《食品中米米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》

团体标准（报批稿）

编制说明

目 录

[一、标准立项的背景及意义 1](#_Toc126056608)

[二、项目的前期研究 1](#_Toc126056609)

[三、第一阶段 项目团体标准正式立项 2](#_Toc126056610)

[四、第二阶段 调研并形成《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（征求意见稿） 3](#_Toc126056611)

[五、第三阶段 向社会公开征求意见后再次修订形成《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（送审稿） 4](#_Toc126056612)

[六、第四阶段 经技术审查会修订形成《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（报批稿） 8](#_Toc126056613)

[七、与国内外有关法律法规和其它标准的关系 9](#_Toc126056614)

[八、标准的制（修）订原则 10](#_Toc126056615)

[8.1 实用性原则 11](#_Toc126056616)

[8.2 协调性原则 11](#_Toc126056617)

[8.3 规范性原则 11](#_Toc126056618)

[8.4 前瞻性原则 12](#_Toc126056619)

[九、各项技术内容确定的依据 12](#_Toc126056620)

[9.1 确定适用范围及检出限 12](#_Toc126056621)

[9.2 方法性能确定实验用到的检测试纸条 13](#_Toc126056622)

[9.3 方法性能确定实验用到的样品基质 13](#_Toc126056623)

[9.4 方法性能确定实验用到的标准品 13](#_Toc126056624)

[9.5 测定步骤与结果判读的确定 13](#_Toc126056625)

[**9.5.1 样品的前处理样品分析步骤的确定** 13](#_Toc126056626)

[**9.5.2 测定步骤的确定** 14](#_Toc126056627)

[**9.5.3 测定步骤的确定** 15](#_Toc126056628)

[**9.5.4 质控试验的确定** 16](#_Toc126056629)

[9.6 方法性能确定实验方案 16](#_Toc126056630)

[**9.6.1 样品本底的测定** 16](#_Toc126056631)

[**9.6.2灵敏度和假阴性率的计算** 16](#_Toc126056632)

[**9.6.3特异性和假阳性的计算** 16](#_Toc126056633)

[**9.6.4与参比方法一致性分析** 16](#_Toc126056634)

[**9.6.5交叉反应** 17](#_Toc126056635)

[**9.6.6 阳性样品对比** 17](#_Toc126056636)

[**9.6.7其他品牌胶体金试纸条的验证** 17](#_Toc126056637)

[十、方法性能验证结果 18](#_Toc126056638)

[10.1 样品前处理条件优化 18](#_Toc126056639)

[10.2 测定条件研究 20](#_Toc126056640)

[10.3 灵敏度和假阴性率 23](#_Toc126056641)

[10.4特异性和假阳性 26](#_Toc126056642)

[10.5 与参比方法一致性 26](#_Toc126056643)

[10.6 交叉反应率结果 27](#_Toc126056644)

[10.7 阳性样品胶体金试纸条检测结果 28](#_Toc126056645)

[10.8 其他品牌胶体金试纸条验证 29](#_Toc126056646)

[十一、方法性能验证结论 30](#_Toc126056647)

[十二、方法可能带来的经济和社会影响评估 31](#_Toc126056648)

[十三、起草过程中主要分歧意见的处理情况 32](#_Toc126056649)

[附 表1 33](#_Toc126056650)

一、标准立项的背景及意义

米酵菌酸（Bongkrekic acid, BA）是由唐菖蒲霍尔德菌致病变种菌（椰毒假单胞菌酵米面亚种）分泌的线粒体毒素，容易污染酵米面，银耳和木耳等。近年来，我国部分地区相继发生由鲜湿粉（如河粉）、凉皮及泡发木耳引起的中毒事件。最近，中国黑龙江省鸡西市的一户家庭因食用米酵菌酸污染的玉米粉导致9人死亡。然而，它最初被错误地认为是由黄曲霉毒素引起的食物中毒事件。米酵菌酸主要通过作用于细胞呼吸链系统从而产生毒害作用，在人体内的潜伏期为1-10 h，口服对人体的半数致死剂量为3.16 mg/kg。由于缺乏有效的解毒手段，消费者误食含米酵菌酸的食品，只能通过催吐和洗胃缓解，病死率超过40%。因此，对食品中的米酵菌酸进行监控检测就显得十分必要。

然而，食品中米酵菌酸的常用检测方法有高效液相色谱法（HPLC）、高效液相色谱串联质谱联用法（HPLC-MS/MS）等，该类仪器方法具有准确性好、灵敏度高等特点，但需要专业人员操作，检测过程复杂，时间长，成本高，不利于大量样品的现场快速筛查，也难于在基层检测单位进行推广应用。与仪器法相比，免疫检测方法因其操作简单、检测时间短、成本低等优点收到广大一线消费者和检测人员的青睐。其中免疫层析检测方法只需提取、稀释、点样等简单步骤5-10 min后便可直接通过肉眼判断检测结果，无需其他专业的操作和任何专业仪器，但目前市面上暂无针对食品中米酵菌酸的快速检测方法、产品和标准。

