

ICS 67.050

X 04

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 333—2018

食品及饲料中黄曲霉毒素定量检测方法 -荧光量子点免疫层析法

Determination of quantitative assay for Aflatoxin in food and feed --
quantum dotimmunochemical assay

2018-11-15 发布

2018-12-01 实施

深圳市市场和质量监督管理委员会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 荧光量子点快速测定法原理	1
5 仪器、检测卡与试剂	2
6 生物安全要求	2
7 样品的前处理准备	2
8 黄曲霉毒素含量的快速精确测定	4
9 测定结果	4
附录 A (规范性附录) 相关试剂配制	5
附录 B (资料性附录) 荧光量子点快速定量检测卡及荧光扫描判读仪	6
附录 C (资料性附录) 荧光扫描仪内置计算公式及质量换算公式	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本文件的附录A为规范性附录，附录B和附录C为资料性附录。

本文件由深圳市检验检疫科学研究院提出。

本文件由中华人民共和国深圳出入境检验检疫局归口。

本文件起草单位：深圳市正海生物科技有限公司、深圳市检验检疫科学研究院、深圳出入境检验检疫局。

本文件主要起草人：陶虹、赵秦、卞学海、陈兵、刘建利、秦智锋、孙盼、孙洁、刘晓露。

食品及饲料中黄曲霉毒素定量检测方法-荧光量子点免疫层析法

1 范围

本文件规定了使用荧光量子点免疫层析法快速定量检测食品和饲料中黄曲霉毒素B₁和黄曲霉毒素M₁的检测技术及方法程序。

本文件适用于食品、饲料中黄曲霉毒素B₁的快速筛选检测，适用于牛奶和乳制品中黄曲霉毒素M₁的快速筛选检测。

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 2761-2011 食品安全国家标准-食品中真菌毒素限量

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB 5491-1985 粮食、油料检验扦样、分样法

GB/T 14699.1-2005 饲料采样

GB/T 18088-2000 出入境动物检疫采样

SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 缩略语

下列术语和定义适用于本文件。

AFB₁ (Aflatoxin B₁)，黄曲霉毒素B₁

AFM₁ (Aflatoxin M₁)，黄曲霉毒素M₁

QDs，荧光量子点

QDs-B₁Ab或QDs-M₁Ab，用AFB₁小鼠单克隆抗体或者AFM₁小鼠单克隆抗体偶联标记的荧光量子点探针

AFB₁-BSA或AFM₁-BSA，AFB₁抗原或AFM₁抗原与牛血清白蛋白的偶联物

Anti-鼠IgG，抗鼠IgG抗体

4 荧光量子点快速测定法原理

为免疫竞争膜层析法。将荧光量子点探针QDs-B₁Ab或QDs-M₁Ab喷涂预置在检测卡试纸芯条的样品结合垫中，AFB₁-BSA或AFM₁-BSA抗原包被固定在硝酸纤维素膜的检测线（T线）位置，抗鼠IgG抗体包被固定在硝酸纤维素膜的质控线（C线）位置。待测样品加入样品结合垫，在毛细管作用的驱动下带动量子点探针一起沿试纸条向吸水纸方向流动，其中的目标抗原与量子点探针特异性结合而消耗了部份探针。液体流经检测线时，未与待测样品中目标抗原结合的量子点探针在检测线处与包被抗原结合形成复合物而滞留形成T线；剩余探针继续随液体流动，至质控线时与该处Anti-鼠IgG抗体结合形成复合物并滞留形成C线。层析一定时间后，T线和C线在紫外线激发光的照射下会发出荧光，T线荧光强度与C线荧光强度的比值（T/C）反映了待测样品中AFB₁或AFM₁的含量，两者呈反比关系。运用快速免疫荧光分析仪读取荧光强度，通过仪器内置标准曲线可直接显示待测样品中AFB₁或AFM₁的精确浓度。

