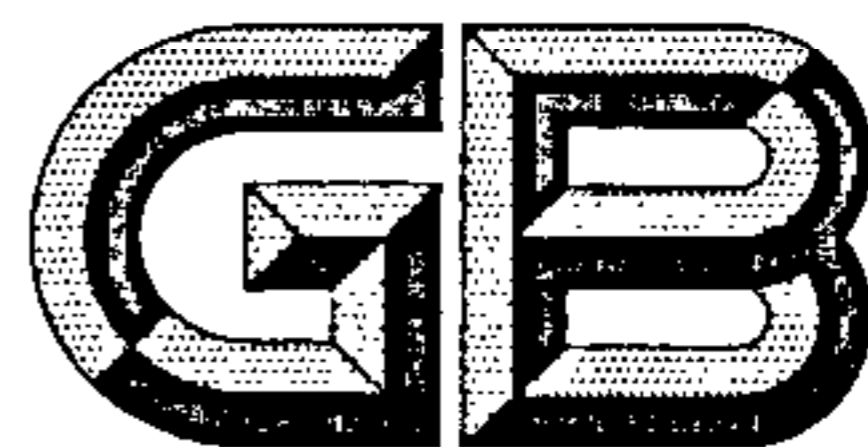


ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.199—2003

蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药 残留量的快速检测

Rapid determination for organophosphate and
carbamate pesticide residues in vegetables

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

有机磷和氨基甲酸酯类农药在蔬菜中的残留问题和引发中毒的情况较为突出。本标准提供的两种检验方法,能快速检测有机磷和氨基甲酸酯类农药在蔬菜中的残留,以便及时发现问题,采取措施,控制高残留农药蔬菜的上市,保障人们食菜安全。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、北京市产品质量监督检验所、广东省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:王林、王晶、张莹、邓峰、杨大进。

蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药 残留量的快速检测

1 范围

本标准规定了由酶抑制法测定蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量的快速检验方法。
本标准适用于蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量的快速筛选测定。

速测卡法(纸片法)

2 原理

胆碱酯酶可催化靛酚乙酸酯(红色)水解为乙酸与靛酚(蓝色),有机磷或氨基甲酸酯类农药对胆碱酯酶有抑制作用,使催化、水解、变色的过程发生改变,由此可判断出样品中是否有高剂量有机磷或氨基甲酸酯类农药的存在。

3 试剂

3.1 固化有胆碱酯酶和靛酚乙酸酯试剂的纸片(速测卡)。

3.2 pH7.5 缓冲溶液:分别取 15.0 g 磷酸氢二钠 $[\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ 与 1.59 g 无水磷酸二氢钾 $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$,用 500 mL 蒸馏水溶解。

4 仪器

4.1 常量天平。

4.2 有条件时配备 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 恒温装置。

5 分析步骤

5.1 整体测定法

5.1.1 选取有代表性的蔬菜样品,擦去表面泥土,剪成 1 cm 左右见方碎片,取 5 g 放入带盖瓶中,加入 10 mL 缓冲溶液,振摇 50 次,静置 2 min 以上。

5.1.2 取一片速测卡,用白色药片沾取提取液,放置 10 min 以上进行预反应,有条件时在 37°C 恒温装置中放置 10 min。预反应后的药片表面必须保持湿润。

5.1.3 将速测卡对折,用手捏 3 min 或用恒温装置恒温 3 min,使红色药片与白色药片叠合发生反应。

5.1.4 每批测定应设一个缓冲液的空白对照卡。

5.2 表面测定法(粗筛法)

5.2.1 擦去蔬菜表面泥土,滴 2 滴~3 滴缓冲溶液在蔬菜表面,用另一片蔬菜在滴液处轻轻摩擦。

5.2.2 取一片速测卡,将蔬菜上的液滴滴在白色药片上。

5.2.3 放置 10 min 以上进行预反应,有条件时在 37°C 恒温装置中放置 10 min。预反应后的药片表面必须保持湿润。

5.2.4 将速测卡对折,用手捏 3 min 或用恒温装置恒温 3 min,使红色药片与白色药片叠合发生反应。

5.2.5 每批测定应设一个缓冲液的空白对照卡。

6 结果判定

结果以酶被有机磷或氨基甲酸酯类农药抑制(为阳性)、未抑制(为阴性)表示。

与空白对照卡比较,白色药片不变色或略有浅蓝色均为阳性结果。白色药片变为天蓝色或与空白对照卡相同,为阴性结果。

对阳性结果的样品,可用其他分析方法进一步确定具体农药品种和含量。

7 附则

7.1 速测卡技术指标

7.1.1 灵敏度指标:速测卡对部分农药的检出限见表1。

表1 部分农药的检出限

农药名称	检出限/(mg/kg)	农药名称	检出限/(mg/kg)	农药名称	检出限/(mg/kg)
甲胺磷	1.7	乙酰甲胺磷	3.5	久效磷	2.5
对硫磷	1.7	敌敌畏	0.3	甲萘威	2.5
水胺硫磷	3.1	敌百虫	0.3	好年冬	1.0
马拉硫磷	2.0	乐果	1.3	呋喃丹	0.5
氧化乐果	2.3				

