

团 体 标 准

T/CHI XX-202X

中草药中甲基异柳磷、涕灭威、胺苯磺隆、醚菌酯的快速定量-胶体金免疫层析法

Rapid quantitation of isocarbophos, aldicarb, amidosulfuron, and kresoxim-methyl in chinese herbal medicines by colloidal gold immunochromatographic assay

(征求意见稿)

提交反馈意见时，请将您知道的专利连同支持性文件一并附上。

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

中国高技术产业发展促进会 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	2
5 实验条件	2
6 试剂和材料	2
6.1 试剂	2
6.2 检测试剂盒	3
6.3 标准物质详细信息	3
6.4 标准溶液配制	3
6.5 材料	3
7 仪器与设备	4
8 样品处理	4
8.1 样品制备	4
8.2 样品提取	4
9 实验步骤	4
10 实验数据处理	5
10.1 计算原理	5
10.2 定量范围	5
10.3 计算公式	5
10.4 无效结果判定	5
10.5 结果表述	5
11 质量控制	6
11.1 空白试验	6
11.2 加标质控试验	6
11.3 基质效应的验证与校准	6
12 结果确认	6
13 性能指标	6
13.1 定量限	6
13.2 准确度	7
13.3 精密度	7
14 其他	7
附录 A (资料性) 性能指标验证方法	8
附录 B (资料性) 结果的目视判读示意图	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。

本文件由甘肃药业集团科技创新研究院有限公司提出。

本文件由中国高技术产业发展促进会归口。

本文件起草单位：甘肃药业集团科技创新研究院有限公司、甘肃药业集团国方检验检测有限公司、甘肃药业集团中药材发展有限公司、江南大学、甘肃省陇药产业协会、定西市药品检验检测中心。

本文件起草人：朱永红、张政、杨会君、杨克谦、王小芳、贾继禧、甄世伟、杨俊良、胡九禄、杨树栋、刘丽强、陈杰、高晓东、张海星。

征求意见稿

引 言

中草药作为中医药产业的战略核心与物质基础，其质量与安全直接关系到人民群众的健康权益及产业的可持续发展。然而，在种植与加工环节中，农药残留问题已成为制约中草药品质、安全乃至国际化进程的关键瓶颈。当前，针对农药残留的常规实验室检测方法，如气相色谱-质谱联用（GC-MS）或液相色谱-串联质谱联用（LC-MS/MS），虽具备高精度和高灵敏度的优势，但其设备昂贵、操作复杂、检测周期长，难以满足产地源头、流通环节和基层监管所需的大规模、高时效的快速筛查需求，造成监管覆盖不足与企业品控成本高昂的困境。

为有效应对上述挑战，胶体金免疫层析分析技术（Colloidal Gold Immunochromatographic Assay, GICA）作为一种成熟的即时检测（POCT）技术，展现出巨大应用潜力。该技术凭借其 10-15 分钟内即可获得结果的快速性、优异的便携性、低廉的成本以及简便的操作性，已在食品安全、临床诊断等领域得到广泛应用。然而，目前市场尚缺乏针对中草药中甲基异柳磷、涕灭威、胺苯磺隆、醚菌酯这四种代表性农药的统一、规范的胶体金检测标准。标准的缺失导致相关快检产品性能参差不齐，检测结果缺乏可比性与权威性，严重影响了该技术在中草药领域的健康发展与可靠应用。为此，本文件起草单位基于自主研发的系列检测试剂盒，旨在建立一套完整、规范的检测方法，以引领和规范市场。

本标准的制定旨在填补行业空白，通过对检测流程、性能指标、样品前处理及结果判读等关键环节进行统一规范，为产业发展提供清晰的技术指引。本标准通过提供经过验证和优化的前处理方案，有效降低了中草药复杂基质（如色素、多糖、皂苷等）对免疫反应的干扰，显著提升了检测的准确性与可靠性。本标准的实施，将为各级监管部门提供强有力的现场快速筛查工具，为广大中小企业及种植户提供经济、便捷的质量自控手段，为构建“绿色中药材”认证体系提供技术支撑，从而有效遏制高毒农药滥用，全方位保障公众用药安全。

本标准在制定过程中，与现行的 KJ 202309、GB/T 14929.2-1994、DB22/T 1680-2012 等相关检测标准进行了协调性分析，明确了本标准作为快速定量筛查方法与实验室确证方法的互补关系。

