

农药残留快速检测技术研究进展

杨 靓¹, 刘小娟¹, 郭玉双²

(1. 福建农林大学 植物病毒研究所/福建省植物病毒学重点实验室, 福建 福州 350002; 2. 贵州省烟草科学研究所 育种工程技术中心, 贵州 贵阳 550081)

摘要: 农药是农作物生产的基本保障, 对于农作物病虫害的综合防治起着举足轻重的作用, 但大量施用农药后农产品中农药的残留对环境 and 人类健康产生严重的威胁。随着人类环保意识和健康意识的加强, 农药残留的危害性越来越受到大家的广泛关注, 许多国家制定了食品中农药残留的上限标准。因此, 农药残留分析检测技术显得尤为重要。通过综述目前适用于现场检测的农药残留检测技术——酶抑制检测法、免疫分析法、活体生物测定法和生物传感器法等快速测定方法的技术原理及其优缺点, 指出了农药残留快速检测技术中存在的问题、最新研发动态及其未来的发展方向, 以期对农药残留分析检测技术的完善与发展提供一定的参考。

关键词: 农药残留; 酶抑制; 免疫分析; 活体生物测定; 快速测定

中图分类号: S481⁺.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2012)10-0150-04

我国每年农药的使用量大概在 130 万 t 以上, 由于严重的超标使用, 导致大量农产品中农药的残留量超过国家标准, 这不仅会引发人畜中毒, 同时还会影响农产品的贸易, 因此农药残留超标已经成为农产品生产中的重要问题。对农产品中农药残留量进行及时和准确的分析是控制农产品中农药残留量的关键环节。常规的农药残留分析方法为仪器分析法, 即利用色谱、色谱-质谱联用、超临界流体等技术对农药含量进行快速准确的分析, 但这些方法均不能满足样品现场快速检测的要求, 这就迫使人们开发出一些操作方便快捷、结果准确的快速检测新技术, 目前, 得到广泛应用的有酶抑制法、免疫分析法、活体生物测定法和生物传感器法等, 并且还有许多新的速测技术正处于实验室研究阶段, 其中最具发展潜力的是荧光偏振免疫分析和分子印迹技术。

1 酶抑制法

酶抑制法是根据昆虫毒理学原理发展而成, 利用有机磷和氨基甲酸酯类农药与底物争夺胆碱酯酶的功能部位, 抑制酶催化底物的降解, 加入显

色剂后, 通过颜色深浅的变化就可以快速确定样品中是否有农药残留或农药残留相对量^[1]。酶抑制法根据底物和分析仪器的不同可分为速测卡法、分光光度法和 pH 法。

1.1 速测卡法

速测卡法是一种直观的检测方法, 卡片上固定有胆碱酯酶及其底物——靛酚乙酸酯, 胆碱酯酶能催化靛酚乙酸酯(红色)发生水解反应, 生成乙酸和靛酚(蓝色)。若待测样品中含有有机磷或者氨基甲酸酯类农药, 这两类物质就会强烈抑制酶活从而抑制蓝色产物的生成。依靠目测就可以判断农药的残留情况^[2-3]。该方法使用方便, 检测速度快, 价格实惠, 但它不能对农药残留量做定量分析。此外, 国产的速测卡反应后的颜色较浅, 不容易判断是否为阳性, 而进口速测卡的颜色过渡虽然比国产速测卡清晰, 但价格不菲, 大规模的推广较为困难^[4-5]。

1.2 比色法

比色法是利用生物酶催化产生的水解产物与显色剂反应, 产生有色物质, 而农药对酶具有抑制作用, 因此可通过比色分析判断是否有农药残留, 也可根据吸光度值随时间的变化, 计算农药对酶的抑制率, 对农药残留做定量分析。上述生物酶可以是动物酶胆碱酯酶〔乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BuChE)〕, 也可以是植物酶。若选用胆碱酯酶, 则以二硫双硝基苯甲酸(DT-NB)为显色剂, 碘代硫化乙酰胆碱(ATCHI)为底

收稿日期: 2012-08-04

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2011J05051); 福建省教育厅科技资助项目(JA11080)

第一作者简介: 杨靓(1981-), 女, 福建省宁化县人, 博士, 讲师, 从事植物保护研究。E-mail: yangliang_fafu@139.com。

通讯作者: 郭玉双(1981-), 男, 山东省胶州市人, 博士, 助理研究员, 从事烟草育种与抗病研究。E-mail: yshguo@126.com。

物, ATCHI 和 DTNB 反应生成黄色物质, 而胆碱酯酶会水解 ATCHI, 在 410 nm 处有最大吸收值。若选用植物酶则以 2,6-二氯乙酰胆碱为底物, 水解后的产物胆碱为蓝色, 在 605 nm 处有最大吸收值^[4]。相比之下, 使用植物酯酶的检测成本比动物酶低, 王亚飞等^[6]对 7 种植物种子和 6 种牧草进行筛选, 发现苜蓿可以作为农药残留检测中最佳植物酯酶源。

