

ICS 号:

CCS 号:

团 体 标 准

T/CIFST XXX.1—XXXX

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

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国食品科学技术学会 发布

前 言

T/CIFST XXX《食品及食品生产过程中食品致敏原的免疫分析检测方法》由下列 17 部分组成：

- 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
- 第 6 部分：乳
- 第 7 部分：酪蛋白
- 第 8 部分： β -乳球蛋白
- 第 9 部分：扁桃仁
- 第 10 部分：腰果
- 第 11 部分：榛子
- 第 12 部分：巴西坚果
- 第 13 部分：椰子
- 第 14 部分：夏威夷果
- 第 15 部分：开心果
- 第 16 部分：核桃
- 第 17 部分：芝麻

本文件为 T/CIFST XXX 的第 1 部分。

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。

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：

本文件主要起草人：

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

本文件规定了食品及食品生产过程中麸质致敏原的酶联免疫吸附和免疫层析测定方法。

本文件适用于食品中麸质致敏原的酶联免疫吸附定量检测和免疫层析定性检测，也适用于食品生产过程中监控麸质致敏原时对食品试样、环境采样及CIP清洁水进行的定量或定性检测。夹心酶联免疫吸附法适用于未经发酵或水解的食品检测，竞争酶联免疫吸附法适用于经过发酵或水解的食品检测，免疫层析法适用于食品、环境采样及CIP清洁水试样检测。

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）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

麸质 gluten

麸质是小麦、黑麦、大麦、燕麦等粮谷或其杂交品种籽粒中含有的一类蛋白质，可引起敏感人群不耐受反应，不溶于水和0.5 mol/L 的NaCl溶液。麸质是粮谷籽粒中主要的贮藏蛋白，约占总蛋白含量80%。

注：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 118-1979 的要求，是可由各国自行定义和决定的。

3.2

R5 Mendez 方法 R5 Mendez method

国际食品法典委员会颁布的《食品法典》，CODEX STAN 118规定，R5 Mendez方法是麸质检测的第一类方法。此方法中的试样提取缓冲液为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谷蛋白与微孔中预先包被的R5单克隆抗体结合，形成抗原-抗体复合物，洗板后加入酶标记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，醇溶谷蛋白含量与吸光度值成正比，可得出试样中醇溶谷蛋白含量试样。试样中麸质的含量与醇溶谷蛋白含量约为两倍关系。

5 试剂和材料

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

见附录A。

5.2 食品中醇溶谷蛋白提取试剂

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（不含醇溶谷蛋白）。

5.2.2 80% 乙醇溶液：量取 80 mL 无水乙醇与 20 mL 水混合。

5.2.3 Cocktail 提取缓冲液，见附录 D。

6 仪器和设备

6.1 酶标仪：450 nm。

6.2 分析天平：感量为 0.01 g。

6.3 涡旋混匀仪。

6.4 微孔板振荡器。

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

6.6 八道移液器：30 µL~300 µL。

6.7 水浴锅：37℃，60℃，100℃。

6.8 离心机：转速不低于 4000 r/min。

7 分析步骤

7.1 试剂配制

配制试剂前，将附录 A 中所有试剂回复至室温（20℃~25℃），使用完尽快放回 2℃~8℃，不可冷冻。未使用的微孔板孔，必须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。

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标准的使用者，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，则可使用这些等效的产品。

7.1.1 1×稀释缓冲液：按照 1:5 比例稀释 5×稀释缓冲液浓缩液（用水见附录 A），临用现配。如移取 1 mL 5×稀释缓冲液浓缩液（见附录 A），加 4 mL 水稀释混匀。一般情况下，1 个试样需约 1.5 mL 1×稀释缓冲液。

7.1.2 1×洗涤缓冲液：按照 1:10 比例稀释 10×洗涤缓冲液浓缩液（用水见附录 A），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（见附录 A），加 90 mL 水稀释混匀。1 条微孔需约 15 mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