中草药中甲基异柳磷、涕灭威、胺苯磺隆、醚菌酯的快速定量-胶体金免疫层析法

1 范围

本文件规定了采用胶体金免疫层析法，对中草药中甲基异柳磷、涕灭威、胺苯磺隆、醚菌酯四种农药残留进行定量测定的方法。

本文件适用于中草药（包括药材及饮片）中上述四种农药残留的现场、快速定量检测及初步筛查。

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

GB/T 27404 实验室质量控制规范 食品理化检测

《中华人民共和国药典》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

甲基异柳磷 Isofenphos-methyl

一种有机磷类杀虫、杀螨剂。

3.2

涕灭威 Aldicarb

一种氨基甲酸酯类的高毒性杀虫、杀线虫剂。

3.3

胺苯磺隆 Ethametsulfuron-methyl

一种磺酰胺类内吸选择性除草剂。

3.4

醚菌酯 Kresoxim-methyl

一种以天然抗生素为基础，仿生合成的一种全新甲氧基丙烯酸酯类高效杀菌剂。

3.5

胶体金免疫层析法 Colloidal gold immunochromatographic assay, GICA

基于竞争抑制免疫层析原理的快速检测技术。样品中的待测物（农药）与检测线（T线）上固定的偶联抗原竞争结合胶体金标记的特异性抗体。待测物浓度与T线信号强度呈负相关。

3.6

检出限 Limit of detection, LOD

在确定的置信水平上，能够可靠地检出样品中存在待测物的最低浓度。

3.7

定量限 Limit of quantitation, LOQ

在可接受的精密度和准确度要求下，能够准确定量测定样品中待测物的最低浓度。

3.8

快速检测方法 Rapid test method

与常规实验室分析方法相比，检测用时显著缩短、操作步骤简化、通常无需大型仪器、适于现场或非实验室环境下使用的检测方法的统称。其结果主要用于初步筛查和风险预警。

3.9

参比方法 Reference method

一种公认的、经过充分验证的、能够提供高度准确度和可靠性结果的分析方法，通常指色谱法或色谱-质谱联用法等实验室确证方法。其结果可用于确认筛查方法的检测结果，并作为争议仲裁的依据。

4 原理

本标准采用竞争抑制免疫层析原理。检测卡设有两条代表不同浓度阈值的检测线（T1、T2）和一条作为程序控制的质控线（C）。检测时，样品中的待测农药与固化在检测线上的抗原，竞争结合胶体金标记的特异性抗体，因此待测物浓度与检测线的显色强度呈负相关。质控线（C）正常显色是确保检测结果有效的前提。最终结果可通过仪器读取T1、T2及C线的信号并结合内置算法计算得出定量值；亦可通过目视进行区间判断（判定原则见附录B）。

5 实验条件

实验应在洁净、无污染、避免阳光直射的环境中进行。建议环境条件如下：温度15℃~30℃，相对湿度≤80%。

6 试剂和材料

6.1 试剂

除另有说明外，本标准所用试剂均为分析纯（AR），实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

6.1.1 甲醇（Methanol, CH₃OH）：色谱纯（HPLC Grade）。

6.1.2 甲基异柳磷标准品（Isufenphos-methyl standard）

6.1.3 涕灭威标准品（Aldicarb standard）

6.1.4 胺苯磺隆标准品（Ethametsulfuron-methyl standard）

6.1.5 醚菌酯标准品（Kresoxim-methyl standard）。

注：6.1.2 至 6.1.5 的标准品信息详见 6.3。

6.2 检测试剂盒

本标准涉及四种独立的胶体金免疫层析定量检测试剂盒，分别对应甲基异柳磷、涕灭威、胺苯磺隆、醚菌酯的单项检测。其性能指标应符合本标准的规定。试剂盒应在包装标明的有效期内，并按其注明的储存条件（通常为 2℃~8℃或常温）避光、干燥保存。每种试剂盒应包含进行检测所需的核心组分：检测卡、微孔反应板、样品提取液及稀释液。

6.3 标准物质详细信息

四种农药的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量见表 1，纯度均≥98.0%。

表 1 标准物质信息表

中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子质量
甲基异柳磷	Isufenphos-methyl	99675-03-3	C ₁₄ H ₂₂ NO ₄ PS	331.37
涕灭威	Aldicarb	116-06-3	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₂ S	190.26
胺苯磺隆	Ethametsulfuron-methyl	97780-06-8	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O ₆ S	410.41
醚菌酯	Kresoxim-methyl	143390-89-0	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	313.35

