

# 有机磷农残检测用植物酯酶的研究

温艳霞, 李建科\*

(陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062)

**摘要:** 本文研究了多种植物种子中植物酯酶的提取方法和总酯酶活力, 得出了最佳提取条件。并且研究了不同来源的植物酯酶对有机磷农药的敏感性, 确定了黄豆来源酯酶对敌敌畏等五种农药的最低检测限。结果表明, 以黄豆来源的植物酯酶的总酯酶活力和敏感性为最好。

**关键词:** 植物酯酶; 农药残留; 水提条件; 检测限

Phytoesterase Study on Detecting the Residues of Organophosphate Pesticides

WEN Yan-xia, LI Jian-ke\*

(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** The extraction methods for optimum conditions and the general esterase activity of phytoesterase were studied. The paper also researched the sensitivity of phytoesterase extracted from different plant seeds on assaying organophosphate pesticides, and the limits of detection concentration (LDC) of five pesticides were determined. Results showed that the general esterase activity and the sensitivity of the phytoesterase obtained from soybean are the best.

**Key words** phytoesterase, organophosphate pesticides residue, abstract methods, the limit of detection concentration (LDC)

中图分类号: TS207.53

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2006)04-0123-04

有机磷农药和氨基甲酸酯类农药广泛用于农业生产中, 但这类农药对人体具有较高的急性毒性, 也常造成农产品和食品中的有机磷农药和氨基甲酸酯农药残留超标。近年来, 有很多有关有机磷农药快速检测方法的研究, 其中, 酶抑制法由于灵敏、简便, 检测快速而得到广泛应用。作为酶抑制法的生物识别元件的酶主要有 3 种: 胆碱酯酶、有机磷水解酶和植物酯酶<sup>[1]</sup>。植物酯酶由于材料易得、含量丰富, 且具有与胆碱酯酶和有机磷水解酶相似的检测限而受到重视。

但目前的研究报道, 尚未对植物酯酶的提取、活

力及敏感性进行系统、深入的研究, 且仅见到直接用面粉作为酶源<sup>[2]</sup>。本实验以总酯酶活力为指标, 对陕西和河南主要种植的 5 种小麦以及水稻、黄豆、玉米种子中的酯酶进行了筛选及提取方法研究, 并且通过总酯酶含量和对氧乐果、敌敌畏、甲胺磷、对硫磷以及久效磷的敏感性比较, 确定了以上五种农药的最低检测限 (LDC)。研究表明, 黄豆中提取的酶液可以满足国内和欧盟规定的对有机磷农药最低残留量的检测要求。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2005-06-13

\*通讯作者

基金项目: 国家科技攻关项目(2001BA804A28); 陕西省科技攻关项目(2004k01-G7)

作者简介: 温艳霞(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事营养与食品安全研究。

- [1] 刘艳. 低质蛋白—血粉的有效利用[J]. 饲料工业, 2000, (5): 19-20.  
[2] 许勤虎, 蔡永峰. 动物血液的开发研究[J]. 山西食品工业, 2001, (2): 26-27.  
[3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社,

2001.

- [4] 赫林. 食品微生物实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.  
[5] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.  
[6] Dubnan D A. Microbial enzymes[J]. Microbial Biology of Bacillus, 1982, (1): 331-363.

### 1.1 材料

小麦 陕西主要种植品种: 小堰 22、西农 2611、陕麦 28 西安农林研究所提供; 河南主要种植品种: 郑麦 9023、太空 6 号 河南省农科院提供。

其他植物 黄豆、玉米、小米、水稻、大麦仁, 购自农产品市场。

### 1.2 仪器

UNICO WFJ2000型分光光度计 上海龙尼柯仪器有限公司; HY-2 调速多用振荡器 富华电器有限公司; D60-2F 型电动搅拌机 杭州仪表电机厂; HHW-21CU-600 型电热恒温水槽 上海福玛实验设备有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 总酯酶活力的测定方法

用 3ml 不同浓度的  $\alpha$ -萘酚溶液加入固兰 B 盐溶液 (0.8% 固兰 B 盐, 3.4% SDS), 混合均匀, 在 30℃ 水浴中反应 5min, 在 595nm 测定吸光度。以浓度为横坐标, 以 595nm 吸光度为纵坐标, 作图, 得标准曲线。求其斜率  $k$ 。

总酯酶活力测定参考文献[3]和[4]。

则总酯酶活力的计算式为: 
$$E = \frac{OD \text{值}}{k \times 15 \times 0.5} \times D$$

式中:  $E$ —每毫升酶液所含的总酯酶活力, U/ml;

$D$ —酶液的稀释倍数;

$k$ —某一 pH 下  $\alpha$ -萘酚标准曲线的斜率;

$OD$ —反应后  $\lambda$  595nm 处测得的吸光度;

