



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202203

禽肉中金刚烷胺残留的快速检测 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

禽肉中金刚烷胺残留的快速检测 胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了鸡、鸭和鹅肉中金刚烷胺残留的快速检测胶体金免疫层析方法。

本方法适用于鸡、鸭和鹅肉中金刚烷胺残留的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中金刚烷胺与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制抗体和试纸条中检测线(T线)上抗原的结合,从而导致试纸条的检测线与控制线(C线)颜色深浅发生变化。通过比较检测线与控制线颜色的深浅,对样品中金刚烷胺残留进行快速定性检测。

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(CH_3OH)。
- 3.1.2 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$)。
- 3.1.3 正己烷(C_6H_{14})。
- 3.1.4 二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.5 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.6 氯化钠(NaCl)。
- 3.1.7 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 3.1.8 氯化钾(KCl)。
- 3.1.9 盐酸(HCl)。
- 3.1.10 氢氧化钠(NaOH)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 样本提取剂 A:称取 8.0 g 氯化钠(3.1.6)、0.2 g 磷酸二氢钾(3.1.7)、0.2 g 氯化钾(3.1.8)、2.9 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.5),加入约 500 mL 水溶解,再加入 6 mol/L 盐酸溶液 1.5 mL,加水定容至 1 L。
- 3.2.2 样本提取剂 B:称取 20.0 g 氢氧化钠(3.1.10),加入约 900 mL 水溶解混匀,加水定容至 1 L。
- 3.2.3 样本复溶液:磷酸盐缓冲液(10 mmol/L, pH 7.4),称取 8.0 g 氯化钠(3.1.6)、2.77 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.5)、0.352 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.4),用水溶解并定容至 1 L。

3.3 参考物质

金刚烷胺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,金刚烷胺纯度 $\geq 99\%$ 。

注:或等同可溯源物质。

表 1 金刚烷胺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
金刚烷胺	Amantadine	768-94-5	C ₁₀ H ₁₇ N	151.25

3.4 标准溶液配制

3.4.1 金刚烷胺标准储备液(100 μg/mL):准确称取 10 mg(精确至 0.01 mg)金刚烷胺(3.3)于烧杯中,用甲醇(3.1.1)溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)稀释至刻度,摇匀,制成 100 μg/mL 金刚烷胺标准储备液,−20 ℃以下保存,有效期 3 个月。

3.4.2 金刚烷胺标准中间液(1 μg/mL):精密移取金刚烷胺标准储备液(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 μg/mL 金刚烷胺标准中间液,−20 ℃以下保存,有效期 2 周。

3.4.3 金刚烷胺标准工作液(0.1 μg/mL):精密移取金刚烷胺标准中间液(3.4.2)5 mL 加入 50 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容,摇匀,配制成 0.1 μg/mL 金刚烷胺标准工作液,临用现配。

3.5 材料

免疫胶体金试剂盒(干燥、避光条件下保存,在产品有效期内使用)。

3.5.1 金标微孔。

3.5.2 试纸条或检测卡。

4 仪器和设备

4.1 涡旋混合器。

4.2 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.01 mg。

4.3 匀浆机。

4.4 样品浓缩仪。

4.5 移液器:100 μL、200 μL、1 mL、5 mL。

5 环境条件

温度 15 ℃~30 ℃,相对湿度≤80%。

6 分析步骤

6.1 试样制备

称取约 200 g 具有代表性的禽肉组织样品,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−20 ℃保存。

6.2 试样提取

准确称取试样 4 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 4 mL 样本提取剂 A(3.2.1),涡旋振荡 2 min,加入 2 mL 样本提取剂 B(3.2.2),涡旋振荡 30 s,最后加入 8 mL 乙酸乙酯(3.1.2),手动振荡混匀 30 s,静置 1 min,待溶液分层;准确吸取 4 mL 上清液于 10 mL 离心管中,于 60 ℃用样品浓缩仪吹干;加入 1 mL 正己烷(3.1.3),完全溶解后再加入 400 μL 样本复溶液(3.2.3),轻轻颠倒混匀,确保离心管壁

