

团 体 标 准

T/CCOA xx—20xx

食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 时间分辨荧光免疫层析法

Determination of aflatoxin B₁ in edible oil

Time- resolved fluorescent immunochromatographic method

（征求意见稿）

20xx-xx-xx 发布

20xx-xx-xx 实施

中国粮油学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国粮油学会提出。

本文件起草单位：中国农业科学院油料作物研究所，武汉轻工大学，武汉华美维士康生物工程有限公司。

本文件主要起草人：李培武、胡小风、张兆威、吴文琴、张奇、何东平、华权高、王督、姜俊、马飞、唐晓倩。

食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

时间分辨荧光免疫层析法

1 范围

本文件描述了时间分辨荧光免疫层析法测定食用油中黄曲霉毒素B₁方法。
本文件适用于大豆油、菜籽油、花生油等食用油中黄曲霉毒素B₁的测定。
本文件黄曲霉毒素B₁的检出限为1.0 µg/kg。方法定量范围为1-25 µg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中黄曲霉毒素 B₁ 与钨乳胶标记的特异性抗体发生结合后，抑制了层析过程中抗体与硝酸纤维素膜检测线上黄曲霉毒素 B₁-BSA 偶联物的免疫反应，使检测线时间分辨荧光强度降低，通过检测时间分辨荧光强度变化进行定量测定。

5 试剂

5.1 水，按照 GB/T 6682 中的要求，二级。

5.2 乙醇（CH₃CH₂OH）。

5.3 蔗糖（C₁₂H₂₂O₁₁）。

5.4 牛血清白蛋白（BSA），纯度大于 98%。

5.5 吐温 - 20（C₅₈H₁₁₄O₂₆）。

5.6 80%乙醇水溶液：取 80mL 乙醇（5.2），加入到 20 mL 水（5.1）中，混匀。

5.7 样品稀释液：取 1.0g 蔗糖（5.3）、0.5g 牛血清白蛋白（5.4）和 2.5g 吐温 - 20（5.5），溶解于 100.0 mL 水（5.1）中。

5.8 铈标记黄曲霉毒素 B1 抗体溶液：黄曲霉毒素 B1 抗体纯度 80% 以上，亲和力常数不低于 1.00×10^8 L/mol。黄曲霉毒素 B1 抗体与黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2 交叉反应率小于 10%。

5.9 1000 ng/mL 黄曲霉毒素 B1 标准溶液。

5.10 100 ng/mL 黄曲霉毒素 B1 标准储备液：准确吸取黄曲霉毒素标准溶液（5.9）1 mL 于 10 mL 容量瓶中，甲醇定容。4℃可保存 3 个月。

警告——由于黄曲霉毒素毒性很强，试验人员应注意自我保护。操作时，应避免吸入、接触黄曲霉毒素标准溶液。标准溶液配置应在通风橱内进行，工作时应戴眼镜、穿工作服、戴医用乳胶手套。凡接触黄曲霉毒素的容器，需浸入 10% 次氯酸钠溶液 12 小时以上。同时为了降低接触黄曲霉毒素的机会，本标准鼓励直接购买并使用黄曲霉毒素的有证标准储备液。

6 仪器与材料

6.1 时间分辨荧光检测仪：激发波长（ 365 ± 5 ） nm ，检测波长（ 615 ± 5 ） nm。

6.2 黄曲霉毒素时间分辨荧光免疫层析装置（图 1）：固定有黄曲霉毒素—BSA 偶联物。检测灵敏度不低于 $1.0 \mu\text{g/kg}$ ，用于样品中黄曲霉毒素与铈标记抗体预反应后再与黄曲霉毒素-BSA 偶联物反应的载体。