5 仪器、检测卡与试剂

5.1 仪器

数显荧光扫描分析仪、漩涡震荡混合器、台式离心机（最大转速8000r/min）、微量移液器（100 μL、200 μL、1000 μL）、粉碎机、不锈钢筛网（10目、20目）、天平（精确至0.01 g）、吹风机/氮吹仪、可温控水浴锅。

5.2 荧光量子点检测卡

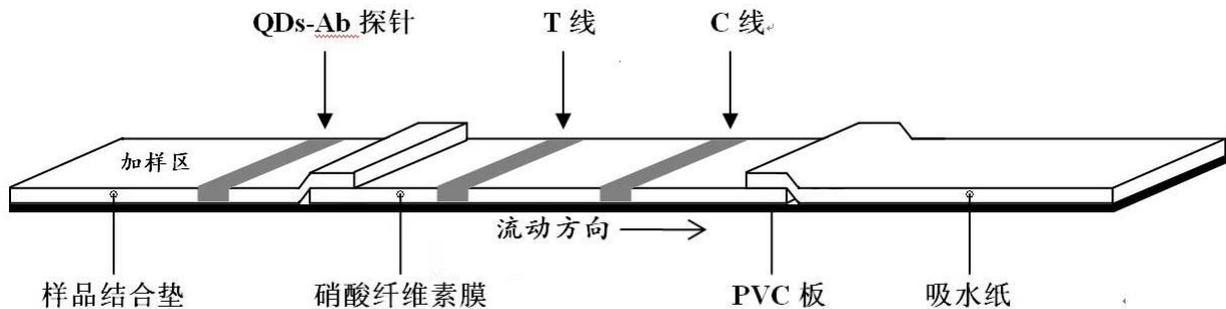
荧光量子点免疫层析快速定量检测卡由试纸芯条（下图）和载持塑料夹片组成，包括两个品种。

5.2.1 AFB₁荧光定量快速检测卡。用于测定样品中AFB₁的精确含量，检测限为0.5 ng/g（0.5 ppb）。

5.2.2 AFM₁荧光定量快速检测卡。包括普通型定量快检卡和高精度型定量快检卡两种规格。

普通型定量快检卡：用于测定样品中AFM₁的精确含量，检测限为0.05 ng/g（0.05 ppb）。

高精度型定量快检卡：用于更低值测定样品中AFM₁的精确含量，检测限为0.01 ng/g（0.01 ppb）。



5.3 试剂

除另有说明外，所有试剂均为分析纯，实验室用水应符合GB/T 6682中三级水要求。

样品稀释液（配方见附录A.1）、pH 7.4 0.02 mol/L PBS溶液（配方见附录A.2）、70%甲醇溶液：（配方见附录A.3）、甲醇、乙酸乙酯、氯化钙。

6 生物安全要求

样品的前处理准备和检测过程所涉及的实验操作，应符合GB 19489的规定。

7 样品的前处理准备

7.1 一般要求

样品的采集、运输和保存应符合GB 5491-1985、GB/T 14699.1-2005、GB/T 18088-2000和SN/T 2123中的规定。

7.2 AFB₁含量测定的样品前处理

7.2.1 玉米、大米、麦类（大麦、小麦及其经加工制品）、薯干、豆类、花生等食品原料，以及以这些食品原料为主要营养基质之动物饲料的测定前处理。

取待检样品 50 g~100 g, 用粉碎机粉碎后过 20 目筛网。准确称取 1 g 筛过的样品, 置于 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 70 % 甲醇溶液, 漩涡振荡器震荡 5 min 后以 6000 r/min 离心 5 min 或者室温静置至少 30 min。取 50 μ L 上清液加入到装有样品稀释液的 EP 管中, 震荡混匀, 6000 r/min 离心 1 min, 上清为样品待测液, 待检。

7.2.2 花生油、香油、菜籽油等样品的前处理。

准确称取 1 mL 样品置于 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 70 % 甲醇溶液, 漩涡振荡器震荡 5 min 后以 6000 r/min 离心 5 min 或者室温静置至少 30 min。小心吸取离心后下层液体, 取 50 μ L 加入到装有样品稀释液的 EP 管中, 震荡混匀, 6000 r/min 离心 1 min, 上清为样品待测液, 待检。

