

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4586—2025

苏云金芽胞杆菌农药制剂参照样品的  
制备和定值指南

Guideline for preparation and quantification of *Bacillus thuringiensis*  
pesticide reference materials

2025-01-09 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。

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并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院植物保护研究所、武汉科诺生物科技股份有限公司、农业农村部农药检定所、华中农业大学、湖北省生物农药工程研究中心、扬州绿源生物化工有限公司、全国农业技术推广服务中心。

本文件主要起草人：张杰、束长龙、耿丽丽、刘华梅、刘荷梅、张宏军、孙明、王开梅、徐健、卓富彦。



# 苏云金芽胞杆菌农药制剂参照样品的制备和定值指南

## 1 范围

本文件提供了苏云金芽胞杆菌农药制剂参照样品的分类、制备、定值、包装、证书、标签、质量保证期和储运等指南。

本文件适用于以产品毒力效价或杀虫蛋白为特性值的苏云金芽胞杆菌农药制剂参照样品的制备和定值。球形芽胞杆菌产品也可参照执行。

## 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 3796 农药包装通则

GB 4789.15—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数

GB/T 15000.3 标准样品工作导则 第3部分：标准样品定值和均匀性与稳定性评价

GB/T 15000.4 标准样品工作导则 第4部分：证书、标签和附带文件的内容

GB/T 15000.6 标准样品工作导则 第6部分：标准样品包装通则

GB/T 15000.7 标准样品工作导则 第7部分：标准样品生产者能力的通用要求

GB/T 19567.1—2004 苏云金芽胞杆菌原粉

GB/T 30361—2013 农药干燥减量的测定方法

JJF 1343 标准物质的定值及均匀性、稳定性评估

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**苏云金芽胞杆菌参照样品** *Bacillus thuringiensis* reference materials

有定量毒力效价或杀虫蛋白、均匀稳定的苏云金芽胞杆菌参考品。

注：适用于苏云金芽胞杆菌的不同菌株，通过毒力效价或杀虫蛋白定值的产品。

### 3.2

**均匀性** homogeneity

参照样品的基本属性，包括单元内和单元间均匀性，其毒力效价或杀虫蛋白保持在规定的限值范围内。

### 3.3

**稳定性** stability

参照样品在规定的条件下储存，在规定的时间内，其毒力效价或杀虫蛋白保持在规定的限值范围内。

### 3.4

**质量保证期** quality assurance period

在规定的条件下储存时，能作为参照样品使用的最终有效日期。

### 3.5

**参照样品的生产者** reference material producers; RMP

技术上有能力的机构（公立或私营的组织或公司），对其参照样品生产的项目策划和管理、毒力效价和杀虫蛋白的定值、标签负全部责任。

### 3.6

#### 特性值 property value

参照样品的物理、化学、生物学等特性值。

### 3.7

#### 定值 characterization

对参照样品特性值的测定。

### 3.8

#### 计量溯源性 metrological traceability

是确保测量结果能够在不同时间与空间保持可比的关键。

## 4 参照样品的分类

按参照样品杀虫蛋白分子量和靶标害虫,苏云金芽胞杆菌参照样品分为杀虫蛋白参照样品和毒力效价参照样品。

## 5 参照样品的制备

### 5.1 原料选择

选择不含干扰性杂质、有足够稳定性和高度特异性、质量符合 GB/T 19567.1—2004 要求的苏云金杆菌原粉,制备参照样品可参考附录 A。

### 5.2 生产者能力要求

生产者能力除应达到 GB/T 15000.7 的有关要求外,还应具备:

- a) 能生产或获取与供试品同菌株的合格原粉;
- b) 毒力效价参照样品生产者具备附录 A 要求的加工能力;

### 5.3 参照样品的制备步骤

5.3.1 将苏云金芽胞杆菌原粉约 3 kg,装入铝箔袋中密封,20 °C~25 °C 储存一年。

5.3.2 取上述储存后的苏云金芽胞杆菌原粉,参照附录 A 制备样品。

5.3.3 检测制备好的参照样品,质量指标与检测方法见表 1。

表 1 参照样品质量指标

项目	指标	检测方法
粒径	$D_{50} \leq 25 \mu\text{m}, D_{90} \leq 50 \mu\text{m}$	激光粒度仪干法
干燥减量	$\leq 6\%$	GB/T 30361—2013 中 2.1
霉菌	$\leq 100 \text{ 个/g}$	GB 4789.15—2016 第一法

