

酶抑制法检测4种辛辣蔬菜农药残留 假阳性消除的研究

桑园园¹, 柴丽娜², 魏朝俊², 郑志琴¹, 万善霞³

(¹北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; ²北京农学院基础教学部, 北京 102206

³北京农学院生物技术系, 北京 102206)

摘要: 选用实际检测中易出现假阳性现象的韭菜、蒜苗、蒜黄、大蒜4种蔬菜为材料, 利用酶抑制法检测农药残留, 并对样品前处理步骤进行改进, 增加了对样品提取液加热处理, 达到消除假阳性的目的。结果表明, 对样品提取液进行适当加热可以起到消除假阳性的作用, 且不会造成残留农药的损失。蒜苗、蒜黄、大蒜、洋葱的最佳处理温度分别为110℃, 100℃, 120℃, 80℃, 在达到相应最佳消除温度后, 假阳性影响消失, 且加热时间对假阳性影响不显著。笔者认为, 辛辣蔬菜中含有的某种特殊物质可能抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 使其不能与底物充分结合, 从而干扰检测结果, 产生假阳性现象。经过加热处理后, 可能使蔬菜样本内某种物质分解, 乙酰胆碱酯酶的活性不再被抑制, 假阳性现象得以消除。

关键词: 酶抑制法; 假阳性; 辛辣蔬菜

中图分类号: S481+.8 文献标识码: A

Study on Eliminating False Positive Results of Pesticide Residues in Four Acrid Vegetables With Enzyme Inhibition Assay

Sang Yuanyuan¹, Chai Lina², Wei Chaojun², Zheng Zhiqin¹, Wan Shanxia³

(¹Department of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206;

²Department of Basic Sciences, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206;

³Department of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract: False positive results in leek, garlic bolt, blanched garlic leaves, and garlic during detecting actually make negative effects to detective results. In this study, the main treatment was applied to eliminate the false positive results of pesticide residue in leek, garlic bolt, blanched garlic leaves, and garlic, so the sample preparation procedure was improved and the results showed that the test sample was heated in one minutes, can decrease the false positive result. False positive results would disappear under the appropriate heating temperature, which was 110℃, 100℃, 120℃, and 80℃ for the materials of garlic bolt, blanched garlic leaves, garlic, and leek respectively, the time of heating has little effect to false positive results. The substance of acrid vegetable would restrain the vitality of enzyme and cause the false positive results. By heating, it would decompose and false positive results would disappear.

Key words: enzyme inhibition assay, false positive results, acrid vegetable

基金项目: 北京市教委资助项目“酶抑制法检测辛辣蔬菜农药残留时假阳性问题的研究”(M200810020014); 北京农学院资助项目“酶抑制法检测辛辣蔬菜农药残留时假阳性问题的研究”(06-JC-JC-06); 北京主要农用投入品检测技术研究与应用资助项目(Z09060500600906)。

第一作者简介: 桑园园, 女, 1984年出生, 北京人, 硕士研究生, 主要从事果蔬农药残留检测方面的研究, E-mail: sangyuanyuan1004@yahoo.com.cn。

通讯作者: 柴丽娜, 女, 1959年出生, 辽宁大连人, 副教授, 主要从事果蔬农药残留检测方面的研究。通信地址: 102206 北京市昌平区德胜门外北农路7号, 北京农学院基础教学部, E-mail: chailina88558@yahoo.com.cn。万善霞, 女, 1963年出生, 河北衡水人, 副教授, 主要从事酶学方面的研究, E-mail: wanshanxia@sina.com。

