



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202308

乳及乳制品中玉米赤霉醇类物质的 快速检测 胶体金免疫层析法

2023-06-13 发布

国家市场监督管理总局 发 布

乳及乳制品中玉米赤霉醇类物质的 快速检测 胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了乳及乳制品中玉米赤霉醇类物质的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于生牛乳、全脂灭菌纯牛乳及全脂牛乳粉中 6 种玉米赤霉醇类物质(α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮、 α -玉米赤霉烯醇以及 β -玉米赤霉烯醇)的快速定性检测。

2 原理

本方法采用竞争性免疫层析检测原理,试样中的玉米赤霉醇类与检测线上的玉米赤霉醇类竞争结合标记有胶体金颗粒的特异性抗体,达到抑制检测线显色的效果。通过检测线(T 线)与质控线(C 线)颜色深浅的比较对试样中玉米赤霉醇类物质进行定性判定。

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 氯化钠(NaCl)。

3.1.2 氯化钾(KCl)。

3.1.3 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。

3.1.4 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

3.1.5 聚山梨酯 80。

3.1.6 Proclin300(2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮,5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮)。

3.1.7 乙腈(CH_3CN)。

3.2 溶液配制

样品稀释缓冲液:称取 1.15 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾和 30.0 g 氯化钠,用 500 mL~800 mL 水将上述试剂充分溶解,加入 0.5 mL 聚山梨酯 80 和 0.5 mL Proclin300,混匀后转移至 1L 容量瓶中,用水定容至 1 000 mL。

3.3 标准品

玉米赤霉醇类物质标准品:纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予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。

注:或等同可溯源物质。

表 1 玉米赤霉醇类物质的中文名称、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
α -玉米赤霉醇	α -Zearalanol	26538-44-3	$C_{18}H_{26}O_5$	322.4
β -玉米赤霉醇	β -Zearalanol	42422-68-4	$C_{18}H_{26}O_5$	322.4
玉米赤霉酮	Zearalanone	5975-78-0	$C_{18}H_{24}O_5$	320.38
玉米赤霉烯酮	Zearalenone	17924-92-4	$C_{18}H_{22}O_5$	318.36
α -玉米赤霉烯醇	α -Zearalenol	36455-72-8	$C_{18}H_{24}O_5$	320.38
β -玉米赤霉烯醇	β -Zearalenol	71030-11-0	$C_{18}H_{24}O_5$	320.38

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$)

分别准确称取适量的玉米赤霉醇类标准品(精确至 0.000 1 g),用乙腈溶解并定容至 10 mL,摇匀,分别配制成 6 种 100 $\mu\text{g/mL}$ 玉米赤霉醇类标准储备液。于-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,可使用 3 个月。

3.4.2 标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)

分别准确量取玉米赤霉醇类标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.1)1mL,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,分别配制成 6 种 10 $\mu\text{g/mL}$ 的玉米赤霉醇类标准中间液。于-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,可使用 1 个月;于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,可使用 7 d。

3.4.3 标准工作液

3.4.3.1 α -玉米赤霉醇标准工作液(60 ng/mL)

准确量取 α -玉米赤霉醇标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.2)60 μL ,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀。现配现用。

3.4.3.2 β -玉米赤霉醇标准工作液(60 ng/mL)

准确量取 β -玉米赤霉醇标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.2)60 μL ,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀。现配现用。

3.4.3.3 玉米赤霉酮标准工作液(100 ng/mL)

准确量取玉米赤霉酮标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.2)100 μL ,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀。现配现用。

3.4.3.4 玉米赤霉烯酮标准工作液(100 ng/mL)

准确量取玉米赤霉烯酮标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.2)100 μL ,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀。现配现用。

3.4.3.5 α -玉米赤霉烯醇标准工作液(70 ng/mL)

准确量取 α -玉米赤霉烯醇标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$)(3.4.2)70 μL ,置于 10mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀。现配现用。

3.4.3.6 β -玉米赤霉烯醇标准工作液(150 ng/mL)

准确量取 β -玉米赤霉烯醇标准中间液(10 μ g/mL)(3.4.2)150 μ L,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀。现配现用。

