

T/ GZTPA

团体标准

T/ GZTPA 0001- 2019

茶叶、蔬菜中克百威残留的测定

酶联免疫吸附法

Determination of carbofuran residues in teas and vegetables—
Enzyme linked immunosorbent assay

2019-12-12 发布

2020-02-01 实施

贵州省绿茶品牌发展促进会 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 原理.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 仪器.....	2
6 试样制备与保存.....	2
7 试样测定.....	2
8 结果计算.....	3
9 检测限、准确度和精密度.....	4

T/ GZTPA

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则和国家茶叶标准的相关规定而起草。

本标准由贵州省绿茶品牌发展促进会提出并归口。

本标准主要起草单位：贵州省绿茶品牌发展促进会、贵州勤邦食品安全科学技术有限公司。

本标准主要起草人：谢体波、雷雨田、胡鹏、张凯、陈鑫、杨玉洁。

茶叶、蔬菜中克百威残留的测定 酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了茶叶、蔬菜中克百威残留量的酶联免疫吸附测定法。

本标准适用于茶叶、蔬菜中克百威残留量的测定。

2 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试验方法

3 原理

采用间接竞争酶联免疫吸附（ELISA）方法，在微孔条上包被偶联抗原，试样中残留的克百威与酶标板上的偶联抗原竞争克百威抗体，加入酶标记的抗体后，显色剂显色，终止液终止反应。用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度，吸光值与克百威残留量呈负相关，与标准曲线比较，再乘以其对应的稀释倍数，即可得出克百威残留含量。

4 试剂和材料

4.1 克百威试剂盒

- 4.1.1 96 孔板（12 条×8 孔）包被有克百威偶联抗原。
- 4.1.2 克百威标准溶液（至少有 5 个倍比稀释浓度水平，外加 1 个空白）。
- 4.1.3 克百威抗体溶液。
- 4.1.4 过氧化物酶标记物。
- 4.1.5 底物显色溶液 A 液：过氧化尿素。
- 4.1.6 底物显色溶液 B 液：四甲基联苯胺。
- 4.1.7 反应终止液：1 mol/L 硫酸。
- 4.1.8 复溶液（2 倍浓缩液）。
- 4.1.9 洗涤液（20 倍浓缩液）。
- 4.1.10 十二水合磷酸氢二钠（分析纯）
- 4.1.11 二水合磷酸二氢钠（分析纯）

4.1.12 乙腈（分析纯）

4.2 水：GB/T 6682 规定的一级水。

4.3 试样提取液：称取 4.40 g 十二水合磷酸氢二钠和 13.68 g 二水合磷酸二氢钠，加 500 mL 水溶解混匀。

4.4 蔬菜复溶液工作液：用水将 2 倍的浓缩复溶液按 1：1 体积比进行稀释（1 份 2 倍浓缩复溶液+1 份水），用于蔬菜试样的稀释，复溶液工作液在 4℃可保存一个月。

4.5 茶叶复溶液工作液：用水将 2 倍的浓缩复溶液按 3：7 体积比进行稀释（3 份 2 倍浓缩复溶液+7 份水），用于溶解茶叶试样干燥的残留物，复溶液工作液在 4℃可保存一个月。

4.6 洗涤液工作液：用水将 20 倍的浓缩洗涤液按 1：19 体积比进行稀释（1 份 20 倍浓缩洗涤液+19 份水），用于酶标板的洗涤，洗涤液工作液在 4℃可保存一个月。

5 仪器

5.1 酶标仪：配备 450 nm 滤光片。

5.2 均质器。

5.3 天平：感量 0.01 g。

5.4 振荡器。

5.5 离心机：转速 ≥ 3000 r/min。

5.6 涡旋仪。

5.7 氮气吹干装置。

5.8 恒温箱。

5.9 微量移液器：单道 20 μ L~200 μ L、100 μ L~1000 μ L 可调，多道 250 μ L。

6 试样制备与保存

取茶叶、蔬菜样品，剪碎，10000 r/min 均质 1 min。制备好的试样，应即刻进行提取和检测。

7 试样测定

7.1 提取

7.1.1 蔬菜试样

称取蔬菜试样 $1.0 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ 至 10 mL 聚苯乙烯离心管中，加 5 mL 试样提取液（4.6），置于振荡器上振荡 5 min，3000 r/min 以上，20~25℃离心 5 min，取上清液 200 μ L 至 2 mL 聚苯乙烯离心管中，加入 600 μ L 蔬菜复溶液工作液，涡动 2 min，充分混匀，取 50 μ L 用于分析。

7.1.2 茶叶试样

称取茶叶试样 1 g 至 50 mL 聚苯乙烯离心管中，加 10 mL 乙腈，涡动 1 min，3000 r/min 以上，20~25℃离心 5 min，取上层有机相 1 mL 至 10 mL 洁净干燥的玻璃试管中，于 20~30℃水浴氮气流下吹干，取 1.0 mL 茶叶复溶液工作液溶解干燥的残留物，涡动 2 min，充分混匀，取 50 μL 用于分析。

7.2 测定

使用前将试剂盒在 20~25℃下放置 1~2 h。

7.2.1 将标准和试样（至少按双平行实验计算）所有数量的孔条插入微孔架，记录标准和试样的位置。

7.2.2 加 50 μL 系列标准溶液（4.1.2）或处理好的试样溶液到各自的微孔中。标准和试样至少做两个平行试验。

7.2.3 加克百威抗体溶液（4.1.3）50 μL 到每一个微孔中，充分混合，于 25℃恒温箱中孵育 30 min。

7.2.4 倒出孔中液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。用 250 μL 洗涤液工作液充入孔中，再次倒掉微孔中的液体，再重复操作两遍以上（或用洗板机洗涤）。

7.2.5 加 100 μL 过氧化物酶标记物（4.1.4），25℃恒温箱中孵育 30 min。

7.2.6 倒出孔中液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。用 250 μL 洗涤液工作液充入孔中，再次倒掉微孔中的液体，再重复操作两遍以上（或用洗板机洗涤）。

7.2.7 加 50 μL 底物显色溶液 A 液（4.1.5）和 50 μL 底物显色溶液 B 液（4.1.6），混合并在 25℃恒温箱避光显色 15 min。

7.2.8 加 50 μL 反应终止液（4.1.7），轻轻振荡混匀，用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度值。

8 结果计算

用所获得的标准溶液和试样溶液吸光度值与空白溶液吸光度值的比值进行计算，见式（1）：

$$A_r = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

A_r —— 相对吸光度值，%；

B —— 标准（试样）溶液的吸光度值；

B_0 —— 空白（浓度为 0 的标准溶液）的吸光度值。

将计算的相对吸光度值（%）对应克百威（μg/L）的自然对数做半对数坐标系统曲线图，对应的试样浓度可从校正曲线算出，见式（2）：

$$X = \frac{A \times f}{m \times 1000} \quad (2)$$

式中：

X —— 试样中克百威的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

A —— 试样中相对吸光度值（%）对应的克百威含量，单位为微克每升（μg/L）；

f —— 试样稀释倍数；

m ——试样的取样量，单位为克（g）。

计算结果表示到小数点后两位。阳性结果应用确证法确证。

9 检测限、准确度和精密度

9.1 检测限

本标准的方法检测限：克百威在茶叶中的检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，在蔬菜中的检测限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

在试样中添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度水平的克百威时，回收率为 70%~110%。

9.3 精密度

本方法的批内变异系数 \leq 15%，批间变异系数 \leq 20%。

T/ GZTPA