ICS 67.050
X 04

DB52

贵 州 省 地 方 标 准

DBS52/ 037—2018

食品安全地方标准
蔬菜中阿维菌素残留的测定
酶联免疫吸附法

Local food safety standard-Determination of avermectin residues in vegetables by enzyme-linked immunosorbent assay

2018－12－14 发布　　2019－05－13 实施

贵州省卫生健康委员会　　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 2
7　试样测定 2
8　结果计算 3
9　检出限、准确度和精密度 3
10　其他 3

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》给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由贵州省农产品质量安全监督检验测试中心提出。

本标准由贵州省卫生健康委员会归口。

本标准起草单位：北京勤邦生物技术有限公司、贵州勤邦食品安全科学技术有限公司、贵州省农产品质量安全监督检验测试中心、贵州省分析测试研究院。

本标准主要起草人：扶胜、冯才伟、蔡滔、李占彬、何方洋、许锡娟、袁旭、卢平、庞宏宇、杨昌彪、吴小胜、王震、赖飞、刘凯、吕平、袁学伟、周艳、周雪丽、罗华兰、王志、丁静、王晓鹭、田雪莲。

食品安全地方标准
蔬菜中阿维菌素残留的测定 酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了蔬菜（结球甘蓝、番茄、萝卜）中阿维菌素残留量的测定 酶联免疫吸附测定法的原理、试剂和材料、仪器、试样制备、试样测定、结果计算及检出限、准确度和精密度及其他。

本标准适用于蔬菜（结球甘蓝、番茄、萝卜）中阿维菌素残留量的测定，也适用于贵州省县级农产品质量安全检测机构开展蔬菜（结球甘蓝、番茄、萝卜）中农药阿维菌素残留例行监测。

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，仅所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

GB/T 8855 新鲜水果和蔬菜 取样方法

3 原理

将抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记，加入酶反应底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物含量与样本中阿维菌素浓度成对数相关，以此定量。

4 试剂和材料

4.1 阿维菌素试剂盒

4.1.1 96 孔板（12 条×8 孔）包被有阿维菌素偶联抗原。

4.1.2 阿维菌素标准品（1 mg/L）。

4.1.3 过氧化物酶标记阿维菌素抗体溶液。

4.1.4 底物液 A：13.6 g 醋酸钠，1.6 g 柠檬酸， 0.3 mL H_2O_2（30%），加水至 500 mL。

4.1.5 底物液 B：0.2 g EDTA-Na， 0.95 g 柠檬酸， 50 mL 甘油，0.2 g 四甲基联苯胺，加水至 500 mL。

4.1.6 反应终止液（1 mol/L 硫酸）：量取分析纯硫酸 54.3 mL，与水配制成 1000 mL 溶液。

4.1.7 复溶液：0.2 g 磷酸二氢钠，2.9 g 磷酸氢二钠，8.0 g 氯化钠，加水至 1000 mL，4 ℃可保存 1 个月。

4.1.8 浓缩洗涤液：0.5 g 磷酸二氢钠，6 g 磷酸氢二钠，16 g 氯化钠，0.5 mL 吐温-20，加水至 1000 mL。

4.1.9 实验中所用到的水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 甲醇

甲醇为分析纯。

4.3 洗涤液

将浓缩洗涤液与纯水按1∶19体积比稀释混匀成洗涤液，在4 ℃可保存1个月。

5 仪器

5.1 酶标仪：配有 450 nm 滤光片。
5.2 涡旋振荡器。
5.3 天平：精确到 0.01 g。
5.4 离心机：转速≥3000 r/min。
5.5 氮吹仪。
5.6 均质器：转速≥10000 r/min。
5.7 洗板机（选配）。
5.8 恒温培养箱：温度可调：25 ℃；湿度可调：40%～50% 。
5.9 微量移液器：单道 20 μL～200 μL、100 μL～1000 μL 可调，多道 250 μL。

6 试样制备

按GB/T 8855 要求，取蔬菜可食部分，经四分法缩分后切碎，混和后均质器匀浆，制成待测样。

7 试样测定

7.1 提取

准确称取待测样1.0 g±0.05 g于50 mL聚苯乙烯离心管中，加10 mL甲醇，涡旋振荡5 min，室温3000 r/min离心5 min，取上清液1 mL于10 mL干燥玻璃试管中，于50 ℃～60 ℃水浴氮吹至近干，加入100 μL甲醇，涡旋混合30 s，再加入900 μL复溶液，涡旋混合1 min，待检测。

7.2 测定

7.2.1 开展检测前将试剂盒置于室温平衡 2 h。
7.2.2 用复溶液将阿维菌素标准品分别稀释成浓度为 0 μg/L，0.5 μg/L，1.5 μg/L，4.5 μg/L，13.5 μg/L，40.5 μg/L 的系列阿维菌素标准使用液。
7.2.3 按照标准系列和待测试样双孔平行测定要求，取适量检测试剂盒孔条置于微孔架。
7.2.4 分别取 50 μL 标准系列溶液（7.2.2）和处理好的待检测试样溶液至相应微孔，同时做空白对照。
7.2.5 分别加过氧化物酶标记阿维菌素抗体溶液（4.1.3）50 μL 至对应微孔，用盖板膜封板，于 25 ℃恒温培养箱孵化 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除去孔中残留液体。用洗板机将 250 μL 洗涤液注入孔中，静置 10 s 以上，倒掉微孔中洗涤液，再次倒置于吸水纸上拍打，重复洗涤操作 4 次（亦可手工操作）。

7.3 显色

7.3.1　分别加 50　μL 底物液 A（4.1.4）和 50　μL 底物液 B（4.1.5），混合并在 25 ℃恒温培养箱中避光显色 15 min。

7.3.2　分别加 50　μL 反应终止液（4.1.6），轻轻振荡混匀，用酶标仪于 450 nm 波长 30 min 内测量。

8　结果计算

8.1　以标准系列溶液和待测试样溶液吸光度值比对应空白溶液吸光度值来计算相对吸光度值，见式（1）：

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

式中：

A_r——相对吸光度值，%；

B_r——阿维菌素标准系列溶液或待测样品溶液的平均吸光度值；

B_0——样品空白或浓度为0的标准溶液对应的平均吸光度值。

8.2　将相对吸光度值（%）对应阿维菌素（μg/L）的自然对数做半对数对应系列工作曲线，对应的试样浓度从校正曲线计算，结果按式（2）计算：

$$X = c \cdot \frac{V}{m} \cdot \frac{1000}{1000} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X——试样中阿维菌素的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

c——试样的相对吸光度值（%）对应的阿维菌素含量，单位为微克每升（μg/L）；

V——样品溶液的最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m——样品溶液对应的最终试样质量，单位为克（g）。

注1：结果表示到小数点后两位。

注2：计算结果应扣除空白值。

9　检出限、准确度和精密度

9.1　检出限

本方法检出限为5　μg/kg。

9.2　准确度

在试样中添加5 μg/kg～100 μg/kg浓度水平的阿维菌素时，样品回收率为70%～110%　。

9.3　精密度

在试样中添加5　μg/kg～100　μg/kg浓度水平的阿维菌素时，批内变异系数≤15%，批间变异系数≤20%　。

10　其他

10.1　本方法蔬菜样本稀释系数为 10。

10.2　若样品检测结果为阳性，应使用相关仲裁方法进行复核确证。

10.3　B_0吸光值不应低于 0.8。