

ICS 65.100.10
CCS G 25

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4409—2023

代替 HG/T 3617—1999

苏云金杆菌可湿性粉剂

Bacillus thuringiensis wettable powder

2023-12-22 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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。

本文件代替 HG/T 3617—1999《苏云金杆菌可湿性粉剂》，与 HG/T 3617—1999 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了苏云金杆菌可湿性粉剂毒力效价指标(见 4.2，HG/T 3617—1999 的 3.2)；
- 增加了苏云金杆菌可湿性粉剂热储稳定性控制项目和指标(见 4.2)；
- 增加了苏云金杆菌可湿性粉剂低温稳定性控制项目和指标(见 4.2)；
- 增加了苏云金杆菌可湿性粉剂毒力效价测定用试验虫的种类和说明(见 4.2)；
- 更改了苏云金杆菌可湿性粉剂中毒素蛋白质量分数指标(见 4.2，HG/T 3617—1999 的 3.2)；
- 更改了苏云金杆菌可湿性粉剂的 pH 指标(见 4.2，HG/T 3617—1999 的 3.2)；
- 更改了苏云金杆菌可湿性粉剂的湿筛试验指标(见 4.2，HG/T 3617—1999 的 3.2)；
- 更改了苏云金杆菌可湿性粉剂的润湿时间指标(见 4.2，HG/T 3617—1999 的 3.2)；
- 增加了苏云金杆菌可湿性粉剂的持久起泡性控制项目和指标(见 4.2)；
- 增加了检验规则(见第六章)；
- 更改了苏云金杆菌可湿性粉剂的质量保证期的规定(见 7.2，HG/T 3616—1999 的 6.5)；
- 更改了苏云金杆菌可湿性粉剂的毒力效价测定的仲裁法(见附录 C，HG/T 3616—1999 的附录 B)。

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。

本文件由农业农村部种植业管理司提出。

本文件由全国农药标准化技术委员会(SAC/TC 133)归口。

本文件起草单位：武汉科诺生物科技股份有限公司、江苏东宝农化股份有限公司、济南天邦化工有限公司、山西绿海农药科技有限公司、福建绿安生物农药有限公司、湖北省生物农药工程研究中心、沈阳沈化院测试技术有限公司、沈阳化工研究院有限公司。

本文件主要起草人：杨闻翰、刘荷梅、史晓利、于海博、丁绍武、王婉秋、王改霞、张小科、刘华梅、宋钰、王月莹、张志刚。

本文件所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1999 年首次发布为 HG/T 3617—1999；
- 本次为首次修订。



苏云金杆菌可湿性粉剂

1 范围

本文件规定了苏云金杆菌可湿性粉剂的技术要求、试验方法、检验规则、验收和质量保证期以及标志、标签、包装、储运。

本文件适用于苏云金杆菌鲎泽亚种(*B. t. a*)和苏云金杆菌库斯塔克亚种(*B. t. k*)可湿性粉剂产品生产的质量控制。

注:苏云金杆菌的其他名称、分类地位和形态学特征等描述见附录 A。

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 1600—2021 农药水分测定方法
- GB/T 1601 农药 pH 值的测定方法
- GB/T 1604 商品农药验收规则
- GB/T 1605—2001 商品农药采样方法
- GB 3796 农药包装通则
- GB/T 5451 农药可湿性粉剂润湿性测定方法
- GB/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB/T 14825—2006 农药悬浮率测定方法
- GB/T 16150—1995 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法
- GB/T 19136—2021 农药热储稳定性测定方法
- GB/T 28137 农药持久起泡性测定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

毒素蛋白 toxin protein

苏云金杆菌在芽孢形成时期产生的一种伴孢晶体蛋白,是使其产品具有杀虫活性的主要物质。

3.2

毒力效价 toxicitypotency

根据产品的生物活性和对生物体的作用来设计试验,与具有确定国际单位的标样进行对比性生物反应,测定样品的毒力效果的生物学活性指标,其结果用单位质量的国际单位表示。

4 技术要求

4.1 外观

均匀的疏松粉末,不应有团块。

4.2 技术指标

苏云金杆菌可湿性粉剂还应符合表 1 的要求。

表 1 苏云金杆菌可湿性粉剂技术指标

| 项目 | 指标 | |
|--|-----------------------------|-----------------|
| | 32 000 IU/mg 规格 | 16 000 IU/mg 规格 |
| 毒素蛋白质量分数,% | ≥4.0 | ≥2.0 |
| 毒力效价(<i>H. a.</i>) ^a , (IU/mg) | ≥32 000 | ≥16 000 |
| pH | 4.0~7.5 | |
| 水分,% | ≤4.0 | |
| 湿筛试验(通过 75 mm 试验筛),% | ≥98 | |
| 悬浮率,% | ≥70 | |
| 润湿时间,s | ≤120 | |
| 持久起泡性(1min 后泡沫量),mL | ≤60 | |
| 低温稳定性 | 冷储后,毒素蛋白质量分数、毒力效价仍应符合本文件的要求 | |
| 热储稳定性 | 热储后,pH、湿筛试验、润湿时间仍应符合本文件的要求 | |
| ^a <i>H. a.</i> 代表棉铃虫(<i>Helicoverpa armigera</i>),也可选择小菜蛾和甜菜夜蛾作为试验虫,试验结果分别表示为毒力效价(<i>P. x.</i>)和毒力效价(<i>S. e.</i>),但应以毒力效价(<i>H. a.</i>)作为仲裁法。 <i>P. x.</i> 代表小菜蛾(<i>Plutella xylostella</i>), <i>S. e.</i> 代表甜菜夜蛾(<i>Spodoptera exigua</i>)。 | | |