3.5 材料

乳制品中玉米赤霉醇类胶体金快速检测试剂盒:微孔试剂、试纸条及样品稀释缓冲液。2 $^{\circ}$ C $\sim$ 8 $^{\circ}$ C 避光保存。

4 设备与仪器

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。

4.2 涡旋混合器:0 r/min $\sim$ 3 000 r/min。

4.3 移液器:100 μ L、200 μ L、1 mL 和 5 mL。

4.4 读数仪:变异系数 $\leq$ 5%。

4.5 温育器:室温+5 $^{\circ}$ C $\sim$ 100 $^{\circ}$ C, $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C。

5 环境条件

环境温度:20 $^{\circ}$ C $\sim$ 30 $^{\circ}$ C。

6 分析步骤

6.1 试样制备

生牛乳和全脂灭菌纯牛乳在检测前需恢复至室温并充分涡旋混匀备用。

准确称取全脂牛乳粉 1.2 g $\pm$ 0.01 g,用 8.8 mL 温水(40 $^{\circ}$ C $\sim$ 50 $^{\circ}$ C)充分溶解后备用。

6.2 试样前处理

6.2.1 生牛乳

无需前处理。

6.2.2 全脂灭菌纯牛乳

将试样与样品稀释缓冲液按 1:1 的体积比进行稀释,充分涡旋混匀。

6.2.3 全脂牛乳粉

将 6.1 中制备的试样溶液与样品稀释缓冲液按 1:1 的体积比进行稀释,充分涡旋混匀。

注:试样前处理(6.2)过程也可按照试剂盒说明书操作。

6.3 测定步骤

6.3.1 通则

在进行检测前先将试剂盒恢复至室温(20 $^{\circ}$ C $\sim$ 30 $^{\circ}$ C),从试剂筒中取出所需数目的试纸条和相应数量的微孔试剂,1 h 内使用完毕。

6.3.2 生牛乳

6.3.2.1 用移液器移取 200 μL 待检试样于微孔中,反复吹打直至微孔中红色试剂充分溶解混匀后,将微孔放置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 温育器上温育 5 min;

6.3.2.2 将试纸条插入微孔中,40 $^{\circ}\text{C}$ 温育器上继续温育 5 min,温育结束后取出试纸条,去除下端样品垫,进行结果判定。

6.3.3 全脂灭菌纯牛乳及全脂牛乳粉

6.3.3.1 用移液器移取 200 μL 待检试样于微孔中,反复吹打直至微孔中红色试剂充分溶解混匀后,将微孔放置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 温育器上温育 8 min;

6.3.3.2 将试纸条插入微孔中,40 $^{\circ}\text{C}$ 温育器上继续温育 8 min,温育结束后取出试纸条,去除下端样品垫,进行结果判定。

注:测定步骤(6.3)过程也可按照试剂盒说明书操作。

6.4 质控试验

6.4.1 通则

每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。

6.4.2 空白试验

空白试样需按 GB/T 21982 和 GB 5009.209 方法检测且未检出玉米赤霉醇类物质。

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

6.4.3.1 生牛乳加标质控试验

按 6.1 制备生牛乳空白试样,准确称取 6 份空白试样各 10 g(精确至 0.01 g)置于 6 支 15 mL 离心管中,分别加入 100 μL 6 种玉米赤霉醇类物质的标准工作液(3.4.3),制备成加标质控样。试样中 α -玉米赤霉醇浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, β -玉米赤霉醇浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米赤霉酮浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米赤霉烯酮浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, α -玉米赤霉烯醇浓度为 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, β -玉米赤霉烯醇浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。制备的试样按 6.2.1 和 6.3.2 步骤与样品同法操作。

6.4.3.2 全脂灭菌纯牛乳加标质控试验

按 6.1 制备全脂灭菌纯牛乳空白试样,准确称取 6 份空白试样各 10 g(精确至 0.01g)置于 6 支 15 mL 离心管中,分别加入 100 μL 6 种玉米赤霉醇类物质的标准工作液(3.4.3),制备成加标质控样。试样中 α -玉米赤霉醇浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, β -玉米赤霉醇浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米赤霉酮浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米赤霉烯酮浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, α -玉米赤霉烯醇浓度为 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, β -玉米赤霉烯醇浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。制备的试样按 6.2.2 和 6.3.3 步骤与样品同法操作。

6.4.3.3 全脂牛乳粉加标质控试验

按 6.1 制备全脂牛乳粉空白试样,准确称取 6 份空白试样各 10 g(精确至 0.01 g)置于 6 支 15 mL 离心管中,分别加入 100 μL 6 种玉米赤霉醇类物质的标准工作液(3.4.3),制备成加标质控样。试样中 α -玉米赤霉醇浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, β -玉米赤霉醇浓度为 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米赤霉酮浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,玉米赤霉烯酮浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, α -玉米赤霉烯醇浓度为 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, β -玉米赤霉烯醇浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。制备的试

