



中华人民共和国国家标准

GB/T 40175.3—2021

纺织品 生物化学分析方法 第3部分：有机磷类农药（酶联免疫法）

Textiles—Methods of biochemical analysis—Part 3: Organophosphorus
pesticide (enzyme-linked immunosorbent assay)

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

本文件是 GB/T 40175《纺织品 生物化学分析方法》的第3部分。GB/T 40175 已经发布了以下部分：

- 第1部分：镉和铅(胶体金法)；
- 第2部分：拟除虫菊酯类农药(酶联免疫法)；
- 第3部分：有机磷类农药(酶联免疫法)。

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专利的责任。

本文件由中国纺织工业联合会提出。

本文件由全国纺织品标准化技术委员会(SAC/TC 209)归口。

本文件起草单位：南京海关工业产品检测中心、江南大学、中纺标(深圳)检测有限公司、南京师范大学、南京海关动植食产品检测中心、上海天祥质量技术服务有限公司、江苏省检验检疫科学技术研究院、晋江中纺标检测有限公司、纺织工业标准化研究所。

本文件主要起草人：吴丽娜、匡华、唐泰山、周静珠、刘丽强、周佳、斯颖、王建平、蔡建和。



纺织品 生物化学分析方法

第3部分：有机磷类农药（酶联免疫法）

警示：使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了纺织品中甲基对硫磷、甲基对氧磷、杀螟硫磷、倍硫磷四种有机磷类农药残留量的酶联免疫检测方法。

本文件适用于各种纺织品。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的有机磷类农药与试剂盒中已包被在酶标板上的有机磷类农药抗原竞争性结合有机磷类农药抗体，再加入酶标二抗，在酶标板上形成抗原—抗—酶标二抗复合物。复合物与显色剂发生反应，用酶标仪测定吸光度值。吸光度值与试样中的农药残留量呈负相关。

5 试剂与材料

所用试剂应均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的三级水。

5.1 有机磷类农药测定酶联免疫试剂盒：附录 A 给出了一种有机磷类农药酶联免疫试剂盒示例，试剂盒组成如下：

- a) 酶标板。
- b) 有机磷类抗体工作溶液。
- c) 酶标二抗。
- d) 甲基对硫磷标准工作溶液：可使用试剂盒中提供的标准工作溶液，也可按如下方法配制。
准确称取 50.0 mg 甲基对硫磷标准品（CAS 号 298-00-0，纯度 $\geq 99\%$ ）置于 100 mL 容量瓶中，加入少量甲醇（5.6）溶解后，用甲醇定容至刻度，浓度为 500.0 mg/L。然后根据需要的系列标

准溶液工作浓度进行稀释。

- e) 底物 A 液:每升包含 13.6 g 醋酸钠、1.6 g 柠檬酸、0.3 mL 过氧化氢(30%)的水溶液。
 - f) 底物 B 液:每升包含 13.6 g 醋酸钠、1.6 g 柠檬酸、0.2 g 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的水溶液。
 - g) 终止液:每升包含 54.3 mL 浓硫酸(98%)的水溶液。
 - h) 浓缩洗涤液:10 倍浓缩,每升包含 0.5 g 磷酸二氢钠、6.0 g 磷酸氢二钠、16.0 g 氯化钠、0.5 mL 吐温-20 的水溶液。
- 5.2 洗涤液:使用前将浓缩洗涤液 5.1 h)按照体积比 1:9 加水稀释(1 份浓缩洗涤液+9 份水)。
- 5.3 显色液:使用前将底物 A 液 5.1 e)和底物 B 液 5.1 f)按体积比 1:1 混合。
- 5.4 正己烷。
- 5.5 乙酸乙酯。
- 5.6 甲醇。
- 5.7 磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L):在 800 mL 去离子水中溶解 8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、1.44 g 磷酸氢二钠和 0.24 g 磷酸二氢钾,用 0.01 mol/L 盐酸调节溶液的 pH 值至 7.4,加水定容至 1 000 mL。
- 5.8 甲醇-磷酸盐缓冲溶液:按照体积比 1:4 将甲醇与缓冲溶液(5.7)混匀。

6 设备仪器和器皿

- 6.1 酶标仪:波长 450 nm。
- 6.2 天平:感量 0.1 g 和 0.000 1 g。
- 6.3 微量可调移液器及配套吸头:50 μ L、100 μ L、1 000 μ L。
- 6.4 可控温的超声波浴:工作频率为 40 kHz,控温精度为 ± 5 $^{\circ}$ C。
- 6.5 氮吹仪。
- 6.6 烘箱:控温精度为 ± 1 $^{\circ}$ C。
- 6.7 pH 计:配备玻璃电极,测量精度至少精确到 0.1。