5 试验方法

警示:使用本文件的人员应有实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施。

5.1 一般规定

本文件所用试剂和水在没有注明其他要求时,均指分析纯试剂和蒸馏水。

5.2 取样

按 GB/T 1605—2001 中 5.3.3 的规定执行。用随机数表法确定取样的包装件;最终取样量应不少于 200 g。

5.3 鉴别试验

5.3.1 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)

本鉴别试验可与毒素蛋白质量分数的测定同时进行。在相同的操作条件下,试样溶液与标样溶液应具有相同的蛋白区带,由此证明产品中的有效毒素蛋白的相对分子质量为 130 000。

5.3.2 生物测定法

根据代表菌株的形态学和生理生化特征进行菌种鉴别,并可辅助脂肪酸分析、Biolog、16SrRNA 序列分析等手段。当对鉴别结果有争议或需要进行法律仲裁检验时,应到具有菌种鉴定资质的单位,将待检菌株与模式菌种进行比对,出具菌种鉴定报告,作为仲裁依据。

有效成分的特征见附录 A。

5.4 外观的测定

采用目测法测定。

5.5 毒素蛋白质量分数的测定

5.5.1 方法提要

用碱性溶液处理苏云金杆菌可湿性粉剂伴孢晶体,使其降解为毒素蛋白,然后通过 SDS-PAGE,依据蛋白质相对分子质量的差异,使毒素蛋白与其他杂蛋白分离,之后用电泳凝胶成像系统扫描蛋白区带面积,进行定量。

5.5.2 试剂和溶液

5.5.2.1 水。

5.5.2.2 十二烷基硫酸钠。

5.5.2.3 三羟基甲基氨基甲烷。

5.5.2.4 浓盐酸。

5.5.2.5 氢氧化钠。

- 5.5.2.6 甘氨酸。
- 5.5.2.7 甘油。
- 5.5.2.8 巯基乙醇。
- 5.5.2.9 溴酚蓝。
- 5.5.2.10 考马斯亮蓝 R-250。
- 5.5.2.11 甲醇。
- 5.5.2.12 冰乙酸。
- 5.5.2.13 无水乙醇。
- 5.5.2.14 0.55 mol/L 氢氧化钠溶液:在烧杯中量取 100 mL 水,缓慢加入 2.2 g 氢氧化钠,边加入边搅拌溶解,待充分溶解后,放置室温,密闭保存备用。
- 5.5.2.15 1 mol/L、pH 6.8 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 12.1 g 溶于水中,用浓盐酸调至 pH 6.8,用水定容至 100 mL。
- 5.5.2.16 电泳缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 3.0 g、甘氨酸 14.4 g、十二烷基硫酸钠 1 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。
- 5.5.2.17 3×样品稀释液:1 mol/L、pH 6.8 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 18.75 mL,十二烷基硫酸钠 6 g,甘油 30 mL,巯基乙醇 15 mL,溴酚蓝 0.5 g,用水定容至 100 mL。
- 5.5.2.18 染色液:称取考马斯亮蓝 R-250 1.0 g,加入甲醇 450 mL、冰乙酸 100 mL、水 450 mL,溶解过滤后使用。
- 5.5.2.19 脱色液:量取甲醇 100 mL、冰乙酸 35 mL,用水定容至 1 000 mL。
- 5.5.2.20 漂洗液:量取无水乙醇 30 mL、冰乙酸 10 mL、水 60 mL,混合均匀后使用。
- 5.5.2.21 固定液:量取冰乙酸 75 mL,用水定容至 1 000 mL。混合均匀后使用。
- 5.5.2.22 毒素蛋白(相对分子质量为 130 000)标样:已知质量分数, $\omega \geq 9.0\%$ 。

5.5.3 仪器

- 5.5.3.1 电泳仪。
- 5.5.3.2 夹芯式垂直电泳槽(1.0 mm 凹形带槽橡胶模框)、凝胶板(1.0 mm,15 孔或 10 孔样品槽模具)。
- 5.5.3.3 电泳凝胶成像系统。
- 5.5.3.4 水浴锅。
- 5.5.3.5 可调移液器。
- 5.5.3.6 微量进样器。
- 5.5.3.7 离心机:20 000 r/min。
- 5.5.3.8 脱色摇床:90 r/min。

