

蔬菜有机磷农药残留检测试剂包检测条件的优化^{*}

王小瑜 王相友 孙霞 孙冬霞

【摘要】 以商品化的乙酰胆碱酯酶试剂包为研究对象,比较了不同用量乙酰胆碱酯酶、底物和显色剂下的抑制率,并在此基础上进行了正交试验。在保证一定检测精度的前提下确定了酶用量为推荐用量的3/4,底物用量为推荐用量的3/4,显色剂用量为推荐用量的1/2,降低了检测成本。通过 F 检验证明,调整后配方和原配方之间无显著性差异。在此条件下,氧乐果、敌百虫和敌敌畏的检测限大约分别为0.37 mg/L、0.09 mg/L和0.035 mg/L,与原配方一致。

关键词: 蔬菜 农药残留 乙酰胆碱酯酶 检测

中图分类号: X835; S481⁺.8 **文献标识码:** A

Optimization of Determination for Pesticide Residues in Vegetables

Wang Xiaoyu¹ Wang Xiangyou¹ Sun Xia¹ Sun Dongxia²

(1. Shandong University of Technology 2. Binzhou Institute of Agricultural Machinery)

Abstract

The optimization of determination for organophosphate pesticide residues in vegetables was studied. In the promise of higher sensitivity, a new low cost reagent components, whose dosage of acetylcholinesterase (AChE), substrate and chromogenic reagent were 3/4, 3/4 and 1/2 that of original components respectively, thus saved cost of reagent. The result was achieved through contrastive test. F -test proved that there was no significant difference between adjusted components and original components. The lower limit of determination of adjusted components to three pesticides is omethoate 0.37 mg/L, trichlorphon 0.09 mg/L, dichlorvos 0.035 mg/L, which is consistent with those of national standard rapid determination method.

Key words Vegetables, Pesticide residues, AChE, Detection

引言

有机磷和氨基甲酸酯类农药是我国应用最为广泛的两种农药,也是目前农药残留检测的重点^[1]。其检测方法主要是仪器分析法^[2~3],该法灵敏度高、成本高、消耗时间长、且需要有熟练操作人员和分析仪器,不能满足现场快速测试的要求。酶抑制法作为有机磷农药残留的主要速测方法,具有简便、快速及成本低廉等优点,深受广大基层监督部门、生产基地及市场的欢迎^[4~5]。随着酶抑制法

技术的发展,近年来出现了商品化的乙酰胆碱酯酶试剂包^[6],但检测成本仍然较高。本文针对商品化的乙酰胆碱酯酶试剂包进行优化研究,在保证检测灵敏度的条件下,减少试剂用量,以降低成本。

1 材料与方法

1.1 原理

依据为国家标准 GB/T 5009.199—2003 中的乙酰胆碱酯酶(AChE)检测体系^[7]。乙酰胆碱酯酶催化硫代乙酰胆碱(ATCh,底物)水解为硫代胆碱

收稿日期: 2007-03-22

^{*} 山东省教育厅科技计划资助项目(项目编号:J07YF11)

王小瑜 山东理工大学轻工与农业工程学院 硕士生, 255049 淄博市

王相友 山东理工大学轻工与农业工程学院 教授 博士生导师 通讯作者

孙霞 山东理工大学轻工与农业工程学院 讲师 博士生

孙冬霞 山东省滨州市农机所 研究实习员, 256616 滨州市

和乙酸,硫代胆碱和二硫代二硝基苯甲酸(DTNB,显色剂)产生显色反应(黄色),在波长为412 nm处有最大吸收峰。在没有有机磷和氨基甲酸酯类农药存在时,底物的水解速率用吸光度值随时间的变化率,即空白斜率以 K_0 表示;当有农药存在时,体系的反应速率,即农药斜率以 K_t 表示,则有机磷和氨基甲酸酯类农药对酶的活性的抑制率为 $Y = \frac{K_0 - K_t}{K_0} \times 100\%$ 。不同种类、不同浓度的农药对应的抑制率不相同,以此可以建立农药残留量和酶活性抑制率之间的对应关系,从而定量测定农药残留量。

1.2 仪器和试剂

UV-1700型紫外可见分光光度计,日本岛津有限公司;DK-98-I型电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;移液枪。

