ICS 67.050
CCS X 04

团 体 标 准

T/CIFST 021.4—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4部分：花生

Detection of food allergens in foods and during the food production process using immunoassay method
Part 4: Peanut

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 4 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。

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组建议用芝麻替代原“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 4 部分：花生

1 范围

本文件描述了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。

本文件中酶联免疫吸附法适用于各种食品及食品生产过程中的花生致敏原定量检测；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花生致敏原的定性检测。

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

花生 peanut

豆科植物落花生的种子，营养丰富，常被用作食品或饲料的原料。其果粒中高达 25 %的蛋白质成分在具营养价值的同时也具有致敏性。

第一法 酶联免疫吸附法

4 原理

标准溶液及试样中游离的花生致敏原被微孔中预先包被的特异性抗体捕获。加入过氧化物酶标记抗体后，形成酶标记抗体-抗原-抗体夹心复合物。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，花生致敏原含量与吸光度值成正比，可得出试样中花生致敏原含量。

5 试剂和材料

5.1 RIDASCREEN® Peanut [1] 花生致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒

应符合附录 A 的要求。

5.2 食品中花生致敏原提取试剂

5.2.1 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。

5.2.2 食品级脱脂奶粉（不含花生致敏原）。

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 0.01 g。
6.3 涡旋混匀仪。
6.4 冷冻离心机：转速不低于 4000 r/min，可实现温度不高于 4 ℃。
6.5 水浴锅：37℃，60℃。
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×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×洗涤缓冲液可贮于室温（20℃~25℃）条件下保存 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 20 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。
7.1.2 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 ℃~8 ℃ 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℃ 水浴中温育并摇晃混匀，直至结晶完全消失。

7.2 试样前处理和提取

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。

针对固态或半固态试样，称取 1.00 g 均质试样，加入 1.00 g 食品级脱脂奶粉（5.2.1），再加入 20 mL 预热至 60 ℃的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.2）。针对液态试样，量取 1mL 均质试样，加入 1.00 g 食品级脱脂奶粉（5.2.1），再加入 19 mL 预热至 60 ℃的 1×致敏原提取缓冲液（7.1.2）。盖紧后彻底混匀，然后置于 60 ℃ 水浴中孵育 10 min，孵育期间振荡几次试样管。用冰水快速冷却，再置冷冻离心机中于 4℃ 条件下以转速 4000 r/min 离心 10 min，取上清液进行检测，此时试样的稀释倍数为 20 倍。

7.3 加样和测定

1） RIDASCREEN® Peanut 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的使用者，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。

7.3.1 准备

将预先包被花生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 标准溶液 1~5 和试样，室温 （20 ℃~25 ℃）孵育 20 min。孵育结束后，弃去微孔中液体，每个微孔每次加入 250 μL 1×洗涤缓冲液洗涤（7.1.1）并在吸水纸上拍干，洗板 4 次。洗板结束后，每个微孔加入 100 μL 酶标记物，室温（20 ℃~25 ℃）孵育 20 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（7.1.1）洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 4 次。洗板结束后，每个微孔加入 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 ℃~25 ℃）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 2~5 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，绘制标准曲线，计算试样溶液中花生致敏原浓度（C）。

可以使用试剂盒配套分析软件 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花生致敏原含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C}{m \times 20} \times f \times V \qquad \cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中花生致敏原含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C——试样溶液中花生致敏原浓度，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）；

20——标准溶液浓度中包含的 20 倍稀释。

液态试样中花生致敏原含量按式（2）计算：

$$X = C \times f \qquad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中花生致敏原含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C——试样溶液中花生致敏原浓度，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 20 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 20 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。

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（20 mg/L）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

本方法对花生的检出限为 0.15 mg/kg（或 mg/L），定量限为 0.75 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，及试剂盒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

试样中的花生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 Peanut [2] 花生致敏原免疫层析检测试剂盒

应符合附录 B 的要求。

12.2 食品及食品原料中花生致敏原提取试剂

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。

2） bioavid Lateral Flow Peanut 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。

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 离心机：转速不低于 4000 r/min。
13.5 单道移液器：100 μL~1000 μL，500 μL~5000 μL。

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×10 cm 的待检测环境表面。若无法实现 10 cm×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 小管中的离心管中，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

称取 50.00 g 试样，向其中加入 450 mL 水，彻底均质。取部分均质好的试样置离心机中在室温（20℃~25 ℃）条件下以转速 4000 r/min 离心 2 min，取上清液用于检测。无离心条件时，可用粗滤纸过滤，得到滤清液用于检测。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，建议进行冷冻离心以去除脂肪。若为纯的坚果、含有谷物粉和/或含有增稠剂的固态样品、粘性较大的样品，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 试剂盒中的流动相缓冲液，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℃~25℃）孵育 5 min。向反应管中放入花生致敏原试纸条后反应 5 min，目测读取检测结果。

