

酶法检测农药残留的现状与发展方向

金洪伟,张 毅,孙艳芳,刘静晶,刘长福

(黑龙江省疾病预防控制中心,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:简述了目前我国农药残留的现状 & 快速检测技术——酶抑制法的现状 & 发展方向,分析了酶抑制法在使用中存在的问题 & 解决途径。与传统方法相比,酶抑制法具有快速、简便、灵敏 & 低成本等优点,已成为蔬菜等生产基地、销售市场 & 监督部门现场快速检测的主要设备。

关键词:酶抑制法;胆碱酯酶;农药残留;快速检测;生物传感器

中图分类号:X592

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)12-0117-04

21 世纪我国农业由粗犷型向集约型转变,对农副产品安全性和质量要求更加严格。我国农户通常使用的农药主要包括除草剂、杀虫剂、杀菌剂、植物生长调节剂等,它们对高等动物有较高毒性。因此除严格限制使用高毒、高残留农药外,对农药残留实施快速检测、将含有农药残留的农产品排出市场之外是行之有效的办法,这在欧美等发达国家已经制度化。我国的基本国情是:施用农药种类繁多,农副产品生产分散。因此,专业技术性强、检测程序复杂、检测成本高及携带不方便的通用分析技术(GC、HPLC、GC-MS、HPLC-MS^[1])难以对水果、蔬菜的流通环节进行全面的监控。开发并推广灵敏、高效的检验检测技术是控制当前果蔬市场农药残留的关键。

1 快速检测果蔬中农药残留的现状

有机磷农药问世以来,由于它的高效性、广普性而被广泛使用,但有机磷农药的毒性大,降解的半衰期一般为几周至几个月,并能在动物体内产生蓄积作用。一些农户为了增产,过量的施用有机磷农药导致果蔬等食品中农药的残留量严重超标,因而人们常因食用含有机磷农药的蔬菜造成急性中毒。在国外通常使用气相色谱法、色谱-质谱联用法 & 波谱法^[2-3]等检测手段检测农药残留,但检测仪器价格昂贵、前处理烦琐、操作复杂并需要操作者具有一定的专业素养,不适合我国现场检测的国情。我国的国情是蔬菜、水果产销缺乏合理的管理手段、监测制度和中间环节,农药的销售和使用缺乏严格的监管措施,而且蔬菜、水果的

生产多以农户家庭为主,因此在蔬菜上使用巨毒农药或随意加大用量和使用次数的现象普遍存在,这样势必会导致果蔬受到农药的污染,甚至农药残留严重超标,直接威胁到消费者的安全,为了寻找操作简便、反应灵敏、成本低廉并能快速测定有机磷农药的方法,国内外研究者做了大量的研究工作,希望找到一种在田间或在市场的销售过程中快速筛选出农药残留超标的果蔬。

目前农药残留快速生化检测技术主要是酶抑制法和酶联免疫法^[4-7],相应的农残快速检测设备在一些发达国家已成为农残普查和实地检测的常规手段。酶联免疫法专一、敏感,是检测某些生物活性物质痕量残留的有效途径^[8-10]。通常,某种免疫试剂只适用分析特定的一类农药,专一性强。我国仍处于研发阶段尚不能满足农药残留检测的需求。而酶抑制法相对于酶联免疫法来说特异性不是很强,利用这个原理所生产的各种速测仪、速测卡,已成为我国农药残留快速检测的主流技术^[11-12]。

2 酶抑制法原理和应用

2.1 酶抑制法原理

有机磷、氨基甲酸酯类农药进入机体以后则与酯酶结合形成了不易水解的磷酸化酯酶,丧失了水解底物的活力。根据有机磷农药对酶促反应具有抑制作用这一毒理学特性,建立了酶抑制法检测农产品中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留。通常采用的酶是 AChE(乙酰胆碱酯酶),它是一种羧酸酯酶,主要功能是通过快速水解神经传递介质乙酰胆碱,来终止胆碱能突触中的脉冲传递。在反应过程中,底物分解为胆碱和乙酸,而胆碱酯酶亦被乙酰化,成为乙酰化胆碱酯酶,立即水解为乙酸和胆碱酯酶,在这个酶促反应中加入相应的