乙酰胆碱酯酶试剂包,上海诺亚威生物技术有限公司。

农药氧乐果、敌敌畏、敌百虫,山东大成农药股份有限公司。

试剂包原配方:将提取液粉剂中加入510 mL蒸馏水充分溶解,显色剂中加入32 mL提取液,酶液中加入2.6 mL提取液,底物中加入2.6 mL蒸馏水。空白操作方法:2.5 mL提取液中加入0.1 mL酶和0.1 mL显色剂,30℃培养15 min,然后加0.1 mL底物,于波长412 nm处比色。样品操作方法:2.5 mL农药溶液中加入0.1 mL酶和0.1 mL显色剂,30℃培养15 min,然后加0.1 mL底物,于波长412 nm处比色。

2 结果和讨论

2.1 单因素试验

分别改变pH值、酶、底物和显色剂用量,测定抑制率,操作方法与前相同,平行做2组($n=2$),研究各因素对测量结果的影响。

2.1.1 pH值

试剂采用原配方,使用不同pH值的磷酸盐溶液作溶剂,农药为1.04 mg/L的氧乐果溶液。试验结果如表1所示。试验结果表明,乙酰胆碱酯酶反应体系在pH值为8时抑制率最高,相同质量浓度的农药溶液对酶的抑制率越高,说明体系的反应越灵敏。因此,以下的试验仍采用pH值为8的磷酸盐缓冲溶液作为提取液。

2.1.2 酶用量

将原配方酶液和底物稀释,质量浓度均为原配方的40%,显色剂浓度不变;农药为0.926 mg/L的

氧乐果溶液,提取液作溶剂。酶液用量对抑制率影响如表2所示。

表1 pH值对抑制率影响($n=2$)

Tab.1 Effect of pH on inhibition rate($n=2$)

参数	pH值				
	4.8	5.9	6.9	8.0	9.0
空白斜率 K_0	0.071 4	0.032 0	0.126 7	0.154 0	0.056 1
农药斜率 K_t	0.069 1	0.028 7	0.068 4	0.051 2	0.092 0
抑制率 $Y/\%$	3.2	10.3	46.1	66.8	30.1

表2 酶液用量对抑制率影响($n=2$)

Tab.2 Effect of enzyme dosage on inhibition rate($n=2$)

参数	酶液用量/mL				
	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
空白斜率 K_0	0.029 7	0.045 1	0.087 1	0.125 0	0.143 1
农药斜率 K_t	0.014 5	0.022 3	0.042 0	0.061 5	0.071 4
抑制率 $Y/\%$	51.2	50.6	51.7	50.8	50.1

试验结果表明,随着酶液用量的增加,空白溶液与农药的斜率都呈上升趋势,但抑制率没有明显的变化。斜率增大可以增加灵敏度,但相应的试剂费用也会增加。

2.1.3 底物用量

将原配方酶液和底物稀释,质量浓度均为原配方的40%,显色剂浓度不变;农药为0.926 mg/L的氧乐果溶液,提取液作溶剂。试验结果如表3所示。

表3 底物用量对抑制率影响($n=2$)

Tab.3 Effect of substrate dosage on inhibition rate($n=2$)

参数	底物用量/mL					
	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.40
空白斜率 K_0	0.075 4	0.099 1	0.123 5	0.136 8	0.141 0	0.145 1
农药斜率 K_t	0.039 5	0.046 1	0.065 3	0.068 1	0.069 9	0.071 1
抑制率 $Y/\%$	47.6	53.4	47.1	50.2	50.4	50.9

结果表明,随着底物用量的增加,空白斜率与农药斜率都呈上升趋势,但抑制率没有明显的变化。

2.1.4 显色剂用量

原配方酶液、底物、底物稀释,质量浓度均为原配方的40%;农药为0.926 mg/L氧乐果溶液,提取液作溶剂。试验结果如表4所示。

表4 显色剂用量对抑制率影响($n=2$)

Tab.4 Effect of chromogenic reagent dosage on inhibition rate($n=2$)

参数	显色剂用量/mL				
	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
空白斜率 K_0	0.101 3	0.106 9	0.103 5	0.099 8	0.108 3
农药斜率 K_t	0.051 0	0.052 4	0.051 7	0.048 8	0.054 1
抑制率 $Y/\%$	49.6	51.0	50.0	51.0	50.0

