附件2

食用油中黄曲霉毒素B1的快速检测

胶体金免疫层析法（KJ201708）

1. 范围

本方法规定了食用油中黄曲霉毒素B1的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于花生油、玉米油、大豆油及其他植物油脂等食用油中黄曲霉毒素B1的快速测定。

1. 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经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和试纸条或检测卡中检测线（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。

1. 试剂和材料

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。

1. 试剂
	* 1. 甲醇。
		2. 十二水磷酸氢二钠。
		3. 二水磷酸二氢钠。
		4. 氯化钠。
		5. 吐温-20。
		6. 提取液：30%甲醇水或胶体金免疫层析检测试剂盒专用提取液或根据产品使用说明书配置。
		7. 稀释液：称取2.90 g十二水磷酸氢二钠（3.1.2），0.296 g二水磷酸二氢钠（3.1.3），4.50g 氯化钠（3.1.4），溶解于400 mL水中，加入0.5 mL吐温-20（3.1.5），用水稀释至500mL，混匀即成稀释液；或使用胶体金免疫层析检测试剂盒专用稀释液。
2. 参考物质

黄曲霉毒素B1参考物质的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量见表1，纯度均≥90%。

表1 黄曲霉毒素B1参考物质中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子质量 |
| 黄曲霉毒素B1 | Aflatoxin B1 | 1162-65-8 | C17H12O6 | 312.27 |

注：或等同可溯源物质。

1. 标准溶液的配制

3.3.1 黄曲霉毒素B1标准储备液（0.1 mg/mL）：精密称取适量黄曲霉毒素B1标准品（3.2），置于10 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.1）溶解并稀释至刻度，摇匀，制成浓度为0.1 mg/mL的黄曲霉毒素B1标准储备液；或可直接购买黄曲霉毒素B1标准储备液。-20℃避光保存备用，有效期3个月。

3.3.2 黄曲霉毒素B1标准中间液（10 μg/mL）：精密量取黄曲霉毒素B1标准储备液（0.1 mg/mL）（3.3.1）1 mL，置于10 mL容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为10 μg/mL的黄曲霉毒素B1标准中间液。临用新制。

1. 材料

黄曲霉毒素B1胶体金免疫层析试剂盒，适用基质为食用油。

3.4.1金标微孔（含胶体金标记的特异性抗体）。

3.4.2 试纸条或检测卡。

1. 仪器和设备
	1. 移液器：100 µL、200 µL和1 mL。
	2. 涡旋混合器。
	3. 离心机：转速≥4000 r/min。
	4. 电子天平：感量为0.01 g。
	5. 环境条件：温度15—35℃，湿度≤80%。
2. 分析步骤
	1. 试样制备

取适量有代表性样品充分混匀。

* 1. 试样提取和净化

称取1g油样于离心管中，加入2mL 提取液（3.1.6）并混合均匀。漩涡振荡3min，然后4000 r/min离心5min离心或静置5—10 min，取下清液备用。

依据检测样品种类及试剂盒说明书，用稀释液（3.1.7）将下清液稀释并涡旋混匀，得待测液。

* 1. 测定步骤

5.3.1试纸条与金标微孔测定步骤

吸取100—200 µL 待测液于金标微孔（3.4.1）中，抽吸5—10次使混合均匀，尽量不要有气泡，室温温育3—5min（根据配套说明书进行避光操作），将检测试纸条（3.4.2）样品端垂直向下插入反应微孔中，温育5—10 min，从微孔中取出试纸条，进行结果判定。

5.3.2 检测卡测定步骤

吸取100—150μL待测液滴加到检测卡（3.4.2）的加样孔中，温育5—10min，进行结果判定。

* 1. 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

* + 1. 空白试验

称取空白试样，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

* + 1. 加标质控试验

花生油、玉米油样品：准确称取空白试样100 g（精确至0.01g）置于100 mL玻璃溶液瓶中，加入200 μL黄曲霉毒素B1标准中间液（10 μg/mL）（3.3.2），使试样中黄曲霉毒素B1浓度为20μg/kg，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

其他油脂样品：准确称取空白试样100 g（精确至0.01g）置于100 mL玻璃溶液瓶中，加入100μL黄曲霉毒素B1标准中间液（10 μg/mL）（3.3.2），使试样中黄曲霉毒素B1浓度为10 μg/kg，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

1. 结果判定要求

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。目视结果判读如图1。

1. 无效

控制线（C线）不显色，表明不正确操作或试纸条/检测卡无效。

1. 阳性结果

6.2.1 消线法

检测线（T线）不显色，控制线（C线）显色，表明样品中黄曲霉毒素B1含量高于方法检测限，判定为阳性。

6.2.2 比色法

检测线（T线）颜色比控制线（C线）颜色浅或几乎不显色，表明样品中黄曲霉毒素B1含量高于方法检测限，判定为阳性。

1. 阴性结果

6.3.1 消线法

检测线（T线）、控制线（C线）均显色，表明样品中黄曲霉毒素B1含量低于方法检测限，判定为阴性。

6.3.2比色法

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，表明样品中黄曲霉毒素B1含量低于方法检测限，判定为阴性。

试纸条

手持端

C线

T线

样品端

检测卡

加样孔

T线

C线

C线

T线

T线

T线

C线

C线

阴性

阳性

阳性

阴性

消线法

比色法

结果无效

检测装置示意图

图1 试纸条/检测卡目视判定示意图

1. 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。

1. 结论

黄曲霉毒素B1与其他几种黄曲霉毒素（黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素M1、黄曲霉毒素M2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2）有交叉，当检测结果为阳性时，应对黄曲霉毒素B1结果进行确证。

1. 性能指标
2. 检测限：玉米油、花生油为20 μg/kg；其他植物油脂为10 μg/kg。
3. 灵敏度：灵敏度应≥99%。
4. 特异性：特异性应≥90%。
5. 假阴性率：假阴性率应≤1%。
6. 假阳性率：假阳性率应≤10%。

注：性能指标计算方法参见附录A。

1. 其他

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。方法使用者应使用经过验证的满足本方法规定的各项性能指标的试剂、试剂盒。

本方法参比标准为《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定》（GB 5009.22—2016）、《出口植物油中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的检测-免疫亲和柱净化高效液相色谱法》（SN/T 3868—2014）。

本方法使用试剂盒可能与黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素M1、黄曲霉毒素M2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2存在交叉反应，当结果判定为阳性时应采用实验室仪器方法《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定》（GB 5009.22—2016）对黄曲霉毒素B1结果进行确证。

附录A

快速检测方法性能指标计算表

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 | N11 | N12 | N1.=N11+N12 |
| 阴性 | N21 | N22 | N2.=N21+N22 |
| 总数 | N.1=N11+N21 | N.2=N12+N22 | N=N1.+N2.或N.1+N.2 |
| 显著性差异（χ2） | χ2=（|N12-N21|-1）2/（N12+N21），自由度（df）=1 |
| 灵敏度（p+，%） | p+=N11/N1. |
| 特异性（p-，%） | p-=N22/N2. |
| 假阴性率（pf-，%） | pf-=N12/N1.=100-灵敏度 |
| 假阳性率（pf+，%） | pf+=N21/N2.=100-特异性 |
| 相对准确度，%c | （N11+N22）/(N1.+N2.) |
| 注：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。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：N11表示第一行，第一列，N1.表示所有的第一行，N.2表示所有的第二列；N12表示第一行，第二列。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：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

验证单位：深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心、中国农业科学院油料作物研究所。

主要起草人：陈爱亮、徐贞贞、岳振峰、王督、张娟。