比色法的可靠性和灵敏度高, 但其结果易受检测仪器、检测试剂、人为操作等因素的影响, 可能出现结果不稳定、检测数据不真实等情况。

1.3 pH 法

pH 法是利用氯化乙酰胆碱在乙酰胆碱酯酶作用下, 产生乙酸, 但有机磷农药或氨基甲酸酯类农药能够抑制 AChE 的活性, 减少乙酸的生成量, 从而使 pH 发生变化, 通过测定 pH 的变化, 就可检测出农药残留量^[7]。

2 免疫分析法

免疫分析法是依赖抗原、抗体之间特异、可逆的结合反应为基础的分析方法, 该方法具有高度选择性。免疫分析技术常用于农残检测的是酶免疫分析和放射免疫分析, 目前酶免疫分析技术在农药残留检测中的应用非常活跃, 应用也日趋普遍^[8]。

2.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)又称酶标法, 其原理是定量的酶标记抗原与抗体特异性的结合, 形成复合物。复合物上的酶可催化底物, 使其生成另外一种带色的物质, 而农药的存在会与酶竞争抗体结合位点, 使得一些结合酶与抗体分离而成为游离酶, 将系统中的游离酶分离出后, 系统中的显色反应由于酶的含量减少而减弱。因此, 可通过酶标仪的测定来确定样品中是否存在未知抗原, 并可对其含量进行定量。ELISA 的优点是特异性强、灵敏度高、可准确定量^[4,7,9]。

2.2 酶放大免疫测试法

酶放大免疫测试法(EMIT), 是建立在空间位阻竞争结合的基础上, 顾名思义, 酶标记抗原和未知抗原与抗体产生竞争结合。酶标抗原与抗体结合后, 标记酶的活性将会受到抑制, 因此标记抗原与抗体的结合越多, 酶的活性就越低, 即未标记物的含量与酶活性呈正比。据此, 可进行样品定量分析^[10-11]。该方法与 ELISA 相比最大的优点

在于它不需要在反应后对游离型/结合型的酶标记物进行分离, 只要直接测定系统中总标记酶活性的变化, 就可以确定结合酶标记物的数量, 得出未标记抗原, 即被测农药的数量。该方法操作简便, 利于自动化分析^[12]。

3 活体生物测定法

活体生物测定法是利用活体生物对待测样品进行农药残留测定, 如使用发光细菌或者昆虫。

3.1 利用发光细菌检测农残

发光细菌体内的荧光素在荧光酶的催化作用下会产生荧光, 在一定条件下发光细菌的发光是恒定的, 但其与农药接触后发光会减弱, 且减弱程度与农药浓度呈一定的比例关系。因此, 通过测定细菌与待测样品接触后的光强变化, 可推算出农药残留量^[13]。袁东星等^[14]研究表明发光细菌检测法检出的最小农药质量浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 可以满足现场快速检测的要求。该方法还具有简便、灵敏、快速、价格低廉等特点, 是检测蔬菜中有机磷残留的一种快速、高效的方法。

3.2 利用昆虫检测农残

该方法是利用敏感昆虫取食农产品后的击倒情况来判断农药的残留程度, 用于检测的昆虫可以是家蝇、水蚤、黄粉虫、蚜虫等^[15-16]。该方法与其它方法相比最大的优点是对样品中的各种有毒物质均可进行检测, 且无需购买仪器, 无需进行前处理。不同昆虫对不同农药的敏感程度不同, 因此有必要针对不同作用机理的农药筛选出敏感昆虫^[16]。

4 生物传感器法

生物传感器是由对特定的生物活性物质或化学物质具有选择性反应的生物敏感部件及信号转换器组成的分析装置, 传感器中的生物敏感部件与待测样品中的目标物发生识别反应后会产生一些物理或者化学信号的变化(如发热、发光、声音、颜色变化等), 这些不同的变化通过不同原理的信号转换器(如光极光敏电阻、离子选择性电极、光敏管压电装置等)的转换, 变成可以输出的第二信号, 经过放大, 显示记录, 就可对目标分析物进行定性和定量检测。生物传感器法是农药残留速测技术的研究热点, 该测定方法在检测灵敏度、反应时间、自动化分析及现场的检测能力等方面已取得较大的进展^[4,17]。根据信号转换器的不同, 生

