

[研究简报]

手持式农药速测仪酶法现场测定蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯农药残毒

邹明强^{1,2}, 杨蕊¹, 赵丽丽³, 于爱民¹, 金钦汉¹

(1. 吉林大学化学学院, 长春 130023; 2. 吉林出入境检验检疫局, 长春 1300621; 3. 天津科技大学, 天津 300222)

关键词 手持式农药速测仪; 酶催化动力学光度法; 有机磷; 氨基甲酸酯

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2003)06-1016-03

检测蔬菜中有机磷类及氨基甲酸酯类农药残留通常采用气相色谱、色谱-质谱联用^[1]等方法, 不适应现场快速检测的要求. 关于快速分析方法, 国外主要采用电化学酶传感器法^[2], 还有微孔板酶标仪法^[3]. 前者存在电极易受污染且需再生处理的麻烦; 后者难以实现现场检测. 国内报道的有酶抑制光度法^[4]、单点目视比色法及速测卡法等, 其中目视比色法和速测卡法虽然具有操作简便等优点, 但由于实验误差较大, 灵敏度较低, 只能作为定性分析. 本文在前期工作的基础上^[5,6], 研制了一种体积小(140 mm × 70 mm × 30 mm)、重量轻(整机 180 g)、能耗低(电池可连续使用 50 h)且现场实用的手持式农药残毒速测仪, 开发了专用试剂包并建立了蔬菜中有机磷类及氨基甲酸酯类农药残毒的现场分析方法, 对 6 种蔬菜及速冻玉米样品进行了实际检测, 并与 GC-MS 方法^[1]进行了对照, 结果令人满意.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 UV-2501 分光光度计(日本 Shimadzu 公司). GCMS-QP 5000 型气相色谱-质谱联用仪(日本 Shimadzu 公司). 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH= 8.02). 底物溶液由适量碘化硫代乙酰胆碱(Acetylthio-choline, ATChI)加水溶解而得. 显色剂溶液用缓冲液溶解适量的二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)而得. 酶溶液用缓冲液溶解适量乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AchE)而得.

1.2 实验原理 本法是基于生物体内一种基本的生化反应, 即在水解酶乙酰胆碱酯酶(AchE)催化下, 乙酰胆碱迅速水解为乙酸和胆碱, 胆碱与显色剂反应生成有色物. 本实验选择碘化硫代乙酰胆碱 $[I(CH_3)_3NCH_2CH_2SCOCH_3]$ 为底物, 5,5'-二硫代-2,2'-二硝基苯甲酸(DTNB)为显色剂, 在特征波长 $\lambda=407\text{ nm}$ 处作溶液吸光度对时间的扫描, 所得曲线在一定时间范围内为直线. 当有机磷及氨基甲酸酯杀虫剂抑制乙酰胆碱酯酶(AchE)时, 催化反应变慢, 吸光度随时间变化曲线的斜率变小, 用酶抑制率表示酶被农药抑制程度即农药残留毒性的 大小, 即 $\text{Enzyme inhibition rate} = (A - B) / A \times 100$, A 是一定量 AchE 催化显色反应的吸光度随时间变化的直线斜率; B 是 AchE 受农药中毒后催化显色反应的吸光度随时间变化的直线斜率. 本手持式农药速测仪能直接显示所得酶抑制率结果, 并可通过调零键查阅空白对照样或待测样的起始时间与 3 min 时的吸光度值.

1.3 实验方法 称取 1 g(精确至 $\pm 0.1\text{ g}$)剪碎的蔬菜样品, 放入具塞试管中, 加入 10 mL 缓冲溶液, 振荡提取 2 min, 放置 3~5 min, 使上层液澄清; 先测空白对照样, 取出 4.0 mL 清液(在空白对照样中加入 4.0 mL 缓冲溶液)于比色池中, 分别加入 50 μL AchE 液和 DTNB 液, 手捂保温 5.0 min, 插入光路调零, 取出后加入 40 μL ATChI 液, 摇振 20~30 s 后立即插入光路, 按测定键, 程序开始记录, 3 min 后停止; 重复以上步骤, 依次连续进行试样测定, 每 3 min 一个循环, 仪器自动给出样品酶抑制率, 据此判断样品受农药的污染程度.

收稿日期: 2002-06-13.

基金项目: 国家食品安全“十五”重大科技攻关课题(批准号: 2001BA 804A 11-8)和吉林省科学技术发展项目(批准号: 931008)资助.

