

团体标准

T/CIFST 021.6—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6部分：乳

Detection of food allergens in foods and during the food production process
using immunoassay method
Part 6: Milk

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6部分。
T/CIFST 021 已经发布了以下部分：

- 第1部分：麸质；
- 第2部分：甲壳纲类动物；
- 第3部分：蛋类；
- 第4部分：花生；
- 第5部分：大豆。

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、王稼萍、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6部分：乳

1 范围

本文件描述了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。

本文件中酶联免疫吸附法适用于食品及食品生产过程中的乳致敏原定量检测，免疫层析法适用于食品、环境采样和 CIP 生产线原位清洗水中乳致敏原的定性检测。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

乳 milk

也称奶、乳汁，食品过敏原中的乳指牛奶。牛奶中含有3.2% 的蛋白质，其中10% 是 β -乳球蛋白，80% 是酪蛋白，这两种蛋白都具有致敏性。

第一法 酶联免疫吸附法

4 原理

标准溶液及试样中含有的乳过敏原与特异性抗体结合。加入过氧化物酶标记的抗体后，形成抗体-抗原-抗体复合物。洗板后，加入底物/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 波长下吸光度值，乳致敏原含量与吸光度值成正比，可得出试样中乳致敏原含量。可根据乳或乳粉中乳蛋白的百分比含量，计算出试样中含有的乳或乳粉的含量。

5 试剂和材料

5.1 RIDASCREEN® FAST Milk¹⁾ 乳酶联免疫吸附检测试剂盒

应符合附录 A 的要求。

5.2 试剂

除特别说明外，所有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 氢氧化钠 (NaOH)。

5.2.2 浓盐酸 (HCl)。

5.2.3 牛血清白蛋白：bovine Fraction V，不含蛋白酶。

5.3 试剂配制

5.3.1 氢氧化钠 (NaOH) 溶液 (1 mol/L)：称取 40.00 g NaOH，加水溶解并定容至 1L，混合均匀。

5.3.2 盐酸溶液 (HCl) (1 mol/L)：取 8.4 mL 浓盐酸 (37%)，用水定容至 100 mL。

6 仪器和设备

6.1 酶标仪：配 450 nm 滤光片。

6.2 分析天平：感量 0.01 g。

6.3 旋涡混匀仪。

6.4 冷冻离心机：转速不低于 4000 r/min，可实现温度不高于 4 °C。

6.5 水浴锅：37°C，60°C，100°C。

6.6 单道移液器：20 µL~200 µL，100 µL~1000 µL。

6.7 八道移液器：30 µL~300 µL。

7 分析步骤

7.1 试剂配制

7.1.1 1×致敏原提取缓冲液：按照 1：10 比例稀释 10×致敏原提取缓冲液浓缩液，稀释后的 1×致敏原提取缓冲液可贮于 2 °C~8 °C 下保存 12 周。稀释前，若 10×致敏原提取缓冲液浓缩液中有结晶，则先将其置于 37 °C 水浴中温育并摇晃混匀，直至结晶完全消失。

7.1.2 含牛血清白蛋白的致敏原提取缓冲液：10 mL 1×致敏原提取缓冲液 (7.1.1) 充分溶解 0.25 g 牛血清白蛋白 (5.2.3)。试样处理前进行配制，临用现配。

7.1.3 含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液：称取 1.35 克添加剂 1，放入玻璃烧杯中，加入 15 mL 1 mol/L NaOH (5.3.1)，搅拌直至完全溶解，将此溶液完全转移至 700 mL 1×致敏原提取缓冲液 (7.1.1)。在转移的过程中，要一直搅拌。使用 1 mol/L HCl (5.3.2)，将 pH 值校正至 9 后，使用 1×致敏原提取缓冲液 (7.1.1) 定容到 750 mL。这些溶液足够 45 个试样使用，可在室温 (20 °C~25 °C) 条件下保存 8 周，若缓冲液中出现了晶体，则不可再使用。灰尘会导致晶体的析出，请在配置过程中使用洁净容器。

7.1.4 1×提取液 2：按照 1：2 (1+1) 使用蒸馏水稀释提取液 2 浓缩液。稀释后全部的 1×提取液 2 足够用于 45 个试样，可在室温 (20 °C~25 °C) 条件下保存约 3 个月。

