

谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米 赤霉烯酮同时测定 荧光免疫层析快速定量法

编制说明

标准起草组

2023 年 1 月

《谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮同时测定荧光免疫层析快速定量法》编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

根据《关于发布中国粮油学会 2022 年第二批团体标准立项公告的通知》（中粮油学发【2022】61 号）的要求，开展《谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮同时测定 荧光免疫层析快速定量法》的起草工作，由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。

（二）目的意义

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON），又名呕吐毒素，是由镰刀菌属（*Fusarium*）的禾谷镰刀菌、黄色镰刀菌、头孢菌属、漆斑菌属、木霉属等菌株产生的代谢产物，主要污染小麦、玉米、大麦等，具有很强的毒性。2003 年我国对小麦、玉米、稻谷中 DON 的污染情况调查显示小麦、玉米 DON 污染较稻谷严重。我国早在 2005 年颁布了粮食和食品中 DON 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、玉米中 DON 的最高限量为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

玉米赤霉烯酮（zearalenone，ZEN）主要是禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌等产生的 2，4-二羟基苯甲酸内酯类化合物，是一种具有雌激素样活性的一种非类固醇结构，常污染玉米、小麦、大米、大麦、小米和燕麦等谷物。玉米赤霉烯酮的食物可引起人的流产、死胎和畸胎，已经被联合国粮农组织（FAO）和世界卫生组织（WHO）确定为最危险的自然发生的食品污染物之一。我国早在 2005 年颁布了粮食和食品中 ZEN 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、玉米中 ZEN 的最高限量为 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本标准旨在建立谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的时间分辨荧光免疫层析检测方法，用于谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的快速检测。便于基层粮库、粮油企业以及粮食监管部门对谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的污染情况进行检测和防控，实现对谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的有效监管，以保障我国粮食质量和人民群众的身体健康。

（三）国内外相关标准情况

已经颁布的各类标准：

GB/T 28716-2012 饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法。

GB/T 30956-2014 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法。

LS/T 6127-2017 粮油检验 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 超高效液相色谱法。

LS/T 6113-2015《粮油检验 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定胶体金快速定量法》。

LS/T 6133-2018 粮油检验 主要谷物中 16 种真菌毒素的测定 液相色谱-串联质谱法。

LS/T 6129-2017 《粮油检验 粮食中玉米赤霉烯酮的测定 超高效液相色谱法》。

LS/T 6112-2015 粮食检验 粮食中玉米赤霉烯酮测定 胶体金快速定量法。

DB 32/T 4368-2022 饲料中玉米赤霉烯酮的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法。

DB 32/T 4367-2022 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法。

DB 43/T 1522-2018 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 酶联免疫吸附法。

NF V18-140/A1-2013 Animal feeding stuffs - Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography - Amendment 1 : limitation of the scope。

NF V18-234-2009 Animal feeding stuffs - Determination of zearalenone in animal feed - High performance liquid chromatographic method with fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up。

ISO 17372 AMD 1-2013 Animal feeding stuffs - Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography - Amendment 1: Limitation of the scop。

ISO 17372-2008 Animal feeding stuffs - Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography。

ISO 17372:2008 Animal feeding stuffs - Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography。

NF V18-233-2009 Foodstuffs - Determination of Deoxynivalenol in animal feed - HPLC method with immunoaffinity column clean-up。

DIN EN 15891-2010 Foodstuffs - Determination of deoxynivalenol in cereals, cereal products and cereal based foods for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection; German version EN 15891:2010。

DIN EN 15850-2010 Foodstuffs - Determination of zearalenone in maize based baby food, barley flour, maize flour, polenta, wheat flour and cereal based foods for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection; German V。

BS EN 15891-2010 Foodstuffs. Determination of deoxynivalenol in cereals, cereal products and cereal based foods for infants and young children. HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection。

BS EN 15850-2010 Foodstuffs - Determination of zearalenone in maize based baby food, barley flour, maize flour, polenta, wheat flour and cereal based foods for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection.

BS ISO 17372-2008+A1-2013 Animal feeding stuffs. Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography.

EN 15850-2010 Foodstuffs - Determination of zearalenone in maize based baby food, barley flour, maize flour, polenta, wheat flour and cereal based foods for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection.

