

KJ

食品快速检验方法

KJ 202102

水产品中组胺的快速检测

××××-××-××发布

国家市场监督管理总局 发布

水产品中组胺的快速检测

1 范围

本方法规定了水产品中组胺的快速检测方法。

本方法适用于水产品(鱼类等)中组胺的快速测定。

第一法 胶体金免疫层析法

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理,样品中的组胺经提取(或提取衍生)后与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制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(T线)与控制线(C线)颜色深浅比较,对样品中组胺进行定性判定。

3 试剂与材料

除非另有说明,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(C_2H_5OH)。

3.1.2 无水四氢呋喃(C_4H_8O)。

3.1.3 4-硝基苯甲酰氯($C_7H_4ClNO_2$)。

3.1.4 三羟甲基氨基甲烷($C_4H_{11}NO_3$),即 Tris。

3.1.5 盐酸(HCl,37%)。

3.2 试剂配制

3.2.1 70%乙醇溶液(体积分数):量取乙醇(3.1.1)700 mL,加水至 1 000 mL,混合均匀。

3.2.2 样品提取液:称取 12.1 g Tris(3.1.4),加 950 mL 70%乙醇(3.2.1)溶解,充分混匀后,用盐酸(3.1.5)调节 pH 值至 8.5,用 70%乙醇(3.2.1)定容至 1 000 mL。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒专用提取液。

3.2.3 样品稀释液:称取 12.1 g Tris(3.1.4),加 950 mL 水溶解,充分混匀后用盐酸(3.1.5)调节 pH 至 7.0,用水定容至 1 000 mL。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒专用稀释液。

3.2.4 样品衍生剂(100 mg/mL):称取 10 g 4-硝基苯甲酰氯(3.1.3),加 90 mL 无水四氢呋喃(3.1.2)溶解,用无水四氢呋喃(3.1.2)定容至 100 mL。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒专用衍生剂。

3.3 参考物质

组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,纯度 $\geq 97.0\%$ 。

注:或等同可溯源物质。

表 1 组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
组胺	Histamine	51-45-6	C ₅ H ₉ N ₃	111.15

3.4 标准溶液配制

组胺标准溶液(4 mg/mL):称取适量组胺参考物质(3.3),准确至 0.1 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度线,混匀,配成浓度为 4 mg/mL 的组胺标准溶液。在-20 °C 保存,有效期 6 个月。

注:组胺标准溶液的配制浓度以组胺单体计算,称取组胺参考物质时应进行折算。组胺参考物质:若为组胺(C₅H₉N₃,相对分子质量 111.15),称取 40 mg;若为组胺盐酸盐(C₅H₉N₃·2HCl,相对分子质量 184.07),称取 66 mg;若为组胺磷酸盐(C₅H₉N₃·2H₃PO₄·H₂O,相对分子质量 325.15),称取 117 mg。

3.5 材料

组胺胶体金免疫层析试剂盒:含胶体金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 0.000 1 g。
- 4.2 pH 计。
- 4.3 组织粉碎机。
- 4.4 涡漩混合器。
- 4.5 离心机:转速 $\geq 4\ 000$ r/min。
- 4.6 移液器:100 μ L、200 μ L、1 mL 和 5 mL。
- 4.7 读数仪(可选):产品配套可使用的检测仪器。

5 环境条件

- 5.1 温度 15 °C~30 °C。
- 5.2 空气相对湿度 $\leq 80\%$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

去头、骨、内脏、鱼皮,取约 100 g 肌肉,用组织粉碎机充分粉碎混匀,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-20 °C 保存。

6.2 试样提取

6.2.1 方法一(衍生测定法)

称取试样 2 g \pm 0.02 g 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 样品提取液(3.2.2),涡漩或剧烈振荡 3 min,4 000 r/min 离心 3 min,取 30 μ L 离心后的上清液,依次加入 1.0 mL 样品提取液(3.2.2)、50 μ L 样品衍生剂(3.2.4),充分混匀后,室温下静置 1 min,即为样品处理液,按以下稀释操作,获取待测液:

