《饲料原料中伏马毒素的快速筛查 胶体金快速定量法》

江西省地方标准编制说明

1. **标准制定意义**
2. **介绍**

伏马毒素（Fumonisin，FB）是由镰刀菌属在一定的温度和湿度下产生的水溶性代谢产物，是一类由不同的多氢醇和丙三羧酸组成的结构类似的双酯化合物。到目前为止，发现的伏马毒素有FA1、FA2、FB1、FB2、FB3、FB4、FC1、FC2、FC3、FC4和FP1共11种，其中60%以上是FB1，其毒性也最强。伏马毒素可以引起人畜急性中毒和慢性毒性，并具有种属特异性和器官特异性，不同的动物产生的疾病不同，相应的耐受限量也有很大差别。研究发现高浓度的FB1可导致各种家畜和试验动物出现种属特异性的急毒症状，如马脑白质软化综合征、猪肺水肿和羊肝肾病变等，现在还发现FB1可能与人的食管癌和肝癌发生有关。伏马毒素尤其是FB1饲料污染的情况在世界范围内普遍存在，且对粮食作物的污染情况较严重，其污染的饲料主要为以玉米为原料的饲料。

考虑到伏马毒素对人体健康的危害性，部分发达国家和地区已经对玉米制品中的伏马毒素限量指标建立了标准。欧盟规定了玉米和玉米制品中伏马毒素的限量（以FB1+FB2计）；2001年美国食品与药物管理局（FDA）发布了供人类食用的玉米和玉米产品伏马毒素的最高限量指导性公告，规定人类食用玉米中伏马毒素最高限量为2mg/kg；同时，FDA的畜牧医学中心（CVM）也发布了动物饲料中伏马毒素的最高限量指导性公告，规定其限量范围为1～50mg/kg。我国对伏马毒素在粮谷类食品中的分布情况和检测方法也做了大量研究，但食品中伏马毒素限量标准尚未出台；但即将颁布的新的《饲料卫生标准》增加了伏马毒素的限量。

伏马毒素的检测方法主要有高效液相色谱法、酶联免疫法、胶体金免疫层析法等。以往利用胶体金免疫快速检测法可对伏马毒素样品进行定性分析，适用于阳性样品的初筛，不能准确定量。本标准项目是通过化学合成法制备伏马毒素人工抗原，利用此抗原免疫实验动物制备伏马毒素B1、B2、B3单克隆抗体，基于此原料基础上开发伏马毒素快速检测试纸条，再通过胶体金读数仪进行饲料样品中伏马毒素（B1、B2、B3）总量的定量分析。本标准有助于提高饲料样品检测、监测效率，降低成本，保护环境，保障从业人员健康安全。

1. **背景**

据联合国粮农组织（FAO）统计，全世界每年谷物产量的25%受到真菌毒素不同程度的污染。随着饲料工业的快速发展，近年来，中国的饲料也受到霉菌污染的严重挑战。自2006年以来，玉米等饲料原料价格普遍上涨，致使很多饲料企业及养殖户使用低质饲料原料，加上近年来气候的变化，降雨量增加，进一步加重了饲料原料中真菌毒素的污染。而由于饲料原料和配合饲料中多种真菌毒素同时存在，在食用油等产品及牛奶中真菌毒素污染也比较严重。在世界许多地方，目前真菌毒素已构成重要的食品安全问题。

真菌毒素对人类和动物健康可产生严重的影响，这一认识导致了许多国家在近几十年来制定了诸多有关食品和饲料中真菌毒素的法规，以保护人类的健康，并保障生产者和贸易商的经济利益。随着全球经济一体化的进程，类似真菌毒素等涉及安全卫生项目的限量标准，越来越多地被利用为贸易保护主义中非关税壁垒的重要手段。因此，为了保证食品安全，保障消费者的健康，为了打破国外的技术壁垒，同时在合理有利的前提下，更多地树立我国的技术性壁垒，开展饲料中真菌毒素的检测并建立标准方法是有效的方法之一。目前国内应用标准检测方法大多为仪器方法，所需仪器设备昂贵，不利于进行广泛推广，并且限制了很多检测单位高效、广泛地开展检测工作。建立符合中国国情的快速检测方法标准，具有检测快速、简便、灵敏、成本低等优点，为打开市场并占领市场提供了先决条件。

