

团体标准

T/CIFST 021.1—2024

食品及食品生产过程中食品致敏原的 免疫分析检测方法 第1部分：麸质

Detection of food allergens in foods and during the food production process
using immunoassay method
Part 1: Gluten

2024-04-20 发布

2024-04-20 实施

中国食品科学技术学会 发布

前 言

本文件按照 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》的规定起草。

本文件是 T/CIFST 021 《食品及食品生产过程中食品致敏原的免疫分析检测方法》的第1部分。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：广州海关技术中心、南昌大学、上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、国家粮食和物资储备局科学研究院、北京工商大学、南京海关动植物与食品检测中心、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、杭州娃哈哈集团有限公司、石家庄君乐宝乳业有限公司、拜发分析系统销售（北京）有限公司。

本文件主要起草人：刘津、梁颖婕、高东微、陈红兵、武涌、蔡一村、谢刚、王佳雅、王彦波、王宇、龙云凤、刘丽君、蒋晶君、张奕敏、吴琴、王镓萍、张耀广、李兴佳、卢曼慧、贺丽丽、葛丽花。

引 言

目前预包装食品标签中以推荐性标识的方式规定了“八大类”致敏原标识的种类和标示方式，分别为含有麸质的谷物及其制品、甲壳纲类动物及其制品、鱼类及其制品、蛋类及其制品、花生及其制品、大豆及其制品、乳及乳制品、坚果及其果仁类制品。2020年，FAO/WHO 食品过敏风险评估专家建议用芝麻替代原“八大类”食品致敏原中的大豆。综合考虑，T/CIFST 021《食品及食品生产过程中食品致敏原的免疫分析检测方法》拟分为如下 17 个部分。

——第 1 部分：麸质。目的在于提供食品及食品生产过程中麸质的夹心酶联免疫吸附法和竞争酶联免疫吸附法及免疫层析检测方法；

——第 2 部分：甲壳纲类动物。目的在于提供食品及食品生产过程中甲壳纲类动物致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析检测方法；

——第 3 部分：蛋类。目的在于提供食品及食品生产过程中蛋类致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法；

——第 4 部分：花生。目的在于提供食品及食品生产过程中花生致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法；

——第 5 部分：大豆。目的在于提供食品及食品生产过程中大豆致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法；

——第 6 部分：乳。目的在于提供食品及食品生产过程中乳致敏原（奶蛋白）的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法；

——第 7 部分：酪蛋白。目的在于提供食品及食品生产过程中酪蛋白的酶联免疫吸附测定方法；

——第 8 部分： β -乳球蛋白。目的在于提供食品及食品生产过程中 β -乳球蛋白致敏原的酶联免疫吸附测定方法；

——第 9 部分：扁桃仁。目的在于提供食品及食品生产过程中扁桃仁致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法；

——第 10 部分：腰果。目的在于提供食品及食品生产过程中腰果致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法；

——第 11 部分：榛子。目的在于提供食品及食品生产过程中榛子致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法；

——第 12 部分：巴西坚果。目的在于提供食品及食品生产过程中巴西坚果致敏原的免疫层析测定方法；

——第 13 部分：椰子。目的在于提供食品及食品生产过程中椰子致敏原的免疫层析测定方法；

——第 14 部分：夏威夷果。目的在于提供食品及食品生产过程中夏威夷果致敏原的免疫层析测定方法；

——第 15 部分：开心果。目的在于提供食品及食品生产过程中开心果致敏原的免疫层析测定方法；

——第 16 部分：核桃。目的在于提供食品及食品生产过程中核桃致敏原的免疫层析测定方法；

——第 17 部分：芝麻。目的在于提供食品及食品生产过程中芝麻致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法。

食品及食品生产过程中食品致敏原的免疫分析检测方法

第 1 部分：麸质

1 范围

本文件描述了食品及食品生产过程中麸质的夹心酶联免疫吸附法和竞争酶联免疫吸附法及免疫层析检测方法。

本文件中夹心酶联免疫吸附法适用于未经发酵或水解的食品及食品生产过程中的麸质定量检测，竞争酶联免疫吸附法适用于经过发酵或水解的食品及食品生产过程中的麸质定量检测，免疫层析法适用于未经发酵或水解的食品及食品生产过程中涉及到的生产线采样及CIP生产线原位清洗水麸质的定性检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

CODEX STAN 118 麸质不耐受人群的特殊膳食食品法典标准（STANDARD FOR FOODS FOR SPECIAL DIETARY USE, FOR PERSON'S INTOLERANT TO GLUTEN）

CXS 234 食品法典《分析和采样方法通用标准》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

麸质 gluten

小麦、大麦、黑麦、燕麦及其杂交种和衍生种中含有的一类蛋白质片段，能溶解于水和0.5 mol/L 氯化钠溶液，食用后可导致部分人群产生过敏反应。

注 1：大多数对麸质不耐受的人群都可以耐受燕麦。因此，没有污染小麦、黑麦或大麦的“纯净”燕麦，其允许存在于食品中的限量，根据 CODEX STAN 118 的要求，由各国自行定义和决定。

3.2

醇溶蛋白 prolamins

可以用 40%~70%乙醇水溶液从麸质中提取出的片段。

注 2：来自小麦的醇溶蛋白为麦醇溶蛋白 gliadin，来自大麦的醇溶蛋白为大麦醇溶蛋白 hordein，来自黑麦的醇溶蛋白为黑麦碱 secalin，来自燕麦的醇溶蛋白为燕麦醇溶蛋白 avenin。麸质中醇溶蛋白的含量通常取作 50%。

