

## 研究报告 ·

# 酶抑制法检测蔬菜中的有机磷农药

曾小岚<sup>1</sup>, 张 歆<sup>2</sup>, 付东亮<sup>3</sup>, 张 娜<sup>3</sup>

(1. 北京航空航天大学环境工程系, 北京 100083; 2. 北京大学环境工程系, 北京 100871;  
3. 河南省淮阳县环保局, 河南 淮阳 466700)

**摘 要:**对新型酶抑制检测蔬菜中有机磷农药残留量的方法进行了研究,介绍了胆碱酯酶的提取、纯化方法,以及用粗酶和纯酶检测蔬菜中有机磷农药残留量的测定效果,确定了最佳实验条件。对样品的预处理方法进行了改进,得出该法的检测限为 1 mg/L,对甲基对硫磷等几种常用农药的加标回收率为 90.4 %~112 %,相对标准偏差为 1.06 %~9.83 %,表明三项评价指标均符合全国农药残留科研协作组对农药残留分析方法的基本要求。

**关键词:**酶抑制;蔬菜;有机磷农药;检测

**中图分类号:**X835

**文献标识码:**B

**文章编号:**1006-2009(2004)06-0012-03

## To Detect Organophosphorus Pesticide in Vegetable with Enzyme Inhibition Method

ZEN G Xiao-lan<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>2</sup>, FU Dong-liang<sup>3</sup>, ZHANG Na<sup>3</sup>

(1. Environmental Engineering Department, Beihang University, Beijing 100083, China;

2. Environmental Engineering Department, Beijing University, Beijing 100871, China;

3. Huaiyang Environmental Protection Bureau, Huaiyang, Henan 466700, China)

**Abstract:** To study the way to detect organophosphorus pesticide in vegetable with enzyme inhibition method. The extraction and purification of cholinesterase was discussed. The detection effect which use unpurified and purified cholinesterase was studied. Also the sample pretreatment methods was improved. This detection method's detection limit was 1 mg/L, sample recovery rate was 90.4 %~112 %, relative standard deviation was 1.06 %~9.83 %.

**Key words:** Enzyme inhibition; Vegetable; Organophosphorus pesticide; Detection

用酶抑制法检测有机磷农药 (Ops) 快速、简便,已得到日益广泛的应用。大部分酶抑制法均基于胆碱酯酶被有机磷农药抑制的原理,但胆碱酯酶需从动物体或血液中提取,价格昂贵<sup>[1,2]</sup>,也可用植物酶测定,但酶液保存期短,且底物和显色剂混合成的溶液不稳定<sup>[3]</sup>。碘化硫代乙酰胆碱与胆碱酯酶的产物可以使 2,6-二氯酚钠溶液退色,退色程度与胆碱酯酶活性正相关。当样品提取液中存在一定量的有机磷农药时,酶活性受到抑制,吸光度较高,吸光度与农药残留量也呈正相关。另外,样品提取液用氧化剂氧化,可提高某些有机磷农药的抑制率。

### 1 实验

#### 1.1 主要仪器和试剂

UV-VIS 7501 紫外/可见分光光度计,梯度混合器,自制柱层析系统,蠕动泵;底物溶液:1g 碘化硫代乙酰胆碱加 pH 7.73 磷酸盐缓冲溶液溶解并定容至 50 mL;显色剂:0.04 g 2,6-二氯酚钠加去离子水溶解并定容至 100 mL;胆碱酯酶液:面粉溶液经振荡、静置、离心后将上清液浓缩至 20 mL (粗提液,粗酶),再以 pH 6.0 磷酸盐缓冲液为流动相,用柱层析系统及梯度混合器对粗提液做

收稿日期:2004-04-02;修订日期:2004-10-10

作者简介:曾小岚(1963-),女,四川重庆人,副教授,在读博士生,从事环境监测研究工作。

梯度洗脱,流出液冷冻干燥成粉(细酶)。取酶粉 0.2 g 加 10 mL pH 7.73 磷酸盐缓冲液溶解,即得胆碱酯酶液;氧化剂:0.5 %次氯酸钙溶液;还原剂:10 %亚硝酸钠溶液;pH 6.0 和 pH 7.73 磷酸盐缓冲液;农药标准储备液:甲基对硫磷、敌敌畏、乐果、氧化乐果和敌百虫农药标准储备液各若干支(100 mg/L),使用时用丙酮稀释成 20 mg/L。