物传感器可分为电化学、光学、测热型、半导体传感器等。

4.1 电化学生物传感器

电化学生物传感器将生物敏感部件与目标分析物之间的识别反应所产生的信号变化转换为电信号。以电化学电极为信号转换器,以酶为识别元件的生物传感器,其酶电极把电极和固定化酶结合在一起,当酶电极浸入待测溶液时,待测底物进入酶层与酶发生反应,可消耗或产生一种可被检测的电活性物质,由电极响应,从而将化学信号转换为电信号,加以检测。电化学生物传感器分析法具有应用范围广、灵敏、快速、性能稳定等特点,其检测技术也日趋完善。

4.2 光学生物传感器

光学生物传感器主要由生物敏感膜和光纤组成。主要原理为:生物敏感膜中的生物活性物质可对待测组分进行选择性的分子识别,接着通过换能反应,把信号转化为不同的光信息,如荧光、磷光、拉曼光、化学发光和生物发光。利用光学生物传感器进行农药残留速测,具有检测探头直径小、信息传递量大、能量损耗低及抗干扰能力强等优点^[4]。

4.3 压电石英晶体生物传感器

生物免疫反应具有特异性,且当抗原抗体结合形成异常稳定的结合物后,质量会发生改变,石英晶体则能感应这种质量的变化,压电石英晶体传感器正是利用石英晶体对质量变化的敏感性,结合生物识别系统(抗原抗体特异性结合)而形成的一种自动化分析检测系统。这个系统可以将石英晶体所感应到的质量变化转换为其它可识别的信号,对待测物中目标分析物进行检测,该检测系统优点是灵敏度高、特异性好、响应快、小型简便等。

5 化学速测法

农药残留的化学速测法主要是根据有机磷农药的氧化还原特性。有机磷农药在金属离子的催化作用下可水解为醇与磷酸,该水解产物与检测液(含有显色剂——紫红色)反应后,使检测液褪色变成无色^[18-19]。此方法的优点在于它是化学反应,相对生化反应方法较稳定,同时避免了使用酶的不稳定、不易保存。用化学方法进行检测所需反应时间只需10 min(不含前处理时间)。但该方法有时颜色变化不明显,不利于判断,同时在

使用过程中易受到植物组织和叶绿体的干扰,故只能检测叶片和果品表面的农药残留。

6 其它检测方法及最新的研发状态

气相色谱快速检测法通过简化净化步骤,提取后直接分析蔬菜和水果中有机磷农药,减少了常规仪器检测法提取和净化所需的时间,大大提高了检测速度。另外,根据农药残留浓度与光谱特性密切相关这一特点,也可利用光谱检测对农药残留进行检测,赵勇等^[20]已经通过实验证明利用红外光谱可以粗略检测蔬菜中的氯氰菊酯浓度是否达到危害人类健康的程度。蒋鼎国等^[21]将自动检测技术、信息处理和控制技术以及现代虚拟仪器设计技术方法应用于农残检测中,设计了一种农产品农药残留自动检测系统,该系统准确度高,方便快捷,适合各种场合应用,具有广泛的应用前景。

目前还有很多农药速测新技术正处于实验室研发状态,如:荧光偏振光免疫分析、分子印迹技术等。荧光偏振光免疫分析是在荧光免疫分析技术的基础上发展起来的一种检测手段,其原理是样品中的被测物能和荧光标记的半抗原竞争特异性抗体结合位点,从而降低荧光信号。这种荧光偏振光免疫分析技术的优点是不需要对样品进行任何前浓缩或冲洗步骤,可直接分析,检测速度比较快,1个样品的检测时间不到1 min。分子印迹技术是一种为获得在空间结构和结合位点上与某一特定的目标分子(模板分子、印迹分子或烙印分子)完全匹配的、具有特异选择性的聚合物的、新的实验制备技术,它集分离与富集于一体,而且其可以多次重复使用,结合高灵敏度的检测手段,将有望对环境中的农药残留进行快速、灵敏且廉价的分析与检测。

7 结论

近年来,农药残留速测技术不断更新、完善和迅速发展,新的检测方法也不断涌现,各种适用于现场快速检测的技术层出不穷,但是各类检测方法在应用过程中仍存在不少问题,例如试剂的稳定性不足、不同批次的产品对检测结果影响较大、缺乏统一的检测标准等。针对这些问题,目前广大农药残留检测工作者将新的技术运用到农残检测中,努力使快速检测向快捷、准确、灵敏度高的方向发展,阻止农残超标产品的上市,保障农产品