收稿日期: 2009-03-25, 修回日期: 2009-04-16。

0 引言

随着人们的生活水平不断提高和经济全球化日益突显,21世纪中国农业将由数量型向质量型转变^[1],对农产品的安全生产和质量监控将更加严格。防止农药残留对人体的危害除了严格禁止高毒、高残留农药的使用和严格控制农药的用量外,加强对农药残留的快速检测也是控制农药使用的有效手段^[2]。近些年,随着农药残留检测技术的不断发展和加强监管力度,农药中毒事件已得到有效地控制。常用农药中,对高等动物毒性较大,容易引起中毒的是杀虫剂,而在杀虫剂中引起中毒事件最多的是有机磷和氨基甲酸酯类农药^[3-5],且这两类农药在实际生产中使用频率较高,这就对有机磷和氨基甲酸酯类农药的快速检测提出了更高的要求。目前,常用的有机磷和氨基甲酸酯类农药检测方法有仪器分析法、酶抑制法、生物传感器法、免疫分析法等等^[6]。其中,酶抑制法以准确性高、检测速度快、操作简单、成本低等优点得到广泛应用。但是,使用此种方法检测某些蔬菜、水果中农药残留的时候,会出现假阳性现象^[7],干扰检测结果,给农产品质量安全的监管增加难度。使用酶抑制法快速检测韭菜、蒜苗等辛辣蔬菜时,产生严重的假阳性反应^[8-9]。滕崑^[10]等提出用酶抑制法测定蔬菜中农药残留时韭菜、茭白、萝卜等样品经常出现假阳性结果。李治祥^[11]等研究指出,芹菜、韭菜、洋葱等有刺激性气味的蔬菜对检测结果有干扰作用,造成检测结果假阳性。检测菌类蔬菜(如蘑菇)时也有假阳性现象的产生。葛静^[12]等人已经对韭菜中农药残留酶速测法假阳性消除进行了研究,笔者基于前人的研究成果,对酶抑制法快速检测蒜苗、蒜黄、大蒜、韭菜时的前处理进行了改进研究,力求消除假阳性影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 蒜苗、蒜黄、大蒜、韭菜。

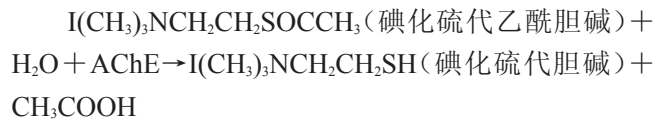
1.1.2 仪器 GDYQ-601M 食品安全快速分析仪(文章中简称速测仪。长春吉大小天鹅仪器有限公司生产);GDYQ-706S 食品检测快速分离仪;GDYQ-702S 食品检测快速恒温加热仪;GDYQ-705S 食品检测快速超声提取仪;电子天平:准确度0.1 g(上海精密科学仪器有限公司);移液枪:2~100 μ l, 1000~5000 μ l(德国Eppendorf公司);其他玻璃仪器。

1.1.3 试剂 磷酸盐缓冲液(pH 7.5),酶为乙酰胆碱酯酶,底物为碘化硫代乙酰胆碱,显色剂为碘化硫代胆碱与5,5-二硫代-2,2-二硝基苯甲酸(DTNB)。农药标准品:异丙威(叶蝉散)、敌敌畏、甲萘威(西维因),全部为农业部环境保护科研监测所提供。试验于2008年6月

—2009年3月在北京农学院化学实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 检测原理 虽然有机磷和氨基甲酸酯类农药种类繁多,但是其作用原理是相似的:都是抑制昆虫中枢和周围神经系统中乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性,使其不能水解神经传导介质——乙酰胆碱,造成乙酰胆碱的积累,影响正常传导,使昆虫抽搐,中毒死亡。利用如下反应可以测定乙酰胆碱酯酶被抑制的程度:



碘化硫代胆碱与5,5-二硫代-2,2-二硝基苯甲酸(DTNB)作用生成5-巯基-2-硝基苯甲酸(黄色),用溶液吸光度(特定波长412 nm)测出乙酰胆碱酯酶的催化活度^[4]。根据吸光度值的变化可以判断乙酰胆碱酯酶受到抑制的程度,从而推断残留农药是否超标。

