

应用植物酯酶固化酶检测有机磷和氨基甲酸酯农药

王继军, 黄永春, 李治祥, 黄士忠 (农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘要: 选用聚苯乙烯微孔反应板作为酶的载体, 将自制的植物酯酶固定在载体上的微孔内壁表面, 制成农药快速检测板。采用酶抑制显色方法, 检测有机磷和氨基甲酸酯类农药, 其检测灵敏度在 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围。该农药快速检测板为现场检测这两类农药提供了简便而快捷的方法。

关键词: 植物酯酶; 固化酶; 农药残留; 快速检测; 有机磷; 氨基甲酸酯

The detection of organophosphorus and carbamate pesticides by immobilized plant esterase

WANG Jijun, HUANG Yongchun, LI Zhixiang, HUANG Shizhong (Agro Environmental Protection Institute of MOA, Tianjin 300191)

Abstract: The plant esterase can be immobilized on the inside wall of the micro holes of a polystyrene plate and used for fast detection of organophosphorus and carbamate pesticides. These two categories of pesticides can be detected by the color developed during enzymatic reaction and the detecting sensitivity is $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The method is convenient for use and time-saving.

Keywords: plant esterase; immobilized esterase; pesticide residue; fast detection; organophosphorus pesticide; carbamate pesticide

近年来, 随着人们食品安全意识的不断增强, 要求生产和供应无农药污染蔬菜的呼声日趋高涨。为防止蔬菜水果上农药残留引起的急性食物中毒, 快速检测农药残留的速测卡、速测仪、酶片等方法应运而生^[1,2]。这些速测法主要采用动物源乙酰胆碱酯酶或丁酰胆碱酯酶, 但胆碱酯酶的价格昂贵且这些方法在实践中, 普遍反应出灵敏度低、重现性和准确性差的问题^[3,4]。为解决目前酶抑制法存在的这些问题, 本研究在以往工作的基础上^[5], 将植物酯酶共价结合到微孔塑料板上, 制成农药快速检测板, 用于检测有机磷和氨基甲酸酯农药并取得了满意的结果。

1 材料和试剂

植物酯酶粉剂: 将提取的粗酶液^[5]于冻干机上冻干; 聚苯乙烯微孔反应板: 天津有机玻璃制品厂提供; 牛血清白蛋白(BSA): 英国食品研究所提供; 50% 戊二醛(GA): 上海特种试剂开发中心; pH 8.0 缓冲溶液; 基质溶液: 称取 4.5 mg 乙酸-萘酯(购于上海试剂公司)置于试剂瓶中, 加入 10 mL (75%) 甲醇-水溶液, 用力振摇至基质完全溶解备用(用前配制); 显色剂溶液: 称取 5 mg 固蓝 B 盐(上海化学试剂站, 进口分装)置于试剂瓶中, 加入 10 mL 无离子水, 用力振摇至固蓝 B 盐完全溶解备用(临用前配制)。植物酯酶溶液: 称取酶粉剂 12.4 mg, 加 5 mL (pH 8.0) 缓冲液(含适量 BSA 和 GA), 振摇至酶粉充分溶解后即为酶工作液(4℃冰箱可保存 7 d)。

2 实验方法

2.1 酶的固定

取 96 孔(12×8)聚苯乙烯微孔反应板, 每孔加入酶工作液 0.02 mL, 室温下(或 4℃冰箱过夜)自然凉干(避光)后, 用无离子水冲洗 3 次, 凉干, 室温干燥避光保存。微孔内壁表面固定有植物酯酶的反应板称为农药快速检测板。

收稿日期: 2003-08-22; 修订日期: 2003-11-18

基金项目: 国家“十五”重点攻关项目

作者简介: 王继军(1964—), 男, 副研究员, hychun@sina.com

2.2 检测

2.2.1 水中农药检测程序及灵敏度 取固定有植物酯酶的微孔反应板, 用单道移液器分别将待测水样加入到微孔板的样品孔 S(若同时测几个样品即为 S₁、S₂ ……) 中, 每孔加 40 μL, 然后再加 40 μL 清洁水于对照孔 (C) 中, 静止 10 min 后用掉孔中液体, 再加清洁水冲洗 1 次, 甩干, 最后向样品孔(S)和对照孔(C) 各加 20 μL 显色液和 20 μL 基质液, 反应 3~ 5 min, 在白色背景下观察结果. 若样品孔(S) 和对照孔(C) 颜色相同或颜色相近似(均为紫红色), 则判为阴性, 表明样品中不含有有机磷和/或氨基甲酸酯农药或含量低于本法检测限. 若样品孔(S) 和对照孔(C) 颜色有明显差别, 或 S 孔无色, 表明样品中含有有机磷和/或氨基甲酸酯农药. 对检出的阳性样品需要时可用气相色谱或液相色谱进行定量分析.