5.3.4 经检测合格的样品分装入自封袋中,于-20 °C~-18 °C 冷冻室储存,进行均匀性和稳定性评价、定值。

### 5.4 均匀性检验

按 5.3 制备的毒力效价参照样品无需进行均匀性检验,杀虫蛋白参照样品应按照 GB/T 15000.3 设计和开展均匀性检验,检测方法参照附录 B。当参照样品的不均匀性误差和测量方法的随机误差无显著差异,则认为参照样品均匀性良好。

### 5.5 稳定性检验

5.5.1 参照样品均匀性检验合格后,应按照 GB/T 15000.3 设计和开展稳定性检验。包括常温、低温稳定性和长期稳定性检验,也可根据参照样品特性及特殊用途开展其他温度的稳定性试验。

5.5.2 常温储存稳定性试验温度为 20 °C~25 °C,时长为 2 个月,至少检测 5 次。

5.5.3 低温储存稳定性试验温度为 0 °C~5 °C,时长为 1 年~2 年。

5.5.4 长期稳定性试验温度为-20 °C~-18 °C,时长至少 2 年,第一年每 3 个月检验一次,之后每 12 个

月检验一次,每次检验样品数不少于2个。

5.5.5 杀虫蛋白检验可参照附录B;毒力效价检测选择对产品敏感的靶标害虫和对应的检测方法。

## 6 参照样品的定值

### 6.1 总则

对均匀性和稳定性试验评价符合要求的参照样品进行定值。根据苏云金芽胞杆菌特殊的理化性质,采用SDS-PAGE法对杀虫蛋白进行定值,采用生物测定法毒力效价进行定值。

### 6.2 杀虫蛋白的定值

参照样品生产者可参照附录B方法进行杀虫蛋白的定值,也可委托具有GB/T 15000.7所要求能力的机构定值,定值的结果和过程可溯源。检测报告内容应包括但不限于样品相关信息、检验依据、参照样品的标准值及不确定度。定值结果和不确定度的表示可按照JJF 1343的规定执行。

### 6.3 毒力效价的定值

#### 6.3.1 计量溯源性原则

6.3.1.1 苏云金芽胞杆菌参照样品的毒力效价定值,应选用目前市面同菌株可追溯对照样品或以其定值的参照样品;

6.3.1.2 新菌株新靶标参照样品,首次可对毒力效价进行赋值,赋值原则是有利于质量评价和使用指导。一旦首次赋值,以后制备同质参照样品的毒力效价的定值,应遵循计量溯源性原则。

#### 6.3.2 定值方式的选择

6.3.2.1 委托2个以上的有相关检测能力和经验的实验室,采用统一的检测方法进行定值。

6.3.2.2 各实验室应充分沟通试验方法可行性、靶标来源、饲养情况、供试虫龄期和生理状态、检测用参照样品等信息,不同靶标害虫的毒力效价检测应建立可行的检测方法,确保检测方法的一致性。

#### 6.3.3 数据统计处理及定值

6.3.3.1 毒力效价测定结果,用格拉布斯(Grubbs)或狄克逊(Dixon)法检验临界值,剔除可疑值,然后进行正态性检验,数据应符合正态分布。

6.3.3.2 对不同实验室测定的毒力效价的平均值和标准偏差分别进行差异显著性分析。

6.3.3.3 若检验结果没有显著性差异,数据合并给出总体平均值和标准偏差;若差异显著,应检查检测方法、条件及操作过程,改进后重新进行测定。

6.3.3.4 定值结果和不确定度的表示按照JJF 1343的规定执行。

#### 6.3.4 参照样品合格认定

均匀性和稳定性符合要求且定值的样品,作为特定靶标害虫的苏云金芽胞杆菌毒力效价和(或)杀虫蛋白参照样品。

## 7 包装、证书、标签、质量保证期和储运

### 7.1 包装和标签

7.1.1 苏云金芽胞杆菌类农药制剂参照样品的包装应符合GB 3796和GB/T 15000.6的要求。参照样品包装宜采用抗压、性能稳定的5 mL圆底冻存管,外套铝箔袋。

7.1.2 参照样品标签按照GB/T 15000.4的内容要求编写,说明书应包括参照样品信息、定值信息、储存条件、不同储存条件下的质量保证期等。

### 7.2 储运

参照样品的储存条件依据储存目的,按说明书中对应要求执行。参照样品运输过程应保持阴凉干燥,确保包装不破损、无污染。

## 附录 A

### (资料性)

#### 苏云金芽胞杆菌参照样品的制备

##### A.1 仪器设备、原材料

###### A.1.1 主要仪器设备

高速大容量冷冻离心机、数显顶置式电子搅拌器、离心干燥机、混合器、激光粒度分析仪、显微镜、塑料桶(25 L)、电子秤、电子天平(精确至 0.01 g)、冰箱、灭菌锅。

