

团 体 标 准

T/SZTIC 002—2022

植物类中药材中克百威的快速检测—胶体金免疫层析法

Rapid detection of carbofuran in Chinese herbal medicine -- colloidal gold immunochromatography

2022 - 12 - 23 发布

2022- 12 - 23 实施

深圳市检验检测认证协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂与材料	1
6 仪器与设备	2
7 分析步骤	2
8 结果判定	3
9 结果确认	3
10 性能指标	3
11 其他	4
附录 A（规范性） 定性方法性能指标计算表	5

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。

本文件由深圳市检验检测认证协会提出。

本文件由深圳市检验检测认证协会归口。

本文件起草单位：深圳市易瑞生物技术股份有限公司，深圳市药品检验研究院，澳门大学，中国科学院微生物研究所。

本文件主要起草人：严义勇，王冰，李鹏，马红圳，王炳志，黄永健，殷果，梁松，余婷婷，崔锡平，罗迈，徐梅，张鑫，何颖，罗元明。

植物类中药材中克百威的快速检测—胶体金免疫层析法

1 范围

本方法规定了植物类中药材中克百威的胶体金免疫层析快速检测方法。
本方法适用于枸杞、薄荷、山银花、党参和当归等植物类中药材中克百威的快速测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

《中国药典》2020年版 第四部 0211 药材和饮片取样法
GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验室方法
食药监办科[2017]43号食品快速检测方法评价技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理，在检测微孔中冻干金标抗体，在硝酸纤维素膜的检测线（T线）和质控线（C线）处分别包被抗原和单克隆抗体。从样品垫中泳动过来的过量胶体金标记的单克隆抗体可被固定于质控线（C线）的单克隆抗体所捕获，使质控线（C线）显色。样本中若含有克百威，在微孔温育过程中与胶体金标记的单克隆抗体结合，从而抑制金标抗体与硝酸纤维素膜上包被的抗原结合，导致检测线（T线）颜色变浅，因此，通过检测线与质控线（C线）颜色深浅比较，对样品中克百威进行定性判定。

5 试剂与材料

5.1 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中三级水的要求。

5.1.1 甲醇（CH₃OH）。

5.1.2 Tris 缓冲液（0.1 mol/L，pH8.0）。

5.1.3 标准物质：克百威标准物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量见表1，纯度≥98%。

表1 克百威标准物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量

中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子质量
克百威	Carbofuran	1563-66-2	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.25

注：或等同可溯源物质。

5.1.4 克百威标准储备液（100μg/mL）：准确称取克百威标准物质（5.1.3）100mg（精确到0.1mg），置于1000mL容量瓶中，用甲醇（5.1.1）溶解并稀释至刻度，摇匀，制成100 μg/mL的标准储备液。-20℃

避光保存，保质期6个月。

5.1.5 克百威标准工作液(1 μ g/mL)：精密移取克百威标准储备液(100 μ g/mL)(5.1.4)0.1mL，置于10mL容量瓶，用甲醇(5.1.1)稀释至刻度，摇匀，制成浓度1 μ g/mL的标准工作液。临用新配。

5.2 材料

5.2.1 固相萃取(Solid Phase Extraction, 简称SPE)净化小柱，填料比例为氧化铝：硅藻土：C18=70：30：20。需在阴凉、干燥、避光条件下保存。

5.2.2 克百威胶体金免疫层析试纸条，适用基质为中药材。需在阴凉、干燥、避光条件下保存。

6 仪器与设备

6.1 电子天平：感量为0.01g及0.0001g。

6.2 移液器：量程10 μ L~1000 μ L。

6.3 均质器。

6.4 涡旋仪。

6.5 胶体金读数仪(可选)。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取适量代表性样品，充分均质混匀。