6.4 标准溶液配制

6.4.1 标准储备液 (1000 μg/mL)：分别精确称取各标准物质 (6.3) 10 mg (精确至 0.01 mg)，置于洁净的小烧杯中，用少量甲醇 (6.1.1) 使其完全溶解，定量转移至 10 mL 容量瓶中，再用甲醇 (6.1.1) 定容至刻度，摇匀，制成浓度为 1000 μg/mL 的单标准储备液。或可直接购买有证标准储备溶液。

储存条件：于 4℃条件下避光密封保存，有效期为 6 个月。

安全提示：涕灭威为高毒性物质，配制标准溶液时应在通风橱内进行，并佩戴手套、口罩等个人防护装备。

6.4.2 标准工作溶液：根据试验需要，使用样品提取液（由试剂盒提供）或甲醇 (6.1.1)，将标准储备液 (6.4.1) 逐级稀释，配制一系列所需浓度的标准工作溶液。建议现用现配。

6.5 材料

6.5.1 移液器吸头：与所用移液器配套。

6.5.2 离心管：10 mL 或 50 mL，具塞。

6.5.3 容量瓶：10 mL，100 mL。

7 仪器与设备

- 7.1 胶体金免疫层析读数仪：与系列试纸条配套，可识别不同检测项目，内置标准曲线，可自动计算并显示定量结果。
- 7.2 电子天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。
- 7.3 高速组织捣碎机或均质器。
- 7.4 离心机：转速 ≥ 8000 r/min。
- 7.5 涡旋混合器。
- 7.6 移液器：10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 mL、5 mL。
- 7.7 恒温孵育器：控温范围能覆盖 38°C。

8 样品处理

8.1 样品制备

- 8.1.1 样品的取样部位及数量应能代表该批次中草药的整体情况，参照《中华人民共和国药典》中相关药材项下的规定执行。
- 8.1.2 取具代表性的样品不少于 100 g，用适当方式（如粉碎机）粉碎后过 40 目筛，将所得粉末充分混匀。分别装入洁净、干燥的容器中作为检验样品和留样，密封、标记。
- 8.1.3 留样置于阴凉干燥处或按相关规定条件保存。

8.2 样品提取

- 8.2.1 精确称取按 8.1.2 制备好的样品 1.0 g（精确至 0.01 g），置于 15 mL 离心管中。
- 8.2.2 向离心管中加入 3.0 mL 与待测农药项目相对应的样品提取液（由 6.2 提供）。
- 8.2.3 置于涡旋混合器上高速振荡 5 min，使其充分混合。
- 8.2.4 在转速不低于 8000 r/min 的条件下离心 5 min。
- 8.2.5 小心吸取上清液 1.0 mL 至新的洁净试管中，使用样品浓缩仪（或氮吹仪）在 50°C~60°C 下将液体完全吹干。
- 8.2.6 向吹干后的试管中加入 100 μL 样品提取液进行复溶，经涡旋混合器振荡 30 秒使其完全溶解。
- 8.2.7 从复溶后的溶液中吸取 20 μL ，加入到含有特定体积稀释液（由 6.2 提供）的稀释管中，振荡混匀。该混合液即为待测样液。

注 1：步骤 8.2.7 中稀释液的体积因不同药材基质而异（例如 180 μL 或 580 μL ），使用者应严格遵照所用检测试剂盒（6.2）说明书中的规定执行。

注 2：样品的称取质量与各步骤的试剂用量，使用者也可参照所用检测试剂盒（6.2）说明书进行调整，以获得最佳效果。

9 实验步骤

- 9.1 测试前，将未开封的检测试剂盒（6.2）、待测样液（8.2.7）等所有试验所需品项恢复至室温（15°C~30°C）。

9.2 吸取待测样液 150 μL 加入到已预热的微孔反应板的微孔中，用移液器反复轻柔抽吸 5~10 次，使样液与孔内预包被的试剂充分混匀后，静置反应 3 min。