本项目旨在开发一种简单快速、适用于中食品中米酵菌酸的胶体金免疫层析快速检测方法来满足大量样品现场筛选和监控和提高我国食品监管部门的检测效率。

本研究无论从社会效益还是经济效益角度来说，都具有重大的应用意义，可以广泛应用于各级市场监督部门现场筛查、专项行动等，可以有效提高覆盖及靶向命中率，用现代化快速检测技术来装备我国食品安全管理体系，使其在保障我国食品安全方面发挥更重要的作用。

二、项目的前期研究

标准的制定本方法研究过程中查阅了国内外相关参考文献，研究了食品中米酵菌酸的样品前处理方法。根据市售快检产品的基质适用性、检测项目、检测限、检测步骤、结果判断等内容，选择了1 种满足检测要求的胶体金金试纸条进行方法学考察。根据原国家食药总局发布的《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科[2017]43 号）的要求，对米酵菌酸胶体金试纸条进行了性能指标（灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率）的分析，建立了食品中米酵菌酸的胶体金免疫层析快速定性检测方法。本方法经过多家检验机构实验室间验证，表现出了良好结果。本标准是按 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》给出的规则编写，技术内容是参照GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分:试验方法标准》确定。

技术路线图，如图1所示。

食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法

确定适用范围、检测项目、检出限

样品前处理方法

市场调研、优选快速检测产品

快速检测产品技术参数考察

快速检测方法性能指标评价

检验机构进行实验室间验证

完成方法文本和编制说明

三、第一阶段 项目团体标准正式立项

深圳市分析测试协会于2023年2月面向会员单位征集团体标准，项目组及时提出了团体标准制订立项申请。协会在2023年6月17日组织专家召开了立项评审会议，最后《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》项目通过专家组评审并获立项。

本方法主要起草单位：华南农业大学，深圳市计量监督检测研究院，汕头海关技术中心，广东省食品检验所，广州万联生物科技有限公司，深圳容金科技有限公司，岭南现代农业科学与技术省实验室河源分中心，广州市食品检验所，深圳市易瑞生物科技股份有限公司，广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司。

本方法主要起草人：徐振林，张世伟，陆奕娜，雷毅，李斌，曹雪铭，江林峰，刘海虹，陈子键，王炳志，梁科，肖剑。

四、第二阶段 调研并形成《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（征求意见稿）

根据第一阶段调研课题研讨会的各方意见，项目组对《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》进行了修改，并根据立项组专家建议将项目进行修改，对前处理条件进行了优化，对方法检出限、灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率等技术内容进行了研究，使得该标准更完善，更先进，适用范围更广。为了使标准适用全市相关企事业单位的实际情况，项目组在2023年6月至2023年8月，调研了深圳市通量检测科技有限公司、深圳市质量安全检验检测研究院、深圳计量质量检测研究院、重庆市食品药品检验检测研究院、山西省检验检测中心（山西省标准计量技术研究院）、广东省食品检验所，征求了标准制订的可行性、适用性等意见。

五、第三阶段 向社会公开征求意见后再次修订形成《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（送审稿）暂无

协会在2022年4月1日在协会官网面向社会发出了“关于《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》等8个团体标准公开征求意见的通知”（深分析测试〔2022〕5号），截止2022年5月1日前一个月内，共收到0个单位提出的0条修改建议。在2022年5月至2022年6月通过电话、发邮件等方式征求快检行业专家意见，截止2022年6月31日，共收到山东省食品药品检验研究院、山西省检验检验检测中心（山西省标准计量技术研究院）、深圳市质量安全检验检测研究院、广东省食品检验所、厦门市食品药品质量检验研究院、华南农业大学和重庆市食品药品检验检测研究院7个单位提出的22条修改建议。项目组汇总了反馈的修改建议，并对标准再次进行了修改，形成了送审稿。反馈意见汇总处理情况见表1。

表1 征求意见汇总处理表

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 文件名称 | 食品中米酵菌酸的快速检测  胶体金免疫层析法 | | | | | 文件种类 | 规范标准 |
| 牵头起草单位 | 华南农业大学 | | | | | 立项日期 | 2023.6 |
| 承办人 | 徐振林 | | 职务/职称 | 研发总监/教授 | | 联系电话 | 13570552215 |
| 序号 | 章条号 | 反馈意见内容 | | | 提出单位  (全称) | 处理意见 | 备注 |
| 1 |  |  | | |  |  |  |
| 2 |  |  | | |  |  |  |
| 3 |  |  | | |  |  |  |
| 4 |  |  | | |  |  |  |
| 5 |  |  | | |  |  |  |
| 6 |  |  | | |  |  |  |
| 7 |  |  | | |  |  |  |
| 8 |  |  | | |  |  |  |
| 9 |  |  | | |  |  |  |
| 10 |  |  | | |  |  |  |
| 11 |  |  | | |  |  |  |
| 12 |  |  | | |  |  |  |
| 13 |  |  | | |  |  |  |
| 14 |  |  | | |  |  |  |
| 15 |  |  | | |  |  |  |
| 16 |  |  | | |  |  |  |
| 17 |  |  | | |  |  |  |
| 18 |  |  | | |  |  |  |
| 19 |  |  | | |  |  |  |
| 20 |  |  | | |  |  |  |
| 21 |  |  | | |  |  |  |
| 22 |  |  | | |  |  |  |
| 说明：1.征求意见应采用网络、电话、书面以及会议相结合的方式，时间一般不少于1个月。  2.处理意见分为“采纳”或者“不采纳”，对于不采纳的，应当在“备注”栏注明原因。  （注：上述说明附在最后一页下面） | | | | | | | |

