

电位法快速检测有机磷及氨基甲酸酯类农药灵敏度的研究

闵建华 李建科 朱桂勤 何 婷 牛 乐

(陕西师范大学食品系, 西安, 710062)

摘 要 以黄豆中提取的植物酯酶为检测用酶,根据酶抑制反应前后 ΔpH 变化,建立了电位法快速检测有机磷及氨基甲酸酯类农药残留的方法。测定了 20 种有机磷及 9 种氨基甲酸酯类农药的灵敏度,经与国家规定的最大残留限量(MRL)相比较,有 28 种农药的最低检测限(LDC)可达到 MRL 限值要求。

关键词 植物酯酶,有机磷及氨基甲酸酯类农药,快速检测,灵敏度

有机磷和氨基甲酸酯类农药目前应用仍十分广泛^[1],其在农产品中的残留问题十分突出。这类农药的毒性主要是抑制血液和组织中的乙酰胆碱酯酶的活性,导致神经递质乙酰胆碱大量蓄积,引起一系列神经症状,轻者会出现头疼、头晕、恶心、呕吐、无力、胸闷、视力模糊等中毒症状,重者肌肉抽搐、痉挛、昏迷、呼吸困难,最终导致呼吸麻痹而死亡。因此,加强对有机磷及氨基甲酸酯类农药的检测是必要的。特别针对我国果蔬产销的特点,快速灵敏的农药残留检测方法是需要的。

酶抑制法测定农产品中有机磷及氨基甲酸酯类农残是根据农药的毒性对酶分解底物的抑制作用进行的,主要使用的酶有动物酶源的胆碱酯酶和从植物中提取的植物酯酶^[2,3]。本研究以酶抑制法为原理,以黄豆中提取的植物酯酶为检测用酶,建立了电位法快速检测有机磷及氨基甲酸酯类农药残留的方法,并评价了该方法对多种农药残留检测的灵敏度。

1 材料与方 法

1.1 原 理

有机磷及氨基甲酸酯类农药可以抑制植物酯酶活性,将含有植物酯酶的酶液与含有农药的溶液反应、当植物酯酶活性受到抑制时,酶与底物 α -乙酸萘酯作用生成的醋酸量相应减少,酶被农药抑制程度与反应体系的产酸量减少线性相关,可根据反应前后 ΔpH 值变化情况,对样品中的农药残留进行定量分析。

1.2 主要仪器与试剂

FZ102 微型植物试样粉碎机,河北省黄骅市新兴电器厂;HH-4 数显恒温水浴锅,上海福玛实验设备

有限公司;TDL-4 台式离心机,上海医用分析仪器厂;pHS-3C pH 计,上海雷磁精密科学仪器有限公司。

敌敌畏、甲胺磷、久效磷、乙基对硫磷、氧乐果、乐果、辛硫磷、甲拌磷、马拉硫磷、甲基对硫磷、伏杀磷、敌百虫、毒死蜱、二嗪磷、三硫磷、杀螟硫磷、杀扑磷、亚胺硫磷、乙硫磷、倍硫磷、抗蚜威、多菌灵、克百威、速灭威、涕灭威、残杀威、灭多威、叶蝉散和甲萘威,购于北京陆桥技术有限公司; α -乙酸萘酯,购于国药集团上海化学试剂有限公司;秦豆八号,购于西安市种子子公司;植物酯酶,本实验室制备。

1.3 试验方法

1.3.1 农药标品配制

将农药标品配制制成 0.5、0.1、0.02、0.004、0.000 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,用前现配。

1.3.2 α -乙酸萘酯溶液

将 0.5 g α -乙酸萘酯溶于 100 mL 无水乙醇中。

1.3.3 酶液配制

取提取的原酶液 2 mL,于 100 mL 容量瓶定容,稀释 50 倍使用。

1.3.4 测定方法

在试管中依次加入酶液 1.8 mL、不同浓度的农药各 4.6 mL,并以相同体积蒸馏水做空白对照,于室温反应 15 min,使农药可以充分抑制酶活;在各试管中加入底物 α -乙酸萘酯 0.5 mL,每加 1 管立即测其 pH 值(pH_1),记录数据;45℃ 水浴反应 30 min;沸水浴 2 min 灭活;降至室温后测每管的 pH 值(pH_2)。

1.3.5 计算

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_1 - \text{pH}_2$$

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\Delta\text{pH}_{\text{未抑制}} - \Delta\text{pH}}{\Delta\text{pH}_{\text{未抑制}}} \times 100$$

1.3.6 最小检测限确定

以可以检测到的最小 ΔpH 对应的农药浓度为初

第一作者:本科生(李建科教授为通讯作者, E-mail: jiankel@snnu.edu.cn)