5.5.4 测定步骤

5.5.4.1 试样处理

分别称取含毒素蛋白 5.5 mg 的标样和试样(精确至 0.01 mg)于 10 mL 离心管中,加 5 mL 水,充分混匀,移取 0.5 mL,置于 1.5 mL 离心管中,加入 0.55 mol/L 氢氧化钠溶液 0.125 mL(使氢氧化钠溶液的最终浓度为 0.1 mol/L),摇匀,静置 5 min,再加入 3×样品稀释液 0.325 mL,于沸水浴中煮 6 min,冷却至室温,15 000 r/min 离心 5 min,取上层清液,以备电泳上样,样品的折算的最终定容体积为 9.5 mL。

5.5.4.2 SDS-PAGE 分离毒素蛋白

5.5.4.2.1 制备 8%~10% 聚丙烯酰胺凝胶

采用不连续缓冲系统,制胶方法见附录 B。

5.5.4.2.2 上样

取上述标样溶解液上层清液,于聚丙烯酰胺凝胶的上样孔中分别上样 2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L、10 μ L

(毒素蛋白质量为 1 μg~5 μg),取 6 μL 的试样溶液上层清液(毒素蛋白含量约为 3 μg)加入上样孔中,注入电泳缓冲液后,接通电源。

5.5.4.2.3 电泳

电泳初期电压控制在 100 V 左右,待试样进入分离胶后,加大电压到 120 V,继续电泳。当指示剂前沿到达距底端 1 cm 左右时,停止电泳,取出胶板,在固定液中浸泡 30 min。

5.5.4.2.4 染色

将分离胶部分取下,用染色液染色过夜。

5.5.4.2.5 脱色

倒去染色液,先用漂洗液洗涤凝胶,然后加入脱色液使其脱色,根据需要更换几次脱色液,直至背景清晰为止。

5.5.4.3 测定

凝胶经脱色后,可清晰地看到 130 000 蛋白区带,用电泳凝胶成像系统及相关的图形处理软件处理该区带,得到各蛋白区带的灰度值,对于标样溶液作毒素蛋白质量对蛋白区带灰度值的标准曲线;利用样品溶液的区带灰度值,由标准曲线计算其对应的毒素蛋白质量。

5.5.5 计算

试样中毒素蛋白的质量分数按公式(1)计算。

$$\omega_1 = \frac{m_1 \times V_1}{m_2 \times V_2} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ω₁——毒素蛋白质量分数的数值,单位为百分号(%) ;
- m₁——从标准曲线上查得的样品中毒素蛋白质量的数值,单位为微克(μg) ;
- V₁——样品最终定容体积的数值,单位为毫升(mL) ;
- m₂——样品称样质量的数值,单位为毫克(mg) ;
- V₂——注入凝胶上样孔样品体积的数值,单位为微升(μL)。

5.5.6 允许差

毒素蛋白质量分数 2 次平行测定结果之相对差应不大于 8%,取其算术平均值作为测定结果。

5.6 毒力效价的测定

按附录 C 进行。

5.7 水分的测定

按 GB/T 1600—2021 中 4.3 的规定执行。

5.8 pH 的测定

按 GB/T 1601 的规定执行。

5.9 湿筛试验

按 GB/T 16150—1995 中 2.2 的规定执行。

5.10 悬浮率的测定

5.10.1 测定

按 GB/T 14825—2006 中 4.1 的规定执行。称取 500 mg 试样(精确至 0.1 mg)于 200 mL 烧杯中,加入 50 mL 标准硬水,以 120 r/min 速度搅拌 2 min,混合均匀试样。将悬浮液全部转移至 250 mL 具塞玻璃量筒中,用标准硬水稀释到 250 mL。经过处理之后,将量筒内剩余的 25 mL 悬浮液及沉淀物全部转移至 100 mL 烧杯,充分混匀,移取 5 mL,置于 10 mL 离心管中,不加水稀释,移取 0.5 mL 至 1.5 mL 离心管中,按照 5.5.4.1 步骤后续处理,取 10 μL 的试样离心上层清液加入上样孔中,其他按 5.5 相应描述测定毒素蛋白质量分数。量筒底部 25 mL 悬浮液折算的最终定容体积为 47.5 mL。

5.10.2 计算

悬浮率按公式(2)计算。

$$\omega_2 = \frac{m_4 \times \omega_1 - m_3 \times V_3 \times 100 \div V_4}{m_4 \times \omega_1} \times 111.1 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- ω_2 ——悬浮率的数值,单位为百分号(%);
- m_4 ——试样质量的数值,单位为毫克(mg);
- ω_1 ——试样中毒素蛋白质量分数的数值,单位为百分号(%);
- m_3 ——从标准曲线上查得的样品中毒素蛋白质量的数值,单位为微克(μg);
- V_3 ——量筒底部 25 mL 悬浮液最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_4 ——注入凝胶上样孔样品体积的数值,单位为微升(μL);
- 100 ——单位换算系数;
- 111.1 ——测定体积与总体积的换算系数。

5.11 润湿时间的测定

按 GB/T 5451 的规定执行。

5.12 持久起泡性的测定

按 GB/T 28137 的规定执行。

5.13 低温稳定性试验

5.13.1 方法提要

将试样于 $(0 \pm 2)^\circ\text{C}$ 储存 7 d 后,对规定项目进行测定。

5.13.2 仪器

5.13.2.1 制冷器: $(0 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

5.13.2.2 干燥器。

5.13.3 试验步骤

将 5 g 试样置于玻璃瓶中密闭,在 $(0 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的制冷器中储存 7 d,取出,放入干燥器中,恢复至室温。于 24 h 内进行测定。

