

团 体 标 准

T/SDNY 038—2022

蔬菜中毒死蜱、克百威和阿维菌素快速检测 胶体金免疫层析法

Rapid detection of chlorpyrifos benfuracarb and abamectin in vegetables
Colloidal gold immunochromatography method

2022-09-28 发布

2022-11-01 实施

山东省农药行业协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 第一法检测卡（试纸条）法	1
4.1 原理	1
4.2 试剂或材料	1
4.3 仪器和设备	2
4.4 分析步骤	2
4.5 结果判定	3
5 第二法 光热读卡仪法	5
5.1 原理	5
5.2 试剂与材料	5
5.3 仪器和设备	5
5.4 分析步骤	5
5.5 试样提取	5
5.6 测定	5
5.7 质控试验	5
5.8 结果的表述计算	5
6 性能指标	6
6.1 检出限	6
6.2 灵敏度	6
6.3 特异性	6
6.4 假阴性率	6
6.5 假阳性率	6
7 其它	6
附录 A（资料性） 3 种农药中英文名称、CAS 号及分子式信息	7
附录 B（资料性） 快速检测方法性能指标计算方法	8
附录 C（资料性） T 值结果	9

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。

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。

本文件由山东省农药检定所提出。

本文件由山东省农药行业协会归口。

本文件起草单位：山东省农药检定所、山东师范大学、山东省现代农业化学产业技术研究院、莱西市检验检测中心。

本文件主要起草人：周力、王恬、张耀中、张鸿雁、吴新、王凯菲、韩帅兵、于淼、邢冰寒、薛雯、马和庆、王海燕、宿培萌、赵富豪、马明、吕焕焕、宋朋。

本标准首次发布日期：2022年9月28日

蔬菜中毒死蜱、克百威和阿维菌素快速检测 胶体金免疫层析法

1 范围

本文件规定了蔬菜中毒死蜱、克百威、阿维菌素胶体金免疫层析法。
本文件适用于韭菜、芹菜、豇豆、姜等蔬菜中毒死蜱、克百威、阿维菌素的快速测定。

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 2763 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 第一法检测卡（试纸条）法

4.1 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的毒死蜱、克百威、阿维菌素与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制了抗体和检测卡中检测线（T线）上抗原的结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线（T线）与控制线（C线）颜色深浅比较，对样品中待测组分进行定性判定。

4.2 试剂或材料

4.2.1 试剂

- 4.2.1.1 甲醇（ CH_3OH ，CAS 号：65-56-1）。
- 4.2.1.2 氯化钠（ NaCl ，CAS 号：7647-14-5）。
- 4.2.1.3 氯化钾（ KCl ，CAS 号：7447-40-7）。
- 4.2.1.4 磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ，CAS 号：7778-77-0）。
- 4.2.1.5 十二水合磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，CAS 号：10039-32-4）。
- 4.2.1.6 水（ H_2O ，CAS 号：7732-18-5，GB/T 6682，三级）。

4.2.2 标准品

毒死蜱、克百威、阿维菌素标准品：纯度 $\geq 95\%$ ，化合物中英文名称及 CAS 号等信息参照附录 A。

4.2.3 溶液配制

4.2.3.1 磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH=7.4): 分别称取 16.0 g 氯化钠、0.4 g 氯化钾、0.4 g 磷酸二氢钾、5.8 g 十二水合磷酸氢二钠, 于 1000 mL 烧杯中, 加水充分搅拌溶解后, 转移定容至 1000mL。

4.2.3.2 甲醇磷酸盐 (1+9) 溶液: 准确量取 10 mL 甲醇, 加入 90 mL 磷酸盐缓冲液 (4.2.3.1) 中, 混匀。

4.2.4 标准溶液配制

4.2.4.1 标准储备液 (1000 mg/L): 准确称取毒死蜱、克百威、阿维菌素标准品各约 10 mg (精确至 0.1 mg), 用甲醇溶解, 定容至 10 mL, 避光-18°C 及以下条件保存, 有效期 12 个月。

4.2.4.2 标准中间液 (10 mg/L): 准确吸取一定量标准储备溶液 (4.2.4.1), 用甲醇稀释, 定容至 10 mL, 避光-18°C 及以下条件保存, 有效期 1 个月。