**（三）限量标准、检测方法及研究现状**

**1、限量标准**

由于付马毒素B1能够引起马脑白质软化症、猪肺水肿综合征以及大鼠肝癌等疾病，还可能与人类食管癌有关，而且目前我国玉米种付马毒素的污染状况具有普遍性，因此对于付马毒素的监控是很有必要的。

表1 我国饲料中付马毒素限量标准

|  |  |
| --- | --- |
| 产品名称 | 限量/(μg/kg) |
| 玉米及其加工产品、玉米酒糟类产品、玉米青贮饲料和玉米秸秆 | ≤60 |
| 犊牛、羔羊精料补充料，家禽浓缩饲料和家禽配合饲料 | ≤20 |
| 马、兔精补料，猪浓缩料，猪、兔、马配合饲料 | ≤5 |
| 其它反刍动物精补料 | ≤50 |
| 鱼配合饲料 | ≤10 |
| 其它配合饲料 | ≤3 |

**2、检测方法及研究现状**

真菌毒素的检测方法主要有两种，一是将色谱技术作为基础的物理化学检测方法，包括高效液相色谱法（HPLC）和气相色谱法（GC）等，而薄层层析法（TLC）由于操作过程太复杂，国际上近些年使用这种方法检测真菌毒素的情况越来越少；二是免疫化学检测法，主要指免疫亲和柱法（IAC）以及酶联免疫吸附法（ELISA）等。

GC可同时检测多种真菌毒素且检测限较低，但仍存在标准曲线线性关系不理想、测定时需要进行衍生化、上一次进样待测物品滞留、重复进样变异系数大使得重现性较差等一系列问题。HPLC法虽可精确进行定性定量测定，但是样品前处理较为繁琐、仪器昂贵而成本高，同时需要专门的技术操作人员，因而一般用于大型企业、科研院校和专业检测机构的定量分析。ELISA检测黄曲霉毒素，样品前处理步骤简单且可实现定量化，但这种生物学方法，受环境因素影响大，所用抗体和酶特别容易发生变质，如今市场上的同一物质试剂盒检测结果差异性较大，稳定性还有待提高。

相比较而言，胶体金免疫层析法无需大型仪器、所需辅助试剂少、交叉反应率低、试纸条易于保存且可单份测定，避免了分析步骤繁琐、成本高等缺点，而且因其检测更快速、操作更简单，测试人员无需进行专业培训，所以更适合食品安全快速检测行业的快速检验和基层检测，尤其是野外和偏远地区人员现场应用此项技术十分方便。

**（四）制定标准的必要性和意义**

饲料是畜牧生产的物质基础，但其中广泛存在的真菌及真菌毒素，可引起畜禽生产力下降、繁殖机能障碍，严重者可引起死亡；同时，真菌毒素还可在畜禽产品中残留，给人类健康安全带来极大隐患，也会给畜牧业造成重大的经济损失，因此，检测饲料原料的真菌毒素是粮食收购、饲料生产中必不可少的环节。

鉴于传统检测方法的专业性要求高和成本昂贵的缺点，胶体金免疫层析技术定量检测条已经可以准确定量，作为一种快速筛查手段，可以有效地筛除真菌毒素污染的农产品，防止毒素中毒事件的发生，保护人民的身体健康。同时，定量分析便于将检测结果与国家限量对比，有助于监管部门快速有效地进行监管，同时有助于企业内部更好地进行质量控制，进而减少食物源T-2毒素污染对广大群众生命健康的威胁。

我国已经加入WTO，我国农产品已面临国际和国内两个市场，为我国农产品（劳动密集型）进入国际市场提供了很好的机遇，但国际上十分重视农产品的安全问题，而农产品易于被真菌污染，可能存在T-2毒素等真菌毒素残留问题，这已成为影响出口创汇的最大制约因素。由于毒素残留超标，引起外国拒收，退货、扣留、索赔、撤消合同等事件经常发生，给我国农产品生产者造成很大损失，并影响了我国农产品的形象。为了从源头保证农产品质量，提高我国农产品的竞争力，研究T-2毒素快速检测技术并制订相应的检测方法标准是非常必要的。