7.3 AFM₁ 含量测定的样品前处理

7.3.1 样品前处理分类

AFM₁ 含量的测定分为“普通快检法测定”和“高精度快检法测定”两种, 其样品适用范围和样品前处理方法有所不同(见 7.3.2 项和 7.3.3 项)。

“普通快检法测定”使用“AFM₁ 普通型定量快检卡”, 适用于鲜奶、纯牛奶等液态牛乳的直接稀释滴加检测, 检测限 0.05 ng/mL。“高精度快检法测定”使用“AFM₁ 高精度型定量快检卡”, 适用于所有牛乳及其乳制品中 AFM₁ 的提取测定, 检测限 0.01 ng/mL。

7.3.2 普通法测定 AFM₁ 含量的样品前处理。

如果待测样本为未经处理的全脂原奶, 可将其在 4 $^{\circ}$ C 下以 6000 r/min 离心 5 min, 离心上层为脂肪层, 吸取下层脱脂牛奶加入到装有同等体积样品稀释液的 EP 管中, 震荡混匀后用于检测。如果是经巴氏灭菌等方法处理的纯牛奶, 则无需离心, 用样品稀释液 1:1 二倍稀释后直接滴加检测。

7.3.3 高精度法测定 AFM₁ 含量的样品前处理。

7.3.3.1 鲜奶、纯牛奶、酸奶等液态乳制品

取 1 mL 样品液加入称有 0.2 g 氯化钙的 5 mL 离心管中, 混匀溶解后加入 2 mL 乙酸乙酯, 漩涡震荡混合器震荡 5 min 充分混匀后, 以 6000 r/min 离心 5 min, 取上清 400 μ L 加入 1.5 mL 离心管中, 吹风机/氮吹仪吹干; 后加入 100 μ L 样品稀释液, 漩涡震荡混合器震荡 1 min 充分溶解离心管壁上 AFM₁, 即为样品待测液。

7.3.3.2 普通乳粉

取 1 g 乳粉溶解于双蒸水中, 最终体积为 8.0 mL。取奶粉水溶液 1 mL 进行后续提取, 方法步骤同 7.3.3.1 项。

7.3.3.3 婴幼儿奶粉和配方奶粉

取 1.00 g 样品(精确至 0.01 g)置 15 mL 离心管中, 加入已预热至 50 $^{\circ}$ C 的双蒸水至 8.0 mL, 震荡使奶粉充分溶解后, 静置冷却至室温。取 1 mL 奶粉水溶液加入称有 0.2 g 氯化钙的 5 mL 离心管中, 混匀溶解后加入 2 mL 乙酸乙酯, 漩涡震荡 5 min 充分混匀, 以 6000 r/min 离心 5 min。如果离心后没有分离出上清, 则将样品离心管室温静置 20~30 min 后再次以 6000 r/min 离心 5 min。取上清 400 μ L 加入 1.5 mL 离心管中; 吹风机/氮吹仪吹干; 吹干后加入 100 μ L 样品稀释液, 漩涡震荡混合器震荡 1 min 充分溶解离心管壁上 AFM₁, 即为样品待测液。

7.3.3.4 乳酪等固体乳制品

SZDB/Z 333—2018

将样品粉碎后通过 10 目筛，取 1 g 样品与 50 mL 离心管中，加入双蒸水至终体积 8.0 mL，震荡混匀后成样品溶（悬）液。取 1.0 mL 样品溶（悬）液，加入 2 mL 乙酸乙酯，漩涡震荡混合器震荡 5 min 充分混匀，以 6000 r/min 离心 5 min，取上清 400 μ L 加入 1.5 mL 离心管中，吹风机/氮吹仪吹干；吹干后加入 100 μ L 样品稀释液，漩涡震荡混合器震荡 1 min 充分溶解离心管壁上 AFM₁ 后，即为样品待测液。