4.2.4.3 标准工作液 (1mg/L): 准确吸取一定量标准中间液 (4.2.4.2), 用甲醇稀释, 定容至 10 mL, 0°C ~5°C 冷藏避光保存, 有效期 2~3 周。

4.2.5 材料

4.2.5.1 毒死蜱胶体金免疫层析检测卡 (条)。

4.2.5.2 克百威胶体金免疫层析检测卡 (条)。

4.2.5.3 阿维菌素胶体金免疫层析检测卡 (条)。

4.3 仪器和设备

4.3.1 电子天平: 感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

4.3.2 组织粉碎机。

4.3.3 涡旋混合器。

4.3.4 移液器: 量程分别为 100 μ L、200 μ L、1 mL 和 5 mL。

4.3.5 离心机: 转速 \geq 4000 r/min。

4.4 分析步骤

4.4.1 试样制备

蔬菜样品取样部位按GB 2763的规定执行, 将适量 (约200 g) 待测样品切碎混匀均一化制成匀浆, -18°C及以下条件保存。

4.4.2 试样提取

4.4.2.1 韭菜、豇豆和姜

准确称取制备后试样2 g(精确至0.01 g)于15 mL离心管中, 加入5 mL甲醇磷酸盐(1+9)溶液(4.2.3.2), 涡旋振荡1 min, 4000 r/min室温离心2 min, 取上清液即为待测液。

4.4.2.2 芹菜

准确称取制备后试样2 g(精确至0.01 g)于15 mL离心管中, 加入5 mL甲醇磷酸盐(1+9)溶液(4.2.3.2), 涡旋振荡1 min, 4000 r/min室温离心2 min, 取上清液即为待测液, 用于阿维菌素和克百威检测。取5mL离心管, 移取上述上清液1.0mL, 加入1.0mL甲醇磷酸盐 (1+9) 溶液 (4.2.3.2), 混匀即为待测液, 用于毒死蜱检测。

4.4.3 测定

吸取120 μL 上述待测液于金标微孔中，上下抽吸5~8次至微孔的颗粒完全溶解，室温孵育3min~5min。将试纸条插入金标微孔中反应8 min。从微孔中取出试纸条，去掉试纸条下端的样品垫，观察显色情况，进行结果判定。

4.4.4 质控试验

4.4.4.1 试验要求

每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。

4.4.4.2 空白试验

称取空白试样，按照4.4.2和4.2.3步骤与样品同法操作。

4.4.4.3 加标质控试验

4.4.4.3.1 毒死蜱加标质控试验

准确称取空白试样2 g(精确至0.01g)置于15 mL离心管中，加入100 μL 毒死蜱标准工作液(4.2.4.3)，使芹菜基质中毒死蜱浓度为0.05 mg/kg，加入40 μL 毒死蜱标准工作液(5.4.3)，使韭菜、豇豆、姜基质中毒死蜱浓度为0.02 mg/kg，充分混合静置30 min，按照4.4.2和4.4.3步骤与样品同法操作。

4.4.4.3.2 克百威加标质控试验

准确称取空白试样2 g(精确至0.01 g)置于15 mL离心管中，加入40 μL 克百威标准工作液(4.2.4.3)，使克百威浓度为0.02 mg/kg，充分混合静置30 min，按照4.4.2和4.4.3步骤与样品同法操作。

4.4.4.3.3 阿维菌素加标质控试验

准确称取空白试样2 g(精确至0.01 g)置于15 mL离心管中，加入100 μL 阿维菌素标准工作液(4.2.4.3)，使阿维菌素浓度为0.05 mg/kg，充分混合静置30 min，按照4.4.2和4.4.3步骤与样品同法操作。

