附件

蔬菜中敌百虫、丙溴磷、灭多威、克百威、敌敌畏残留的快速检测（KJ201710）

1 范围

本方法规定了蔬菜中敌百虫、丙溴磷、灭多威、克百威、敌敌畏残留的快速检测方法。

本方法适用于油菜、菠菜、芹菜、韭菜等蔬菜中敌百虫、丙溴磷、灭多威、克百威、敌敌畏残留的快速测定。

酶抑制（率）法（分光光度法）

2 原理

在一定条件下，有机磷和氨基甲酸酯类农药对胆碱酯酶正常功能有抑制作用，其抑制率与农药的浓度呈正相关。正常情况下，酶催化神经传导代谢产物（乙酰胆碱）水解，其水解产物与显色剂反应，产生黄色物质，用分光光度计在412nm处测定吸光度随时间的变化值，计算出抑制率。

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的二级水。

3.1 试剂

3.1.1 丙酮（CH_3COCH_3）。

3.1.2 磷酸氢二钾（K_2HPO_4）。

3.1.3 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

3.1.4 5,5-二硫代双（2-硝基苯甲酸）（$C_{14}H_8N_2O_8S_2$）。

3.1.5 碳酸氢钠（$NaHCO_3$）。

3.1.6 碘化乙酰硫代胆碱（ $C_7H_{16}INOS$）。

3.1.7 pH8.0 缓冲溶液：分别称取 11.9 g 无水磷酸氢二钾及 3.2 g 磷酸二氢钾，溶解于 1000 mL 水中，混匀。

3.1.8 显色剂：分别取 160 mg 5,5-二硫代双（2-硝基苯甲酸）（DTNB）和 15.6 mg 碳酸氢钠，用 20 mL 缓冲溶液溶解，4 ℃冰箱中保存。

3.1.9 底物：取 125 mg 碘化乙酰硫代胆碱，加 15 mL 蒸馏水溶解，摇匀后置于 4 ℃冰箱中保存备用。保存期不超过两周。

3.1.10 乙酰胆碱酯酶：4 ℃冰箱中保存备用。

3.2　参考物质

3种有机磷和2种氨基甲酸酯类农药参考物质的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量见表1，纯度均≥98%。

表 1 有机磷和氨基甲酸酯类参考物质中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子质量
1	克百威	Carbofuran	1563-66-2	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.25
2	灭多威	Methomyl	59669-26-0	$C_5H_{10}N_2O_2S$	162.23
3	丙溴磷	profenofos	41198-08-7	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	373.63
4	敌敌畏	Dichlorvos	62-73-7	$C_4H_7Cl_2O_4P$	220.98
5	敌百虫	Dipterex	52-68-6	$C_4H_8Cl_3O_4P$	257.44

3.3　标准溶液的配制

3.3.1　克百威、灭多威、敌敌畏、敌百虫标准储备液（1000 μg/mL）：冷藏、避光、干燥条件下保存。

3.3.2　丙溴磷标准储备液（100 μg/mL）：冷藏、避光、干燥条件下保存。

3.3.3　克百威、灭多威、敌敌畏、敌百虫标准中间液 A（100 μg/mL）：精密移取上述标准储备液（1000 μg/mL）（3.3.1）各 1mL，分别置于 10mL 容量瓶中，用丙酮（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 100 μg/mL 的标准液 A。

3.3.4　克百威、灭多威、敌敌畏、敌百虫、丙溴磷标准中间液 B（1 μg/mL）：精密移取标准中间液 A（100 μg/mL）（3.3.3）及丙溴磷标准储备液（100 μg/mL）（3.3.2）各 1 mL，分别置于 100 mL 容量瓶中，用缓冲溶液（3.1.7）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 1 μg/mL 的标准中间液 B。