8 黄曲霉毒素含量的快速精确测定

8.1 加样测定前的准备与检查

- 8.1.1 先将经样品前处理获得的样品待测液和各种测定用液体室温放置 20 min。
- 8.1.2 取出装有快速检测卡的铝箔袋，检查包装是否完好，若有破损或漏气则不得使用。
- 8.1.3 打开铝箔袋，将检测卡取出，检查卡条是否完好，若有残缺或变形弯曲则不得使用。
- 8.1.4 将卡条加样孔朝外平放在实验台面上，检测卡从铝箔袋中取出后需在 30 min 内加样检测。

8.2 样品检测

- 8.2.1 打开数显荧光量子点判读仪选择快速检验模式，预热 10 min。
- 8.2.2 测定 AFB₁ 含量时，使用微量移液器取样品待测液 75 μ L，加入 AFB₁ 荧光定量快速检测卡加样孔中；测定 AFM₁ 含量时，则使用微量移液器取样品待测液 80 μ L，加入 AFM₁ 荧光定量快速检测卡加样孔中。
- 8.2.3 加样 15 min 后，将检测卡插入数显荧光量子点判读仪，开始检测，15~20 min 内测试结果有效。超过 20 min 判读结果无效。

9 测定结果

9.1 结果读取

样品中 AFB₁ 或 AFM₁ 含量由读数仪自动计算并数字显示。AFB₁ 单位为 ng/mL，AFM₁ 单位为 ng/mL。仪器内置计算公式见附录 C。

9.2 结果确证

初筛阳性的样品须用现行国标方法加以复核确证。

附 录 A
(规范性附录)
相关试剂配制

A.1 样品稀释液

吐温80 (Tween 80)	5 mL
0.02 M PBS	995 mL
混匀调节pH值至	7.4

A.2 pH7.4 0.02mol/L PBS 溶液

酸磷氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	2.30 g
一水酸磷二氢钠 (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0.52 g
氯化钠 (NaCl)	8.77 g
加去离子水溶解定容至	1 L
调节pH值至	7.4

A.3 70 %甲醇溶液:

甲醇	700 ml
加去离子水至	1000 ml

附录 B

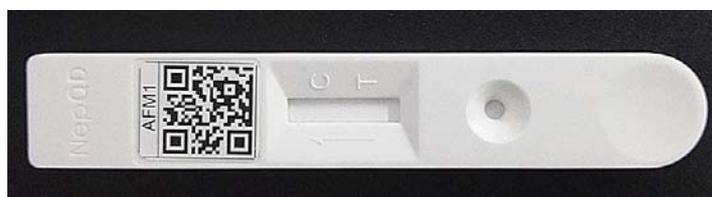
(资料性附录)

荧光量子点快速定量检测卡及荧光扫描判读仪

B.1 AFB₁ 荧光定量快速检测卡



B.2 AFM₁ 荧光定量快速检测卡



B.3 数显荧光量子点扫描判读仪



B.4 数显荧光量子点扫描判读仪结果显示窗口



附 录 C

(资料性附录)

荧光扫描仪内置计算公式及质量换算公式

C.1 数显荧光扫描分析仪内置计算公式如下：

$$y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$$

y 为 T/C 比值；

x 为样品中黄曲霉毒素含量；

A、B、C、D 为四个变量参数（可随不同批次而变化）。

C.2 AFM1 检测结果换算公式（将单位 ng/ml 换算为为 ng/g）：

$$X = \frac{\rho \times V \times n}{m}$$

X 为 AFM₁ 含量的质量分数

ρ 为荧光量子点判读仪读数值（ng/ml）

V 为牛奶、奶粉水溶液或样品水溶（悬）液的体积（ml）

n 为稀释倍数。测定普通奶粉、乳酪、婴幼儿奶粉和配方奶粉等固体或半固体乳制品时，由于样品溶液由原制品溶解、稀释 8 倍而来，则 n = 8。检测鲜奶、纯牛奶、酸奶等液态乳制品时，因未作样品稀释或溶解，则 n = 1。

m 为同体积牛奶、奶粉水溶液或样品水溶（悬）液的质量（g）。