上的残留均能被样本复溶液混匀(请勿振荡)。静置 1 min,溶液分层后吸取下层液体用于检测。

6.3 测定步骤

测试前将未开封的检测卡和金标微孔恢复至室温。临用前从铝箔袋包装中取出检测卡及金标微孔平放于操作台面,用移液器吸取 120 μL 上述待测液于金标微孔中,反复轻轻吹吸混匀,室温(15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 30 $^{\circ}\text{C}$)静置反应 5 min,将反应液全部移取滴加到检测卡的加样孔中,静置反应 8 min 判定结果。

6.4 质控试验

每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。

6.4.1 空白试验

称取均质后的空白禽肉 4 g(精确至 0.01 g),按照 6.2 和 6.3 与试样同法操作。

6.4.2 加标质控试验

准确称取均质后的空白禽肉 4 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 具塞离心管中,加入 40 μL 金刚烷胺标准工作溶液(3.4.3),使试样中金刚烷胺浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按照 6.2 和 6.3 与试样同法操作。

7 结果判定

采用目视法观察结果。

7.1 目视法结果判定

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。

注:如使用其他方法进行结果表示,可在本条款基础上进行适当修改。

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,均表示试验结果无效。

7.1.2 阴性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)颜色深于或等于控制线(C 线),表示试样中待测组分含量低于方法检出限,视为阴性。

7.1.3 阳性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)不显色或颜色浅于控制线(C 线),表示试样中待测组分含量高于方法检出限,视为阳性。

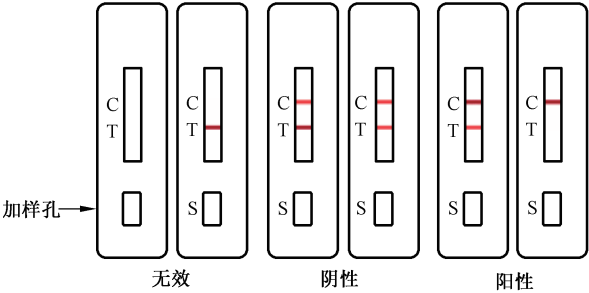


图 1 目视结果示意图

7.2 质控试验要求

空白试验检测结果应为阴性,加标质控试验检测结果应为阳性。

8 结论

本方法筛查出的阳性样品应按照 GB 31660.5—2019《食品安全国家标准 动物性食品中金刚烷胺残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限:1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 灵敏度: $\geq 95\%$ 。

9.3 特异性: $\geq 95\%$ 。

9.4 交叉反应率:金刚乙胺 $\leq 3\%$ 、美金刚 $\leq 89\%$,金刚烷甲酸、索金刚、利巴韦林、达氟沙星、喹乙醇、对乙酰氨基酚 $< 0.1\%$ 。

9.5 假阴性率: $\leq 5\%$ 。

9.6 假阳性率: $\leq 5\%$ 。

10 其他

本方法分析步骤和结果判定可以根据厂家试剂盒的说明书进行,但应符合或优于本方法规定的性能指标。

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,应对其进行考察,以满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准为 GB 31660.5—2019《食品安全国家标准 动物性食品中金刚烷胺残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》(包括所有的修改单)。

本方法可能与金刚乙胺和美金刚存在交叉反应,当结果判定为阳性应对结果进行确证。

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 金刚烷胺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:南昌大学。

本方法验证单位:中国检验检疫科学研究院、深圳海关食品检验检疫技术中心、江西省食品检验检测研究院、江西省农业科学院农产品质量与安全研究所、江西省分析测试中心。

本方法主要起草人:赖卫华、许秀丽、彭娟、王素花、霍茜、刘婷婷、许博舟、谢昀、张富生、杨琳芬。