收稿日期:2006-03-31, 改回日期:2006-06-06

定检测限,再在此浓度下与空白反应液检测值进行 t 检验,以确定此方法对各种农药的最小检测限。

2 结果与分析

2.1 最佳反应条件的确定

2.1.1 底物与酶最佳配比的选择

根据文献[4]确定 45°C 为反应温度,固定底物用量(5 mg/mL 无水乙醇) 0.5 mL ,蒸馏水 4.6 mL 。根据酶用量与 ΔpH 关系来确定酶与底物的配比。由图 1 可选定酶液(原酶液稀释 50 倍)用量为 1.8 mL 。酶用量继续增大时 ΔpH 变化不明显,不利于实际检测。

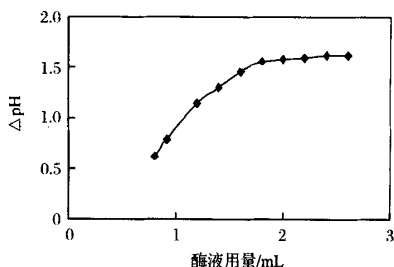


图 1 酶用量与 ΔpH 关系

2.1.2 反应时间的确定

根据上述试验条件,确定反应时间。结果表明, 30 min 后 ΔpH 随时间变化不明显(见图 2),所以选取 30 min 为反应时间。

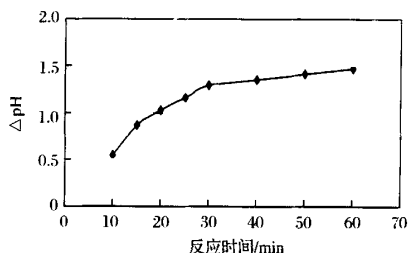


图 2 ΔpH 随时间变化曲线

2.2 方法可行性与灵敏度

在本试验确定的最佳反应条件下测定了 20 种有机磷及 9 种氨基甲酸酯类农药残留,以抑制率对农药浓度的负对数做工作曲线,线性方程及灵敏度见表 1。由表 1 可知,所测农药的浓度与对酶的抑制率之间相关性较好,相关系数都在 0.93 以上,可以满足果蔬中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留快速检测的要求。

分析方法的灵敏度,是指方法本身能测得被测成分的最低限量。一般用最小检出量或最低浓度表示。微量分析方法要求灵敏度越高越好^[4]。

由表 1 可以看出,有机磷农药的灵敏度为 $0.000\ 625\sim0.062\ 5\ \mu\text{g/mL}$,氨基甲酸酯类农药的灵敏度为 $0.015\sim0.312\ 5\ \mu\text{g/mL}$,各种农药的化学结构不同,对酶的抑制能力也不相同。氧化型的有机磷农药抑制能力较强,灵敏度较高,如敌敌畏,灵敏度为 $0.000\ 625\ \mu\text{g/mL}$;硫代型的有机磷抑制能力相对较

表 1 电位法测定各种有机磷及氨基甲酸酯类农药的标准工作曲线及灵敏度¹⁾

农药名称	曲线方程	相关系数	LDC/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	MRL/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
敌敌畏	$y = -0.221x + 0.744\ 6$	0.992 8	0.000 625 ($P < 0.01$)	0.20
甲胺磷	$y = -0.031\ 4x + 0.109\ 8$	0.959 7	0.004 ($P < 0.05$)	0.05
久效磷	$y = -0.384\ 3x + 0.755\ 2$	0.987 8	0.012 5 ($P < 0.01$)	0.05
乙基对硫磷	$y = -0.066\ 1x + 0.255\ 2$	0.981 2	0.000 8 ($P < 0.01$)	0.5
氧乐果	$y = -0.164\ 7x + 0.267$	0.976 9	0.031 25 ($P < 0.01$)	0.20
乐果	$y = -0.205x + 0.275\ 4$	0.934 1	0.062 5 ($P < 0.01$)	1.00
辛硫磷	$y = -0.220\ 6x + 0.761$	0.970 5	0.000 8 ($P < 0.01$)	0.05
甲拌磷	$y = -0.137\ 4x + 0.510\ 2$	0.997	0.004 ($P < 0.01$)	不得检出
马拉硫磷	$y = -0.237x + 0.604\ 7$	0.984 9	0.004 8 ($P < 0.01$)	2.00
甲基对硫磷	$y = -0.060\ 9x + 0.192\ 7$	0.950 7	0.000 8 ($P < 0.05$)	0.10
伏杀磷	$y = -0.142x + 0.199\ 8$	0.989 4	0.062 5 ($P < 0.01$)	1.00
敌百虫	$y = -0.367\ 3x + 0.741$	0.935 3	0.007 8 ($P < 0.01$)	0.10
毒死蜱	$y = -0.115\ 9x + 0.331\ 6$	0.949 5	0.001 6 ($P < 0.05$)	1.00
二嗪磷	$y = -0.142\ 3x + 0.246\ 9$	0.975 1	0.031 25 ($P < 0.01$)	0.50
三硫磷	$y = -0.096\ 3x + 0.173\ 1$	0.945 1	0.031 25 ($P < 0.05$)	未制定
杀螟硫磷	$y = -0.250\ 7x + 0.411$	0.974 8	0.031 25 ($P < 0.01$)	0.50
杀扑磷	$y = -0.286\ 7x + 0.464$	0.995 2	0.031 25 ($P < 0.01$)	2.00
亚胺硫磷	$y = -0.189\ 7x + 0.285\ 7$	0.943 1	0.031 25 ($P < 0.05$)	0.50

