

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

钟树明 袁东星 金晓英 许鹏翔

(厦门大学环境科学研究中心, 海洋环境科学教育部重点实验室, 厦门, 361005)

摘 要

应用植物酶抑制技术检测蔬菜中的有机磷及氨基甲酸酯类农药. 用小柱对样品进行预处理, 可去除叶绿素的干扰、提高检测灵敏度. 提出了抑制率阈值 (15%). 应用本方法对市售蔬菜的农药残留进行了调查. 检出率约为 10%.

关键词: 蔬菜, 有机磷农药, 氨基甲酸酯类农药, 植物酶, 抑制率.

利用有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的特异抑制作用发展的酶化学比色分析法, 已广泛应用于痕量和微量有机磷及氨基甲酸酯类农药残留的检测^[1, 2], 但是乙酰胆碱酯酶来源于动物体, 材料昂贵, 且保存困难. 近年来发展了用植物水解酶替代乙酰胆碱酯酶的分析方法^[3], 该法利用植物水解酶水解 2,6-二氯乙酰酞酚, 根据反应溶液在水解前后颜色的变化, 用眼睛或仪器辨别农药对酶的抑制程度. 在有机磷或氨基甲酸酯类农药存在时, 植物水解酶的活性受到抑制, 酞酚的蓝色变浅.

本研究采用小柱净化, 能有效去除萃取液中的叶绿素; 应用植物酶抑制技术检测蔬菜中的有机磷及氨基甲酸酯类农药; 并根据有关标准提出了抑制率阈值.

1 仪器和试剂

BECKMAN DU-8B 紫外-可见分光光度计, 带恒温装置 (美国产), XK95-I 型多用振荡器 (江苏新康仪器厂), LD4-2 离心机 (北京医用离心机厂).

2,6-二氯乙酰酞酚指示剂^[4]: 取 0.1mol 干燥的 2,6-二氯酞酚钠盐 (德国产, 上海试剂有限公司进口分装) 于锥形瓶中, 加入 0.3mol 的乙酸酐, 在振荡器中振荡 2h. 在室温下静置 1h 后加入 600g 碎冰块, 1.5h 后过滤, 滤出物用水洗后溶于乙醚中, 加无水硫酸钠干燥, 在水浴上蒸发至约 10ml, 然后加入 4 倍体积的石油醚稀释或加石油醚直到出现结晶为止. 过滤, 滤液冰冻冷却后得晶体, 再用乙醚/石油醚重结晶一次. 真空干燥. 晶体避光保存. 称取所得晶体 10mg, 溶于 10ml 1,4-二氧六环 (分析纯, 上海试剂三厂) 中, 即得 $1.0\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 2,6-二氯乙酰酞酚指示剂, 避光保存.

磷酸盐缓冲液 ($0.1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): 混合 94.7ml $0.1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液和 5.3ml $0.1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液, 得 pH 值为 8.0 的磷酸盐缓冲液.

面粉酶溶液^[5]: 称取 5g 市售面粉于锥形瓶中, 加入 20ml 蒸馏水, 在振荡器上振荡 30min, 以 $2000-3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 在离心机上离心 10min, 上清液用针筒式过滤器过滤, 得面

粉酶溶液, 置于 4℃ 冰箱中保存.

50% 甲胺磷乳油 (福建省三农公司), 50% 辛硫磷乳油 (江苏省城市利民化工厂), 增效甲基异柳磷乳油 (青岛双收农药公司), 80% 敌敌畏乳油 (江苏梅兰公司), 氧化乐果乳油 (中国人民解放军第九七一五工厂), 17.5% 增效水胺硫磷乳油 (湖北省仙桃市农药厂), 40% 乐果乳油 (沈阳新城化工公司), 敌百虫原粉 (南宁化学工业集团), 3% 呋喃丹粒剂 (南宁化学工业集团).

2 样品预处理

预处理柱: 在直径 1cm 的 10ml 塑料离心试管下部钻一直径约为 2mm 的小孔, 依次填入少量玻璃纤维和 1g 硅藻土 545 (上海试剂有限公司进口分装).

