《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》

团体标准（征求意见稿）

编制说明

目 录

[一、标准立项的背景及意义 1](#_Toc7377)

[二、项目的前期研究 2](#_Toc6656)

[三、第一阶段 项目团体标准正式立项 3](#_Toc5568)

[四、第二阶段 调研并形成《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（征求意见稿） 4](#_Toc6796)

[五、与国内外有关法律法规和其它标准的关系 4](#_Toc28209)

[六、标准的制（修）订原则 5](#_Toc11926)

[6.1 实用性原则 5](#_Toc22300)

[6.2 协调性原则 6](#_Toc3416)

[6.3 规范性原则 6](#_Toc21615)

[6.4 前瞻性原则 6](#_Toc5691)

[七、各项技术内容确定的依据 7](#_Toc20051)

[7.1 确定适用范围及检出限 7](#_Toc9603)

[7.2 方法性能确定实验用到的检测试纸条 7](#_Toc31162)

[7.3 方法性能确定实验用到的样品 8](#_Toc10033)

[7.4 方法性能确定实验用到的标准品 8](#_Toc14892)

[7.5 测定步骤与结果判读的确定 8](#_Toc8715)

[7.6 方法性能确定实验方案 11](#_Toc12504)

[八、方法性能验证结果 13](#_Toc18777)

[8.1 样品前处理条件优化 13](#_Toc30868)

[8.2 测定条件研究 15](#_Toc13406)

[8.3 灵敏度和假阴性率 18](#_Toc23296)

[8.4特异性和假阳性 19](#_Toc30155)

[8.5 与参比方法一致性 20](#_Toc25412)

[8.6 交叉反应率结果 21](#_Toc25465)

[8.7 阳性样品胶体金试纸条检测结果 21](#_Toc17004)

[8.8 其他品牌胶体金试纸条验证 22](#_Toc6798)

[九、方法性能验证结论 23](#_Toc14372)

[十、方法可能带来的经济和社会影响评估 24](#_Toc7841)

[十一、起草过程中主要分歧意见的处理情况 25](#_Toc23003)

[**附 表1 快速检测方法性能指标计算表** 26](#_Toc5839)

一、标准立项的背景及意义

氟虫腈是苯基吡唑类新型高活性杀虫剂，其作用机制在于阻碍昆虫γ-氨基丁酸控制的氯化物代谢，因而对叶蝉、鳞翅目幼虫、蚜虫、蝇类和飞虱等害虫有很高的杀虫活性，具有防虫效果好、用量低、起效时间长等优点，已经在农作物生产中广泛使用。随着氟虫腈使用范围的逐渐扩大和用量的不断增加，其残留的毒副作用也逐步显现。在食品和环境中半衰期长，残留物能够在生物体中富集，对生物体的健康具有较大毒害风险。由于氟虫腈在蔬菜水果上的广泛使用，对虫害的控制起到了很重要的作用，但同时也不可避免地产生了农药残留问题。随着对氟虫腈的使用及毒性的深入了解，其残留问题也逐渐受到重视。目前国际上对氟虫腈在食品中的最大残留限量标准也日益严格。因此，建立蔬菜中简单、准确、成本低的检测方法具有十分重要的意义。

目前氟虫腈在蔬菜和水果中的主要测定方法为气相色谱法、液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法。这些方法前处理富集程度低，或者操作步骤繁琐，使用仪器设备昂贵。已远远不能满足当前食品行业检测样品的简洁、快速、高灵敏度、大批量、低成本的需求，因此快速检测方法的建立迫在眉睫。快速检测方法基于胶体金免疫层析技术，简单快速、成本低，可以在现场快速出结果，具有灵敏度高、可操作性强，免去其他方法繁琐的净化步骤等优点，适合大批量蔬菜水果样品中氟虫腈残留的检测。在有限的成本和时间的情况下，可以扩大监管范围，同时通过现场化的检测过程快速锁定问题样品，减少问题样品的流通。