4.5 结果判定

4.5.1 目视比色法

4.5.1.1 方法提要

通过对比控制线(C线)和检测线(T线)的颜色深浅进行结果判定。目视结果示意图见图1。

4.5.1.2 无效结果

控制线(C线)不显色，无论检测线(T线)是否显色，均表示实验结果无效。

4.5.1.3 阳性结果

控制线(C线)显色，若检测线(T线)不显色或颜色浅于控制线(C线)表示试样中含有毒死蜱、克百威或阿维菌素，且其含量高于方法检出限，判定为阳性。

4.5.1.4 阴性结果

控制线(C线)显色，若检测线(T线)颜色深于或等于控制线(C线)表示试样中不含毒死蜱、克百威、阿维菌素，或其含量低于方法检出限，判定为阴性。

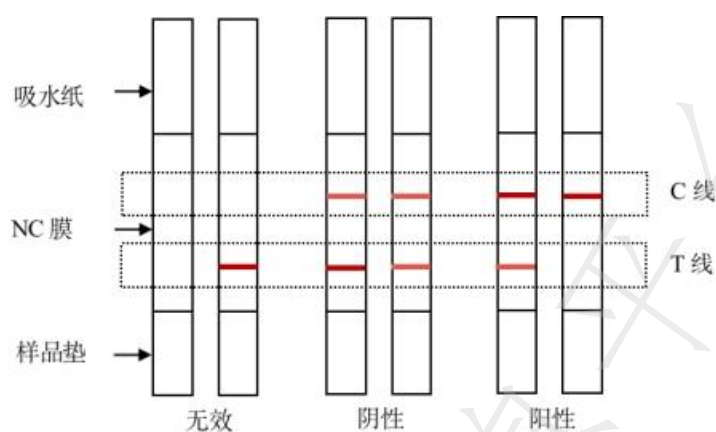


图1 目视判定示意图（目视法）

4.5.2 目视消线法

4.5.2.1 方法提要

通过对比控制线（C线）和检测线（T线）的颜色有无进行结果表示。目视结果示意图见图2。

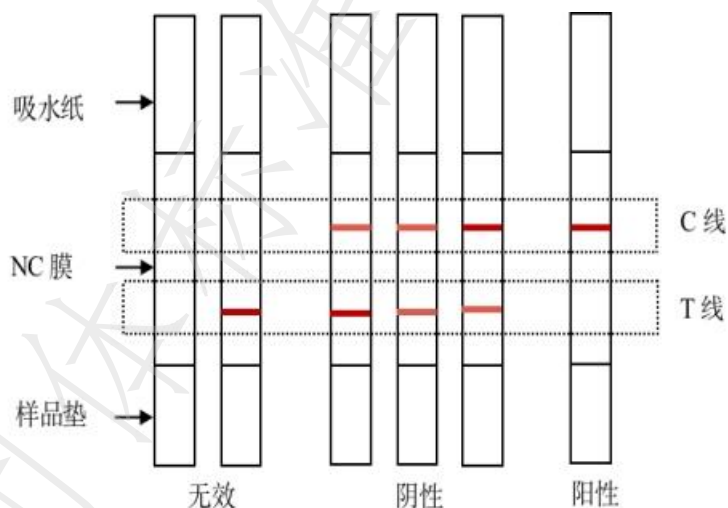


图2 目视判定示意图（消线法）

4.5.2.2 无效结果

控制线（C线）不显色，无论检测线（T线）是否显色，均表示实验结果无效。

4.5.2.3 阳性结果

控制线（C线）显色，检测线（T线）不显色，表示试样中含有毒死蜱、克百威或阿维菌素且其含量高于方法检出限，判定为阳性。

4.5.2.4 阴性结果

控制线（C线）和检测线（T线）均显色，表示试样中不含毒死蜱、克百威、阿维菌素或其含量低

于方法检出限，判定为阴性。

4.5.3 质控试验结果

空白试验测定结果应为阴性，加标质控试验测定结果应为阳性。否则表示不满足质控实验要求，该批样品结果无效。

5 第二法 光热读卡仪法

5.1 原理

本方法采用胶体金光热效应原理。样品中的毒死蜱、克百威、阿维菌素与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制了抗体和检测卡中检测线（T线）上抗原的结合，胶体金在532 nm的激光照射下，表面等离子体共振效应，将吸收的光能转化成热能，从而使温度升高。通过检测线（T线）与控制线（C线）的温度变化比较，对样品中的待测组分进行定性判定。

5.2 试剂与材料

同4.2。

5.3 仪器和设备

5.3.1 光热读卡仪：波长 532 nm。

5.3.2 除光热读卡仪外，其他仪器设备同 4.3。

5.4 分析步骤

5.4.1 试样制备

同4.4.1。

5.5 试样提取

同4.4.2。

5.6 测定

吸取120 μL上述待测液于金标微孔中，上下抽吸5~8次至微孔的颗粒完全溶解，室温孵育3 min~5 min，将试纸条插入金标微孔中反应8 min，从微孔中取出试纸条，去掉试纸条下端样品垫，将试纸条置入光热读卡仪，将检测线（T线）与控制线（C线）置于532 nm激光下照射50 s，测定检测线（T线）与控制线（C线）的温度变化值。

