附件3

保健食品中巴比妥类化学成分的快速检测

胶体金免疫层析法

（KJ201903）

1 范围

本方法规定了保健食品中巴比妥类化学成分的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于硬胶囊、软胶囊、丸剂、片剂、散剂及口服液等保健食品中巴比妥类化学成分的快速测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的巴比妥类化学成分经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制了抗体和检测线（T线）上抗原的结合，从而致使检测线不显色。通过检测线的显色与否判读，定性判定样品中是否含有巴比妥类化学成分。

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 无水乙醇。

3.1.2 提取液：将无水乙醇（3.1.1）与水按照体积比10:90混匀。

3.1.3 甲醇。

3.2 参考物质

3.2.1本方法所用巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥钠等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≥95%。

表1 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

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子量 |
| 巴比妥 | Barbital | 57-44-3 | C8H12N2O3 | 184.19 |
| 苯巴比妥 | Phenobarbital | 50-06-6 | C12H12N2O3 | 232.24 |
| 异戊巴比妥 | Amobarbital | 57-43-2 | C11H18N2O3 | 226.27 |
| 司可巴比妥钠 | Secobarbital | 76-73-3 | C12H17N2O3 | 238.28 |

注：或等同可溯源物质。

3.3 标准溶液的配制

3.3.1 巴比妥类标准储备液（0.5 mg/mL）：精密称取巴比妥（或苯巴比妥，异戊巴比妥，司可巴比妥钠）标准品（3.2.1）适量，置于10mL容量瓶中，加入适量甲醇（3.1.3）超声溶解后，用甲醇稀释至刻度，摇匀，制成浓度为0.5 mg/mL的巴比妥类标准储备液。﹣20 ℃避光保存，有效期6个月。

3.3.2 巴比妥类标准中间液（50 μg/mL）：精密量取巴比妥类标准储备液（0.5 mg/mL）（3.3.1）1mL，置于10mL容量瓶中，用甲醇（3.1.3）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为50 μg/mL的巴比妥类标准中间液。

3.4材料

3.4.1免疫胶体金免疫层析试剂盒，适用于保健食品硬胶囊、软胶囊、丸剂、片剂、散剂及口服液。

3.4.1.1检测卡。

4 仪器和设备

4.1 离心管：15mL。

4.2 涡旋混合器。

4.3 剪刀。

4.4 塑料吸管。

4.5 电子天平：感量为0.01 g。

4.6 离心机：转速≥4000r/min，转子配套15mL离心管。

4.7移液器：200μL

4.8环境条件：温度15℃～35℃，湿度≤80%。

5.分析步骤

5.1试样制备

取适量样品，硬胶囊及软胶囊取内容物充分混匀，丸剂及片剂充分粉碎混匀，散剂及口服液充分混匀。

5.2试样提取

准确称取试样2 g（精确至0.01 g）于15mL具塞离心管中，加入10mL提取剂（3.1.2）。加盖后振摇或涡旋振荡0.5 min，放置至澄清（30 min内）或4000 r/min离心5min，取上清液作为待测液，立即测定。

注：试样提取和净化（5.2）过程可按照试剂盒说明书操作，不做限定。

5.3 测定步骤

吸取200μL待测液滴加到检测卡（3.4.1.1）上的加样孔中，开始计时。3～8 min内观察质控线（C线）和检测线（T线）的显色情况，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

准确称取空白试样2 g（精确至0.01g）置于15mL具塞离心管中，加入一定体积的巴比妥类标准中间液（3.3.2），使巴比妥类化学成分添加浓度为：巴比妥40 mg/kg（或苯巴比妥40 mg/kg，异戊巴比妥60 mg/kg，司可巴比妥钠60 mg/kg）。按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

6.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，也可根据产品说明书进行。目视判定示意图见图1。

6.1 无效

控制线（C线）不显色，表明不正确操作或检测卡无效。

6.2 阴性结果

检测线（T线）和控制线（C线）均显色，表明样品中巴比妥类化学成分低于方法检测限，判定为阴性。

6.3 阳性结果

检测线（T线）不显色，控制线（C线）显色，表明样品中巴比妥类化学成分的含量高于方法检测限，判定为阳性。

 **阴性（-） 阳性（﹢） 无效**

图1 检测结果判读

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

巴比妥40mg/kg、苯巴比妥40mg/kg、异戊巴比妥60mg/kg、司可巴比妥钠60mg/kg。

8.2 灵敏度

灵敏度应≥96%。

8.3 特异性

特异性应≥98%。

8.4 假阴性率

假阴性率应≤4%。

8.5 假阳性率

假阳性率应≤2%。

8.6 相对准确度

相对准确度应≥96%。

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，分析步骤和结果判定可以根据厂家试剂盒的说明书进行。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《国家食品药品监督管理总局药品检验补充检验方法和检验项目批准件（批准件编号2009024）》和《保健食品中75种非法添加化学药物的检测BJS 201710》。

附录A

定性方法性能计算表

表A.1 性能指标计算方法

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品情况a | 检测结果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+N12 | N.2=N21+N22 | N=N1.+N2.或N.1+N.2 |
| 显著性差异(х2) | 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：山东省食品药品检验研究院、河北省药品检验研究院。

主要起草人：王子龙、董培智、裴晓芬、杨国伟、刘春霖、马春艳。