联系人简介: 金钦汉(1937 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事分析科学及微波化学研究. E-mail: qjhan@jlu.edu.cn

2 结果与讨论

- 2.1 吸收光谱 考察了底物、显色剂及酶在几种情况下的吸收光谱. 发现在 408 nm 处, 酶催化显色反应产物有最大吸收, 且随着时间增加吸收值增大; 显色剂在 405 ~ 420 nm 范围内吸收值很小, 其最大吸收在 320 nm; 底物最大吸收波长 < 250 nm. 为提高本法的灵敏度, 选择 405 ~ 420 nm 进行测定.
- 2.2 酸度的影响 实验表明, 随 pH 值的增加, 反应速率增大, pH 值超过 7.5 后反应速率变化减弱, pH 值为 8 和 8.5 时反应速率最大且达到恒定, 与文献值^[3]吻合. 故选择 pH 值为 8.02 的体系.
- 2.3 试剂加入顺序的影响 酶与待测农药(酶抑制剂)或底物的反应为可逆反应, 由于酶与酶抑制剂比酶与底物的反应速率低得多^[5], 故试剂加入顺序对实验影响较大. 先加入酶液, 使酶与酶抑制剂预反应, 然后加入显色剂, 最后加入底物, 能达到最佳效果.
- 2.4 摇振时间的影响 充分摇振有利于酶催化动力学反应的进行. 若摇振时间太短, 则初始反应速率小, 检测灵敏度较低; 若摇振时间过长, 则初始吸光度较大, 不易获得线性良好的酶抑制曲线. 实验证明, 以摇振 20 ~ 30 s 为宜.
- 2.5 试液体积的影响 由于所用样品池规格及位置均固定, 所以当试液体积小于某一数值时会使入射光无法完全通过待测溶液而引起较大误差, 实验表明体积须大于 3.8 mL, 考虑到过大的体积会相应降低检测灵敏度并消耗试剂量多, 故选择 4.0 mL 进行实验.
- 2.6 反应温度的影响 实验比较了室温(20)、手握保温 5 min(约 33 ~ 34)及 37 水浴加热 15 min 这 3 种温度下酶催化显色反应吸光度随时间的变化情况(图 1). 可见温度越高, 吸光度越大. 但 33 ~ 34 及 37 时的反应速率接近. 考虑到现场应用的方便性, 故选择手握保温方式.

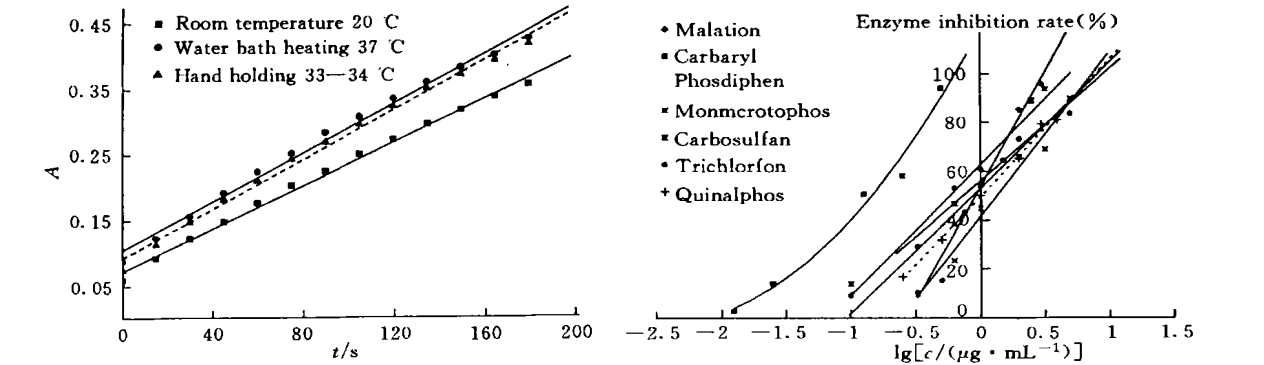


Fig. 1 Dependence of absorbance value on reaction time at various temperatures

Fig. 2 Dependence of enzymatic inhibition rate on concentration for various insecticides