收稿日期:2010-09-25

第一作者简介:金洪伟(1979-),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,主管技师,从事理化检验工作。E-mail: jhw790216@163.com。

显色剂进行显色反应或在适当的时间终止反应过程,就可以通过最终的颜色变化或测定相关的物理化学信号的改变来定性或半定量地检测有机磷或氨基甲酸酯类农药残留,并依据信号变化的快慢等因素来判断残留量的大小^[13-17]。

显色反应有4种:乙酸萘酯为底物的酶促反应(水解产物 α -萘酚与显色剂固蓝B盐作用形成紫红色偶氮化合物)、靛酚乙酸酯为底物的酶促反应(水解产物本身有色的特点)、乙酰胆碱为底物的酶促反应[水解产物为乙酸和胆碱,通过乙酸与溴百里酚蓝(酸碱指示剂)反应,农药残留高时显蓝色,农药残留低时显黄色]和乙酸羟基吲哚为底物的酶促反应(水解产物吲哚酚自身氧化成靛蓝而显蓝色)。

除了这些反应体系外,乙酸羟基吲哚或乙酸-5-溴-羟基吲哚、碘化硫代乙酰胆碱、靛酚乙酸酯等均可作为酶的反应底物。利用酶抑制法原理检测农药残留的灵敏度与试验所用的酶、反应时间、显色反应、反应温度等都有关系。无论利用的是哪个酶-底物体系,酶都是决定检测方法灵敏度的关键因素。能够用于检测的酶有丁酰胆碱酯酶(动物血清等)、羧酸酯酶(主要来源于动物肝脏、植物等)和乙酰胆碱酯酶(昆虫头部、动物红细胞等),丁酰胆碱酯酶和羧酸酯酶受影响因素多,专一性差,易假阳性。乙酰胆碱酯酶活性能够专一性地被有机磷和氨基甲酸酯类农药所抑制,用其检测这2类农药比用其它2种酯酶具有可靠的专一性,避免了较多的测量结果假阳性^[18-23]。

2.2 通常采用的农残检测方法

2.2.1 比色法 国内植物酯酶近年来的研究现状多停留在抑制比色法上,其原理是有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂能抑制酯酶的活性;酯酶被抑制的程度可用比色法来测定

(1)间接生色法。其包括2种显色方法,即动物源胆碱酯酶法:将农副产品的样品提取液与动物源胆碱酯酶作用,以碘化硫代乙酰胆碱为底物,二硫代二硝基苯甲酸为显色剂,反应一段时间后在一定波长下比色,根据吸光值的变化量计算胆碱酯酶受抑制率,判断是否存在有机磷和氨基甲酸酯类农药的残留;植物酯酶法:植物酯酶可以使乙酸- α -萘酯水解为 α -萘酚和乙酸, α -萘酚与呈色剂固蓝B盐作用形成紫红色的偶氮化合物,524 nm 比色,从而完成显色反应。底物乙酸- α -萘酯被酯酶水解前后没有颜色变化,但水解产物 α -萘

酚能与第3种物质固蓝B盐反应,溶液颜色由黄色变成紫红色。当酶被抑制的程度不同时,紫红色偶氮化合物的产量不同,溶液的颜色深浅不同,通过光学仪器就可以检测出农药的残留量。

(2)直接生色法。植物酯酶可以使底物2,6-二氯靛酚乙酯分解,605 nm 比色。反应前后颜色变化较大,容易鉴别。在样品溶液中依次加入植物酯酶和底物(2,6-二氯靛酚乙酯)。如样品中不含有有机磷农药,底物被酶迅速分解,样品溶液很快由橙色变为蓝色;如样品中含有有机磷农药,酯酶活性受到抑制,底物分解变慢或不分解,溶液为浅蓝色或不变色。通过与对照样比较,即可获得有机磷农药含量。

