

生物酶技术在农药残留快速检测中的应用

王玮屏¹, 伍艳¹, 何丽君², 卢奎²

(1. 黄河水利科学研究院工程力学研究所, 河南 郑州 450003;

2. 河南工业大学 化学化工学院, 河南 郑州 450052)

摘 要: 介绍了 4 种应用于农药残留检测的生物酶技术类型、原理及相关研究进展, 主要包括微生物降解技术、酶抑制技术、酶联免疫吸附技术及酶免疫放大技术. 分析并探讨了这些技术的优点及存在的不足, 对今后生物酶技术快速检测农药残留工作进行了展望. 生物酶技术应用在农药残留检测具有简便、快速、灵敏等优点, 有着广阔的应用前景, 对人类健康及环境保护具有深远的意义.

关键词: 农药残留; 快速检测; 生物酶技术

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2008)02-0072-07

我国是农业大国, 农药在生产中发挥着不可低估的作用. 近年来, 国内外都在一定程度上加大了农药研发力度, 不断研制出农药新品, 但农药的广泛应用却引起了严重的环境问题和食品安全问题, 也成为制约我国农产品出口的一个瓶颈. 因此, 如何有效地检测农药残留成为科研人员关注的焦点之一.

多年来, 色谱法已经非常成功地应用在农残检测领域, 气质联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 和高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 最为常见^[1~4]. 虽然目前这些方法在农药多残留分析中必不可少, 但仍存在着样品前处理复杂、仪器设备昂贵、操作麻烦、检测时间长、不适合现场检测等不足, 随着农产品流通的日趋频繁和快速, 待检样品数量也在迅速增加, 且组分越来越复杂, 显然, 采用传统的色谱分析方法已无法满足要求, 因此, 发展快速、灵敏、高效的农残检测方法成为人们的迫切希望. 近年来, 生物技术在农残分析领域的应用, 使其得到很大突破, 其中, 生物酶技术是研究的热点, 它在很大程度上弥补了色谱分析方法的不足, 引起人们广泛关注.

1 微生物降解法

微生物降解农药一般是在水解酶、氧化还原酶、

裂解酶或转移酶等酶的作用下, 经过一系列反应, 最终被降解成分子量较小的微毒或无毒化合物, 此过程可分为以下 3 步: 首先, 农药化合物在微生物细胞膜表面吸附; 然后, 化合物进入到细胞膜内; 最后, 在降解酶的作用下发生酶促反应. 以磷酸酯水解酶 (OPH) 为例, 当农药与微生物混合后, 农药刺激微生物产生 OPH, 专一性地切断有机磷农药的磷氧、磷硫、磷氟和磷氧键, 使有机磷农药降解生成带有生色基团或具有电活性的产物, 根据这一特性即可通过测定光信号或电信号, 对农药进行定量分析. 根据此原理, 国外许多研究者开发了光学、电势计和安培计等生物传感器, 可以快速、敏感、有选择性地直接检测有机磷化合物.

Schöning 等^[5]以硅胶和 pH 敏感材料等为基质, 覆盖一层有机磷水解酶, 根据电位的改变来测定农残量. 后又对传感器进行改进, 并引入流动注射技术, 对敌敌畏、对硫磷等几种农药进行检测, 浓度范围均低于 μM 级^[6]. Deo^[7]将制成的有机磷水解酶传感器用于检测对氧磷和甲基对硫磷, 检出限和灵敏度分别为 $0.15 \mu\text{M}$ 、 $25 \text{ nA}/\mu\text{M}$ 和 $0.8 \mu\text{M}$ 、 $6 \text{ nA}/\mu\text{M}$. 通过科研工作者的努力, 已经分离得到了大量可降解农药的微生物, 刘宪华^[8]从长期受农药污染的土壤中分离得到假单胞菌 AE-BL3, 它能高效降

收稿日期: 2008 02 25; 修订日期: 2008 03 28.

基金项目: 河南省重大科技攻关项目 (No. 0422031200).

作者简介: 王玮屏 (1968—), 女, 工程师, 主要从事环境分析研究.

