

KJ

食品快速检验方法

KJ 202101

食品中赭曲霉毒素 A 的快速检测 胶体金免疫层析法

××××-××-××发布

国家市场监督管理总局 发布

食品中赭曲霉毒素 A 的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了食品中赭曲霉毒素 A 的快速检测胶体金免疫层析法。

本方法适用于谷物(燕麦除外)、葡萄酒、烘焙咖啡豆、研磨咖啡(烘焙咖啡)和速溶咖啡中赭曲霉毒素 A 的快速测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理,样品中的赭曲霉毒素 A 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,对样品中赭曲霉毒素 A 进行定性判定。

3 试剂与材料

3.1 试剂

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水为 GB/T 6682 规定的二级水。

- 3.1.1 甲醇。
- 3.1.2 乙腈。
- 3.1.3 无水乙醇。
- 3.1.4 盐酸。
- 3.1.5 三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)。
- 3.1.6 氯化钠。
- 3.1.7 氯化钾。
- 3.1.8 磷酸氢二钠。
- 3.1.9 磷酸二氢钾。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 甲醇-乙腈(50+50):分别量取 50 mL 甲醇(3.1.1)、50 mL 乙腈(3.1.2),混合均匀。
- 3.2.2 盐酸溶液(1+1):量取 50 mL 盐酸(3.1.4)缓慢倒入 40 mL 水中,定容至 100 mL,混匀。
- 3.2.3 谷物稀释液:称取 Tris 碱(3.1.5)242.28 g,加入 600 mL 水,充分搅拌溶解后用盐酸溶液(3.2.2)将 pH 值调节至 8.0,向溶液中加入氯化钠 20 g(3.1.6)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稀释液。
- 3.2.4 葡萄酒稀释液:称取 Tris 碱(3.1.5)242.28 g,加入 600 mL 的水,充分搅拌溶解后,用盐酸溶液(3.2.2)将 pH 值调节至 7.5,向溶液中加入氯化钠(3.1.6)20 g,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稀释液。
- 3.2.5 咖啡复溶液:分别称取氯化钠(3.1.6)160.0 g、氯化钾(3.1.7)4.0 g、磷酸氢二钠(3.1.8)71.6 g、磷

酸二氢钾(3.1.9)4.8 g 于 1 000 mL 烧杯中,加水充分搅拌溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶中定容。取上述溶液 50 mL 加入 950 mL 水混合均匀,即为咖啡复溶液。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒配套复溶液。

3.3 标准品

赭曲霉毒素 A 标准品:纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予有证标准物质证书的标准物质。其中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 1。

表 1 赭曲霉毒素 A 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
赭曲霉毒素 A	Ochratoxin A	303-47-9	$C_{20}H_{18}ClNO_6$	403.81

3.4 标准溶液配制

3.4.1 赭曲霉毒素 A 标准储备溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取适量的赭曲霉毒素 A 标准品(3.3)于烧杯中溶解后转移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇-乙腈(50+50)(3.2.1)溶解并稀释至刻度,摇匀,配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的赭曲霉毒素 A 标准储备液。在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,可使用 3 个月。

3.4.2 赭曲霉毒素 A 标准工作液 A(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确量取赭曲霉毒素 A 标准储备溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.1) 1 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇-乙腈(50+50)(3.2.1)稀释至刻度,摇匀。于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存,可使用 7 天。

3.4.3 赭曲霉毒素 A 标准工作液 B(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确量取赭曲霉毒素 A 标准工作液 A(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.2) 10 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇-乙腈(50+50)(3.2.1)稀释至刻度,摇匀。临用现配。

3.5 材料

赭曲霉毒素 A 胶体金免疫层析试剂盒:金标微孔(含胶体金标记的特异性抗体)、试纸条。需在阴凉、干燥、避光条件下保存。

4 设备与仪器

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.1 mg。

4.2 粉碎机。

4.3 涡漩混合器。

4.4 离心机: $\geq 4\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

4.5 移液器:100 μL 、200 μL 、1 mL、5 mL。

4.6 氮吹仪。

4.7 pH 计。

4.8 筛网:0.5 mm~1 mm 孔径。

5 环境条件

环境温度: $15\text{ }^\circ\text{C}\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$;相对湿度: $\leq 80\%$ 。

6 分析步骤

6.1 试样制备

谷物、烘焙咖啡豆:取具有代表性样品约 1 kg,用高速粉碎机将其粉碎,全部通过 0.5 mm~1 mm 孔径试验筛,过筛,混合均匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。

焙烤咖啡、速溶咖啡:取具有代表性样品约 1 kg,混合均匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。

葡萄酒:取代表性样品混合均匀。

6.2 试样提取

6.2.1 谷物

准确称取试样 5 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,依次加入 20 mL 水,1 mL 谷物稀释液(3.2.3),涡漩混匀 1 min 后静置 30 min,4 000 r/min 离心 3 min,上清液即为待测液。

6.2.2 葡萄酒

吸取 400 μL 试样于 5 mL 离心管中,依次加入 1 160 μL 水,40 μL 葡萄酒稀释液(3.2.4),涡漩混匀 30 s 后静置 30 min,混匀后的液体即为待测液。

