



食 品 快 速 检 测 方 法

KJ 202205

蔬菜水果中多菌灵的快速检测 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

蔬菜水果中多菌灵的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了蔬菜水果中多菌灵的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于胡萝卜、菜用大豆、莲藕、抱子甘蓝、叶芥菜、韭菜、番茄、结球莴苣、草莓、桃、西瓜、梨、橙等蔬菜水果(不适用于豌豆、腌制小黄瓜)中多菌灵残留的快速定性测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析法原理。试样中的多菌灵残留经提取后与胶体金标记的多菌灵特异性抗体结合,抑制抗体和检测线(T线)上抗原的结合,从而导致T线颜色深浅的变化。通过T线与控制线(C线)颜色深浅比较,对试样中多菌灵进行定性判定。

3 试剂和材料

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(CH₃OH)。
- 3.1.2 氯化钠(NaCl)。
- 3.1.3 十二水合磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)。
- 3.1.4 二水合磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·2H₂O)。

3.2 参考物质

多菌灵参考物质的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量见表1,纯度≥99%。

注:或等同可溯源物质。

表 1 多菌灵参考物质的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
多菌灵	Carbendazim	10605-21-7	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191.19

3.3 试剂配制

样品提取液(PBS 缓冲液,含 5%体积分数甲醇):准确称取 8.50 g 氯化钠(3.1.2)、5.54 g 十二水合磷酸氢二钠(3.1.3)、0.26 g 二水合磷酸二氢钠(3.1.4),用水溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶中,再准确加入 50 mL 甲醇(3.1.1),用水定容至 1 000 mL。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 多菌灵标准储备液(50 mg/L):精密称取多菌灵参考物质(3.2)5.0 mg(精确至 0.01 mg),置于 50 mL 烧杯中,加入适量甲醇(3.1.1)溶解后,转移至 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 50 mg/L 的多菌灵标准储备液。—20 ℃ 冷冻避光保存,有效期 6 个月。

3.4.2 多菌灵标准工作溶液(5 mg/L):移取多菌灵标准储备液(3.4.1)1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 5 mg/L 的多菌灵标准工作溶液,临用现配。

3.5 材料

多菌灵快速检测试剂盒:含胶体金试纸条及金标微孔(或检测卡),按产品要求保存。

4 仪器和设备

4.1 电子天平:感量分别为 0.01 g 和 0.01 mg。

注:如直接使用符合规定的标准溶液时,无需配备感量为 0.01 mg 的天平。

4.2 移液器:200 μ L、1 mL、5mL。

4.3 涡旋振荡器。

4.4 高速组织捣碎机。

4.5 胶体金读数仪(可选)。

5 环境条件

环境温度 10 ℃~37 ℃。

6 分析步骤

6.1 试样制备

取具有代表性的蔬菜水果试样不少于 100 g,取样部位参考 GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中附录 A。经充分均质或粉碎混匀,试样和留样分别装入洁净容器,密封并标记。留样置于一20 ℃ 下避光保存。

6.2 试样的提取

准确称取 6.1 中混匀的试样 1.0 g(精确至 0.01 g)于 15 mL 离心管,加入 3 mL 提取液(3.3),涡旋振荡 1 min,静置 3 min,将上清液按照表 2 的方案用提取液(3.3)进行稀释,获得待测液。

表 2 不同基质稀释比例和加标质控样品配制方法

基质种类	GB 2763—2021 限量/(mg/kg)	上清液(μ L)+ 提取液(μ L)	标准溶液体积 (μ L)
菜用大豆、胡萝卜、莲藕	0.2	200 +100	40(3.4.2)
孢子甘蓝、草莓	0.5	100 +200	10(3.4.1)
叶芥菜	1	50 +200	20(3.4.1)

表 2 不同基质稀释比例和加标质控样品配制方法（续）

基质种类	GB 2763—2021 限量/(mg/kg)	上清液(μL)+ 提取液(μL)	标准溶液体积 (μL)
韭菜、桃、西瓜	2	50 + 700	40(3.4.1)
番茄、梨	3	50 + 950	60(3.4.1)
结球莴苣、橙	5	50 + 1 450	100(3.4.1)
注：表中数据为推荐的稀释比例，实际操作中可按照试剂盒说明书操作。			