7.1.3 1×酶标记物：按照 1:11 比例稀释 11×酶标记物浓缩液（用水见附录 A），临用现配。如移取 100 μL 11×酶标记物浓缩液（见附录 A），加 1 mL 水稀释混匀，可供 1 条微孔反应应用。

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。

7.2.1 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 7.2.5 进一步处理试样。

7.2.2 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 7.2.5 进一步处理试样。

7.2.3 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 7.2.5 进一步处理试样。

7.2.4 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 7.2.5 进一步处理试样。

7.2.5 将经过 7.2.1/7.2.2/7.2.3/7.2.4 处理后的试样于 50℃ 水浴加热 40 分钟。快速冷却试样，加入 7.5 mL 80% 乙醇（5.2.2）（针对燕麦试样加入 30 mL 80% 乙醇）。在室温（20℃~25℃）条件下，上下颠倒/旋转振荡 1h。在室温（20℃~25℃）条件，以转速 4000 r/min 离心 10 min 或过滤，收集上清液或滤液。将上清液或滤液用 1×稀释缓冲液（7.1.1）按比例 1:12.5（如移取 80 μL 提取物上清液/滤液，加 920 μL 1×稀释缓冲液（7.1.1）稀释混匀）继续稀释。至此试样的稀释倍数累计为 500 倍。

7.3 测定

将预先包被 R5 单克隆抗体的微孔（见附录 A）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。

在为空中平行加入 100 μL 标准溶液 1~6（见附录 A）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（见附录 A）和 50 μL 发色剂（见附录 A），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（见附录 A），轻轻地水平摇动微孔板使其反应完全，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谷蛋白浓度（C）。

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

7.5 测定结果表述

固态试样中醇溶谷蛋白含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C}{m \times 1000} \times f \times V \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X ——试样中醇溶谷蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ——试样溶液中醇溶谷蛋白浓度，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。

注意：1. 试样稀释倍数 f 应为 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，也需要考虑进去。

2. 计算结果保留小数点后两位有效数字。

液态试样中醇溶谷蛋白含量按式（2）计算：

$$X = C \times f / 1000 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X ——试样中醇溶谷蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C ——试样溶液中醇溶谷蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

f ——试样稀释倍数；

1000——单位换算系数。

注意：1. 按照本标准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，也要考虑进去。

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

$$Y = X \times 2 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中：

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

注：1. 食品加工工艺对试样中醇溶谷蛋白含量、以及醇溶谷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谷蛋白约占麸质 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。进行麸质含量换算时，应充分评估食品加工工艺对换算系数的影响。

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

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

10 注意事项/防污染措施

10.1 防污染措施

- 10.1.1 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）污染应尽量在独立的房间或使用通风橱进行试样均质的前处理操作。
- 10.1.2 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。
- 10.1.3 在实验过程中必须戴手套操作，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谷蛋白与微孔中预先包被的水解醇溶谷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，醇溶谷蛋白含量与吸光度值成反比，可得出试样中醇溶谷蛋白含量。试样中麸质的含量与醇溶谷蛋白含量约为两倍关系。

12 试剂和材料

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

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标准的使用者，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，则可使用这些等效的产品。

见附录 B。

12.2 发酵食品中醇溶谷蛋白提取试剂

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 60% 乙醇溶液：量取 60 mL 无水乙醇与 40 mL 水混合。

12.2.2 鱼明胶：来源于冷水鱼类的皮肤，含量 40~50%。

12.2.3 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

配制试剂前，将附录 B 中所有试剂回复至室温（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，必须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。

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（用水见附录 B），临用现配。如移取 1 mL 5×稀释缓冲液浓缩液（见附录 B），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（用水见附录 B），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（见附录 B），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（用水见附录 B），现配现用。如移取 100 μL 11×酶标记物浓缩液（见附录 B），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，混匀后用 1 mol/L 氢氧化钠（12.2.3）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