4　仪器和设备

4.1　恒温水浴锅。

4.2　天平：感量为 0.1 g。

4.3　分光光度计或相应商品化测定仪。

4.4　环境条件：温度 15 ℃～35 ℃，湿度≤80%。

5　分析步骤

5.1　试样的提取

5.1.1　整株提取法

选取韭菜、芹菜有代表性的样品，擦去表面泥土，称取试样3 g（精确至0.1 g）置于表面皿中，加入10 mL缓冲液（3.1.7），残缺面不得接触缓冲液，轻轻振摇50 次，静置2 min以上，取上清液

备用。

5.1.2　整体测定法

选取油菜、菠菜有代表性的样品，擦去表面泥土，剪成1 cm左右见方碎片，称取3 g（精确至0.1 g）放入离心管中，加入10 mL缓冲溶液（3.1.7），振摇50 次，静置2 min以上，倒出提取液，静置3 min～5 min，待用。

5.2　测定步骤

5.2.1　对照液的测定

先于反应管中加入3 mL缓冲溶液（3.1.7），再加入适量酶液、0.1 mL显色剂，摇匀后于37 ℃水浴锅中放置15 min。加入0.1 mL底物摇匀，立即测定吸光度，3min后再测定一次，记录反应3min的吸光度值的变化ΔA_0。

5.2.2　样品液的测定

先于反应管中加入3 mL提取液，其他操作与对照液操作（5.2.1）相同，记录反应3 min的吸光度值的变化ΔA_t。

5.3　质控试验

每次测定应同时进行空白试验和加标质控试验。

5.3.1　空白试验

称取空白试样，按照5.1和5.2步骤与样品同法操作。

5.3.2　加标质控试验

5.3.2.1　韭菜、芹菜加标实验

取空白试样，擦去表面泥土，称取5份试样各3 g（精确至0.1 g）置于表面皿中，分别加入检出限水平的有机磷和氨基甲酸酯类标准中间液B（1 μg/mL）（3.3.4），加入10 mL缓冲液（3.1.7），残缺面不得接触缓冲液，轻轻振摇50 次，静置2 min以上，取上清液备用。

其余操作按照5.2步骤同法操作。

5.3.2.2　油菜、菠菜加标实验

取空白试样，擦去表面泥土，剪成1 cm左右见方碎片，称取5 份试样各3 g（精确至0.1 g）放入小离心管中，分别加入检出限水平的有机磷和氨基甲酸酯类标准中间液 B（1 μg/mL）（3.3.4），加入10 mL缓冲溶液（3.1.7），振摇50 次，静置2 min以上，倒出提取液，静置3 min～5 min，待用。

其余操作按照5.2步骤同法操作。

6　结果的表述

6.1　结果计算

抑制率（%）=[（ΔA_0-ΔA_t）/ΔA_0]×100

式中：

ΔA_0—对照溶液反应3 min吸光度的变化值；

ΔA_t—样品溶液反应3 min吸光度的变化值；

6.2 结果判定

结果以酶被抑制的程度（抑制率）表示。

当抑制率≥50%时，表示蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留高于检测限，判定为阳性，阳性结果的样品需要重复检验2 次以上。

6.3 质控试验要求

空白试验测定结果应为阴性，加标质控试验测定结果应均为阳性。

7 结论

当检测结果为阳性时，应采用其他分析方法进行确证，进一步确定农药品种和含量。

8 性能指标

8.1 检测限：敌百虫 0.1 mg/kg，丙溴磷 0.5 mg/kg，灭多威 0.2 mg/kg，克百威 0.02 mg/kg，敌敌畏 0.2 mg/kg。

8.2 灵敏度：灵敏度应≥95%

8.3 特异性：特异性应≥85%。

8.4 假阴性率：假阴性率应≤5%。

8.5 假阳性率：假阳性率应≤15%。

注：1.性能指标计算方法见附录 A。

2.吸光度变化ΔA_0值应控制在0.2～0.3之间。具体的酶量，应根据产品说明书上标识的使用量，测定ΔA_0值。根据测定值，增加或减少酶量，使ΔA_0值控制在0.2～0.3之间。

