

中华人民共和国粮食行业标准

**粮油检测 谷物中赭曲霉毒素 A 的测定
时间分辨荧光免疫层析快速定量法**

(征求意见稿)

编制说明

标准起草组

2022 年 9 月

《粮油检测 谷物中赭曲霉毒素 A 的测定 时间分辨荧光免疫层析快速定量法》编制说明

1. 工作简况

1.1 任务来源及协作单位

1.1.1 标准下达计划

根据《国家粮食和物资储备局办公室关于下达 2019 年第一批粮油行业标准制修订计划的通知》（国粮办发〔2019〕192 号）的要求，开展《粮油检测 谷物中赭曲霉毒素 A 的测定 时间分辨荧光免疫层析快速定量法》的起草工作，由中国农业大学和国家粮食和物资储备局科学研究院负责。起草单位成立标准起草组进行本标准制定的各项工作。

1.1.2 标准计划项目调整

2022 年 5 月申请延期 6 个月，用于补充方法验证部分数据。

1.1.3 标准制修订的背景、必要性和重要意义

赭曲霉毒素 A（Ochratoxin A, OTA），主要由多种生长在粮食（小麦、玉米、大麦、燕麦、黑麦、大米和黍类等）、花生、蔬菜（豆类）等农作物上的曲霉和青霉菌产生的一类化合物。OTA 可侵害人及动物肝脏与肾脏，引起肝脏和肾脏损伤，大剂量可能引起肠黏膜炎症和坏死；另外，还在动物试验中观察到 OTA 具有致畸毒性。我国早在 2005 年颁布了粮食和食品中 OTA 的限量标准，2017 年颁布了国家食品安全标准-《食品中真菌毒素限量》规定小麦、玉米等谷物及豆类中 OTA 的最高限量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本标准旨在建立谷物中赭曲霉毒素 A 的时间分辨荧光免疫层析检测技术，用于谷物中赭曲霉毒素 A 的快速检测。便于基层粮库、粮油企业以及粮食监管部门对谷物中赭曲霉毒素 A 的污染情况的调查和防控，实现对谷物中赭曲霉毒素 A 的有效监管，以保障我国粮食质量和人民群众的身体健

1.2 协作单位

国家粮食和物资储备局科学研究院、北京维德维康生物技术有限公司、江南大学、中储粮成都储藏研究院有限公司、上海市农业科学院、安徽省粮油产品质量监督检测站、广西壮族自治区粮油质量检验中心、中储粮江苏质检中心有限公司。

1.3 主要工作过程

2019年6月—2019年12月，成立标准起草组，查阅了国内外相关资料，对相关检测机构、粮库、粮食加工企业进行了调研，召开了第一次讨论会，确定了标准制订方案和工作计划；

2020年1月—2021年12月，在国家粮食和物资储备局科学研究院实验室进行标准的研制工作，主要包括方法的建立、灵敏度测试、线性范围确定以及回收率研究等；编写完成《粮油检测 谷物中赭曲霉毒素A的测定 时间分辨荧光免疫层析快速定量法》标准草案及编制说明；

2022年1月—2022年9月，组织实验室间方法验证，对验证结果进行处理和统计，并形成标准征求意见稿。

1.4 标准主要起草人及其所做的工作

主要起草人温凯、叶金主要负责调研及标准研制方案的制定及关键技术问题的解决；温凯牵头，叶金、马立才、刘洪美、轩志宏等参与撰写了《粮油检测 谷物中赭曲霉毒素A的测定 时间分辨荧光免疫层析快速定量法》标准草案；叶金、马立才、孙秀兰、张佳林、陈晋莹、韩铮等完成了标准的主要实验，建立并优化了标准关键指标；杨柳、胡斌、伍先绍、纪剑等协助对标准文本及编制说明的修改完善；叶金、聂冬霞、袁华山、孙嘉笛等牵头完成了标准实验室间协同验证，并根据验证结果对标准方法提出了修改意见。

2. 标准编制原则和确定标准主要内容的论据

2.1 标准编制原则

本标准是根据 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》、GB/T 20001.4—2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定及 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》要求下进行编制，本标准在制定过程中遵循“科学性、适用性、规范性”的原则。

2.2 确定标准主要内容的论据

2.2.1 标准的适用范围

本标准规定了时间分辨荧光免疫层析法测定谷物中赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 的原理、试剂及材料、仪器及设备、样品制备、样品测

定、结果表述、重复性。本标准适用于玉米和小麦等谷物中赭曲霉毒素 A 的快速检测。本标准的方法检出限为 $1.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $3.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2.2 标准关键流程和技术指标的确定

2.2.2.1 待测液中甲醇浓度对试纸条的影响

本法采用 70% 甲醇作为样品提取液，为了探究待测液中甲醇浓度对荧光免疫层析试纸条检测的影响，分别样品稀释液中添加终浓度为 0、3、5、7、9、12 和 15% 的甲醇作为待测溶液，评价甲醇对试纸条检测线荧光信号 F_T 和质控线荧光信号 F_C 的影响，具体实验结果见图 1。从图中可知，当样品中甲醇浓度在 3~15% 时， F_T 和 F_C 的信号强度随着甲醇浓度的增加而降低。当溶液中甲醇浓度 $\leq 7\%$ 时，试纸条的 F_T 和 F_C 与不含甲醇时值相差不大。因此，本方法选用 7% 的甲醇溶液作为最终的测试溶液，即采用 70% 甲醇提取样品后，使用样品稀释液进行 10 倍稀释后作为待测溶液。