在酶的来源方面,目前主要是来自动物血清的丁酰胆碱酯酶、来自敏感昆虫的乙酰胆碱酯酶和来自小麦的植物酯酶。前2种动物酯酶,价格昂贵,产量低,远不能满足当前的需求,不适合我国推广使用。植物酯酶来源广泛,但仍需进一步研究。

2.2.2 试纸法 将酯酶经过固定化处理加载到滤纸片上,并可以与底物进行酶促反应,通过显色剂显色。此法对常用农药的检出限为0.3~10.0 mg·kg⁻¹^[14-16],此方法的检测成本低,操作方便、检测速度快,主要用于口岸、市场等水果、蔬菜等农副产品中农药残留的检测^[24-26]。

2.2.3 生物传感器 目前现场检测技术中的研究热点是生物传感装置。它通常是由生物敏感材料与换能装置配合在一起。基本分信号发生装置、信号捕获装置和信号放大与记录装置3个部分。生物传感器在诸多方面已取得了长足进步,如:响应时间短、测定方法多、自动化程度和测量灵敏度高、现场适应能力强等方面。近年来,我国利用靶标酶活性的抑制研究,研制出一些行之有效的生物酶传感器,如:乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶生物传感器测量有机磷农药残留^[27-29]。

3 目前酶法测定存在的问题

与传统的仪器分析方法相比,酶抑制法农药残留快速检测技术在成本、时间、检测速度等方面都具有明显的优势。近几年,特别是比色法的应用,在欧美等国家已被推广使用,在我国推广速度也很快,但在使用过程中存在一些亟待解决的问题。

3.1 酯酶制备和保存技术急需提高

由于乙酰胆碱酯酶对有机磷农药的测定灵敏

度高,国外的试纸法和比色法检测农药残留,采用的都是乙酰胆碱酯酶,胆碱酯酶只能放置低温下,不能常温保存,在保存和使用过程中容易失活,在我国还不能大批量制备乙酰胆碱酯酶^[30]。因此,我国要自主寻找代替酶源,如植物酯酶。

3.2 测定农药种类有限

酶抑制法目前主要用于有机磷和氨基甲酸酯类农药的残留检测,对其它类型农药的检测不灵敏,导致检测结果出现假阴性。

3.3 检测结果呈假阳性

对洋葱、芹菜、韭菜等蔬菜的检测,通常受到较强的干扰,会造成检测结果假阳性。同时,提取液的 pH、植物次生物质、叶绿素以及反应过程中的温度、时间等条件对检测结果均有一定的影响。

4 酶抑制法的发展方向

随着经济的发展,人们生活水平的提高,自我保健意识的增强,人们对农副产品的食用安全性要求也越来越高。酶抑制法以其较高的准确性和灵敏性以及较低的成本等优点,已经得到普遍认可。因此,加大研究力度,借鉴其它研究领域的丰硕成果并应用于酯酶的研究,以期在短期内,使我国的农残速测技术取得较大的进步^[31-33]。

4.1 批量制备胆碱酯酶,并提高纯化和保存技术

酯酶的灵敏度直接影响农药测定的准确性。为提高酶的灵敏度,利用生物学筛选技术,选育对农药高度敏感的生物品系。胆碱酯酶是混合分子型不是单一分子型,因此采用凝胶层析法或亲和层析法纯化所获得纯化的家蝇头部胆碱酯酶,其比活力能提高达 1 000 倍。利用现代分子生物学技术,通过基因工程大量制备胆碱酯酶,提高耐寒能力,延长常温条件下胆碱酯酶保存活性的时间。