检测卡法

9 原理

样品中的有机磷和氨基甲酸酯类农药残留经缓冲液提取，有机磷和氨基甲酸酯类农药对胆碱酯酶（白色药片）有抑制作用，抑制胆碱酯酶催化靛酚乙酸酯（红色药片）水解为乙酸与靛酚（蓝色），从而导致速测卡颜色深浅的变化。通过空白颜色比较，对样品中有机磷和氨基甲酸酯类农药进行定性判定。

10 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的二级水。

10.1 试剂

10.1.1 丙酮（CH_3COCH_3）。

10.1.2 磷酸氢二钾（K_2HPO_4）。

10.1.3 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

10.1.4　pH8.0 缓冲溶液：分别称取 11.9 g 无水磷酸氢二钾及 3.2 g 磷酸二氢钾，溶解于 1000 mL 水中，混匀。

10.2　参考物质

同3.2。

10.3　标准溶液的配制

同3.3。

10.4　固化有胆碱酯酶和靛酚乙酸酯试剂的纸片（检测卡）。

11　仪器和设备

11.1　恒温水浴锅。

11.2　天平：感量为 0.1 g。

11.3　环境条件：温度 15 ℃～35 ℃，湿度≤80%。

12　分析步骤

12.1　试样的提取

12.1.1　整株提取法

选取韭菜、芹菜有代表性的样品，擦去表面泥土，称取试样3 g（精确至0.1 g）置于表面皿中，加入10 mL缓冲液（10.1.4），残缺面不得接触缓冲液，轻轻振摇50 次，静置2 min以上。

12.1.2　整体测定法

选取油菜、菠菜有代表性的样品，擦去表面泥土，剪成1 cm左右见方碎片，称取3 g（精确至0.1 g）放入小离心管中，加入10 mL缓冲溶液（10.1.4），振摇50 次，静置2 min以上。

12.2　测定步骤

吸取2 滴左右待测液于白色药片反应区域，在37 ℃恒温装置中放置15 min进行预反应，预反应后的药片表面必须保持湿润。

将速测卡对折，手捏3 min或置于37 ℃恒温装置3 min，保证红色药片反应区域与白色药片反应区域完全叠合发生反应。

每次测定需有一个缓冲溶液的空白对照。

12.3　质控试验

每次测定应同时进行空白试验和加标质控试验。

12.3.1　空白试验

称取空白试样，按照 12.1 和 12.2 步骤与样品同法操作。

12.3.2　加标质控试验

12.3.2.1　韭菜、芹菜

取空白试样，擦去表面泥土，称取5份试样各3 g （精确至0.1g）置于表面皿中，分别加入检出限水平的有机磷和氨基甲酸酯类标准中间液 B（1 μg/mL）（3.3.4），按照12.1和12.2步骤与样品同法操作。

12.3.2.2　油菜、菠菜

选取空白试样，擦去表面泥土，剪成1 cm左右见方碎片，称取5份试样各3 g（精确至0.1 g）放入小离心管中，分别加入检出限水平的有机磷和氨基甲酸酯类标准中间液 B（1 μg/mL）（3.3.4），按照12.1和12.2步骤与样品同法操作。

13　结果判定

白色药片区域不变色或略有浅蓝色为阳性结果；白色药片区域变为天蓝色或与空白对照卡相同，为阴性结果。通过对比空白和样品白色药片区域的颜色变化进行结果判定。目视判定示意图见图1。

13.1　无效

白色药片区域干燥，表明取样量偏少，检测结果无效。

13.2　阴性

样品白色药片区域颜色比空白对照卡颜色颜色相当或为天蓝色，表明样品中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留低于方法检测限，判定为阴性。

