



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202206

花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 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

花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测
胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测胶体金免疫层析法。
本方法适用于花生、水煮花生、烘烤花生、油炸花生和花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 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,样品中的黄曲霉毒素 B₁ 经提取与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制了抗体和试纸条中检测线(T 线)上抗原的结合,从而导致检测线(T 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,对样品中黄曲霉毒素 B₁ 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 规定的二级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 乙腈(C₂H₃N)。
- 3.1.2 无水乙醇(C₂H₆O)。
- 3.1.3 盐酸(HCl)。
- 3.1.4 三羟甲基氨基甲烷(C₄H₁₁NO₃, Tris)。
- 3.1.5 氯化钠(NaCl)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 乙醇-水溶液(1+1):分别量取 50 mL 无水乙醇(3.1.2)、50 mL 水,混匀。
- 3.2.2 盐酸溶液(1+1):量取 50 mL 盐酸(3.1.3)缓慢倒入 50 mL 水中,混匀。
- 3.2.3 样品稀释液:称取 121.14 g Tris(3.1.4),加入 600 mL 水,充分搅拌溶解后用盐酸溶液(3.2.2)调节 pH 至 8.5,向溶液中加入 10 g 氯化钠(3.1.5),充分搅拌至溶解,加水定容至 1 L。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒配套的稀释液。

3.3 标准品

黄曲霉毒素 B₁ 标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 1,纯度≥98%。
注:或等同可溯源物质。

表 1 黄曲霉毒素 B₁ 标准品的中文名称、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
黄曲霉毒素 B ₁	Aflatoxin B ₁	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.27

3.4 标准溶液配制

3.4.1 黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液(100 μg/mL):准确称取 2.5 mg(精确至 0.01 mg)黄曲霉毒素 B₁ 标准品于烧杯中,用乙腈(3.1.1)溶解后转移至 25 mL 容量瓶中,用乙腈(3.1.1)稀释至刻度,摇匀。—20℃避光保存,有效期 3 个月。

3.4.2 黄曲霉毒素 B₁ 标准工作液(1 μg/mL):准确量取黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液(100 μg/mL)(3.4.1)1 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用乙腈(3.1.1)稀释至刻度,摇匀。—20℃避光保存,有效期 3 个月。

3.5 材料

黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔、胶体金试纸条及配套的试剂。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.01 mg。

4.2 组织捣碎机。

4.3 涡旋混合器。

4.4 pH 计。

4.5 离心机:转速 $\geq 4\,000$ r/min。

4.6 移液器:100 μL、200 μL、1 mL、5 mL。

4.7 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度:15℃~40℃;湿度: $\leq 80\%$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 花生、水煮花生、烘烤花生、油炸花生

取具有代表性样品约 1 kg,用组织捣碎机将其充分粉碎,混合均匀后缩分至 100 g,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

6.1.2 花生酱

取代表性样品约 1 kg,对于袋装、瓶装等包装样品需至少采集 3 个包装(同一批次或号),用组织捣碎机混合均匀,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

6.2 试样提取

称取试样 5 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙醇-水溶液(3.2.1),涡旋混匀 5 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液待用。

吸取 100 μL 上清液于 5 mL 离心管中,加入 2 200 μL 样品稀释液(3.2.3),混匀后即待测液。

注:试样提取(6.2)也可按照试剂盒说明书进行。

6.3 测定步骤

吸取 200 μL 上述待测液于金标微孔中,抽吸至孔底颗粒完全溶解,室温条件下孵育 3 min。将试纸条样品端垂直向下插入金标微孔中,室温条件下反应 3 min。从微孔中取出试纸条,弃去试纸条下端的样品垫,观察显色情况,进行结果判定。

注 1: 测定步骤(6.3)也可按照试剂盒说明书进行。

注 2: 若试剂盒需冷藏保存,使用前恢复至环境温度。

6.4 质控试验

质控试验包括空白试验和加标质控试验。空白试样经参比方法检测且未检出黄曲霉毒素 B_1 、黄曲霉毒素 B_2 、黄曲霉毒素 G_1 、黄曲霉毒素 G_2 、黄曲霉毒素 M_1 。