1.2.2 常规检测步骤 将样品(蒜苗、蒜黄、大蒜、韭菜)切碎,切碎长度在1~1.5 cm(由于中华人民共和国农业行业标准NY/T 448-2001:蔬菜上有机磷和氨基甲酸酯类农药残留快速检测方法已严格规定了取样大小,所以笔者不再对取样长度对抑制率的影响进行研究),取2 g样品放入提取瓶中,加入10 ml磷酸盐缓冲溶液,使所有样品都浸在溶液中,超声提取6 min,取出提取瓶,将上清液倒入离心管中,离心2 min,取出静置,用移液枪吸取上清液4 ml于比色瓶中,分别向比色瓶中加入酶和显色剂各100 μ l,摇匀,将比色瓶放入速测仪中恒温培养10 min(培养温度37~38 $^{\circ}$ C),培养结束后取出比色瓶并加入100 μ l底物,继续放入速测仪中显色3 min,测定抑制率。

1.2.3 前处理方法的优化试验 将1.2.2经过超声提取后的样品上清液置于恒温加热仪中加热,(只加热上清液的目的是避免加热时蔬菜组织中其他物质对试验结果造成影响),由试验筛选出4种辛辣蔬菜假阳性消除的最佳温度和最佳时间。其他操作步骤同1.2.2。

1.2.4 蔬菜样品中农药添加回收试验 将样品(蒜苗、蒜黄、大蒜、韭菜)切碎,切碎长度在1~1.5 cm,取2 g样品分别放入提取瓶中,添加不同浓度的农药标样,静置15 min,加入10 ml磷酸盐缓冲溶液,使所有样品都浸在溶液中,超声提取6 min,取上清液加热。再将不同种类的蔬菜样品提取液加热。(加热温度和加热时间均由1.2.3试验决定)。加热后取出冷却至室温,将上清液倒入离心管中,离心2 min,取出静置,用移液枪吸取上清液4 ml于比色瓶中,分别向比色瓶中加入酶和显色剂各100 μ l,摇匀,将比色瓶放入速测仪中恒温培养

10 min(培养温度 37~38 ℃),培养结束后取出比色瓶并加入 100 μ l 底物,放入速测仪中显色 3 min,测定抑制率。每个浓度做 3 个重复,空白参比。

1.2.5 农药加热稳定性 向提取瓶中加入提取液 10 ml, 100 μ g/ml 的农药标样(异丙威、敌敌畏、甲萘威 3 种农药分别做验证)20 μ l,混合均匀后加热。(将加入农药标样的样品提取液用 1.2.3 中得到的最高温度、最佳时间加热,取出后冷却至室温),吸取提取液

4 ml 于比色瓶中,再向比色瓶中加入酶和显色剂各 100 μ l,将比色瓶放入速测仪中恒温(37~38 ℃)培养 10 min,再加入 100 μ l 底物,显色 3 min,测得抑制率,每种农药重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的优化

2.1.1 不同温度处理对抑制率的影响 将 4 种样品提取液在不同温度下加热 1 min,测定抑制率如表 1 所示。

表 1 不同温度处理对抑制率的影响

温度/℃	平均抑制率/%			
	蒜苗	蒜黄	大蒜	韭菜
20(室温)	90.2	90.7	99.3	76.0
70	98.5	94.9	96.5	51.7
80	97.7	93.5	97.9	20.9
90	84.6	84.6	98.3	12.8
100	37.2	20.4	90.1	13.9
110	9.8	2.4	46.8	16.9
120			34.6	

从表 1 可以得出,温度对假阳性消除的影响。根据 4 种蔬菜样品的试验结果可以看出,随着温度升高,抑制率降低,假阳性现象减小。室温(20 ℃)下,4 种蔬菜各做 9 个重复,蒜苗、蒜黄、大蒜、韭菜的平均抑制率分别为 90.2%, 90.7%, 99.3%, 76.0%, 经过加热后,4 种蔬菜的抑制率显著降低。蒜苗在温度达到 110 ℃时,平均抑制率降到 9.8%;蒜黄在温度达到 100 ℃时,平均抑制率降到 20.4%;大蒜在温度达到 120 ℃时,平均抑制率降到 34.6%;韭菜在温度达到 80 ℃时,平均抑