13.3　阳性

样品白色药片区域不变色或略有浅蓝色，表明样品中有机磷和氨基甲酸酯类农残高于检测限，判定为阳性。

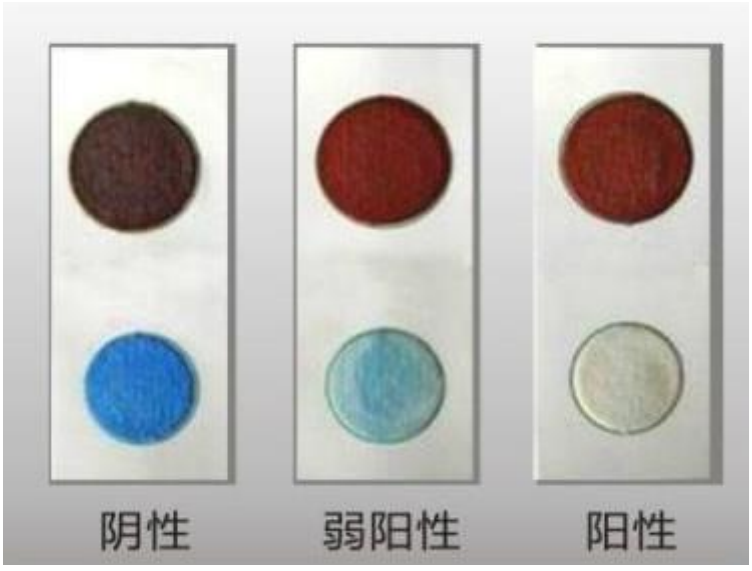


图1 目视判定示意图

13.4　质控试验要求

空白试验测定结果应为阴性，加标质控试验测定结果应均为阳性。

14　结论

当检测结果为阳性时，应采用其他分析方法进行确证，进一步确定农药品种和含量。

15　性能指标

15.1　检测限：敌百虫 0.1 mg/kg，丙溴磷 0.5 mg/kg，灭多威 0.2 mg/kg，克百威 0.02 mg/kg，敌敌畏 0.2 mg/kg。

15.2　灵敏度：灵敏度应≥95%

15.3　特异性：特异性应≥85%。

15.4　假阴性率：假阴性率应≤5%。

15.5　假阳性率：假阳性率应≤15%。

注：性能指标计算方法见附录 A。

16　其他

葱、蒜、萝卜、韭菜、芹菜、香菜、茭白、蘑菇及番茄汁液中，含有对酶有影响的植物次生物质，容易产生假阳性。处理这类样品时，采取整株蔬菜浸提。对一些含叶绿素较高的蔬菜，也可采取整株蔬菜浸提的方法，减少色素的干扰。

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准为 NY/T 761—2008 《蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定》。

附录A

快速检测方法性能指标计算表

表 A.1 性能指标计算方法

样品情况[a]	检测结果[b]		总数
	阳性	阴性	
阳性	N11	N12	N1.=N11+N12
阴性	N21	N22	N2.=N21+N22
总数	N.1=N11+N12	N.2=N21+N22	N=N1.+N2.或 N.1+N.2
显著性差异(x^2)	$\chi 2=(\|N12-N21\|-1)^2/(N12+N21)$, 自由度（df）=1		
灵敏度(p+，%)	p+=N11/N1.		
特异性(p-，%)	p-=N22/N2.		
假阴性率(pf-，%)	pf-=N12/N1.=100-灵敏度		
假阳性率(pf+，%)	pf+=N21/N2.=100-特异性		
相对准确度，%[c]	(N11+N22)/(N1.+N2.)		

注：

[a] 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果；

[b] 由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。

N：任何特定单元的结果数，第一个下标指行，第二个下标指列。例如：N11 表示第一行，第一列，N1.表示所有的第一行，N.2 表示所有的第二列；N12 表示第一行，第二列。

[c] 为方法的检测结果相对准确性的结果，与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。

本方法负责起草单位：山东省食品药品检验研究院。

验证单位：南京工业大学食品与轻工学院、深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心。

主要起草人：胡明燕、胡梅、王骏、熊晓辉、岳振峰