从上述国内外相关标准中可以看出, 国外的相关标准中以高效液相色谱法为主, 国内的相关标准中免疫分析方法是重要的检测方法。其中, 时间分辨荧光免疫层析方法具有灵敏度高、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。到目前为止, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮同时测定的免疫分析法属于空白, 尚未出现在国内外的相关标准中。

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》中的 DON 和 ZEN 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 DON 检出范围为 50 $\mu\text{g/kg}$ ~2500 $\mu\text{g/kg}$ ，ZEN 检出范围为 8 $\mu\text{g/kg}$ ~140 $\mu\text{g/kg}$ ，满足了绝大多数样本的测定。

本标准颁布实施后，针对粮食中玉米赤霉烯酮的测定，符合现行的法律法规和强制性（国家、行业、地方）标准要求。

（四）主要工作过程

2022 年 6 月—2022 年 9 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；

2022 年 9 月—2022 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《粮油检验 谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的测定 时间分辨荧光免疫层析法》标准草案及编制说明；

2022 年 12 月—2023 年 1 月，组织实验室间方法验证，对验证结果进行统计，并形成标准征求意见稿。

（五）主编单位和参编单位、人员及分工

主编单位：国家粮食和物资储备局科学研究院

参编单位：江苏省苏微微生物研究有限公司、江苏省苏微微生物研究有限公司、国家食品安全风险评估中心、中储粮成都储藏研究院有限公司、中储粮江苏质检中心有限公司、广西一东盟食品检验检测中心、广西壮族自治区粮油质量检验中心、安徽省粮油产品质量监督检测站、江苏省粮油质量监测中心、南京财经大学等

人员及分工：主要起草人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；叶金牵头，刘洪美、张海涛、韩小敏、陈晋莹、杨婷婷等参与撰写了《谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮同时测定 荧光免疫层析快速定量法》标准草案；叶金、刘洪美、张海涛、李丽、焦梓毅、祁苏娴、陆廷瑾等完成了标准的主要实验，建立并优化了标准关键指标；袁华山、王海波、伍先绍、胡斌、莫晓嵩、汪海峰等协助对标准文本及编制说明的修改完善；叶金、刘洪美、张海涛、陈晋莹、李丽、袁华山、王海波、伍先绍、汪海峰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进行修改完善。

二、标准编制原则和确定标准的主要内容

（一）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。

（二）确定标准的主要内容

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脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的原理、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脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的快速检测。本标准的方法脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检出限为50 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为200 $\mu\text{g/kg}$ ，玉米赤霉烯酮的检出限为5 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为20 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2 标准关键流程和技术指标的确定

2.2.1 反应时间对标准曲线的影响

配制系列标准溶液，将层析卡及系列标准溶液平衡至室温下，准确移取100 μL 加于层析卡的样品孔中，在室温（ $25^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ）下反应1 min、5 min、8 min、10 min、20 min，每个标准浓度做3次平行测试。以时间为横坐标，T/C值为纵坐标，如图1所示。免疫荧光微球随着时间不断涌动，仪器监测到的T/C值是一个动态变化过程，因此，设置信号稳定的时间为最佳的检测时间。在不同反应时间下，反应时间在1~5 min时，同一标准点的T/C的变化较大，而由10 min增加至20 min，T/C基本稳定，考虑到免疫层析快速简便的特点，将最佳检测时间确定为10 min。