取蔬菜菜叶 10g, 适当剪碎, 置于 25ml 离心管中, 加入 10ml 磷酸盐缓冲液, 振荡 1min, 将液体倒入预处理柱, 接收流出液, 即为样品溶液^[3].

3 定性和定量分析

定性分析: 取两支试管, 一支加样品溶液 2.7ml, 另一支加磷酸盐缓冲溶液 2.7ml, 分别加入 0.2ml 植物酶溶液, 于 40℃ 下恒温 10min, 分别加入 0.1ml 2,6-二氯乙酰胺酚指示剂, 40℃ 下再恒温 10min, 对比两试管中溶液的颜色. 若样品管溶液的蓝色较浅或呈现橙色, 说明酶活性受到抑制, 样品中含有机磷或氨基甲酸酯类农药.

标准工作曲线的绘制: 在 1cm 比色皿中依次加入 2.4ml 磷酸盐缓冲液、0.3ml 农药水溶液 (使最终浓度分别为 0.010, 0.033, 0.067, 0.10, 0.33, 0.67, 1.0, 3.3, 6.7, 10.0, 33.3, 100.0 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)、0.2ml 植物酶溶液, 在 40℃ 下恒温 10min, 于 605nm 处读取吸光值. 然后加入 0.1ml 2,6-二氯乙酰胺酚指示剂, 40℃ 下再恒温 10min, 于 605nm 处读取吸光值.

用磷酸盐缓冲液替代农药溶液, 在同上的操作下, 得空白溶液的吸光值, 按下式计算抑制百分率.

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

式中, $\Delta A_{\text{空白}}$ 表示显色前后空白溶液的吸光值变化; $\Delta A_{\text{样品}}$ 表示样品的吸光值变化.

定量分析: 采用外标法. 抑制率与样品中有机磷及氨基甲酸酯类农药浓度的对数成正比^[6], 以抑制百分率对样品中农药浓度的对数作图, 得标准工作曲线.

4 萃取液中叶绿素的去除对方法灵敏度的贡献

叶类蔬菜在预处理过程中, 叶绿素和其它杂质也同农药一起被萃取出来, 绿色的叶绿素对显色反应有影响, 因此, 把叶绿素等杂质从萃取液中去除是提高方法灵敏度的有效途径. 报道的方法是取萃取液的上清液^[7]或通过铺有硅藻土 545 的滤纸过滤^[8]. 叶类蔬菜样品体积较大, 在萃取液一定的情况下, 不易得到上清液. 通过铺有硅藻土 545 的滤纸过滤能取得一定的去除叶绿素的效果, 但过滤时间长, 吸附剂用量大.

分别取未过柱的样品萃取液和过柱后的样品萃取液, 在波长 645nm 读取吸光值, 叶绿素去除效果以过柱后样品的吸光值 $A_{\text{过柱}}$ 与未过柱样品的吸光值 $A_{\text{未过柱}}$ 的百分比率表

示, 叶绿素通过不同吸附剂后的残留率分别为: 滤纸 70.3%, 硅镁型吸附剂 17.9%, 201 红色担体 34.0%, 硅藻土 545 为 15.4%. 硅镁型吸附剂和硅藻土 545 对叶绿素有很好的吸附作用.

分别取未过柱的农药溶液和过柱后的农药溶液, 对比它们的抑制率值, 可判断农药被吸附剂吸附的情况. 用同一农药溶液试验, 以过柱后的样品抑制率与未过柱后的样品抑制率的百分比率表示样品经预处理后农药的保留, 硅镁型吸附剂 (62.2%) 对农药有一定的吸附作用, 而硅藻土 545 (99.0%) 对农药的吸附作用可以忽略.

因硅藻土 545 对叶绿素去除效果好且不影响样品中农药的浓度, 故选其作为预处理柱填充材料. 比较了填有不同量硅藻土 545 的预处理柱对叶绿素和农药的吸附情况, 发现 1g 硅藻土 545 就能有效提高方法灵敏度. 故此选用填有 1g 硅藻土 545 的小柱作为样品预处理柱.