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。

14.2.1 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（12.2.1）。按照 14.2.5 进一步处理试样。

14.2.2 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 14.2.5 进一步处理试样。

14.2.3 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（12.2.1）。按照 14.2.5 进一步处理试样。

14.2.4 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 14.2.5 进一步处理试样。

14.2.5 将 14.2.1/14.2.2/14.2.3/14.2.4 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。必要时可用滤纸过滤上清液，进一步得到滤清液用于检测。将上清液或滤液用 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 测定

将预先包被水解醇溶谷蛋白的微孔（见附录 B）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。

在微孔中平行加入 50 μL 标准溶液 1~5（见附录 B）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 4 次。洗板结束后，每个微孔中加入 100 μL 底物/发色剂（见附录 B），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（见附录 B），轻轻地水平摇动微孔板使其反应完全，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谷蛋白浓度（C）。

醇溶谷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 —— 醇溶谷蛋白标准溶液或试样溶液的平均吸光度值；

S₀ —— 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 中 cubic spline 模式进行标准曲线绘制和测定结果计算。

14.5 测定结果表述

固态试样中醇溶谷蛋白含量按式（5）计算：

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

式中：

X —— 试样中醇溶谷蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C —— 试样溶液中醇溶谷蛋白浓度，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 g；

1000 —— 单位换算系数。

注意：按照本标准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，也需要考虑进去。

液态试样中的醇溶谷蛋白含量按式（6）计算：

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

式中：

X —— 试样中醇溶谷蛋白含量，单位为毫克每升（mg/L）；

C —— 试样溶液中醇溶谷蛋白浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

f —— 试样稀释倍数；

1000——单位换算系数。

注意：按照本标准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，也需要考虑进去。

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）

- 注：1. 食品加工工艺对试样中醇溶谷蛋白含量、以及醇溶谷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谷蛋白约占麸质 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。进行麸质含量换算时，应充分评估食品加工工艺对换算系数的影响。
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

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

17 注意事项/防污染措施

防污染措施按照 10.1。

第三法 免疫层析法

18 原理

试样中的醇溶谷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。试样中醇溶谷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谷蛋白含量约为两倍关系。

19 试剂和材料

19.1 RIDA®QUICK Gliadin³醇溶谷蛋白免疫层析试剂盒

见附录 C。

19.2 食品及食品原料中醇溶谷蛋白提取试剂

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（不含醇溶谷蛋白）。

19.2.2 60% 乙醇溶液：量取 60 mL 无水乙醇与 40 mL 水混合。

19.2.3 80% 乙醇溶液：量取 80 mL 无水乙醇与 20 mL 水混合。

19.2.4 Cocktail 提取缓冲液，见附录 D。

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（见附录 C）吸取 500 μ L 试样稀释缓冲液（见附录 C）加入到一次性试管（见附录 C）中。

21.1.2 用干燥的试纸条（见附录 C）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（见附录 C），立即读取检测结果。

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标准的使用者，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，则可使用这些等效的产品。

22.2 清洁用水的检测

22.2.1 不含有洗涤剂的清洁用水：使用一次性滴管（见附录 C）吸取 250 μL 试样稀释缓冲液（见附录 C）到一次性试管（见附录 C）中，再加入 250 μL 待测清洁用水试样，均匀混合，按照 21.1.3 和 21.1.4 进行检测。

22.2.2 含有洗涤剂的清洁用水：使用一次性滴管（见附录 C）吸取 500 μL 试样稀释缓冲液（见附录 C）到一次性试管（见附录 C）中，再加入 50 μL 待测清洁用水试样，均匀混合，按照 21.1.3 和 21.1.4 进行检测。

注：含有次氯酸盐的清洁用水不适用于本方法。

21.3 食品试样前处理和提取

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。

21.3.1 未经加工的食品

21.3.1.1 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（19.2.2），按照 21.3.1.3 进一步处理试样。

21.3.1.2 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（19.2.2）。按照 21.3.1.3 进一步处理试样。