**二、标准制定过程**

《饲料原料中伏马毒素的快速筛查 胶体金免疫层析法》标准由江西省兽药饲料监察所、中检环贸生物技术（北京）有限公司、双胞胎（集团）股份有限公司、江西正邦科技股份有限公司负责起草编写。根据国家有关标准制定和修订工作的要求，标准起草单位在《饲料原料中伏马毒素的快速筛查 胶体金免疫层析法》的起草编制过程中，主要工作包括以下几个方面：

（1）详细查阅了国内、国外有关标准和相关专业期刊上发表过的参考文献等技术资料，并对这些资料进行了详细的对比，从方法的先进性、可靠性和实用性等几个方面考虑，选取了几个代表性的参考资料作为标准起草中的主要技术参考文本。

（2）及时购置相关的实验试剂、标准品和其他材料；摸索不同条件对方法进行最优化，最终确定了最佳的检测方法。

（3）开展饲料原料胶体金快速检测方法的试验，选取相关饲料原材料，用胶体金免疫层析法进行试验和验证，确保本检测方法能够灵敏、特异、准确地检测出饲料原料中伏马毒素的含量。如：方法的灵敏度，选取多份阴性样品平行测定，以均值加3倍标准差的方法确认检测限符合要求；方法的准确率，通过对经验证的阳性样品进行检测，得到本检测方法的标准偏差及变异系数，确保本方法的检测结果可靠；原料中伏马毒素残留。方法的批间稳定性，选取多份确证浓度的阳性样品进行不同批次的平行测定，计算批间变异系数，确保伏马毒素测定的批间稳定性。

（4）在技术指标完成试验工作之后，严格按照标准的格式，起草编写标准文本内容和编制说明内容。

**三、标准制定依据**

本标准是根据GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》和GB/T20001.4-2009《标准编写规则第4部分：试验方法分析》的规定进行编制的。

**四、标准技术内容和技术指标的论证**

**（一）技术原理**

本方法应用了竞争疫层析原理。使用一个能够特异性识别某一分子或某分子家族的抗体和配对的抗原，将抗体标记胶体金颗粒，将配对的抗体喷涂到反应膜上做检测线。检测过程中，如果样品中含有待检测物质，则待检测物质首先与胶体金颗粒标记的抗体结合形成复合物，之后沿反应膜向吸水纸方向流动，到达检测线时，因为待检测分子表面的表面决定簇大部分已经被抗体占据，少量与检测线处的抗原结合，形成比较浅的色带，待检测物质-胶体金颗粒标记的抗体结合形成复合物继续沿反应膜流动，到达质控线后被质控线处的胶体金颗粒抗体所捕获，形成清晰可见的色带。反应完成后，使用读数仪读取检测区域和质控区域的颜色强度信号，根据内置标准曲线计算出样品中付马毒素的含量。

**（二）适用范围**

本标准规定了胶体金法测定谷物及其制品中伏马毒素的条件和详细分析步骤。

本方法适用于玉米及其他谷物中伏马毒素快速定量筛查的测定，检测限为250 μg/kg。

**（三）关于样品制备的要求**

理论上讲样品颗粒的大小与样品的均匀性以及毒素的提取效率有关，当样品细度不足20目时，真菌毒素的提取效率较低，因此国家标准方法中真菌毒素检测的制样一般都要求制备至少500g，全部通过20目筛，本行业标准直接采用，从测试数据看，能够满足方法需求。

**（四）方法精密度及准确度**

采用800µg/kg、2000µg/kg和3000 µg/kg三个浓度水平的阳性样品，每个浓度水平测定10次，重复测定的变异系数在3.20%～4.76%，平均变异系数为4.22%，结果见表2。