7 试验步骤

7.1 试样前处理

称取 5 g 代表性的试样,剪碎至 5 mm \times 5 mm 以下,混匀。从混合样中称取 1.0 g 试样,置于 50 mL 带旋盖的离心管中。准确加入 20 mL 体积比为 1:1 的正己烷(5.4)和乙酸乙酯(5.5)混合溶剂,置于 45 $^{\circ}$ C 的超声波浴(6.4)中萃取 30 min,取 1 mL 萃取液,氮气吹干,用 100 μ L 甲醇-磷酸盐缓冲溶液(5.8)复溶,待测。

7.2 酶联免疫检测

- 7.2.1 测试前需要将所有试剂放置至室温(20 $^{\circ}$ C \sim 25 $^{\circ}$ C)后方可使用。
- 7.2.2 取系列甲基对硫磷标准工作溶液 5.1d)和待测样品溶液(7.1)各 50 μ L 分别加入至相应的酶标板 5.1a)孔中,每个溶液平行测试 2 个,然后再分别加入 50 μ L 有机磷类抗体工作溶液 5.1b),在烘箱(6.6)中 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min。
- 7.2.3 弃去孔中液体,并将酶标板 5.1a)剩余残液在吸水纸上拍干。每孔注满洗涤液(5.2),轻轻振荡,放置 2 min,弃去孔中液体,并在吸水纸上拍干,重复洗涤 4 次。
- 7.2.4 在每孔中加入 50 μ L 酶标二抗 5.1c),在烘箱(6.6)中于 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min。
- 7.2.5 弃去孔中的液体,并将酶标板剩余残液在吸水纸上拍干,每孔注满洗涤液(5.2),轻轻振荡,放置 2 min,弃去孔中液体,并在吸水纸上拍干,重复洗涤 4 次。

7.2.6 在每孔中加入 50 μL 显色液(5.3),在烘箱(6.6)中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光显色 15 min。

7.2.7 在每孔中加入 50 μL 终止液 5.1 g)以终止反应,于 10 min 内用波长 450 nm 的酶标仪(6.1)测定吸光度值。

7.3 空白试验

在不加试样的情况下,按上述步骤进行试验。

8 结果计算与表达

8.1 相对吸光度值的计算

分别计算标准溶液和样品溶液的平均吸光度值,按公式(1)计算标准溶液或样品溶液的相对吸光度值。

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

式中:

A ——相对吸光度值;

B ——系列标准工作溶液或样品溶液的平均吸光度值;

B_0 ——0 $\mu\text{g/L}$ 标准工作溶液的平均吸光度值。

8.2 绘制标准工作曲线

以相对吸光度值为纵坐标(%),标准工作溶液浓度($\mu\text{g/L}$)的对数值为横坐标,绘制标准工作曲线。每次试验均应绘制标准工作曲线。

8.3 有机磷类农药浓度的计算和结果表达

从 8.2 中绘制的标准工作曲线上,读取样品溶液相对吸光度值所对应的有机磷类农药浓度。按公式(2)计算试样中的有机磷类农药的含量。

$$X = \frac{20 \times c \times V}{m} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——试样中有机磷类农药的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);

c ——从标准工作曲线上得到的试样中有机磷类农药浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

V ——复溶后样品溶液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

计算结果应扣除空白,精确至一位小数。

如被测试样中有机磷类农药含量小于 2.0 $\mu\text{g/kg}$,则结果表示为未检出;如含量超过或等于 2.0 $\mu\text{g/kg}$,则结果为实测值,宜使用 GB/T 18412.3 中规定的方法或其他仪器分析方法再进行检测。

9 检出限

以甲基对硫磷计,检出限为 2.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

10 试验报告

试验报告至少应给出下述内容:

GB/T 40175.3—2021

- a) 本文件的编号；
- b) 样品来源及描述；
- c) 测试结果；
- d) 试验日期；
- e) 任何偏离本文件的细节。



附 录 A
(资料性)
有机磷类农药酶联免疫试剂盒示例

A.1 试剂盒组成

试剂盒组成如下：

——酶标板 96 孔	
——有机磷类抗试剂(一抗)	6 mL
——有机磷类酶标物(二抗)	6 mL
——甲基对硫磷标准液(0 μg/L、1 μg/L、5 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、1 000 μg/L)	6×1 mL
——底物液 A 液	6 mL
——底物液 B 液	6 mL
——终止液	6 mL
——浓缩洗涤液(10 倍浓缩)	40 mL
——稀释液	40 mL

A.2 试剂盒的保存

本试剂盒在-2℃~8℃的温度下储存,有效期为1年。如果超过3个月不使用试剂盒,将一抗和二抗放置-20℃保存。

A.3 试剂盒交叉反应性

见表 A.1。

表 A.1 试剂盒交叉反应性

农药名称	CAS 号	交叉反应率/%
甲基对硫磷	298-00-0	100
甲基对氧磷	950-35-6	100
杀螟硫磷	122-14-5	87
倍硫磷	55-38-9	85

参 考 文 献

- [1] GB/T 18412.3 纺织品 农药残留量的测定 第3部分:有机磷农药
-

