



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202208

蔬菜水果中丙溴磷的快速检测 胶体金免疫层析法

2022-12-05 发布

国家市场监督管理总局 发 布

蔬菜水果中丙溴磷的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了蔬菜水果中丙溴磷残留的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于蔬菜(结球甘蓝、萝卜、芥蓝、花椰菜、辣椒、普通白菜、番茄)、水果(芒果、柑、橙、橘、山竹)中丙溴磷残留量的快速定性检测。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的丙溴磷经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制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)与控制线(C线)颜色深浅比较,对样品是否检出丙溴磷进行定性判定。

3 试剂与材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇(CH_3OH)。

3.1.2 氯化钠(NaCl)。

3.1.3 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

3.1.4 二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

3.2 试剂配制

缓冲液(0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液,pH 为 8.0):准确称取氯化钠(3.1.2)9 g、十二水合磷酸氢二钠(3.1.3)6 g、二水合磷酸二氢钠(3.1.4)0.4 g,用水溶解并定容至 100 mL,即为缓冲液。或使用胶体金免疫层析检测试剂盒专用缓冲液。

3.3 参考物质

丙溴磷(Profenofos)参考物质,CAS 号: 41198-08-7,纯度 $\geq 94\%$,或等同可溯源物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 丙溴磷标准储备液($100 \mu\text{g/mL}$):准确称取适量经纯度折算后的丙溴磷参考物质 10mg(精确至 0.01 mg),置于小烧杯中,用甲醇(3.1.1)溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,再用甲醇(3.1.1)定容,摇匀,配制成 $100 \mu\text{g/mL}$ 丙溴磷标准储备液, -18°C 以下避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2 丙溴磷标准工作液($10 \mu\text{g/mL}$):精密移取丙溴磷标准储备液(3.4.1)5 mL 加入 50 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容,摇匀,配制成 $10 \mu\text{g/mL}$ 丙溴磷标准工作液, 4°C 冷藏避光保存,有效期 1 个月。

3.5 材料

3.5.1 丙溴磷胶体金免疫层析试剂盒:一般包含金标微孔(含胶体金标记的特异性抗体)、胶体金检测卡等。

3.5.2 50 mL 容量瓶。

3.5.3 一次性吸管。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 mg 和 0.01 g。

4.2 移液器:100 μ L、200 μ L、1 mL、5 mL。

4.3 粉碎机。

4.4 离心机:转速 $\geq 4\,000$ r/min。

4.5 涡旋混合器。

4.6 温育器。

4.7 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

温度 20 $^{\circ}$ C $\sim$ 40 $^{\circ}$ C。

6 分析步骤

6.1 试样制备

6.1.1 蔬菜类试样制备

称取约 100 g 具有代表性的蔬菜样品,叶菜类蔬菜取整棵(去除根),根茎类蔬菜取整棵(去除顶部叶及叶柄),芸薹属类蔬菜取整棵(花椰菜去除叶、芥蓝去除根),茄果类取全果(去柄)。叶菜类蔬菜剪碎,其他样品匀浆处理,分为两份分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于-18 $^{\circ}$ C 以下保存。

6.1.2 水果类试样制备

称取约 100 g 具有代表性的水果样品,柑橘类水果取全果(去柄),芒果取全果(去除核),山竹取全果(测定果肉),匀浆处理,分为两份分别装入洁净容器作为试样和留样,密封,标记。留样置于-18 $^{\circ}$ C 以下保存。

6.2 试样提取

准确称取制备好的试样 2 g(精确至 0.1 g)至 15 mL 离心管中,加入 8 mL 缓冲液(3.2),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 4 000 r/min 离心 1 min,上清液即为待测液。

6.3 测定步骤

6.3.1 测定液的准备

GB 2763《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中不同蔬菜水果基质的丙溴磷限量要求不同,其待测液处理方式见表 1。

表 1 不同基质待测液处理方式表

基质种类	处理方式
芒果、柑、橘、橙	在金标微孔中加入 200 μL 待测液,用一次性吸管上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀
结球甘蓝	在金标微孔中加入 200 μL 待测液,用一次性吸管上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀
萝卜	在金标微孔中依次加入 100 μL 缓冲液(3.2)和 100 μL 待测液,用一次性吸管上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀
花椰菜、芥蓝	在金标微孔中依次加入 150 μL 缓冲液(3.2)和 50 μL 待测液,用一次性吸管上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀
辣椒	将 500 μL 缓冲液(3.2)和 100 μL 待测液混合均匀后,在金标微孔中加入 200 μL 上述混合液,用一次性吸管上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀
普通白菜	将 450 μL 缓冲液(3.2)和 50 μL 待测液混合均匀后,在金标微孔中加入 200 μL 上述混合液,用一次性吸管上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀
番茄、山竹	将 380 μL 缓冲液(3.2)和 20 μL 待测液混合均匀后,在金标微孔中加入 200 μL 上述混合液,用一次性吸管上下抽吸 5 次~10 次直至微孔试剂混合均匀

6.3.2 测定

将以上已加入测试样品混匀后的金标微孔在室温或温育器反应 3 min,将试纸条插入到金标微孔中,室温反应 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。

6.4 质控试验

6.4.1 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 次~10 次直至微孔试剂混合均匀后,按 6.3.2 操作。

