

KJ

食品快速检验方法

KJ 202106

玉米及其碾磨加工品中伏马毒素的快速检测 胶体金免疫层析法

2021-××-××发布

玉米及其碾磨加工品中伏马毒素的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了玉米及其碾磨加工品中伏马毒素 B₁、伏马毒素 B₂、伏马毒素 B₃ (以下简称为 FB₁、FB₂、FB₃) 快速检测胶体金免疫层析法。

本方法适用于玉米及其碾磨加工品中伏马毒素 (以 FB₁、FB₂、FB₃ 总量计) 的快速定性测定。

2 原理

本方法根据竞争抑制免疫层析原理。样品中的伏马毒素 (FB₁、FB₂、FB₃) 经乙腈-水溶液提取, 提取液经样品稀释液稀释后, 与胶体金标记的特异性抗体结合, 抑制抗体和试纸条中检测线 (T 线) 上抗原结合, 从而导致试纸条检测线 (T 线) 颜色变化。通过检测线 (T 线) 与控制线 (C 线) 颜色深浅比较, 对样品中伏马毒素 (以 FB₁、FB₂、FB₃ 总量计) 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 (CH₃CN)。

3.1.2 三羟甲基氨基甲烷 (C₄H₁₁NO₃), 又名 Tris 碱。

3.1.3 盐酸 (HCl, 37%)。

3.1.4 吐温-20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆)。

3.2 参考物质

伏马毒素参考物质的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 1, 纯度 ≥ 95%。

注: 或等同可溯源物质。

表 1 伏马毒素参考物质的中文名称、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
伏马毒素 B ₁	Fumonisin B ₁ (FB ₁)	116355-83-0	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721.83
伏马毒素 B ₂	Fumonisin B ₂ (FB ₂)	116355-84-1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83
伏马毒素 B ₃	Fumonisin B ₃ (FB ₃)	136379-59-4	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83

3.3 溶液配制

3.3.1 乙腈-水溶液 (50+50): 分别量取 100 mL 乙腈 (3.1.1) 和 100 mL 水, 混合均匀。

3.3.2 稀盐酸溶液(2 mol/L):量取 12 mL 浓盐酸(3.1.3)加入到 60 mL 水,混合均匀。

3.3.3 样品稀释液:称取 12.1 g Tris 碱(3.1.2)于 800 mL 水中,搅拌溶解后,加入适量稀盐酸溶液(3.3.2)调节 pH 至 8.5,再加入 5 g 吐温-20(3.1.4)并搅拌混匀,用水定容至 1 000 mL。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 伏马毒素 B₁ 标准储备溶液(100 μg/mL):准确称取 FB₁ 10 mg(精确至 0.01 mg)至烧杯中,用乙腈-水溶液(3.3.1)溶解,并转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。此溶液密封后避光-20 °C 保存。有效期 6 个月。

3.4.2 伏马毒素 B₂ 标准储备溶液(100 μg/mL):准确称取 FB₂ 10 mg(精确至 0.01 mg)至烧杯中,用乙腈-水溶液(3.3.1)溶解,并转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。此溶液密封后避光-20 °C 保存。有效期 6 个月。

3.4.3 伏马毒素 B₃ 标准储备溶液(100 μg/mL):准确称取 FB₃ 10 mg(精确至 0.01 mg)至烧杯中,用乙腈-水溶液(3.3.1)溶解,并转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。此溶液密封后避光-20 °C 保存。有效期 6 个月。

3.4.4 混合标准工作溶液:准确量取 FB₁ 标准储备溶液(3.4.1)14 mL、FB₂ 标准储备溶液(3.4.2)4 mL、FB₃ 标准储备溶液(3.4.3)2 mL 至同一 50 mL 容量瓶中,加乙腈-水溶液(3.3.1)定容至刻度,得到 FB₁ 质量浓度为 28 μg/mL、FB₂ 质量浓度为 8 μg/mL、FB₃ 质量浓度为 4 μg/mL 的混合标准工作溶液。此溶液密封后避光 4 °C 保存。有效期 6 个月。

3.4.5 若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

伏马毒素胶体金免疫层析试剂盒,一般包含金标微孔、胶体金试纸条,适用于玉米及其碾磨加工品。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.01 mg。

注:当实验室可获得符合规定的标准溶液时,无需配备感量为 0.01 mg 的天平。

4.2 粉碎机。

4.3 离心机:转速 \geq 4 000 r/min。

4.4 移液器:量程分别为 100 μL、200 μL、1 mL、5 mL。

4.5 振荡器。

4.6 涡漩混合器。

4.7 pH 计。

4.8 孵育器:可控温 20 °C~25 °C。

4.9 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度 15 °C~35 °C,相对湿度 \leq 80%。

6 分析步骤

6.1 试样制备

将样品按四分法缩分至约 1 kg,用粉碎机磨碎至全部通过网孔尺寸小于 1 mm 的筛子,混匀后分成

两份,分别装入洁净容器作为试样和留样。试样待测,留样不少于 200 g 以备复检。试样和留样均密封后标识,并置于 4 °C 下避光保存。

6.2 试样提取

6.2.1 玉米碾磨加工品

准确称取试样 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈-水溶液(3.3.1),振荡提取 5 min 或涡漩提取 2 min,于 4 000 r/min 离心 3 min 或静置 5 min 使固液分层,立即取 100 μ L 上清液加入到装有 600 μ L 样品稀释液(3.3.3)的离心管中,混匀后即为待测液。