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

称取空白试样 5 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 具塞离心管中,加入 100 μL 黄曲霉毒素 B_1 标准工作液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.2),使样品中黄曲霉毒素 B_1 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

注: 更换快检试剂品牌、批次时,均应进行空白试验和加标质控试验。

7 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,见图 1 目视结果示意图。必要时也可使用胶体金读数仪判读,读数仪的具体操作与判读原则参照读数仪的使用说明书。

7.1 无效结果

控制线(C 线)不显色,无论检测线(T 线)是否显色,表明操作不正确或试纸条已失效,检测结果无效。

7.2 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),表明样品中黄曲霉毒素 B_1 含量高于方法检出限,判定为阳性。

7.3 阴性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)颜色深于控制线(C 线)或与控制线(C 线)颜色基本一致,表明样品中黄曲霉毒素 B_1 含量低于方法检测限,判定为阴性。

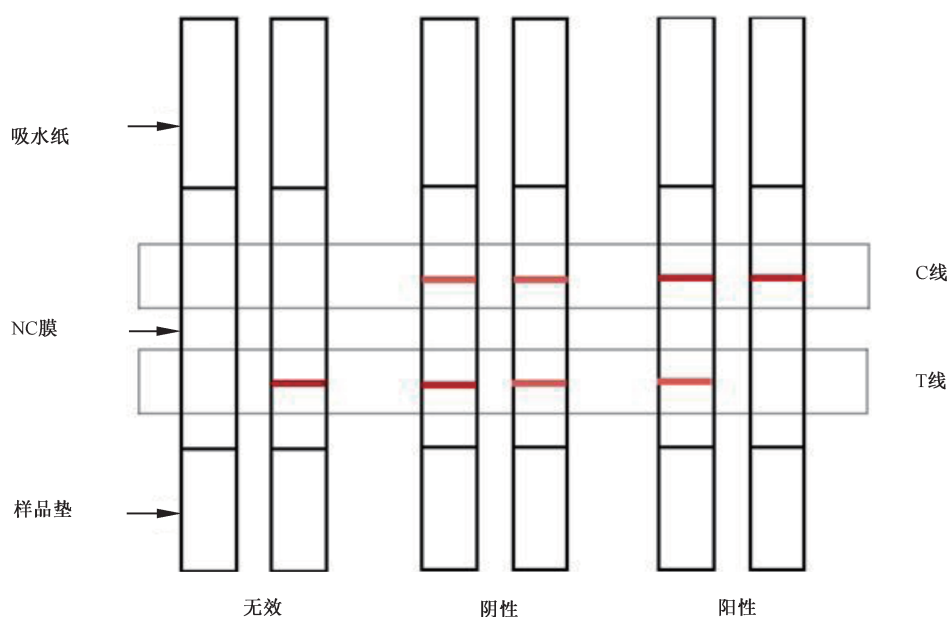


图 1 目视结果示意图

7.4 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。

8 结论

本方法与黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、黄曲霉毒素 M₁ 存在交叉反应,当检测结果为阳性时,应采用参比方法同时对黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、黄曲霉毒素 M₁ 进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限:20 μg/kg。

9.2 灵敏度:≥99%。

9.3 特异性:≥95%。

9.4 交叉反应率:本方法与黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、黄曲霉毒素 M₁ 的交叉反应率分别为 80%、80%、80%、20%;与赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇的交叉反应率均<0.1%。

9.5 假阴性率:≤1%。

9.6 假阳性率:≤5%。

10 其他

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,以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 GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》(包括所有的修改单)、GB 5009.24—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》(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 黄曲霉素 B ₁ 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:山东省食品药品检验研究院。

本方法验证单位:广东省食品检验所、山东食安检测技术有限公司、安徽省产品质量监督检验研究院、济宁市食品药品检验检测中心、中国食品药品检定研究院。

本方法主要起草人:田洪芸、毕婷婷、张海红、胡梅、王骏、魏可燕、周一冉、傅骏青、赵慧男。