蔬菜水果中氟虫腈的快速检测方法建立后，将大大提高市场监管和检测效率，进一步完善蔬菜中农药残留检测的标准体系，为食品安全监管提供支撑力量。

因此《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准的编制十分必要。

二、项目的前期研究

标准制定研究过程中查阅了国内外相关参考文献，研究了蔬菜水果中氟虫腈的样品前处理方法。根据市售快检产品的基质适用性、检测项目、检测限、检测步骤、结果判断等内容，选择了1 种满足检测要求的胶体金金试纸条进行方法学考察。根据原国家食药总局发布的《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科[2017]43 号）的要求，对氟虫腈胶体金试纸条进行了性能指标（灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率）的分析，建立了蔬菜水果中氟虫腈的胶体金免疫层析快速定性检测方法。本方法经过多家检验机构进行了实验室间验证，表现出了良好结果。本标准是按 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》给出的规则编写，技术内容是参照GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分:试验方法标准》确定。

技术路线图，如图1所示。

蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法

确定适用范围、检测项目、检出限

样品前处理方法

市场调研、优选快速检测产品

快速检测产品技术参数考察

快速检测方法性能指标评价

检验机构进行实验室间验证

完成方法文本和编制说明

三、第一阶段 项目团体标准正式立项

深圳市分析测试协会于2021年6月面向会员单位征集团体标准，项目组及时提出了团体标准制订立项申请。协会在2021年8月7日至8日组织专家召开了立项评审会议，最后《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》项目通过专家组评审并获立项。

本方法主要起草单位：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。

本方法主要起草人：XXX。

四、第二阶段 调研并形成《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（征求意见稿）

根据第一阶段调研课题研讨会的各方意见，项目组对《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》进行了修改，并根据立项组专家建议将项目进行修改，对前处理条件进行了优化，对方法检出限、灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率等技术内容进行了研究，使得该标准更完善，更先进，适用范围更广。为了使标准适用全市相关企事业单位的实际情况，项目组在2021年8月至2021年11月，调研了深圳市通量检测科技有限公司、深圳市质量安全检验检测研究院、深圳计量质量检测研究院、重庆市食品药品检验检测研究院、山西省检验检测中心（山西省标准计量技术研究院），征求了标准制订的可行性、适用性等意见。

五、与国内外有关法律法规和其它标准的关系

GB 2763-2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》规定，在叶菜类、茄果类等蔬菜中以及热带和亚热带类水果（香蕉除外），瓜果类水果中氟虫腈最大残留量为0.02 mg/kg。

其检测方法：谷物按照GB 23200.34-2016 《食品安全国家标准 食品中涕灭砜威、吡唑醚菌酯、嘧菌酯等65种农药残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》规定的方法检测，油料和油脂参照SN/T 1982-2007 《进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》规定的方法测定，蔬菜、水果、糖料、食用菌按照SN/T 1982-2007 《进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》规定的方法测定，蛋类按照GB 23200.115《食品安全国家标准 鸡蛋中氟虫腈及其代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱联用法》规定的方法测定。以上方法均用色谱法完成，该系列检测方法与本标准的免疫层析法不同。

# 六、标准的制（修）订原则

本标准按照《分析测试协会团体标准管理办法》的要求进行编制，遵循先进性、科学性、实用性的原则，在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。本标准注重科学性和可操作性的结合，利于推广应用。

6.1 实用性原则

传统仪器分析方法由于前处理繁琐、价格昂贵、操作专业要求高、试剂耗材消耗量大、检测周期长，已远远不能满足当前蔬菜水果农残检测样品的简洁、快速、高灵敏度、大批量、低成本的需求。

胶体金免疫层析方法检测氟虫腈目前技术已成熟，具有结果准确、简单快速、成本低的特点，适于基层快检室、快检车推广使用，可以成为快速筛查的有力工具。符合当前农贸市场、批发市场、市场监督管理等农产品安全的快速检测水平，具有较强的实用性和可操作性强。

6.2 协调性原则

在《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》编写过程中注意了与国内外相关法律法规、标准的协调问题，在内容上与现行法律法规、标准协调一致。为了统一检验标准、规范蔬菜水果中氟虫腈胶体金产品和市场，在方法制定的过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行国家强制性标准和行业标准。