六、第四阶段 经技术审查会修订形成《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（报批稿）

深圳市分析测试协会于2023年月日召开技术审查会议，项目组汇总了评审专家组的意见，并形成了技术审查专家意见汇总表（见表2），评审会结束后项目组经过协会秘书处与专家经过多次讨论协商最终达成一致，由专家组进行投票表决标准是否发布。

表2 技术审查专家意见汇总表

标准名称：食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法

技术审查日期：2023年月日

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **专家姓名** | **意见描述** | **采纳情况及说明** | **备注** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

七、与国内外有关法律法规和其它标准的关系

在我国现行标准中，GB7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》规定银耳及其制品中米酵菌酸最大残留量的限量值为0.25 mg/kg，其他食品尚未见明确的限量标准。

检测方法：目前国内食品中米酵菌酸的检测方法有高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。对于米酵菌酸检测标准有两种，分别是GB5009.189-2016《食品中米酵菌酸残留量的测定》和TSATA042-2023《鲜湿米粉中米酵菌酸的测定液相色谱-串联质谱法》。

目前，国内常用的液相色谱法和液相色谱-串联质谱法为传统实验室检测方法，检测周期长、价格昂贵、操作复杂，不适合现场少量样品的快速检测。胶体金免疫层析法特异性强、操作简便、检测成本低，是目前技术较成熟、应用最广泛的现场快速检测方法之一，特别适合食用农产品、餐饮食品、散装食品等快速流通样品的现场快速筛查。本研究拟建立一种米酵菌酸的胶体金免疫层析快速检测方法用于基层食品安全监管开展现场快速筛查。

# 八、标准的制（修）订原则

本标准文件按照原国家食药总局《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科【2017】43号）的相关技术要求、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》以及《分析测试协会团体标准管理办法》的要求进行编制，遵循先进性、科学性、实用性的原则，在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。本标准注重科学性和可操作性的结合，利于推广应用。

8.1 实用性原则

传统仪器分析方法由于前处理繁琐、价格昂贵、操作专业要求高、试剂耗材消耗量大、检测周期长，已远远不能满足当前食品农残检测样品的简洁、快速、高灵敏度、大批量、低成本的需求。

快检方法编制应遵循原国家食药监总局发布的技术规范和现有抽样检验相关法规和标准要求，以发现问题样品为导向，有利于在实际监管工作中推广应用。

8.2 协调性原则

在《食品中米酵菌酸的快速检测 胶体金免疫层析法》编写过程中注意了与国内外相关法律法规、标准的协调问题，在内容上与现行法律法规、标准协调一致。为了统一检验标准、规范食品中米酵菌酸胶体金产品和市场，在方法制定的过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行国家强制性标准和行业标准。

8.3 规范性原则

方法表述参照现行法定标准要求进行，结构严谨合理，内容编排和层次划分符合逻辑，文字力求准确、简明、易懂。严格按照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》的要求和规定编写本标准的内容，保证标准的编写质量。

8.4 前瞻性原则

GB7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》规定银耳及其制品中米酵菌酸最大残留量的限量值为0.25 mg/kg，在此基础上，本标准兼顾当前米酵菌酸胶体金快速检测试纸条的检出限与国家标准GB5009.189-2016方法的检出限基本匹配，提高快速检测与定量检测结果的符合率。通过快检初筛，快检结果呈阳性时，可快速锁定疑似目标，提高食品中米酵菌酸监督抽检的“靶向性”。考虑到了快速检测技术的发展趋势和需要，在标准中体现了个别前瞻性条款，作为对行业发展的引导。

九、各项技术内容确定的依据

包括方法研制、实验条件的确定相关技术分析和方法的性能检验考察等内容。

9.1 确定适用范围及检出限

本方法是针对食品中米酵菌酸残留的检测，选择的适用范围是谷类发酵制品（发酵玉米面、糯玉米汤圆粉、吊浆粑、糍粑、凉粉、湿米粉、米线）、薯类制品（马铃薯粉条、甘薯面、山芋淀粉）、木耳和银耳。我国标准GB7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》中规定了银耳中米酵菌酸的最大残留量为0.25 mg/kg。GB5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》中方法检出限为0.005 μg/g。《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科[2017]43 号）规定，最低检出水平（检出限）设置对于存在国家标准限值规定的物质应小于或等于限值规定。因此本方法的检测性能（定性限）根据GB5009.189-2016中的方法检出限设定。

9.2 方法性能确定实验用到的检测试纸条

经过大量市场调研，市售米酵菌酸快速检测产品较少，主要包括深圳市易瑞生物技术股份有限公司、江苏美正生物科技有限公司、北京勤邦生物技术有限公司、广州万联生物科技有限公司等快检厂家。各厂家的检出限均符合GB7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》中规定的银耳中米酵菌酸最大残留量。最终本项目选择广州万联生物科技有限公司的米酵菌酸胶体金试纸条进行方法学研究。该产品适用范围与检测限均满足本项目的要求。

9.3 方法性能确定实验用到的样品基质

空白样品：经仪器方法确认，未检出米酵菌酸的食品。

9.4 方法性能确定实验用到的标准品

标准品名称：甲醇中米酵菌酸溶液标准物质

品牌及编号：上海安谱实验科技股份有限公司，产品编号[CDAA-290015](https://www.ncrm.org.cn/Web/Ordering/MaterialDetail?autoID=4419)

