



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202207

乳及乳制品中地塞米松的快速检测 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

乳及乳制品中地塞米松的快速检测
胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了乳及乳制品中地塞米松快速检测胶体金免疫层析法。
本方法适用于生牛乳、巴氏杀菌牛乳和脱脂巴氏杀菌牛乳中地塞米松的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理,样品中的地塞米松与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制了抗体和试纸条中检测线(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,对样品中地塞米松进行定性判定。

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 十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)。
- 3.1.3 二水合磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·2H₂O)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L):称取 71.6 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.2),加适量水溶解后定容至 1 L。
- 3.2.2 磷酸二氢钠溶液(0.2 mol/L):称取 31.2 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.3),加适量水溶解后定容至 1 L。
- 3.2.3 PBS 缓冲溶液 A(0.2 mol/L,pH=7.4):量取磷酸二氢钠溶液(3.2.2)19.0 mL,加入 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液(3.2.1)81.0 mL,混匀。
- 3.2.4 PBS 缓冲溶液 B(0.01 mol/L,pH=7.4):量取 50.0 mL PBS 缓冲溶液(3.2.3),加水至约 800 mL,用盐酸溶液调 pH 至 7.4,用水稀释至 1 L。

3.3 标准品

地塞米松标准品的中文名称、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 地塞米松的中文名称、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
地塞米松	Dexamethasone	50-02-2	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392.46

3.4 标准溶液配制

3.4.1 地塞米松标准储备液(1.0 mg/mL):准确称取 10 mg 地塞米松标准品(精确至 0.01 mg)(3.3),用甲醇(3.1.1)溶解并定容至 10 mL,摇匀。-20 ℃保存,有效期 3 个月。

3.4.2 地塞米松标准中间液(10 μg/mL):准确移取地塞米松标准储备液(1.0 mg/mL)(3.4.1)1 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容至刻度,摇匀。-20 ℃保存,有效期 1 个月。

3.4.3 地塞米松标准工作液(0.1 μg/mL):准确移取地塞米松标准中间液(3.4.2)1 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用 PBS 缓冲溶液 B(3.2.4)定容至刻度,摇匀,临用现配。

3.5 材料

地塞米松胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔、胶体金试纸条或检测卡及配套的试剂。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.01 mg。

4.2 涡旋混合器。

4.3 温育器。

4.4 pH 计。

4.5 移液器:10 μL、200 μL、1 mL。

4.6 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度:10 ℃~35 ℃;湿度:≤80%。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取 250 g 左右均匀试样装入洁净容器中作为测定用试样,4 ℃下密封保存。

6.2 测定步骤

吸取 200 μL 试样于金标微孔中,上下抽吸至孔底颗粒完全溶解,40 ℃温育条件下孵育 6 min。将试纸条样品端垂直向下插入金标微孔中,40 ℃温育条件下反应 6 min。从微孔中取出试纸条,弃去试纸条下端的样品垫,观察显色情况或使用读数仪读取,进行结果判定。

注 1:测定步骤(6.2)也可按照试剂盒说明书进行。

注 2:若试剂盒冷藏保存,使用前需恢复至环境温度。

注 3:若样品需冷藏保存,测定前恢复至环境温度。

6.3 质控试验

质控试验包括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塞米松及表 2 中相关兽药。

6.3.1 空白试验

空白试样按照 6.2 步骤与样品同法操作。

6.3.2 加标质控试验

称取空白试样 20 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 60 μL 地塞米松标准工作液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.3),使地塞米松的浓度为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,充分混匀后按照 6.2 步骤与样品同法操作。

注:更换快检试剂品牌、批次时,均应进行空白试验和加标质控试验。

7 结果判定

通过对比质控线(C线)和检测线(T线)的颜色深浅进行结果判定,见图 1 目视判定示意图。必要时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 无效

控制线(C线)不显色,无论检测线(T线)是否显色,表明操作不正确或试纸条已失效,检测结果无效。

7.2 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),表明试样中地塞米松含量高于方法检出限,判定为阳性。