注3：大多数对麸质不耐受的人群都可以耐受燕麦。因此，没有污染小麦、黑麦或大麦的“纯净”燕麦，其允许存在于食品中的限量，根据 CODEX STAN 118 的要求，是可由各国自行定义和决定的。

3.3

R5 门德斯方法 R5 Mendez method

CODEX STAN 118 规定麸质检测的 R5 Mendez 方法，CXS 234 食品法典《分析和采样方法通用标准》规定的无麸质食品检测麸质的I类定义方法，其试样提取缓冲液为 Cocktail 提取缓冲液。

第一法 夹心酶联免疫吸附法

4 原理

标准溶液及未经发酵或水解的食品中游离的醇溶蛋白与微孔中预先包被的 R5 单克隆抗体结合，洗涤加入酶标记 R5 单克隆抗体，形成酶标记抗体-抗原-抗体夹心复合物。再次洗板后，加入底物和显色剂产生显色反应，反应结束后加入终止液终止反应。通过测定 450 nm 波长下吸光度值，醇溶蛋白含量与吸光度值成正比，可得出试样中醇溶蛋白含量。试样中麸质的含量与醇溶蛋白含量约为两倍关系。

5 试剂和材料

5.1 RIDASCREEN® Gliadin¹⁾ 醇溶蛋白夹心酶联免疫吸附检测试剂盒

应符合附录A的要求。

5.2 食品中醇溶蛋白提取试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯或生化试剂，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

5.2.1 食品级脱脂奶粉（不含醇溶蛋白）。

5.2.2 乙醇。

5.2.3 Cocktail 提取缓冲液，见附录 D。

5.3 试剂配制

80%乙醇溶液：量取 80 mL 无水乙醇与 20 mL 水混合，混匀。

6 仪器和设备

6.1 酶标仪：配 450 nm 波长滤光片。

6.2 分析天平：感量为 0.01 g。

6.3 涡旋混匀仪。

1) RIDASCREEN® Gliadin 是由 R-Biopharm 拜发公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，那么可使用这些等效产品。

- 6.4 微孔板振荡器。
- 6.5 单道移液器：20 μ L~200 μ L，100 μ L~1000 μ L。
- 6.6 八道移液器：30 μ L~300 μ L。
- 6.7 水浴锅：37 $^{\circ}$ C，60 $^{\circ}$ C，100 $^{\circ}$ C。
- 6.8 离心机：转速不低于 4000 r/min。

7 分析步骤

7.1 试剂配制

- 7.1.1 1 \times 稀释缓冲液：按照 1 : 5 比例稀释 5 \times 稀释缓冲液浓缩液，临用现配。如移取 1 mL 5 \times 稀释缓冲液浓缩液，加 4 mL 水稀释混匀。一般情况下，1 个试样需约 1.5 mL 1 \times 稀释缓冲液。
- 7.1.2 1 \times 洗涤缓冲液：按照 1 : 10 比例稀释 10 \times 洗涤缓冲液浓缩液，稀释后的 1 \times 洗涤缓冲液可贮室温（20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）下保存 4 周。如移取 10 mL 10 \times 洗涤缓冲液浓缩液，加 90 mL 水稀释混匀。1 条微孔需约 15 mL 1 \times 洗涤缓冲液洗涤。
- 7.1.3 1 \times 酶标记物：按照 1:11 比例稀释 11 \times 酶标记物浓缩液临用现配。如移取 100 μ L 11 \times 酶标记物浓缩液，加 1 mL 水稀释混匀，可供 1 条微孔反应用。

7.2 试样前处理和提取

7.2.1 样品制备

对不少于 50 g 或 50 mL 试样进行充分均质。固态类试样粉碎、研磨、过筛（筛板孔径 0.3 mm~0.5 mm）；半固态食品试样匀浆混匀；液态试样振摇混合均匀。

7.2.2 样品提取

- 7.2.2.1 液态一般食品试样（不含单宁和多酚）：吸取 0.25 mL 均质后的液态试样，加入 2.5 mL Cocktail 提取液（5.2.3），密闭上容器并充分混合。按照 7.2.2.5 进一步处理试样。
- 7.2.2.2 固态和半固态一般试样（不包括燕麦试样；不含单宁和多酚）：称取 0.25 g 均质后的固体和半固态试样，加入 2.5 mL Cocktail 提取液（5.2.3），密闭容器并充分混合。按照 7.2.2.5 进一步处理试样。
- 7.2.2.3 含有单宁和多酚的食品试样（如巧克力、咖啡、可可、板栗粉、荞麦、小米和调味料）：称取 0.25 g（若为液体试样则取 0.25 mL）均质后的试样，加入 0.25 g 食品级脱脂奶粉（5.2.1）和 2.5 mL Cocktail 提取液（5.2.3），密闭容器并充分混合。按照 7.2.2.5 进一步处理试样。
- 7.2.2.4 燕麦试样：取不少于 200 g 燕麦试样进行充分均质，称取 1.00 g 均质后的试样，加入 10 mL Cocktail 提取液（5.2.3），密闭容器并充分混合。按照 7.2.2.5 进一步处理试样。
- 7.2.2.5 试样的进一步处理：将经过 7.2.2.1~7.2.2.4 处理后的试样于 50 $^{\circ}$ C 水浴加热 40 min。快速冷却试样，加入 7.5 mL 80 % 乙醇溶液（5.3），针对燕麦试样加入 30 mL 80% 乙醇溶液（5.3）。在室温（20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C）条件下，上下颠倒并旋转振荡 1h。以 4000 r/min 转速离心 10 min，收集上清液。将上清液用 1 \times 稀释缓冲液（7.1.1）按比例 1 : 12.5[如移取 80 μ L 提取物上清液，加 920 μ L 1 \times 稀释缓冲液（7.1.1）稀释混匀]继续稀释。此时试样的稀释倍数累计为 500 倍。