5 敌敌畏浓度与抑制率的关系

以敌敌畏浓度的对数对抑制率作图, 关系曲线如图 1 所示. 从图 1 可以看出, 当敌敌畏浓度在 $0.01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ — $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时, 浓度的对数与抑制率基本呈线性关系.

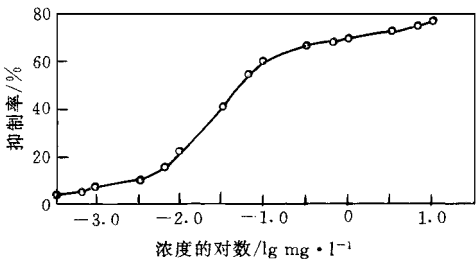


图 1 敌敌畏浓度的对数与抑制率的关系曲线

Fig 1 Relationship between inhibition and logarithms of DDVP concentration

农药加酶混合后的恒温时间与酶活性被抑制程度密切相关, 一般恒温时间愈长, 反应时间愈长, 酶活性被抑制程度愈高, 所以要严格控制恒温反应时间, 以保证数据的准确性.

6 方法测定限和相对标准偏差

用各种农药配成一系列不同浓度的水溶液, 按实验步骤进行测定. 考虑到方法的测定误差, 以抑制率 10% 作为方法测定限的标准, 各种农药的测定限 ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) 分别为: 甲胺磷 (0.012), 敌敌畏 (0.0040), 乐果 (0.048), 氧化乐果 (0.17), 甲基异柳磷 (0.0015), 水胺硫磷 (0.15), 辛硫磷 (0.10), 敌百虫 (0.0074), 呋喃丹 (0.33).

将同一农药水溶液平均分成 5 份, 按实验步骤测定, 得方法的相对标准偏差为 1.8%, 说明方法的精密度较高.

7 抑制率阈值的估算

按已建立的实验方法，可以得到几种常用的有机磷及氨基甲酸酯类农药的浓度对数与抑制率值之间的关系，如表 1 所示。我国已制定了一些农药的最大允许残留量(Maximum Residue Limit, MRL)，部分农药的最大允许残留量和根据实验计算出的对应抑制率值也列于表 1 中。

从表 1 可以看出，不同农药的最大允许残留量所对应的抑制率值是不同的，根据 FAO/WHO 1985 年第 16 届食品法典委员会所采纳的农药残留最高限量标准，各种农药残留在 0.1—10mg•l⁻¹ 范围。本方法除辛硫磷和呋喃丹外，对其它农药均能满意地检测。考虑方法测定限、误差、萃取效率、不同蔬菜对反应的影响等综合因素，可以拟定抑制率值 15% 为抑制率阈值。如果抑制率大于或等于 15%，表示蔬菜中农药含量超标；如果检测抑制率小于 15%，表示蔬菜合格，从而建立了蔬菜中农药残留快速检测方法。

表 1 几种常用有机磷及氨基甲酸酯类农药浓度对数与抑制率的关系和
蔬菜中最大允许残留量及其对应的抑制率值

Table 1 Relationship between percent inhibition and logarithms of different
organophosphorus and carbanate pesticides

农药通用名	最大允许残留量 ^[9] (mg•kg ⁻¹)	浓度对数 x 与抑制率 y 的关系式	最大允许残留量 对应的抑制率值/ %
甲胺磷	稻米(0.1)	y= 12.94x + 34.81	21.9
敌敌畏	蔬菜(0.1)	y= 34.42x + 92.41	58.0
乐果	蔬菜(1.0)	y= 4.412x + 15.81	15.8
氧化乐果	暂无标准, 参考乐果	y= 8.093x + 16.31	16.3
甲基异柳磷	暂无标准(取 0.1)	y= 10.14x + 38.76	28.6
辛硫磷	蔬菜(0.05)	y= 13.36x + 23.37	6.0
水胺硫磷	暂无标准, 参考亚胺硫磷(0.5)	y= 7.631x + 16.28	14.0
敌百虫	蔬菜(0.1)	y= 11.67x + 34.85	23.2
呋喃丹(克百威)	糙米(0.2)	y= 9.904x + 14.72	7.80