解氨基甲酸酯类农药,在呋喃丹的诱导下产生较高活性的呋喃丹水解酶。实验还考察了温度和金属离子对该水解酶酶活的影响,在适宜条件下,酶活力基本不变;但当温度高于 50 ℃时,酶活力则迅速下降。 K^+ 和 Na^+ 等对酶有激活作用, Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 等对酶则有抑制作用。张先恩^[9~11] 科研小组从农药污染的土样中分离出具有彻底降解甲基对硫磷能力的细菌 WBC-3,并对获得的甲基对硫磷水解酶进行了较为系统的研究。

由于基因序列的细微差别,所编码的蛋白质降解酶对农药的降解利用具有选择性,即某一基因序列编码的特定降解酶,对某种农药具有较高的降解率,若要检测多种农药,则需先获得各自对应的降解酶。最近, Lan^[12] 成功地构建了有机磷水解酶和羧酸酯酶的双表达载体,使不同种类的农药残留能够同时降解,为将来农药多残留同时分析技术提供了新的思路。

2 酶抑制法

与微生物降解法不同,酶抑制法并不直接以农药为底物,而是通过农药对酶的抑制作用来达到检测目的。此法操作简便,速度快,不需昂贵的仪器,反应条件温和,特别适合现场检测及大批样品的筛选检测,且检出限符合国家农药残留标准,因此被广泛应用在果蔬生产基地和监督部门。

胆碱酯酶分为乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BuChE)两类。乙酰胆碱酯酶是一种生物催化剂,主要功能是使胆碱在神经突触处快速水解神经递质——乙酰胆碱,从而中断神经冲动的传递。在正常生理情况下,乙酰胆碱完成传导作用以后即在乙酰胆碱酯酶的催化下分解生成乙酸和胆碱,而有机磷、氨基甲酸酯类农药可以抑制乙酰胆碱酯酶的活性,使其分解乙酰胆碱的速度变慢或停止^[13],故可利用这一反应特性检测蔬菜、水果、土壤和水中的有机磷、氨基甲酸酯类农药残留。上述2种动物酶也可由植物酶代替。在酶的催化作用下,对底物或产物颜色进行比色分析,即可判断是否有农药残留。也可根据它们吸光度值的变化,以不加酶试样作空白对照,按下式计算出酶被抑制的程度,从而对农药残留量进行定量分析,判断是否超标。

$$\text{抑制率}\% = \frac{\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{空白}}} \times 100$$

其中: $\Delta A_{\text{空白}}$ 表示显色前后空白溶液吸光值的

变化; $\Delta A_{\text{样品}}$ 表示显色前后样品溶液吸光值的变化。

研究发现,酶活对检测时间、线性范围及最低检出限具有显著影响。我们课题组^[14] 将 N-丁基吡啶四氟硼酸盐([BPy][BF₄])和 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([BMim][BF₄])离子液体加入到磷酸缓冲盐反应介质中,通过比较反应产物在 629 nm 处的吸光度值后发现,酶在该介质中不易失活,相同条件下,加入 8%(V/V)的[BPy][BF₄]可使酶抑制率提高 2.5 倍,即灵敏度提高,且分析时间也由原来的 8 min 缩短为 4 min,这一结果可能是由酶与离子液体中阴阳离子相互作用不同引起的。王继军^[15] 等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的微孔内壁表面,制成农药快速检测板,对果蔬中 10 种有机磷和氨基甲酸酯农药进行检测,灵敏度为 0.01~0.1 mg/kg。植物酶经固化后,稳定性大大提高,可在常温避光条件下保存一年。