7.3 加样和测定

7.3.1 准备

将预先包被 R5 单克隆抗体的微孔插入微孔板架并做好标记，微孔数量包括标准溶液和试样，均设置双平行。

7.3.2 加样

在微孔中平行加入 100 μL 标准溶液 1~6 和试样溶液至微孔，室温下（20℃~25℃）孵育 30 min。孵育结束后，弃去微孔中液体，每个微孔每次加入 250 μL 1×洗涤缓冲液（7.1.2）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，每个微孔中加入 100 μL 1×酶标记物（7.1.3），室温下（20℃~25℃）孵育 30 min。孵育结束后，弃去微孔中液体，每个微孔每次加入 250 μL 1×洗涤缓冲液（7.1.2）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，每个微孔分别加入 50 μL 底物和 50 μL 发色剂，轻轻地水平摇动微孔板使其均匀混合，室温下（20℃~25℃）暗处避光孵育 30 min。孵育结束后，每个微孔中加入 100 μL 终止液，轻轻地水平摇动微孔板使其反应完全。

7.3.3 测定

使用酶标仪在 450 nm 波长下 30 min 之内读取吸光度值（OD 值）。

7.4 标准曲线制作和测定结果计算

以标准溶液 2~6 质量浓度为横坐标，双平行测定的标准溶液的平均 OD 值为纵坐标，绘制半对数曲线，计算试样溶液中醇溶蛋白浓度（C）。

可以使用试剂盒配套分析软件 RIDASOFT® Win 进行标准曲线绘制和测定结果计算。

7.5 测定结果表述

固态试样中醇溶蛋白含量按式（1）计算：.....（1）

$$X = \frac{C}{m \times 1000} \times f \times V$$

式中：

X ——试样中醇溶蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ——试样溶液中醇溶蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

f ——试样稀释倍数；

V ——定容体积，除燕麦外的试样为 10 mL，燕麦试样为 40 mL；

m ——试样称量的质量，除燕麦外的试样为 0.25 g，燕麦试样为 1 g；

1000——单位换算系数。

注 1：试样稀释倍数 f 为 7.2.2.5 中使用 1×稀释缓冲液稀释上清液或滤液的稀释倍数 12.5 倍，若除此稀释步骤外还有进一步稀释，也需纳入计算。

注 2：计算结果保留小数点后两位有效数字。

液态试样中醇溶蛋白含量按式（2）计算：

$$X = C \times f / 1000 \quad \text{..... (2)}$$

式中：

X ——试样中醇溶蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C ——试样溶液中醇溶蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

f ——试样稀释倍数；

1000——单位换算系数。

注 1：按照本文件方法处理试样稀释倍数 f 为 500 倍，若除 500 倍稀释外，还有进一步稀释，也需纳入计算。

注 2：计算结果保留小数点后两位有效数字。

试样中麸质含量按式（3）计算：.....（3）

$$Y = X \times 2$$

式中：

Y ——试样中麸质含量，单位为毫克每千克（mg/kg）或毫克每升（mg/L）；

X ——试样中醇溶蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）或毫克每升（mg/L）；

2——醇溶蛋白与麸质含量的换算系数。

注 1：食品加工工艺对试样中醇溶蛋白含量以及醇溶蛋白与麸质含量的比例关系和换算系数有重要影响。一般情况下，食品原料和食品中醇溶蛋白约占麸质 50%，换算系数为 2。某些特殊的食品加工工艺会显著改变比例关系。

注 2：计算结果保留小数点后两位有效数字。

8 质量控制

8.1 试剂失效

出现以下情况之一表明试剂失效，不能进行测定或测定结果作废：

——贮存在试剂瓶中的发色剂颜色出现蓝色；

——加入终止液后标准溶液 6（80 ng/mL）吸光度值 < 1.2。

8.2 变异系数

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

9 检出限和定量限

本方法对醇溶蛋白的检出限为 0.5 mg/kg（或 mg/L），定量限为 2.5 mg/kg（或 mg/L）。麸质测定的检出限为 1.0 mg/kg（或 mg/L），定量限为 5.0 mg/kg（或 mg/L）。

10 防污染措施

10.1 食品试样的均质可能产生粉尘，为避免粉尘级别的蛋白（食品致敏原）污染应在独立的房间或使用通风橱进行试样均质的前处理操作。

10.2 设备和器具用水冲洗后，用 60% 乙醇彻底清洁，以消除谷物粉尘污染。

10.3 在试验过程中应戴手套操作，且在称量和均质试样、试样提取及试样检测三个不同阶段中应更换新的手套。

第二法 竞争酶联免疫吸附法

11 原理

标准溶液及经过发酵或水解的食品中游离的水解醇溶蛋白与微孔中预先包被的水解醇溶蛋白竞争结合酶标记的 R5 单克隆抗体。洗板后，加入的底物/发色剂呈显色反应，反应结束后加入终止液终止反应。通过测定 450 nm 波长下吸光度，醇溶蛋白含量与吸光度值成反比，可得出试样中醇溶蛋白含量。试样中麸质的含量与醇溶蛋白含量约为两倍关系。

12 试剂和材料

12.1 RIDASCREEN® Gliadin competitive²⁾ 醇溶蛋白竞争酶联免疫吸附检测试剂盒

应符合附录 B 的要求。

12.2 发酵食品中醇溶蛋白提取试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯或生化试剂，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