2.2.2 蔬菜水果中农药检测程序 (1) 样品处理 白菜、油菜、圆白菜、韭菜等叶菜类蔬菜取待检样品剪成 2 cm² 的小块若干(韭菜剪成 2 cm 长若干段), 随机取 8 块(约 1 g), 韭菜取 8 段(约 1 g) 放在表面皿中, 加入 2 mL 样品浸提液(20% 甲醇溶液), 用玻棒稍加搅拌, 浸渍 2 min, 浸渍液即为样品提取液, 待检. 对果菜及水果类如: 西红柿、黄瓜、青椒、茄子、苹果、梨等, 从待检样品中随机取 1 个果实, 用 2 mL 浸提液反复冲洗果实表面、冲洗液即为样品提取液, 待检. 根菜类: 胡萝卜、萝卜等, 洗去泥土, 去掉须根, 处理方法同果菜类. (2) 样品检测 检测方法及结果观察和判定基本同水中农药检测, 仅有一点不同, 即对照孔(C) 不是加清洁水而是加样品浸提液(20% 甲醇溶液).

3 结果和讨论

3.1 检测果蔬上农药的灵敏度

取 10 种不同种类的蔬菜、水果, 添加 10 种不同类型、不同浓度的有机磷或氨基甲酸酯农药, 测定结果列入表 1.

表 1 果蔬上有机磷和氨基甲酸酯农药的检测灵敏度

Table 1 The sensitivities for 10 pesticides in vegetable and fruit sample										μg•kg ⁻¹
果蔬品种	敌敌畏	氧乐果	对硫磷	甲基对硫磷	甲拌磷	甲胺磷	马拉硫磷	毒死蜱	呋喃丹	涕灭威
小白菜	10	10~ 50	10~ 100	10~ 100	100	100	100	100	10	10~ 100
油菜	10	10~ 50	100	10~ 100	10~ 100	10~ 100	100	10~ 100	5~ 10	10~ 100
圆白菜	10	10~ 100	100	100	100	100	10~ 100	100	10~ 20	10~ 50
黄瓜	10	10~ 50	10~ 100	10~ 100	100	10~ 100	100	10~ 100	10~ 100	10~ 100
番茄	10	10~ 50	10~ 100	10~ 100	10~ 100	10~ 100	100	10~ 100	10	10~ 100
青椒	10	10~ 50	10~ 100	10~ 100	10~ 100	100	10~ 100	100	10	10~ 100
豆角	10	10~ 100	10~ 100	100	100	100	10~ 100	100	10~ 100	10~ 100
韭菜	10	10~ 100	100	100	100	10~ 100	10~ 100	10~ 100	10~ 20	10~ 50
苹果	10~ 50	10~ 50	10~ 100	10~ 100	10~ 100	10~ 10	10~ 100	10~ 100	10	10~ 100
梨	10~ 50	10~ 50	10~ 100	10~ 100	10~ 100	10~ 100	10~ 100	10~ 100	10	10~ 100

从表 1 可以看出, 应用植物酯酶固化酶方法检测果蔬上 10 种有机磷和氨基甲酸酯农药, 检测灵敏度在 0.01~ 0.1 mg•kg⁻¹ 范围.

3.2 检测水中农药的灵敏度

取上述 3.1 节中不同类型有机磷和氨基甲酸酯农药标准品(纯度 95% 以上), 用丙酮配制成 10 μg•mL⁻¹ 标准溶液, 再用水稀释成不同浓度的标准工作液即: 1.0, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 μg•mL⁻¹, 测定方法的灵敏度. 结果表明检测灵敏度在 0.01~ 0.1 μg•mL⁻¹ 范围. 目前国内外使用胆碱酯酶(包括 AchE 或 BuchE) 的酶液法, 如各种速测仪(中国)、酶纸片法(中国、美国) 检测灵敏度一般在 0.1~ 10.0 μg•mL⁻¹ 范围. 二者进行比较不难看出, 植物酯酶固化酶方法的检测灵敏度有显著提高.