在固化技术基础上发展起来的生物酶传感技术是近年来农残检测研究最为活跃的领域^[16~19]。它是将酶作为生物敏感基元,通过各种物理、化学信号转换器,捕捉目标物与敏感基元之间反应所产生的光、热、声、质量、颜色、电化学等可测信号(这些可测信号与目标物浓度成比例关系),实现对目标物定量测定的分析仪器,目前研究较多的是乙酰胆碱酯酶生物传感器。Suprun^[20] 等用传感器对涕灭威、对氧磷和甲基对硫磷 3 种农药残留进行检测,检出限分别为 30、10 和 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。Josiane^[21] 等在相同条件下,用乙酰胆碱酯酶传感器与高效液相色谱方法对西红柿中的西维因残留进行检测,由于后者需要前处理,故线性和回收率均不及前者。何奕^[22] 在乙酰胆碱酯酶的基础上,以戊二醛为交联剂,在复合 pH 电极上固定化酶膜,制备了一种检测毒死蜱的膜生物传感器,可检出浓度为 1.64~20.52 mg/kg 的毒死蜱,并考察了 pH 值、戊二醛用量、工作环境、温度对传感器工作过程的影响。金盛烨^[23,24] 根据 2-丁基-6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-苯并[de]异喹啉 1,3-二酮(激发波长 390 nm,发射波长 530 nm)在不同 pH 值下荧光强度发生变化的原理,研制了一种便携式荧光探针农药残留检测仪,对小白菜、苹果和黄瓜等样品中的呋喃丹和对氧磷进行检测,检出限分别为 3.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 12.0 $\mu\text{g}/\text{L}$,线性范围为 3.0~37.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 12~350 $\mu\text{g}/\text{L}$,卷心菜和白菜中的克百威、甲萘

威、对氧磷和敌敌畏的检出限分别为 3.5、50.0、12.0 和 25.0 $\mu\text{g/L}$, 整个分析过程用时 14 min, 回收率分别为 93.2%~107.0% 和 108.0%~118.0%。酶传感技术使酶抑制法的检测灵敏度和准确性有了很大提高, 并可反复多次利用, 并具有快速、在线、连续检测等优点, 适应现代分析检测的需要。

流动注射是 1970 年代中期诞生并发展起来的溶液自动在线处理及测定的现代分析技术, 具有进样速率高、响应时间快、设备较简单和便于实现微型集成化等优点, 因此近几年来备受农药残留电化学研究人员的青睐^[25~27]。孟范平^[28]等以碘化硫代乙酰胆碱为底物, 将乙酰胆碱酯酶传感器引入流动注射系统中, 该系统可对海水中的马拉硫磷进行连续、灵敏、准确的监测, 检出限达到 0.05 $\mu\text{g/L}$ 。后又以固定化鲛鱼脑组织乙酰胆碱酯酶为识别元件, pH 电极为换能器, 构建了流动注射型 AChE 酶传感器^[29], 该传感器在以磷酸盐缓冲液为载液条件下具有良好的重现性 ($RSD=1.427\%$, $n=10$) 和敏感性, 可实现对有机磷化合物的在线监测, 对甲基对硫磷线性响应的浓度范围为 $4.29 \times 10^{-10} \sim 4.29 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$, 最低检出限为 $1.3 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 。Dănel^[30]根据农药可对乙酰胆碱酯酶产生不可逆抑制的原理, 采用流动注射荧光检测技术检测水中的对氧磷, 整个分析过程用时 35 min, 最低检出限为 1.3 $\mu\text{g/L}$, 线性范围 2~80 $\mu\text{g/L}$ 。Rippeth 等^[31]将乙酰胆碱酯酶修饰的可抛弃型钴酞菁染料印刷丝网碳电极集成到流动注射体系中, 用以检测敌敌畏和对氧磷, 条件优化后的检测限可达到 10^{-11} mol/L , 效果优于其它电化学检测方法。

3 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 又称酶标法, 是将抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合而发展起来的一种综合性技术, 在免疫法分析农残中占到了约 90%^[32] 的比例。该方法既有抗原-抗体反应的特异性, 又有酶促反应的生物放大作用。由于农药小分子不能刺激机体产生免疫应答并产生抗体, 是半抗原物质, 因此在分析过程中, 农药小分子首先须与大分子载体蛋白偶联形成完全抗原, 再与相应的抗体 (多克隆抗体或单克隆抗体) 进行特异性结合, 待抗原抗体反应平衡后, 将游离的酶标记物去除, 随后加入底物发生酶促反应, 根据生成产物颜色