###### A.1.2 包装材料

带盖圆底冻存管(5 mL)、铝箔袋。

###### A.1.3 原料

经 20 ℃~25 ℃ 储存 1 年的苏云金芽胞杆菌原粉、反渗透水(RO 水)。

##### A.2 制备过程

###### A.2.1 原粉水洗处理

A.2.1.1 称取 1.6 kg 原粉,加 RO 水至 16 kg,600 r/min 搅拌,持续搅拌 1 h,静置 30 min,再搅拌 1 h,4 ℃ 12 000 g 离心 15 min,收集菌浆。

A.2.1.2 将收集的菌浆用 RO 水洗至塑料桶中,并定量至 16 kg,600 r/min 搅拌均匀(无可见团块)后,4 ℃ 12 000 g 离心 15 min,收集菌浆。重复上述洗涤操作,至上层液澄清,无明显色素。

A.2.1.3 操作过程中,应防止样品污染;如水洗处理过程非连续操作,中间过程的菌浆等物料应冷藏(4 ℃)。在操作过程中,应不定期镜检,确认无杂菌污染。

###### A.2.2 干燥、混合

A.2.2.1 边搅拌边加 RO 水到收集的菌浆中,加水量 10 L;搅拌均匀后喷雾干燥。

A.2.2.2 开启喷雾干燥机,当进口风的温度为 180 ℃~190 ℃、出口风的温度为 70 ℃~75 ℃时,开始进料干燥,进料流量依据干燥机的干燥能力设置,确保样品的干燥减量和粒径范围符合要求。

A.2.2.3 将干燥的样品混合,可制得约 1 kg 参照样品。

A.2.2.4 取样检测粒径分布、干燥减量、杂菌及毒力效价,其中粒径范围、干燥减量、霉菌值应符合本文件 5.3.3 的要求。

###### A.2.3 参照样品的分装

检测合格后,将剩余的样品进行分装。取无菌的 5 mL 带盖圆底冻存管,每支管装约 2 g,外套铝箔袋封口;冻存管和铝箔袋都应贴上参照样品的标签,然后用自封袋装起来,储存于-18 ℃冰箱中。

## 附录 B

(资料性)

## 杀虫蛋白的均匀性、稳定性测定及定值方法

## B.1 仪器设备、原材料

## B.1.1 主要仪器设备

落地式高速大容量冷冻离心机、电子天平(精确至 0.01 g)。

## B.1.2 包材

带盖圆底冻存管(5 mL)、铝箔袋。

## B.1.3 原料

20 ℃~25 ℃储存 1 年的合格苏云金芽胞杆菌原粉、灭菌去离子水。

## B.2 检验技术

## B.2.1 杀虫蛋白含量测定

按 GB/T 19567.1—2004 中 4.2 进行杀虫蛋白含量测定。

## B.2.2 均匀性测定

## B.2.2.1 测定方法

采用方差分析法( $F$  检验法)进行样品均匀性检验,确定样品的均匀性结果,并根据均匀性检验的结果计算均匀性不确定度。

方差分析法( $F$  检验法)是均匀性检验过程中常用的检验方法之一。此法是通过组间方差和组内方差的比较来判断各组测量之间有无系统偏差。按照以下步骤对均匀性检验中的试验结果进行  $F$  检验:

从标准物质总体单元中抽取  $m$  个包装单元,采用质谱法对每个包装单元都进行了  $n$  次( $n \geq 3$ )重复测定。

计算公式:

组间离差平方和

$$Q_1 = \sum_{i=1}^m n (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2 \dots\dots\dots (B.1)$$

组内离差平方和

$$Q_2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 \dots\dots\dots (B.2)$$

自由度

$$\gamma_1 = m - 1 \dots\dots\dots (B.3)$$

$$\gamma_2 = m(n - 1) \dots\dots\dots (B.4)$$

统计量  $F$ 

$$F = \frac{Q_1 / \gamma_1}{Q_2 / \gamma_2} \dots\dots\dots (B.5)$$

式中:

 $Q_1$  ——均匀性检验中所得的组间离差平方和; $Q_2$  ——均匀性检验中所得的组内离差平方和; $n$  ——每一组内重复测定的次数; $m$  ——均匀性检验抽取的单元数; $X_{ij}$  ——第  $i$  个组内的第  $j$  个测定值; $\bar{X}_i$  ——第  $i$  个组内的测定平均值;