$U$ —酶活力单位, 1U 定义为规定条件下, 每分钟催化得到  $1\mu\text{mol}$   $\alpha$ -萘酚所需的酶量。

#### 1.3.2 对农药的灵敏度测定方法

配制不同浓度的有机磷农药, 按照上述总酯酶活力测定的方法, 只是将缓冲液换为不同浓度的农药, 测定 595nm 的吸光度。

抑制率(I) = 
$$\frac{E_{\text{未抑制}} - E_{\text{抑制}}}{E_{\text{未抑制}}} \times 100\%$$

以农药浓度的常用对数为横坐标, 相应的抑制率为纵坐标, 作图, 得抑制曲线, 求斜率, 通过曲线斜率的大小反映酯酶粗提液对农药灵敏性的优劣<sup>[5,6]</sup>。

#### 1.3.3 对不同农药的检测限确定

根据所使用 UNICO WFJ2000 型分光光度计的误差范围, 中国以及欧盟所规定的最低残留量(MRL), 以可以检测到的最小吸光度对应的农药浓度为初定检测限, 然后在此浓度下与空白反应液进行  $t$  检验, 确定黄豆种子中提取的植物酯酶对氧乐果, 敌敌畏等农药的最低检测限(LDC)。

## 2 结果与分析

### 2.1 酯酶提取条件的确定

植物种子粉碎, 称取一定量, 按 1:5 加蒸馏水, 用振荡器振荡处理, 并放置过夜后, 用粗纱布过滤, 在 3000r/min 条件下, 离心 5min, 收集上清液, 稀释一定倍数, 按照上述方法测定总酯酶活力。

#### 2.1.1 振荡与搅拌效果比较

用 HY-2 调速多用振荡器和 D60-2F 型电动搅拌机, 料液比 1:5 分别处理, 处理结果见表 1。

表 1 振荡与搅拌效果比较  
Table 1 The comparison of oscillation and stirrer

	陕麦 28 活力	小堰 22 活力	西农 2611 活力
振荡 30min	2.96(U/ml)	2.20(U/ml)	1.86(U/ml)
搅拌 30min	2.96(U/ml)	2.15(U/ml)	1.89(U/ml)

从表 1 可以看出, 振荡或搅拌处理相同时间, 酶活力相差不大, 其效果无显著差异, 两种方法都可以选择。本文选用振荡处理方式。

#### 2.1.2 最佳振荡时间的确定

不同振荡处理时间对酶提取量结果见表 2。

表 2 最佳振荡时间确定  
Table 2 The determination of optimal oscillating time

振荡时间	5min	10min	15min	20min	25min	30min	2h	5h	10h
酶活力	3.07	3.30	3.32	3.20	3.31	3.25	3.16	3.16	3.23

由表 2 可以看出, 振荡处理 10min 至处理 10h, 酶活力变化不明显, 所以, 以振荡处理 10~30min 为宜。

#### 2.1.3 水提取液放置过夜效果比较

水提取液放置过夜与振荡后放置 1h 内立即离心测活对酶提取效果比较见图 1。

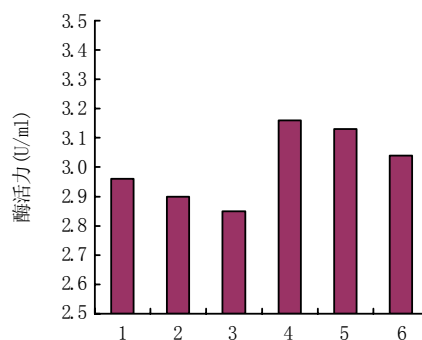


图 1 提取液静置不同时间对酶活力的影响

Fig.1 The effect of enzyme activity in different resting period

图 1 中, 处理 1、2 和 3 分别为陕麦 28, 小堰 22 和西农 2611 水提取液未经过夜(振荡后放置 1h 内)直接测定的酶活力, 处理 4、5 和 6 为三种反应液放置过夜后

测定的酶活力。从图上可以看出, 过夜处理后酶活力较不过夜处理酶活明显增大。

### 2.1.4 反应液显色稳定性研究

#### 2.1.4.1 显色稳定性

表3 反应液显色稳定性  
Table 3 The stability of reactive coloration

	立即测活	放置10min	放置20min	放置30min
吸光度	0.177	0.181	0.188	0.193
酶活力(U/ml)	3.16	3.23	3.36	3.45
相对误差(%)	0	2.2	6.3	9.2