浓度：500 mg/L（甲醇）

9.5 测定步骤与结果判读的确定

**9.5.1** **样品的前处理****样品分析步骤的确定**

9.5.1.1试样制备

银耳、木耳需去蒂。

称取不少于100 g具有代表性的谷类发酵制品（发酵玉米面、糯玉米汤圆粉、吊浆粑、糍粑、凉粉、湿米粉、米线）、薯类制品（马铃薯粉条、甘薯面、山芋淀粉）、木耳或银耳样品，剪碎，用组织粉碎机充分粉碎混匀，均分成两份，分别装入洁净容器作为试样和留样，密封，标记。留样置于-20 ℃保存。

9.5.1.2 试样提取

准确称取1 g（精确至0.1 g）制备的试样放入15 mL离心管中，加入3 mL样品提取液，涡旋或上下振荡1 min，室温下4000 r/min离心3 min。静置1min，取全部上层有机相，氮吹仪50℃吹干，加入0.2 mL样品稀释液涡旋混匀，混合液即为待测液。。

1. 试样提取建议按照试剂盒说明书。

**9.5.2 测定步骤的确定**

9.5.2.1不同食品基质的最大残留限量

| 基质名称 | 最大残留限量/（mg/kg） |
| --- | --- |
| 谷类发酵制品：发酵玉米面、糯玉米汤圆粉、吊浆粑、糍粑、凉粉、湿米粉、米线  薯类制品：马铃薯粉条、甘薯面、山芋淀粉  木耳 | 暂无 |
| 银耳 | 0.25 |

9.5.2.2测定

吸取待测液200 μL加入金标微孔中，缓慢抽吸5～10次至待测液与金标微孔试剂充分混匀，在室温（20～30℃）温育3 min，将试纸条插入到金标微孔中，室温（20～30℃）反应6 min后，从微孔中取出试纸条，除去试纸条下端的样品垫，进行结果判定。

1. 测定步骤建议按照试纸条说明书。
2. 结果判定建议使用读数仪，读数仪的具体使用参照仪器使用说明书。

**9.5.3 测定步骤的确定**

根据胶体金免疫层析试剂盒说明书要求进行结果判定，可采用目视法或胶体金读数仪法判定结果。

（一）目视法

通过对比质控线(C线)和检测线(T线)的颜色深浅进行结果判定。目视结果示意图见图2。

1、无效结果

质控线(C线)不显色无论检测线(T线)是否显色，判定为无效结果；质控试验结果不符合要求时，同批次所有检测结果判定为无效结果。

2、阳性结果

质控线(C线)显色若检测线(T线)不显色或颜色浅于质控线(C线)表示试样中含有米酵菌酸且其含量高于方法检出限，判定为阳性结果。

3、阴性结果

质控线(C线)显色若检测线(T线)颜色深于或等于质控线(C线)表示试样中不含米酵菌酸成其含量低于方法检出限，判定视为阴性结果。

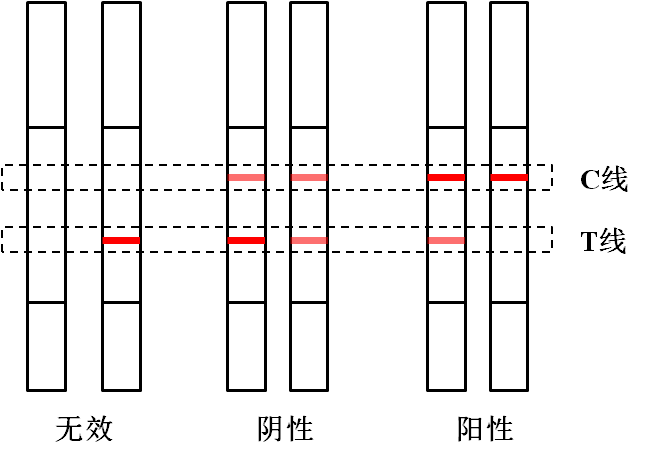


图2 结果判定示意图

（二）胶体金读数仪法

按照胶体金读数仪说明书进行操作，直接读取检测结果，并按胶体金读数仪说明书进行判定。质控试验结果不符合要求时，同批次所有检测结果判定为无效结果。

**9.5.4 质控试验的确定**

每批样品应同时进行空白试验和阳性质控试验，可根据检测样品量制定适宜频次的质控试验。

9.6 方法性能确定实验方案

**9.6.1 样品本底的测定**

采集的样品参考GB5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》确定本底值，选取阴性样品作为空白样品用于方法验证。

**9.6.2灵敏度和假阴性率的计算**

根据GB5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》中该法的检出限为0.005 μg/g。分别选取50个添加1倍关注浓度的样品和2倍关注浓度的样品，考察灵敏度和假阴性率，计算方法见附表1。

**9.6.3特异性和假阳性的计算**

选取50个空白样品以及50个添加水平为0.5倍关注浓度样品，考察特异性和假阳性率。计算方法见附表1。

**9.6.4与参比方法一致性分析**

根据GB 7096-2014中米酵菌酸在银耳中最大残留量的限量值、GB5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》及食品安全监管需要，确定米酵菌酸胶体金免疫层析快速检测方法应用的基质为谷类发酵制品、薯类制品、木耳和银耳等基质。因此，以湿米粉、木耳和银耳为代表基质开展后续方法学考察。

