附件1

保健食品中西地那非和他达拉非的快速检测

胶体金免疫层析法

（KJ201901）

1. 范围

本方法规定了保健食品中西地那非和他达拉非的胶体金免疫层析快速筛查方法。

本方法适用于声称具有抗疲劳、调节免疫等功能的保健食品中西地那非和他达拉非成分的快速筛查。

1. 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的西地那非和他达拉非等物质经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和试纸条或检测卡中检测线（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，对样品中西地那非和他达拉非成分进行定性判定。

1. 试剂材料
   1. 试剂

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。

* + 1. 甲醇：色谱纯。
    2. 三羟甲基氨基甲烷，Tris碱。
    3. 浓盐酸。
    4. 吐温-20。
    5. 盐酸溶液：量取浓盐酸（3.1.3）16.7 mL，用水溶解并稀释至100 mL。
    6. 缓冲液：称取12.1 g Tris碱（3.1.2），加适量水溶解，混匀，用盐酸溶液（3.1.5）调节pH至8.0，加入5.0 g吐温-20（3.1.4）搅拌均匀，定容至1000 mL。
  1. 参考物质

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，纯度均≥99%。

表1 参考物质信息表

| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 西地那非 | Sildenafil | 139755-83-2 | C22H30N6O4S | 474.58 |
| 2 | 他达拉非 | Tadalafil | 171596-29-5 | C22H19N3O4 | 389.40 |

注：或等同可溯源物质。

* 1. 标准溶液配制
     1. 西地那非标准储备液（1.0 mg/mL）：精密称取适量西地那非参考物质（3.2），用甲醇（3.1.1）溶解并稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为1.0 mg/mL的标准储备液。-20℃避光保存，有效期1年。
     2. 西地那非标准工作液（10 μg/mL）：精密移取适量西地那非标准储备液（1.0 mg/mL）（3.3.1）分别置于10 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为10 μg/mL的标准工作液。-20℃避光保存，有效期3个月。
     3. 他达拉非标准储备液（0.5 mg/mL）：精密称取适量他达拉非参考物质（3.2），用甲醇（3.1.1）溶解并稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为0.5 mg/mL的标准储备液。-20℃避光保存，有效期1年。
     4. 他达拉非标准工作液（10 μg/mL）：精密移取适量他达拉非标准储备液（0.5mg/mL）（3.3.3）分别置于10 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为10 μg/mL的标准工作液。-20℃避光保存，有效期3个月。
  2. 材料

西地那非胶体金免疫层析试剂盒及配套的试剂（可选），适用基质为保健食品。

他达拉非胶体金免疫层析试剂盒及配套的试剂（可选），适用基质为保健食品。

1. 设备与仪器
   1. 设备
      1. 天平：感量为0.1 mg和0.01 g。
      2. 涡旋混合器。
      3. 移液器：20-200 μL，100-1000 μL，5 mL。
      4. 离心机：转速可达4000 r/min以上。
   2. 仪器
      1. 读数仪：产品配套可使用的检测仪器（可选）。
      2. 环境条件：温度10-40℃，相对湿度≤80%。
2. 分析步骤
   1. 试样制备

液体样品充分混匀，固体样品充分粉碎混匀。

* 1. 试样提取和净化
     1. 液体基质

量取0.5 mL±0.02 mL试样于15 mL离心管中，加入4 mL缓冲液（3.1.6），涡旋混合30 s，作为待测液。

* + 1. 固体基质
       1. 检测西地那非

准确称取试样0.5 g±0.01 g于15 mL离心管中，加1 mL甲醇（3.1.1），涡旋30 s，4000 rpm离心2 min或静置2 min。取250 µL上清液于2 mL离心管中，加入750 µL缓冲液（3.1.6），涡旋混合30s，作为待测液。

* + - 1. 检测他达拉非

准确称取试样0.5 g±0.01 g于15 mL离心管中，加1 mL甲醇（3.1.1），涡旋30 s，4000 rpm离心2 min或静置2 min。取200 µL上清液于15 mL离心管中，加入3 mL缓冲液（3.1.6），涡旋混合30 s，作为待测液。

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。

* 1. 测定步骤
     1. 试纸条与金标微孔测定步骤

吸取200 µL样品待测液于金标微孔中，抽吸5~10次使混合均匀，室温温育5 min；温育结束后，将试纸条吸水海绵端垂直向下插入金标微孔中，室温温育5 min，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。

