

团 体 标 准

T/SATA 046—2023

蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 胶体金免疫层析法

Rapid detection of isofenphos-methyl residues in vegetables and fruits
— colloidal gold immunochromatography

2023 - 04 - 18 发布

2023 - 05 - 18 实施

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 原理	1
5 试剂与材料	1
5.1 试剂	1
5.2 试剂配制	2
5.3 标准物质	2
5.4 标准溶液配制	2
5.5 材料	2
6 仪器与设备	2
7 环境条件	2
8 分析步骤	2
8.1 试样制备	3
8.2 试样提取	3
8.3 测定步骤	3
8.4 质控试验	3
8.4.1 空白试验	3
8.4.2 加标质控试验	3
9 结果判定	4
9.1 目视判定	4
9.2 目视判定示意图	4
9.2.1 无效结果	4
9.2.2 阴性结果	4
9.2.3 阳性结果	4
9.3 质控试验结果	4
10 结果确认	4
11 性能指标	4
12 其他	5
附 录 A （规范性） 快速检测方法性能指标计算表	6

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。

本文件由深圳市分析测试协会提出。

本文件由深圳市分析测试协会归口。

本文件起草单位：深圳市易瑞生物技术股份有限公司、深圳海关食品检验检疫技术中心、深圳市检验检疫科学研究院、广东省食品检验所、华南农业大学。

本文件主要起草人：王炳志、刘海虹、廖俊佳、王水树、朱茵茵、麦焯聪、严义勇、林泳欣、靳保辉、万志刚、徐振林、黄永健、胡安淇、杨星星、莫秋华、朱晓芳。

蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 胶体金免疫层析法

1 范围

本文件规定了蔬菜和水果中甲基异柳磷残留的胶体金免疫层析快速检测方法。

本文件适用于鳞茎类蔬菜、芸薹属类蔬菜、叶菜类蔬菜、茄果类蔬菜、瓜类蔬菜、豆类蔬菜、茎类蔬菜、根茎类和薯芋类蔬菜(甘薯除外)、甘薯、水生类蔬菜、芽菜类蔬菜和其他类蔬菜、柑橘类水果、仁果类水果、核果类水果、浆果和其他小型类水果、热带和亚热带类水果、瓜果类水果的快速定性测定。

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

快速检测方法 rapid detection method

具有满足用户需求、减少分析时间、易于操作或者可以自动操作、小型化、降低检测成本等优势的方法。

3.2

参比方法 reference method

经过系统研究,清楚而严密的描述所需条件和程序,用于对物质一种或多种特征值进行测量的方法。

注:该方法已经证明具有与预期用途相称的准确度及其他性能。原则上参比方法应为法定检验方法。

3.3

定性分析 qualitative analysis

根据物质的化学性质、生物性质或物理性质对其进行鉴定的分析方法。

4 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的甲基异柳磷经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制了抗体和试纸条中检测线(T线)上抗原的结合,从而导致检测线(T线)颜色深浅的变化。通过检测线(T线)与质控线(C线)颜色深浅比较,对样品中甲基异柳磷进行定性分析。

5 试剂与材料

5.1 试剂

除另有说明外,所有试剂均为分析纯,实验室用水应符合GB/T 6682中三级水的要求。

5.1.1 氯化钠(NaCl)。

5.1.2 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.3 二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.4 丙酮 (CH₃COCH₃)。

5.2 试剂配制

样品提取液 (0.2 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液)：称取 9 g 氯化钠 (5.1.1)、6 g 十二水合磷酸氢二钠 (5.1.2)、0.4 g 二水合磷酸二氢钠 (5.1.3)，在烧杯中用水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中，定容至 100 mL，摇匀。

注：也可由胶体金免疫层析试剂盒配套提供，或按照其说明书配制。

5.3 标准物质

甲基异柳磷中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量见表1，纯度≥98%。

表1 标准物质信息表

中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子量
甲基异柳磷	Isofenphos-methyl	101365-44-0	C ₁₃ H ₂ ON ₄ PS	317.34

注：或等同可溯源物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 甲基异柳磷标准储备溶液 (100 μg/mL)：准确称取适量经纯度折算后的甲基异柳磷标准物质 (5.3) 1 mg (精确至 0.01 mg)，置于小烧杯中，用丙酮 (5.1.4) 溶解，定量转移至 10 mL 容量瓶中，再用丙酮 (5.1.4) 定容，摇匀，制成浓度为 100 μg/mL 的甲基异柳磷标准储备溶液。或可直接购买甲基异柳磷标准储备溶液。-18℃ 及以下条件避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 甲基异柳磷标准中间溶液 (10 μg/mL)：准确量取 1 mL 甲基异柳磷标准储备溶液 (100 μg/mL) (5.4.1)，置于 10 mL 容量瓶中，用丙酮 (5.1.4) 稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 10 μg/mL 的甲基异柳磷标准中间溶液。2℃~8℃ 避光保存，有效期 3 个月。