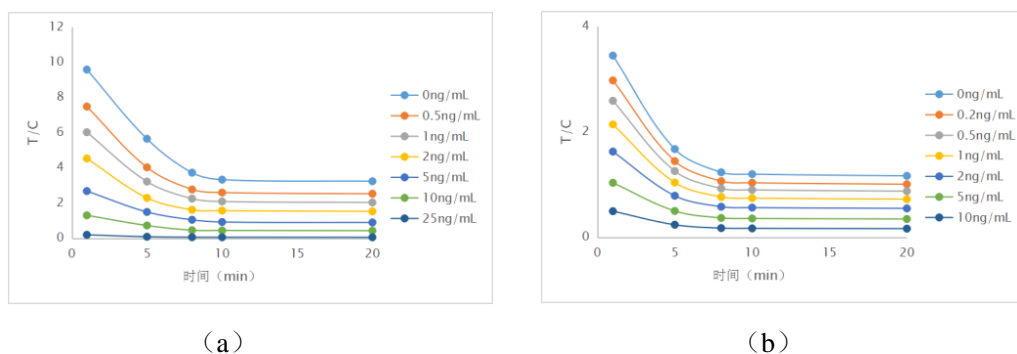


图1. 不同反应时间对DON (a) 和ZEN (b) 标准浓度的T/C的影响

2.2.2 环境温度对标准曲线的影响

配制系列标准溶液，调节温度至10℃、25℃、40℃，将层析卡及系列标准溶液分别平衡至设定温度下，准确移取100 μ L加于层析卡的样品孔中，使层析卡于相应温度下反应10 min，每个标准浓度做3次平行测试。以标准工作溶液浓度的自然对数值 ($\ln C$) 为横坐标，各浓度标准液的T/C值与0 ng/mL标准液的T/C值的比值所得百分比为纵坐标，绘制标准曲线，比较斜率及 IC_{50} ，结果如图2所示。从图2可以看出，反应温度对于ZEN来说，影响不大，标准曲线基本无变化；而其对DON影响较大，曲线的斜率与 IC_{50} 随着温度的变化而变化，环境温度越高，曲线的 IC_{50} 越大，层析卡灵敏度降低，对于同一样品而言，温度越高，测出的样品值越低，虽然在低温下，DON的灵敏度较高，但从控温方面来说，不太容易实现，考虑到仪器设备的便捷与一般实验室较为容易达到的环境温度，最佳反应温度选择 $25 \pm 3^\circ C$ 。

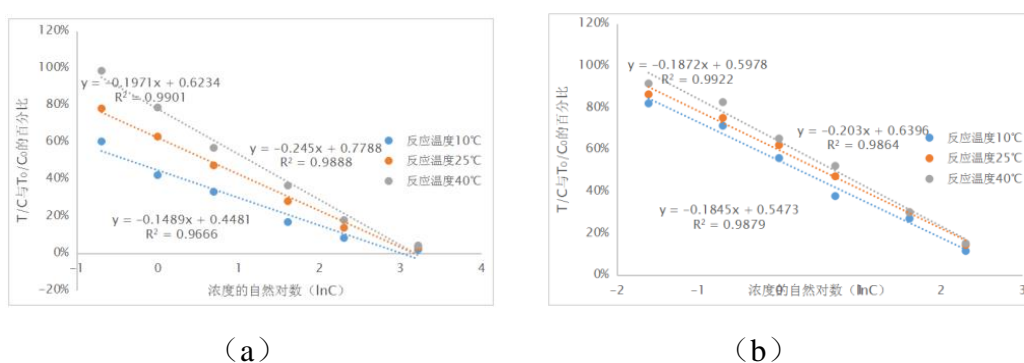


图2. 不同反应温度对DON (a) 和ZEN (b) 标曲的影响

2.2.3 缓冲体系对标准曲线的影响

配制系列标准溶液，用0.4%吐温20-PBS (pH7.2, 0.01M)、0.4%吐温20-PBS (pH7.2, 0.05 M)、0.4%吐温20-含5%甲醇的PBS (pH7.2, 0.01M) 分别配制系列标准溶液，调节反应温度至25℃，将层析卡及系列标准溶液平衡至该温度下，

准确移取100 μL 加于层析卡的样品孔中，反应10 min，每个标准浓度做3次平行测试。按2.2.2的方法拟合标准曲线及 IC_{50} ，结果如图3所示。从图3结果可以发现，缓冲体系为0.4%吐温20-含5%甲醇的PBS（ $\text{pH}7.2$ ，0.01M）和0.4%吐温20-PBS（ $\text{pH}7.2$ ，0.01M）对DON与ZEN标准曲线的 IC_{50} 、斜率几乎完全一致，曲线基本重叠；而缓冲体系中离子强度增加时，标准曲线斜率增大，DON与ZEN灵敏度变差，且线性差。这对于采用有机溶液提取DON与ZEN毒素时，仅通过一定稀释即可满足测定的需求，是非常必要的。因此选择0.4%吐温20-PBS（ $\text{pH}7.2$ ，0.01M）作为缓冲体系。