有无或深浅, 对抗原和抗体进行定性定量分析^[33]。

ELISA 在欧美等国家使用非常广泛, 并有相应的试剂盒生产。Watanabe^[34]等用 ELISA 试剂盒对市售黄瓜、茄子、茼蒿和青椒中的吡虫啉残留进行检测, 所得平均回收率 $\geq 85.3\%$, 与高效液相色谱法进行了比较, 两种方法相关系数 $r \geq 0.91$ 。ELISA 与其它分析方法、仪器设备的结合使得它在农残快速检测领域的应用越来越广泛。Marta^[35]等将快速萃取与 ELISA 结合, 对橄榄油中的有机磷农药残留进行检测, 最低检出限均小于橄榄油的最大残留限量, 回收率为 94%~122%。Kumar^[36]将流动注射分析技术与酶联免疫方法结合, 获得一种灵敏、准确、高通量且自动化程度高的农残检测方法。国内起步较晚, 目前还停留在研究开发阶段, 刘廷凤^[37]等用活泼酯法将氯菊酯半抗原 (Py) 与卵白蛋白 (OVA) 偶联, 制备合成抗原 Py-OVA, 并在此基础上建立了农药间接酶联免疫吸附测定法, 用以测定环境样品中的氯菊酯农药残留, 该法在 10~800 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内呈良好的线性关系, 回收率大于 97%。朱国念^[38]等研制出一种适用于检测水样、土样和蔬菜样品中克百威残留的直接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒, 该试剂盒最低检出限为 0.01 mg/L, 线性检测范围为 0.01~10.00 mg/L, 供试样品检测结果的批内、批间和整体变异系数均小于 8%, 回收率均大于 90%, 符合农药残留分析要求, 试剂盒在 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下至少可保存 6 个月。韩丽君^[39]等通过动物免疫获得 2 种高效价抗体, 在此基础上建立了 2 种甲基对硫磷的酶联免疫吸附测定方法。这 2 种方法检出限分别为 2.0 ng/mL 和 6.1 ng/mL, 2 种抗体对结构相似的有机磷农药 (对硫磷除外) 无交叉反应, 即对甲基对硫磷具有很高的特异性, 且回收率和 CV 值与 GC 结果基本吻合, 灵敏度高于 GC。Zhang^[40]等合成了 2 种受其它农药干扰较小的倍硫磷抗原, 并用加标回收法检测 4 种水果 (葡萄、桃、梨和西红柿) 中的倍硫磷含量, 回收率均在 79.8%~106.0%。

酶联免疫传感器结合了免疫分析和与传感器的优点, 越来越受到人们关注^[41~43]。Yulaeva^[44]用酶联免疫传感器测定多种食物中的西玛津, 最低检出限达到 3 ng/mL, 此传感器的使用寿命为 15 d, 可重复使用 250 次。Yokoyama^[45]等人制作了压电免疫传感器测定阿拉特津, 检测范围为 0.001~1.000 ng/mL, 还可测定其它多种阿拉特津的衍生物。

4 酶放大免疫测试法

酶放大免疫测试法 (enzyme multiplied immunoassay technique, EMIT) 是最早出现且经典的均相酶免疫测试技术, 是基于空间位阻竞争结合机理发展起来的分析方法, 即酶标记与未标记抗原与抗体产生竞争结合, 由于酶标记抗原与抗体结合后, 标记酶的活性受到抑制, 故当标记抗原与抗体结合多(未标记抗原与抗体结合少)时, 酶的活性就低。由此可见, 未标记物的含量与酶活性呈正相关, 据此, 可对待测物质进行定量分析^[46]。该方法与 ELISA 等异相酶免疫测定方法最大的区别在于前者不需在反应后对游离酶标记物和结合酶标记物进行分离^[47], 通过直接测定系统中总标记酶活性的变化, 即可确定结合酶标记物的数量, 故该方法操作简单, 易于自动化, 但同时也会在一定程度上引起干扰增强, 灵敏度下降等问题。