7.1.2 符合率:在检出的30份以上阳性样品中,经气相色谱法验证,阳性结果的符合率应在80%以上。

8 说明

8.1 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,可采取整株(体)蔬菜浸提或采用表面测定法。对一些含叶绿素较高的蔬菜,也可采取整株(体)蔬菜浸提的方法,减少色素的干扰。

8.2 当温度条件低于37℃,酶反应的速度随之放慢,药片加液后放置反应的时间应相对延长,延长时间的确定,应以空白对照卡用手指(体温)捏3 min时可以变蓝,即可往下操作。注意样品放置的时间应与空白对照卡放置的时间一致才有可比性。空白对照卡不变色的原因:一是药片表面缓冲溶液加的少、预反应后的药片表面不够湿润,二是温度太低。

8.3 红色药片与白色药片叠合反应的时间以3 min为准,3 min后的蓝色会逐渐加深,24 h后颜色会逐渐退去。

酶抑制率法(分光光度法)

9 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412 nm处测定吸光度随时间的变化值,计算出抑制率,通过抑制率可以判断出样品中是否有高剂量有机磷或氨基甲酸酯类农药的存在。

10 试剂

10.1 pH8.0缓冲溶液:分别取11.9 g无水磷酸氢二钾与3.2 g磷酸二氢钾,用1 000 mL蒸馏水溶解。

10.2 显色剂:分别取 160 mg 二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)和 15.6 mg 碳酸氢钠,用 20 mL 缓冲溶液溶解,4℃冰箱中保存。

10.3 底物:取 25.0 mg 硫代乙酰胆碱,加 3.0 mL 蒸馏水溶解,摇匀后置 4℃冰箱中保存备用。保存期不超过两周。

10.4 乙酰胆碱酯酶:根据酶的活性情况,用缓冲溶液溶解,3 min 的吸光度变化 ΔA_0 值应控制在 0.3 以上。摇匀后置 4℃冰箱中保存备用,保存期不超过四天。

10.5 可选用由以上试剂制备的试剂盒。乙酰胆碱酯酶的 ΔA_0 值应控制在 0.3 以上。

11 仪器

11.1 分光光度计或相应测定仪。

11.2 常量天平。

11.3 恒温水浴或恒温箱。

12 分析步骤

12.1 样品处理:选取有代表性的蔬菜样品,冲洗掉表面泥土,剪成 1 cm 左右见方碎片,取样品 1 g,放入烧杯或提取瓶中,加入 5 mL 缓冲溶液,振荡 1 min~2 min,倒出提取液,静置 3 min~5 min,待用。

12.2 对照溶液测试:先于试管中加入 2.5 mL 缓冲溶液,再加入 0.1 mL 酶液、0.1 mL 显色剂,摇匀后于 37℃放置 15 min 以上(每批样品的控制时间应一致)。加入 0.1 mL 底物摇匀,此时检液开始显色反应,应立即放入仪器比色池中,记录反应 3 min 的吸光度变化值 ΔA_0 。

12.3 样品溶液测试:先于试管中加入 2.5 mL 样品提取液,其他操作与对照溶液测试相同,记录反应 3 min 的吸光度变化值 ΔA_1 。

13 结果的表述计算

13.1 结果计算

见式(1)。

$$\text{抑制率(\%)} = [(\Delta A_0 - \Delta A_1) / \Delta A_0] \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

ΔA_0 ——对照溶液反应 3 min 吸光度的变化值;

ΔA_1 ——样品溶液反应 3 min 吸光度的变化值。

13.2 结果判定

结果以酶被抑制的程度(抑制率)表示。

当蔬菜样品提取液对酶的抑制率 $\geq 50\%$ 时,表示蔬菜中有高剂量有机磷或氨基甲酸酯类农药存在,样品为阳性结果。阳性结果的样品需要重复检验 2 次以上。

对阳性结果的样品,可用其他方法进一步确定具体农药品种和含量。

14 附则

14.1 酶抑制率法技术指标

14.1.1 灵敏度指标:酶抑制率法对部分农药的检出限见表 2。

表 2 酶抑制率法对部分农药的检出限

农药名称	检出限/(mg/kg)	农药名称	检出限/(mg/kg)
敌敌畏	0.1	氧化乐果	0.8
对硫磷	1.0	甲基异柳磷	5.0
辛硫磷	0.3	灭多威	0.1
甲胺磷	2.0	丁硫克百威	0.05
马拉硫磷	4.0	敌百虫	0.2
乐果	3.0	呋喃丹	0.05

14.1.2 符合率:在检出的抑制率 $\geq 50\%$ 的 30 份以上样品中,经气相色谱法验证,阳性结果的符合率应在 80%以上。

15 说明

15.1 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,可采取整株(体)蔬菜浸提。对一些含叶绿素较高的蔬菜,也可采取整株(体)蔬菜浸提的方法,减少色素的干扰。

15.2 当温度条件低于 37℃,酶反应的速度随之放慢,加入酶液和显色剂后放置反应的时间应相对延长,延长时间的确定,应以胆碱酯酶空白对照测试 3 min 的吸光度变化 ΔA_0 值在 0.3 以上,即可往下操作。注意样品放置时间应与空白对照溶液放置时间一致才有可比性。胆碱酯酶空白对照溶液 3 min 的吸光度变化 ΔA_0 值 < 0.3 的原因:一是酶的活性不够,二是温度太低。