5.4.3 甲基异柳磷标准工作溶液 (1 μg/mL)：准确量取 1 mL 甲基异柳磷标准中间溶液 (10 μg/mL) (5.4.2)，置于 10 mL 容量瓶中，用丙酮 (5.1.4) 稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 1 μg/mL 的甲基异柳磷标准工作溶液。现配现用。

5.5 材料

甲基异柳磷胶体金快速检测试剂盒，应在阴凉、干燥、避光条件下保存。

5.5.1 金标微孔 (含胶体金标记的特异性抗体)。

5.5.2 试纸条或检测卡。

6 仪器与设备

6.1 电子天平：感量为 0.1 mg 和 0.01 g。

6.2 移液器：10 μL、100 μL、200 μL、1 mL、5 mL。

6.3 粉碎机或搅拌机。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 离心机：转速≥4 000 r/min。

6.6 胶体金读数仪 (可选)。

7 环境条件

温度 15℃~35℃，相对湿度≤80%。

8 分析步骤

8.1 试样制备

样品测定部位应按照 GB 2763 中附录A的规定执行。

称取不少于 100 g 具有代表性的蔬菜或水果样品，剪碎，分别装入洁净容器作为试样和留样，密封，标记。留样置于 -18°C 以下保存。

8.2 试样提取

准确称取 2 g (精确至 0.1 g) 制备的试样放入 15 mL 离心管中，加入 8 mL 样品提取液 (5.2)，涡旋或上下振荡 1 min，静置 1 min。根据不同基质及最大残留限量，需对上清液进行进一步稀释，根据表2所述稀释方法，将上清液与一定体积样品提取液 (5.2) 混合，混合液即为待测液。

注：试样提取建议按照试剂盒说明书。

表2 不同基质的最大残留限量及上清液稀释方法

基质名称	最大残留限量/ (mg/kg)	上清液/ μL +样品提取液/ μL
蔬菜：鳞茎类蔬菜、芸薹属类蔬菜、叶菜类蔬菜、茄果类蔬菜、瓜类蔬菜、豆类蔬菜、茎类蔬菜、根茎类和薯芋类蔬菜(甘薯除外)、水生类蔬菜、芽菜类蔬菜和其他类蔬菜 水果：柑橘类水果、仁果类水果、核果类水果、浆果和其他小型类水果、热带和亚热带类水果、瓜果类水果	0.01	无需稀释
甘薯	0.05	100 + 400

8.3 测定步骤

8.3.1 测试前，将未开封的检测卡或试纸条恢复至室温。

8.3.2 吸取待测液 200 μL 加入金标微孔中，缓慢抽吸 5~10 次至待测液与金标微孔试剂充分混匀， 20°C ~ 30°C 反应 3 min。

8.3.3 将试纸条插入到金标微孔中， 20°C ~ 30°C 反应 6 min。

8.3.4 从金标微孔中取出试纸条，除去试纸条下端的样品垫，进行结果判定。

注1：测定步骤(8.3)也可按照试剂盒说明书进行。

注2：结果判定可使用胶体金读数仪，读数仪的具体使用参照仪器使用说明书。

8.4 质控试验

质控试验包括空白试验和加标质控试验。

8.4.1 空白试验

称取空白试样，按照 8.2 和 8.3 步骤与试样同法操作。

8.4.2 加标质控试验

准确称取 2 g (精确至 0.1 g) 空白试样置于 15 mL 离心管中，针对不同基质分别添加一定体积的甲基异柳磷标准工作溶液，制备甲基异柳磷浓度达到最大残留限量值的加标质控试样(见表3)，按照 8.2 和 8.3 步骤与试样同法操作。

注：更换快检试剂品牌、批次时，均应进行空白试验和加标质控试验。

表3 不同基质加标质控试样制备方法

基质名称	甲基异柳磷标准溶液	标准溶液体积 μL	试样中甲基异柳磷浓度 mg/kg
蔬菜：鳞茎类蔬菜、芸薹属类蔬菜、叶菜类蔬菜、茄果类蔬菜、瓜类蔬菜、豆类蔬菜、茎类蔬菜、根茎类	标准工作溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$) (5.4.3)	20	0.01

基质名称	甲基异柳磷标准溶液	标准溶液体积 μL	试样中甲基异柳磷浓度 mg/kg
和薯芋类蔬菜(甘薯除外)、水生类蔬菜、芽菜类蔬菜和其他类蔬菜 水果:柑橘类水果、仁果类水果、核果类水果、浆果和其他小型类水果、热带和亚热带类水果、瓜果类水果			
甘薯	标准工作溶液 (1 μg/mL) (5.4.3)	100	0.05