高组胺鱼类(指鲈鱼、鲹鱼、竹荚鱼、鲭鱼、鲣鱼、金枪鱼、秋刀鱼、马鲛鱼、青占鱼、沙丁鱼等青皮红肉海水鱼):取 40 μL 样品处理液,加入 2.0 mL 样品稀释液(3.2.3),混匀,即为待测液。

其他海水鱼类:取 40 μL 样品处理液,加入 1.0 mL 样品稀释液(3.2.3),混匀,即为待测液。

6.2.2 方法二(直接测定法)

称取试样 $2\text{ g}\pm 0.02\text{ g}$ 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 样品提取液(3.2.2),涡漩或剧烈振荡 3 min, 4 000 r/min 离心 3 min,上清液即为样品处理液,按以下稀释操作,获取待测液:

高组胺鱼类(指鲈鱼、鲹鱼、竹荚鱼、鲭鱼、鲣鱼、金枪鱼、秋刀鱼、马鲛鱼、青占鱼、沙丁鱼等青皮红肉海水鱼):取 30 μL 样品处理液,加入 2.0 mL 样品稀释液(3.2.3),混匀,即为待测液。

其他海水鱼类:取 60 μL 样品处理液,加入 2.0 mL 样品稀释液(3.2.3),混匀,即为待测液。

注:请根据所采用的检测卡选择对应的试样提取方法,试样提取可按照试剂盒说明书进行操作,不做限定。

6.3 测定步骤

测试前,将未开封的检测卡恢复至室温。吸取 60 μL ~120 μL 样品待测液于检测卡的加样孔中,室温温育 5 min~8 min,直接进行结果判定。

注 1:测定步骤建议按照试剂盒说明书。

注 2:结果判定建议使用读数仪,读数仪的具体使用参照仪器使用说明书。

6.4 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

6.4.1 空白试验

采用经参比标准 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》第一法 液相色谱法检测不含组胺的试样作空白试样。

称取空白试样,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

6.4.2 加标质控试验

称取空白试样 $2\text{ g}\pm 0.02\text{ g}$ 于 50 mL 离心管中,加入 100 μL 组胺标准溶液(4 mg/mL)(3.4),使组胺含量为 400 mg/kg(高组胺鱼类)或 200 mg/kg(其他海水鱼类),按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

7 结果判定

7.1 读数仪测定结果

按读数仪说明书要求操作,直接读数并进行结果判定。

7.2 目视判定

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。目视判定示意图见图 1。

7.2.1 无效

控制线(C线)不显色,无论检测线(T线)是否显色,均表示实验结果无效。

7.2.2 阳性结果

控制线(C线)显色,若检测线(T线)不显色或颜色浅于控制线(C线),表示试样中含有待测组分且其含量高于方法检出限,判为阳性。

7.2.3 阴性结果

控制线(C线)显色,若检测线(T线)颜色深于或等于控制线(C线),表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检出限,判为阴性。

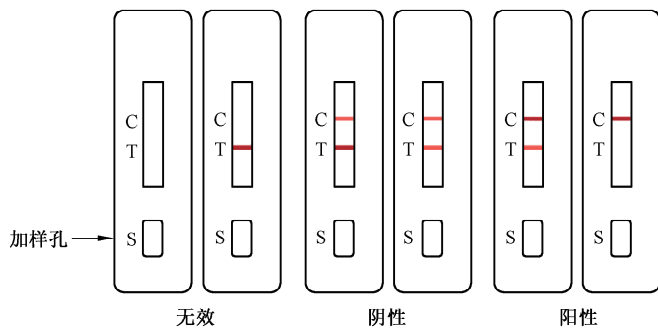


图 1 目视判定示意图

7.3 质控试验要求

空白试样测定结果应为阴性,加标质控样品测定结果应为阳性。

8 结论

当检测结果为阳性时,应对结果进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

高组胺鱼类 400 mg/kg,其他海水鱼类 200 mg/kg。

9.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 95\%$ 。

9.3 特异性

特异性 $\geq 85\%$ 。

9.4 假阴性率

假阴性率 $\leq 5\%$ 。

9.5 假阳性率

假阳性率 $\leq 15\%$ 。

注:性能指标计算方法见附录 A。

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,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 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》第一法 液相色谱法(包括所有的修改单)。