12.2.1 乙醇。

12.2.2 鱼明胶：来源于冷水鱼类的皮肤，含量 40%~50%。

12.2.3 氢氧化钠（NaOH）。

12.3 试剂配制

12.3.1 60% 乙醇溶液：量取 60 mL 无水乙醇与 40 mL 水混合。

12.3.2 1 mol/L 氢氧化钠（NaOH）：称取 40.00 g NaOH，溶解至 1 L 水中。

13 仪器和设备

参见 6。

14 分析步骤

14.1 试剂配制

14.1.1 1×稀释缓冲液：按照 1：5 比例稀释试剂盒中 5×稀释缓冲液浓缩液，临用现配。如移取 1 mL 5×稀释缓冲液浓缩液，加 4 mL 水稀释混匀。一般情况下，1 个试样需约 1 mL 1×稀释缓冲液。

14.1.2 1×洗涤缓冲液：按照 1：10 比例稀释试剂盒中 10×洗涤缓冲液浓缩液，稀释后的 1×洗涤缓冲液可贮室温（20℃~25℃）下保存 4 周。如移取 10 mL 10×洗涤缓冲液浓缩液，加 90 mL 水稀释混匀。1 条微孔需约 8 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

14.1.3 1×酶标记物：按照 1：11 比例稀释试剂盒中 11×酶标记物浓缩液，现配现用。如移取 100 μL 11×酶标记物浓缩液，加 1 mL 水中稀释混匀，可供 2 条微孔反应应用。

14.1.4 富含多酚的发酵食品提取试剂（含 10% 鱼明胶的 60% 乙醇溶液）：在 30 mL 水中加入 10.00 g 鱼明胶（12.2.2）并充分搅拌，再加入 60 mL 无水乙醇（12.2.1），混匀后用 1 mol/L 氢氧化钠（12.3.2）

2) RIDASCREEN® Gliadin competitive 是由 R-Biopharm 拜发公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，那么可使用这些等效产品。

调节 pH 为 8.5，再用水定容至 100 mL。配制好的提取试剂可贮室温（20℃~25℃）下保存 2 周。使用前先搅拌均匀再取用。

14.2 试样前处理和提取

14.2.1 样品制备

对不少于 50 g 或 50 mL 试样进行充分均质，固态类试样粉碎、研磨、过筛（筛板孔径 0.3 mm ~ 0.5 mm）；半固态食品试样匀浆混匀；液态试样振摇混合均匀。

14.2.2 样品提取

14.2.2.1 不含多酚类物质的固态及半固态食品试样：称取 1.00 g 试样，置于 50 mL 离心管中。加入 10 mL 60% 乙醇溶液（12.3.1）。按照 14.2.2.5 进一步处理试样。

14.2.2.2 含有多酚类物质的固态及半固态食品试样：称取 1.00 g 试样，置于 50 mL 离心管中。加入 10 mL 富含多酚的发酵食品提取试剂（14.1.4）。按照 14.2.2.5 进一步处理试样。

14.2.2.3 除啤酒外的液态食品试样：吸取 1 mL 试样，置于 50 mL 离心管中。加入 9 mL 60% 乙醇溶液（12.3.1）。按照 14.2.2.5 进一步处理试样。

14.2.2.4 啤酒：吸取 1 mL 试样，置于 50 mL 离心管中。加入 9 mL 富含多酚的发酵食品提取试剂（14.1.4）。按照 14.2.2.5 进一步处理试样。

14.2.2.5 试样的进一步处理：将 14.2.2.1~14.2.2.4 处理后的试样涡旋混匀至少 30 s，上下颠倒/旋转振荡 10 min，在室温（20℃~25℃）条件以转速 4000 r/min 离心 10 min，取上清液用于检测。将上清液用 1× 稀释缓冲液（14.1.1）按比例 1：50[如移取 20 μL 提取物上清液/滤液，加 980 μL 1× 稀释缓冲液（14.1.1）稀释混匀]继续稀释，得到用于测定的试样液。至此试样的稀释倍数累计为 500 倍。

14.3 加样和测定

14.3.1 准备

将预先包被水解醇溶蛋白的微孔插入微孔板架并做好标记，微孔数量包括标准溶液和试样，均设置双平行。

14.3.2 加样

在微孔中平行加入 50 μL 标准溶液 1~5 和试样溶液，再加入 50 μL 1× 酶标记物（14.1.3），轻轻地水平摇动微孔板使其均匀混合，室温下（20℃~25℃）孵育 30 min。孵育结束后，弃去微孔中液体，每个微孔每次加入 250 μL 1× 洗涤缓冲液（14.1.2）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，每个微孔中加入 100 μL 底物/发色剂，室温下（20℃~25℃）暗处孵育 10 min。孵育结束后，每个微孔中加入 100 μL 终止液，轻轻地水平摇动微孔板使其反应完全。

14.3.3 测定

用酶标仪在 450 nm 波长下 10 min 之内读取吸光度值（OD 值）。

14.4 标准曲线制作和测定结果计算

以标准溶液 2~5 质量浓度为横坐标，式（4）计算的百分比为纵坐标，绘制半对数曲线，计算试样溶液中醇溶蛋白浓度（C）。

醇溶蛋白标准溶液和试样溶液的百分比吸光度值按式（4）计算：

$$A = \frac{S}{S_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中：

A —— 百分比吸光度值；

S —— 醇溶蛋白标准溶液或试样溶液的平均吸光度值；

S_0 —— 标准溶液 1 的平均吸光度值。

可以使用试剂盒配套分析软件 RIDASOFT® Win 进行标准曲线绘制和测定结果计算。

14.5 测定结果表述

固态试样中醇溶蛋白含量按式（5）计算：

$$X = \frac{C}{m \times 1000} \times f \times V \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中：