1) RIDASCREEN® FAST Milk 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。

7.1.5 1×洗涤缓冲液：按照 1:10 比例稀释 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 15 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

7.1.6 1×酶标记物：用酶连接物缓冲液按照 1:11 比例稀释 11×酶标记物浓缩液，临用现配。如移取 100 μL 11×酶标记物浓缩液，加 1 mL 的酶连接物缓冲液稀释混匀，足够 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 固态或半固态试样

称取 1.00 g 均质试样置于洁净的 50 mL 离心管中，加入 4 mL 制备好的 1×提取液 2（7.1.4），盖好管盖后用力上下颠倒混匀。在 100℃ 的水浴中加热 10 min。用冰水快速冷却至室温（20℃~25℃），加入 16 mL 预热至 60℃ 的含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3），按照 7.2.2.3 进一步处理试样。

7.2.2.2 液态试样

取 1 mL 试样于洁净的 50 mL 离心管中，加入 4 mL 制备好的 1×提取液 2（7.1.4），盖好管盖后用力上下颠倒混匀。在 100℃ 的水浴中加热 10 min。用冰水快速冷却，加入 15 mL 预热至 60℃ 的含添加剂 1 的致敏原提取缓冲液（7.1.3），按照 7.2.2.3 进一步处理试样。

7.2.2.3 试样的进一步处理

将 7.2.2.1 或 7.2.2.2 处理后的试样彻底混匀，在 60℃ 水浴中进行加热提取 10 min，用冰水快速冷却至室温（20℃~25℃），置离心机中在室温（20℃~25℃）条件下以转速 4000 r/min 离心 10 min 或过滤。将上清液/滤液用 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）按比例 1:5（如移取 100 μL 提取物上清液/滤液，加 400 μL 1×致敏原提取缓冲液（7.1.1）稀释混匀）继续稀释。针对玉米和玉米制品以及如核桃、葵花籽、松籽和南瓜籽等试样基质，将上清液/滤液用含牛血清白蛋白的致敏原提取缓冲液（7.1.2）按比例 1:5[如移取 100 μL 提取物上清液/滤液，加 400 μL 含牛血清白蛋白的致敏原提取缓冲液（7.1.2）稀释混匀]继续稀释。此时试样的稀释倍数为 100 倍。制备好的试样溶液应在 30 min 内进行检测。

7.3 加样和测定

7.3.1 准备

将预包被乳特异性抗体的微孔插入微孔板架并做好标记，标准溶液和试样均设置双平行。一次检测不宜超过 3 条微孔板条（24 个板孔），以避免过大的孔间时间差造成对定量结果的不良影响。

7.3.2 加样

在微孔中平行加入 100 μL 的标准溶液 1~5 和试样，室温（20℃~25℃）孵育 10 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（7.1.5）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，每个微孔加入 100 μL 1×酶标记物（7.1.6），室温（20℃~25℃）孵育 10 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（7.1.5）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 100 μL 底物/发色剂，轻轻地水平摇动微孔板使其均匀混合，室温（20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ ）下暗处避光孵育 10 min。孵育结束后，每个微孔加入 100 μL 终止液，轻轻地水平振摇微孔板其反应完全。

7.3.3 测定

使用酶标仪在 450 nm波长下 10 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 2~5 质量浓度为横坐标，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，计算试样液中乳致敏原浓度（ C ）。

可以使用配套分析软件 RIDA SOFT® Win 进行标准曲线绘制和测定结果计算。

7.5 测定结果表述

固态或半固态试样中乳蛋白含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C}{m \times 100} \times f \times V \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中乳蛋白含量，单位为毫克每千克（ mg/kg ）；

C ——试样溶液中乳蛋白浓度，单位为毫克每升（ mg/L ）；

f ——试样稀释倍数；

V ——定容体积，为 0.02 L；

m ——试样称量的质量，单位为千克（ kg ）；

100——标准溶液浓度中包含的 100 倍稀释。

注 1：试样稀释倍数 f 为使用 1 \times 致敏原提取缓冲液稀释时的稀释倍数 5 倍，若进行了进一步稀释，则需考虑进去。

注 2：计算结果保留小数点后两位有效数字。

液态试样中乳蛋白含量按式（2）计算：

$$X = C \times f \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中乳蛋白含量，单位为毫克每升（ mg/L ）；