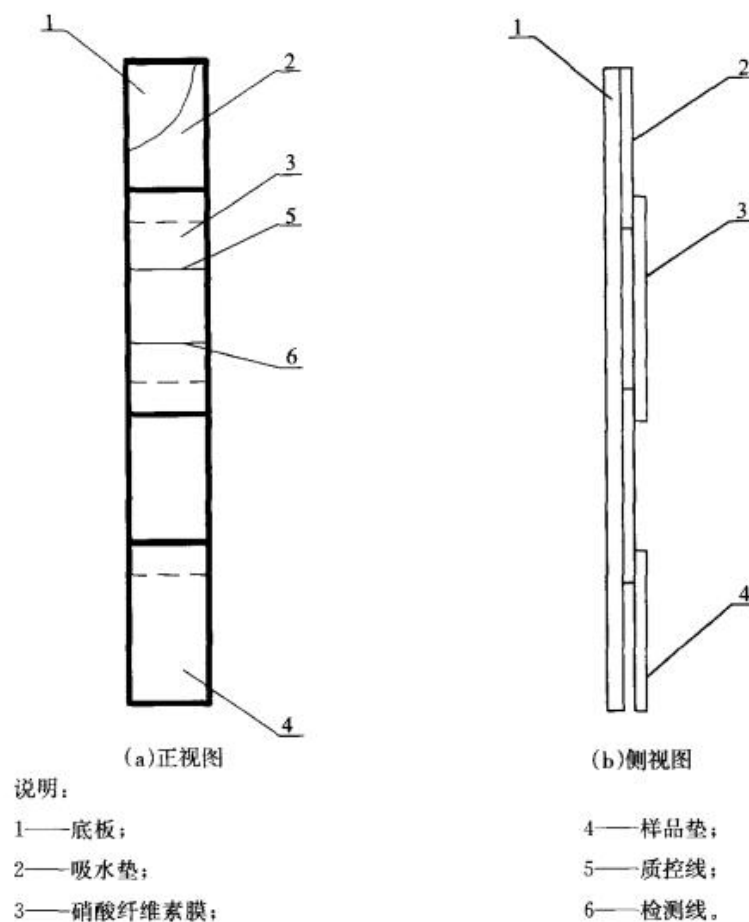


图 1 黄曲霉毒素 B1 免疫层析装置示意图

- 6.2.1 黄曲霉毒素一 BSA 偶联率为 1:5~1:20 (BSA : AFB1)。
- 6.2.2 样品垫：玻璃纤维、酯纤维或纸质薄片。
- 6.2.3 硝酸纤维素膜：4 cm 毛细时间不小于 135 s。
- 6.2.4 吸水纸。
- 6.2.5 底板。
- 6.2.6 连接胶带。
- 6.3 离心机：4000r/min。
- 6.4 分析天平：感量 0.01 g。
- 6.5 恒温装置：温控范围为 (37.0 ± 2.0) °C。
- 6.6 漩涡混匀仪。
- 6.7 微量移液器：1 μL~10 μL，10 μL ~100 μL，100 μL ~1000 μL。
- 6.8 手持读数仪。
- 6.9 耗材：枪头、离心管、50 mL 量筒、计时器等。
- 6.10 钨乳胶：荧光寿命≥600 μLs。

7 分析步骤

- 7.1 准确称取 1.0 g 食用油于 10 mL 离心管中，加入 1 mL 80%乙醇水 (5.6)，用漩涡混匀仪 (6.6) 提取 1 min，将震荡后的样本以 4000 r/min 离心 3 min。
- 7.2 将 7.1 中离心分层的提取液进行稀释。
 - 7.2.1 取 100 μL 样本上清液加入到 600 μL 样本稀释液 (5.7) 中，混匀。
 - 7.2.2 取 7.2.1 中 100 μL 混合溶液加入到 600 μL 样本稀释液 (5.7) 中，混匀即为待检液，备用。
- 7.3 取 150 μL 钨标记黄曲霉毒素 B1 抗体溶液于微孔中，冻干备用。
- 7.4 取稀释后的净化液 (7.2.2) 100 μL 垂直滴加于冻干微孔中 (7.3)，缓慢吸打 5 次以上使充分混匀，试纸条按箭头方向插入微孔中，盖上孵育器盖子，37°C 反应 5min 后取出试纸条，用纸巾吸干样品垫残留液体，立即使用手持读数仪 (6.8) 判读结果。
- 7.5 标准曲线。
 - 7.5.1 空白基质溶液制备：取阴性样品，按 7.1 制备空白基质溶液，备用。
 - 7.5.2 用制备好的黄曲霉毒素 B1 加标的食用油系列梯度阳性样本 (1 μg/kg, 3 μg/kg, 5 μg/kg, 10 μg/kg, 15 μg/kg, 20 μg/kg, 25 μg/kg) 作为标准曲线建立的样本。由低浓度到高浓度进行检测，根据检测线 T 信号值与质控线 C 信号值的比值 (T/C) 和标准工作溶液浓度

的自然对数值（Inc）建立标准曲线。

8 结果表示

试样中黄曲霉毒素 B1 含量以质量分数 X 计，数值以微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）表示，按式（1）计算。

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

式中：

ρ —从标准曲线上查得的测定液中黄曲霉毒素 B1 含量的数值，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V —样品测定液体积的数值，单位为毫升（ mL ）；

n —试样稀释倍数的数值；

m —试样质量的数值，单位为克（ g ）。

计算结果保留至小数点后两位。

9 精密度

9.1 重复性

在重复性条件下，黄曲霉毒素 B1 含量不大于 $10.0 \mu\text{g/kg}$ 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 20%；黄曲霉毒素 B1 含量大于 $10.0 \mu\text{g/kg}$ 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 15%。

9.2 再现性

在再现性条件下，黄曲霉毒素 B1 含量不大于 $10.0 \mu\text{g/kg}$ 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 30%；黄曲霉毒素 B1 含量大于 $10.0 \mu\text{g/kg}$ 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 20%。