选取自然样品，湿米粉、木耳和银耳各10份进行方法比对，由于GB5009.189-2016为液相色谱法，T/SATA042-2023为液相色谱－质谱联用法，考虑测试结果精确性。因此，最终选择参比方法为GB5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》作为文本中所选用的参比方法。

**9.6.5交叉反应**

交叉反应率表示采用快检方法及其相关产品的交叉反应率反映产品的特异性，即目标物质检出限与干扰物质（同系物或衍生物）检出阳性的最小浓度的比值（以百分比计）。用提取液分别添加检出限水平的目标物或不同浓度梯度的其他结构近似物质，记录结果，对其他常见的毒素进行交叉反应验证，分析快检方法的特异性。选取毒黄素、T-2毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素、呕吐毒素、黄曲霉毒素B1、玉米赤霉酮，为考察本方法所采用的胶体金试纸条对上述化合物的交叉反应，用样品稀释液将各化合物配制成20倍检出限浓度，然后进行检测。

**9.6.6 阳性样品对比**

选取经GB5009.189-2016 法测定为阳性的米粉样品，检测结果为0.002 mg/kg，按本方法用胶体金试纸条进行验证。

**9.6.7其他品牌胶体金试纸条的验证**

为验证其他品牌的米酵菌酸胶体金试纸条对本标准的适用性，选择北京勤邦生物技术有限公司、深圳市易瑞生物科技股份有限公司，江苏美正生物科技有限公司研制生产的米酵菌酸胶体金试纸条对空白样品、0.5 倍关注浓度、1倍关注浓度及2倍关注浓度进行测定。

十、方法性能验证结果

10.1 样品前处理条件优化

本项目组参考了已发布的快速检测方法LST6111-2015《粮食中黄曲霉毒素B1测定 胶体金快速定量法》。该快速检测方法的样品前处理过程可以概况为：（1）称样；（2）提取；（3）振荡离心；（4）稀释，待用。整个样品前处理过程简单、快速。另外，本项目组还参考了KJ202102《水产品中组胺的快速检测》，样品前处理方法也是提取液提取后，振荡混匀、离心，取上清液用稀释液稀释进行测定。

综合上述信息，本项目组确定了样品前处理方法为：准确称取1 g（精确至0.1 g）制备的试样放入15 mL离心管中，加入3 mL样品提取液，涡旋或上下振荡1 min，室温下4000 r/min离心3 min。静置1min，取全部上层有机相，氮吹仪50℃吹干，加入0.2 mL样品稀释液涡旋混匀，混合液即为待测液。

10.1.1 提取液体积

选用湿米粉阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.005 mg/kg），各称取1 g放入离心管中，分别加入1、3、5 mL提取液，盖上盖子，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，静置1min，取全部上层有机相，氮吹仪50℃吹干，加入0.2 mL样品稀释液涡旋混匀，混合液即为待测液。

表1 提取液体积对检测结果的影响

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 提取液体积（mL） | | |
| 1 | 3 | 5 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.005 | C线 | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：随着提取液体积的增加，胶体金试纸条中的条带颜色有变深的趋势。当提取液体积为1 mL时，C线和T线颜色相对略浅，虽然可以有效判读阴性或阳性结果，但显色仍然不是特别充分、均匀，表明提取效率不高；当提取液体积为5 mL时，阳性样品的T线颜色显著变深，不能被有效抑制住；当提取液体积为3 mL时，提取效率最高，0 mg/kg、0.005 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.005 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。由此可见，提取液过少或过多，提取效率都会有所降低，易出现错误结果。本方法的提取液体积建议为3 mL。

因此，本方法最终确定的前处理过程为：准确称取剪碎混匀的试样1 g（精确至0.01 g）至15 mL离心管中，加入3 mL样品提取液，盖上盖子，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，静置1min，取全部上层有机相，氮吹仪50℃吹干，加入0.2 mL样品稀释液涡旋混匀，混合液即为待测液。考虑GB 7096-2014规定不同的食品最大残留限量不同，不同的食品再根据限量值取提取液。也考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的前处理方法进行操作。

10.2 测定条件研究

样品前处理完成后，取待测液进行胶体金试纸条定性检测。本项目对定性检测结果可能产生影响的相关因素进行研究，确定测定条件。

10.2.1 待测液-微孔孵育时间

选用湿米粉阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.005 mg/kg），按9.5.1确定的方法进行样品前处理。取200 μL待测液加入试纸条的金标微孔中→室温反应时间梯度：1、3、5、7min→读取检测结果。

本方法所采用的胶体金试纸条，产品说明书的孵育时间为3 min。为了考察待测液-微孔孵育时间对抗原抗体反应的影响，研究对比了湿米粉基质的1 min 、3 min、5min、7 min孵育时间的测定结果，详见表2。

表2 试纸条待测液-微孔孵育反应时间对检测结果的影响

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 反应时间（min） | | | |
| 1 | 3 | 5 | 7 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.005 | C线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋＋ |
| T线 | ＋/－ | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：试纸条待测液-微孔孵育反应时间在1~7 min范围内，随着时间的延长，胶体金试纸条中的条带颜色显著变深。当反应1 min时，阳性样品的检测结果中T线和C线显色不充分，两者颜色程度相近，不利于有效判读阴性或阳性结果；当反应3 min时，0 mg/kg、0.005 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.005 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。