8 植物酶法与标准方法的比较

为了验证方法的可靠性，取喷洒不同浓度久效磷农药的同一蔬菜样品，用已建立的植物酶法与国家标准法^[10] 进行分析测定。当喷洒浓度为 5.0mg•l⁻¹ 时，用国家标准气相色谱法测定的结果为 0.23mg•l⁻¹，植物酶法为 0.13mg•l⁻¹；当喷洒浓度为 1.0mg•l⁻¹ 时，检测的结果为：国家标准气相色谱法为 0.047mg•l⁻¹，而植物酶法为 0.029mg•l⁻¹。

对于水溶性的农药乳油，与标准气相色谱法相比，植物酶法的检测结果略低些，但已能满足检测的要求。由于气相色谱法的萃取和检测，操作复杂，需要使用大量的二氯甲烷等有机溶剂，而植物酶法在测定过程中无需使用有机溶剂，预处理方法简单，测定速度较快，成本低廉。应用所建立的方法抽样对市场出售的新鲜蔬菜进行农药残留检测，检出率约为 10%。

参 考 文 献

- [1] Benabei M, Determination of Organophosphorus and Carbamic Pesticides with a Choline and Acetylcholine Electrochemical Biosensor. *Anal. Lett.*, 1991, **24** (8) : 1317-1331
- [2] Katsoudas E, Abdelmessih H, Enzyme Inhibition and Enzyme Linked Immunosorbent Assay Methods for Carbamate Pesticide Residue Analysis in Fresh Produce. *Journal of Food Protection*, 2000, **63** (12) : 1758-1760
- [3] 韩承辉, 谷巍, 王乃岩等. 快速测定水中有机磷农药方法的研究. *环境化学*, 2000, **19** (2) : 187-189
- [4] David N K, Robert M G, Miller F G, A Study of the Physical and Chemical Properties of the Esters of Indophenols I. Preparation. *Org. Chem.*, 1959, **24** 1743-1750
- [5] 李治祥, 翟延路, 应用植物酯酶抑制技术测定蔬菜水果中农药残留量. *环境科学学报*, 1987, **7** (4) : 472-478
- [6] George G Guilbault, 酶法分析. 北京: 科学出版社. 1977, 195-200
- [7] 韩承辉, 王乃岩, 用植物酯酶片快速测定蔬菜上有机磷农药. *环境保护*, 1998, **12** 31-33
- [8] 李治祥, 黄士忠, 翟延路, 快速测定蔬菜水果中农药残毒的酶抑制技术. *中国环境科学*, 1991, **11** (4) : 311-313
- [9] GB 8321.1-87 《农药合理使用准则 (一)》; GB 8321.2-87 《农药合理使用准则 (二)》; GB/T 8321.5-1997 《农药合理使用准则 (五)》
- [10] GB/T 5009.20-1996 《食品中有机磷农药残留量的测定方法》

2001 年 3 月 7 日收到.

DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS AND CARBAMATE PESTICIDE RESIDUES IN VEGETABLES USING A PLANT-HYDROLYSES INHIBITION TECHNIQUE

ZHONG Shu-ming YUAN Dong-xing JIN Xiao-ying XU Peng-xiang

(Key Laboratory for Marine Environmental Science of MOE,

Environmental Sciences Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005)

ABSTRACT

A detection method for pesticide residues in vegetables has been developed using a plant-hydrolyses inhibition technique. The chlorophyll existing in vegetables has been removed using a minicolumn filled with Celite 545. Thus the method sensitivity has been improved. The threshold of percent inhibition is suggested (15%). The developed method has been applied to a vegetable survey in market.

Keywords: vegetables, organophosphorus, carbamates, pesticides, plant-hydrolyses, percent inhibition.