《蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 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](#_Toc3749)

[二、项目的前期研究 1](#_Toc29528)

[三、第一阶段 项目团体标准正式立项 2](#_Toc29145)

[四、第二阶段 调研并形成《蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 胶体金免疫层析法》团体标准（征求意见稿） 3](#_Toc28667)

[五、与国内外有关法律法规和其它标准的关系 3](#_Toc19031)

[六、标准的制（修）订原则 4](#_Toc14316)

[6.1 实用性原则 5](#_Toc18526)

[6.2 协调性原则 5](#_Toc24036)

[6.3 规范性原则 5](#_Toc4465)

[6.4 前瞻性原则 5](#_Toc89)

[七、各项技术内容确定的依据 6](#_Toc9511)

[7.1 确定适用范围及检出限 6](#_Toc30617)

[7.2 方法性能确定实验用到的检测试纸条 7](#_Toc15712)

[7.3 方法性能确定实验用到的样品 7](#_Toc30119)

[7.4 方法性能确定实验用到的标准品 7](#_Toc11564)

[7.5 测定步骤与结果判读的确定 7](#_Toc11782)

[7.6 方法性能确定实验方案 10](#_Toc7800)

[八、方法性能验证结果 12](#_Toc9917)

[8.1 样品前处理条件优化 12](#_Toc10903)

[8.2 测定条件研究 14](#_Toc1902)

[8.3 灵敏度和假阴性率 18](#_Toc20392)

[8.4特异性和假阳性 19](#_Toc21224)

[8.5 与参比方法一致性 19](#_Toc3277)

[8.6 交叉反应率结果 20](#_Toc19942)

[8.7 阳性样品胶体金试纸条检测结果 21](#_Toc20785)

[8.8 其他品牌胶体金试纸条验证 22](#_Toc31417)

[九、方法性能验证结论 22](#_Toc3673)

[十、方法可能带来的经济和社会影响评估 24](#_Toc25471)

[十一、起草过程中主要分歧意见的处理情况 25](#_Toc12779)

[**附 表1 快速检测方法性能指标计算表** 26](#_Toc9028)

一、标准立项的背景及意义

目前我国许多地区在农业生产，尤其是蔬菜、水果生产中，常以喷洒化学农药作为防治病虫害的主要手段，当今普遍使用的农药主要是有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯3大类，其中对人畜造成严重危害的，主要还是有机磷农药。甲基异柳磷，按照我国农药毒性分级标准，是一种高毒土壤杀虫剂，属于硫代磷酸酯类有机磷农药，对蝼蛄、蛴螬、金针虫等害虫具有较强的触杀和胃毒作用，效力高，杀虫谱广。甲基异柳磷能强烈抑制人体内胆碱酯酶活性，引起严重的毒蕈样、烟碱样和中枢神经系统症状。甲基异柳磷对人畜毒性较大，可通过食道、呼吸道和皮肤引起中毒。早在2002年农业部第199号公告就规定甲基异柳磷禁止在蔬菜、果树、茶叶等上使用。

近年来，广东省风险监测和监督抽检数据中，蔬菜中依然存在甲基异柳磷残留现象，危害公众健康。蔬菜水果等食用农产品具有品种类别多样性、生产流通复杂性、安全问题易发性等特点，食品安全监督抽检存在发现问题滞后等特性。因此建立一种快速准确的蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测方法十分必要。

本研究无论从社会效益还是经济效益角度来说，都具有重大的应用意义，可以广泛应用于各级市场监督部门现场筛查、专项行动等，可以有效提高覆盖及靶向命中率，用现代化快速检测技术来装备我国食品安全管理体系，使其在保障我国食品安全方面发挥更重要的作用。

二、项目的前期研究

标准的制定本方法研究过程中查阅了国内外相关参考文献，研究了蔬菜水果中甲基异柳磷的样品前处理方法。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，对甲基异柳磷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，建立了蔬菜水果中甲基异柳磷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。

蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 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《蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 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、广东省食品检验所。

本方法主要起草人：XXX。

四、第二阶段 调研并形成《蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 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《蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 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）、广东省食品检验所，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

在我国现行标准中，GB 2763－2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》规定食品中甲基异柳磷最大残留量的限量值为0.01～0.05 mg/kg，其中水果、蔬菜（甘薯除外）限量均为0.01 mg/kg，甘薯限量为0.05 mg/kg。

检测方法：目前国内蔬菜水果中甲基异柳磷的检测方法有气相色谱法和气相色谱－质谱法。对于甲基异柳磷检测标准有两种，分别是GB/T 5009.144－2003《植物性食品中甲基异柳磷残留量的测定》和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》。

目前，国内常用的气相色谱法和气相色谱－质谱法为传统实验室检测方法，检测周期长、价格昂贵、操作复杂，不适合现场少量样品的快速检测。胶体金免疫层析法特异性强、操作简便、检测成本低，是目前技术较成熟、应用最广泛的现场快速检测方法之一，特别适合食用农产品、餐饮食品、散装食品等快速流通样品的现场快速筛查。本研究拟建立一种甲基异柳磷的胶体金免疫层析快速检测方法用于基层食品安全监管开展现场快速筛查。