注：测定步骤建议按照试剂盒说明书。

* + 1. 检测卡与金标微孔测定步骤

吸取200 μL上述待测液于金标微孔中，上下抽吸5~10次使混合均匀。室温温育5 min，将反应液全部加入到检测卡的加样孔中，将金标微孔中全部溶液滴加到检测卡上的加样孔中，温育5 min，进行结果判定。

注：测定步骤建议按照试剂盒说明书。

* 1. 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

* + 1. 空白试验

准确称取固体空白试样0.5 g±0.01 g或量取液体空白试样0.5 mL±0.02 mL于15 mL离心管中，按照5.2和5.3步骤与试样同法操作。

* + 1. 加标质控试验

准确称取固体空白试样0.5 g±0.01 g或量取液体空白试样0.5 mL±0.02 mL于15 mL离心管中，加入适量标准工作液（3.3.2），使西地那非参考物质浓度为1.0 µg/g或1.0 µg/mL，按照5.2和5.3步骤与试样同法操作。

准确称取固体空白试样0.5 g±0.01 g或液体空白试样0.5 mL±0.02 mL于15 mL离心管中，加入适量标准工作液（3.3.4），使他达拉非参考物质浓度为1.0 µg/g或1.0 µg/mL，按照5.2和5.3步骤与试样同法操作。

1. 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。目视判定示意图见图1。结果判定也可根据产品说明书进行。

* 1. 无效

控制线（C线）不显色，表明不正确操作或试纸条无效。

* 1. 阴性结果

控制线（C线）显色，检测线（T线）颜色比控制线（C线）颜色深或检测线（T线）颜色与控制线（C线）颜色相当，均表示样品中不含待测组分或含量低于方法检测限，判为阴性。

* 1. 阳性结果

控制线（C线）显色，检测线（T线）颜色比控制线（C线）颜色明显浅或检测线（T线）不显色，均表示样品中待测组分含量高于方法检测限，判为阳性。

* 1. 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。

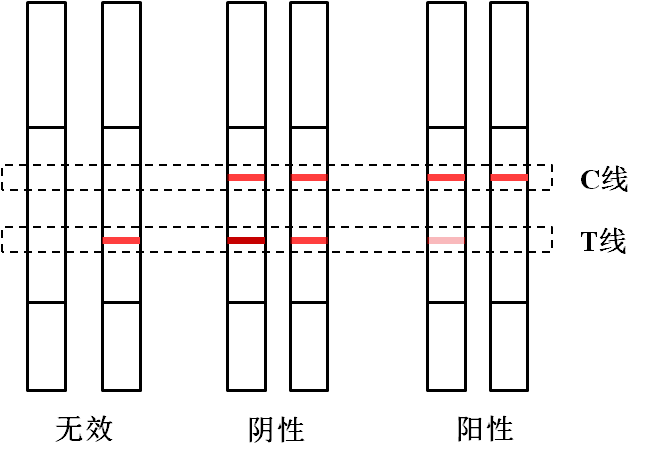


图1 目视判定示意图

1. 结论

当检测结果为阳性时，应对结果进行确证。

1. 性能指标
   1. 检出限

固体样品1.0 μg/g，液体样品1.0 μg/mL。

* 1. 灵敏度

灵敏度≥95%。

* 1. 特异性

特异性≥90%。

* 1. 假阴性率

假阴性率≤5%。

* 1. 假阳性率

假阳性率≤10%。

注：性能指标计算方法见附录A。

1. 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。但方法使用者应使用经过验证的满足本方法规定的各项性能指标的试剂、试剂盒。

本方法参比标准为食品补充检验方法BJS201710《保健食品中75种非法添加化学药物的检测》、药品检验补充检验方法2009030《补肾壮阳类中成药中PDE-5型抑制剂的快速检测方法》。

本方法使用西地那非试剂盒可能与那莫西地那非、豪莫西地那非、羟基豪莫西地那非、伪伐地那非、伐地那非、硫代艾地那非存在交叉反应；他达拉非试剂盒可能与氨基他达拉非、去甲基他达拉非存在交叉反应；当结果判定为阳性应对结果进行确证。

附录A

定性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（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：广东省食品检验所。

验证单位：江苏省南通市食品药品监督检测中心、南京工业大学。

主要起草人：刘海虹、申超群、邓皇翼、雷毅。