21.3.1.3 将经过 21.3.1.1 或 21.3.1.2 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℃~25℃）条件下离心 10 min 或过滤，取上清液或滤液用于检测。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 加工过的食品

21.3.2.1 按照 7.2.1、7.2.2、7.2.3、7.2.4 进行试样处理后，再按照 21.3.2.2 进一步处理试样。

21.3.2.2 将经过 7.2.1、7.2.2、7.2.3、7.2.4 处理后的试样于 50℃ 水浴加热 40 min。冷却试样，加入 7.5 mL 80% 乙醇（19.2.3）（针对燕麦试样则加入 30 mL 80% 的乙醇）。在室温（20℃~25℃）条件上下颠倒/旋转振荡 1 h。以转速 4000 r/min 在室温（20℃~25℃）条件离心 10 min 或过滤，取提取物上清液/滤液用于检测。

21.4 食品试样的检测

使用一次性滴管（见附录 C）吸取 500 μL 试样稀释缓冲液（见附录 C）到一次性试管（见附录 C）中，取 50 μL 从 21.3.1.3 和 21.3.2.2 得到的提取物上清液/滤液到试管中，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谷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

本方法对醇溶谷蛋白的检出限为：环境拭子 $1.5\ \mu\text{g}/100\ \text{cm}^2$ ，不含有洗涤剂的清洁用水 5ng/mL ，含有洗涤剂的清洁用水 $50\ \text{ng/mL}$ ，未经加工的食品原料 $2.2\ \text{mg/kg (L)}$ ，加工过的食品原料和食品 $3.2\ \text{mg/kg (L)}$ 。

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

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清洁水试样中的麸质。

25 注意事项/防污染措施

防污染措施按照 10.1。

附录 A

(规范性)

醇溶谷蛋白夹心酶联免疫吸附检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

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

- a) 预包被醇溶谷蛋白 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, 醇溶谷蛋白含量为 0 ng/mL;
- f) 标准溶液 2 (Std 2): 1.3 mL/瓶×1 瓶, 醇溶谷蛋白含量为 5 ng/mL;
- g) 标准溶液 3 (Std 3): 1.3 mL/瓶×1 瓶, 醇溶谷蛋白含量为 10 ng/mL;
- h) 标准溶液 4 (Std 4): 1.3 mL/瓶×1 瓶, 醇溶谷蛋白含量为 20 ng/mL;
- i) 标准溶液 5 (Std 5): 1.3 mL/瓶×1 瓶, 醇溶谷蛋白含量为 40 ng/mL;
- j) 标准溶液 6 (Std 6): 1.3 mL/瓶×1 瓶, 醇溶谷蛋白含量为 80 ng/mL;
- k) 底物: 7 mL/瓶×1 瓶;
- l) 发色剂: 7 mL/瓶×1 瓶;
- m) 终止液: 14 mL/瓶×1 瓶。