6.3 规范性原则

本标准的起草是在对国内外资料分析、研究及整理的基础上，并按照标准的制定及《国家标准管理办法》的程序与基本要求进行。

本标准严格按照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》的要求和规定编写本标准的内容，保证标准的编写质量。

6.4 前瞻性原则

本标准在兼顾当前氟虫腈胶体金快速检测试纸条的检出限与国家标准GB 2763-2021规定的限量值上限基本匹配，提高快速检测与定量检测结果的符合率。通过快检初筛，快检结果呈阳性时，可快速明确哪种农药超标，锁定疑似目标，提高农药残留监督抽检的“靶向性”。考虑到了农药残留快速检测技术的发展趋势和需要，在标准中体现了个别前瞻性条款，作为对行业发展的引导。

七、各项技术内容确定的依据

包括方法研制、实验条件的确定相关技术分析和方法的性能检验考察等内容。

7.1 确定适用范围及检出限

本方法是针对蔬菜水果中氟虫腈农药残留的检测，选择的适用范围是蕹菜（空心菜）、芹菜、小白菜、大白菜、菠菜、生菜、苋菜、茼蒿、油麦菜、上海青、香菜、葱、韭菜、洋葱、大蒜、菜薹（菜心）、结球甘蓝（包菜）、花椰菜、芥蓝、青花菜（西蓝花）、茄子、辣椒、番茄、甜椒、南瓜、西葫芦、冬瓜、黄瓜、苦瓜、腌制用小黄瓜、丝瓜、豇豆、扁豆、豌豆、芦笋、生姜、白萝卜、马铃薯、芋头、胡萝卜、山药、莲藕、绿豆芽、黄豆芽、玉米笋、柑、橙、蜜桔、柠檬、柚子、苹果、梨、水蜜桃、葡萄、草莓、芒果、西瓜、哈密瓜。我国标准GB 2763-2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》 中规定蔬菜水果中氟虫腈的最大残留限量。《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科[2017]43 号）规定，最低检出水平（检出限）设置对于存在国家标准限值规定的物质应小于或等于限值规定。因此本方法的检测性能（定性限）设定为GB 2763-2021规定的最大残留限量。

7.2 方法性能确定实验用到的检测试纸条

经过大量市场调研，市售氟虫腈快速检测产品较多。主要包括深圳市易瑞生物技术股份有限公司、广州万联生物科技有限公司、江苏美正生物科技有限公司、北京勤邦生物技术有限公司、广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司、无锡中德伯尔生物技术有限公司、深圳市三方圆生物科技股份有限公司等快检厂家。各厂家的检出限均符合GB 2763-2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中规定鳞茎类蔬菜、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、水生类蔬菜、芽菜类蔬菜、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（香蕉除外），瓜果类水果中氟虫腈含量不得超过0.02 mg/kg的要求。最终本项目选择深圳市易瑞生物技术股份有限公司的氟虫腈胶体金试纸条进行方法学研究。该产品适用范围与检测限均满足本项目的要求。

7.3 方法性能确定实验用到的样品

空白样品：经仪器方法确认，未检出氟虫腈的蔬菜水果。

7.4 方法性能确定实验用到的标准品

标准品名称：丙酮中氟虫腈溶液标准物质

品牌及编号：北京坛墨质检科技有限公司，产品编号GBW(E)083564

浓度：1000mg/L（丙酮）

7.5 测定步骤与结果判读的确定

**7.5.1** **样品的前处理****样品分析步骤的确定**

7.5.1.1试样制备

称取不少于200 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。留样储存于－18℃以下保存。

7.5.1.2 试样提取

准确称取剪碎混匀的试样2 g（精确至0.01 g）至15 mL离心管中，加入8 mL样品提取液，盖上盖子，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，取上清液即为待测液。