6.3 测定步骤

测试前,将未开封的检测卡或试纸条放置至室温。对于金标微孔产品:吸取 200 μL 试样待测液(6.2)于金标微孔中,用移液器上下抽吸 5 次~10 次至微孔试剂混合均匀,室温下孵育 3 min。将试纸条插入微孔中,室温下反应 5 min 后,立即进行结果判读。对于检测卡产品:吸取 100 μL 试样待测液(6.2)于检测卡的加样孔中,室温下反应 5 min 后,立即进行结果判读。也可按照说明书的检测时间进行结果判读。

6.4 质控试验

每批试样应同时进行空白试验和加标质控试验。空白试样应经参比方法检测且未检出多菌灵。

6.4.1 空白试验

称取空白试样,按照 6.2 和 6.3 的步骤操作。

6.4.2 加标质控试验

准确称取同类基质的空白试样 1.0 g(精确至 0.01 g)置于 15 mL 离心管中,针对不同基质分别添加一定体积的多菌灵标准工作液(3.4.2)或储备液(3.4.1),参考 GB 2763—2021 中多菌灵最大残留限量值进行对应浓度添加,作为加标质控试样(见表 2),按照 6.2 和 6.3 的步骤同法操作。

7 结果判定

采用目视法,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。必要时也可使用胶体金读数仪判读,读数仪的具体操作与判读原则参照读数仪的使用说明书。

7.1 无效结果

控制线(C 线)不显色,无论检测线(T 线)是否显色,均表示不正确操作或试纸条/检测卡无效。

7.2 阳性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)不显色或颜色比控制线(C 线)颜色浅,表示试样中多菌灵含量高于方法检出限,视为阳性。

7.3 阴性结果

控制线(C 线)显色,检测线(T 线)颜色比控制线(C 线)颜色深或者检测线(T 线)颜色与控制线

(C线)颜色相当,表示试样中多菌灵含量低于方法检出限,视为阴性。

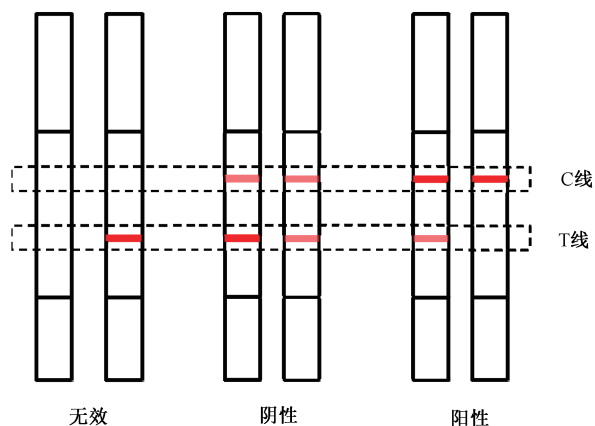


图 1 目视结果示意图

7.4 质控试验要求

空白试验测定结果应为阴性,加标质控试验测定结果应为阳性。

8 结论

当测定结果为阳性时,应采用参比方法对对结果进行确证。

9 性能指标

9.1 检出限

菜用大豆、胡萝卜、莲藕为 0.2 mg/kg,孢子甘蓝、草莓为 0.5 mg/kg,叶芥菜为 1 mg/kg,韭菜、桃、西瓜为 2 mg/kg,番茄、梨为 3 mg/kg,结球莴苣、橙为 5 mg/kg。

9.2 灵敏度

灵敏度 $\geq 98\%$ 。

9.3 交叉反应率

与苯菌灵和丙硫多菌灵交叉反应率为 100%。

9.4 假阴性率

假阴性率 $\leq 2\%$ 。

9.5 假阳性率

假阳性率 $\leq 5\%$ 。

注:性能指标计算方法见附录 A。

10 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤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/T 20769—2008《水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、GB 23200.121—2021《食品安全国家标准 植物源性食品中 331 种农药及其代谢物残留量的测定 液相色谱-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方法见表 A.1。

表 A.1 定性方法性能指标计算表

试样情况 ^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($p+$)/%	$p+=N_{11}/N_{1.}\times 100$		
假阴性率($pf-$)/%	$pf-=N_{12}/N_{1.}\times 100=100-\text{灵敏度}$		
假阳性率($pf+$)/%	$pf+=N_{21}/N_{2.}\times 100=100-N_{22}/N_{2.}$		
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试样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。			

本方法起草单位:中国检验检疫科学研究院、江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所。

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、湖北省食品质量安全监督检验研究院、山东省食品药品检验研究院、安徽省产品质量监督检验研究院。

本方法主要起草人:张峰、邢仕歌、刘通、贺木易、王玉龙、张存政、姚美伊、姚桂红、凌云。