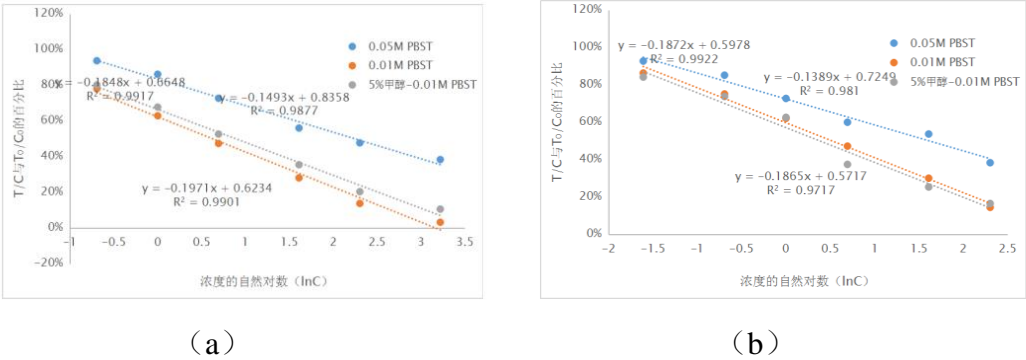


图3. 不同缓冲体系对DON（a）和ZEN（b）标曲的影响

2.2.4 方法的标准曲线

将DON与ZEN的标准品，分别用50%甲醇-水定容配制成10 $\mu\text{g/mL}$ 和100 ng/mL 的标准储备溶液；采用0.4%吐温20-PBS（ $\text{pH}7.2$ ，0.01 mol/L ）稀释成DON/ZEN浓度分别为0/0、2/0.2、5/0.5、10/1.0、25/2.5、50/5.0、100/10 ng/mL 的标准工作溶液。分别取100 μL 加至层析卡的样品孔中，每个浓度设置三个平行，由低浓度到高浓度进行检测，时间分辨荧光仪检测 T_1 、 T_2 线荧光强度与C线荧光强度，计算 T_1/C 与 T_2/C 值。以标准工作溶液浓度为横坐标，各浓度标准液的 T/C 值与0 ng/mL 标准液的 T/C 值的比值所得百分比为纵坐标，分别绘制DON和ZEN的标准曲线，结果见图4和图5。由图4、图5可以发现随着DON和ZEN浓度的增加，各浓度标准液的 T/C 值与0 ng/mL 标准液的 T/C 值的比值所得百分比逐渐降低，竞争抑制率逐渐增大，同时DON在2.5~100 ng/mL 浓度范围内，有效剂量值即抑制率在85%~19%；而ZEN在0.25~10 ng/mL 浓度范围内，有效剂量值即抑制率在88%~27%。而且，DON及ZEN浓度分别在2.5~50 ng/mL 、0.2~5 ng/mL 范围内，具有很好的线性关系。

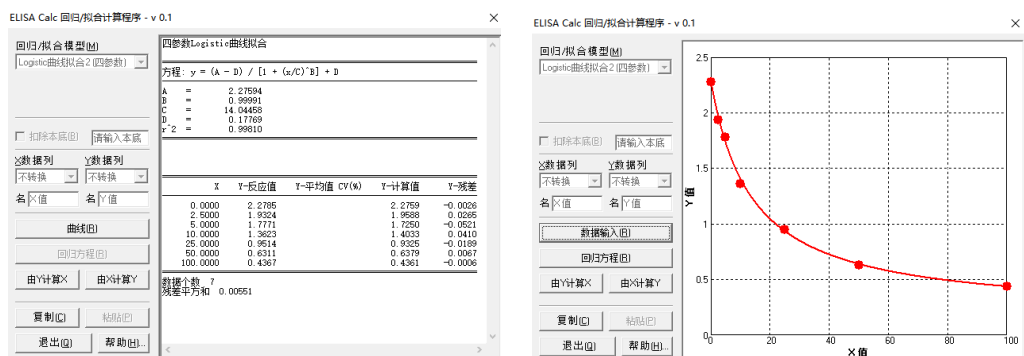


图4. DON/ZEN时间分辨荧光免疫层析定量检测二联卡DON标准曲线的建立

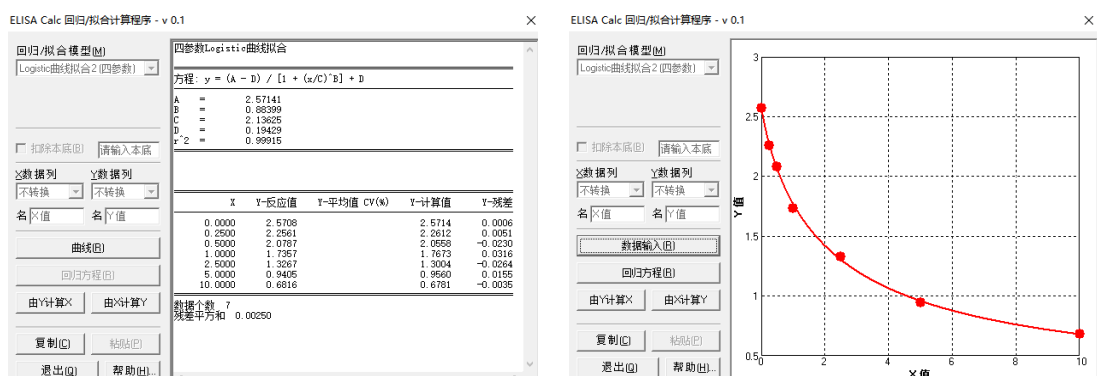


图5. DON/ZEN时间分辨荧光免疫层析定量检测二联卡ZEN标准曲线的建立

2.2.5 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《粮油检验 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 方法检出限和定量限

