

ICS 67.060
B 20
备案号：44929—2014

LS

中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6108—2014

粮油检验 谷物中黄曲霉毒素 B₁ 的快速测定 免疫层析法

Inspection of grain and oils—Rapid test of aflatoxin B₁ in cereal—
Immuno-chromatography method

2014-04-28 发布

2014-06-01 实施

国家粮食局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国粮油标准化技术委员会(SAC/TC 270)归口。

本标准起草单位:湖北省粮油食品质量监测站、国家粮食局标准质量中心、北京市粮油食品检验所、重庆市粮油质量监督检验站、广西壮族自治区粮油质量监督检验站。

本标准主要起草人:熊宁、刘坚、杨卫民、郭健、柳永英、邹勇、彭超、刘利、刘勇、倪姗姗、吴莉莉。

粮油检验

谷物中黄曲霉毒素 B₁ 的快速测定

免疫层析法

1 范围

本标准规定了谷物中黄曲霉毒素 B₁ 的酶标记免疫层析法和胶体金免疫层析法的原理、试剂及材料、仪器及设备、样品制备、样品测定、结果判定。

本标准适用于大米、糙米、玉米等谷物中黄曲霉毒素 B₁ 的快速筛查。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 2761 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量

GB 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 酶标记免疫层析法

3.1 原理

本方法基于特异性抗原抗体反应和免疫层析技术,以酶作为载体,采用双抗夹心法的反应原理,样品经甲醇溶液提取,将提取液过滤或离心、稀释后,加入检测卡中,样品中黄曲霉毒素 B₁ 会与固相载体上的抗体结合后再与检测带上的酶标抗体结合,使检测带显色。通过检测带是否显色及显色时间长短来判定样品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

3.2 试剂及材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,实验室用水应符合 GB/T 6682 中一级水。

3.2.1 黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫检测卡¹⁾:检测卡的性能应满足附录 A 的要求。不同品牌不同批次的检测卡使用前,应按照附录 A 进行检测卡性能测定。

3.2.2 70%甲醇溶液:取 70 mL 甲醇加 30 mL 水混合。

3.2.3 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。

3.2.4 氯化钠(NaCl)。

3.2.5 氯化钾(KCl)。

3.2.6 浓盐酸(HCl)。

1) 德国拜发公司生产的黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫检测卡是当前应用较为广泛的快速检测卡。提供此信息只是为了方便本标准的使用者,不代表本标准对该产品的认可。任何可以满足本标准附录 A 规定的检测卡均可使用。

3.2.7 PBS 缓冲液:分别称取 1.42 g 磷酸氢二钠、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾,加 800 mL 水充分搅拌溶解,加入浓盐酸调整 pH 至 7.4,用水定容到 1 L。

3.3 仪器及设备

除实验室常规仪器设备外,应注意下列仪器设备。

3.3.1 天平:分度值 0.01 g,量程 210 g。

3.3.2 粉碎机。

3.3.3 离心机:转速 4 000 r/min。

3.3.4 振荡器。

3.3.5 计时器。

3.3.6 离心管。

3.4 样品制备

3.4.1 扦样与分样:按 GB 5491 执行。

3.4.2 样品粉碎:将被测样品粉碎至全部通过 20 目筛,充分混合均匀。

3.4.3 待测溶液制备:准确称取粉碎后的样品(3.4.2)10.0 g 于离心管中,加入 20 mL 70% 甲醇溶液(3.2.2)。振荡提取 3 min~5 min,静置 3 min,过滤或离心得上清液。取 100 μ L 常温下的 PBS 缓冲液(3.2.7)与 50 μ L 上清液混合,此溶液为待测溶液。

注:称样前应充分混合样品,保证待测样品的代表性。

3.5 样品测定

取待测溶液(3.4.3)100 μ L 加到检测卡(3.2.1)的点样小孔中,开始计时,在 16 min 内分三次判读结果。

注:检测卡在每次检测时应出现质控色带,质控色带在加样后最迟 2 min 内显现。

3.6 结果判定

3.6.1 无效

质控色带不显色,此检测卡无效,需用新检测卡重新进行检测。

3.6.2 阴阳性样品

质控色带显色,检测色带在不同时间显色,表示样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量不同。如检测色带在 4 min 后显色,样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量约为 20 μ g/kg;检测色带在 8 min 后显色,样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量约为 10 μ g/kg;检测色带在 16 min 后显色,样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量约为 4 μ g/kg。

根据 GB 2761 中规定的各种粮食中黄曲霉毒素 B₁ 限量标准来判定样品阴阳性。

需对本方法筛查出来的阳性样品进行确认时,应采用 GB 2761 中规定的方法。

4 胶体金免疫层析法

4.1 原理

本方法基于特异性抗原抗体反应和免疫层析技术,以胶体金作为载体,采用竞争法的反应原理。样品经乙酸乙酯提取,提取液经过滤或离心、吹干、稀释后,加入检测卡中。样品中的黄曲霉毒素 B₁ 会与

胶体金标记的特异性抗体结合,使检测色带不显色。通过检测色带是否显色来判定样品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

4.2 试剂及材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,实验室用水应符合 GB/T 6682 中一级水。