5.14 热储稳定性试验

按 GB/T 19136—2021 中 4.4.1 的规定执行。热储时,样品应密封储存,热储前后质量变化率应不大于 1.0%。

6 检验规则

6.1 出厂检验

每批产品均应做出厂检验,经检验合格签发合格证后,方可出厂。出厂检验项目为第 4 章技术要求中外观、毒素蛋白质量分数、毒力效价、pH、水分、湿筛试验、悬浮率、润湿时间、持久起泡性、低温稳定性。

6.2 型式检验

型式检验项目为第 4 章中的全部项目,在正常连续生产情况下,每 3 个月至少进行 1 次。有下述情况之一,应进行型式检验:

- a) 原料有较大改变,可能影响产品质量时;
- b) 生产地址、生产设备或生产工艺有较大改变,可能影响产品质量时;
- c) 停产后又恢复生产时;
- d) 国家质量监管机构提出型式检验要求时。

6.3 判定规则

按 GB/T 8170—2008 中 4.3.3 判定检验结果是否符合本文件的要求。

按第 4 章技术要求对产品进行出厂检验和型式检验,任一项目不符合指标要求判为该批次产品不合格。

7 验收和质量保证期

7.1 验收

应符合 GB/T 1604 的规定。

7.2 质量保证期

在 8.2 的储运条件下,苏云金杆菌可湿性粉剂的质量保证期从生产日期算起为 2 年。质量保证期内,各项指标均应符合本文件的要求。

8 标志、标签、包装、储运

8.1 标志、标签、包装

苏云金杆菌可湿性粉剂的标志、标签、包装应符合 GB 3796 的规定;苏云金杆菌可湿性粉剂的包装采用清洁、干燥的复合膜袋或铝箔袋包装,每袋净含量每袋净含量 50 g、100 g、200 g、500 g。也可根据用户要求或订货协议采用其他形式的包装,但需符合 GB 3796 的规定。

8.2 储运

苏云金杆菌湿性粉剂包装件应储存在通风、阴凉、干燥的库房中,严防日晒;储运时,产品对温度敏感,要关注储运时的温度变化,要严防潮湿、日晒和高温;不得与食物、种子、饲料混放;避免与皮肤、眼睛接触,防止由口鼻吸入。

附录 A

(资料性)

苏云金杆菌的其他名称、分类地位和形态学特征等描述

苏云金杆菌的其他名称、分类地位和形态学特征等描述如下：

- 中文通用名称：苏云金杆菌+菌株编号。
- 拉丁学名：*Bacillus thuringiensis*。
- 分类地位：细菌(*Bacteria*)；厚壁菌门(*Firmicutes*)；芽孢杆菌纲(*Bacilli*)；芽孢杆菌目(*Bacillales*)；芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)；芽孢杆菌属(*Bacillus*)。
- 形态学特征：菌体在显微镜下呈椭圆形杆状，呈短链或者长链状排列，大小为 $(1.2\sim 1.8)\mu\text{m}\times(3.0\sim 5.0)\mu\text{m}$ ，革兰氏染色阳性。芽孢为椭圆形，靠近中间生长，大小为 $2\mu\text{m}\times(0.8\sim 0.9)\mu\text{m}$ ，芽孢囊微膨大。菌体的一头或两头会释放不定量的伴孢晶体(parasporal crystal)，多数为长菱形、短菱形、方形，也有呈立方形、球形、椭球形、不规则形、三角形及镶嵌形等。在 NA 上菌落为圆形或者椭圆形，淡黄色，边缘不规则，不透明微隆起呈滴蜡状。
- 有效成分主要存在形式：伴孢晶体。
- 主要生物活性：杀虫(防病)。
- 培养保存条件：最适生长温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；适合培养基为营养琼脂(NA)或营养肉汤(NB)培养基；适宜储存温度为 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

附 录 B
(资料性)
电泳凝胶的制备

B.1 制板

选择两块大小一样的玻璃板,其中一块一端带有 2 cm~3 cm 高的凹槽。两块玻璃板洗净干燥后,固定在制板装置上,下端应密封完整,形成 1.0 mm 间隙的制胶板。

B.2 试剂与溶液

B.2.1 水。

B.2.2 十二烷基硫酸钠。

B.2.3 四甲基乙二胺。

B.2.4 丙烯酰胺。

B.2.5 亚甲基双丙烯酰胺(又称为甲叉双丙烯酰胺)。

B.2.6 三羟甲基氨基甲烷。

B.2.7 浓盐酸。

B.2.8 过硫酸铵。

B.2.9 甘氨酸。

B.2.10 30%丙烯酰胺溶液:称取丙烯酰胺 29.0 g、亚甲基双丙烯酰胺 1.0 g,溶于 100 mL 水中,过滤,于 4 °C 暗处储存备用。

B.2.11 1 mol/L、pH 8.8 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 30.2 g 溶于水中,用浓盐酸调至 pH 8.8,用水定容至 250 mL。