6.2.3 烘焙咖啡豆、焙烤咖啡、速溶咖啡

准确称取试样 1 g(精确至 0.01 g),置于 15 mL 离心管中,加入 8 mL 无水乙醇(3.1.3),涡漩混匀 1 min 后静置 30 min,4 000 r/min 离心 3 min。取 1 mL 上清液,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹干。烘焙咖啡豆、焙烤咖啡加入 0.5 mL 咖啡复溶液(3.2.5),速溶咖啡加入 1 mL 咖啡复溶液(3.2.5),涡漩混匀 1 min,作为待测液。

注:试样提取(6.2)过程可按照试剂盒说明书操作。

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,室温条件下进行孵育:谷物孵育 3 min,葡萄酒孵育 3 min,烘焙咖啡豆、焙烤咖啡、速溶咖啡孵育 4 min。将试纸条吸水海绵端垂直向下插入金标微孔中,室温条件下谷物反应 3 min,葡萄酒反应 6 min,烘焙咖啡豆、焙烤咖啡、速溶咖啡反应 4 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。若试剂盒冷藏保存,使用前需恢复至实验环境温度。

注:测定步骤(6.3)也可按照试剂盒说明书进行。

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

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

谷物样品:准确称取空白样品 5 g(精确至 0.01g)置于 50 mL 具塞离心管中,加入 250 μL 赭曲霉毒

素 A 标准中间液 B($0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.3),使谷物中赭曲霉毒素 A 浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

烘焙咖啡豆、焙烤咖啡样品:准确称取空白样品 1 g(精确至 0.01 g)置于 15 mL 具塞离心管中,加入 $50 \mu\text{L}$ 赭曲霉毒素 A 标准中间液 B($0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.3),使焙烤咖啡豆、焙烤咖啡中赭曲霉毒素 A 浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

速溶咖啡样品:准确称取空白样品 1g(精确至 0.01 g)置于 15 mL 具塞离心管中,加入 $100 \mu\text{L}$ 赭曲霉毒素 A 标准中间液 B($0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$)(3.4.3),使速溶咖啡中赭曲霉毒素 A 浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

7 结果判定

通过对比质控线(C线)和检测线(T线)的颜色深浅进行结果判定,见图 1 目视判定示意图。

7.1 无效

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),表明样品中赭曲霉毒素 A 高于方法检测限,判为阳性。

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,表明样品中赭曲霉毒素 A 低于方法检测限,判为阴性。

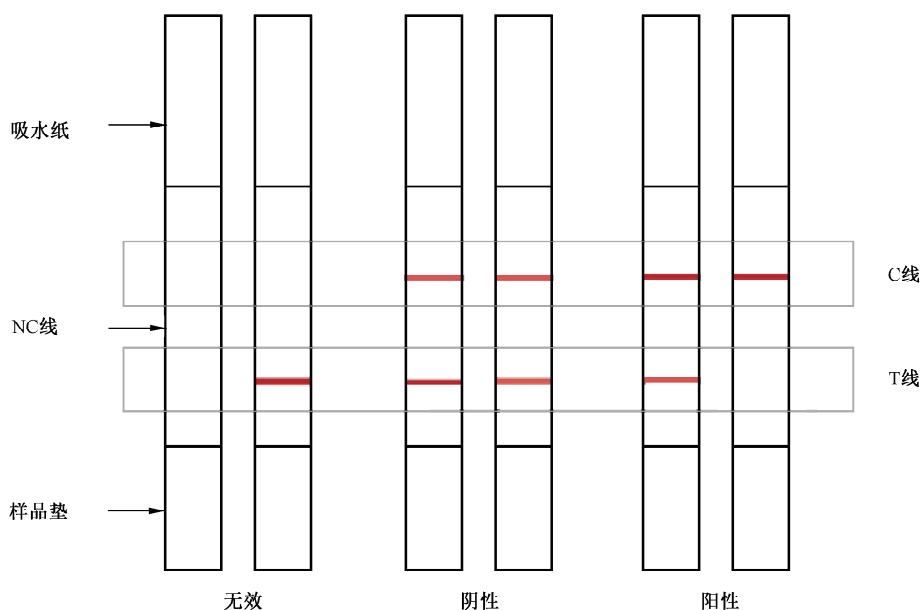


图 1 目视判定示意图

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

本方法筛查出的阳性样品应按照 GB 2761 指定方法标准进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

谷物为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;葡萄酒为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$;烘焙咖啡豆、焙烤咖啡为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;速溶咖啡为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 95\%$ 。

9.3 特异性

特异性 $\geq 95\%$ 。

9.4 假阴性率

假阴性率 $\leq 5\%$ 。

9.5 假阳性率

假阳性率 $\leq 5\%$ 。

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,须对其进行考察,应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 5009.96—2016《食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 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 :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 赭曲霉毒素 A 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:北京市食品安全监控和风险评估中心(北京市食品检验所)、广东省食品检验所、安徽省产品质量监督检验研究院、山东食安检测技术有限公司、国家粮食和物资储备局、河南省口岸食品检验检测所。

本方法主要起草人:田洪芸、张海红、王骏、毕婷婷、胡梅、任雪梅、叶金。