安全。同时还应该加强农药残留降解技术的研究,积极开发易于降解的农药,使农药残留最大限度地减少。

参考文献:

- [1] 曾艳红,辛焕发.常用农药残留快速检测方法及其注意事项[J].农业技术与装备,2009(12):31-32.
- [2] 张莹.农药残留量快速检测方法——农药速测卡的应用与验证[J].中国食品卫生杂志,1998,10(12):12-14.
- [3] 陈胜,刘立群,周辉棠.农药速测卡的研制与应用[J].检验检疫科学,2000,10(2):1-3.
- [4] 高俊娥,李盾,刘铭钧.农药残留快速检测技术的研究进展[J].农药,2007,46(6):361-365.
- [5] 刘家鹏,赵列军.农药残留的快速测定方法简介[J].环境科学与管理,2007,32(11):132-134.
- [6] 王亚飞,张金艳.农药残留检测用植物酯酶源的筛选[J].江苏农业科学,2011,39(4):375-376.
- [7] 王亮.农药残留快速检测技术进展[J].温州农业科技,2005(4):10-12.
- [8] 黎其万,潘灿平.农药残留免疫分析方法及其在应用研究进展[J].西南农业学报,2004,17(2):248-252.
- [9] Morozova V S, Levashova A I, Eremin S A. Determination of pesticides by enzyme immunoassay[J]. J. Anal. Chem., 2005, 60: 202-217.
- [10] 王玮屏,伍艳,何丽君,等.生物酶技术在农药残留快速检测中的应用[J].分析测试技术与仪器,2008,14(2):72-78.
- [11] Jenkins S H. Homogeneous enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1992, 150: 91-97.
- [12] Wu A H B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry[J]. Clin Chim Acta, 2006, 369: 119-124.
- [13] 吴淑杭,凌云,赵渝,等.生物发光在农产品安全性检测中的应用前景[J].农业环境科学学报,2006,25(增刊):421-424.
- [14] 袁东星,邓永智,林玉晖.蔬菜中有机磷农药残留的发光体细菌快速检测[J].环境化学,1997,16(1):77-81.
- [15] 袁振华.大型水蚤生物测试技术在监测蔬菜中农药残留的应用研究[J].卫生研究,1995,24(特辑):109-110.
- [16] 朱华,宋航,边阔.活体生物在农药残留快速检测中的应用[J].上海化工,2012,37(4):26-28.
- [17] 涂忆江.我国农药残留快速检测技术的研究与应用现状[J].农药科学与管理,2003,24(4):14-16.
- [18] 汪世新,陆自强.速测灵对蔬菜有机磷农药残留检测的研究[J].江苏农业研究,2001,22(4):29-31.
- [19] 钱允辉,陆自强,汪世新,等.农药残留速测技术方法与进展[J].中国测试技术,2008,34(5):85-88.
- [20] 赵勇,龚丽农,黄存莲,等.基于蔬菜农药残留——氯氰菊酯的红外光谱特性快速检测系统的研究[J].青岛农业大学学报,2007,24(4):304-307.
- [21] 蒋鼎国,徐保国.智能式农药残毒检测系统设计[J].湖北农业科学,2011,50(16):3403-3407.
- [22] 朱国念.农药残留快速检测技术[M].北京:化学工业出版社,2008:215-220.

Progress of Rapid Detecting Technique of Pesticide Residues

YANG Liang¹, LIU Xiao-juan¹, GUO Yu-shuang²

(1. Fujian Agricultural and Forestry University/Fujian Province Key Laboratory of Plant Virology, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Breeding Engineering Technological Center of Guizhou Tobacco Science Research Institute, Guiyang, Guizhou 550081)

Abstract: Pesticides play an important guarantee for the increase of harvest productivity and provide an irreplaceable role in pests' control of crops. However, pesticide residues in the agricultural products have extremely harmfulness to human health and environment. With the strengthening of human environmental awareness and health consciousness, the dangers of pesticide residues are paid attention, and, many countries developed maximum level standards on pesticide residues in food. Therefore, pesticide residue detection techniques become especially important. In order to demonstrate certain reference for the future development of pesticide residues analysis techniques, the recent common methods for the rapid determination of pesticide residues were summarized which could be used in scene detection such as enzyme inhibition, immunoassay, bacterial biological measurement method and biosensors. The test principle and both advantages and shortcomings in those methods were discussed, and the latest research and development trends of the rapid determination and some problems observed were also indicated.

Key words: pesticide residue; enzyme inhibition; immunoassay; bacterial biological measurement method; rapid determination