



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202201

粮食及其碾磨加工品中 T-2 毒素的快速检测 胶体金免疫层析法

2022-12-05 发布

国家市场监督管理总局 发 布

粮食及其碾磨加工品中 T-2 毒素的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了粮食及其碾磨加工品中 T-2 毒素的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于小麦、玉米和大米等粮食及其碾磨加工品中 T-2 毒素的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中 T-2 毒素经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和检测线(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 T-2 毒素进行定性判定。

3 试剂与材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈(CH_3CN)。

3.1.2 盐酸(HCl , 37%)。

3.1.3 三羟甲基氨基甲烷($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)，即 Tris 碱。

3.2 试剂配制

3.2.1 盐酸(1+1)溶液：量取适量的盐酸(3.1.2)缓慢加入到等体积的水中，搅拌混匀，冷却后待用。

3.2.2 提取液($\text{pH}=8.0$, 1 mol/L)：称取 121.14 g Tris 碱(3.1.3)，加约 900 mL 水溶解，混匀，用盐酸溶液(3.2.1)调节 pH 至 8.0，用水定容到 1 L。

3.3 标准品

T-2 毒素($\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_9$, CAS 号：21259-20-1)：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 T-2 毒素标准储备液(1 mg/mL)：准确称取 T-2 毒素标准品(3.3)10 mg，精确到 0.1 mg，用乙腈(3.1.1)溶解后，全部转移至 10 mL 容量瓶中，定容至刻度，制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 及以下避光保存，有效期 3 个月。

3.4.2 T-2 毒素标准工作液(10 $\mu\text{g/mL}$)：准确吸取 T-2 毒素标准储备液(3.4.1)100 μL 置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈(3.1.1)定容至刻度，摇匀，制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液，临用现配。

3.4.3 标准溶液为外部获取时，管理及使用应符合相关规定。

3.5 材料

T-2 毒素胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔、试纸条等。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.000 1 g 和 0.01 g。

4.2 移液器:10 μ L、200 μ L、10 mL。

4.3 研磨仪。

4.4 离心机:转速 $\geq$ 4 000 r/min。

4.5 涡旋混合器。

4.6 pH 计:测量精度 0.02pH 单位。

4.7 试样筛:孔径 1.0 mm。

4.8 孵育器。

4.9 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

环境温度 20 $^{\circ}$ C $\sim$ 35 $^{\circ}$ C。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取约 1 kg 具有代表性的样品,用研磨仪磨碎并全部通过试样筛,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于常温保存。

6.2 试样提取

称取粉碎混匀的样品 2.0 g(精确至 0.1 g)(6.1)于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 提取液(3.2.2),涡旋振荡 3 min,4 000 r/min 离心 2 min,上清液即为待测液。

6.3 测定步骤

吸取上述待测液 200 μ L 于金标微孔中,上下抽吸 5 次 $\sim$ 10 次直至微孔试剂混合均匀。温育 3 min,将试纸条插入到金标微孔中,反应 6 min 后,从微孔中取出试纸条,拭去下端的样品垫,在 15 min 内进行结果判定。

6.4 质控试验

每批快检试剂应同时进行空白试验和加标质控试验。

6.4.1 空白试验

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 T-2 毒素含量为 10 $\mu\text{g/kg}$ 的质控样,或称取空白试样置于研磨仪中,加入适量 T-2 毒素标准工作液(3.4.2),使 T-2 毒素的添加量为 10 $\mu\text{g/kg}$,充分研磨混匀,按照 6.2 和 6.3 步骤操作。

7 结果表示

根据读数仪/胶体金免疫层析试剂盒等说明书要求操作,并直接读数表示结果;或采用目视法观察结果。

7.1 目视结果

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。目视结果示意图见图 1。

7.1.1 无效结果

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。

7.1.2 阳性结果

控制线(C 线)显色,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,视为阳性。

7.1.3 阴性结果

控制线(C 线)显色,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,视为阴性。

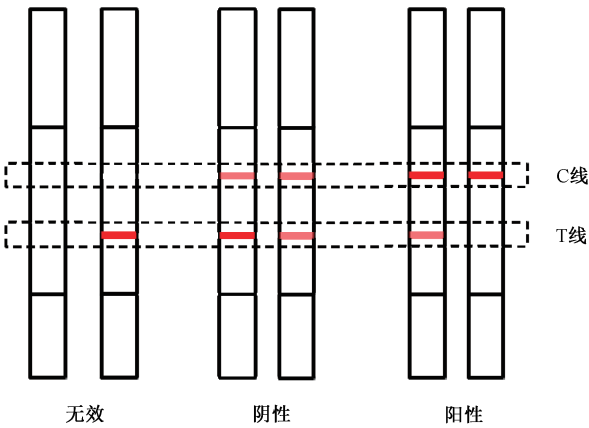


图 1 目视结果示意图

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应为阳性。

8 结论

当测定结果为阳性时,应采用参比方法对结果进行确证。

9 性能指标

9.1 性能指标计算方法按照附录 A 执行。

9.2 检出限: $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.3 灵敏度: $\geq 95\%$ 。

9.4 特异性: $\geq 95\%$ 。

9.5 交叉反应率: HT-2 毒素 $\leq 20\%$ 。

9.6 假阴性率: $\leq 5\%$ 。

9.7 假阳性率: $\leq 5\%$ 。

10 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,应对其进行考察,以满足本方法规定的各项性能指标。

T-2 毒素为剧毒物质,在标准溶液配制及试验过程中,应戴好手套、口罩做好防护,避免接触、吸入固体标准物质或尽量使用溶液标准物质。

本方法参比标准为 GB 5009.118—2016《食品安全国家标准 食品中 T-2 毒素的测定》(包括所有的修改单)。

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方法见表 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 胶体金试纸条得到的结果。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。			

本方法起草单位:广东省食品检验所(广东省酒类检测中心)。

本方法验证单位:广州市食品检验所、四川省食品检验研究院、河南省食品检验研究院、广东省药品检验所、广东省食品工业研究所有限公司。

本方法主要起草人:邓皇翼、蔡若纯、刘海虹、刘耀慧、雷毅、叶秋雄、邵曼、曹雅静。