14.5 检测结果表述

试纸条反应区域有三条线，从上到小分别为：C 线-质控带，H 线-钩状效应带，T 线-检测带。
阴性结果：试纸条同时出现 C 线和 H 线，T 线未显色。
阳性结果：试纸条上 C 线、H 线、T 线均显色。
强阳性结果：试纸条上 C 线和 T 线同时显色，H 线消失，检测结果为强阳性结果。
疑似强阳性结果：试纸条上只有 C 线显色，T 线及 H 线均未显色，需要大比例稀释后再次检测。

15 质量控制

15.1 试剂失效

试纸条未出现蓝 C 线-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花生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

本方法对花生致敏原的检出限 ≤ 1 mg/kg（或 mg/L），对 CIP 生产线原位清洗水的检出限为 1 mg/L。

本方法对环境表面的拭子采样的检出限为 ≤ 2 μg/100 cm^2（当采样面积为 10 cm x 10 cm 时），或 2 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 注意事项/防污染措施

17.1 防污染措施

按照 10。

17.2 试样 pH 值

强酸性或强碱性试样应调节 pH 值至 7.5±0.5 后再检测。

附 录 A
（规范性）
花生致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

花生致敏原酶联免疫吸附检测试剂盒 RIDASCREEN® Peanut 包括：

a） 预包被花生特异性抗体的 96 孔可拆分微孔板：8×12 孔；
b） 酶标记物：11 mL/瓶×1 瓶；
c） 10×洗涤缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
d） 10×致敏原提取缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1 瓶；
e） 标准溶液 1：1.3 mL/瓶×1 瓶，花生含量为 0.0 mg/L；
f） 标准溶液 2：1.3 mL/瓶×1 瓶，花生含量为 0.75 mg/L；
g） 标准溶液 3：1.3 mL/瓶×1 瓶，花生含量为 1.5 mg/L；
h） 标准溶液 4：1.3 mL/瓶×1 瓶，花生含量为 3.0 mg/L；
i） 标准溶液 5：1.3 mL/瓶×1 瓶，花生含量为 6.0 mg/L；
j） 底物/发色剂：3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液，13 mL/瓶×1 瓶；
k） 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 ℃）。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。

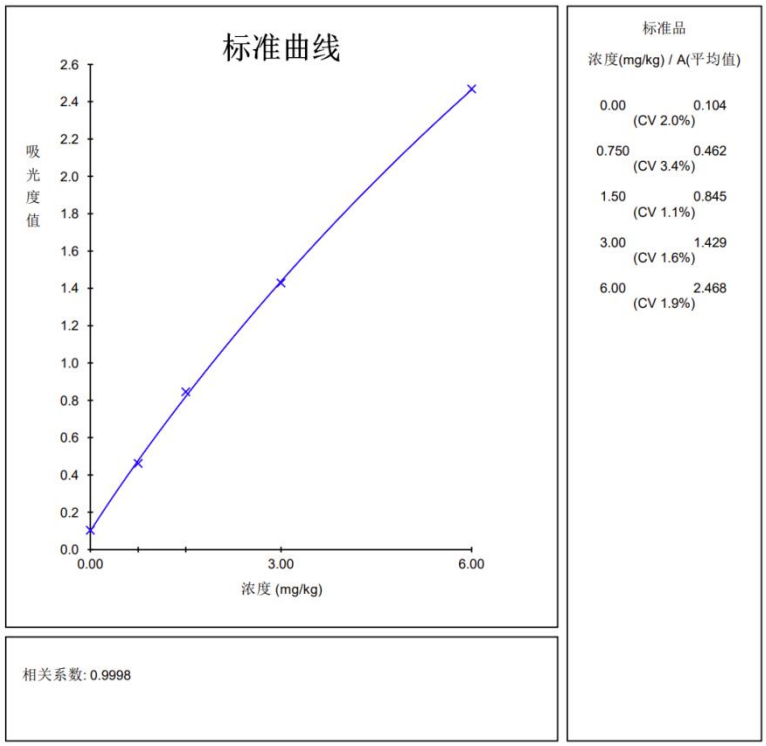

图 A.1 标准曲线谱图示例

附 录 B
（规范性）
花生致敏原免疫层析检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

花生致敏原免疫层析检测试剂盒 bioavid Lateral Flow Peanut 包括：

a） 预包埋标记抗体的反应管：15 支；
b） 花生致敏原快速检测条：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 μL 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 ℃~8 ℃ ，使用前回复至室温（20 ℃~25 ℃）。
B.2.3 不使用超过有效期的试剂盒。