7.3 阴性结果

控制线(C线)显色,检测线(T线)颜色深于控制线(C线)或与控制线(C线)颜色相当,表明试样中地塞米松含量低于方法检出限,判定为阴性。

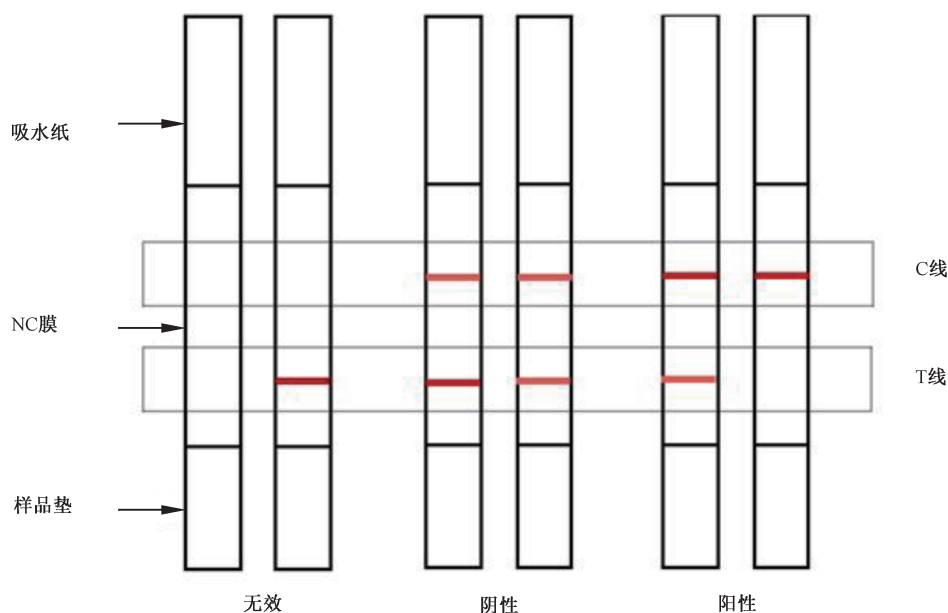


图 1 目视判定示意图

7.4 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

本方法与氟米龙、氟米松、倍他米松等兽药存在交叉反应,当测定结果为阳性时应采用参比方法同时对表 2 中相关兽药进行确证。

9 性能指标

- 9.1 检出限:0.3 μg/kg。
- 9.2 灵敏度:≥99%。
- 9.3 特异性:≥95%。
- 9.4 交叉反应率:本方法与氟米龙、氟米松、倍他米松等兽药存在交叉反应,相关兽药交叉反应情况详见表 2。

表 2 交叉反应结果表

交叉反应率(X)	兽药种类
$X \geq 60\%$	氟米龙、氟米松、倍他米松
$10\% \leq X < 30\%$	甲基泼尼松、甲基泼尼松龙
$1\% \leq X < 10\%$	氟氢可的松、泼尼松、倍氯米松、泼尼松龙
$0.1\% \leq X < 1\%$	氢化可的松、氟轻松、曲安西龙、醛固酮、可的松
$X < 0.1\%$	曲安奈德、丙酸倍氯他索、布地奈德、青霉素,头孢噻呋、恩诺沙星、环丙沙星、磺胺二甲嘧啶、四环素、土霉素、庆大霉素、林可霉素、氯霉素、氟苯尼考、三聚氰胺
注:性能指标计算方法见附录 A。	

- 9.5 假阴性率:≤1%。
- 9.6 假阳性率:≤5%。

10 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为了方便方法使用者,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时方可使用。

本方法参比标准为 GB/T 22978—2008《牛奶和奶粉中地塞米松残留量的测定 液相色谱—串联质谱法》(包括所有的修改单)、GB/T 21981—2008《动物源食品中激素多残留检测方法 液相色谱—质谱/质谱法》(包括所有的修改单)、农业部 1031 号公告-2—2008《动物源性食品中糖皮质激素类药物多残留检测 液相色谱—串联质谱法》(包括所有的修改单)。

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 地塞米松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。			

本方法起草单位:山东省食品药品检验研究院。

本方法验证单位:济宁市食品药品检验检测研究院、山东食安检测技术有限公司、中国食品药品检定研究院、山东农业大学、厦门海关技术中心、安徽省产品质量监督检验研究院。

本方法主要起草人:田洪芸、张海红、徐志祥、王骏、毕婷婷、魏可燕、傅骏青、周一冉、胡梅、郑红。