**《**饲料中T2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**

T-2毒素是一种倍半萜烯化合物，纯品为白色针状结晶，分子量低（MW466.52），熔点151-152℃，不易挥发，不溶于水和石油醚，但在丙酮、醋酸盐、氯仿、二甲基亚砜、甲醇、乙醇、丙二醇中有很高的溶解度。该毒素性质稳定，有很强的耐热性和紫外线耐受性，因此在食物生产和加工过程中高压灭菌不易灭活。

T-2毒素是A类单端孢霉烯族真菌毒素中毒性最强的一种，在农作物中，主要以玉米和黑麦产毒能力最强，其次是大麦、大米和小麦。单端孢霉烯族真菌毒素是由寄居在多种农作物上的镰刀菌属霉菌在一定条件下产生的一组倍半萜类化合物。早在1973年FAO/WHO就将单端孢霉烯族毒素列为最危险的天然存在的食物污染毒物之一，从结构上可以分为A、B、C、D四类，B类单端孢霉烯族真菌毒素最为常见，且结构复杂，通常称为大环单族毒素。而A类单端孢霉烯族真菌毒素结构比较简单，为非大环类，通常有镰孢菌产生，如脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）和乙酰蔗草镰刀烯醇（DAS），这些毒素之间的区别仅在于加氧位置和数量的不同。在动物体内，A类单端孢霉烯族真菌毒素的毒性为B类的10-100倍。T-2毒素属于A类单端孢霉烯族，主要危害动物造血组织和免疫器官，引起出血性综合症、白细胞减少、贫血和胃肠道功能受损等。

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**

目前，已有几个国家先后制定了T-2毒素的限量标准，国际官方组织如JECFA等尚没有制定统一的限量标准值，我国也尚未制定粮食中T-2毒素的限量标准，但是饲料中T-2毒素的限量已有明确标准（见表1）。

表1 我国饲料中T-2毒素限量标准

|  |  |
| --- | --- |
| 饲料种类 | 限量（mg/kg） |
| 猪配合饲料禽配合饲料植物性饲料原料 | ≤0.5≤0.5≤0.5 |

**2、检测方法及研究现状**

目前T-2毒素的检测方法主要有薄层色谱法（TLC）、液相色谱法（LC）、气相色谱-质谱法（GC-MS）、液相色谱-质谱法（LC-MS）等，免疫法有放射免疫、酶联免疫吸附测定（ELISA）等。

薄层色谱是快速分离和定性分析少量物质的一种重要技术，但步骤繁琐、灵敏度不高。气相色谱法测定粮食中的单端孢霉烯族毒素虽早已见于文献，但一般比较麻烦，且回收率不高。液相色谱法在T-2毒素的检测中最常应用，但是T-2毒素的化学结构中缺乏合适的生色团，HPLC结合荧光检测器无法直接采用，需要衍生，前处理比较繁琐。质谱联用技术虽然更为准确，但设备昂贵，成本较高，而且需要专门的技术操作人员。而ELISA检测T-2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T-2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T-2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仪器、试剂、标准品和其他材料，建立了胶体金免疫层析法的反应体系，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T-2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T-2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T-2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》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求而进行编写的。有关技术内容是在参考国外有关标准及文献的基础上经研究、改进和验证后制定的。

**四、标准技术内容和技术指标的论证**

**（一）测定原理**

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T-2毒素的含量。

**（二）适用范围**

本标准规定了胶体金法测定饲料原料样品中T-2毒素的条件和详细分析步骤。

本方法适用于小麦、大米和玉米等谷物中T-2毒素快速定量筛查的测定，检测限为10μg/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100µg/kg、500µg/kg和800 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1.74%～11.85%，平均变异系数为7.01%，结果见表2。

 表2 饲料样品中T-2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） | 100 | 500 | 800 |
| 1 | 98 | 500 | 850 |
| 2 | 96 | 500 | 800 |
| 3 | 100 | 450 | 750 |
| 4 | 102 | 400 | 750 |
| 5 | 99 | 550 | 800 |
| 6 | 99 | 600 | 850 |
| 7 | 102 | 550 | 900 |
| 8 | 101 | 450 | 850 |
| 9 | 100 | 500 | 800 |
| 10 | 100 | 550 | 700 |
| 平均结果（µg/kg） | 99.7 | 505 | 805 |
| 标准偏差 | 1.73 | 59.86 | 59.86 |
| 变异系数（%） | 1.74 | 11.85 | 7.44 |

**（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2.01，因此本方法的检出限为2µg/kg，阴性样品结果见表3。

 表3 阴性饲料样品T-2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 | 1 |
| 5 | 0 |
| 6 | 0 |
| 7 | 1 |
| 8 | 0 |
| 9 | 0 |
| 10 | 0 |
| 11 | 0 |
| 12 | 2 |
| 13 | 0 |
| 14 | 0 |
| 15 | 1 |
| 16 | 0 |
| 17 | 1 |
| 18 | 0 |
| 19 | 0 |
| 20 | 0 |
| 平均结果（µg/kg） | 0.3 |
| 标准偏差 | 0.57 |
| 检测限（µg/kg） | 2.01 |

**（六）批间稳定性**

采用100 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T-2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 | 98 | 98 | 100.3 | 99.83 | 1.25 | 1.25 |
| 98 |
| 2 | 101 | 100.5 |
| 100 |
| 3 | 101 | 101.5 |
| 102 |
| 4 | 100 | 100.5 |
| 101 |
| 5 | 99 | 99 |
| 99 |
| 6 | 100 | 99.5 |
| 99 |

**（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T-2毒素的检测限为10μg/kg，定量限为30μg/kg。本方法的检测限为10μg/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 | 15.38 | 18 |
| 2 | 96.44 | 113 |
| 3 | 189.65 | 205 |
| 4 | 玉米 | 233.67 | 247 |
| 5 | 19.89 | 23 |
| 6 | 46.72 | 50 |
| 7 | 黄豆 | 78.4 | 82 |
| 8 | 145.79 | 153 |
| 9 | 240.32 | 249 |
| 10 | 豆粕 | 1030.55 | 1050 |
| 11 | 1432.48 | 1500 |
| 12 | 1947.86 | 2000 |
| 13 | DDGS | 2048.78 | 2200 |
| 14 | 1546.72 | 1750 |
| 15 | 1770.09 | 1950 |
| 16 | 花生粕 | 789.12 | 850 |
| 17 | 644.54 | 700 |
| 18 | 1737.25 | 1900 |

**五、结论**

本方法的定量下限为10µg/kg，具有较高的精密度、准确性和批间稳定性；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，均能满足饲料原辅料中T-2毒素测定的要求，易于推广应用。