4.2 胆碱酯酶的固定化

固定化的胆碱酯酶有液态酶没有的优点,固定化酶不易失活、对温度不敏感、保存时间长。固定化过程对酶能够起到一定的纯化作用从而导致胆碱酯酶对农药灵敏度有一定的提高并且可以重复使用,便于回收。但是在固定化过程中能够导致酶活的部分丧失,所以解决固定化过程中避免酶活力的丧失,是目前研究的重点。现阶段的固定化技术通常是在固定化过程之中加入一定量的牛血清白蛋白,来保护胆碱酯酶,防止过多的戊二醛对胆碱酯酶功能位点的破坏。有的研究者使用一些纳米材料,如四氧化三铁与壳聚糖或酞菁铜类化合物作为胆碱酯酶的基质赋予胆碱酯酶一些

特殊的性质。

4.3 研制检测农产品新型试剂盒

通过对反应体系(酯酶底物、反应时间、显色剂)、样品体系(前处理方法)、检测途径(多种方法对比验证)等方面研究,开发出适应我国特色的快速检测农药残留的新型试剂盒,用于水果、蔬菜生产和销售的在线检测。提高农副产品的安全食用水平,保障消费者的安全健康,增强农副产品的国际竞争力,推动种植业和外贸可持续发展。

4.4 敏感元件和换能器的研究

随着研究的深入,简单的固定化酶应用于农药残留的检测已经难于满足人们对检测速度及方便性的要求。进而在比色法和试纸片法的基础上,产生了检测农药残留的生物传感器。目前最流行的是电流型和电位型传感器。检测限可以达到纳克级。而光纤传感器由于本身的特点,其抗干扰能力强,不受周围电磁场的干扰,耐高温、高压、防腐、防暴,传感器相应速度快,灵敏度高,可用于遥测和特殊环境。目前光纤生物传感器已在临床医学、食品工业、环境监测和军事领域得到了广泛的应用。因而,光纤生物传感器应用到农药残留检测方面将是农药残留检测技术的一次飞跃性标志。

参考文献:

- [1] Mol Hans G J, Ruud C J, Odile M. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1015: 119-128.
- [2] 王燕, 彭利, 许雄飞, 等. 气相色谱法测定青菜中有机磷农药残留量[J]. 化学工程师, 2009, 167: 36-37, 68.
- [3] 王军, 朱鲁生, 林爱军, 等. 农药残留速测技术研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2001, 2(1): 17-20.
- [4] 杨依军, 王勇, 杨秀荣, 等. 免疫分析法在农药残留分析中的应用[J]. 华北农学报, 2001, 16(4): 119-124.
- [5] 陆贻通, 周培, 李振红. 生物酶技术在农药残留快速检测中的应用进展[J]. 上海环境科学, 2001, 20(10): 467-470.
- [6] Wang Y L, Zeng Z R, Liu M M, et al. Determination of organophosphorus pesticides in pakchoi samples by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography using home-made fiber[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 226: 1091-1098.
- [7] Clegg B, Stephenson G R, Hall J C. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Glyphosate[J]. J Agfic Food Chem, 1999, 47 (12): 5031-5037.
- [8] Clegg B S, Stephenson G R, Hall J C. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of

