附件13

食品中玉米赤霉烯酮快速检测

胶体金免疫层析法

征求意见稿

1. 范围

本标准规定了食品中玉米赤霉烯酮快速检测胶体金免疫层析法。

本标准适用玉米、小麦及其碾磨加工品中玉米赤霉烯酮快速筛选测定。

第一法 比色法

1. 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的玉米赤霉烯酮经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和试纸条中检测线（T线）上的抗原结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线（T线）、控制线（C线）的颜色深浅对比进行结果判读。

1. 试剂及材料

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

* 1. 试剂
		1. 乙腈。
		2. 甲醇+水（7+3，体积比）。
		3. 稀释缓冲液（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）。
	2. 参考物质
		1. 玉米赤霉烯酮的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量见表1，纯度≥95%。

表1 玉米赤霉烯酮参考物质的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子量 |
| 玉米赤霉烯酮 | Zearalenone | 17924-92-4 | C18H22O5 | 318.36 |

注：或等同可溯源物质。

* 1. 标准溶液的配制
		1. 标准储备液：称取适量标准品，用乙腈（3.1.1）溶解，制成浓度为100 μg/mL的标准储备液。﹣18 ℃避光保存，有效期6个月。
		2. 标准工作液：准确量取标准储备液（100 μg/mL）（3.3.1）100 μL，置于10 mL容量瓶中，用乙腈（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为1 μg/mL的玉米赤霉烯酮标准工作液，2～8 ℃避光保存，有效期1个月。
	2. 材料

玉米赤霉烯酮胶体金免疫层析试剂盒，适用基质为玉米、小麦及其碾磨加工品。

1. 仪器和设备
	1. 移液器：100 μL、200 μL 、1 mL和5 mL。
	2. 旋涡混合器。
	3. 离心机。
	4. 电子天平：感量为0.01 g。
2. 环境条件

环境温度：20～30 ℃。

空气相对湿度：最佳测定湿度45%～65%。若湿度低于45%，相应延长待测液-试纸条反应时间，以质控实验为准；若湿度为65%～80%，微孔与试纸条拆开后立即使用，避免微孔与试纸条长时间暴露在空气中受潮，避免高湿环境下（湿度80%以上）进行实验。

1. 分析步骤
	1. 试样制备

取适量样品，充分碾磨或粉碎混匀，过40目筛。

* 1. 提取

准确称取试样5.0 g（精确至0.01g）于50 mL离心管中，加入20 mL 甲醇+水溶液（3.1.2），用旋涡混合器振荡3 min，离心分层或静置分层，上清液备用。

准确移取0.8 mL稀释缓冲液（3.1.3）于1.5 mL离心管中，加入25 μL上清液，混匀，待检。

* 1. 测定步骤

依检验所需，取相应数量的金标微孔和试纸条，做好标记。吸取待检液200 μL于金标微孔中，抽吸至孔底的紫红色颗粒完全溶解，孵育10 min。将试纸条插入金标微孔中，反应3 min～5 min。

从金标微孔中取出试纸条，弃去试纸条下端的样品垫，观察显色结果，进行判定。（若试剂盒冷藏保存，使用前需恢复至实验操作环境温度。）

1. 质控试验

每批样品应该同时进行空白试验和阳性质控试验。

* 1. 空白试验

准确称取空白试样，按照6.1和6.2步骤与样品同法操作。

* 1. 阳性质控试验

准确称取玉米赤霉烯酮含量为60 μg/kg的质控样，按照6.1和6.2步骤与样品同法操作。或准确称取空白试样，加入一定体积的玉米赤霉烯酮标准工作液（3.3.2），使玉米赤霉烯酮添加量为60 μg/kg，按照6.1和6.2步骤与样品同法操作。

1. 结果判定

通过对比控制C线和检测T线的颜色深浅进行结果判定。

* 1. 无效结果

无论样品中有无玉米赤霉烯酮存在，C线都会出现一条紫红色条带。若控制C线未显色，表明操作过程不正确或试纸条已失效，检测结果无效。

**图1 试纸条目视判定图**

**无效**

* 1. 阳性结果

控制C线显色，检测T线显色比C线浅或者没有颜色，判定为阳性。

* 1. 阴性结果

控制C线显色，检测T线显色比C线深或者一致，判定为阴性。

**比色法**

**图2 试纸条目视判定图**

* 1. 质控试验要求

空白试验结果应为阴性，阳性质控试验结果应为阳性。

第二法 消线法

1. 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的玉米赤霉烯酮经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和试纸条中检测线（T线）上的抗原结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过T线显色与否进行判读结果。

1. 试剂及材料

同3。

1. 仪器和设备

同4。

1. 环境条件

环境温度：10～40 ℃。

空气相对湿度：同5。

1. 分析步骤
	1. 试样制备

同6.1。

* 1. 提取

准确称取试样5.0 g（精确至0.01 g）于50 mL离心管中，加入12.5 mL甲醇+水溶液（3.1.2），用旋涡混合器振荡3 min，离心分层或静置分层，上清液备用。

准确移取400 μL稀释缓冲液（3.1.3）于1.5 mL离心管中，加入上清液(小麦50 μL，玉米80 μL），混匀，待测。

* 1. 测定步骤

同6.3。

1. 质控试验

同7。

1. 结果判定

通过检测T线显色与否进行结果判定。

* 1. 无效

同8.1

* 1. 阳性结果

控制C线显色，检测T线不显色，判定为阳性。

* 1. 阴性结果

控制C线显色，检测T线显色，判定为阴性。

**消线法**

**图3 试纸条目视判定图**

1. 质控试验要求

同8.4

1. 结论

本方法筛查出的阳性样品进行确认时，应按GB 2761指定方法标准检测并判定。

1. 性能指标
	1. 检出限：60 μg/kg。
	2. 灵敏度：灵敏度≥95%。
	3. 特异性：特异性≥90%。
	4. 假阴性：假阴性≤5%。
	5. 假阳性：假阳性≤10%。

注：性能指标计算方法见附录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，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 5009.209-2016 食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定。

附录A

快速检测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 | 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样品中实际的公议值结果；b由玉米赤霉烯酮胶体金试纸条检验方法得到的结果。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。 |

本方法起草单位：成都市食品药品检验研究院。

本方法参与单位：江南大学、国家粮食局科学研究院、广东省食品检验所、山东省食品药品检验研究院、浙江省食品药品检验研究院。

本方法主要起草人：肖全伟、姚蕾珺、王昕、张敏、胥传来、田洪芸、沈泓、周露