ICS 67.050

CCS X 04

|  |
| --- |
|  |

团体标准

T/SATA XXX—2022

|  |
| --- |
|   |

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

（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、广东省食品检验所。

本文件主要起草人：王炳志、刘海虹、廖俊佳、范海艳、朱茵茵、麦烨聪、严义勇、刘晓慧、林泳欣、黄永健。

本文件为首次发布。

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

本文件规定了蔬菜水果中甲基异柳磷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甲基异柳磷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

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 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 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 甲基异柳磷 | Isofenphos-methyl | 101365-44-0 | C13H20NO4PS | 317.34 |

注：或等同可溯源物质。

* 1. 标准溶液配制

4.4.1 甲基异柳磷标准储备液（100 μg/mL）：精密称取甲基异柳磷参考物质（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的甲基异柳磷标准储备液。或可直接购买甲基异柳磷标准储备液。-18℃避光保存，有效期6个月。

4.4.2 甲基异柳磷标准中间液（10 μg/mL）：精密量取甲基异柳磷标准储备液（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的甲基异柳磷标准中间液。4℃避光保存，有效期3个月。

4.4.3 甲基异柳磷标准工作液（1 μg/mL）：精密量取甲基异柳磷标准中间液（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的甲基异柳磷标准工作液。4℃避光保存，有效期3个月。

* 1. 材料

甲基异柳磷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具有代表性的黄瓜，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

GB 2763中不同蔬菜、水果基质的甲基异柳磷限量要求不同，其待测液处理方式见下表。

|  |  |
| --- | --- |
| 基质种类 | 处理方式 |
| 韭菜、葱、花椰菜、芥蓝、芹菜、上海青，菠菜、茄子、青椒、丝黄瓜、苦瓜、芸豆、豇豆、芦笋、胡萝卜、姜、山药、莲藕、茭白、黄豆芽、绿豆芽、黄花菜、竹笋、柑、橘、苹果、梨、桃，枣，草莓、蓝莓、香蕉、荔枝，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。 |
| 甘薯 | 在金标微孔中加入160 μL样品提取液(4.2)和40 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

测定韭菜、葱、花椰菜、芥蓝、芹菜、上海青，菠菜、茄子、青椒、丝黄瓜、苦瓜、芸豆、豇豆、芦笋、胡萝卜、姜、山药、莲藕、茭白、黄豆芽、绿豆芽、黄花菜、竹笋、柑、橘、苹果、梨、桃，枣，草莓、蓝莓、香蕉、荔枝，西瓜、哈密瓜时，称取甲基异柳磷含量为0.01 mg/kg的质控样，或称取空白试样，加入适量甲基异柳磷标准工作液（1 μg/mL）（4.4.3），使甲基异柳磷的添加量为0.01 mg/kg，按照6.2和6.3步骤与样品同法操作。

测定甘薯时，称取甲基异柳磷含量为0.05 mg/kg的质控样，或称取空白试样，加入适量甲基异柳磷标准中间液（10 μg/mL）（4.4.2），使甲基异柳磷的添加量为0.05 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)表示试样中不含甲基异柳磷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)表示试样中含有甲基异柳磷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

本方法韭菜、葱、花椰菜、芥蓝、芹菜、上海青，菠菜、茄子、青椒、丝黄瓜、苦瓜、芸豆、豇豆、芦笋、胡萝卜、姜、山药、莲藕、茭白、黄豆芽、绿豆芽、黄花菜、竹笋、柑、橘、苹果、梨、桃，枣，草莓、蓝莓、香蕉、荔枝，西瓜、哈密瓜中甲基异柳磷的检出限为0.01 mg/kg，甘薯中甲基异柳磷的检出限为0.01 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）

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。 |

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