9.3 用移液器吸取微孔中 100 μL 的反应液，将其一次性加入到已预热的检测卡样品孔（S 孔）中，开始计时，进行层析反应 8 min。

9.4 计时结束后，应在 20 秒内将检测卡从恒温设备中取出，并立即置于配套的胶体金免疫层析读数仪（7.1）中进行信号值读取和结果计算。

注：试验步骤建议严格按照检测试剂盒（6.2）说明书执行，以确保结果的准确性。当需要对同一样品检测多种农药时，应取新的待测样液，使用对应的检测试剂盒，分别进行独立的检测。

10 实验数据处理

10.1 计算原理

读数仪（7.1）通过读取通过同时读取质控线（C 线）、检测线 1（T1 线）和检测线 2（T2 线）的信号强度，并根据内置的、与当前批次检测试剂盒（6.2）匹配的校准算法（通常由 ID 芯片或二维码提供），将信号值自动换算为待测样液中农药的浓度（ C_s ）。

注：该计算原理适用于基质效应可忽略或已在试剂盒开发中被补偿的情况。当存在显著基质效应时，应按照国家 11.3 节的要求进行校准与计算。

10.2 定量范围

本方法的定量检测应在试剂盒说明书标明的线性范围内进行。若仪器读出的待测样液浓度（ C_s ）超出线性范围上限，应对待测样液（8.2.7）进行适当稀释后重新测定，并在计算最终结果时乘以相应的稀释倍数（ f ）。

10.3 计算公式

样品中农药的实际残留量（ X ，单位： mg/kg ）按公式（1）计算：

$$X = (C_s \times V \times f) / (m \times 1000) \quad (1)$$

式中： X ——样品中待测农药的残留量，单位为毫克每千克（ mg/kg ）；

C_s ——从读数仪读出的待测样液中农药的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V ——提取溶剂的体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——样品的质量，单位为克（ g ）；

f ——稀释倍数。

10.4 无效结果判定

若质控线（C 线）未出现或读数仪提示 C 线信号异常，则判定该次检测无效。应分析原因（如试纸条失效、操作不当等）并另取试纸条对样品重新进行检测。

10.5 结果表述

检测结果以 mg/kg 为单位报告。若检测结果低于方法的定量限（LOQ），则报告为“未检出（< LOQ 具体数值 mg/kg ）”；若检测结果在定量范围内，报告其数值，结果保留两位有效数字。

11 质量控制

11.1 空白试验

采用经实验室确认为不含待测农药的阴性样品基质（或试剂空白）作为空白对照，按照第 8 章和第 9 章的步骤与样品同法操作。检测结果应低于本方法规定的定量限（LOQ）。

11.2 加标质控试验

精确称取确认后的阴性样品，向其中添加适量的农药标准工作溶液，使其最终浓度在本标准的定量范围内。按照第 8 章和第 9 章的步骤与样品同法操作。测定结果的准确度（回收率）应符合 12.2 的要求。

注：更换检测试剂盒品牌、批次或关键试剂时，均应进行空白试验和加标质控试验，以验证其适用性。

11.3 基质效应的验证与校准

考虑到中草药基质的多样性可能对待测物的回收率产生影响，在检测特定药材品种（尤其是首次检测或已知成分复杂的基质）时，建议按以下步骤对试剂盒内置标准曲线的适用性进行验证：

a) 验证方法：取经实验室确认为不含待测农药的相应药材阴性样品，按照 11.2 的要求进行加标回收率试验。

b) 结果判定：若回收率结果在 70%~130% 的范围内，表明基质效应对本次检测影响较小，可直接使用试剂盒内置的标准曲线进行定量。

c) 校准方法：若回收率结果超出 70%~130% 的范围，表明存在显著的基质效应，此时不应直接采用内置标准曲线。为获得准确的定量结果，应采用基质匹配标准曲线进行校准。具体操作为：使用不含待测物的同种药材阴性样品的提取液（按 8.2 制备）作为稀释溶剂，配制一系列浓度的标准工作溶液，重新建立标准曲线并进行测定。

12 结果确认

当检测结果高于本标准规定的定量限（LOQ）或相关法规限量时，应判定为筛查阳性。所有筛查阳性的样品，应采用本标准定义的参比方法（液相色谱-串联质谱法等）进行最终的确证。