- 2.7 几种杀虫剂浓度与酶抑制率关系曲线 几种常见农药酶抑制率随浓度的变化曲线如图 2 所示. 可见, 在一定浓度范围内, 酶抑制率与农药浓度的对数基本呈线性关系.
- 2.8 准确度及干扰因素的考察 在 407 nm 处, 本法的干扰因素较少. 取未喷洒过农药的菠菜、油菜、小白菜、黄瓜、芹菜及豆角等蔬菜样品进行基体干扰实验, 结果表明, 在 407 nm 处样品基体溶液有一定吸收(小于 0.5 吸光度值), 但吸光度值随时间变化曲线的斜率值与空白对照样的斜率值之间的相对误差(即“酶抑制率”)均在 10% 以内, 即未发现明显的基体干扰. 本研究所提供的速测仪在吸光度值 2.5 以内线性关系良好, 故可以样品体系为基准调零进行测量. 此外, 有机溶剂干扰实验表明, 除 2% 甲醇对测定影响较小外, 其它溶剂均有较大的干扰. 实验以缓冲溶液直接提取样品, 避免了用有机溶剂提取而引进的干扰. 因此实际测量中基本不存在干扰.
- 2.9 重现性及检出限 对某一油菜样品平行处理并测定 10 次, 计算得酶抑制率的平均值为 32.6%, 标准偏差 2.1, 相对标准偏差 6.3 %. 单从测量波动性考虑, 取未受农药污染的油菜试样作空白, 10 次测量的标准偏差(S/N)为 1.17, 以 3 倍 S/N(3.5)计算, 则对马拉硫磷的检出限为 0.07 μg/mL, 西维因为 0.007 μg/mL. 而酶抑制法一般按一定的酶抑制率来确定方法检出限, 如按酶抑制率 15% 计, 则检出限为马拉硫磷 0.3 μg/mL, 西维因 0.03 μg/mL.
- 2.10 结果判定 本方法模拟了人体中毒过程的原理^[1], 并在大量对照实验的基础上提出, 当酶抑制

率在 25% ~ 40% 之间时, 可能存在农药污染; 当酶抑制率超过 40 % 时则有农药残毒. 对于酶抑制率超过 25% 的样品, 应该按文献[2] 方法进行对照检测.

3 样品分析

对长春市蔬菜生产基地和批发市场的蔬菜进行检测, 并用 GC-MS 法^[2]进行对照分析, 结果见表 1. 可见, 用上述快速检测方法现场检测出酶抑制率超过 40% 的蔬菜样品, 经 GC-MS 法进一步检测确证, 分别检出农药残留量, 而速冻豆角和速冻玉米由于经过高温处理, 酶抑制率检测结果低于检出限, GC-MS 法对照检测也未发现农药残留量.

Table 1 Determination of organophosphates and carbamates insecticides in vegetables

Sample number	Samples	Sampling places	Found(enzyme inhibition rate, %)	Found by GC-MS($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	Caraways	Terminal market	57. 5	Methamidopos 0. 38
2	Cabbages	Terminal market	74. 5	Methamidopos 0. 45
3	Spinages	Market 1	21. 2	—
4	Cucumbers	Market 2	17. 6	—
5	Celerys	Vegetable base 1	53. 2	Omethoate 0. 64
6	Frozen kidney beans	Vegetable base 2	< 6. 3	—
7	Frozen corns	Market 3	< 6. 3	—

参 考 文 献

[1] WANG Jian(王 建), LIN Qiu-Ping(林秋萍), LEI Zheng-Li(雷郑莉) *et al.*. Chin. J. Anal. Lab. (分析实验室)[J], 2002, **21** (2): 27—30

[2] Fulton M. H., Key P. B.. Environmental Toxicology and Chemistry[J], 2001, **20**(1): 37—45

[3] Hamers T., Molin K. R. J., Koeman J. H. *et al.*. Toxicological Science[J], 2000, **58**: 60—67

[4] HUANG Wen-Feng(黄文凤), CAI Qi(蔡 琪), LIN Er-Li(林而立) *et al.*. Modern Sci. Inst. (现代分析仪器)[J], 2000, **4**: 44—46

[5] CHEN Huan-Wen(陈焕文), JIN Qin-Han (金钦汉), YANG Li-Quan(杨立泉) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2001, **22**(6): 928—930

[6] YANG Rui(杨 蕊), CHEN Huan-Wen(陈焕文), ZHANG Han-Qi(张寒琦) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(8): 1 501—1 503

Rapid *on-site* Determination of the Toxicity of Organophosphates and Carbamates in Vegetables by Enzyme Catalytic Dynamic Photometry with Handheld Pesticide Analyzer

ZOU Ming-Qiang^{1,2}, YANG Rui¹, ZHAO Li-Li³, YU Ai-Min¹, JIN Qin-Han^{1*}
(1. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130023, China;
2. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China;
3. Tianjin Science and Technology University, Tianjin 300222, China)

Abstract A simple, convenient and *on-site* determination method and the corresponding handheld analyzer for monitoring toxicity of organophosphates and carbamates in vegetables were developed based on enzyme catalytic dynamic photometry. Variousexperimental parameters were studied and optimized. The toxicity level can be judged according to the enzyme inhibition rate directly displayed on the analyzer. The method is rapid, with an average analysis time of 6—8 min for per sample. It is of practicality and great value, and can effectively be applied for monitoring the toxicity of pesticides, such as organophosphates and carbamates, commonly used for vegetables.

Keywords Handheld pesticide analyzer; Enzyme catalytic dynamic photometry; Organophosphates; Carbamates