**7.5.2 测定步骤的确定**

7.5.2.1测定液的准备

GB 2763中不同蔬菜、水果基质的氟虫腈限量要求不同，其待测液处理方式见下表。

|  |  |
| --- | --- |
| 基质种类 | 处理方式 |
| 蕹菜（空心菜）、芹菜、小白菜、大白菜、菠菜、生菜、苋菜、茼蒿、油麦菜、上海青、香菜、葱、韭菜、洋葱、大蒜、菜薹（菜心）、结球甘蓝（包菜）、花椰菜、芥蓝、青花菜（西蓝花）、茄子、辣椒、番茄、甜椒、南瓜、西葫芦、冬瓜、黄瓜、苦瓜、腌制用小黄瓜、丝瓜、豇豆、扁豆、豌豆、芦笋、生姜、白萝卜、马铃薯、芋头、胡萝卜、山药、莲藕、绿豆芽、黄豆芽、玉米笋、柑、橙、蜜桔、柠檬、柚子、苹果、梨、水蜜桃、葡萄、草莓、芒果、西瓜、哈密瓜 | 在金标微孔中加入200 μL待测液，用一次性吸管上下抽吸5～10次直至微孔试剂混合均匀。 |

7.5.2.2测定

将以上混匀后的测试样品在室温(20～30℃)温育3 min，将试纸条插入到金标微孔中，室温(20～30℃)反应6 min后，从微孔中取出试纸条，除去试纸条下端的样品垫，进行结果判定。

1. 测定步骤建议按照试纸条说明书。
2. 结果判定建议使用读数仪，读数仪的具体使用参照仪器使用说明书。

**7.5.3 测定步骤的确定**

根据胶体金免疫层析试剂盒说明书要求进行结果判定，可采用目视法或胶体金读数仪法判定结果。

（一）目视法

通过对比质控线(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。

2、阳性结果

质控线(C线)显色若检测线(T线)不显色或颜色浅于质控线(C线)表示试样中含有氟虫腈且其含量高于方法检出限，判定为阳性结果。

3、阴性结果

质控线(C线)显色若检测线(T线)颜色深于或等于质控线(C线)表示试样中不含氟虫腈成其含量低于方法检出限，判定视为阴性结果。



图2 结果判定示意图

（二）胶体金读数仪法

按照胶体金读数仪说明书进行操作，直接读取检测结果，并按胶体金读数仪说明书进行判定。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。

**7.5.4 质控试验的确定**

每批样品应同时进行空白试验和阳性质控试验，可根据检测样品量制定适宜频次的质控试验。

7.6 方法性能确定实验方案

**7.6.1 样品本底的测定**

采集的样品根据SN/T 1982-2007 《进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》确定本底值，选取阴性样品作为空白样品用于方法验证实验。

**7.6.2灵敏度和假阴性率的计算**

由于GB 2763-2021中规定鳞茎类蔬菜、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、水生类蔬菜、芽菜类蔬菜、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（香蕉除外），瓜果类水果中氟虫腈的限量为0.02 mg/kg（按最低限量），因此设定0.02 mg/kg为方法检出限，即关注浓度。添加水平为1倍关注浓度、2倍关注浓度，考察灵敏度和假阴性率，计算方法见附表1。

**7.6.3特异性和假阳性的计算**

选取50个空白样品，以及50个添加水平为0.5 倍关注浓度样品，考察特异性和假阳性率。计算方法见附表1。

**7.6.4与参比方法一致性分析**

选取菜心、菠菜、草莓样品各10份进行方法比对，参比方法为SN/T 1982-2007 《进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》。

**7.6.5交叉反应**

食品安全检验工作中常见的同类农药、类似物或可能联合使用的农药包括乙虫腈、溴虫腈、敌百虫等。为考察本方法所采用的胶体金试纸条对上述化合物的交叉反应，用样品稀释液将各化合物配制成20倍检出限浓度的混标，然后进行检测。

**7.6.6 阳性样品对比**

选取经SN/T 1982-2007 法测定为阳性的蔬菜水果样品，按本方法用胶体金试纸条进行验证。

**7.6.7其他品牌胶体金试纸条的验证**

为验证其他品牌的氟虫腈胶体金试纸条对本标准的适用性，选择北京勤邦生物技术有限公司、广州万联生物科技有限公司两家公司研制生产的氟虫腈胶体金试纸条对空白样品、0.5 倍关注浓度、1倍关注浓度及2倍关注浓度进行测定。