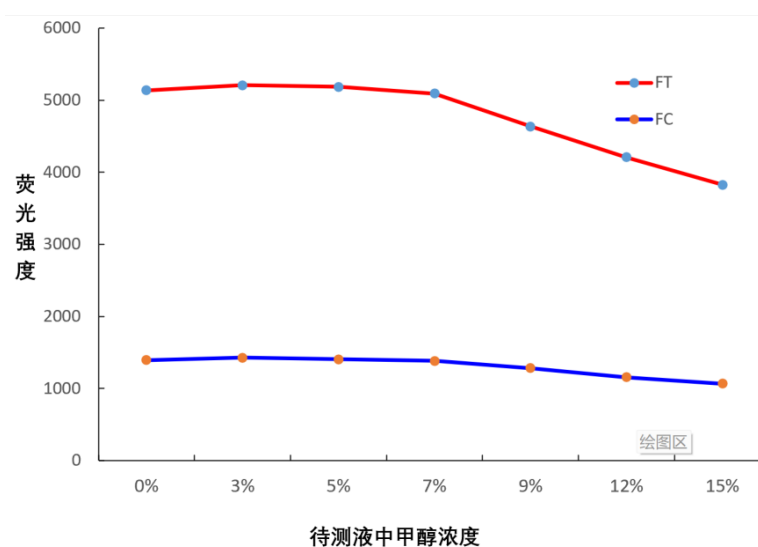


图 1 待测液中甲醇浓度对试纸条的影响

2.2.2.2 检测卡孵育时间的确定

将待测液加到检测卡加样小孔后的温孵育时间对试纸条的结果影响较大。本方法分别考察了不同孵育时间（1、2、4、6、8、10、12、15 分钟）检测卡的检测线荧光信号 F_T 和质控线荧光信号 F_C 的变化趋势，由图 2 可以看出，检测卡孵育时间在 1-8min 内随着时间的延长其 F_T 和 F_C 的信号逐渐增强，孵育时间超过 10min 后趋于稳定。因此，本方法将检测卡的孵育时间定为 10min。

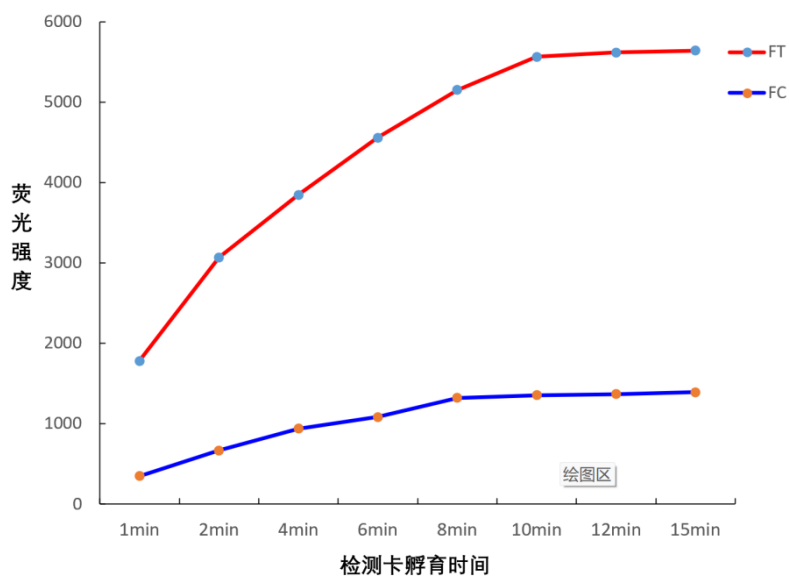


图 2 检测卡荧光信号强度随孵育时间的变化

2.2.3 方法检出限和定量限

方法检出限和定量限参考行业标准 LS/T 6402-2017《粮油检测 设备和方法 标准适用性验证及结果评价一般原则》进行评价。检出限 (LOD)：采用 20 个阴性样品检测值的均值，加上 3 倍标准偏差计算；定量限 (LOQ)：采用 20 个阴性样品检测值的均值，加上 10 倍标准偏差计算。

表 1 LOD 方法检出限和定量限

单位：μg/kg

测定次数	测定值	平均值	标准偏差	检出限	定量限
1	0.65				
2	0.47				
3	0.84				
4	0.55				
5	0.56				
6	0.79				
7	0.63				
8	0.36				
9	0.21				
10	0.82	0.49	0.25	1.24	2.99
11	0.66				
12	0.28				
13	0.00				
14	0.77				
15	0.06				
16	0.61				
17	0.53				
18	0.15				