4.2.1 黄曲霉毒素 B₁ 胶体金检测卡²⁾:检测卡的性能应满足附录 A 的要求。不同品牌不同批次使用前,按照附录 A 进行检测卡性能测定。

4.2.2 乙酸乙酯。

4.2.3 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。

4.2.4 氯化钠(NaCl)。

4.2.5 氯化钾(KCl)。

4.2.6 浓盐酸(HCl)。

4.2.7 PBS 缓冲液:同 3.2.7。

4.3 仪器及设备

除实验室常规仪器设备外,应注意下列仪器设备。

4.3.1 天平:分度值 0.01 g,量程 210 g。

4.3.2 粉碎机。

4.3.3 离心机:转速 4 000 r/min。

4.3.4 振荡器。

4.3.5 计时器。

4.3.6 电吹风机:500 W~1 000 W。

4.3.7 离心管。

4.3.8 玻璃烧杯。

4.4 样品制备

4.4.1 扦样与分样:同 3.4.1。

4.4.2 样品粉碎:同 3.4.2。

4.4.3 待测溶液制备:准确称取粉碎混匀样品(4.4.2)2.0 g 于离心管中,加入 2 mL 水和 8 mL 乙酸乙酯,振荡提取 3 min~5 min,4 000 r/min 转速下离心 1 min。取 2 mL 上清液到玻璃烧杯中,用电吹风机吹干上清液。加 0.4 mL PBS 缓冲液复溶烧杯底的残留物,此溶液为待测溶液。

注:根据 GB 2761 中对不同品种粮食黄曲霉毒素 B₁ 限量的不同,选择不同体积的 PBS 缓冲液复溶烧杯底的残留物,黄曲霉毒素 B₁ 限量是 5 μg/kg,则加 0.4 mL PBS 缓冲液复溶烧杯底的残留物;黄曲霉毒素 B₁ 限量是 10 μg/kg,则加 0.8 mL PBS 缓冲液复溶烧杯底的残留物;黄曲霉毒素 B₁ 限量是 20 μg/kg,则加 1.6 mL PBS 缓冲液复溶烧杯底的残留物。以此类推。

4.5 样品测定

取 3 滴~4 滴待测溶液(4.4.3)缓慢滴加到检测卡(4.2.1)加样小孔中,开始计时,5 min 判读结果。

2) 上海快灵生物科技有限公司和北京华安麦科生物技术有限公司生产的黄曲霉毒素 B₁ 胶体金检测卡是当前应用广泛的快速检测卡。提供此信息只是为了方便本标准的使用者,不代表本标准对该产品的认可。任何可以满足本标准附录 A 规定的检测卡均可使用。

注：检测卡在每次检测时必须出现质控色带，质控色带在加样后最迟 2 min 内显现。

4.6 结果判定

4.6.1 无效

质控色带不显色，说明此检测卡无效，需用新检测卡重新检测。

4.6.2 阴阳性样品

质控色带显色，检测色带显色，判为阴性，即样品中不含黄曲霉毒素 B₁ 或黄曲霉毒素 B₁ 含量低于本次检测所设定的限量值。

质控色带显色，检测色带不显色或颜色非常模糊时，判为阳性。即样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量高于本次检测所设定的限量值。

需对本方法筛查出来的阳性样品进行确认时，应采用 GB 2761 中规定的方法。

附 录 A

(规范性附录)

谷物中黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测卡的技术要求与验证方法

A.1 技术要求

A.1.1 基本要求

A.1.1.1 工作环境要求

气温:20℃~30℃。

A.1.1.2 交叉反应

对脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素、玉米赤霉烯酮毒素、赭曲霉毒素及其他真菌毒素均无交叉反应。

A.1.2 性能要求

A.1.2.1 外观

外观应符合以下要求:

- a) 检测卡表面应光滑平整,颜色均匀一致,纤维膜面无露底、气泡、麻点、起皱、刷痕等缺陷;
- b) 点样孔应洁净;
- c) 文字、符号等标志应字体端正、清晰、正确。

A.1.2.2 准确性

样品的检测结果误判率应不超过10%。

对于黄曲霉毒素 B₁ 含量在 8.0 μg/kg~12.0 μg/kg 的大米、糙米样品,黄曲霉毒素 B₁ 含量在 16.0 μg/kg~24.0 μg/kg 的玉米样品,检测结果允许存在假阳性,不允许存在假阴性。

注:检测卡对不同种类的谷物检测有不同的检测误差范围,如大米、糙米样品检测卡的检验误差范围是±2 μg/kg;玉米样品检测卡的检验误差范围是±4 μg/kg。

A.1.2.3 稳定性

同批次检测卡、不同批次检测卡的误判率均应不超过10%。

A.2 验证方法

A.2.1 阳性样品定值

按照 GB 2761 中规定的方法对阳性样品进行定值。

A.2.2 性能测定

A.2.2.1 准确性

检测稻谷、大米和糙米类样品时,在 8.0 μg/kg~12.0 μg/kg 黄曲霉毒素 B₁ 浓度范围内,选取 10 个不同浓度的样品进行测定,计算误判率。

检测玉米类样品时,在 $16.0 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 24.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 黄曲霉毒素 B_1 浓度范围内,选取 10 个不同浓度的样品进行测定,计算误判率。

A.2.2.2 稳定性

A.2.2.2.1 批间稳定性

随机选取 3 个批次产品,每个批次用同一阳性样品进行至少 6 次测定,计算误判率。

A.2.2.2.2 批内稳定性

随机选取 1 个批次产品,用同一阳性样品进行至少 6 次测定,计算误判率。

A.2.2.3 产品失效率

保质期内产品失效率应符合厂家提供的允许值。

A.2.2.4 约定误差范围

约定误差范围应符合厂家提供的允许值。