13 性能指标

使用本标准所述方法的配套试剂盒及仪器，其性能指标应满足以下要求。

13.1 定量限 LOQ

本方法对中草药中四种农药的定量限应达到或优于表 2 所列水平。

表 2 方法定量限要求

待测物名称	定量限（LOQ）要求（mg/kg）
甲基异柳磷	≤ 0.2

涕灭威	≤ 0.05
胺苯磺隆	≤ 0.5
醚菌酯	≤ 0.2

13.2 准确度

以加标回收率表示。在 1~2 倍定量限的浓度水平下对阴性样品进行加标，平行测定 6 次，其平均回收率 (Recovery) 应在 70% ~ 130% 的范围内。

13.3 精密度

以相对标准偏差 (RSD) 表示。在重复性条件下，对加标样品进行 6 次平行测定，结果的相对标准偏差应 $\leq 15\%$ 。

14 其他

本标准中提及的试剂、仪器型号和操作步骤旨在作为示例，以满足本方法的技术要求。任何能够达到同等或更优性能指标的其他品牌试剂、试剂盒、仪器或经优化的操作步骤均可使用。方法使用者有责任在使用前对所选用的产品或步骤进行充分的方法学验证，确保其满足本标准第 13 章规定的各项性能指标，并保留验证记录。

本标准中涉及的样品前处理和结果确认方法，可进一步参考《中华人民共和国药典》及相关色谱-质谱联用确证方法的规定。

附录 A

(资料性)

性能指标验证方法

A.1 定量限 (LOQ) 的确定

取经参比方法确认为不含待测物的阴性中草药样品, 进行加标。设置 5 个~7 个覆盖预估定量限浓度的加标水平, 每个水平平行测定 3 次以上。以能够满足本标准 13.2 和 13.3 中对准确度和精密度要求的最低添加浓度, 作为该方法的定量限。

A.2 准确度 (加标回收率) 的测定

取经确认的阴性样品, 分别添加低、中、高三个浓度水平 (1 倍、2 倍、5 倍定量限) 的待测物标准溶液, 每个浓度水平平行制备 6 份。按照本标准规定的步骤进行测定, 计算加标回收率。回收率 (P) 按公式 (A.1) 计算:

$$P(\%) = ((C_1 - C_0) / C_2) \times 100 \quad (\text{A.1})$$

式中: P ——加标回收率, 单位为百分比 (%);

C_1 ——加标样品测定结果的平均值, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

C_0 ——未加标的阴性样品测定结果的平均值, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

C_2 ——在样品中添加的标准物质的理论浓度, 单位为毫克每千克 (mg/kg)。

A.3 精密度 (相对标准偏差) 的测定

精密度用相对标准偏差 (RSD) 来评价。

在重复性条件下, 对 A.2 中任一浓度水平的加标样品进行 6 次独立测定, 得到 6 个检测结果 (X_i)。相对标准偏差 (RSD) 按公式 (A.2) ~ (A.4) 计算:

首先计算 6 次测定结果的算术平均值 (\bar{X}):

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^n X_i / n \quad (\text{A.2})$$

再计算标准偏差 (S):

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 / (n-1)} \quad (\text{A.3})$$

最后计算相对标准偏差 (RSD):

$$RSD(\%) = (S / \bar{X}) \times 100 \quad (\text{A.4})$$

式中: RSD ——相对标准偏差, 单位为百分比 (%);

S ——标准偏差;

\bar{X} —— n 次独立测定结果的算术平均值;

X_i ——第 i 次测定的结果;

n ——测定次数 (本标准中 $n=6$)。

附录 B

(资料性)

结果的目视判读示意图

本附录对三线式（双检测线）检测卡的目视判读提供了指导原则。所有判读均应参照图 B.1 的综合示意图进行。判读时，首先应确认质控线（C线）正常显色以保证结果有效，再通过观察检测线（T1线和 T2线）的显色情况来判定阴性或阳性结果。

B.1 目视判读原则

参照图 B.1，检测结果的判读原则如下：

B.1.1 无效结果

如图 B.1(a)所示，质控线（C线）不显色。此结果无效，应重新检测。

B.1.2 阴性结果

如图 B.1(b)所示，质控线（C线）、检测线 1（T1线）和检测线 2（T2线）三条线均清晰显色。

B.1.3 阳性结果

弱阳性：如图 B.1(c)所示，C线和 T1线清晰显色，但 T2线不显色。

强阳性：如图 B.1(d)所示，仅 C线清晰显色，T1线和 T2线均不显色。