# 六、标准的制（修）订原则

本标准文件按照原国家食药总局《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科【2017】43号）的相关技术要求、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》以及《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。

快检方法编制应遵循原国家食药监总局发布的技术规范和现有抽样检验相关法规和标准要求，以发现问题样品为导向，有利于在实际监管工作中推广应用。

6.2 协调性原则

在《蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测 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、规范蔬菜水果中甲基异柳磷胶体金产品和市场，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

方法表述参照现行法定标准要求进行，结构严谨合理，内容编排和层次划分符合逻辑，文字力求准确、简明、易懂。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

本标准在兼顾当前甲基异柳磷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甲基异柳磷农药残留的检测，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、甘薯。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》中规定了上述蔬菜水果中甲基异柳磷的最大残留量。《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）根据GB 2763-2021中的最大残留限量设定。

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，市售甲基异柳磷快速检测产品较多，主要包括深圳市易瑞生物技术股份有限公司、江苏美正生物科技有限公司、北京勤邦生物技术有限公司、深圳市绿诗源生物技术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》中规定的蔬菜水果中甲基异柳磷最大残留量。最终本项目选择深圳市易瑞生物技术股份有限公司的甲基异柳磷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基质

空白样品：经仪器方法确认，未检出甲基异柳磷的蔬菜水果。

7.4 方法性能确定实验用到的标准品

标准品名称：丙酮中甲基异柳磷溶液标准物质

品牌及编号：中国计量科学研究院，产品编号[GBW(E)081825](https://www.ncrm.org.cn/Web/Ordering/MaterialDetail?autoID=4419)

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200g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 |
| 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。 |
| 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。 |

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)表示试样中含有甲基异柳磷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)表示试样中不含甲基异柳磷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**

采集的样品参考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》确定本底值，选取阴性样品作为空白样品用于方法验证。

**7.6.2灵敏度和假阴性率的计算**

根据GB 2763-2021中规定蔬菜水果中甲基异柳磷的限量设定方法检出限，即关注浓度。分别选取50个添加1倍关注浓度的样品和2倍关注浓度的样品，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**

根据GB 2763－2021中甲基异柳磷在不同食品中最大残留量的限量值及食品安全监管需要，确定甲基异柳磷胶体金免疫层析快速检测方法应用的基质为豆类、叶菜类、薯芋类、仁果类等基质。因此，以豇豆、梨和甘薯为代表基质开展后续方法学考察。

选取自然样品，豇豆、梨、甘薯各10份进行方法比对，由于GB/T 5009.144－2003为气相色谱法，GB 23200.113－2018为气相色谱－质谱联用法，考虑测试结果精确性。因此，最终选择参比方法为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》作为文本中所选用的参比方法。

**7.6.5交叉反应**

交叉反应率表示采用快检方法及其相关产品的交叉反应率反映产品的特异性，即目标物质检出限与干扰物质（同系物或衍生物）检出阳性的最小浓度的比值（以百分比计）。用提取液分别添加检出限水平的目标物或不同浓度梯度的其他结构近似物质，记录结果，对其他结构相似物质进行交叉反应验证，分析快检方法的特异性。选取水胺硫磷、甲胺磷、乙酰甲胺磷、喹硫磷、对硫磷、甲基对硫磷、乐果、甲拌磷，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，然后进行检测。

**7.6.6 阳性样品对比**

选取经GB 23200.113－2018 法测定为阳性的豇豆样品，检测结果为0.052 mg/kg，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**

为验证其他品牌的甲基异柳磷胶体金试纸条对本标准的适用性，选择江苏美正生物科技有限公司、北京勤邦生物技术有限公司、深圳市绿诗源生物技术有限公司研制生产的甲基异柳磷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

选用豇豆阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.01 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 | ＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.01 | 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、0.01 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；0.01 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

选用豇豆阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.01 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、7min→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，研究对比了豇豆基质的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 | ＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.01 | 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，两者颜色程度相近，不利于有效判读阴性或阳性结果；当反应3 min时，0 mg/kg、0.01 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；0.01 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。研究对比了豇豆基质的1 min 、3 min、6 min、9 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 | 9 |
| 0 | C线 | ＋ | ＋ | ＋ | ＋＋ |
| T线 | ＋ | ＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.01 | 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1~9 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、0.01 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；0.01 mg/kg，T线小于C线，阳性结果。当反应9 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

选用豇豆阴性样品，再采用空白基质加标的方式制备了阳性样品（0.01 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 | ＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ | ＋＋＋ |
| 0.01 | 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、0.01 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；0.01 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》测试不含甲基异柳磷的豇豆、梨和甘薯作为空白样品，GB 2763-2021中规定豇豆和梨中甲基异柳磷的限量为0.01 mg/kg、甘薯中甲基异柳磷的限量为0.05 mg/kg（按最低限量），因此设定豇豆和梨的方法检出限为0.01 mg/kg，甘薯的方法检出限为0.05 mg/kg，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（%） |
| 豇豆 | 0.01 | 2（-），48（+） | 96 | 4 | 98 | 2 |
| 0.02 | 0（-），50（+） | 100 | 0 |
| 梨 | 0.01 | 0（-），50（+） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.02 | 0（-），50（+） | 100 | 0 |
| 甘薯 | 0.05 | 1（-），49（+） | 98 | 2 | 99 | 1 |
| 0.10 | 0（-），50（+） | 100 | 0 |