X —— 试样中醇溶蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C —— 试样溶液中醇溶蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

f —— 试样稀释倍数；

V —— 定容体积，为 10 mL；

m —— 试样称量的量，单位为克（g）；

1000 —— 单位换算系数。

注：按照本文件方法处理试样稀释倍数为 500 倍，若除 500 倍稀释外，还有进一步稀释，也需纳入计算。

液态试样中的醇溶蛋白含量按式（6）计算：

$$X = C \times f / 1000 \quad \dots\dots\dots (6)$$

式中：

X —— 试样中醇溶蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C —— 试样溶液中醇溶蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

f —— 试样稀释倍数；

1000 —— 单位换算系数。

注：按照本文件方法处理试样稀释倍数为 500 倍，若除 500 倍稀释外，还有进一步稀释，也需纳入计算。

试样中麸质含量按式（7）计算：

$$Y = X \times 2 \quad \dots\dots\dots (7)$$

式中：

Y —— 试样中麸质含量，单位为毫克每千克（mg/kg）或毫克每升（mg/L）；

X —— 试样中醇溶蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）或毫克每升（mg/L）；

2 —— 醇溶蛋白与麸质含量的换算系数。

注 1：食品加工工艺对试样中醇溶蛋白含量、以及醇溶蛋白与麸质含量的比例关系和换算系数有重要影响。一般情况下食品原料和食品中醇溶蛋白约占麸质 50%，换算系数为 2。某些特殊的食品加工工艺会显著改变比例关系。

注 2：计算保留小数点后 2 位有效数字。

15 质量控制

15.1 试剂失效

出现以下情况之一表明试剂失效，不能进行测定或测定结果作废：

- 贮存在试剂瓶中的发色剂颜色出现蓝色；
- 加入终止液后标准溶液 1 (0 ng/mL) 吸光度值 < 1.2。

15.2 变异系数

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

16 检出限和定量限

本方法对醇溶蛋白的检出限为 2.3 mg/kg (或 mg/L)，定量限为 5.0 mg/kg (或 mg/L)。麸质测定的检出限为 4.6 mg/kg (或 mg/L)，定量检测限为 10.0 mg/kg (或 mg/L)。

17 防污染措施

防污染措施按照 10。

第三法 免疫层析法

18 原理

试样中的醇溶蛋白与包被固定在试纸条上的 R5 单克隆抗体、红色胶体金颗粒交联的 R5 单克隆抗体，形成夹心复合物并在检测区显色，通过目测判读检测结果。试样中醇溶蛋白的含量和检测带的颜色成正比。试样中麸质的含量与醇溶蛋白含量约为两倍关系。

19 试剂和材料

19.1 RIDA®QUICK Gliadin³⁾ 醇溶蛋白免疫层析试剂盒

应符合附录 C 的要求。

19.2 食品及食品原料中醇溶蛋白提取试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯或生化试剂，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

19.2.1 食品级脱脂奶粉（不含醇溶蛋白）。

19.2.2 乙醇。

19.2.3 Cocktail 提取缓冲液，见附录 D。

19.3 试剂配制

19.3.1 60% 乙醇溶液：按照 12.3.1。

3) RIDA®QUICK Gliadin 是由 R-Biopharm 拜发公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，那么可使用这些等效产品。

19.3.2 80% 乙醇溶液：按照 5.3。

20 仪器和设备

20.1 分析天平：感量 0.01 g。

20.2 匀浆机。

20.3 涡旋混匀仪。

20.4 离心机：转速 ≥ 4000 r/min。

20.5 单道移液器：100 μ L~1000 μ L，500 μ L~5000 μ L。

21 分析步骤

21.1 环境拭子的采样和检测

21.1.1 使用一次性滴管吸取 500 μ L 试样稀释缓冲液加入到一次性试管中。

21.1.2 用干燥的试纸条下端的反应区充分擦拭 10 cm \times 10 cm 的待检测环境表面。

21.1.3 按照箭头指定方向将试纸条插入试管并静置 5 min \pm 10 s，试纸条浸入液体的高度不能超过最大刻度。

21.1.4 取出试纸条，对照结果比对卡，立即读取检测结果。

21.2 CIP 生产线原位清洗水的检测

21.2.1 不含有洗涤剂的 CIP 生产线原位清洗水：使用一次性滴管吸取 250 μ L 试样稀释缓冲液到一次性试管中，再加入 250 μ L 待测 CIP 生产线原位清洗水，均匀混合，按照 21.1.3 和 21.1.4 进行检测。

21.2.2 含有洗涤剂的 CIP 生产线原位清洗水：使用一次性滴管吸取 500 μ L 试样稀释缓冲液到一次性试管中，再加入 50 μ L 待测 CIP 生产线原位清洗水，均匀混合，按照 21.1.3 和 21.1.4 进行检测。

注：含有次氯酸盐的 CIP 生产线原位清洗水不适用于本方法。

21.3 食品试样前处理和提取

21.3.1 样品制备

对不少于 50 g 或 50 mL 试样进行充分均质。固态类试样粉碎、研磨、过筛（筛板孔径 0.3 mm~0.5 mm）；半固态食品试样匀浆混匀；液态试样振摇混合均匀。