A.2 试剂盒验收和保存

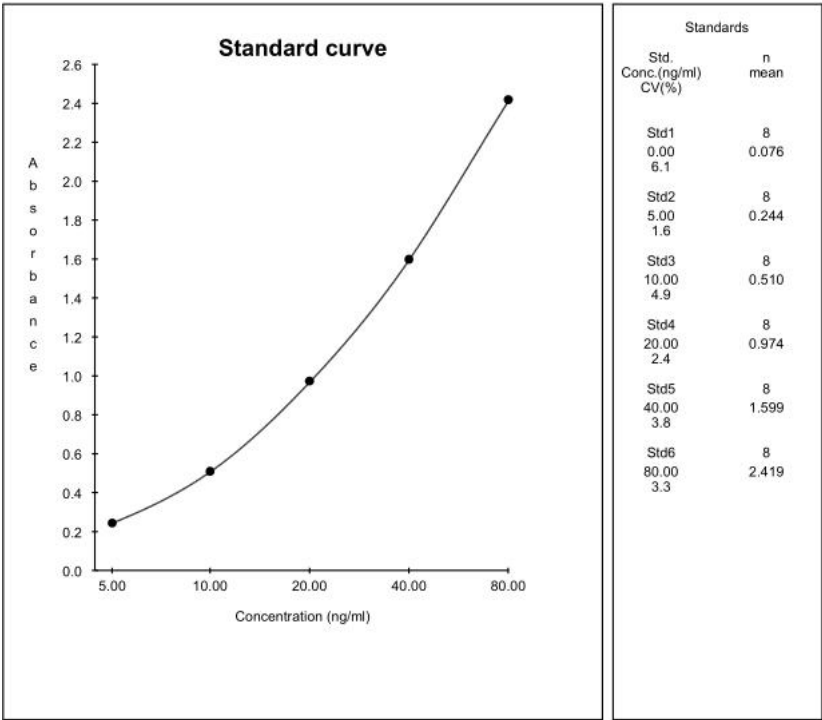
- A.2.1 每个批号试剂盒应进行回收率测试的验收试验, 回收率符合质量控制要求。
- A.2.2 试剂盒于 2℃~8℃ 黑暗处避光保存, 使用前回复至室温 (20℃~25℃)。
- A.2.3 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- A.2.4 超过有效期的试剂盒不得使用。

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谷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)

醇溶谷蛋白竞争酶联免疫吸附检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

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

- a) 预包被水解醇溶谷蛋白的 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，水解醇溶谷蛋白含量为 0 ng/mL；
- f) 标准溶液 2 (Std 2)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶谷蛋白含量为 10 ng/mL；
- g) 标准溶液 3 (Std 3)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶谷蛋白含量为 30 ng/mL；
- h) 标准溶液 4 (Std 4)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶谷蛋白含量为 90 ng/mL；
- i) 标准溶液 5 (Std 5)：1.3 mL/瓶×1 瓶，水解醇溶谷蛋白含量为 270 ng/mL；
- j) 底物/发色剂：10 mL/瓶×1 瓶；
- k) 终止液：14 mL/瓶×1 瓶。

B.2 试剂盒验收和保存

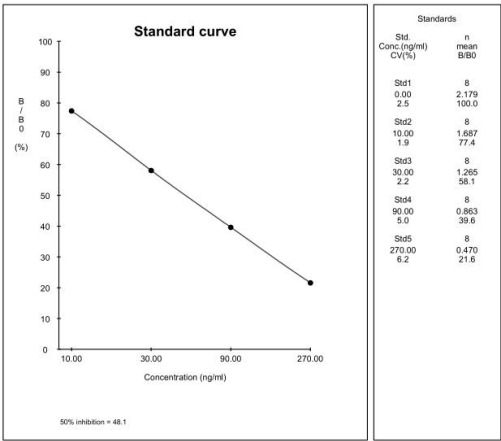
- B.2.1 每个批号试剂盒应进行回收率测试的验收试验，回收率符合质量控制要求。
- B.2.2 试剂盒于2℃~8℃黑暗处避光保存，使用前回复至室温（20℃~25℃）。
- B.2.3 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- B.2.4 超过有效期的试剂盒不得使用。

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谷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。



图B.1 标准曲线谱图示例

附录 C

(规范性)

醇溶谷蛋白免疫层析试剂盒

C.1 试剂盒组成

醇溶谷蛋白免疫层析试剂盒 RIDA[®]QUICK Gliadin 包括:

- a) 预包被醇溶谷蛋白 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 超过有效期的试剂盒不得使用。

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 118-2008 中 5.2 明确指定的 R5 Mendez 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谷蛋白，于2003年被Valdes等研发，于2005年被Mendez等改进。

D.2 试剂安全

Cocktail 提取缓冲液中含有氰胍和巯基乙醇，因此建议在通风橱内使用 Cocktail 提取缓冲液，同时避免皮肤直接接触。