$\bar{X}$  ——  $m$  个单元测量结果的总平均值；

$\gamma_1$  ——组间离差平方和对应的自由度；

$\gamma_2$  ——组内离差平方和对应的自由度。

**B.2.2.2 结果判定**

查  $F$  分布表,得临界值  $F_{0.05, (m-1), m(n-1)}$ 。

若  $F \leq F_{0.05, (m-1), m(n-1)}$ ,则认为结果数据无显著性差异,样品均匀；

若  $F > F_{0.05, (m-1), m(n-1)}$ ,则认为结果数据有显著性差异,样品不均匀。

均匀性检验:对分装完毕的参照样品采用随机抽样的方法选取 10 瓶~30 瓶,每瓶取样 3 次,采用 SDS-PAGE 检测样品的杀虫蛋白含量以进行均匀性检验。

**B.2.3 稳定性测定**

**B.2.3.1 测定方法**

在参照样品稳定性研究中,采用的研究方法为同步稳定性法,检测方法为 SDS-PAGE。稳定性的评价是通过在不同时间测定标准物质的特性值,以时间为  $x$  轴,以特性量值为  $y$  轴,描绘出特性值与时间的关系。

斜率可用公式(B.6)计算。

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \dots\dots\dots (B.6)$$

截距由公式(B.7)计算。

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \dots\dots\dots (B.7)$$

直线之中的点的标准偏差可由公式(B.8)计算。

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n - 2} \dots\dots\dots (B.8)$$

与斜率相关的不确定度用公式(B.9)计算。

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots (B.9)$$

式中:

$\bar{x}$  ——为时间的平均值；

$\bar{y}$  ——为特性值的平均值。

**B.2.3.2 结果判定**

若  $|b_1| < t_{0.95, n-2} s(b_1)$ ,则表明斜率是不显著的,未观测到不稳定性现象；

若  $|b_1| > t_{0.95, n-2} s(b_1)$ ,则表明斜率是显著的,观测到不稳定性现象。

**B.2.4 定值**

杀虫蛋白定值采用 SDS-PAGE 法,通过 BSA 标准品实现蛋白定值结果溯源。样品随机取样不少于 6 个,进行 SDS-PAGE 分析,测定结果即可作为定值结果。定值之前首先采用 Dixon 异常值检验方法对 6 个样品的测定结果进行异常值检验,检验方法如下:

将  $n$  次测定的数据从小到大排列为: $X_1, X_2, \dots, X_{n-1}, X_n$ 。其中, $X_1$ 为最小的可疑值, $X_n$ 为最大的可疑值。按照下列对应的公式计算统计量( $r$ )。

检验 $X_n$	检验 $X_1$
3 次~7 次	
$r_{10} = \frac{X_n - X_{n-1}}{X_n - X_1}$	或 $r_{10} = \frac{X_2 - X_1}{X_n - X_1} \dots\dots\dots (B.10)$

8 次~10 次	
$r_{11} = \frac{X_n - X_{n-1}}{X_n - X_2}$	或 $r_{11} = \frac{X_n - X_{n-1}}{X_{n-1} - X_1} \dots\dots\dots (B.11)$

11 次~13 次

$$r_{21} = \frac{X_n - X_{n-2}}{X_n - X_2} \quad \text{或} \quad r_{21} = \frac{X_3 - X_1}{X_{n-1} - X_1} \dots\dots\dots (B. 12)$$

14 次~25 次

$$r_{22} = \frac{X_n - X_{n-2}}{X_n - X_3} \quad \text{或} \quad r_{22} = \frac{X_3 - X_1}{X_{n-2} - X_1} \dots\dots\dots (B. 13)$$

将统计量( $r$ )的计算值与从表 B. 2(JJF 1343)中查得的临界值(根据  $n$  次测定和显著性水平来确定)相比较,如果此极端值大于临界值,则舍弃此值并重复进行检验,直至不再检出这样的极端值。

**表 B. 1 Dixon 检验的临界值表**

$n$	显著性水平		$n$	显著性水平	
	0.01	0.05		0.01	0.05
3	0.994	0.970	15	0.647	0.565
4	0.926	0.829	16	0.627	0.546
5	0.821	0.710	17	0.610	0.529
6	0.740	0.628	18	0.594	0.514
7	0.680	0.569	19	0.580	0.501
8	0.717	0.608	20	0.567	0.489
9	0.672	0.564	21	0.555	0.478
10	0.635	0.530	22	0.544	0.468
11	0.709	0.619	23	0.535	0.459
12	0.660	0.583	24	0.526	0.451
13	0.638	0.557	25	0.517	0.443
14	0.670	0.586			