八、方法性能验证结果

8.1 样品前处理条件优化

本项目组参考了已发布的快速检测方法KJ 201710《蔬菜中敌百虫、丙溴磷、灭多威、克百威、敌敌畏残留的快速检测》。该快速检测方法的样品前处理过程可以概况为：（1）称样；（2）缓冲溶液（pH 8.0的PB缓冲液）提取；（3）振摇；（4）静置，得上清液，待用。整个样品前处理过程简单、快速，不使用有机溶剂，安全无毒。另外，本项目组还参考了T/NXSPAQXH 001-2019《枸杞中12种农药残留快速检测方法 胶体金免疫层析法》，样品前处理方法也是提取液提取后，振荡混匀、静置，用上清液进行测定。

综合上述信息，本项目组确定了样品前处理方法为：准确称取剪碎混匀的试样2 g（精确至0.01 g）至15 mL离心管中，加入样品提取液，盖上盖子，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，取上清液即为待测液。

8.1.1 提取液体积

选用菜心阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.02 mg/kg），各称取2 g放入离心管中，分别加入4、8、16 mL提取液，盖上盖子，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，上清液适当稀释后进行检测。

表1 提取液体积对检测结果的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 提取液体积（mL） |
| 4 | 8 | 16 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.02 | C线 | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：随着提取液体积的增加，胶体金试纸条中的条带颜色有变深的趋势。当提取液体积为4 mL时，C线和T线颜色相对略浅，虽然可以有效判读阴性或阳性结果，但显色仍然不是特别充分、均匀，表明提取效率不高；当提取液体积为16 mL时，阳性样品的T线颜色显著变深，不能被有效抑制住；当提取液体积为8 mL时，提取效率最高，0 mg/kg、0.02 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.02 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。由此可见，提取液过少或过多，提取效率都会有所降低，易出现错误结果。本方法的提取液体积建议为8 mL。

因此，本方法最终确定的前处理过程为：准确称取剪碎混匀的试样2 g（精确至0.01 g）至15 mL离心管中，加入8 mL样品提取液，盖上盖子，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，取上清液即为待测液。考虑GB 2763规定不同的食品最大的农药残留最大限量不同，不同的蔬菜水果再根据限量值取上清液和提取液进一步稀释。也考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的前处理方法进行操作。

8.2 测定条件研究

样品前处理完成后，取待测液进行胶体金试纸条定性检测。本项目对定性检测结果可能产生影响的相关因素进行研究，确定测定条件。

8.2.1 待测液-微孔孵育时间

选用菜心阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.02 mg/kg），按7.5.1确定的方法进行样品前处理。取200 μL待测液加入试纸条的金标微孔中→室温反应时间梯度：1、3、5、7 min→读取检测结果。

本方法所采用的胶体金试纸条，产品说明书的孵育时间为3 min。为了考察待测液-微孔孵育时间对抗原抗体反应的影响，研究对比了菜心基质的1 min 、3 min、5min、7 min孵育时间的测定结果，详见表2。

表2 试纸条待测液-微孔孵育反应时间对检测结果的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 反应时间（min） |
| 1 | 3 | 5 | 7 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.02 | C线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋＋ |
| T线 | ＋/－ | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：试纸条待测液-微孔孵育反应时间在1~7 min范围内，随着时间的延长，胶体金试纸条中的条带颜色显著变深。当反应1 min时，阳性样品的检测结果中T线和C线显色不充分，两者颜色呈度相近，不利于有效判读阴性或阳性结果；当反应3 min时，0 mg/kg、0.02 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.02 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。

当反应5 min、7 min时，阴性样品检测结果，C线显色严重；阳性样品检测结果，T线显色严重，不能被抑制住。由此可见，反应时间过长，极易出现错误结果。本方法的反应时间建议为3 min。同样，考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的时间进行操作。

8.2.2 试纸条-待测液反应时间

本方法所采用的胶体金试纸条，产品说明书的反应时间为6 min。研究对比了菜心基质的1 min 、3 min、6 min、12 min反应时间的测定结果，详见表3。