结果表明, 试验范围内显色剂用量的改变对空白斜率和抑制率都没有影响。0.25 mL 的显色剂用量相当于原配方的用量, 和 0.10 mL 的数据比较, 表明原配方的显色剂用量远远过量, 其用量可以减少为原配方的 1/2 甚至更低。考虑到显色时间和不同人员操作时间的要求, 显色剂用量也不易降低过多, 因此初步确定调整显色剂用量为原配方的 1/2。

2.2 正交试验

在单因素试验的基础上同时改变酶液和底物用量, 进行正交试验, 以确定一种可行的配方。其中, 显色剂用量全部为原配方的 1/2, 农药为高、中、低 3 种质量浓度的氧乐果溶液(分别为 1.856 mg/L、0.926 mg/L 和 0.463 mg/L)。试验平行做 2 组 ($n=2$)。正交试验因素水平如表 5 所示。

表 5 正交试验表因素水平表

Tab.5 Table of factors and levels of orthogonal experiment

水平	酶液浓度 M	底物浓度 D	氧乐果质量浓度 N/mg·L ⁻¹
1	原配方	原配方	0.5
2	原配方 3/4	原配方 3/4	1.04
3	原配方 1/2	原配方 1/2	1.856

操作方法与前相同。试验结果如表 6 所示。

试验结果表明, 对于同一质量浓度农药, 不同试剂配方其抑制率变化不大。因此, 在测量光源足够稳定的前提下, 完全可以降低 3 种试剂的用量。对

表 7 试剂配方调整前后的精密度对比

Tab.7 Precision contrast between adjusted components and original components

K ₀	氧乐果质量浓度/mg·L ⁻¹							
			0.463		0.926		1.856	
	调整前	调整后	调整前 Y/%	调整后 Y/%	调整前 Y/%	调整后 Y/%	调整前 Y/%	调整后 Y/%
0.126 8	0.087 9		33.4	32.7	49.3	51.3	71.7	73.1
			35.3	28.9	52.6	54.4	74.4	74.2
			30.3	34.2	51.6	53.9	72.7	75.0
			29.2	29.8	52.9	55.2	75.3	72.5
			36.4	27.7	48.6	50.8	73.6	75.7
			35.4	28.8	53.3	54.3	74.2	73.6
			32.6	30.1	53.0	53.6	75.0	76.2
			34.0	34.9	49.6	54.0	72.0	73.7
			36.8	34.3	52.3	50.9	73.8	74.9
			37.3	33.6	51.7	54.2	72.2	75.6
均值		34.1	31.5	51.5	53.3	73.5	74.5	

从 F 检验的计算结果来看, 3 组 F 值(1.02、1.11 和 1.09)均小于标准值 3.23(置信度 95%), 因此配方调整前后在精密度上没有显著性差异。

2.4 检测限确定

用调整后配方重复测定 8 组空白溶液(即不含农药的提取液)的反应斜率, 计算平均值并作为空白

表 6 不同酶液和底物用量配比的比较 ($n=2$)

Tab.6 Comparison of chromogenic reagent dosages($n=2$)

序号	因素			K ₀	K _t	Y/%
	M	D	N			
1	1	1	1	0.125 1	0.081 6	33.8
2	1	2	2	0.081 6	0.040 5	50.4
3	1	3	3	0.077 1	0.021 5	72.1
4	2	1	2	0.066 3	0.028 5	57.0
5	2	2	3	0.059 5	0.019 6	67.0
6	2	3	1	0.042 1	0.030 6	27.4
7	3	1	3	0.040 1	0.014 6	63.6
8	3	2	1	0.035 2	0.025 5	27.6
9	3	3	2	0.036 3	0.017 9	50.7

于农药残留快速检测体系, 当抑制率 $Y=50\%$ 时, 只要 Y 的相对误差小于 10% 即可, 因此当 $K_0 > 0.062$ 即满足要求。所以, 正交试验序号为 1、2、3 和 4 的配方可用, 序号为 5 的配方也可考虑。综合考虑, 初步选定序号为 5 的配方作为优化调整后配方, 即酶和底物用量为原配方的 3/4, 显色剂用量为原配方的 1/2。

2.3 精确度验证

操作方法: 在其他条件相同的情况下, 用 2 种配方分别测量 10 组空白和 10 组高、中、低不同质量浓度氧乐果农药在 3 min 内吸光度随时间的变化, 计算斜率、抑制率, 利用 F 检验法分析调整前、后 2 种配方在精密度上有无显著性差异。结果如表 7 所示。