9 结果判定

9.1 目视判定

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,见图1目视判定示意图。

注:也可使用胶体金读数仪判读,读数仪的具体操作与判读原则参照读数仪的使用说明书。

9.2 目视判定示意图

9.2.1 无效结果

质控线(C线)不显色,无论检测线(T线)是否显色,判定为无效结果。质控试验结果不符合要求时,同批次所有检测结果判定为无效结果。若出现无效结果,需对同批次样品进行重新检测。

9.2.2 阴性结果

质控线(C线)显色,检测线(T线)颜色深于或等于质控线(C线),判定为阴性结果。

9.2.3 阳性结果

质控线(C线)显色,检测线(T线)不显色或颜色浅于质控线(C线),判定为阳性结果。

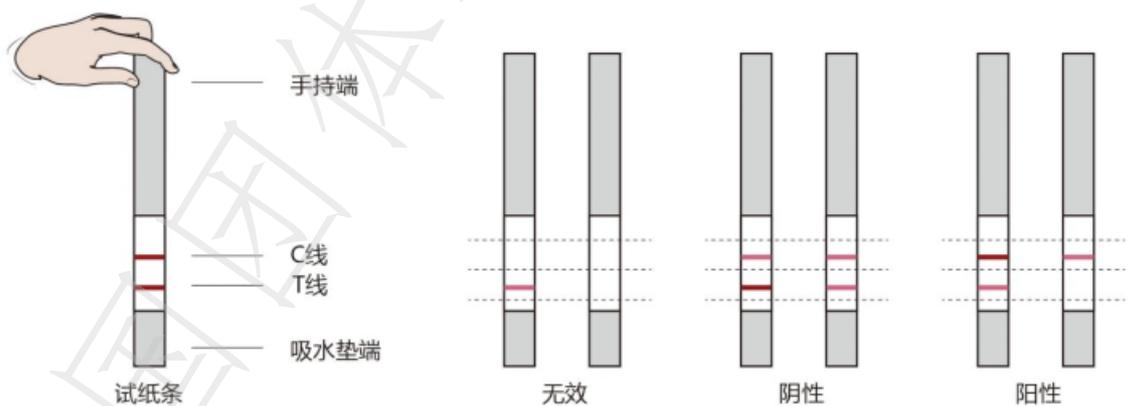


图1 目视判定示意图

9.3 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。

10 结果确认

当检测结果为阳性时,采用参比方法进行确证。

11 性能指标

11.1 检出限：蔬菜（除甘薯外）、水果为 0.01 mg/kg；甘薯为 0.05 mg/kg。

11.2 灵敏度： $\geq 95\%$ 。

11.3 特异性： $\geq 85\%$ 。

11.4 假阴性率： $\leq 5\%$ 。

11.5 假阳性率： $\leq 15\%$ 。

注：性能指标计算方法见附录A。

12 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不作限定。方法使用者在使用试剂、试剂盒或操作步骤之前，应对其进行考察，性能指标应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准为 GB 23200.113-2018《食品安全国家标准 植物源性食品中 208 种农药及其代谢物残留量的测定 气相色谱-质谱联用法》。

附 录 A
(规范性)
快速检测方法性能指标计算表

性能指标计算方法见表A. 1。

表A. 1 性能指标计算方法

样品情况 ^①	检测结果 ^②		总数
	阳性	阴性	
阳性	N_{11}	N_{12}	$N_{1.} = N_{11} + N_{12}$
阴性	N_{21}	N_{22}	$N_{2.} = N_{21} + N_{22}$
总数	$N_{.1} = N_{11} + N_{21}$	$N_{.2} = N_{12} + N_{22}$	$N = N_{1.} + N_{2.}$ 或 $N_{.1} + N_{.2}$
显著性差异 (X^2)	$X^2 = (N_{12} - N_{21} - 1)^2 / (N_{12} + N_{21})$, 自由度 (df) = 1		
灵敏度 (p+, %)	$p+ = N_{11} / N_{1.}$		
特异性 (p-, %)	$p- = N_{22} / N_{2.}$		
假阴性率 (pf-, %)	$pf- = N_{12} / N_{1.} = 100 - \text{灵敏度}$		
假阳性率 (pf+, %)	$pf+ = N_{21} / N_{.2} = 100 - \text{特异性}$		
相对准确度, % ^③	$(N_{11} + N_{22}) / (N_{.1} + N_{.2})$		
<p>注:</p> <p>① 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公认值结果;</p> <p>② 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。</p> <p>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: N_{11}表示第一行, 第一列, $N_{1.}$表示所有的第一行, $N_{.2}$表示所有的第二列; N_{12}表示第一行, 第二列。</p> <p>③ 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。</p>			