###

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS XXXX

A 21

色素中生物毒素检测 胶体金快速定量法

Detection of mycotoxin in pigment Rapid quantitative method of colloidal gold technique

（征求意见稿）



发布

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局

中国国家标准化管理委员会

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

色素中生物毒素检测 胶体金快速定量法

**1 范围**

本标准规定了色素产品中黄曲霉素B1、**桔青霉素、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素**的胶体金快速定量检测方法原理、仪器设备、试剂和材料、操作步骤、结果分析。

本标准适用于色素产品中黄曲霉素B1、桔青霉素、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮的快速定量检测。

方法检出限为：黄曲霉毒素B1 2.0 μg/ kg，**桔青霉素 40 μg/ kg，玉米赤霉烯酮60 μg/ kg，呕吐毒素500 μg/ kg。**

**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 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

**3 原理**

试样提取液中的生物毒素在层析过程中与检测试剂条中的胶体金微粒发生呈色反应，颜色深浅与试样中生物毒素含量相关。用读数仪检定检测条上检测线和质控线颜色深浅，根据颜色深浅和读数仪内置曲线自动计算出试样中生物毒素含量。

**4 试剂材料**

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，实验室用水应符合GB/T 6682 中二级水的要求

4.1 黄曲霉毒素B1

纯度≥98.0%。

4.2 桔青霉素

纯度≥98.0%。

4.3 玉米赤霉烯酮

纯度纯度≥98.0%。

4.4 呕吐毒素

纯度纯度≥98.0%。

4.5 苯+乙腈混合液

量取98.0 mL苯，加2.0 mL乙腈，混匀。

4.6 稀释缓冲液

由胶体金免疫检测试纸条提供，或根据产品说明书配制。

4.7 70％甲醇溶液提取液

取70.0 mL的甲醇加水30.0 mL，混匀；或由胶体金生产商提供。

4.8 PBS缓冲溶液

称取8.0 g氯化钠、1.2 g磷酸氢二钠、0.2 g磷酸二氢钾、0.2 g氯化钾,用水溶解，调节pH 至7.0，用水定容至1000mL。

4.9 0.1%吐温20-PBS溶液

准确移取1 mL吐温20，以PBS缓冲溶液定容至1000mL。

4.10 0.1%磷酸溶液

准确移取1mL磷酸，加水定容至1000mL。

4.11 0.1 mg/L的生物毒素标准储备液

准确称取一定量的生物毒素标准品，用苯+乙腈（98:2）溶液（3.4.1）溶解，容量瓶定容至10 mL，配置0.1 mg/L的生物毒素标准储备液，保存于4℃备用，可保存1年。

**5 仪器设备及材料**

* 1. 天平：精度0.01 g。
	2. 粉碎机：转速不低于3000 r/min。
	3. 离心机：转速不低于4000 r/min。
	4. 涡旋振荡器。
	5. 读数仪
	6. 胶体金免疫层析检测试纸条：技术要求见附录A.
	7. 微量移液器：1μL~10μL，10μL~100μL，100μL~1000μL。
	8. 免疫亲和柱: 柱体积6mL,最大柱容量20ng,或等效柱。
1. **样品制备**
	1. **试样取样**

按照GB 5491执行

* 1. **试样制备**
		1. 固体样品：取有代表性的固体或样品500g，其中300 g用粉碎机（4.2）粉碎至全部通过20目筛，混匀，分两份密封冷冻保存。
		2. 取一份保存样品准确称取10.0 g试样于50 mL具塞锥形瓶中，加入20.0 mL试样提取液，密闭，用涡旋振荡器振荡2 min-3 min，静置后用滤纸过滤，或取1.5 mL混合液于离心管中，用离心机离心1 min。

取滤液或离心后上清液100 μL于另一离心管中，加入1.0 mL稀释缓冲液，充分混匀待测。如样品为特殊材料，需将稀释后的混合液用针头过滤器过滤，即为待测液

* + 1. 液体样品：液体待测样品用均质器（**处理不少于2min**）充分混匀后，用微量移液器分别吸取1.0 mL加入2个2.0 mL离心管中，一份密封冷冻保存，一份用于检测。

从待测离心管中吸取200μL液体样品于另一离心管中，加入2 mL稀释缓冲液（3.3.2），充分混匀待测。

* + 1. 净化处理：参考国标GB5009.222-2016 中红曲及其制品的净化方法：

将免疫亲和柱连接在10mL玻璃针筒下，准确移取10.0 mL上述样品滤液过免疫亲和柱，以1滴/s~2滴/s的流速全部通过亲和柱；加入10 mL 0.1%吐温20-PBS溶液，以1滴/s~2滴/s的流速淋洗柱子,直至空气进入到亲和柱中，弃去全部流出液。准确加入1.0mL洗脱液进行洗脱,洗脱流速为1滴/s~2滴/s。收集全部洗脱液于离心管中备用。

注：净化处理仅针对红曲红等对胶体金反应结果产生严重背景干扰的色素产品。

1. **样品测定**
	1. 参考胶体金免疫层析检测试纸条的储存要求，如需低温保存（2~8℃），使用前需将检测试纸条取出，室温放置20~30 min。
	2. 将放至室温的胶体金免疫层析检测试纸条浸入含300-500 μL待测溶液的离心管中，或将200 μL待测溶液加入到检测孔中。
	3. 室温孵育5 min 后。
2. **结果判定**

7.1反应结束后，取出胶体金免疫层析检测试纸条观察C线（质控线）和T线（检测线）的显色情况。若出现下述情况，视为无效检测：

1. C线不出现；
2. C线出现，但弥散或严重不均匀；
3. C线出现，但T线弥散或严重不均匀。

7.2选择读数仪的相应生物毒素检测频道，以目标毒素检测的阳性对照标准样品,开始样品测定，测定需要在2 min内完成，读数仪自动计算并显示样品中相应生物毒素的含量，单位为微克每千克（μg/kg）或微克每升（μg/L）。

1. **重复性**

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的20％。

**附录A**

**(规范性附录)**

**胶体金快速检测试纸条性能要求**

**A.1 准确性**

 采用最低检测限2倍、5倍、8倍浓度水平的实物标准样品，每个浓度水平测定不低于6次。计算检测条检测结果与实物标准样品的偏差，3个浓度水平的偏差均应控制在-20％~+20％之间。

**A.2 精密度**

采用最低检测限5倍浓度水平的实物标准样品，测定不低于6次，计算检测条批次内变异系数，变异系数≤20％。

**A.3 检测限**

测定20份阴性样品，计算平均值加3倍标准差，其结果应小于等于产品灵敏度标示值。

**A.4 批间稳定性**

采用约10μg/kg浓度水平的实物标准样品进行检测，不得低于6个批次，每个批次测定不低于2次，批内测定取平均值，计算检测条批间变异系数，变异系数应≤20％。