K_0 值, 估算出 8 组空白样品的抑制率 Y 值, 然后计算 Y 的平均值和标准偏差 S , 则 Y 的检测限 $D_L = Y + 3S$, Y 的测定下限 $R = Y + 10S$, 测定结果如表 8 所示。经计算得, $S = 2.21\%$, $D_L = 7.54\%$, $R = 23.0\%$ 。

根据每种农药质量浓度与抑制率的实际测定值

表8 调整后配方的测定结果

Tab.8 Lower limit of determination of adjusted components

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	均值
斜率 K_0	0.089 2	0.085 5	0.084 7	0.085 9	0.087 8	0.084 1	0.089 8	0.083 5	0.086 3
抑制率 $Y/\%$	-2.20	-0.93	1.85	0.46	-1.74	2.55	4.06	3.24	0.91

可以估算出每种农药的检测下限。

2.4.1 氧乐果的检测限

经测定,0.5 mg/L 氧乐果的抑制率为 31.6%, 大于 23.0%, 而 0.125 mg/L 的氧乐果的抑制率为 16.3%, 因此氧乐果农药的定量测定下限约为 0.37 mg/L。

2.4.2 敌百虫的检测限

配制一系列敌百虫农药标准溶液,测其 15 min 内对乙酰胆碱酯酶的抑制率,平行做 2 组 ($n = 2$)。试验结果如表 9 所示。

表9 不同质量浓度敌百虫溶液的抑制率 ($n = 2$)Tab.9 Inhibition rate of different concentrations of trichlorphon ($n = 2$)

敌百虫质量浓度/mg·L ⁻¹	农药斜率 K_t	抑制率 $Y/\%$
0.018	0.040 3	10.4
0.036	0.039 9	16.0
0.072	0.038 7	19.4
0.108	0.233 0	37.8
0.117	0.022 7	52.8
0.414	0.014 0	70.8

因 37.8% > 23.0% > 19.4%, 所以敌百虫的测定下限在 0.072 ~ 0.108 mg/L 之间,估算大约为 0.090 mg/L。

2.4.3 敌敌畏的检测限

配制一系列敌敌畏农药标准溶液,测其 15 min

内对乙酰胆碱酯酶的抑制率,平行做 2 组 ($n = 2$)。试验结果如表 10 所示。

表10 不同质量浓度敌敌畏溶液的抑制率 ($n = 2$)

Tab.10 Inhibition rate of different concentrations of dichlorvos

敌敌畏质量浓度/mg·L ⁻¹	农药斜率 K_t	抑制率 $Y/\%$
0.032	0.031 3	18.9
0.048	0.023 7	38.8
0.096	0.016 3	57.7
0.136	0.015 0	61.2
0.176	0.011 3	70.7

由表 10 可以看出,敌敌畏的定量测定下限在 0.032 ~ 0.048 mg/L 之间,估算约为 0.035 mg/L。

3 结束语

通过对上海商品化试剂包的优化研究,在保证较高灵敏度的前提下,确定了一种更经济的试剂配方,即酶和底物的用量为推荐用量的 3/4,显色剂用量为推荐用量的 1/2,总体上节约了一定的成本。通过 F 检验证明,调整后配方和原配方之间无显著性差异。调整后配方对 3 种常见有机磷农药氧乐果、敌百虫和敌敌畏的检出下限大约分别为 0.37 mg/L、0.09 mg/L 和 0.035 mg/L,检测限基本不变。

参 考 文 献

- 林玉锁. 农药环境污染调查与诊断技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- 刘云国, 林东风, 李八方, 等. 食品中农药及药物残留检测技术研究进展[J]. 海洋水产研究, 2004, 25 (2): 83~87.
- Aprea C, Colosio C, Mammone T, et al. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 769(5): 191~219.
- 刘永杰, 张金振, 曹明章, 等. 酶抑制法快速检测农产品农药残留的研究与应用[J]. 现代农药, 2004, 3 (2): 25~27.
- Lee H S, Kim Y A, Cho Y A, et al. Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by cholinesterase-based biosensor[J]. Chemosphere, 2002, 46(4): 571~576.
- 高晓辉. 蔬菜上农药残毒快速检测技术——酶抑制法检测有机磷和氨基甲酸酯类农药[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(4): 29~31.
- GB/T 5009.199—2003 蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留量快速检测[S].