C ——试样溶液中乳蛋白浓度，单位为毫克每升（ mg/L ）；

f ——试样稀释倍数。

注 1：根据（7.2）制备的试样溶液时的 100 倍稀释倍数已经包括在标准曲线中，试样稀释倍数 f 只考虑除此 100 倍以外的稀释倍数。

注 2：计算结果保留小数点后两位有效数字。

再根据乳或乳粉中乳蛋白的百分比含量，计算出试样中含有的乳或乳粉的含量。 $\dots\dots\dots (3)$

$$Y = X \div P$$

式中：

Y ——试样中乳或乳粉的含量，单位为毫克每千克或毫克每升（ mg/kg 或 mg/L ）；

X ——试样中乳蛋白含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg 或 mg/L）

P ——乳或乳粉中乳蛋白的百分比含量。例如，常用为乳中含有 3.2% 的乳蛋白。

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 5（67.5 mg/L）的吸光度值 <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

本方法对乳蛋白的检出限为 0.7 mg/kg（或 mg/L），定量限为 2.5 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% 乙醇或异丙醇彻底清洁，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、均质试样，试样提取，及检测三个不同阶段中应更换新的手套。

第二法 免疫层析法

11 原理

试样中的乳致敏原与预包被在反应管内的标记抗体发生反应，所形成的抗原-抗体结合物被预包被在免疫层析试纸条上的特异性抗体捕获，形成抗体-抗原-抗体的夹心复合物，并在检测区显色，通过目测判读检测结果。

12 试剂和材料

12.1 bioavid Lateral Flow Milk²⁾ 乳致敏原免疫层析检测试剂盒

2) bioavid Lateral Flow Milk 是由 bioavid 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。

应符合附录 B 的要求。

12.2 食品中乳致敏原提取试剂

除特别说明外，所有试剂均为分析纯或生化试剂，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

13 仪器和设备

13.1 分析天平：感量 0.01 g。

13.2 匀浆机。

13.3 涡旋混匀仪。

13.4 高速离心机：转速不低于 4000 r/min。

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

14 分析步骤

14.1 环境拭子的采样

14.1.1 取 PBS 小管一支，浸润棉签拭子。

14.1.2 用浸润的棉签拭子的棉头充分擦拭 10 cm \times 10 cm 的待检测环境表面。若无法实现 10 cm \times 10 cm 的待检测环境表面擦拭，自行定义合理及合适的待检测环境表面范围并记录。

14.1.3 将擦拭取样后的棉签拭子放回 PBS 小管中，充分浸洗并挤压释放出棉签拭子采样棉头上采集的试样（液）后，取出挤干的棉签拭子。

14.1.4 从 PBS 小管中取 0.1 mL 用于检测。

14.2 CIP 生产线原位清洗水的采样

直接取 0.1 mL CIP 生产线原位清洗水用于检测。

14.3 食品试样前处理和提取

14.3.1 液态试样：对不少于 5 mL 试样进行均质。

14.3.2 固态或半固态试样：称取 50.00 g 试样，向其中加入 450 mL 水。取部分均质好的试样置离心机在室温（20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）条件下以转速 4000 r/min 离心 2 min 或过滤，取上清液/滤液用于检测。若离心后产生脂肪层，则轻挑除去脂肪层后，取脂肪层下的无脂肪清液用于检测。脂肪含量高的试样，宜进行冷冻离心，以去除脂肪。若为纯的坚果则需用水按照 1:20 的比例进行稀释。

14.4 试样的检测

向预包被标记抗体的反应管中加入 0.1 mL 的流动相缓冲液，再加入 0.1 mL 于 14.1~14.3 步骤处理得到的试样液，盖上管盖，混合并室温（20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）孵育 5 min。向反应管中置入乳致敏原试纸条后反应 3 min，目测读取检测结果。