续表 1

农药名称	曲线方程	相关系数	LDC/mg·kg ⁻¹	MRL/mg·kg ⁻¹
乙硫磷	$y = -0.1257x + 0.355$	0.956 9	0.001 6 ($P < 0.05$)	0.50
倍硫磷	$y = -0.0334x + 0.0874$	0.904 6	0.2 ($P < 0.05$)	0.05
抗蚜威	$y = -0.1571x + 0.3453$	0.968 8	0.015 ($P < 0.01$)	2.50
甲萘威	$y = -0.1517x + 0.3251$	0.998 2	0.015 ($P < 0.01$)	2.50
克百威	$y = -0.1123x + 0.1732$	0.993 7	0.062 5 ($P < 0.05$)	0.50
速灭威	$y = -0.5797x + 0.3524$	0.988	0.312 5 ($P < 0.01$)	未制定
涕灭威	$y = -0.321x + 0.2403$	0.996 4	0.312 5 ($P < 0.01$)	未制定
残杀威	$y = -0.226x + 0.1462$	0.993 6	0.312 5 ($P < 0.01$)	未制定
灭多威	$y = -0.379x + 0.2279$	0.985 5	0.062 5 ($P < 0.01$)	2.00
叶蝉散	$y = -0.1557x + 0.2368$	0.994 7	0.062 5 ($P < 0.01$)	未制定
多菌灵	$y = -0.112x + 0.1796$	0.996 3	0.062 5 ($P < 0.01$)	0.50

1) y 为抑制率; x 为农药浓度的负对数

弱,如甲胺磷,灵敏度为 0.004 $\mu\text{g/mL}$ 。在这 29 种农药中除了倍硫磷和五个未制定 MRL 之外,其灵敏度都远低于国家规定的最大残留限量(MRL),完全可以满足实际检测的需要。

3 讨论与结论

目前用电位法快速检测有机磷及氨基甲酸酯类农药的研究较少,所选酶源有的是用马血清中提取的乙酰胆碱酯酶^[2],有的用从面粉中提取的植物酯酶^[3,4],本研究是从黄豆中提取植物酯酶,酶源易得活力更高并且稳定。已经研究过的只有几种有机磷农药(敌敌畏,氧乐果,甲基对硫磷,甲胺磷,辛硫磷,久效磷)^[2],并没有有关氨基甲酸酯类的报道。本研

究包括了 20 种有机磷及 9 种氨基甲酸酯类农药,灵敏度也比前者有了较大幅度的提高。

参 考 文 献

- 1 陈万义. 展望 21 世纪的农药[J]. 植物保护, 1998, 24(5): 33~36
- 2 徐 斐, 张慧君, 许学勤. 用于有机磷农药残留检测的植物酯酶筛选[J]. 上海理工大学学报, 2003, 25(2): 109~116
- 3 黄志勇, 袁 园, 吕禹泽. 蔬菜中有机磷农药残留的两种酶抑制快速检测方法的比较研究. 食品科学, 2003, 24(8): 135~137
- 4 邵俊杰主编. 食品分析大全[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 103

Studies on the Sensitivity of Rapid Detection to Organophosphorus and N-methylcarbamate Pesticides by Potentiometry

Min Jianhua Li Jianke Zhu Guiqin He Ting Niu Le

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

ABSTRACT Based on variation of ΔpH values in the reaction of the phytoesterase activity inhibition, a potentiometry method for determining organophosphorus and N-methylcarbamate pesticides was established. The sensitivity of twenty kinds of organophosphorus pesticides and nine kinds of N-methylcarbamate pesticides were determined. The result showed that the LDC of twenty-eight kinds of these pesticides can meet the demand of its MRL standards.

Key words phytoesterase, organophosphorus and N-methylcarbamate pesticides, rapid detection, sensitivity