3.3 方法的实用性及其评价

为了评价植物酯酶固化酶方法检测果蔬上有机磷和氨基甲酸酯农药的实用性, 分别于不同地点不同时间取市售和田间蔬菜样品, 应用固化酶法和 GC 法进行测定, 结果列入表 2.

表2 天津市市售和田间蔬菜样品的农药残留检测
Table 2 Detection of pesticides in vegetables from markets and farmlands

采样时间	采样地点	品名	检测结果/(mg•kg ⁻¹)	
			试剂盒	气谱法
2002-04-08	澄江路市场	黄瓜等8种菜	均为阴性	均未检出
2002-04-08	澄江路市场	小白菜	+	DDVP 0.3591
2002-04-08	澄江路市场	圆白菜	+	甲基对硫磷 0.3591
2002-04-08	澄江路市场	青椒	+	甲胺磷 0.3030
2002-07-02	蔬菜所温室	番茄 苦瓜	-	未检出
2002-07-02	蔬菜所田间	圆白菜 茄子 番茄	-	未检出
2002-08-30	南开区市场	小白菜 黄瓜 青椒	-	未检出
2002-09-04	南开区市场	番茄等5种菜	-	未检出
2002-09-04	南开区市场	小白菜	+	DDVP 0.8326

从表2可以看出在检测的4批30组样品中,固化酶法检出4组阳性样本,气相色谱检出这4组样本分别含有DDVP、甲基对硫磷、甲胺磷和DDVP.其它样本均未检出.说明固化酶法与气相色谱检测结果相符.

我们应用固化酶法首先对天津市岳阳道等7个蔬菜市场和津南区7个蔬菜生产基地生产的番茄、黄瓜、柿子椒、圆白菜、菠菜、芹菜、大白菜、油菜、菜花、菜豆角、韭菜、尖辣椒、京水菜、紫贝天葵、绿羽衣甘蓝、胡萝卜、油麦菜、雪里红、茼蒿等19个品种共90个样品进行筛检后由农业部环境监督检验测试中心应用GC法进行验证.固化酶法检出一个不合格的阳性(+)黄瓜样品,GC法测定含有甲胺磷1.281mg•kg⁻¹.另外89个样品,GC法检出8个样品含有甲胺磷农药,其中5个含量低于0.1mg•kg⁻¹,3个含量在0.1~0.4mg•kg⁻¹范围.根据试剂盒的检测限(一般为0.1mg•kg⁻¹),3个样品理论上试剂盒应检出为阳性(+),但实际未检出,这说明在检测90个样品中有3个漏检,与GC法比较,符合率应为96%左右.

根据联合国FAO/WHO规定,甲胺磷在黄瓜、芹菜、菜甘蓝、辣椒、茄子、番茄、花菜、柿子椒等蔬菜上的最高残留限量为1.0mg•kg⁻¹.据此标准,上述90个品种,除1个不合格外,其余89个样品均为合格,试剂盒检测结果与此相符.

5 结论

(1)使用固化酶的优点不仅是灵敏度高,而且酶与样品提取液很容易分开,这样就可以排除提取液中其它一些酶可逆性抑制剂的干扰,从而也改善了方法的准确度.

(2)经试验证明,酶被固定化以后,其稳定性大大增加,农药速测板常温避光保存有效期为一年.长期保存稳定性的增加为该方法的应用创造了有利条件.

(3)固化酶法只用于有机磷和氨基甲酸酯农药检测,检测结果反应的是这两类农药的综合残毒指标.

(4)农药的含量不同对酶的抑制程度不同,不同农药对酶的抑制能力有很大差异,因此酶水解反应产生的颜色深浅不同,据此可以绘制出每种农药的标准色板,给出农药的大致含量,适用于田间快速检测,但其前提是预先要知道蔬菜上使用的是哪种农药.

参考文献:

[1] 黄雁. 简易、快速检测有机磷农药的酶片和生色基质片[J]. 环境科学, 1995, 16(3): 52—54
[2] 赵建庄. 快速检测果蔬中农药残留量的方法研究[J]. 农业环境保护, 2002, 21(1): 70—71
[3] 汪世新. 蔬菜农药残留速测方法中若干问题的操作[J]. 农业环境与发展, 2002, 19(2): 43
[4] 刘玲. 果蔬农药残留快速检测方法比较试验[J]. 蔬菜, 2001, (3): 26—28
[5] 李治祥. 应用植物酯酶抑制技术测定蔬菜水果中农药残留量[J]. 环境科学学报, 1987, 7(4): 472—478