当反应5 min、7 min时，阴性样品检测结果，C线显色严重；阳性样品检测结果，T线显色严重，不能被抑制住。由此可见，反应时间过长，极易出现错误结果。本方法的反应时间建议为3 min。同样，考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的时间进行操作。

10.2.2 试纸条-待测液反应时间

本方法所采用的胶体金试纸条，产品说明书的反应时间为6 min。研究对比了湿米粉基质的1 min 、3 min、6 min、9 min反应时间的测定结果，详见表3。

表3 试纸条-待测液反应时间对检测结果的影响

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 反应时间（min） | | | |
| 1 | 3 | 6 | 9 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.005 | C线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋＋ |
| T线 | ＋/－ | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：试纸条反应时间在1~9 min范围内，随着时间的延长，胶体金试纸条中的条带颜色显著变深。当反应1 min时，阳性样品的检测结果中T线和C线显色不充分，两者颜色呈度相近，不利于有效判读阴性或阳性结果；当反应3 min时，C线和T线颜色仍相对略浅，虽然可以有效判读阴性或阳性结果，但显色仍然不是特别充分、均匀；当反应6 min时，0 mg/kg、0.005 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.005 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。当反应9 min时，阴性样品检测结果，C线显色严重；阳性样品检测结果，T线显色严重，不能被抑制住。由此可见，反应时间过长，极易出现错误结果。本方法的反应时间建议为6 min。同样，考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的时间进行操作。

10.2.3反应温度

选用湿米粉阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.005 mg/kg），按9.5.1确定的方法进行样品前处理。取200 μL待测液加入试纸条的金标微孔中→15℃、室温、35℃、45℃反应3 min→插入试纸条反应6 min→读取检测结果。

表4 试纸条反应温度对检测结果的影响

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 反应温度（℃） | | | |
| 15 | 室温 | 35 | 45 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.05 | C线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋/－ | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：随着反应温度的升高，胶体金试纸条中的条带颜色有变深的趋势。当反应温度为15℃时，C线和T线颜色相对略浅；当反应温度为45℃时，阳性样品的T线颜色显著变深，不能被有效抑制住。当反应温度为室温和35℃时，0 mg/kg、0.005 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.005 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。由此可见，抗体与待测目标物进行结合反应，需要在适宜温度条件下才能高效反应，温度过高或过低都不利于结合反应的进行。考虑到操作的便捷性，本方法的试纸条反应温度选择室温。同样，考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的温度进行操作。

10.3 灵敏度和假阴性率

选取经GB5009.189-2016《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》测试不含米酵菌酸的湿米粉、木耳和银耳作为空白样品，GB5009.189-2016中方法检出限为0.005 mg/kg，因此设定湿米粉和木耳的添加浓度为0.005 mg/kg，GB7096-2014 中规定银耳中米酵菌酸的限量为0.25 mg/kg，因此设定银耳的添加浓度为0.25 mg/kg，即关注浓度。添加水平为1倍关注浓度、2倍关注浓度，考察灵敏度和假阴性率。两个浓度水平的样品，每个浓度水平各50 份试样，按前述样品前处理方法进行。试纸条检测结果如下：

表5 1倍检测限和2倍检测限试纸条检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 检测对象 | 添加浓度  （mg/kg） | 检测结果 | 灵敏度  （%） | 假阴性率  （%） | 总体灵敏度  （%） | 总体假阴性率（%） |
| 湿米粉 | 0.005 | 2（-）  48（+） | 96 | 4 | 98 | 2 |
| 0.01 | 0（-）  50（+） | 100 | 0 |
| 木耳 | 0.005 | 0（-）  50（+） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.01 | 0（-）  50（+） | 100 | 0 |
| 银耳 | 0.25 | 1（-）  49（+） | 98 | 2 | 99 | 1 |
| 0.5 | 0（-）  50（+） | 100 | 0 |

结论：1倍检测限和2倍检测限米酵菌酸胶体金检测试纸条结果都为阳性，因此灵敏度≥95%，假阴性率≤5%。

**表5-1 15种不同样品基质验证结果**

| **基质/添加浓度（mg/kg）** | **产品A** | | | **产品B** | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **0** | **0.0025** | **0.005** | **0** | **0.0025** | **0.005** |
| 发酵玉米面 | － | － | + | － | － | + |
| 糯玉米汤圆 | － | － | + | － | － | + |
| 吊浆粑 | － | + | + | － | + | + |
| 糍粑 | － | － | + | **无效** | **无效** | **无效** |
| 凉皮 | － | － | + | － | － | + |
| 湿河粉 | － | － | + | － | － | + |
| 陈村粉 | － | － | + | － | － | + |
| 濑皮粉 | － | － | + | － | － | + |
| 米线 | － | － | + | － | － | + |
| 肠粉 | － | + | + | － | + | + |
| 马铃薯粉条 | － | － | + | － | － | + |
| 甘薯面 | － | － | + | － | － | + |
| 山芋淀粉 | － | － | + | － | － | + |
| 木耳 | － | － | + | － | － | + |
| 银耳 | － | － | + | － | + | + |