5.7 质控试验

同4.4.4。

5.8 结果的表述计算

5.8.1 结果计算

见式（1）。

$$T = \Delta T - \Delta C \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ΔT ——T 线在激光照射前后温度的变化值；

ΔC ——C 线在激光照射前后温度的变化值。

5.8.2 结果判定

当T值小于附表A.3 对应T线值时，表示试样中含有毒死蜱、克百威或阿维菌素且其含量高于方法检出限，判定为阳性，阳性结果的试样需要重复检验2次以上；当T值大于附表A.3对应T线值时，表示试样中不含毒死蜱、克百威或阿维菌素或其含量低于方法检出限，判定为阴性。

5.8.3 质控试验结果

空白试验测定结果应为阴性，加标质控试验测定结果应为阳性。否则表示不满足质控实验要求，该批样品结果无效。

6 性能指标

6.1 检出限

毒死蜱在芹菜中检出限为0.05 mg/kg，在韭菜、豇豆、姜中为0.02 mg/kg；克百威在四种蔬菜中检出限为0.02 mg/kg；阿维菌素在四种蔬菜中检出限为0.05 mg/kg。

6.2 灵敏度

应不小于95%。

6.3 特异性

应不小于95%。

6.4 假阴性率

应不大于5%。

6.5 假阳性率

应不大于5%。

7 其它

当检测结果为阳性时，应使用GB 2763规定方法对结果进行确认。

本方法为使用者提供快速检测依据，使用者在使用生产厂家提供的配套试剂、材料和分析步骤时，应对其进行验证，满足本方法规定的各项性能指标。

附录 A

(资料性)

3 种农药中英文名称、CAS 号及分子式信息

3种农药中英文名称、CAS号及分子式信息见表A.1。

表 A.1 3 种农药中英文名称、CAS 号及分子式信息

序号	农药中文名称	农药英文名称	CAS号	分子式
1	毒死蜱	Chlorpyrifos	2921-88-2	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$
2	克百威	Carbofuran	1563-66-2	$C_{12}H_{13}NO_3$
3	阿维菌素	Abamectin	71754-41-2	$C_{48}H_{72}O_{14}$

附录 B

(资料性)

快速检测方法性能指标计算方法

快速检测方法性能指标计算方法见表B.1。

表 B.1 快速检测方法性能指标计算方法

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	N11	N12	N1.=N11+N12
阴性	N21	N22	N2.=N21+N22
总数	N.1=N11+N12	N.2=N21+N22	N=N1.+N2.或 N.1+N.2
显著性差异 (χ^2)	$\chi^2 = (N12-N21 -1)^2 / (N12+N21)$, 自由度 (df) =1		
灵敏度 (p+, %)	p+=N11/N1.		
特异性 (p-, %)	p-=N22/N2.		
假阴性率 (pf-, %)	pf-=N12/N1.=100-灵敏度		
假阳性率 (pf+, %)	pf+=N21/N2.=100-特异性		
相对准确度, % ^{c,d}	(N11+N22) / (N1.+N2.)		
^a 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果; ^b 由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。N: 任何特定单元的结果数, 第一个下标指行, 第二个下标指列。例如: N11 表示第一行, 第一列, N1. 表示所有的第一行, N.2 表示所有的第二列; N12 表示第一行, 第二列。 ^c 为方法的检测结果相对准确性的结果, 与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。			

附录 C
(资料性)
T 值结果

T值结果见表C.1。

表 C.1 T 值结果

序号	基质	农药中文名称	T 值线
1	芹菜	毒死蜱	0
2		克百威	-0.8
3		阿维菌素	0.1
4	姜	毒死蜱	-0.12
5		克百威	-2.8
6		阿维菌素	-0.2
7	豇豆	毒死蜱	0.2
8		克百威	-2.8
9		阿维菌素	-0.9
10	韭菜	毒死蜱	0.15
11		克百威	0
12		阿维菌素	0