单位：μg/kg

真菌毒素	测定次数	测定值	平均值	标准偏差	检出限	定量限
DON	1	30.2	14.5	5.5	30.9	69.2
	2	12.7				
	3	8.3				
	4	15.5				
	5	8.1				
	6	21.7				
	7	14.5				
	8	13.4				
	9	18.2				
	10	12.9				
	11	18.3				
	12	14.3				

	13	16.0				
	14	18.3				
	15	16.8				
	16	5.3				
	17	10.0				
	18	11.5				
	19	13.4				
	20	9.9				
	1	5.1				
	2	0				
	3	0				
	4	0				
	5	0				
	6	0				
	7	0				
	8	1.0				
	9	0				
ZEN	10	0	0.3	1.2	3.8	11.8
	11	0				
	12	0				
	13	0				
	14	0				
	15	0				
	16	0				
	17	0				
	18	0				
	19	0				
	20	0				

2.2.6 方法的准确度和精密度

采用本方法对添加 DON 和 ZEN 的阴性小麦粉和玉米粉样品进行检测。DON/ZEN 添加量分别为高（2000 /120 $\mu\text{g/kg}$ ）、中（1000/60 $\mu\text{g/kg}$ ）、低（500/30 $\mu\text{g/kg}$ ）3 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。其中小麦粉 DON 的 3 个添加水平的平均回收率在 95.1%~101.2%之间，变异系数小于 8.5 %；小麦粉 ZEN 的 3 个添加水平的平均回收率在 88.9%~108.7%之间，变异系数小于 9.1 %。玉米粉 DON 的 3 个添加水平的平均回收率在 98.6%~99.8%之间，变异系数小于 6.1 %；小麦粉 ZEN 的 3 个添加水平的平均回收率在 91.0%~93.7%之间，变异系数小于 11.4 %。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 小麦和玉米基质添加回收率结果

样品 种类	加 标 浓 度 水平	DON			ZEN		
		实测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	CV (%)	平均回 收率 (%)	实测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	CV (%)	平均回 收率 (%)
小麦	低	506	5.11	101.2	28.6	8.41	95.3
	中	962	8.47	96.2	65.2	9.04	108.7
	高	1902	4.27	95.1	106.7	8.32	88.9
玉米	低	493	6.05	98.6	28.1	11.36	93.7
	中	994	6.08	99.4	54.6	5.06	91.0
	高	1996	5.24	99.8	109.5	7.42	91.3

2.2.7 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 5009.111-2016 和 GB 5009.209-2016 方法进行比较。应用本方法分析了六个浓度梯度的小麦样品中 DON 和 ZEN 的含量，并与国标方法进行比较，参考行业标准《LS/T 6402-2017 粮油检验 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，结果显示不存在显著差异。

表 3 与现行国家标准方法进行比较（单位： $\mu\text{g/kg}$ ）

样 品 编 号	DON			样 品 编 号	ZEN		
	国标方法	本方法	差值 d_1		国标方法	本方法	差值 d_1
1	245	213.4	-0.13	1	20.1	29.1	-9.00
2	367.5	430.1	-1.12	2	33.5	30.7	2.80
3	490	477.8	-2.02	3	67	62.0	5.00
4	720	780	0.47	4	95.5	82.6	12.90
5	1200	1269	-4.33	5	143.25	147.3	-4.05
6	2400	2203	-2.89	6	191	180.5	10.50
结论	配对 T 检无显著性差异			结论	配对 T 检无显著性差异		

三、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

本方法目前已完成行业内外 6 家实验室验证。验证样品包括空白玉米样品、空白小麦，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。

四、标准涉及的相关知识产权说明

无

五、采用国际标准的程度及水平，与现行有关法律法规和强制性国家标准的关系

目前，国际标准中尚未有关于谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮同时测定荧光免疫层析快速定量法的相关标准，只有部分文献报道。本标准方法检出限和定量限较低，具有较高的精密度、准确性和特异性，同时该方法前处理简单，耗时较短，仪器设备小巧，便携性好，操作简单，易于推广使用。

本标准颁布实施后，针对谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的测定，符合现行的法律法规和强制性（国家、行业、地方）标准要求。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

七、其他应予说明的事项

无。

《谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮同时测定
荧光免疫层析快速定量法》粮食行业标准起草组
2023 年 1 月 18 日