21.3.2 样品提取

21.3.2.1 未经加工的食品

21.3.2.1.1 液态试样：吸取 1 mL 试样到 50 mL 离心管中。如果试样成分含有单宁或多酚物质，应加入 1.00 g 食品级脱脂奶粉（19.2.1）。加入 9 mL 60% 乙醇溶液（12.3.1），按照 21.3.2.1.3 进一步处理试样。

21.3.2.1.2 固态试样或半固态试样：称取 1.0 g 均质后的试样到 50 mL 离心管中。如果试样成分含有单宁或多酚物质如大豆，加入 1.0 g 食品级脱脂奶粉（19.2.1）。加入 10 mL 60% 乙醇溶液（12.3.1）。按照 21.3.2.1.3 进一步处理试样。

21.3.2.1.3 试样的进一步处理：将经过 21.3.2.1.1 或 21.3.2.1.2 处理后的试样，盖紧管盖后涡旋混匀至少 30 s，以转速 4000 r/min 在室温（20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）条件下离心 10 min，取上清液用于检测。强酸性或

强碱性试样应调节 pH 值至 7.0 ± 0.5 后再检测。

21.3.2.2 加工过的食品

21.3.2.2.1 按照 7.2.1~7.2.2 进行试样处理后, 再按照 21.3.2.2.2 进一步处理试样。

21.3.2.2.2 将经过 7.2.1~7.2.2 处理后的试样于 50°C 水浴加热 40 min。冷却试样, 加入 7.5 mL 80% 乙醇 (5.3) (针对燕麦试样则加入 30 mL 80% 的乙醇)。在室温 ($20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$) 条件下颠倒/旋转振荡 1 h。以转速 4000 r/min 在室温 ($20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$) 条件离心 10 min, 取提取物上清液用于检测。

21.4 食品试样的检测

使用一次性滴管吸取 500 μL 试样稀释缓冲液到一次性试管中, 取 50 μL 从 21.3.2.1.3 和 21.3.2.2.2 得到的提取物上清液到试管中, 按照 21.1.3 和 21.1.4 进行检测。

21.5 检测结果表述

试纸条同时出现蓝色质控带和红色检测带, 检测结果为阳性。

试纸条只出现蓝色质控带, 未出现红色检测带, 检测结果为阴性。

22 质量控制

22.1 试剂失效

试纸条未出现蓝色质控带, 检测结果无效。

22.2 内部质控

定期或必要时使用商品化加工食品醇溶蛋白质控物或实验室自行制备的人工添加试样进行质量控制。

23 检出限

本方法对醇溶蛋白的检出限为: 环境拭子 $1.5 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$, 不含有洗涤剂的 CIP 生产线原位清洗水 5 ng/mL, 含有洗涤剂的 CIP 生产线原位清洗水 50 ng/mL, 未经加工的食品原料 2.2 mg/kg (或 mg/L), 加工过的食品原料和食品 3.2 mg/kg (或 mg/L)。

本方法对麸质的检出限为: 环境拭子 $3.0 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$, 不含有洗涤剂的 CIP 生产线原位清洗水 10 ng/mL, 含有洗涤剂的 CIP 生产线原位清洗水 100 ng/mL, 未经加工的食品原料 4.4 mg/kg (或 mg/L), 加工过的食品原料和食品 6.4 mg/kg (或 mg/L)。

24 方法局限性

次氯酸盐可令试样中的麸质迅速地被氧化破坏, 本方法无法检测含有次氯酸盐的生产线原位清洗水中的麸质。

25 防污染措施

防污染措施按照 10。

附 录 A
(规范性)
醇溶蛋白夹心酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

醇溶蛋白夹心酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN® Gliadin 包括：

- a) 预包被醇溶蛋白 R5 抗体的 96 孔可拆分微孔板：8×12 孔；
- b) 11×酶标记物浓缩液：1.2 mL/瓶×1 瓶；
- c) 5×稀释缓冲液浓缩液：60 mL/瓶×1 瓶；
- d) 10×洗涤缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
- e) 标准溶液 1 (Std 1)：1.3 mL/瓶×1 瓶，醇溶蛋白含量为 0 ng/mL；
- f) 标准溶液 2 (Std 2)：1.3 mL/瓶×1 瓶，醇溶蛋白含量为 5 ng/mL；
- g) 标准溶液 3 (Std 3)：1.3 mL/瓶×1 瓶，醇溶蛋白含量为 10 ng/mL；
- h) 标准溶液 4 (Std 4)：1.3 mL/瓶×1 瓶，醇溶蛋白含量为 20 ng/mL；
- i) 标准溶液 5 (Std 5)：1.3 mL/瓶×1 瓶，醇溶蛋白含量为 40 ng/mL；
- j) 标准溶液 6 (Std 6)：1.3 mL/瓶×1 瓶，醇溶蛋白含量为 80 ng/mL；
- k) 底物：过氧化脲溶液，7 mL/瓶×1 瓶；
- l) 发色剂：四甲基联苯胺溶液，7 mL/瓶×1 瓶；
- m) 终止液：1N 硫酸，14 mL/瓶×1 瓶。

A.2 试剂盒验收和保存

A.2.1 每个批号试剂盒应进行回收率测试的验收试验，回收率符合质量控制要求。

A.2.2 试剂盒于 2℃~8℃ 黑暗处避光保存，使用前回复至室温（20℃~25℃）。使用完尽快放回 2℃~8℃ 保存，不可冷冻。未使用的微孔板孔，应与袋中的干燥剂一起，重新置入铝箔封口袋中并封好，放置 2℃~8℃ 保存。

