ICS 67.050

CCS X 04

|  |
| --- |
|  |

团体标准

T/SATA XXX—2022

|  |
| --- |
|   |

蔬菜水果中氟虫腈的快速检测

胶体金免疫层析法

Rapid detection of fipronil residues in vegetables and fruits

 — colloidal gold immunochromatography

（征求意见稿）

|  |
| --- |
|  |
|       |

2022 - XX - XX发布

2022 - XX - XX实施

深圳市分析测试协会   发布

目  次

[目次 I](#_Toc93438949)

[前言 II](#_Toc93438950)

[1 范围 1](#_Toc93438951)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc93438952)

[3 原理 1](#_Toc93438953)

[4 试剂与材料 1](#_Toc93438954)

[5 仪器与设备 2](#_Toc93438955)

[6 分析步骤 2](#_Toc93438956)

[7 结果判定 3](#_Toc93438957)

[8 结论 4](#_Toc93438958)

[9 性能指标 4](#_Toc93438959)

[10 其他 5](#_Toc93438960)

[附录A 6](#_Toc93438961)

[定性方法性能指标计算表 6](#_Toc93438962)

 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。

本文件由深圳市易瑞生物技术股份有限公司提出。

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。

本文件主要起草人：李婷、王炳志、吕海明、付辉、张远霞、杨嘉豪、张欣欣、王雅思、李城、高荣健。

本文件为首次发布。

蔬菜水果中氟虫腈的快速检测 胶体金免疫层析法

1. 范围

本文件规定了蔬菜水果中氟虫腈的胶体金免疫层析快速检测的原理、试剂与材料、仪器与设备、分析步骤、结果判定、结论、性能指标。

本文件适用于蔬菜水果中氟虫腈残留的快速筛选检验。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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实验方法

食药监办科[2017]43号 食品快速检测方法评价技术规范

1. 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的氟虫腈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，对样品中氟虫腈进行定性判定。

1. 试剂与材料
	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中二级水的要求。

4.1.1 氯化钠（NaCl）。

4.1.2 十二水合磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）。

4.1.3 二水合磷酸二氢钠（NaH2PO4·2H2O）。

4.1.4 丙酮（CH3COCH3）。

* 1. 试剂配制

样品提取液(0.1 mmol/L磷酸盐缓冲溶液，pH值为8.0)：准确称取氯化钠(4.1.1)9 g、十二水合磷酸氢二钠(4.1.2)6 g、二水合磷酸二氢钠(4.1.3)0.4 g，用水溶解并定容至100 mL，即为样品提取液。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒专用缓冲液。

* 1. 参考物质

氟虫腈中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量见表1，纯度≥98%。

表1 参考物质信息表

| 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子量 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 氟虫腈 | Fipronil | 120068-37-3 | C12H4Cl2F6N4OS | 437.2 |

注：或等同可溯源物质。

* 1. 标准溶液配制

4.4.1 氟虫腈标准储备液（100 μg/mL）：精密称取氟虫腈参考物质（4.3）1 mg，置于10 mL容量瓶中，用丙酮（4.1.4）溶解并稀释至刻度，摇匀，制成浓度为100 μg/mL的氟虫腈标准储备液。或可直接购买氟虫腈标准储备液。-18℃避光保存，有效期6个月。

4.4.2 氟虫腈标准中间液（10 μg/mL）：精密量取氟虫腈标准储备液（100 μg/mL）（4.4.1）1 mL，置于10 mL容量瓶中，用丙酮（4.1.4）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 10 μg/mL的氟虫腈标准中间液。4℃避光保存，有效期3个月。

4.4.3 氟虫腈标准工作液（1 μg/mL）：精密量取氟虫腈标准中间液（10 μg/mL）（4.4.2）1 mL，置于10 mL容量瓶中，用丙酮（4.1.4）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 1 μg/mL的氟虫腈标准工作液。4℃避光保存，有效期3个月。

* 1. 材料

氟虫腈胶体金快速检测试剂盒。需在阴凉、干燥、避光条件下保存。

4.5.1 金标微孔（含胶体金标记的特异性抗体）。

4.5.2 试纸条或检测卡。

4.5.3 离心管。

1. 仪器与设备

5.1 电子天平：感量为0.01mg和0.01g。

5.2 移液器：100μL，200μL，1mL，5mL。

5.3 粉碎机。

5.4 离心机：转速≥4000 r/min。

5.5 涡旋混合器。

5.6 温育器。

5.7 胶体金读数仪(可选)。

1. 分析步骤
	1. 试样制备

称取不少于200 g具有代表性的样品，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。

* 1. 试样提取

准确称取制备好的试样2 g(精确至0.01 g)至15 mL离心管中，加入8 mL样品提取液(4.2)，盖上盖子，涡旋混合器混匀或手动上下振荡混匀30 s，静置分层或4000 r/min离心1 min，上清液即为待测液。

* 1. 测定步骤
		1. 测定液的准备

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。 |

* + 1. 测定

将以上(6.3.1)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。
	1. 质控试验
		1. 空白试验

准确称取空白试样，按照6.2和6.3步骤与样品同法操作；也可在金标微孔中加入200 μL缓冲液，用一次性吸管上下抽吸5~10次直至微孔试剂混合均匀后，按6.3.2操作。

* + 1. 加标质控试验

测定蕹菜（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、哈密瓜时，称取氟虫腈含量为0.02 mg/kg的质控样，或称取空白试样，加入适量氟虫腈标准工作液（1 μg/mL）（4.4.3），使氟虫腈的添加量为0.02 mg/kg，按照6.2和6.3步骤与样品同法操作。

注：每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。

1. 结果判定
	1. 目视法

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。

* + 1. 无效结果

控制线(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。

* + 1. 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)表示试样中不含氟虫腈或其含量低于方法检出限，判定为阴性结果。

* + 1. 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)表示试样中含有氟虫腈且其含量高于方法检出限，判定为阳性结果。



图1

* 1. 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。

* 1. 质控试验结果

空白试验测定结果应为阴性结果，加标质控试验测定结果应为阳性结果。

1. 结论

当检测结果为阳性时，应采用指定参比方法对结果进行确证。

1. 性能指标
	1. 检出限

本方法蕹菜（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、哈密瓜中氟虫腈的检出限为0.02 mg/kg。

* 1. 灵敏度

灵敏度：≥95%。

* 1. 特异性

特异性：≥90%

* 1. 假阴性率

假阴性率：≤5%。

* 1. 假阳性率

假阳性率：≤10%。

注：性能指标计算方法见附录A。

1. 其他

本方法分析步骤和结果判定可以根据厂家试剂盒的说明书进行，但应符合或优于本方法规定的性能指标。

本方法所述试剂、试剂盒信息、操作步骤及结果判定要求是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为SN/T 1982《进出口食品中氟虫腈残留量检测方法 气相色谱-质谱法》。

附录A

（规范性）

定性方法性能指标计算表

定性方法各个性能指标计算见表A.1。

表A.1 定性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+N21 | N.2=N12+N22 | N=N1.+N2.或N.1+N.2 |
| 显著性差异（χ2） | χ2=（⏐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.) |
| 注：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。 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_