B.2.12 1 mol/L、pH 6.8 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 12.1 g 溶于水中,用浓盐酸调至 pH 6.8,用水定容至 100 mL。

B.2.13 10%十二烷基硫酸钠溶液:称取十二烷基硫酸钠 0.5 g,用水溶解并定容至 5 mL。

B.2.14 10%过硫酸铵溶液:称取过硫酸铵 0.1 g,用水溶解并定容至 1 mL,于 4 °C 储存备用,储存期不超过 1 周。

B.2.15 电泳缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 3.0 g、甘氨酸 14.4 g、十二烷基硫酸钠 1 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

B.3 制备分离胶

从冰箱中取出制胶试剂,平衡至室温。按表 B.1 先配制分离胶。将胶液配好、混匀后,迅速注入两块玻璃板的间隙中,至胶液面离玻璃板凹槽 3.5 cm 左右。然后在胶面上轻轻铺 1 cm 高的水,加水时通常顺玻璃板慢慢加入,勿扰乱胶面。垂直放置胶板于室温约 30 min 左右使之凝聚。此时,在凝胶和水之间可以看到很清晰的一条界面。然后倒出胶面上的水。

表 B.1 SDS-PAGE 凝胶的配方

| 储备液 | 10%分离胶 | 8%分离胶 | 5%浓缩胶 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|
| 30%丙烯酰胺溶液 | 6.7 mL | 5.3 mL | 1.3 mL |
| 1 mol/L、pH 8.8 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 | 7.6 mL | 7.6 mL | — |
| 1 mol/L、pH 6.8 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 | — | — | 1.0 mL |

表 B.1 (续)

| | | | |
|------------|-----------|------------|------------|
| 水 | 5.3 mL | 6.7 mL | 5.5 mL |
| 10%十二烷基硫酸钠 | 0.2 mL | 0.2 mL | 80 μ L |
| 10%过硫酸胺 | 0.2 mL | 0.2 mL | 80 μ L |
| 四甲基乙二胺 | 8 μ L | 12 μ L | 8 μ L |
| 总体积 | 20 mL | 20 mL | 8 mL |

B.4 制备浓缩胶

按表 B.1 配制浓缩胶,用少量灌入玻璃板间隙中,冲洗分离胶胶面,而后倒出。然后把余下的胶液注入玻璃板间隙,使胶液面与玻璃板凹槽处平齐,而后插入梳子,在室温放置 30 min,浓缩胶即可凝固。慢慢取出梳子,取时应防止把胶孔弄破。取出梳子后,在形成的胶孔中加入水,冲洗杂质,倒出孔中水,再加入电泳缓冲液。

将灌好胶的玻璃板垂直固定在电泳槽上,带凹槽的玻璃板与电泳槽紧贴在一起,形成一个储液槽,向其中加入电泳缓冲液,使其与胶孔中的缓冲液相接触,在电泳槽下端的储液槽中也加入电泳缓冲液。

附 录 C
(规范性)
毒力效价的测定

C.1 毒力效价测定方法——用棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)作试虫的测定方法(仲裁法)

C.1.1 试剂和材料

C.1.1.1 标准品:已知毒力效价标准品。

C.1.1.2 棉铃虫幼虫:*Helicoverpa armigera*。

C.1.1.3 黄豆粉:黄豆炒熟后磨碎过60目筛。

C.1.1.4 酵母粉:食用级。

C.1.1.5 冰乙酸

C.1.1.6 水。

C.1.1.7 36%乙酸溶液:体积比 $\phi_{(\text{乙酸}:\text{水})}=36:64$ 。

C.1.1.8 苯甲酸钠。

C.1.1.9 维生素C。

C.1.1.10 琼脂粉。

C.1.1.11 氯化钠。

C.1.1.12 磷酸氢二钾。

C.1.1.13 磷酸二氢钾。

C.1.1.14 聚山梨酯-80。

C.1.1.15 磷酸缓冲液:分别称取氯化钠8.5g、磷酸氢二钾6.0g、磷酸二氢钾3.0g于玻璃器皿中,加入0.1mL聚山梨酯-80和1000mL水,充分溶解后混匀。

