

KJ

食品快速检验方法

KJ 202103

食用植物油中天然辣椒素的快速检测 荧光免疫层析法

××××-××-××发布

食用植物油中天然辣椒素的快速检测 荧光免疫层析法

1 范围

本方法规定了食用植物油中天然辣椒素的快速检测荧光免疫层析法。

本方法适用于菜籽油、大豆油、花生油、芝麻油、玉米油、葵花籽油、茶籽油、橄榄油、调和油等食用植物油中天然辣椒素的快速测定。

2 原理

试样中天然辣椒素与荧光标记的特异性抗体结合,抑制了抗体和试纸条中检测线上抗原的结合,用荧光速测仪测定荧光强度,荧光强度与试样中的天然辣椒素含量相关。根据荧光强度变化和内置曲线自动计算试样中天然辣椒素含量,进行定性判定。

3 试剂及材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,试验用水为 GB/T 6682 规定的二级水。

3.1 试剂及材料

- 3.1.1 甲醇(CH_3OH)。
- 3.1.2 二氯甲烷(CH_2Cl_2)。
- 3.1.3 石油醚:沸程 $60\text{ }^\circ\text{C}\sim 90\text{ }^\circ\text{C}$ 。
- 3.1.4 氢氧化钠(NaOH)。
- 3.1.5 浓硫酸(H_2SO_4)。
- 3.1.6 pH 试纸:1~14。

3.2 溶液配制

- 3.2.1 甲醇水(1+9)溶液:量取 10 mL 甲醇(3.1.1),加入到 90 mL 水中,混匀备用。
- 3.2.2 氢氧化钠溶液(0.5 mol/L):称取 20.0 g 氢氧化钠(3.1.4),加入 800 mL 水搅拌,待冷却至室温,用水定容至 1 000 mL。
- 3.2.3 硫酸(1+14)溶液:量取 10 mL 浓硫酸(3.1.5),缓慢加入到 140 mL 水中,混匀备用。

3.3 参考物质

天然辣椒素($\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$,CAS 号:404-86-4):纯度 $\geq 98\%$,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 标准储备液(0.1 mg/mL):准确称取 10 mg(精确至 0.1 mg)天然辣椒素标准品(3.3),用甲醇(3.1.1)溶解,配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 标准储备液。 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

3.4.2 标准工作溶液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确移取 100 μL 标准储备液(3.4.1)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容至 100 mL,配制成浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作溶液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

4 仪器及设备

- 4.1 荧光速测仪:可测定免疫试纸条的荧光强度,并显示食用植物油中天然辣椒素的测定结果。
- 4.2 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.1 mg。
- 4.3 涡漩混合器。
- 4.4 孵育器:(37.0 \pm 1.0) $^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.5 氮吹仪或空气吹干仪(带温度控制)。
- 4.6 天然辣椒素荧光免疫层析试剂盒:荧光微孔(含荧光标记的特异性抗体)、试纸条。需在阴凉、干燥、避光条件下保存。
- 4.7 移液器:10 μL 、100 μL 、1 mL。
- 4.8 离心机: \geq 4 000 r/min。

5 环境条件

环境温度:15 $^{\circ}\text{C}$ \sim 30 $^{\circ}\text{C}$;相对湿度: \leq 80%。

6 分析步骤

6.1 试样制备

室温条件下,取适量有代表性试样充分混匀。

6.2 试样提取

准确称取试样 2 g(精确至 0.01 g),置于 15 mL 具塞离心管中,加入 2 mL 二氯甲烷(3.1.2),再加入 2 mL 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(3.2.2),涡漩混匀 2 min,4 000 r/min 离心 2 min,取上层水相 1 mL,用硫酸溶液(3.2.3)调节 pH 至 5 \sim 6(约 0.15 mL \sim 0.25 mL),然后加入 2 mL 石油醚(3.1.3)涡漩混匀 1 min,取上清液 1 mL 置于玻璃试管内,氮吹仪或空气吹干仪(4.5)60 $^{\circ}\text{C}$ 吹至近干,加入 150 μL 10% 甲醇水(3.2.1)复溶,此为待测液,备用。

6.3 测定步骤

吸取 100 μL 上述待测液于荧光微孔中,抽吸至微孔的荧光标记颗粒完全溶解,荧光微孔置于孵育器(4.4)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。将试纸条插入荧光微孔 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min。从微孔中取出试纸条,除去试纸条下端的样品垫,用荧光速测仪(4.1)在 2 min 内完成检测。

注:当荧光速测仪检测出现“无效卡”提示时,视为无效检测。

6.4 质控试验

6.4.1 每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。

6.4.2 空白试验:不称取试样,按照 6.2 和 6.3 与试样同法操作。

6.4.3 加标质控试验:准确称取试样 2 g(精确至 0.01 g),置于 15 mL 具塞离心管中,加入 8 μL 的标准工作溶液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.2),使试样中天然辣椒素浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按照 6.2 和 6.3 与试样同法操作。

7 结果计算

7.1 结果表述

试样中天然辣椒素含量由荧光速测仪自动计算并定性判定,同时可给出定量结果,含量单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)。

7.2 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为阳性。

7.3 结论

试样中天然辣椒素含量高于 $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$,判为阳性,应对结果进行确证。

8 性能指标

8.1 性能指标计算方法按照附录 A 执行。

8.2 检出限: $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

8.3 灵敏度: $\geq 99\%$ 。

8.4 特异性: $\geq 90\%$ 。

8.5 假阴性率: $\leq 1\%$ 。

8.6 假阳性率: $\leq 10\%$ 。

9 其他

本方法测定步骤和结果也可以根据厂家检测试剂的说明书进行,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,应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 BJS 201801《食用油脂中辣椒素的测定》。

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 由天然辣椒素荧光层析检测方法得到的结果。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: 中国农业科学院油料作物研究所。

本方法参与验证单位: 中国检验检疫科学研究院、中国食品药品检定研究院、国家粮食和物资储备局科学研究院、中国肉类食品综合研究中心、湖北省食品质量监督检验研究院、重庆市公安局物证鉴定中心、武汉华美生物工程有限公司、成都市食品药品检验研究院。

本方法主要起草人: 李培武、马飞、王督、唐晓倩、陈颖、金绍明、张九凯、韩逸陶、曹进、谢刚、张忠、李莹莹、余箭翔、郭浩、吴文林、张奇。