Rubenstein^[48] 研究小组在 1972 年最先提出 EMIT 分析方法, 并将其用于吗啡的测定, 在后来的 30 多年时间里, 该方法被广泛应用在临床医学、药学^[49, 50] 等研究领域, 并主要将其用于药物、激素、毒品、兴奋剂等小分子化合物的分析测定。研究者们通过实验发现, 一些酶被抑制是由于酶的构型发生了改变, 因此, 选择合适的酶标物很重要, 会直接影响酶活及检测结果。Zherdev 等人^[51] 将 EMIT 用于农药检测, 并首次选择 α 淀粉酶作为该方法的酶标, 在优化条件下, 用常规比色方法定量后得出拟除虫菊酯类农药(氯菊酯、苯醚菊酯)及其衍生物的检出限为 2~5 ng/mL, 分析耗时 45 min, 此外, 该方法还可用于农药 2,4-二氯苯氧乙酸的检测。

5 前景展望

生物酶速测技术作为农残常规检测方法的有效补充, 主要用于大量样品的初筛, 以便快速判断样品中的农残量是否超标, 而对于阳性样品一般还需采用色谱方法作进一步确认, 目前该法还不具备色谱分析法的某些优点, 在实际应用过程中仍存在一些问題: (1) 生物酶技术测定农残通常一次只能检测其中某一种农药残留量或所有农药的残留总量, 而不能多残留同时分析; (2) 酶电极高度的选择性和灵敏性使其成为许多农残分析研究者首选方法之一, 但用于农药检测的酶相对匮乏、酶修饰电极的寿命一般较短, 且其稳定性受环境条件影响较大, 这些不利

因素阻碍了酶电极的推广应用; (3) 联用技术相对较少, 目前常见的仅有生物酶传感器—流动注射联用技术, 远不能满足农残检测领域日益增长的需求, 如何开发出更优的联用技术, 相互取长补短、各尽其用, 是科研工作者们值得思考的问题。

总的来说, 作者认为选择合适的载体, 进一步完善酶固化技术, 是生物酶农残速测技术研究的重点; 研制新型酶催化剂、免疫芯片及酶传感器, 推动该方法及与其它分析技术的联用, 提高方法灵敏度、准确性和自动化, 是有前景的研究方向。若上述问题得以解决, 生物酶技术将会在农药残留快速检测中发挥巨大潜力。

参考文献:

- [1] Liu L B, Hashi Y, Qin W P. Development of automated online gel permeation chromatography-gas chromatograph mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural products[J]. J Chromatogr B, 2007, 845: 61-68.
- [2] Tomás P R, Carmen M L, María D G. Determination of N-methylcarbamate pesticides in environmental samples by an automated solid phase extraction and liquid chromatographic method based on post-column photolysis and chemiluminescence detection[J]. J Chromatogr A, 2007, 1164: 174-180.
- [3] Vega A B, Frenich A G, Vidal J L M. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2005, 538: 117-127.
- [4] Cai Z W, Wang D L, Ma W T. Gas chromatography/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters by an isotope dilution technique[J]. Anal Chim Acta, 2004, 503: 263-270.
- [5] Schöning M J, Arzdorf M, Mulchandani P, et al. A capacitive field-effect sensor for the direct determination of organophosphorus pesticides[J]. Sens Actuators, B, 2003, 91: 92-97.
- [6] Schöning M J, Krause R, Block K, et al. A dual amperometric/potentiometric FIA-based biosensor for the distinctive detection of organophosphorus pesticides[J]. Sens Actuators, B, 2003, 95: 291-296.
- [7] Deo R P, Wang J, Block I, et al. Determination of

- organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 530: 185-189.
- [8] 刘宪华, 宋文华, 戴树桂. 呋喃丹水解酶的分离纯化及性质[J]. *上海交通大学学报*, 2004, 38: 834-837.
- [9] 陈亚丽, 张先恩, 刘虹, 等. 甲基对硫磷降解菌假单胞菌 WBG-3 的筛选及其降解性能的研究[J]. *微生物学报*, 2002, 42: 490-497.
- [10] 楚晓娜, 张先恩, 陈亚丽, 等. 假单胞菌 WBG-3 甲基对硫磷水解酶性质的初步研究[J]. *微生物学报*, 2003, 43: 453-459.
- [11] 刘璐璐, 周亚凤, 张治平, 等. 甲基对硫磷水解酶基因的高效表达及酶活性分析[J]. *微生物学通报*, 2004, 31: 77-82.
- [12] Lan W S, Gu J D, Zhang J L, *et al.* Coexpression of two detoxifying pesticide degrading enzymes in a genetically engineered bacterium[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2006, 58: 70-76.
- [13] Melstrom P C, Williams P L. Reversible AChE inhibitors in *C. elegans* vs rats, mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357: 200-205.
- [14] Wu Y, He L J, Zhao W J, *et al.* Effect of ionic liquid on detection of carbofuran by plant lipases inactivation[J]. *Chin Chem Lett*, 2006, 17: 1493-1494.
- [15] 王继军, 黄永春, 李治祥, 等. 应用植物酯酶固化工酶检测有机磷和氨基甲酸酯农药[J]. *环境科学学报*, 2004, 24: 558-560.
- [16] Andreescu S, Marty J L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications[J]. *Biomol Eng*, 2006, 23: 1-15.
- [17] Holger S, Sandra V, Francois V, *et al.* Design of acetylcholinesterases for biosensor applications[J]. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18: 201-209.
- [18] Marques P R B D, Nunes G S, Dos Santos T C R, *et al.* Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*: Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20: 825-832.
- [19] Reybier K, Zairi S, Jaffrezic Renault N, *et al.* The use of polyethyleneimine for fabrication of potentiometric cholinesterase biosensors[J]. *Talanta*, 2002, 56: 1015-1020.
- [20] Suprun E, Evtugyn G, Budnikov H, *et al.* Acetylcholinesterase sensor based on screen printed carbon electrode modified with prussian blue[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383: 597-604.
- [21] Josiane C, Sergio A S M. Determination of carbaryl in tomato "in natura" using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity[J]. *Sens Actuators, B*, 2008, 129: 40-46.
- [22] 何奕, 王琦琛, 虞骥. 快速检测毒死蜱残留量的酶膜生物传感器研究[J]. *上海环境科学*, 2003, 22: 687-689.
- [23] 张纪秀, 黄威东, 金盛烨, 等. 便携式检测仪检测呋喃丹和对氧磷的研究[J]. *分析测试学报*, 2005, 24: 89-91.
- [24] Jin S Y, Xu Z C, Chen J P, *et al.* Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH sensitive fluorescence probe[J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 523: 117-123.
- [25] Liu G, Riechers S L, Timchalk C, *et al.* Sequential injection/ electrochemical immunoassay for quantifying the pesticide metabolite 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol[J]. *Electrochem Commun*, 2005, 7: 1463-1470.
- [26] Grennan K, Strachan G, Porter A J, *et al.* Atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single chain antibody fragments and regeneration-free multi-calibrant measurement[J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 500: 287-298.
- [27] Bucur B, Dondoi M, Danet A, *et al.* Insecticide identification using a flow injection analysis system with biosensors based on various cholinesterases[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 539: 195-201.
- [28] 孟范平, 何东海, 朱小山, 等. 利用流动注射型乙酰胆碱酯酶传感器监测海水中马拉硫磷[J]. *分析化学*, 2005, 33: 922-926.
- [29] 朱小山, 孟范平, 朱琳, 等. 基于固定化 AChE 的流动注射型酶传感器研究[J]. *环境科学*, 2006, 27: 1829-1834.
- [30] Danet A F, Bucur B, Cheregi M C, *et al.* Spectrophotometric determination of organophosphoric insecticides in a FIA system based on AChE inhibition[J]. *Anal Lett*, 2003, 36: 59-73.
- [31] Rippeth J J, Gibson T D, Hart J P, *et al.* Flow injection detector incorporating a screen printed disposable amperometric biosensor for monitoring organophosphate pesticides[J]. *Analyst*, 1997, 112: 1425-1429.
- [32] Morozova V S, Levashova A I, Eremin S A.