表3 试纸条-待测液反应时间对检测结果的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 反应时间（min） |
| 1 | 3 | 6 | 12 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.02 | C线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋＋ |
| T线 | ＋/－ | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：试纸条反应时间在1~12 min范围内，随着时间的延长，胶体金试纸条中的条带颜色显著变深。当反应1 min时，阳性样品的检测结果中T线和C线显色不充分，两者颜色呈度相近，不利于有效判读阴性或阳性结果；当反应3 min时，C线和T线颜色仍相对略浅，虽然可以有效判读阴性或阳性结果，但显色仍然不是特别充分、均匀；当反应6 min时，0 mg/kg、0.02 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.02 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。当反应12 min时，阴性样品检测结果，C线显色严重；阳性样品检测结果，T线显色严重，不能被抑制住。由此可见，反应时间过长，极易出现错误结果。本方法的反应时间建议为6 min。同样，考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的时间进行操作。

8.2.3反应温度

选用菜心阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.02 mg/kg），按7.5.1确定的方法进行样品前处理。取200 μL待测液加入试纸条的金标微孔中→15℃、室温、35℃、45℃反应3 min→插入试纸条反应6 min→读取检测结果。

表4 试纸条反应温度对检测结果的影响

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 添加浓度（mg/kg） | 显色 | 反应温度（℃） |
| 15 | 室温 | 35 | 45 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.02 | C线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋/－ | ＋ | ＋ | ＋＋ |

注：+、－代表显色情况。+++表示着色很深；++表示着色较深；+表示着色淡；－表示没有着色。

由上述结果可知：随着反应温度的升高，胶体金试纸条中的条带颜色有变深的趋势。当反应温度为15℃时，C线和T线颜色相对略浅；当反应温度为45℃时，阳性样品的T线颜色显著变深，不能被有效抑制住。当反应温度为室温和35℃时，0 mg/kg、0.02 mg/kg两个浓度水平的检测结果中T线和C线显色充分：0 mg/kg，T线大于C线，阴性结果；0.02 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。由此可见，抗体与待测目标物进行结合反应，需要在适宜温度条件下才能高效反应，温度过高或过低都不利于结合反应的进行。考虑到操作的便捷性，本方法的试纸条反应温度选择室温。同样，考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，因此本方法在实际使用中也可按照产品说明书规定的温度进行操作。

8.3 灵敏度和假阴性率

选取经SN/T 1982-2007 《进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》测试不含氟虫腈的菜心、菠菜、草莓作为空白样品，GB 2763-2021中规定菜心、菠菜、草莓中氟虫腈的限量为0.02 mg/kg（按最低限量），因此设定0.02 mg/kg为方法检出限，即关注浓度。添加水平为1倍关注浓度、2倍关注浓度，考察灵敏度和假阴性率。两个浓度水平的样品，每个浓度水平各50 份试样，按前述样品前处理方法进行。试纸条检测结果如下：

表5 1倍检测限和2倍检测限试纸条检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 检测对象 | 添加浓度（mg/kg） | 检测结果  | 灵敏度（%） | 假阴性率（%） | 总体灵敏度（%） | 总体假阴性率（%） |
| 菜心 | 0.02 | 0（－），50（＋） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.04 | 0（－），50（＋） | 100 | 0 |
| 菠菜 | 0.02 | 0（－），50（＋） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.04 | 0（－），50（＋） | 100 | 0 |
| 草莓 | 0.02 | 0（－），50（＋） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.04 | 0（－），50（＋） | 100 | 0 |

结论：1倍检测限和2倍检测限氟虫腈胶体金检测试纸条结果都为阳性，因此灵敏度≥95%，假阴性率≤5%。

8.4特异性和假阳性

选用菜心、菠菜、草莓样品，采用空白基质加标的方式，制备成2个浓度水平（0、0.01 mg/kg）的样品各50份。采用本方法规定的样品前处理和测定步骤对样品进行检测，试纸条检测结果如下：

表6 0.5倍检测限和空白基质试纸条检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 检测对象 | 添加浓度（mg/kg） | 检测结果  | 特异性（%） | 假阳性率（%） | 总体特异性（%） | 总体假阳性率（%） |
| 菜心 | 0 | 50（－），0（＋） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.01 | 50（－），0（＋） | 100 | 0 |
| 菠菜 | 0 | 50（－），0（＋） | 100 | 0 | 99 | 1 |
| 0.01 | 49（－），1（＋） | 98 | 2 |
| 草莓 | 0 | 50（－），0（＋） | 100 | 0 | 98 | 2 |
| 0.01 | 48（－），2（＋） | 96 | 4 |