## 1.2 农药标样的定量检测方法

采用外标法分别对上述 5 种农药进行定量分析,移取 20 mg/L 农药标样 0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL 和 0.8 mL 至 6 只 2 mL 容量瓶,加 0.3 mL pH 7.73 磷酸盐缓冲液和 0.1 mL 氧化剂,摇匀,静置 10 min,加还原剂 0.3 mL,酶液 0.2 mL,摇匀,加底物溶液 0.2 mL,显色剂 0.1 mL,静置 5 min,用 pH 7.73 磷酸盐缓冲液定容至 2 mL,在 600 nm 波长下测定并记录吸光值。将所得吸光值对相应农药浓度作图,即得到每种农药样品的标准工作曲线。

## 1.3 样品检测方法

样品制备:新鲜蔬菜样品擦去表面泥水,取代表性食部 2 g,剪碎,盛于小烧杯中,加 5 mL 丙酮浸泡 5 min,其间不时振摇,加入 0.2 g 氧化钙,调节溶液 pH 值,对于番茄等酸性较强的样品可增加碳酸钙用量。若溶液颜色较深,可加 0.2 g 硅藻土去除叶绿素和其他杂质,充分搅拌。将溶液过滤,为保证有机磷农药能全部随滤液流出,可用适量丙酮继续冲洗滤渣,收集所有滤液。用氮气流吹试样,浓缩溶液体积至 1 mL 以内,作为样品待测。

样品检测:同定量分析中操作步骤,将样品溶液经氧化、酶解后,在 600 nm 波长下测定吸光值,与标准工作曲线对照计算,确定样品的农药浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准工作曲线

以农药样品敌敌畏为例,用各浓度标样吸光值对敌敌畏浓度作图,该曲线相关系数  $r$  为 0.997 6。以同样方法测定甲基对硫磷、乐果、氧化乐果和敌百虫,其相关系数分别为 0.982 3, 0.922 3, 0.964 5, 0.978 5,表明均具有良好的线性关系。

### 2.2 反应条件的优化

#### 2.2.1 溶液 pH 值

溶液 pH 值对酶的活性影响很大,pH 值过高或过低均会使酶的活性降低,从而对反应产生影

响。现用 pH 为 7.73 (20 °C) 的磷酸盐缓冲液保持反应环境的 pH 值。

#### 2.2.2 磷酸盐缓冲液的用量

随着磷酸盐缓冲液用量的增加,有机磷农药对胆碱酯酶的抑制率也有所增加,但并不呈线性,且增加幅度不大,当用量增加到一定程度后,抑制率不再提高。因此,该实验选择 pH 7.73 的磷酸盐缓冲液作为定容及参比溶液,既能使反应充分,又能降低对吸光值影响的程度。

#### 2.2.3 反应时间

有机磷农药对胆碱酯酶的抑制需要一定的反应时间,抑制作用是逐渐增强,但 10 min 后,抑制作用不再增强。因此,该实验选择的反应时间为 10 min,即在向溶液中加入还原剂和酶液后,静置 10 min。

#### 2.2.4 检测时间

为了确定检测的最佳时间,用分光光度计对加入显色剂后的溶液进行时间扫描,以 pH 7.73 的磷酸盐缓冲液为参比溶液,选择取样速度为 60 次/min,扫描时间为 15 min。对农药含量及种类不同的标样均进行扫描。以含量 12  $\mu$ g 的敌敌畏标样为例,其时间扫描曲线见图 1。

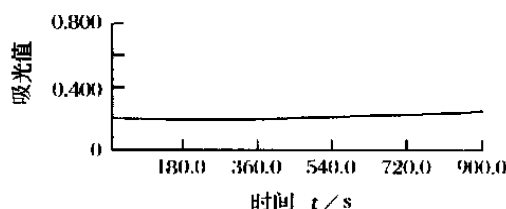


图 1 敌敌畏标样时间扫描

由图 1 可见,8 min 后吸光值逐渐增大,但 5 min 左右吸光值最稳定,基本上呈直线。因此,该实验选择加入显色剂后 5 min 测定吸光值。

#### 2.2.5 纯酶与粗酶的比较

该实验将直接从振荡、离心过的面粉溶液得到的胆碱酯酶粗提液进行了纯化处理,并对纯酶和粗酶的反应结果进行了比较。

##### 2.2.5.1 对测定时间的影响

用粗酶对含 16  $\mu$ g 敌敌畏的标样进行反应测定和时间扫描,测定结果见图 2。

由图 2 可见,粗酶与纯酶溶液的反应趋势相同,加入显色剂后 5 min 左右,吸光值变化不大,所以,最佳测定时间定为 5 min。

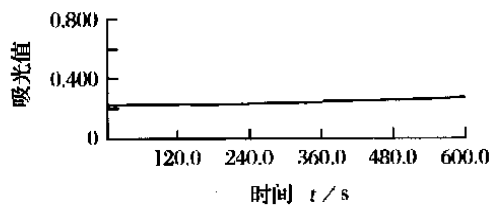


图 2 敌敌畏与粗酶反应时间扫描

2.2.5.2 酶反应灵敏度的比较

该实验用粗酶对敌敌畏、乐果两种农药进行了标准曲线测定,相关系数分别为 0.989 4、0.998 1。但与纯酶相比,使用粗酶测得的吸光值偏低,表明粗酶与农药反应不充分,活性不能被农药完全抑制,并且吸光值低也会影响测定结果的灵敏度和准确性。因此,建议在检测过程中使用经过提纯的酶。