7.2 试样提取与净化

称取1g枸杞、薄荷、山银花、党参、当归(精确至0.05g)放入15mL离心管中，加入3mL甲醇提取，涡旋仪高速涡旋1min，静置30s，上清液即为提取液。

准确吸取500 μ L提取液于SPE净化小柱，依靠重力让其自然滴下，用2mL离心管收集流穿液。

7.3 测定步骤

将收集到的流穿液用0.1mol/L Tris 8.0 稀释10倍(25 μ L流穿液, 225 μ L 0.1mol/L Tris 8.0 稀释液)，混合均匀后即待测液。测试前，将未开封的试纸条恢复至室温；在20-30 $^{\circ}$ C室温下取200 μ L待测液于红色微孔中混合均匀，反应3min后取出试纸筒中的试纸条，将测试条插入上述红色微孔中反应6min，待时间到后从微孔中取出试纸条，轻轻刮去试纸条下端的吸水海绵，进行结果判读。(超过5min后的结果判读无效)

注1：测定步骤建议按照试纸条说明书。

注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。

7.4 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

7.4.1 空白试验

称取空白试样，按照7.2和7.3步骤与样品同法操作。

7.4.2 加标质控试验

准确称取空白试样1 g(精确至0.05 g)放入15mL离心管中,加入50 μ L克百威标准工作液(1 μ g/mL),使试样中克百威浓度为0.05 mg/kg,按照7.2和7.3步骤与样品同法操作。

8 结果判定

8.1 目视判定

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。目视判定示意图见图1。

注: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。

8.2 目视判定示意图

8.2.1 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。若出现无效结果,需对同批次样品进行重新检测。

8.2.2 阴性结果

质控线(C线)显色,检测线(T线)颜色深于或等于质控线(C线),判定视为阴性结果。

8.2.3 阳性结果

质控线(C线)显色,检测线(T线)不显色或颜色浅于质控线(C线),判定为阳性结果。

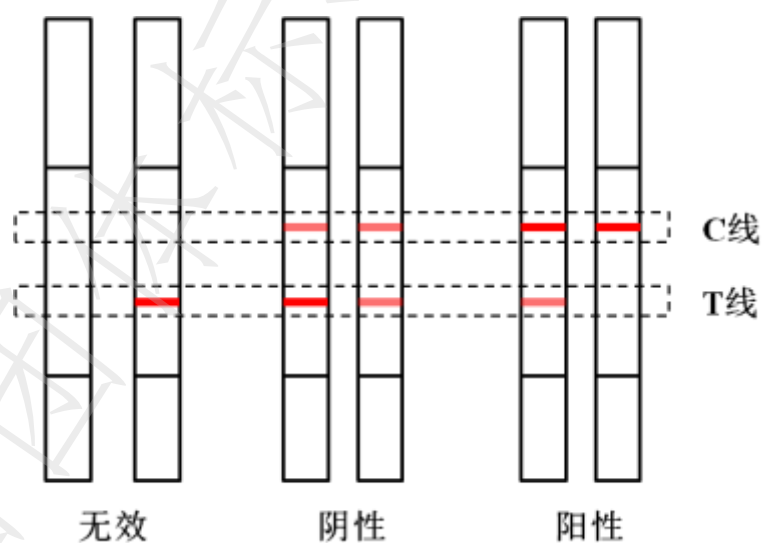


图1 目视判定示意图

8.3 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。

9 结果确认

当检测结果为阳性时,应按照2020版《中国药典》规定方法标准进行确证。

10 性能指标

10.1 检出限：0.05 mg/kg

10.2 灵敏度： $\geq 95\%$

10.3 特异性： $\geq 90\%$

10.4 假阴性率： $\leq 5\%$

10.5 假阳性率： $\leq 10\%$

注：性能指标计算方法见附录A

11 其他

本方法所述试剂、试纸条信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不作限定。方法使用者在使用试剂、试纸条或操作步骤之前，应对其进行考察。性能指标应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为2020版《中国药典》规定方法。

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表

样品情况	检测结果		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	$\chi^2 = \frac{(N12-N21 -1)^2}{(N12+N21)}$, 自由度 (df) =1		
灵敏度	$p+ = N11/N1.$		
特异性	$p- = N22/N2.$		
假阴性率	$pf- = N12/N1. = 100 - \text{灵敏度}$		
假阳性率	$pf+ = N21/N2. = 100 - \text{特异性}$		
相对准确度	$(N11+N22) / (N1.+N2.)$		
注：			
^a 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公认值结果； ^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。			