C.1.2 仪器和设备

C.1.2.1 电动搅拌器:无级调速,100 r/min~6000 r/min。

C.1.2.2 微波炉或电炉。

C.1.2.3 振荡器。

C.1.2.4 水浴锅。

C.1.2.5 组织培养盘:24孔。

C.1.2.6 搪瓷盘:30cm×20cm。

C.1.2.7 磨口三角瓶:250mL,具塞。

C.1.2.8 大烧杯:1000mL。

C.1.2.9 小烧杯:50mL。

C.1.2.10 试管:18mm×180mm。

C.1.2.11 玻璃珠:直径5mm。

C.1.2.12 注射器:50mL。

C.1.2.13 移液管。

C.1.2.14 标本缸。

C.1.2.15 恒温培养箱。

C.1.3 测定步骤

C.1.3.1 感染液的配制

C.1.3.1.1 标准品

称取 100.0 mg~150.0 mg 标准品(精确至 0.1 mg),装入 250 mL 装有 10 粒玻璃珠的磨口三角瓶中。加入 100 mL 磷酸缓冲液,浸泡 10 min,在振荡器上振荡 30 min。得到浓度约为 1 mg/mL 的标准品母液(该母液在 4 ℃冰箱中可存放 10 d)。然后将标准品母液用磷酸缓冲液以一定的倍数等比稀释,稀释成浓度约为 1.000 mg/mL、0.500 mg/mL、0.250 mg/mL、0.125 mg/mL、0.062 5 mg/mL、0.031 3 mg/mL 6 个稀释感染液,并设磷酸缓冲液作对照,每一浓度感染液吸取 3 mL,置至 50 mL 小烧杯内待用,对照吸取 3 mL 磷酸缓冲液。

C.1.3.1.2 样品

称取相当于标准品毒力效价的可湿性粉剂样品适量(精确至 0.1 mg),加 100 mL 磷酸缓冲液,然后参照标准品的配制方法配制样品感染液。

对有些效价过高或过低的样品,在测定前需先以 3 个距离相差较大的浓度做预备试验,估计 LC_{50} 值的范围,据此设计稀释浓度。

C.1.3.2 感染饲料的配制

C.1.3.2.1 饲料配方

酵母粉 12g、黄豆粉 24 g、维生素 C 1.5 g、苯甲酸钠 0.42 g、36%乙酸 3.9 mL、水 300 mL。

C.1.3.2.2 饲料配制

将黄豆粉、酵母粉、维生素 C、苯甲酸钠和 36%乙酸放入大烧杯内,加 100 mL 水湿润,另将余下 200 mL 水加入 4.5 g 琼脂粉,在微波炉上加热至沸腾,使琼脂完全溶化,取出冷却至 70 ℃,即与其他成分混合,在电动搅拌器内高速搅拌 1 min,迅速移至 60 ℃水浴锅中加盖保温。

用注射器吸取 27 mL 饲料,注入上述已有样品或标准品感染液的烧杯内,以电动搅拌器高速搅拌 0.5 min,迅速倒入组织培养盘上各小孔中(倒入量不要求一致,以铺满孔底为准),凝固待用。

C.1.3.3 接虫感染

于 26 ℃~30 ℃室温下,将未经取食的初孵幼虫(孵化后 12 h 内)抖入直径 20 cm 的标本缸中,静待数分钟选取爬上缸口的健康幼虫作供试虫,用毛笔轻轻地将它们移入已有感染饲料的组织盘的小孔内,每孔 1 头虫。每个浓度和空白对照皆放 48 头虫,用塑料薄片盖住,然后将组织培养盘逐个叠起,用橡皮筋捆紧,竖立放于 30 ℃恒温培养箱内培养 72 h。

C.1.4 结果检查及计算

用肉眼或放大镜检查死、活虫数。以细签触动虫体,完全无反应的为死虫,计算死亡率。如对照有死亡,可查 Abbott 校正值表或按公式(C.1)计算校正死亡率。对照死亡率在 5%以下不用校正,5%~10%需校正,大于 10%则测定无效。

$$X_1 = \frac{T - C}{1 - C} \times 100 \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

X_1 ——校正死亡率的数值,单位为百分号(%);

T ——处理死亡率;

C ——对照死亡率。

将浓度换算成对数值,死亡率或校正死亡率换算成机率值,用最小二乘法工具分别求出标准品和样品的 LC_{50} 值,按公式(C.2)计算试样的毒力效价。

$$X_2 = \frac{S \times P}{Y} \dots\dots\dots (C.2)$$

式中:

X_2 ——试样的毒力效价的数值,单位为国际单位每毫克(IU/mg);

S ——标准品 LC_{50} 值；

P ——标准品效价的数值，单位为国际单位每毫克(IU/mg)；

Y ——样品 LC_{50} 值。

C.1.5 允许差

毒力测定法测定允许相对差，但每个样品 3 次重复测定结果之最大相对差不得超过 20%。毒力测定制剂各浓度所引起的死亡率应在 10%~90%，在 50%死亡率上下至少要各有 2 个浓度。