结论：0.5倍检测限和空白基质氟虫腈胶体金检测试纸条结果都为阴性，因此特异性≥90%，假阳性率≤10%。

8.5 与参比方法一致性

选取自然样品，菜心、菠菜、草莓各10份，分别用胶体金免疫层析方法和参比方法SN/T 1982-2007 《进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》进行检测。两种方法的一致性分析按照《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科【2017】43 号）要求进行卡方检验与显著性差异分析。

表7 菜心比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 胶体金法检测结果 | － | + | － | － | － | － | － | － | － | － |
| 参比法检测结果(mg/kg) | ND | 0.09 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

表8 菠菜比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 胶体金法检测结果 | － | － | － | － | － | － | － | － | + | － |
| 参比法检测结果(mg/kg) | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.12 | ND |

表9 草莓比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 胶体金法检测结果 | － | － | + | － | － | － | － | － | － | － |
| 参比法检测结果(mg/kg) | ND | ND | 0.06 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

注：参比法检测结果ND代表未检出，－代表低于胶体金法检出限并高于参比法检测限；胶体金法检测结果－代表低于检出限，+代表高于检出限。

结论：由结果可见试纸条法与仪器法结果一致率达到100%，表明试纸条法检测准确率较高。

8.6 交叉反应率结果

采用与待检药物同类药物、类似物或可能联合使用的药物测定特异性，乙虫腈、溴虫腈、敌百虫等药物属于该范畴，有可能会产生交叉反应。为了考察本方法所采用的胶体金试纸条对上述化合物的交叉反应，将各化合物配制成20倍检出限浓度，然后进行检测，结果见表10。

表10 交叉反应实验

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 化合物名称 | 浓度（mg/kg） | 检测结果 | 交叉反应率 |
| 氟虫腈 | 0.02 | 阳性 | 100% |
| 乙虫腈 | 0.4 | 阴性 | 无 |
| 溴虫腈 | 0.4 | 阴性 | 无 |
| 敌百虫 | 0.4 | 阴性 | 无 |

结论：由结果可知，本方法采用的胶体金试纸条对上述药物均无交叉反应。

8.7 阳性样品胶体金试纸条检测结果

将阳性菜心、菠菜、草莓样品用氟虫腈胶体金试纸条检测的结果见图3，结果检测结果为阳性，与仪器法结果相一致，表明此方法可以用于实际样品的检测。



图3 实际样品检测结果

8.8 其他品牌胶体金试纸条验证

使用北京勤邦生物技术有限公司和广州万联生物科技有限公司研制生产的氟虫腈胶体金试纸条对空白样品、0.5 倍关注浓度、1倍关注浓度及2倍关注浓度的测定结果见表11。

表11 不同品牌的胶体金试纸条检测结果

|  |  |
| --- | --- |
| 品牌 | 浓度 |
| 空白 | 0.5倍检测水平 | 1倍检测水平 | 2倍检测水平 |
| 北京勤邦生物技术有限公司 | 0（＋）20（－） | 0（＋）20（－） | 20（＋）0（－） | 20（＋）0（－） |
| 广州万联生物科技有限公司 | 0（＋）20（－） | 0（＋）20（－） | 20（＋）0（－） | 20（＋）0（－） |

注：－代表低于检出限，+代表高于检出限。

结论：由结果可见，1倍关注浓度及2倍关注浓度下试纸条结果均为阳性，空白样品和0.5 倍关注浓度结果均为阴性，表明本标准适用于不同品牌的氟虫腈胶体金试纸条。

九、方法性能验证结论

本研究采用胶体金免疫层析方法对蔬菜水果中的氟虫腈进行检测。

本快速检测方法在起草过程中，参考了蔬菜水果中氟虫腈检测的相关标准，筛选出一种简单、快速、成本低廉的样品前处理方法。通过单因素变量测试，对影响胶体金试纸条检测结果的测定条件进行了研究，确定了提取液体积、待测液-微孔孵育时间、试纸条-待测液反应时间、检测反应温度等测定条件。考虑到不同厂家生产的快速检测产品存在多方面的不同，本方法对测定条件不做限定，在实际工作中可按照产品说明书规定的测定步骤进行操作。