样按 6.2.3 和 6.3.3 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

7.1 通则

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,可采用目视法也可采用仪器法进行检测结果的判定。

7.2 目视法

7.2.1 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。

7.2.2 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),表明样品中玉米赤霉醇类物质残留高于方法检出限,判为阳性。

7.2.3 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,表明样品中玉米赤霉醇类物质残留低于方法检出限,判为阴性。

目视结果判定示意图见图 1。

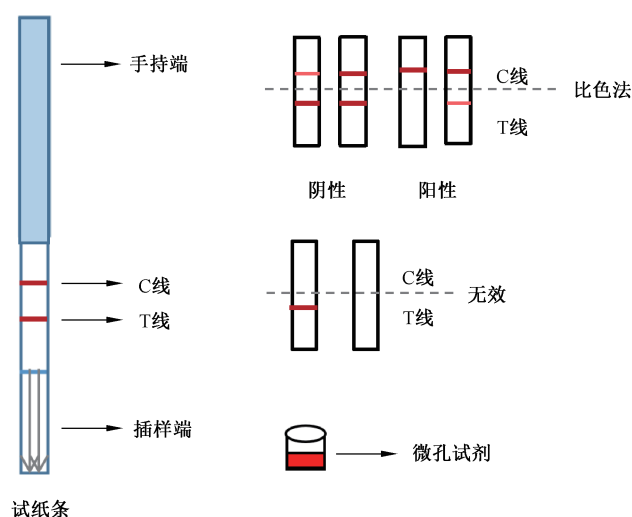


图 1 胶体金试纸条目测法结果判定示意图

7.3 仪器法

读数仪的具体操作与判读方法参照产品使用说明书。

7.4 质控试验要求

空白试验检测结果应为阴性,加标质控试验检测结果应为阳性。

8 结论

当检测结果为阳性时,应对结果进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

生牛乳和全脂灭菌纯牛乳: α -玉米赤霉醇 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$; β -玉米赤霉醇 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$;玉米赤霉酮 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$;玉米赤霉烯酮 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; α -玉米赤霉烯醇 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$; β -玉米赤霉烯醇 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

全脂牛乳粉: α -玉米赤霉醇 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; β -玉米赤霉醇 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;玉米赤霉酮 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;玉米赤霉烯酮 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$; α -玉米赤霉烯醇 5.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; β -玉米赤霉烯醇 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 99\%$ 。

9.3 特异性

特异性 $\geq 90\%$ 。

9.4 交叉反应率

本方法 α -玉米赤霉醇与 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮的交叉反应率均为 100%,与 α -玉米赤霉烯醇的交叉反应率为 80%,与 β -玉米赤霉烯醇的交叉反应率为 66.67%。

本方法玉米赤霉醇类物质与脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素)、黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 M₁、赈曲霉毒素、伏马菌素、氯霉素、磺胺二甲嘧啶、恩诺沙星、庆大霉素及青霉素 G 物质之间的交叉反应率均为 0。

9.5 假阴性率

假阴性率 $\leq 1\%$

9.6 假阳性率

假阳性率 $\leq 10\%$

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。

本方法中 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮的参比标准

为 GB/T 21982《动物源性食品中 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》(部分废止)、玉米赤霉烯酮的参比标准为 GB 5009.209《食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定》;包括所有的修改单。参比方法未明示乳粉基质的适用性,在本方法中,对于乳粉首先按 6.1 制备成复原乳,再按照牛奶基质采用上述参比方法进行检测。

本方法起草单位:中国检验检疫科学研究院、山东省食品药品检验研究院、广东省食品检验所(广东省酒类检测中心)。

本方法验证单位:山东省食品药品检验研究院、广东省食品检验所(广东省酒类检测中心)、中检科(北京)测试技术有限公司、中检科(北京)测试认证有限公司、农业农村部乳品质量监督检验测试中心、山西省检验检测中心(山西省标准计量技术研究院)、华南农业大学。

本方法主要起草人:何艳玲、唐慧林、宋军伟、田洪芸、赵瑜、刘敏、刘海虹、罗志浩、张海红、林洁纯。