14.5 结果判断和表述

试纸条反应区域有两条线，从上到下分别为：C 线-质控带，T 线-检测带。

阳性结果：试纸条同时出现 C 线及 T 线条带。

阴性结果：试纸条只出现 C 线质控带，未出现 T 线检测带。

试纸条上若有钩状效应带，则参考试纸条说明书上关于钩状效应带的结果评估方法。

15 质量控制

15.1 试剂失效

试纸条未出现蓝紫色质控带，检测结果无效。

15.2 内部质控

定期或必要时使用商品化加工食品乳致敏原质控物或实验室自行制备的人工添加试样进行质量控制。

16 检出限

本方法对食品试样及 CIP 生产线原位清洗水的检出限为 1 mg/kg（或 mg/L），酸性乳清的检出限为 10 mg/kg（或 mg/L），乳清蛋白的检出限为 0.1 mg/kg（或 mg/L）。

本方法对环境表面的拭子采样的检出限为 50 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^2$ （当采样面积为 10 cm x 10 cm 时），或 50 μg /采样拭子（当采样面积是自行确定时，明确所记录的采样范围）。

17 方法局限性

若试样中含有特别高浓度的乳致敏原（>10000 mg/kg），则检测带的颜色可能会变浅，甚至完全抑制其形成。若试样可能含有特别高浓度的目标检测致敏原，则宜对试样进行大倍数稀释。

18 注意事项/防污染措施

18.1 防污染措施

按照 10。

18.2 试样 pH 值

极酸性或极碱性试样应调节 pH 值至 7.5 ± 0.5 后再检测。

附 录 A
(规范性)
乳致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

乳致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN® FAST Milk 包括：

- a) 预包被乳蛋白致敏原抗体的 48 孔可拆分微孔板：8×6 孔；
- b) 11×酶标记物浓缩液：0.7 mL/瓶×1 瓶；
- c) 酶标记物缓冲液：7 mL/瓶×1 瓶；
- d) 10×洗涤缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
- e) 10×致敏原提取缓冲浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
- f) 2×提取液 2：30 mL/瓶×3 瓶；
- g) 添加剂 1：2 g ×1 瓶；
- h) 标准溶液 1：1.3 mL/瓶×1 瓶，乳蛋白含量为 0 mg/L；
- i) 标准溶液 2：1.3 mL/瓶×1 瓶，乳蛋白含量为 2.5 mg/L；
- j) 标准溶液 3：1.3 mL/瓶×1 瓶，乳蛋白含量为 7.5 mg/L；
- k) 标准溶液 4：1.3 mL/瓶×1 瓶，乳蛋白含量为 22.5 mg/L；
- l) 标准溶液 5：1.3 mL/瓶×1 瓶，乳蛋白含量为 67.5mg/L；
- m) 底物/发色剂：3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液，10 mL/瓶×1 瓶；
- n) 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，回收率应符合质量控制要求。
- 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℃）。未使用的微孔板孔，应与袋中的干燥剂一起，重新放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 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图 A.1。

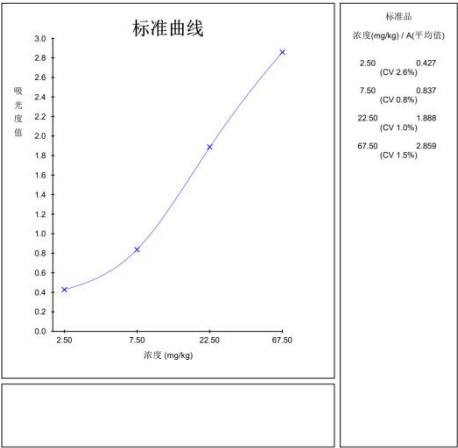


图 A.1 标准曲线谱图示例

附 录 B
(规范性)
乳致敏原免疫层析试剂盒

B.1 试剂盒组成

乳致敏原免疫层析试剂盒 bioavid Lateral Flow Milk 包括：

- a) 预包埋标记抗体的反应管：15 支；
- b) 乳致敏原快速检测条：15 支；
- c) 内含 8 mL 流动相（缓冲液）的滴瓶：1 支；
- d) 冻干阳性质控：1 份，使用时加入 1 mL 水复溶，涡旋混匀 5 min。
- e) 塑料吸管：带有 100 μ L 刻度线：15 支；
- f) 棉签拭子：16 支；
- g) 预装 1.2 mL PBS 的 PBS 小管：15 支
- h) 结果评估卡：1 个。

B.2 试剂盒验收和保存

- B.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。
 - B.2.2 未开封试剂盒保存在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C，使用前回复至室温（20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）。
 - B.2.3 不使用超过有效期的试剂盒。
-