- Dicamba[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(5): 2168-2174.
- [9] Qeffelec A L, Boide F, Larne J P, et al. Development of an Immunoassay (ELISA) for The Quantification of Thiram in Lettuce[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(4): 1675-1680.
- [10] 恒亮, 张保民, 王兰芝, 等. 酶活性抑制测定农药残毒技术研究[J]. 河南农业科学, 1997(1): 25-26.
- [11] 赵建庄, 范志金, 安健, 等. 薄层层析—酶抑制法检测有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2001, 24(5): 496-498.
- [12] 董超, 史延茂, 张丽萍, 等. 采用植物酯酶测定农药残留的研究[J]. 农药, 2001, 40(9): 19-20.
- [13] 余孝颖. 有机磷农药对不同生物来源的胆碱酯酶选择性的研究[J]. 环境科学, 1996, 17(4): 41-43.
- [14] 黄保宏, 姚垠. 用于检测农药残留的植物酯酶的选择[J]. 安徽技术师范学院学报, 2004, 18(2): 15-17.
- [15] 穆大刚, 孟范平, 朱小山, 等. 海鱼 AChE 监测海水有机磷农药的可行性研究[J]. 海洋湖沼通报, 2004(1): 68-73.
- [16] Cai L S, Gong S L, Chen M, et al. Vinyl crown ether as a novel radical crosslinked sol-gel SPME fiber for determination of organophosphorus pesticides in food samples[J]. Anal Chim Acta, 2006, 559: 89-96.
- [17] 李治祥. 快速测定蔬菜水果中农药残毒的酶抑制技术[J]. 中国环境科学, 1991, 11(4): 310-314.
- [18] 赵建庄, 康国瑞. 快速测定果菜中农药残留量的方法研究[J]. 农业环境保护, 2002, 21(1): 70-71.
- [19] 董超, 史延茂, 张丽萍, 等. 采用植物酯酶测定农药残留的研究[J]. 农药, 2001, 40(9): 19-20.
- [20] 纪淑娟, 赵丽丽, 冯辉. 一种快速检测农产品有机磷农药残留的方法[J]. 农药, 2000, 39(10): 17-18.
- [21] 刘世文, 侯云修, 陈佳荣, 等. 纯化乙酰胆碱酯酶抑制法测定游离有机磷[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(2): 7-10.
- [22] 黄文凤, 蔡琪, 黄敏, 等. 便携式农药残留毒性快速测试仪—水果和蔬菜农药残留动力学速测方法[J]. 分析测试学报, 2000, 19(6): 87-89.
- [23] 高晓辉, 朱光艳. 蔬菜上农药残留快速检测技术—酶抑制法检测有机磷和氨基甲酸酯类农药[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(4): 29-31.
- [24] 李治祥. 浅析安徽省蔬菜农药残留检测特点[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(4): 35-37.
- [25] 钟树明, 袁东显. 植物酶抑制技术用于检测蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留[J]. 环境化学, 2002, 21(2): 189-195.
- [26] 黄雁, 郭中英. 有机磷农药检测纸片的研制[J]. 广州医学院学报, 1994, 22(2): 65-67.
- [27] Wei M, Xie Z Y, Sun L G, et al. Electrochemical properties of boron-doped diamond electrode modified with gold/polyelectrolyte hollow spheres[J]. Electroanal, 2009, 21: 138-143.
- [28] 李发生, 布特尼科夫, 梅江采娃. 丁酰胆碱酯酶传感器用于有机磷农药测定[J]. 化学传感器, 1994, 14(2): 108-110.
- [29] 王厚行. 乙酰胆碱传感器的研制[J]. 化学传感器, 1991, 11(2): 18-21.
- [30] 肖建军, 华泽钊. 冷却与低温保存对小麦酯酶活性的影响[J]. 工程热物理学报, 2003, 24(4): 682-684.
- [31] 董杰, 王开运, 姜兴印, 等. 家蝇头部乙酰胆碱酯酶检测农药残留最佳条件研究[J]. 农药学报, 2003, 5(1): 93-96.
- [32] 魏福祥, 韩菊. 乙酰胆碱酯酶固定化方法的研究[J]. 化学世界, 2005(3): 155-159.
- [33] 郑春慧, 杨立刚, 姚志云, 等. 白菜中有机磷农药的电纺纳米纤维固相萃取-高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28: 926-930.

Present Situation and Development of Enzyme Inhibition on Rapid Detection of Pesticide Residues

JIN Hong-wei, ZHANG Yi, SUN Yan-fang, LIU Jing-jing, LIU Chang-fu

(Heilongjiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: The researches and application of enzyme inhibition on rapid detection of pesticide residues in China were reviewed and analyzed its disadvantages in the application and put forward some suggestions. Compared to the traditional method, the method of enzyme inhibition had the advantages of simplicity, speed, sensitive, cheap and it was widely used as rapid detection in greenstuff base, sells market and intendance department in China nowadays.

Key words: enzyme inhibition; acetylcholinesterase; pesticide residues; rapid detection; biosensor