结论：该快速检测方法灵敏度≥95%，假阴性率为≤5%。

8.4特异性和假阳性

选用豇豆、梨和甘薯样品，采用空白基质加标的方式，制备成2个浓度水平（0.5倍检测限、空白基质）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（%） |
| 豇豆 | 0 | 50（-），0（+） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.005 | 50（-），0（+） | 100 | 0 |
| 梨 | 0 | 49（-），1（+） | 98 | 2 | 99 | 1 |
| 0.005 | 50（-），0（+） | 100 | 0 |
| 甘薯 | 0 | 50（-），0（+） | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 0.025 | 50（-），0（+） | 100 | 0 |

结论：该快速检测方法特异性≥90%，假阳性率为≤10%。

8.5 与参比方法一致性

选取豇豆、梨、甘薯作为检测基质，每个基质10份样品，5份阴性样品和5份阴性加标样品，分别用胶体金免疫层析方参比方法测样品中的甲基异柳磷含量，同时用参比方法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》检测甲基异柳磷含量，将胶体金免疫层析方法与参比方法的结果进行一致性对比，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 豇豆比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 1.0 | 0.025 | 0.023 | 0.035 | 0.045 |

表8 梨比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.024 | 0.021 | 0.020 | 0.042 | 0.040 |

表9 甘薯比对实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.091 | 0.087 | 0.085 | 0.181 | 0.178 |

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，水胺硫磷、甲胺磷、乙酰甲胺磷、喹硫磷、对硫磷、甲基对硫磷、乐果、甲拌磷等属于该范畴，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（0.01 mg/kg），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 |
| 甲基异柳磷 | 0.01 | 阳性 | 100% |
| 水胺硫磷 | 0.20 | 阴性 | 无 |
| 甲胺磷 | 0.20 | 阴性 | 无 |
| 乙酰甲胺磷 | 0.20 | 阴性 | 无 |
| 喹硫磷 | 0.20 | 阴性 | 无 |
| 对硫磷 | 0.20 | 阴性 | 无 |
| 甲基对硫磷 | 0.20 | 阴性 | 无 |
| 乐果 | 0.20 | 阴性 | 无 |
| 甲拌磷 | 0.20 | 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

将阳性胡萝卜、辣椒、卷心菜、白菜样品用甲基异柳磷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

使用江苏美正生物科技有限公司、北京勤邦生物技术有限公司、深圳市绿诗源生物技术有限公司研制生产的甲基异柳磷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 |
| 江苏美正生物科技有限公司 | 0（+）20（-） | 0（+）20（-） | 20（+）0（-） | 20（+）0（-） |
| 北京勤邦生物技术有限公司 | 0（+）20（-） | 0（+）20（-） | 20（+）0（-） | 20（+）0（-） |
| 深圳市绿诗源生物技术有限公司 | 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甲基异柳磷胶体金试纸条。

九、方法性能验证结论

本研究采用胶体金免疫层析方法对豇豆、梨、甘薯中的甲基异柳磷进行检测。

本快速检测方法在起草过程中，参考了蔬菜水果中甲基异柳磷检测的相关标准，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。

根据《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科【2017】43 号），本项目进行方法性能指标评价，结果表明方法性能指标：检出限设定蕹菜（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0.05 mg/kg。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，该甲基异柳磷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。

表12 四种浓度水平样品方法性能指标计算表（以豇豆为例）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品情况" | 检测结果b | 总数 |
| 阳性 | 阴性 |
| 豇豆 |
| 阳性（1倍检测限） | 48 | 2 | 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 | 98 | 102 | 200 |
| 显著性差异(χ2) | χ2=0.5<3.84表示待确认方法与参比方法的阳性确证比率在95%的置信区间内没有显著性差异 |
| 灵敏度（p+，％) | p+=98/100=98% |
| 特异性（ p-， %） | p-=100/100=100% |
| 假阴性率（ pf-， %) | pf-=2/100=2% |
| 假阳性率（ pf+， %) | pf+=0/100=0% |
| 相对准确度， %c | (98+100)/(100+100)=99% |
| 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甲基异柳磷的免疫胶体金方法。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：一方面该标准的发布实施可以提升市场监管部门对食用农产品质量安全监管水平，及时筛查发现蔬菜水果的农药残留，保障消费者的健康安全和权益；另一方面可增强检测机构的服务能力和规范快检行业有序发展，保障食品安全，具有明显的社会效益，同时也可创造出一定的经济效益。

本方法标准，为蔬菜水果中甲基异柳磷的快速检测方法（胶体金法）提供规范统一的技术指标参数，从而倒逼快检产品企业不断创新和提高产品质量，形成良好的市场优胜劣汰机制，促进食品快检行业高质量发展。

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。 |