结论：由表5-1结果可知，产品A在吊浆粑两种基质中1/2倍关注浓度时出现假阳性，其余基质验证结果呈现阴性，在空白浓度时所有基质均呈阴性，在1倍关注浓度时所有基质均呈现阳性。产品B在测试糍粑时出现无效结果，测试空白样品吊浆粑、肠粉、银耳基质时出现假阳性，在实际检测过程中需要多加关注。

10.4特异性和假阳性

选用湿米粉、木耳和银耳样品，采用空白基质加标的方式，制备成2个浓度水平（0.5倍检测限、空白基质）的样品各50份。采用本方法规定的样品前处理和测定步骤对样品进行检测，试纸条检测结果如下：

表6 0.5倍检测限和空白基质试纸条检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 检测对象 | 添加浓度  （mg/kg） | 检测结果 | 特异性  （%） | 假阳性率  （%） | 总体特异性  （%） | 总体假阳性率（%） |
| 湿米粉 | 0 | 50（-），0（+） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.0025 | 50（-），0（+） | 100 | 0 |
| 木耳 | 0 | 49（-），1（+） | 98 | 2 | 99 | 1 |
| 0.0025 | 50（-），0（+） | 100 | 0 |
| 银耳 | 0 | 50（-），0（+） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.125 | 50（-），0（+） | 100 | 0 |

结论：0.5倍检测限和空白基质米酵菌酸胶体金检测试纸条结果都为阴性，因此特异性≥90%，假阳性率≤10%。

10.5 与参比方法一致性

选取湿米粉、木耳和银耳作为检测基质，每个基质10份样品，5份阴性样品和5份阴性加标样品，分别用胶体金免疫层析方参比方法测样品中的米酵菌酸含量，同时用参比方法GB5009.189-2016 《食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》检测米酵菌酸含量，将胶体金免疫层析方法与参比方法的结果进行一致性对比，两种方法的一致性分析按照《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科【2017】43 号）要求进行卡方检验与显著性差异分析。

表7 湿米粉比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 胶体金法检测结果 | － | － | － | － | － | + | + | + | + | + |
| 参比法检测结果(mg/kg) | ND | ND | ND | ND | ND | 1.0 | 0.025 | 0.023 | 0.035 | 0.045 |

表8 木耳比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 胶体金法检测结果 | － | － | － | － | － | + | + | + | + | + |
| 参比法检测结果(mg/kg) | ND | ND | ND | ND | ND | 0.024 | 0.021 | 0.020 | 0.042 | 0.040 |

表9 银耳比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 胶体金法检测结果 | － | － | － | － | － | + | + | + | + | + |
| 参比法检测结果(mg/kg) | ND | ND | ND | ND | ND | 0.091 | 0.087 | 0.085 | 0.181 | 0.178 |

注：参比法检测结果ND代表未检出，－代表低于胶体金法检出限并高于参比法检测限；胶体金法检测结果－代表低于检出限，+代表高于检出限。

结论：由结果可见试纸条法与仪器法结果一致率达到100%，表明试纸条法检测准确率较高。

10.6 交叉反应率结果

采用常见的毒素测定特异性，毒黄素、T-2毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素、呕吐毒素、黄曲霉毒素B1、玉米赤霉酮等属于该范畴，有可能会产生交叉反应。为了考察本方法所采用的胶体金试纸条对上述化合物的交叉反应，将各化合物配制成20倍检出限浓度（0.005 mg/kg），然后进行检测，结果见表10。

表10 交叉反应实验

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 化合物名称 | 浓度（mg/kg） | 检测结果 | 交叉反应率 |
| 米酵菌酸 | 0.005 | 阳性 | 100% |
| 毒黄素 | 0.10 | 阴性 | 无 |
| T-2毒素 | 0.10 | 阴性 | 无 |
| 赭曲霉毒素 | 0.10 | 阴性 | 无 |
| 伏马毒素 | 0.10 | 阴性 | 无 |
| 呕吐毒素 | 0.10 | 阴性 | 无 |
| 黄曲霉毒素B1 | 0.10 | 阴性 | 无 |
| 玉米赤霉酮 | 0.10 | 阴性 | 无 |

结论：由结果可知，本方法采用的胶体金试纸条对上述药物均无交叉反应。

10.7 阳性样品胶体金试纸条检测结果

将阳性河粉、吊浆粑、木耳、银耳样品用米酵菌酸胶体金试纸条检测的结果见图3，结果检测结果为阳性，与仪器法结果相一致，表明此方法可以用于实际样品的检测。

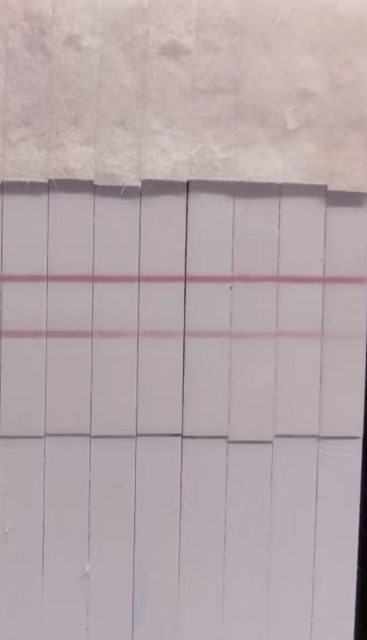


图3 实际样品检测结果

10.8 其他品牌胶体金试纸条验证

使用深圳易瑞生物科技股份有限公司、北京勤邦生物技术有限公司、广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司研制生产的米酵菌酸胶体金试纸条对空白样品、0.5 倍关注浓度、1倍关注浓度及2倍关注浓度的测定结果见表11。