A.2.3 不同批号试剂盒中组分不应混用。

A.2.4 不使用超过有效期的试剂盒。

A.3 试剂盒评估

A.3.1 定期进行回收率评估，回收率应在 80%~120% 之间。

A.3.2 回收率评估可使用商品化食品醇溶蛋白质控物或实验室自行制备的人工添加试样。

A.4 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图 A.1。

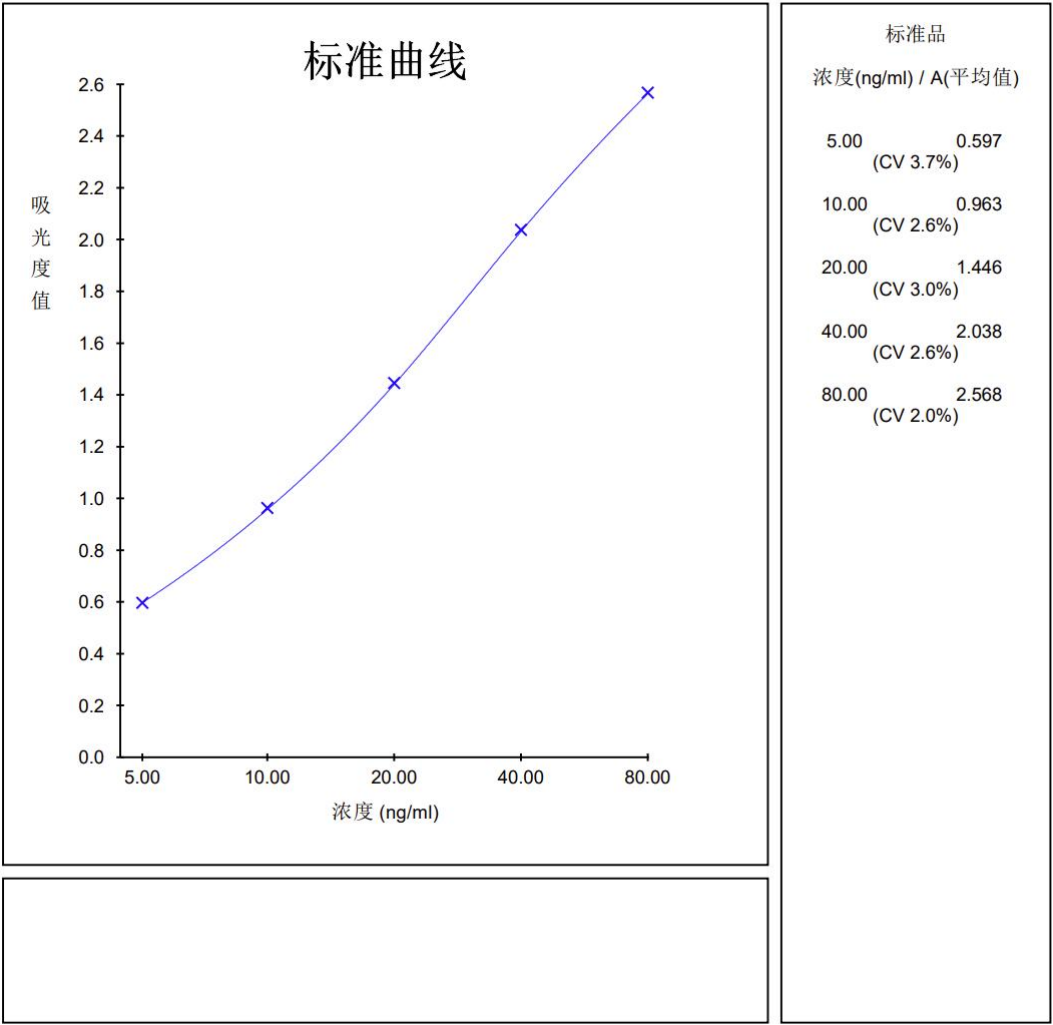


图 A.1 标准曲线谱图示例

附录 B

(规范性)

醇溶蛋白竞争酶联免疫吸附检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

醇溶蛋白竞争酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN® Gliadin competitive 包括：

- a) 预包被水解醇溶蛋白的 96 孔可拆分微孔板：8×12 孔；
- b) 11×酶标记物浓缩液：0.7 mL/瓶×1 瓶；
- c) 5×稀释缓冲液浓缩液：60 mL/瓶×1 瓶；
- d) 10×洗涤缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
- e) 标准溶液 1 (Std 1)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶蛋白含量为 0 ng/mL；
- f) 标准溶液 2 (Std 2)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶蛋白含量为 10 ng/mL；
- g) 标准溶液 3 (Std 3)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶蛋白含量为 30 ng/mL；
- h) 标准溶液 4 (Std 4)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶蛋白含量为 90 ng/mL；
- i) 标准溶液 5 (Std 5)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶蛋白含量为 270 ng/mL；
- j) 底物/发色剂：3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液，10 mL/瓶×1 瓶；
- k) 终止液：1N 硫酸，14 mL/瓶×1 瓶。

B.2 试剂盒验收和保存

B.2.1 每个批号试剂盒应进行回收率测试的验收试验，回收率符合质量控制要求。

B.2.2 试剂盒于 2℃~8℃ 黑暗处避光保存，使用前回复至室温 (20℃~25℃)。使用完尽快放回 2℃~8℃ 保存，不可冷冻。未使用的微孔板孔，应与袋中的干燥剂一起，重新置入铝箔封口袋中并封好，放置 2℃~8℃ 保存。