6.2.2 玉米

准确称取试样 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈-水溶液(3.3.1),振荡提取 5 min 或涡漩提取 2 min,于 4 000 r/min 离心 3 min 或静置 5 min 使固液分层,立即取一定量上清液与乙腈-水溶液(3.3.1)以 1 : 1 体积混合均匀,再取 100 μ L 混合溶液加入到装有 600 μ L 样品稀释液(3.3.3)的离心管中,混匀后即为待测液。

6.3 测定步骤

用移液器吸取 200 μ L 待测液于金标微孔中,反复吹吸 4~5 次,使微孔试剂混合均匀,于孵育器中 20 °C~25 °C 孵育 3 min,将试纸条下端插入到金标微孔溶液底部,于孵育器中 20 °C~25 °C 反应 5 min,拔出试纸条,刮掉下端样品垫,在 1 min~3 min 内判读结果。

6.4 质控试验

6.4.1 每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

获取同类基质的空白试样,经参比方法检测伏马毒素(以 FB₁、FB₂、FB₃ 总量计)含量小于 200 μ g/kg。

6.4.2 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。

6.4.3 加标质控试验:准确称取空白试样 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,玉米样品中加入 500 μ L 混合标准工作溶液(3.4.4),使 FB₁、FB₂、FB₃ 的含量分别为 2.8 mg/kg、0.8 mg/kg、0.4 mg/kg;玉米碾磨加工品样品中加入 250 μ L 混合标准工作溶液(3.4.4),使 FB₁、FB₂、FB₃ 的含量分别为 1.4 mg/kg、0.4 mg/kg、0.2 mg/kg。按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

7 结果判定要求

根据伏马毒素胶体金免疫层析试剂盒选用判读方法。采用目视法对结果进行判读,目视判定示意图如图 1 和图 2 所示。

注: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请参照读数仪的使用说明书。

7.1 比色法

7.1.1 无效

控制线(C 线)不显色,表明错误操作或试纸条无效。

7.1.2 阳性结果

检测线(T 线)不显色或检测线(T 线)颜色比控制线(C 线)颜色浅,表明样品中伏马毒素总含量高

于方法检测限,判为阳性。

7.1.3 阴性结果

检测线(T线)颜色比控制线(C线)颜色深或者检测线(T线)颜色与控制线(C线)颜色相当,表明样品中伏马毒素总含量低于方法检测限,判为阴性。

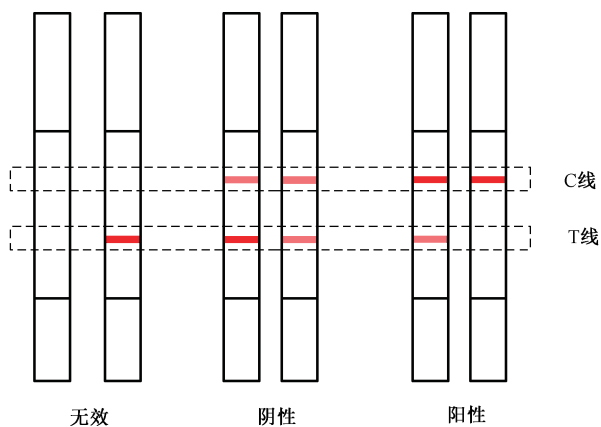


图 1 目视判定示意图(比色法)

7.2 消线法

7.2.1 无效

控制线(C线)不显色,表明错误操作或试纸条无效。

7.2.2 阳性结果

控制线(C线)显色,检测线(T线)不显色,表明样品中伏马毒素总含量高于方法检测限,判为阳性。

7.2.3 阴性结果

检测线(T线)与控制线(C线)均显色,表明样品中伏马毒素总含量低于方法检测限,判为阴性。

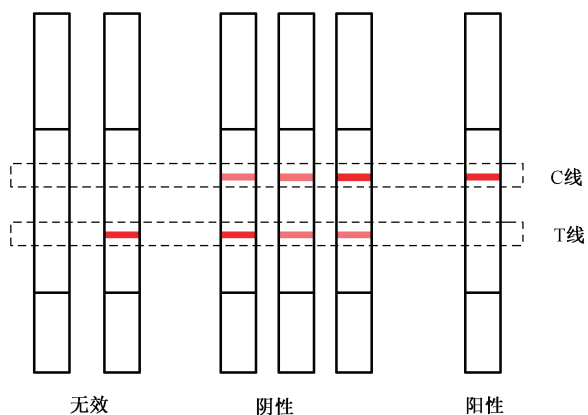


图 2 目视判定示意图(消线法)

7.3 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

当检测结果为阳性时,采用参比方法进行确证。

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:玉米为 4 mg/kg;玉米碾磨加工品为 2 mg/kg。

9.3 灵敏度: $\geq 99\%$ 。

9.4 特异性: $\geq 95\%$ 。

9.5 假阴性率: $\leq 1\%$ 。

9.6 假阳性率: $\leq 5\%$ 。

10 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息、操作步骤及结果判定要求是为给方法使用者提供方便,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,应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为 GB 5009.240—2016《食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定》(包括所有的修改单)。

附录 A

(规范性)

快速检测方法性能指标计算表

性能指标计算方法见表 A.1。

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	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 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。			
^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:江西省食品检验检测研究院。

本方法验证单位:陕西省食品药品监督检验研究院、河南省食品检验研究院、南昌大学、南昌海关技术中心、广州海关技术中心。

本方法主要起草人:王栋、张威、喻俊磊、林芳、焦强、徐娟、郭平、连琦、赖卫华、占春瑞、陈红兰、兰伟、曾臻、胡蓓。