



中华人民共和国国家标准

GB/T 38475—2020

色素中生物毒素检测 胶体金快速定量法

Detection of mycotoxins in pigment—Rapid quantitative
method of colloidal gold strip test

2020-11-19 发布

2020-11-19 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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：中国计量大学、中国标准化研究院、江南大学、北京萨姆伯科技有限公司。

本标准主要起草人：崔海峰、叶子弘、马爱进、刘丽强、张明洲、俞晓平、许益鹏、申屠旭萍、张雅芬、匡华、郝帅。



色素中生物毒素检测

胶体金快速定量法

1 范围

本标准规定了用胶体金快速定量法检测天然色素产品中生物毒素的方法。

本标准适用于基于天然产物提取及发酵制备的天然色素产品中黄曲霉素 B₁、桔青霉素、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素的快速定量检测。

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/T 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胶体金微粒标记的特异性抗体竞争结合并发生呈色反应,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 试剂或材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯。

4.1 水

GB/T 6682,二级水。

4.2 黄曲霉毒素 B₁

纯度 $\geq 98\%$ 。

4.3 桔青霉素

纯度 $\geq 98\%$ 。

4.4 玉米赤霉烯酮

纯度 $\geq 98\%$ 。

4.5 呕吐毒素

纯度 $\geq 98\%$ 。



4.6 苯 + 乙腈混合液

量取 98.0 mL 苯,加 2.0 mL 乙腈,混匀。

4.7 稀释缓冲液

称取 2.422 8 g 三羟甲基氨基甲烷,加水溶解,调 pH=8.0;加入 9.0 g 氯化钠、5 mL Triton X-100,用水定容至 1 000 mL;或采用商品化的同类产品。

4.8 70%(体积分数)甲醇溶液提取液

取 70.0 mL 的甲醇加水 30.0 mL,混匀。

4.9 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 1 000 mL。

4.10 0.1%(体积分数)吐温 20-PBS 溶液

移取 1 mL 吐温 20,以 PBS 缓冲溶液定容至 1 000 mL。

4.11 0.1%(体积分数)磷酸溶液

准确移取 1 mL 磷酸,加水定容至 1 000 mL。

4.12 0.1 mg/L 的生物毒素标准储备液

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

5 仪器设备

5.1 天平:精度 0.01 g 和 0.01 mg。

5.2 粉碎机:转速不低于 3 000 r/min。

5.3 离心机:转速不低于 3 000 × g。

5.4 涡旋振荡器。

5.5 读数仪:可测定并显示胶体金免疫层析试纸条的检测结果。

5.6 胶体金免疫层析检测试纸条:性能要求见附录 A。

5.7 微量移液器。

5.8 免疫亲和柱:柱体积规格 1 mL 或 3 mL,柱容量不低于 200 ng,或等效柱。

6 样品制备



6.1 试样取样

按照 GB/T 5491 执行。

6.2 试样制备

6.2.1 固体样品

天平称取有代表性的固体或样品 500 g,其中 300 g 用粉碎机粉碎至全部通过 20 目筛,混匀,分两份密封冷冻保存。取一份保存样品准确称取 2.0 g 试样于 10 mL 具塞锥形瓶中,加入 20.0 mL 70% 甲醇溶液提取液,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 900 μL 于稀释缓冲液,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。

6.2.2 液体样品

液体待测样品用均质器,处理不少于 2 min,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 200 μL 离心液体样品于另一离心管中,加入 1.8 mL 稀释缓冲液,充分混匀待测。

6.2.3 净化

将免疫亲和柱连接在 10 mL 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 1.0 mL 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。

7 测定

7.1 低温保存的检测试纸条取出后,室温放置 20 min~30 min。

7.2 胶体金试剂条:将试纸条浸入含 300 μL ~500 μL 待测溶液的离心管中,室温孵育 5 min。

7.3 胶体金检测卡:将 60 μL ~80 μL 待测溶液加入到检测孔中,室温孵育 5 min。

7.4 宜选择胶体金检测试纸条或检测卡生产厂家的读数仪配套使用。

8 结果分析

8.1 反应结束后,取出胶体金免疫层析检测试纸条或检测卡观察 C 线(质控线)和 T 线(检测线)的显色情况。若出现 C 线不出现,或 C 线出现但弥散或严重不均匀,或 C 线出现但 T 线弥散或严重不均匀,均视为无效检测。

8.2 调整读数仪参数,固定好胶体金检测试纸条或检测卡,对目标毒素进行检测,测定需要在 2 min 内完成,重复测定 3 次,读数仪根据内置拟合曲线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($\mu\text{g}/\text{kg}$)或微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$)。

8.3 在相应生物毒素的检测范围内,基于阴性对照样品,设置空白样品添加的不同浓度梯度,其中黄曲霉毒素 B₁ 浓度范围为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~128 $\mu\text{g}/\text{kg}$;桔青霉素浓度范围为 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~640 $\mu\text{g}/\text{kg}$;呕吐毒素浓度范围为 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~14 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$;玉米赤霉烯酮浓度范围为 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1 920 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。基于标准样品浓度值与代表 T 线强度光密度值的积分面积检测数据,采用四参数 logistic 拟合算法建立标准曲线,拟合程度 R^2 值应在 0.99 以上。

9 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%。

10 其他

本方法检出限黄曲霉毒素 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。



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 $-20\% \sim +20\%$ 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 $\leq 20\%$ 。

A.3 检测限

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

A.4 批间稳定性

采用约 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 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,变异系数应小于或等于 20% 。

A.5 特异性

选取阴性待测样品,加入与目标检测生物毒素可能存在交叉反应的其他生物毒素,除目标检测生物毒素添加样品检测结果为阳性外,其余添加样品测定结果均为阴性。