由表3可以看出酶活力测定反应液显色稳定性较差, 放置10min后吸光度即开始增大。

#### 2.1.4.2 煮沸使酶失活对显色稳定性影响

此实验是在酶与底物 $\alpha$ -乙酸萘酯水浴反应15min后, 煮沸使酶完全失活, 再加入显色剂进行显色反应, 测活得到的结果。从表3和表4比较可以看出, 酶反应液显色稳定性较差的原因在于反应产物 $\alpha$ -萘酚与显色剂固兰B盐溶液成色的稳定性不好, 为减小实验误差应在10min以内完成反应液吸光度的测定。

表4 煮沸后显色稳定性  
Table 4 The stability of reactive coloration after boil

	立即测定	放置10min	放置20min
吸光度	0.330	0.339	0.347
酶活力(U/ml)	5.89	6.05	6.20
相对误差(%)	0	2.72	5.26

## 2.2 最佳酶源的筛选

### 2.2.1 五种小麦总酯酶活力以及比活力比较

表5 5种小麦酯酶总酶活力比较  
Table 5 Enzyme activity of five wheat seeds

	陕麦28	小堰22	西农2611	郑麦9023	太空6号
595nm吸光度	0.224	0.220	0.215	0.196	0.194
260nm吸光度(稀释后)	0.075	0.072	0.077	0.073	0.075
280nm吸光度(稀释后)	0.067	0.063	0.069	0.066	0.067
蛋白质含量(mg/ml)	41.5	37.7	43.0	42.0	41.5
总酯酶活力(U/ml)	4.00	3.93	3.84	3.50	3.46
比活力(U/mg)	0.096	0.104	0.089	0.083	0.083

从表5可以看出, 这五种小麦种子中, 陕麦28的总酯酶活力最高, 高于小堰22和西农2611, 而郑麦9023和太空6号则较低。而其比活力大小依次为小堰22略高于陕麦28, 高于西农2611, 郑麦9023以及太空6号。

### 2.2.2 黄豆、玉米等植物种子中酯酶活力比较

从表5和表6我们看出, 植物酯酶广泛存在于小麦, 黄豆等植物种子中, 本实验所选种子中, 黄豆中酯酶

表6 黄豆、玉米等植物中酯酶比较

Table 6 Enzyme activity of soybean, zeamays and other seeds

	玉米	黄豆	小米	水稻	大麦仁	小麦
吸光度(OD)	0.121	0.295	0.123	0.123	0.129	0.220
酶活力(U/ml)	2.161	5.268	2.196	2.196	2.286	3.93

含量最高, 其次是小麦, 大麦仁中含量次于黄豆和小麦, 而高于小米、水稻和玉米。

### 2.2.3 黄豆、陕麦28、小堰22对农药的灵敏性实验

按照1.2.2的实验方法, 分别配制不同浓度的农药, 将1.950ml蒸馏水换为不同浓度的农药, 测定595nm的吸光度, 计算总酯酶活力。求抑制率, 作图, 比较曲线斜率, 从而反映不同来源的植物酯酶对农药的敏感性。

表7 不同来源酯酶对农药敏感性比较

Table 7 Sensitivity of various enzyme to five organophosphate pesticides

农药	酶源	曲线方程
氧乐果	黄豆	$y=21.792x+52.965$
	陕麦28	$y=7.9344x+39.828$
	小堰22	$y=6.0081x+43.458$
敌敌畏	黄豆	$y=6.946x+26.884$
	陕麦28	$y=11.464x+29.33$
	小堰22	$y=4.2175x+23.683$
甲胺磷	黄豆	$y=20.712x+28.293$
	陕麦28	$y=5.2171x+29.996$
	小堰22	$y=4.6742x+18.217$
对硫磷	黄豆	$y=13.68x+22.977$
	陕麦28	$y=2.2709x+11.382$
	小堰22	$y=3.8715x+8.8138$
久效磷	黄豆	$y=24.939x+27.028$
	陕麦28	$y=6.2675x+10.065$
	小堰22	$y=6.2024x+8.7554$

从表7 黄豆、陕麦28和小堰22对氧乐果、敌敌畏、甲胺磷、对硫磷、久效磷的抑制曲线方程的斜率可以判断, 从黄豆种子中提取的粗酶液对各种农药的灵敏度明显优于其它两种小麦, 而小麦中小堰22又较陕麦28更为敏感。

## 2.3 最低检测限

最低检测限结果见表8。

表8 黄豆酯酶对各种农药的最低检测限

Table 8 The LDC of organophosphate pesticides

农药	最低检测限(LDC) (mg/L)	允许最低残留量(MRL) (mg/L)
氧乐果	0.3*	0.2(欧盟)
敌敌畏	0.05*	0.2(中国)
甲胺磷	0.0625*	0.05(欧盟)
对硫磷	0.0625*	0.5(欧盟)
久效磷	0.05*	0.05(中国)

注: \* 与空白比较  $p < 0.01$ 。

由表8可见, 黄豆来源的植物酯酶可以检测到欧盟