附件3

食品中罗丹明B的快速检测

胶体金免疫层析法（KJ201703）

1范围

本方法规定了食品中罗丹明B的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于辣椒粉和辣椒酱中罗丹明B的快速测定。

2原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中罗丹明B经有机试剂提取，固相萃取小柱净化，浓缩复溶后，罗丹明B与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制了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，对样品中罗丹明B进行定性判定。

3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。

3.1试剂

3.1.1正己烷。

3.1.2丙酮。

3.1.3甲醇。

3.1.4磷酸氢二钠。

3.1.5磷酸二氢钠。

3.1.6提取试剂：将正己烷与丙酮按照体积比80:20混匀。

3.1.7复溶液：称取35.61g磷酸氢二钠(3.1.4)置于1000ml容量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，制成0.2mol/L溶液A；称取31.21g磷酸二氢钠(3.1.5)置于1000ml容量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，制成0.2mol/L溶液B。将溶液A与溶液B按照体积比67:33混匀，制成pH7.1磷酸盐缓冲液。

3.2参考物质

罗丹明B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≥98.6%

表1 罗丹明B参考物质中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子量 |
| 罗丹明B | RhodamineB | 81-88-9 | C28H31C1N2O3 | 479.01 |

注：或等同可溯源物质。

3.3标准溶液配制

3.3.1罗丹明B标准储备液（1mg/mL）：精密称取适量罗丹明B参考物质（3.2），置于10mL容量瓶中，用甲醇（3.1.3）溶解并稀释至刻度，摇匀，制成浓度为1mg/mL的罗丹明B标准储备液。冷藏，有效期6个月。

3.3.2罗丹明B标准中间液A（1μg/mL）：精密量取罗丹明B标准储备液（1mg/mL）（3.3.1）0.1mL，置于100mL容量瓶中，用甲醇（3.1.3）稀释至刻度，摇匀，制成1μg/mL的罗丹明B标准中间液A。临用新制。

3.3.3罗丹明B标准中间液B（100ng/mL）：精密量取罗丹明B中间液A（1μg/mL）（3.3.2）1mL，置于10mL容量瓶中，用甲醇（3.1.3）稀释至刻度，摇匀，制成100ng/mL的罗丹明B标准中间液B。临用新制。

3.4材料

3.4.1固相萃取小柱：中性氧化铝柱，1000mg/6ml。

3.4.2免疫胶体金试剂盒（在2℃—8℃、干燥、避光条件下保存，在产品有效期内使用）。

3.4.2.1金标微孔。

3.4.2.2试纸条或检测卡。

4仪器和设备

4.1移液器：200μL、1mL和10mL。

4.2涡旋混合器。

4.3离心机：转速≥4000r/min。

4.4电子天平：感量为0.01g。

4.5振荡器。

4.6样品浓缩仪：如有需要。

4.7环境条件：温度：15℃—25℃，相对湿度≤60%。

5分析步骤

5.1试样制备

取具有代表性样品约500g，充分粉碎混匀，均分成两份，分别装入洁净容器作为试样和留样，密封，标记，于常温保存。

5.2试样提取和净化

准确称取试样2g（精确至0.01g）置于50mL具塞离心管中，依次加入20mL提取剂（3.1.6），振荡提取3min，以5000r/min离心5min。上清液待净化。

吸取5mL提取剂（3.1.6）于固相萃取小柱（3.4.1）中，流出液弃去。将上清液全部转移至固相萃取小柱中，流出液弃去。再加入20mL提取剂（3.1.6）淋洗固相萃取小柱，流出液弃去。用5mL甲醇洗脱小柱，收集洗脱液吹干。精密加入500µL复溶液（3.1.7），涡旋混合1min，作为待测液。

5.3测定步骤

5.3.1试纸条与金标微孔测定步骤

吸取200µL样品待测液于金标微孔（3.4.2.1）中，抽吸5—10次使混合均匀，室温温育5min；温育结束后，将试纸条（3.4.2.2）吸水海绵端垂直向下插入金标微孔中，室温温育5—8min，从微孔中取出试纸条，去掉试纸条下端的吸水海绵，进行结果判定。

5.3.2检测卡与金标微孔测定步骤

吸取全部样品待测液于金标微孔（3.4.2.1）中，抽吸5—10次使混合均匀，室温温育5min；温育结束后，将金标微孔中溶液滴加到检测卡（3.4.2.2）上的加样孔中，室温温育5—8min，进行结果判定。

5.4质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

5.4.1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。

5.4.2加标质控试验

准确称取空白样品2g或适量（精确至0.01g）置于50mL具塞离心管中，加入100μL或适量罗丹明B标准中间液B（100ng/mL）（3.3.3），使罗丹明B浓度为5μg/kg，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

6结果判定要求

通过对比控制线和检测线的颜色深浅进行结果判定。由于长时间放置会引起检测线颜色的变化，需在规定时间内进行结果判定。目视结果判读依据如图1所示。

6.1无效

控制线（C线）不显色，表明不正确操作或试纸条/检测卡无效。

6.2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，表明样品中罗丹明B含量高于方法检测限，判定为阳性。

6.3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，表明样品中罗丹明B含量低于方法检测限，判定为阴性。

6.4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。

7结论

当检测结果为阳性时，应对结果进行确证。

8性能指标

8.1检测限：罗丹明B为5μg/kg。

8.2灵敏度：灵敏度应≥99%。

8.3特异性：特异性应≥85%。

8.4假阴性率：假阴性率应≤1%。

8.5假阳性率：假阳性率应≤15%。

注：性能指标计算方法见附录A

9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SN/T 2430-2010《进出口食品中罗丹明B的检测方法》(包括所有修改单)。

附录A

快速检测方法性能指标计算表

表A.1 性能指标计算方法

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品情况a | 检验结果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+N21 | N.2=N12+N22 | N=N1.+N2.或N.1+N.2 |
| 显著性差异(χ2) | 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：山西省食品药品检验所。

验证单位：陕西省食品药品监督检验研究院、四川省食品药品检验检测院。

主要起草人：杨国伟、张烨、王媛媛、李倩。