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）

1. 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。

1. 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。

* 1. 试剂
		1. 丙酮（CH3COCH3）。
		2. 磷酸氢二钾（K2HPO4）。
		3. 磷酸二氢钾（KH2PO4）。
		4. 5,5-二硫代双（2-硝基苯甲酸）（C14H8N2O8S2）。
		5. 碳酸氢钠（NaHCO3）。
		6. 碘化乙酰硫代胆碱（ C7H16INOS）。
		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。
		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。
		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。
		10. 乙酰胆碱酯酶：4 ℃冰箱中保存备用。
	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 | C12H15NO3 | 221.25 |
| 2 | 灭多威 | Methomyl | 59669-26-0 | C5H10N2O2S | 162.23 |
| 3 | 丙溴磷 | profenofos |  41198-08-7 | C11H15BrClO3PS | 373.63 |
| 4 | 敌敌畏 | Dichlorvos | 62-73-7 |  C4H7Cl2O4P  | 220.98 |
| 5 | 敌百虫 | Dipterex | 52-68-6  | C4H8Cl3O4P | 257.44 |

* 1. 标准溶液的配制
		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。
		2. 丙溴磷标准储备液（100 μg/mL）：冷藏、避光、干燥条件下保存。
		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。
		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。
1. 仪器和设备
	1. 恒温水浴锅。
	2. 天平：感量为0.1 g。
	3. 分光光度计或相应商品化测定仪。
	4. 环境条件：温度15 ℃～35 ℃，湿度≤80%。
2. 分析步骤
	1. 试样的提取
		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。

* + 1. 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。

* 1. 测定步骤
		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∆A0。

* + 1. 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∆At。

* 1. 质控试验

每次测定应同时进行空白试验和加标质控试验。

* + 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。

* + 1. 加标质控试验
			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。

* + - 1. 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。

1. 结果的表述
	1. 结果计算

抑制率（%）=[（∆A0-∆At）/∆A0]×100

式中：

∆A0───对照溶液反应3 min吸光度的变化值；

∆At───样品溶液反应3 min吸光度的变化值；

* 1. 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。

* 1. 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。

1. 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。

1. 性能指标
	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。
	2. 灵敏度：灵敏度应≥95%
	3. 特异性：特异性应≥85%。
	4. 假阴性率：假阴性率应≤5%。
	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∆A0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∆A0值。根据测定值，增加或减少酶量，使∆A0值控制在0.2～0.3之间。

检测卡法

1. 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。

1. 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。

* 1. 试剂
		1. 丙酮（CH3COCH3）。
		2. 磷酸氢二钾（K2HPO4）。
		3. 磷酸二氢钾（KH2PO4）。
		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。
	2. 参考物质

同3.2。

* 1. 标准溶液的配制

同3.3。

* 1. 固化有胆碱酯酶和靛酚乙酸酯试剂的纸片（检测卡）。
1. 仪器和设备
	1. 恒温水浴锅。
	2. 天平：感量为 0.1 g。
	3. 环境条件：温度15 ℃～35 ℃，湿度≤80%。
2. 分析步骤
	1. 试样的提取
		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。

* + 1. 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。

* 1. 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。

* 1. 质控试验

每次测定应同时进行空白试验和加标质控试验。

* + 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。

* + 1. 加标质控试验
			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。

* + - 1. 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。

1. 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。

* 1. 无效

白色药片区域干燥，表明取样量偏少，检测结果无效。

* 1. 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。

* 1. 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

* 1. 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。

1. 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。

1. 性能指标
	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。
	2. 灵敏度：灵敏度应≥95%
	3. 特异性：特异性应≥85%。
	4. 假阴性率：假阴性率应≤5%。
	5. 假阳性率：假阳性率应≤15%。

注：性能指标计算方法见附录A。

1. 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(х2) | χ2=(|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