B.2.3 不同批号试剂盒中组分不应混用。

B.2.4 不使用超过有效期的试剂盒。

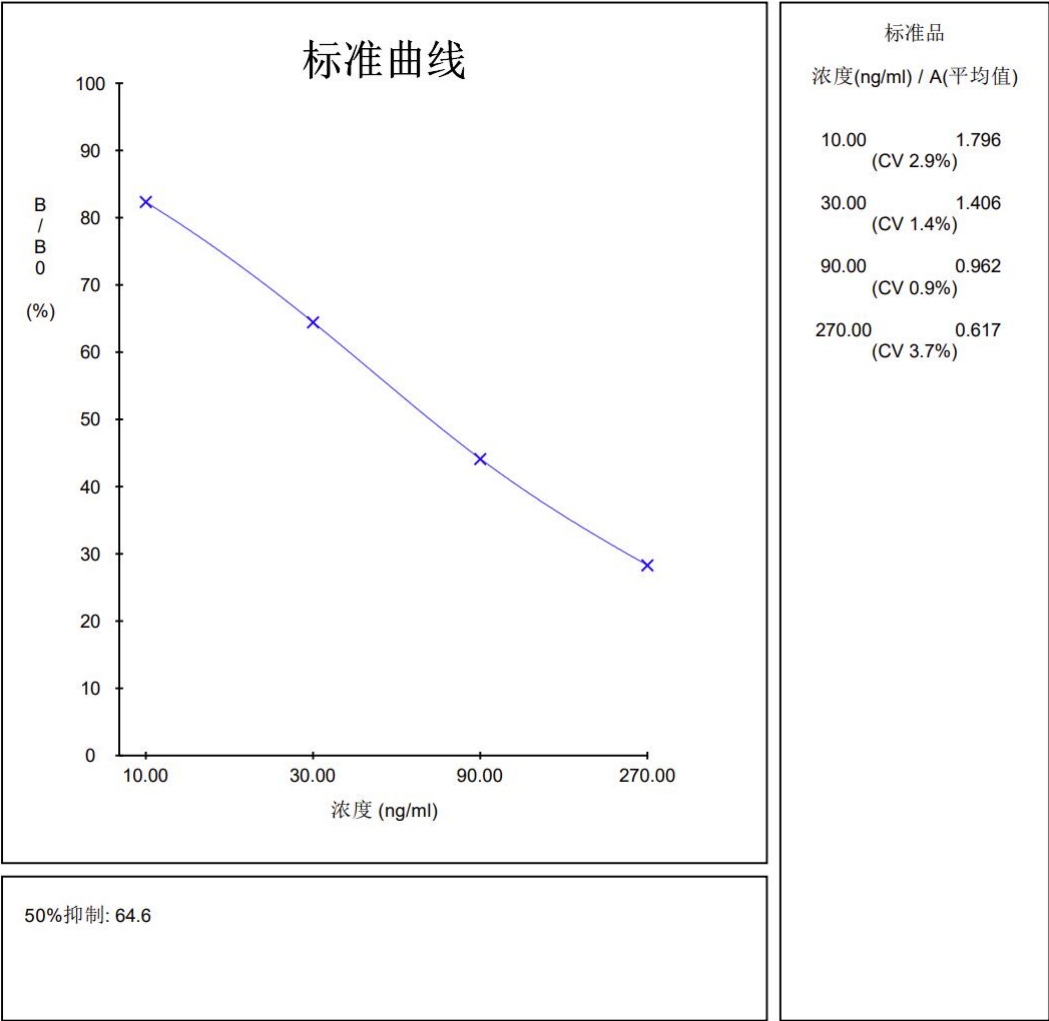
B.3 试剂盒评估

B.3.1 定期进行回收率评估，回收率应在 80%~120% 之间。

B.3.2 回收率评估可使用商品化食品醇溶蛋白质控物或实验室自行制备的人工添加试样。

B.4 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图 B.1。



7

图 B.1 标准曲线谱图示例

附 录 C
(规范性)
醇溶蛋白免疫层析试剂盒

C.1 试剂盒组成

醇溶蛋白免疫层析试剂盒 RIDA®QUICK Gliadin 包括：

- a) 预包被醇溶蛋白 R5 抗体的免疫层析试纸条：25 条；
- b) 试样稀释缓冲液：60 mL；
- c) 无污染一次性试管：30 支；
- d) 无污染一次性滴管：25 支；
- e) 结果比对卡。

C.2 试剂盒验收和保存

C.2.1 每个批号试剂盒应按照质量控制要求进行验收试验，考察检测性能。

C.2.2 未开封试剂盒保存在 2℃~8℃，使用前回复至室温（20℃~25℃）。开封后试剂保存在室温（20℃~25℃）并保持干燥。

C.2.3 不使用超过有效期的试剂盒。

附 录 D
(规范性)
Cocktail 提取缓冲液

D.1 试剂描述

Cocktail 试样提取缓冲液，是 Codex Alimentarius 食品法典国际标准 CODEX STAN 118 中 5.2 明确指定的 R5 门德斯方法对应的麸质检测试样提取缓冲液，及 CXS 234 中明确列出的无麸质食品麸质检测的国际唯一定义方法——R5 门德斯方法对应的麸质检测试样提取缓冲液，用于提取加工过的食品试样中的醇溶蛋白，于 2003 年被 Valdes 等研发，于 2005 年被 Mendez 等改进。

D.2 试剂安全

Cocktail 提取缓冲液中含有氯胍和巯基乙醇，因此宜在通风橱内使用 Cocktail 提取缓冲液，同时避免皮肤直接接触。