6.4.2 加标质控试验

准确称取空白试样 2 g(精确至 0.1 g)至 15 mL 离心管中,加入适量丙溴磷标准工作液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),使试样中丙溴磷的浓度与表 2 一致,按照 6.2 和 6.3 步骤与样品同法操作。

表 2 不同基质中丙溴磷的浓度

食品类别	基质名称	浓度/(mg/kg)
蔬菜	结球甘蓝	0.5
	芥蓝、花椰菜	2
	普通白菜	5
	番茄	10
	辣椒	3
	萝卜	1
水果	柑、橘、橙、芒果	0.2
	山竹	10
注：每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。		

7 结果判定

7.1 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。

7.1.1 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。

7.1.2 阴性结果

控制线(C线)显色,检测线(T线)颜色深于或等于控制线(C线),表示试样中不含丙溴磷或其含量低于方法检出限,判定为阴性结果。

7.1.3 阳性结果

控制线(C线)显色,检测线(T线)不显色或颜色浅于控制线(C线),表示试样中含有丙溴磷且其含量高于方法检出限,判定为阳性结果。

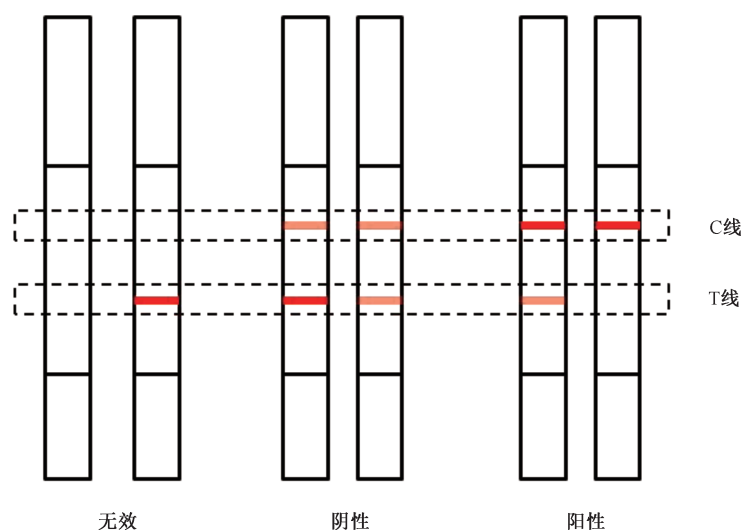


图 1 目视结果示意图

7.2 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。

7.3 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。

8 结论

当检测结果为阳性时,应采用参比方法对结果进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

本方法芒果、柑、橙、橘中丙溴磷的检出限为 0.2 mg/kg,结球甘蓝中丙溴磷的检出限为 0.5 mg/kg,萝卜中丙溴磷的检出限为 1 mg/kg,芥蓝、花椰菜中丙溴磷的检出限为 2 mg/kg,辣椒中丙溴磷的检出限为 3 mg/kg,普通白菜中丙溴磷的检出限为 5 mg/kg,番茄、山竹中丙溴磷的检出限为 10 mg/kg。

9.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 95\%$ 。

9.3 特异性

特异性 $\geq 90\%$ 。

9.4 交叉反应率

本方法对乙酰甲胺磷、毒死蜱、杀螟硫磷、水胺硫磷、三唑磷等丙溴磷的功能和结构类似农药以及多

菌灵、阿维菌素、虫螨睛、烯酰吗啉、吡唑醚菌酯等常见农药无交叉反应。

9.5 假阴性率

假阴性率 $\leq 5\%$ 。

9.6 假阳性率

假阳性率 $\leq 10\%$ 。

注：性能指标计算方法见附录 A。

10 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，应对其进行考察，以满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准为 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》(包括所有的修改单)。

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方法见表 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	N_{11}	N_{12}	$N_{1.}=N_{11}+N_{12}$
阴性	N_{21}	N_{22}	$N_{2.}=N_{21}+N_{22}$
总数	$N_{.1}=N_{11}+N_{21}$	$N_{.2}=N_{12}+N_{22}$	$N=N_{1.}+N_{2.}$ 或 $N_{.1}+N_{.2}$
显著性差异(χ^2)	$\chi^2=(N_{12}-N_{21} -1)^2/(N_{12}+N_{21})$, 自由度(df)=1		
灵敏度($p+$)/%	$p+=N_{11}/N_{1.}\times 100$		
特异性($p-$)/%	$p-=N_{22}/N_{2.}\times 100$		
假阴性率($pf-$)/%	$pf-=N_{12}/N_{1.}\times 100=100-\text{灵敏度}$		
假阳性率($pf+$)/%	$pf+=N_{21}/N_{2.}\times 100=100-\text{特异性}$		
相对准确度 ^c /%	$(N_{11}+N_{22})/(N_{1.}+N_{2.})\times 100$		
注: N 为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, N_{11} 表示第一行,第一列, $N_{1.}$ 表示所有的第一行, $N_{2.}$ 表示所有的第二列; N_{12} 表示第一行,第二列。			
^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。			
^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。			

本方法负责起草单位:深圳海关食品检验检疫技术中心、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本方法验证单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、广东省食品检验所、深圳市计量质量检测研究院、南昌大学、四川省食品药品检验检测院。

本方法主要起草人:岳振峰、涂晓波、万志刚、涂小珂、吕海明、曹振、李辉、崔雪妍。