ \text{g}$)试样(6.1)于 $15\ \text{mL}$ 离心管中,加入 $3\ \text{mL}$ 提取液(3.2.2),涡旋振荡 $1\ \text{min}$, $4\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $2\ \text{min}$,上清液即为待测液。

6.3 测定步骤

缓慢滴加上述待测液 $100\ \mu\text{L}$ 至检测卡加样孔中,静置反应 $4\ \text{min}$,在 $8\ \text{min}$ 内对结果进行判定。

6.4 质控试验

每批快检试剂应同时进行空白试验和阳性质控试验。

6.4.1 空白试验

称取空白试样,按照 6.2 和 6.3 步骤与试样同法操作。

6.4.2 阳性质控试验

称取甲硝唑含量为 $5\ \mu\text{g/kg}$ 的质控样,或称取空白试样置于搅拌机中,加入适量甲硝唑标准工作液(3.4.3),使甲硝唑浓度为 $5\ \mu\text{g/kg}$,充分搅拌混匀,按照 6.2 和 6.3 步骤操作。

7 结果表示

根据读数仪/胶体金免疫层析试剂盒等说明书要求操作,并直接读数表示结果;或采用目视法观察结果。

7.1 目视结果

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。目视结果示意图见图 1。

7.1.1 无效结果

控制线(C线)不显色,无论检测线(T线)是否显色,均表示检测结果无效。

7.1.2 阳性结果

控制线(C线)显色,检测线(T线)不显色或比控制线(C线)颜色浅,表示试样中含有待测组分且其含量高于方法检出限,视为阳性。

7.1.3 阴性结果

控制线(C线)显色,检测线(T线)比控制线(C线)颜色深或者相当,表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检出限,视为阴性。

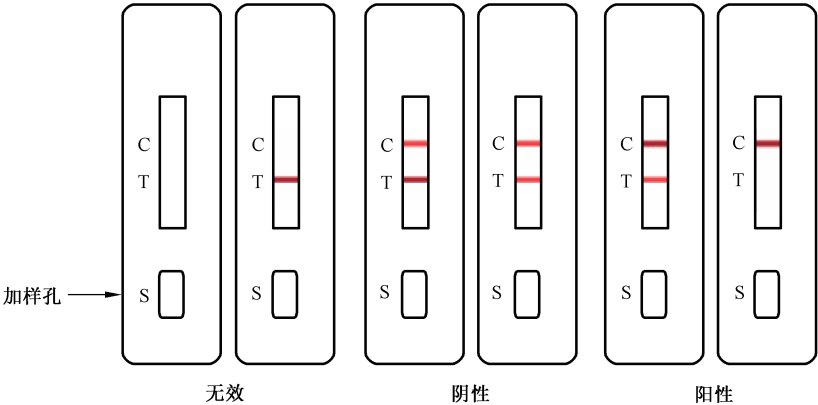


图 1 目视结果示意图

7.2 质控试验结果

空白试验测定结果应为阴性,阳性质控试验测定结果应为阳性。

8 结论

当测定结果为阳性时,应采用参比方法同时对硝基咪唑类药物进行确证。

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:5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.3 灵敏度： $\geq 95\%$ 。

9.4 特异性： $\geq 90\%$ 。

9.5 交叉反应率：地美硝唑、洛硝哒唑、羟基甲硝唑、羟甲基甲硝咪唑 $\leq 10\%$ ，异丙硝唑、2-硝基咪唑 $\leq 5\%$ 。

9.6 假阴性率： $\leq 5\%$ 。

9.7 假阳性率： $\leq 10\%$ 。

10 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，在使用本方法时不作限定。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，以满足或优于本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为现行有效的食品安全国家标准或食品补充检验方法。

附 录 A
(规范性)
定性方法性能指标计算表

定性方法各个性能指标计算方法见表 A.1。

表 A.1 定性方法性能指标计算表

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	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 样品中实际的公议值结果。			
^b 胶体金试纸条得到的结果。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：广东省食品检验所(广东省酒类检测中心)。

本方法验证单位：四川省食品检验研究院、广州市食品检验所、河南省食品检验研究院、华南农业大学、深圳市计量质量检测研究院、广东省药品检验所、广东省食品工业研究所有限公司。

本方法主要起草人：邓皇翼、刘耀慧、梁淑霞、汪廷彩、雷毅、黄丽娟、雷红涛、彭程、焦强。