表11 不同品牌的胶体金试纸条检测结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 品牌 | 浓度 | | | |
| 空白 | 0.5倍  检测水平 | 1倍  检测水平 | 2倍  检测水平 |
| 深圳易瑞生物科技股份有限公司 | 0（+）  20（-） | 0（+）  20（-） | 20（+）  0（-） | 20（+）  0（-） |
| 北京勤邦生物技术有限公司 | 0（+）  20（-） | 0（+）  20（-） | 20（+）  0（-） | 20（+）  0（-） |
| 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司 | 0（+）  20（-） | 0（+）  20（-） | 20（+）  0（-） | 20（+）  0（-） |

注：－代表低于检出限，+代表高于检出限。

结论：由结果可见，1倍关注浓度及2倍关注浓度下试纸条结果均为阳性，空白样品和0.5 倍关注浓度结果均为阴性，表明本标准适用于不同品牌的米酵菌酸胶体金试纸条。

十一、方法性能验证结论

本研究采用胶体金免疫层析方法对湿米粉、木耳、银耳中的米酵菌酸进行检测。

本快速检测方法在起草过程中，参考了食品中米酵菌酸检测的相关标准，筛选出一种简单、快速、成本低廉的样品前处理方法。通过单因素变量测试，对影响胶体金试纸条检测结果的测定条件进行了研究，确定了提取液体积、待测液-微孔孵育时间、试纸条-待测液反应时间、检测反应温度等测定条件。考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，本方法对测定条件不做限定，在实际工作中可按照产品说明书规定的测定步骤进行操作。

根据《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科【2017】43 号），本项目进行方法性能指标评价，结果表明方法性能指标：检出限设定谷类发酵制品（发酵玉米面、糯玉米汤圆粉、吊浆粑、糍粑、凉粉、湿米粉、米线）、薯类制品（马铃薯粉条、甘薯面、山芋淀粉）、木耳和银耳中米酵菌酸的检出限为0.005 mg/kg。该方法灵敏度≥95%，特异性≥90%，假阴性率≤5%，假阳性率≤10%。经过方法验证表明，该米酵菌酸试纸条具有很好的灵敏度与特异性。符合本方法规定性能指标要求（灵敏度≥95%，特异性≥90%，假阴性率≤5%，假阳性率≤10%）。

本项目也对本快速检测方法进行实验室间验证，验证结果不仅证实了本快速检测方法性能指标，也证明了本快速检测方法切实可行，具有良好的可操作性。

表12 四种浓度水平样品方法性能指标计算表（以豇豆为例）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品情况" | 检测结果b | | 总数 |
| 阳性 | 阴性 |
| 豇豆 | | | |
| 阳性（1倍检测限） | 48 | 2 | 50 |
| 阳性（2倍检测限） | 50 | 0 | 50 |
| 阴性（空白） | 0 | 50 | 50 |
| 阴性（1/2倍检测限） | 0 | 50 | 50 |
| 总数 | 98 | 102 | 200 |
| 显著性差异(χ2) | χ2=0.5<3.84表示待确认方法与参比方法的阳性确证比率在95%的置信区间内没有显著性差异 | | |
| 灵敏度（p+，％) | p+=98/100=98% | | |
| 特异性（ p-， %） | p-=100/100=100% | | |
| 假阴性率（ pf-， %) | pf-=2/100=2% | | |
| 假阳性率（ pf+， %) | pf+=0/100=0% | | |
| 相对准确度， %c | (98+100)/(100+100)=99% | | |
| a由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果；  b由待确认方法检验得到的结果。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。 | | | |

十二、方法可能带来的经济和社会影响评估

本项目将提供一种快速检测食品中米酵菌酸的免疫胶体金方法。方法简便高效，为国内不同检测机构，尤其是生产一线及基层部门提供科学、统一的快速测定方法，是实验室常规检测方法的有益补充，社会效益尤为明显：一方面该标准的发布实施可以提升市场监管部门对食用农产品质量安全监管水平，及时筛查发现食品中米酵菌酸残留，保障消费者的健康安全和权益；另一方面可增强检测机构的服务能力和规范快检行业有序发展，保障食品安全，具有明显的社会效益，同时也可创造出一定的经济效益。

本方法标准，为食品中米酵菌酸的快速检测方法（胶体金法）提供规范统一的技术指标参数，从而倒逼快检产品企业不断创新和提高产品质量，形成良好的市场优胜劣汰机制，促进食品快检行业高质量发展。

十三、起草过程中主要分歧意见的处理情况

本标准制定过程中无重大分歧意见。

附 表1

快速检测方法性能指标计算表

表A.1性能指标计算方法

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品情况① | 检测结果② | | 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，%③ | （N11+N22）/(N1.+N2.) | | |
| 注：  ① 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果；  ② 由待确认方法检验得到的结果。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。  ③ 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。 | | | |