2.2.6 样品预处理方法

2.2.6.1 吸附剂的选择

为减少叶绿素对测定影响,首先依据 GB/T 18630-2002《蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯农药残留量的简易检测方法 酶抑制法》(国标方法),用活性炭去除叶绿素,但结果并不理想,因为增加活性炭用量时,活性炭的黑色使溶液颜色加深,无法观察退色情况。用硅藻土对比实验,结果表明,在相同用量下,硅藻土去除叶绿素效果较好,处理过的样品溶液能进行正常的酶抑制反应。但对于叶绿素含量过高的蔬菜(如韭菜)的测定结果仍偏高。

2.2.6.2 待测样品体积的确定

进行样品预处理时,国标方法要求用 5 mL 丙酮从 2 g 蔬菜样品中萃取农药,经调节 pH 值、去除叶绿素后过滤,取 0.5 mL 滤液测定。但丙酮易挥发,可造成萃取液的体积改变,也就无法准确测定样品中农药总量,导致测定结果偏差较大。因此,该实验改进了样品预处理方法:(1)用丙酮冲洗滤渣,收集所有滤液,避免农药残留;(2)用氮气加速丙酮挥发,浓缩滤液至一定体积后再测定。用两种预处理方法测定菜花的结果见表 1。

表 1 两种样品预处理方法测定菜花中农药的结果比较

| 预处理方法             | 样品<br>m/g | 吸光值   | 最低测定值<br>w/(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|-----------|-------|-----------------------------------|
| 国标方法 <sup>①</sup> | 2         | 0.116 | 19                                |
|                   |           | 0.137 | 24                                |
| 改进方法              | 2         | 0.126 | 2.2                               |

① 为平行样测定,农药浓度以所测样品浓度的 10 倍定量。

表 1 可见,两种样品预处理方法的测定结果差异很大,国标法处理的样品结果,由于待测样品体积定量不准确,造成不确定性较大,相比之下,采用改进预处理方法的样品测定结果更为准确、可靠。

2.2.7 样品检测结果

按照改进的样品预处理和检测方法,对以下几种蔬菜样品(样品质量均为 2 g)进行检测,检测结果与 GB 18406.1-2001《农产品安全质量无公害蔬菜安全要求》的相关规定进行了比较,见表 2。

表 2 蔬菜样品的最低农药浓度测定结果<sup>①</sup>

| 样品                              | 菜花    | 韭菜    | 白菜    | 豌豆    | 冬瓜    | 土豆    | 卷心菜   |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 吸光值                             | 0.126 | 0.630 | 0.051 | 0.136 | 0.055 | 0.044 | 0.052 |
| 测定值<br>w/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 2.2   | 8.7   | ND    | 2.3   | ND    | ND    | ND    |

① 为从 5 种农药样品标准曲线计算结果中取得的最小值;ND(未检出)为该样品吸光值低于各种农药检测限对应的吸光值。

从表 2 可以看出,大部分蔬菜中有机磷农药残留量均能达到国家标准要求,其中韭菜和豌豆的测定结果超标主要是叶绿素影响,导致吸光值偏大。

3 结论

根据全国农药残留科研协作组对农药残留分析方法的基本要求,采用胆碱酯酶抑制法测定有机磷农药的检测限为 1 mg/L;对甲基对硫磷、敌敌畏、乐果、氧化乐果和敌百虫 5 种农药样品加标回收率为 90.4 %~112 %;相对标准偏差为 1.06 %~9.83 %,3 项评价指标均符合全国农药残留科研协作组的相关规定。

该方法测定蔬菜中有机磷农药快速、准确,从面粉中提取胆碱酯酶简便、成本低。用纯化的胆碱酯酶分析样品,可以提高样品测定结果的灵敏度和准确性,改用硅藻土脱色,能够去除样品中叶绿素颜色的影响。

[参考文献]

[1] 韩承辉,王乃岩,王正萍. 植物酯酶片快速测定蔬菜上有机磷农药[J]. 环境监测管理与技术,1999,11(4):29-30.  
[2] 钟树明,袁东星,金晓英,等. 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[J]. 环境化学,2002,21(2):189-193.  
[3] 侯明迪. 植物酯酶法快速测定有机磷农药残留的研究[J]. 食品科学,2002,23(7):111-115.