第二法 偶氮试剂法-比色卡法

11 原理

样品中的组胺经提取后,通过正戊醇萃取净化,再与偶氮试剂反应生成橙色化合物,其颜色的深浅在一定范围内与组胺含量成正相关,通过色阶卡进行目视比色,对样品中组胺进行定性判定。

12 试剂与材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

12.1 试剂

12.1.1 三氯乙酸($C_2HCl_3O_2$)。

12.1.2 氢氧化钠(NaOH)。

12.1.3 正戊醇($C_5H_{12}O$)。

12.1.4 盐酸(HCl,37%)。

12.1.5 碳酸钠(Na_2CO_3)。

12.1.6 对硝基苯胺($C_6H_6N_2O_2$)。

12.1.7 亚硝酸钠($NaNO_2$)。

12.2 试剂配制

12.2.1 三氯乙酸溶液(100 g/L):称取 10 g 三氯乙酸(12.1.1),用水溶解并稀释至 100 mL,有效期 6 个月。

12.2.2 氢氧化钠溶液(250 g/L):称取 25 g 氢氧化钠(12.1.2),用水溶解并稀释至 100 mL,有效期 3 个月。

12.2.3 盐酸溶液(1 mol/L):吸取 8.3 mL 盐酸(12.1.4),用水稀释至 100 mL,混匀,有效期 6 个月。

12.2.4 碳酸钠溶液(100 g/L):称取 10 g 碳酸钠(12.1.5),用水溶解并稀释至 100 mL,有效期 6 个月。

12.2.5 对硝基苯胺溶液(2.5 g/L):称取 0.5 g 对硝基苯胺(12.1.6),加 5 mL 盐酸(12.1.4)超声溶解,用水稀释至 200 mL,混匀,置于 4 °C 冰箱中保存,有效期 3 个月。

12.2.6 亚硝酸钠溶液(5 g/L):称取 1 g 亚硝酸钠(12.1.7),用水溶解并稀释至 200 mL,混匀,有效期

3 个月。

12.2.7 偶氮试剂:吸取 1 mL 对硝基苯胺溶液(12.2.5)和 8 mL 亚硝酸钠溶液(12.2.6),混匀,临用前配制。

12.3 参考物质

组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 2,纯度 $\geq 97.0\%$ 。

注:或等同可溯源物质。

表 2 组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 登录号	分子式	相对分子质量
组胺	Histamine	51-45-6	C ₅ H ₉ N ₃	111.15

12.4 标准溶液配制

12.4.1 组胺标准储备液(1 mg/mL):准确称取适量组胺参考物质(12.3),置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,混匀,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的组胺标准储备液,置于-20 °C 冰箱中保存,有效期 6 个月。

注:组胺标准溶液的配制浓度以组胺单体计算,称取组胺参考物质时应进行折算。组胺参考物质:若为组胺(C₅H₉N₃,相对分子质量 111.15),称取 10 mg;若为组胺盐酸盐(C₅H₉N₃·2HCl,相对分子质量 184.07),称取 17 mg;若为组胺磷酸盐(C₅H₉N₃·2H₃PO₄·H₂O,相对分子质量 325.15),称取 29 mg。

12.5 材料

水产品中组胺快速检测试剂盒(比色卡法),需置于 4 °C 冰箱中保存。

13 仪器和设备

13.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。

13.2 组织粉碎机。

13.3 离心机:转速 $\geq 4\ 000$ r/min。

13.4 涡漩混合器。

13.5 移液器:200 μ L、1 mL 和 5 mL。

14 环境条件

14.1 温度 15 °C~30 °C。

14.2 空气相对湿度 $\leq 80\%$ 。

15 分析步骤

15.1 试样制备

去头、骨、内脏、鱼皮,取约 100 g 肌肉,用组织粉碎机充分粉碎混匀,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-20 °C 保存。

15.2 试样提取

准确称取试样 $2\text{ g}\pm 0.02\text{ g}$ ，置于 15 mL 离心管中，加 5 mL 三氯乙酸溶液(12.2.1)，摇匀后，涡漩 2 min ， $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 3 min 。取上清液 0.5 mL 于 10 mL 离心管中，加入 0.2 mL 氢氧化钠溶液(12.2.2)，加入 2 mL 正戊醇(12.1.3)，涡漩 3 min ， $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 1 min 。取上清液 0.5 mL 于 10 mL 离心管中，加入 2 mL 盐酸溶液(12.2.3)，涡漩 3 min ， $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 1 min 。取下层液作为提取液。