19	0.45
20	0.39

2.2.4 方法的准确度和精密度

采用本方法对添加 OTA 的阴性小麦、玉米样品进行检测。小麦和玉米中 OTA 的添加量分别为 3 ng/g、5 ng/g、10 ng/g 和 20 ng/g 4 个浓度水平，每个加标水平进行 6 次重复实验，回收率和变异系数结果见表 2。2 种基质的 4 个添加水平回收率在 81.39%~110.58%之间；变异系数小于 9.0%。回收率和变异系数均符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中规定的相关要求，说明本方法具有较好的准确度和精密度。

表 2 两种谷物基质添加回收率结果

基体	加标浓度 (ng/g)	回收率 (%)	变异系数 (%)
小麦	3	109.29	8.60
	5	86.03	5.80
	10	97.61	6.17
	20	84.97	4.53
玉米	3	106.63	8.18
	5	110.58	6.20
	10	81.39	7.43
	20	90.59	4.75

2.2.5 与国家标准方法的比较

应用建立的方法与现行食品安全国家标准 GB 5009.96-2016《食品中赭曲霉毒素 A 的测定》免疫亲和层析净化高效液相色谱法进行比较。应用本方法分析了来自不同粮食产区的玉米（表 3）、小麦（表 4）样品中的 OTA 含量，并与国标方法进行比较，参考行业标准 LS/T 6402-2017《粮油检测 设备和方法标准适用性验证及结果评价一般原则》进行配对 T 检验，结果显示两种检测方法不存在显著性差异。

表 3 与现行国家标准高效液相色谱法进行比较—玉米样品 单位：μg/kg

样品编号	国标方法	本方法	差值 d_i	均值 d	标准偏差 S_d	t_d	$t_{0.05,5}$
玉米 1	3.07	3.24	0.17	0.36	0.89	0.98	2.5706
玉米 2	4.90	5.28	0.38				
玉米 3	9.13	10.41	1.28				
玉米 4	20.55	21.25	0.70				
玉米 5	40.63	41.52	0.89				
玉米 6	59.47	58.19	-1.28				
结论	配对 T 检验不存在显著性差异						

表 4 与现行国家标准高效液相色谱法进行比较—小麦样品 单位：μg/kg

样品编号	国标方法	本方法	差值 d_1	均值 d	标准偏差 S_d	t_d	$t_{0.05,5}$
小麦 1	3.01	3.20	0.19				
小麦 2	5.66	5.15	-0.51				
小麦 3	10.83	11.87	1.04				
小麦 4	22.97	20.79	-2.18	-0.63	1.53	1.00	2.5706
小麦 5	41.78	39.58	-2.20				
小麦 6	61.47	62.16	0.69				
结论	配对 T 检验不存在显著性差异						

3. 主要试验（或验证）情况的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

本方法目前已在北京市农林科学研究院、北京市粮油食品检验所、河南口岸食品检测中心、广西粮油食品质量监督检测中心、河南省粮油饲料产品质量监督检验中心等行业内外 6 家实验室完成验证。验证样品包括空白玉米样品、空白小麦和有证基体标准物质等，其中空白样品用于加标，加标浓度水平分别为 0.6 倍限量浓度、1 倍限量浓度、2 倍限量浓度三个水平。采用 2 种谷物基体进行方法精密度实验，根据 GB/T 6379.2-2004 对 6 个实验室返回的检测结果进行统计分析，采用柯克伦检验和格拉布斯检验剔除离群值，重复性的变异系数小于 10%，再现性变异系数小于 15%，HorRat 在 2 之内，均符合《食品法典委员会程序手册》（第二十版）中关于联合验证的要求。说明本方法在各实验室验证均有很好的重复性和再现性。

4. 与国际、国外对比情况

无。

5. 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

已经颁布的各类行业标准：

LS/T 6114-2015 《粮油检测 粮食中赭曲霉毒素 A 测定 胶体金快速定量法》，方法检出限 3 μg/kg。

LS/T 6126-2017 《粮油检测 粮食中赭曲霉毒素 A 的测定 超高效液相色谱法》，方法检出限 0.5 μg/kg。

从上述行业标准中可以看出，免疫分析方法是行业标准的重要检测方法。时间分辨荧光免疫层析法具有灵敏度高、线性范围宽的优点，在粮食中真菌毒素的实际检测中已大量应用。但是，时间分辨荧光免疫层析方法只出现在饲料行业的标准中，尚未出现在粮油行业的标准中。

应用该技术对样本处理后，能够满足 GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中 OTA 的限量检测需求，并且限量值在该技术的最佳浓度测定范围内。该技术检出范围 1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，满足了绝大多数样本的测定。

本标准颁布实施后，针对粮食中赭曲霉毒素 A 的测定，符合现行的法律法规和强制性（国家、行业、地方）标准要求。

6. 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

7. 标准作为推荐性标准的建议

建议将本标准列为推荐性行业标准。

8. 贯彻标准的要求和措施建议

本标准过渡期建议为 6 个月。

9. 废止现行有关标准的建议

无。

10. 其他应予说明的事项

无。

11. 附录

无。

《粮油检测 谷物中赭曲霉毒素 A
的测定 时间分辨荧光免疫层析快

速定量法》粮食行业标准起草组

2022年9月20日