检测结果表明蕹菜（空心菜）、芹菜、小白菜、大白菜、菠菜、生菜、苋菜、茼蒿、油麦菜、上海青、香菜、葱、韭菜、洋葱、大蒜、菜薹（菜心）、结球甘蓝（包菜）、花椰菜、芥蓝、青花菜（西蓝花）、茄子、辣椒、番茄、甜椒、南瓜、西葫芦、冬瓜、黄瓜、苦瓜、腌制用小黄瓜、丝瓜、豇豆、扁豆、豌豆、芦笋、生姜、白萝卜、马铃薯、芋头、胡萝卜、山药、莲藕、绿豆芽、黄豆芽、玉米笋、柑、橙、蜜桔、柠檬、柚子、苹果、梨、水蜜桃、葡萄、草莓、芒果、西瓜、哈密瓜的检出限设定为0.02 mg/kg时，该方法灵敏度≥95%，特异性≥90%，假阴性率≤5%，假阳性率≤10%。经过方法验证表明，该氟虫腈试纸条具有很好的灵敏度与特异性。符合本方法规定性能指标要求（灵敏度≥95%，特异性≥90%，假阴性率≤5%，假阳性率≤10%）。

本项目也对本快速检测方法进行实验室间验证，验证结果不仅证实了本快速检测方法性能指标，也证明了本快速检测方法切实可行，具有良好的可操作性。各机构的验证反馈报告见《蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法》验证报告。

表12 四种浓度水平样品方法性能指标计算表（以菜心为例）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品情况" | 检测结果b | 总数 |
| 阳性 | 阴性 |
| 菜心 |
| 阳性（1倍检测限） | 50 | 0 | 50 |
| 阳性（2倍检测限） | 50 | 0 | 50 |
| 阴性（空白） | 0 | 50 | 50 |
| 阴性（1/2倍检测限） | 0 | 50 | 50 |
| 总数 | 100 | 100 | 200 |
| 显著性差异(X2) | 0 |
| 灵敏度（p+，％) | p+=100/100=100% |
| 特异性（ p-， %） | p-=100/100=100% |
| 假阴性率（ pf-， %) | pf-=0/100=0% |
| 假阳性率（ pf+， %) | pf+=0/100=0% |
| 相对准确度， %c | (100+100)/(100+100)=100% |
| 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。 |

十、方法可能带来的经济和社会影响评估

本项目将提供一种快速检测蔬菜水果中氟虫腈的免疫胶体金方法。方法简便高效，为国内不同检测机构，尤其是生产一线及基层部门提供科学、统一的快速测定方法，是实验室常规检测方法的有益补充，社会效益尤为明显：一是为蔬菜水果农药残留监控工作提供有效的现场快速检测手段，显著提升我国蔬菜水果食品安全监控水平和快速反应能力，减少突发性安全事件的发生；二是通过实现基层监管和商超、种植企业的自我品质监控，从源头实现控制或禁止流通，有效保护我国消费者健康、促进蔬菜水果农产品贸易和种植业的健康持续发展；三是通过消费者参与检测，提升食品安全监管透明度，增强民众对政府监管的信任度，有助于维护社会和谐稳定。

另一方面，项目的实施将通过快速检测是试纸条的产业化获得直接的经济效益，也能通过提高检测效率、减少检测成本等途径间接提高经济效益，据保守估计间接经济效益可达到检测成本的70%以上，主要以消耗品、仪器设备资源的占用、人工成本的形式体现出来。

本方法操作简便、试剂耗材廉价，通过宣贯和培训，可以有效推广应用。本方法的实施不会对经济和社会带来负面影响。

十一、起草过程中主要分歧意见的处理情况

本标准制定过程中无重大分歧意见。

附 表1

快速检测方法性能指标计算表

表A.1性能指标计算方法

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品情况" | 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(X2) | X2=(|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 | （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。 |