C.2 毒力效价测定方法——用小菜蛾(*Plutella xylostella*)作试虫的测定方法

C.2.1 试剂和材料

C.2.1.1 标准品：已知毒力效价标准品。

C.2.1.2 小菜蛾幼虫：*Plutella xylostella*。

C.2.1.3 食用菜籽油。

C.2.1.4 酵母粉：食品级。

C.2.1.5 维生素 C。

C.2.1.6 琼脂粉：凝胶强度大于 300 g/cm²。

C.2.1.7 磷酸氢二钾。

C.2.1.8 磷酸二氢钾。

C.2.1.9 聚山梨酯-80。

C.2.1.10 菜叶粉：甘蓝型油菜叶，80℃烘干，磨碎，过 80 目筛。

C.2.1.11 蔗糖。

C.2.1.12 纤维素粉 CF-11。

C.2.1.13 氢氧化钾。

C.2.1.14 氢氧化钾水溶液： $c_{(\text{氢氧化钾})} = 0.001 \text{ mol/L}$ 。

C.2.1.15 氯化钠。

C.2.1.16 对羟基苯甲酸甲酯。

C.2.1.17 95%乙醇。

C.2.1.18 尼泊金溶液：称取 15 g 对羟基苯甲酸甲酯，加入 100 mL 95%乙醇，充分溶解后混匀。

C.2.1.19 甲醛。

C.2.1.20 水。

C.2.1.21 甲醛水溶液：体积比 $\psi_{(\text{甲醛}:\text{水})} = 1:9$ 。

C.2.1.22 干酪素：生物试剂。

C.2.1.23 干酪素溶液：称取 2 g 干酪素，加 2 mL 氢氧化钾水溶液溶解，再加入 8 mL 水，混合均匀。

C.2.1.24 磷酸缓冲液：同 C.1.1.15。

C.2.2 仪器和设备

C.2.2.1 磨口三角瓶：250 mL。

C.2.2.2 电动搅拌器：无级调速，100 r/min~6 000 r/min。

C.2.2.3 医用手术刀。

C.2.2.4 振荡器。

C.2.2.5 水浴锅。

C.2.2.6 养虫管：9 cm × 2.5 cm。

C.2.2.7 烧杯：50 mL、500 mL。

C.2.2.8 试管:18 mm×180 mm。

C.2.2.9 玻璃珠:直径 5 mm。

C.2.2.10 移液管。

C.2.3 测定步骤

C.2.3.1 感染液的配制

C.2.3.1.1 标准品

用分析天平准确称取标准品 100.0 mg~150.0 mg(精确至 0.1 mg),装入 250 mL 装有 10 粒玻璃珠的磨口三角瓶中。加入 100 mL 磷酸缓冲液,浸泡 10 min,在振荡器上振荡 30 min。得到浓度约为 1 mg/mL 的标准品母液(该母液在 4 °C 冰箱中可存放 10 d)。然后将标准品母液稀释成浓度约为 1.000 mg/mL、0.500 mg/mL、0.250 mg/mL、0.125 mg/mL、0.062 5 mg/mL、0.031 3 mg/mL 6 个稀释感染液。

C.2.3.1.2 样品

称取相当于标准品毒力效价的可湿性粉剂样品适量(精确至 0.1 mg),加 100 mL 磷酸缓冲液,然后参照标准品的配制方法配制样品感染液。

C.2.3.2 感染饲料的配制

C.2.3.2.1 饲料配方

维生素 C 0.5 g、干酪素溶液 1.0 mL、菜叶粉 3.0 g、酵母粉 1.5 g、纤维素粉 CF-11 1.0 g、琼脂粉 2.0 g、蔗糖 6.0 g、菜籽油 0.2 mL、甲醛溶液 0.5 mL、尼泊金溶液 1.0 mL、水 100 mL。

C.2.3.2.2 饲料配制

将蔗糖、酵母粉、干酪素溶液、琼脂粉加入 90 mL 的水中调匀。搅拌煮沸,使琼脂完全溶化,加入尼泊金溶液,搅匀。将其他成分用剩余的 10 mL 水调成糊状。当琼脂冷却至 75 °C 左右时,与之充分混合,搅匀,置 55 °C 水浴锅中保温备用。取 50 mL 烧杯 7 只,写好标签,置 55 °C 水浴中预热,分别向每个烧杯中加入 1 mL 对应浓度的感染液,缓冲液作空白对照。向每个烧杯中加入 9 mL 熔化的饲料;用电动搅拌器搅拌 20 s,使每个烧杯中的感染液与饲料充分混匀。

将烧杯静置,待冷却凝固后,用医用手术刀将感染饲料切成 1 cm×1 cm 的饲料块,每个浓度取 4 个饲料块分别放入 4 支养虫管中,每管放入一块,写好标签。

C.2.3.3 接虫感染

随机取已放置饲料的养虫管,每管投入 10 头小菜蛾三龄初幼虫,每浓度 4 管,塞上棉塞,写好标签,在相同饲养条件下饲养。

C.2.4 结果检查及计算

感染 48 h 后检查试虫的死亡情况。判断死虫的标准是以细签轻轻触动虫体,无任何反应者判为死亡。

计算标准品和样品各浓度的供测昆虫死亡率,查 Abbott 表或用公式(C.1)计算校正死亡率,对照死亡率在 5% 以下不用校正,5%~10% 需校正,大于 10% 则测定无效。

将感染液各浓度换算成对数值,校正死亡率转换成死亡机率值,用最小二乘法工具分别求出标准品 LC_{50} 值和待测样品 LC_{50} 值,然后按公式(C.2)计算待测样品的毒力效价。