注：试样提取可按照试剂盒说明书进行操作，不做限定。

15.3 测定步骤

准确吸取提取液 0.5 mL 于 5 mL 离心管中，加入 0.75 mL 碳酸钠溶液(12.2.4)摇匀，再加入 0.75 mL 偶氮试剂(12.2.7)混匀，放置 10 min 。与标准色阶卡目视比色， 10 min 内判读结果。需进行平行试验，两次测定结果应一致，即显色结果无肉眼可辨识差异。

15.4 质控试验

每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。用色阶卡和质控试验同时对检测结果进行控制。

15.4.1 空白试验

采用经参比标准 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》第一法 液相色谱法检测不含组胺的试样作空白试样。

称取空白试样，按照 15.2 和 15.3 步骤与试样同法操作。

15.4.2 加标质控试验

准确称取空白试样 $2\text{ g}\pm 0.02\text{ g}$ ，置于 15 mL 离心管中，加入 $400\ \mu\text{L}$ 组胺标准储备液(1 mg/mL) (12.4.1)，使试样中组胺含量为 200 mg/kg ，加入 4.6 mL 三氯乙酸溶液(12.2.1)，以下按 15.2 自“摇匀后，涡漩 2 min ……”起依次操作至 15.3 结束。

16 结果判定

观察待测液的颜色，与标准色阶卡比较判读样品中组胺的含量。颜色浅于检出限(200 mg/kg)则为阴性样品；颜色深于检出限的根据颜色的深浅进行判读。对于高组胺鱼类(鲐鱼、鲭鱼、竹荚鱼、鲭鱼、鲹鱼、金枪鱼、秋刀鱼、马鲛鱼、青占鱼、沙丁鱼等青皮红肉海水鱼)，当测定结果 $\geq 400\text{ mg/kg}$ 时，判定为阳性；对于其他海水鱼类，当测定结果 $\geq 200\text{ mg/kg}$ 时，判定为阳性。色阶卡见图 2。



图 2 组胺色阶卡

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与加标量相符。

17 结论

由于色阶卡目视判读存在一定误差,为尽量避免出现假阴性结果,读数时遵循就高不就低的原则。当测定结果为阳性时,应对结果进行确证。

18 性能指标

18.1 检出限

200 mg/kg。

18.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 95\%$ 。

18.3 特异性

特异性 $\geq 85\%$ 。

18.4 假阴性率

假阴性率 $\leq 5\%$ 。

18.5 假阳性率

假阳性率 $\leq 15\%$ 。

注:性能指标计算方法见附录 A。

19 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,在使用本方法时不作限定。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。色阶卡应确保在试剂盒保质期内不出现褪色或变色的情况。

本方法参比标准为 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》第一法 液相色谱法(包括所有的修改单)。

本方法可能与酪胺存在交叉反应,当结果判定为阳性时应对结果进行确证。

附录 A

(规范性)

定性方法性能指标计算表

表 A.1 规定了文件中定性方法各个性能指标的计算方法。

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 :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 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。			
^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。			

本方法牵头单位:厦门市食品药品质量检验研究院。

本方法胶体金免疫层析法起草单位:厦门市食品药品质量检验研究院。

胶体金免疫层析法验证单位:广东省食品检验所、深圳市计量质量检测研究院、南京工业大学(国家轻工业食品质量监督检测南京站)、广州市食品检验所、厦门市疾病预防控制中心。

本方法胶体金免疫层析法主要起草人:骆和东、叶雅真、徐振林、张志成、刘耀慧、张世伟、雷红涛、汪开银、王宇。

本方法偶氮试剂法起草单位:南京工业大学(国家轻工业食品质量监督检测南京站)。

本方法偶氮试剂法验证单位:厦门市食品药品质量检验研究院、江苏省食品药品监督检验研究院、江苏省产品质量监督检验研究院、江苏省理化测试中心、南京市产品质量监督检验院。

本方法偶氮试剂法主要起草人:熊晓辉、聂小林、汪开银、骆和东、徐春祥、周玮、高宏、肖有玉。