- Determination of pesticides by enzyme immunoassay [J]. *J Anal Chem*, 2005, 60: 202-217.
- [33] Nunes G S, Toscano I A, Barceló D. Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme linked immunosorbent assays [J]. *Trends Anal Chem*, 1998, 17: 79-87.
- [34] Watanabe E, Eun H, Baba K, *et al.* Rapid and simple screening analysis for residual imidacloprid in agricultural products with commercially available ELISA [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 521: 45-51.
- [35] Marta G G, Eva M B, Rosa P, *et al.* Immunochemical determination of four organophosphorus insecticide residues in olive oil using a rapid extraction process [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 556: 347-354.
- [36] Kumar M A, Chouhan R S, Thakur M S, *et al.* Automated flow enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) system for analysis of methyl parathion [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 560: 30-34.
- [37] 刘廷凤, 刘亚子, 孙成. 氯菊酯农药间接酶联免疫吸附测定法的建立 [J]. *环境科学*, 2006, 27: 347-350.
- [38] 朱国念, 程敬丽, 吴慧明, 等. 克百威残留检测直接竞争 ELISA 试剂盒的研究 [J]. *中国食品学报*, 2003, 3: 1~6.
- [39] 韩丽君, 贾明宏, 钱传范, 等. 甲基对硫磷的酶联免疫吸附分析 (ELISA) 研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24: 187-190.
- [40] Zhang Q, Sun Q, Hu B S, *et al.* Development of a sensitive ELISA for the analysis of the organophosphorous insecticide fenthion in fruit samples [J]. *Food Chem*, 2008, 106: 1 278-1 284.
- [41] Knopp D. Application of immunological methods for the determination of environmental pollutants in human biomonitoring: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 1995, 311: 383-392.
- [42] Alcocer M J C, Dillon P P, Manning B M, *et al.* Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity antiorganophosphate pesticide antibody [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48 (6): 2 228-2 233.
- [43] Eremin S A, Ryabova I A, Yakovleva J N, *et al.* Development of a rapid, specific fluorescence polarization immunoassay for the herbicide chlorsulfuron [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 468: 229-236.
- [44] Yulaeva M F, Sitdikova R A, Dmitrieva N M, *et al.* Development of a potentiometric immunosensor for herbicide simazine and its application for food testing [J]. *Sens Actuators, B*, 2001, 75 (1~2): 129-135.
- [45] Kenji Y, Kazunori I, Eiichi T, *et al.* Highly sensitive quartz crystal immunosensors for multisample detection of herbicides [J]. *Anal Chim Acta*, 1995, 304: 139-145.
- [46] Jenkins S H. Homogeneous enzyme immunoassay [J]. *J Immunol Methods*, 1992, 150: 91-97.
- [47] 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.
- [48] Rubenstein K E, Schneider R S, Ullman E F. "Homogeneous" enzyme immunoassay: new immunochemical technique [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, 47: 846-851.
- [49] Gjerde H. Screening for cannabinoids in blood using EMIT: Concentrations of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in relation to EMIT results [J]. *Forensic Sci Int*, 1991, 50: 121-124.
- [50] Boer K, Deufel T, Schmidt D, *et al.* Application of the EMIT 2000 tacrolimus assay on the Abbott Architect c8000 high volume clinical chemistry analyzer [J]. *Clin Biochem*, 2006, 39: 1 041-1 043.
- [51] Zherdev A V, Dzantiev B B, Trubaceva J N. Homogeneous enzyme immunoassay for pyrethroid pesticides and their derivatives using bacillary α -amylase as label [J]. *Anal Chim Acta*, 1997, 347: 131-138.

Application of Bioenzyme Techniques on Rapid Determination of Pesticide Residues

WANG Weiping¹, WU Yan¹, HE Lijun², LU Kui²

(1. Institute of Engineering Mechanics, Yellow River Institute of Hydraulic Research,
Zhengzhou 450003, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering,
Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The types, principles and research progress of four bioenzyme techniques for detecting pesticide residues were introduced, including microbial degradation, enzyme inhibition, enzyme-linked immunosorbent and enzyme-multiplied immunoassay techniques. Their advantages, disadvantages and expectation in future in this field are also indicated in this paper. Bioenzyme techniques are simple, fast and sensitive, having a broad prospect and far reaching significance for human's health and environmental protection.

Key words: pesticide residues; rapid determination; bioenzyme technology

Classifying number: O657.32