C.2.5 允许差

毒力测定方法的允许相对差要求与 C.1.5 相同。

C.3 毒力效价测定方法——用甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)作试虫的测定方法

C.3.1 试剂和材料

C.3.1.1 标准品:已知毒力效价标准品。

C.3.1.2 甜菜夜蛾幼虫;*Spodoptera exigua*。

- C.3.1.3 黄豆粉:黄豆炒熟后磨碎过 60 目筛。
- C.3.1.4 酵母粉:食用级。
- C.3.1.5 维生素 C。
- C.3.1.6 15%尼泊金:对羟基苯甲酸甲酯溶于 95%酒精。
- C.3.1.7 10%甲醛:甲醛溶于水。
- C.3.1.8 对羟基苯甲酸甲酯。
- C.3.1.9 95%乙醇。
- C.3.1.10 尼泊金溶液:称取 15 g 对羟基苯甲酸甲酯,加入 100 mL 95%乙醇,充分溶解后混匀。
- C.3.1.11 甲醛。
- C.3.1.12 水。
- C.3.1.13 甲醛水溶液:体积比 $\psi_{(\text{甲醛}:\text{水})}=1:9$ 。
- C.3.1.14 琼脂粉:凝胶强度大于 300 g/cm²。
- C.3.1.15 磷酸缓冲液:同 C.1.1.15。

C.3.2 仪器和设备

- C.3.2.1 电动搅拌器:无级调速,100 r/min~6 000 r/min。
- C.3.2.2 微波炉或电炉。
- C.3.2.3 振荡器。
- C.3.2.4 水浴锅。
- C.3.2.5 组织培养盘:24 孔。
- C.3.2.6 搪瓷盘:30 cm×20 cm。
- C.3.2.7 磨口三角瓶:250 mL,具塞。
- C.3.2.8 大烧杯:1 000 mL。
- C.3.2.9 小烧杯:50 mL。
- C.3.2.10 试管:18 mm×180 mm。
- C.3.2.11 玻璃珠:直径 5 mm。
- C.3.2.12 注射器:50 mL。
- C.3.2.13 标本缸。
- C.3.2.14 恒温培养箱。

C.3.3 测定步骤

C.3.3.1 感染液的配制

C.3.3.1.1 标准品

称取 100.0 mg~150.0 mg(精确至 0.1 mg)标准品,装入 250 mL 装有 10 粒玻璃珠的磨口三角瓶中。加入 100 mL 磷酸缓冲液,浸泡 10 min,在振荡器上振荡 30 min。得到浓度约为 1 mg/mL 的标准品母液(该母液在 4℃冰箱中可存放 10 d)。然后将标准品母液用磷酸缓冲液以一定的倍数等比稀释,稀释成浓度约为 1.000 mg/mL、0.500 mg/mL、0.250 mg/mL、0.125 mg/mL、0.062 5 mg/mL、0.031 3 mg/mL 6 个稀释感染液,并设磷酸缓冲液作对照,每一浓度感染液吸取 3 mL,置至 50 mL 小烧杯内待用,对照吸取 3 mL 磷酸缓冲液。

C.3.3.1.2 样品

称取相当于标准品毒力效价的可湿性粉剂样品适量(精确至 0.2 mg),加 100 mL 磷酸缓冲液,然后参照标准品的配制方法配制样品感染液。

C.3.3.2 感染饲料的配制

C.3.3.2.1 饲料配方

酵母粉 16g、黄豆粉 32 g、维生素 C 2 g、琼脂 6 g、尼泊金溶液 6.7 mL、甲醛溶液 4 mL、水 400 mL。

C.3.3.2.2 饲料配制

将黄豆粉、酵母粉、维生素 C、尼泊金溶液和甲醛溶液放入大烧杯中,加入 150 mL 水,混匀备用。将余下的 250 mL 水加入 3.5 g 琼脂粉,在微波炉上加热至沸腾,使琼脂完全溶化,取出冷却至 70 °C。即与其他成分混合,在电动搅拌器内高速搅拌 1 min,迅速移至 60 °C 水浴锅中加盖保温。

用注射器吸取 27 mL 饲料,注入上述已有样品或标准品感染液的烧杯内,以电动搅拌器高速搅拌 0.5 min,迅速倒入组织培养盘上各小孔中(倒入量不要求一致,以铺满孔底为准),凝固待用。

C.3.3.3 接虫感染

于 26 °C~30 °C 室温下,将未经取食的初孵幼虫(孵化后 12 h 内)抖入直径 20 cm 的标本缸中,静待数分钟选取爬上缸口的健康幼虫作供试虫,用毛笔轻轻地将它们移入已有感染饲料的组织盘的小孔内,每孔 1 头虫。每个浓度和空白对照皆放 48 头虫,用塑料薄片盖住,然后将组织培养盘逐个叠起,用橡皮筋捆紧,竖立放于 25 °C 恒温培养箱内培养 72 h。

C.3.4 结果检查及计算

用肉眼或放大镜检查死、活虫数。以细签触动虫体,完全无反应的为死虫,计算死亡率。如对照有死亡,可查 Abbott 校正值表或按公式(C.1)计算校正死亡率。对照死亡率在 5% 以下不用校正,5%~10% 需校正,大于 10% 则测定无效。将浓度换算成对数值,死亡率或校正死亡率换算成机率值,用最小二乘法分别求出标准品和样品的 LC_{50} ,按公式(C.2)计算毒力效价。

C.3.5 允许差

毒力测定方法的允许相对差要求与 C.1.5 相同。