表2 饲料样品中伏马毒素检测数据分析表（浓度：µg/kg）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 测定结果 | | |
| 参考浓度（µg/kg） | 800 | 2000 | 3000 |
| 1 | 850 | 2100 | 3100 |
| 2 | 900 | 2000 | 3000 |
| 3 | 800 | 2100 | 3100 |
| 4 | 800 | 2200 | 3200 |
| 5 | 900 | 2000 | 3000 |
| 6 | 850 | 2300 | 3200 |
| 7 | 850 | 2000 | 3300 |
| 8 | 800 | 2100 | 3100 |
| 9 | 850 | 2100 | 3100 |
| 10 | 800 | 2000 | 3000 |
| 平均结果（µg/kg） | 840 | 2090 | 3110 |
| 标准偏差 | 39.44 | 99.44 | 99.44 |
| 变异系数（%） | 4.70 | 4.76 | 3.20 |

**（五）检测限**

取20份阴性样品平行测定，结果均值加3倍标准差为89.12，因此本方法的检测限为89µg/kg，阴性样品结果见表3。

表3 阴性饲料样品伏马毒素测定结果分析表（浓度：µg/kg）

|  |  |
| --- | --- |
| 样品编号 | 测定结果 |
| 1 | 0 |
| 2 | 0 |
| 3 | 0 |
| 4 | 50 |
| 5 | 0 |
| 6 | 0 |
| 7 | 50 |
| 8 | 0 |
| 9 | 0 |
| 10 | 0 |
| 11 | 50 |
| 12 | 50 |
| 13 | 0 |
| 14 | 0 |
| 15 | 0 |
| 16 | 0 |
| 17 | 50 |
| 18 | 0 |
| 19 | 0 |
| 20 | 0 |
| 平均结果（µg/kg） | 12.5 |
| 标准偏差 | 22.21 |
| 检测限（µg/kg） | 89.12 |

**（六）批间稳定性**

采用800 µg/kg左右浓度水平的阳性样品，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，通过批间变异系数来表达，变异系数应≤25%。经多批次平行测定，次方法符合变异系数要求，批间稳定性良好，结果见表4。

表4 饲料样品伏马毒素批间稳定性测定数据分析表（浓度：µg/kg）

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 批次号 | 测定结果（µg/kg） | 批次内平均值（µg/kg） | 参考浓度（µg/kg） | 批次间平均值（µg/kg） | 标准偏差 | 变异系数（%） |
| 1 | 850 | 850 | 800 | 825 | 15.81 | 1.92 |
| 850 |
| 2 | 800 | 800 |
| 800 |
| 3 | 850 | 825 |
| 800 |
| 4 | 800 | 825 |
| 850 |
| 5 | 800 | 825 |
| 850 |
| 6 | 850 | 825 |
| 800 |

**（七）HPLC和胶体金定量检测条结果比对**

随机抽取小麦、大米、黄豆、玉米、豆粕、花生粕、DDGS样品，用本方法和仪器方法分别进行检测。仪器方法参考GB/T 30955-2014《饲料中赭曲霉毒素A、B2、G1、G2的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱》，对伏马毒素的检测限为10μg/kg，定量限为50μg/kg。本方法的检测限为250μg/kg。结果见表5。

表5 仪器比对测定结果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 样品类型 | HPLC结果（µg/kg） | 胶体金检测条结果（µg/kg） |
| 1 | 小麦 | 245.48 | 250 |
| 2 | 180.88 | 200 |
| 3 | 633.56 | 650 |
| 4 | 玉米 | 545.09 | 600 |
| 5 | 847.66 | 900 |
| 6 | 49.08 | 50 |
| 7 | 黄豆 | 568.08 | 650 |
| 8 | 775.65 | 800 |
| 9 | 905.43 | 950 |
| 10 | 豆粕 | 3080.67 | 3100 |
| 11 | 3228.32 | 3400 |
| 12 | 1258.98 | 1300 |
| 13 | DDGS | 2276.55 | 2400 |
| 14 | 4579.77 | 4600 |
| 15 | 1890.56 | 2000 |
| 16 | 花生粕 | 1090.78 | 1100 |
| 17 | 3289.56 | 3300 |
| 18 | 3355.58 | 3400 |

**五、结论**

本方法的检出限为50μg/g，定量下限为250μg/g，具有较高的精密度、准确性和特异性；通过简单的样品前处理，测试条点样、孵育器孵育、读数仪读数这几个步骤，15min之内就能完成一个样品的测定，方法要求条件低，操作简单。实验结果表明，均能满足饲料原料中伏马毒素测定的要求，易于推广应用。