制率降到 20.9%。虽然,继续升高温度可以进一步降低抑制率,减小假阳性影响,但是考虑到需要避免农药损失和实际操作简便,选择试验中测得的最佳温度作为下一步研究的前提。

2.1.2 加热不同时间对抑制率的影响 上述试验得到了 4 种蔬菜农残检测消除假阳性的最佳温度。将 4 种蔬菜样品分别在各自最佳温度下加热不同时间,分别为 1 min, 2 min, 3 min, 测得抑制率结果如表 2 所示。

表 2 不同时间处理对样品提取液抑制率的影响

时间/min	平均抑制率/%			
	蒜苗(110 ℃)	蒜黄(100 ℃)	大蒜(120 ℃)	韭菜(80 ℃)
1	9.6	22.7	32.3	18.4
2	11.6	17.8	34.3	18.5
3	11.9	20.6	34.9	20.7

从表 2 可以得出,最佳温度加热不同时间对假阳性消除的影响。当加热温度达到一定值时,加热时间对抑制率影响不明显,因此,为了操作简便,避免残留农药损失,笔者选择最短加热时间 1 min。

2.2 酶抑制法检测农药残留添加回收试验

为了进一步证明农药存在时本检测方法的可行性,选用异丙威(叶蝉散)、敌敌畏、甲萘威(西维因)3 种农药进行研究。

2.2.1 缓冲溶液中农药添加浓度与抑制率的关系研究 分别向缓冲溶液中添加不同浓度的农药标样,120 ℃加热 1 min。测得 3 种农药添加浓度与抑制率的关系如图 1 所示。

图 1 表明,缓冲溶液的抑制率随着农药添加浓度的升高而升高。当异丙威、敌敌畏、甲萘威这 3 种农药的最大添加质量浓度为 0.35 μ g/ml 时,抑制率分别为 84.6%, 95.2%, 87.3%。

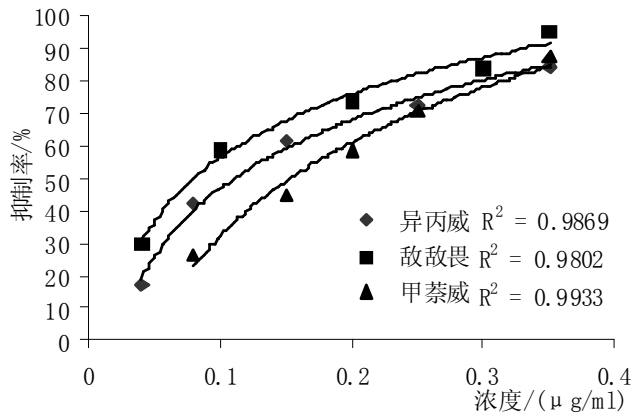


图1 缓冲液中农药添加浓度与抑制率的关系

2.2.2 蔬菜样品中农药添加质量浓度与抑制率的关系
由试验 1.2.4 可得,图 2~5 中,在添加一定量农药的范

围内,4 种蔬菜提取液经过加热处理的抑制率均比未经过加热处理的抑制率低,且加热处理对抑制率的影响随着农药添加量的升高而减小。在 3 种农药添加质量浓度较低时,同种蔬菜经过加热处理的抑制率和未经加热处理的抑制率数值差异较大,当农药添加质量浓度逐渐升高时,差异逐渐减小,在添加农药的质量浓度达到最大值(0.35 μg/ml)时,同种蔬菜经过加热处理和未经加热处理的抑制率几乎相同。这是因为在农药添加量少的情况下,抑制率主要受蔬菜内部干扰物质影响,而加热可以在一定程度上消除这种影响;而在农药添加量多的情况下,抑制率的升高主要是因为农药残留引起的,并非蔬菜本身的干扰物质,此时抑制率升高就不再是假阳性现象。

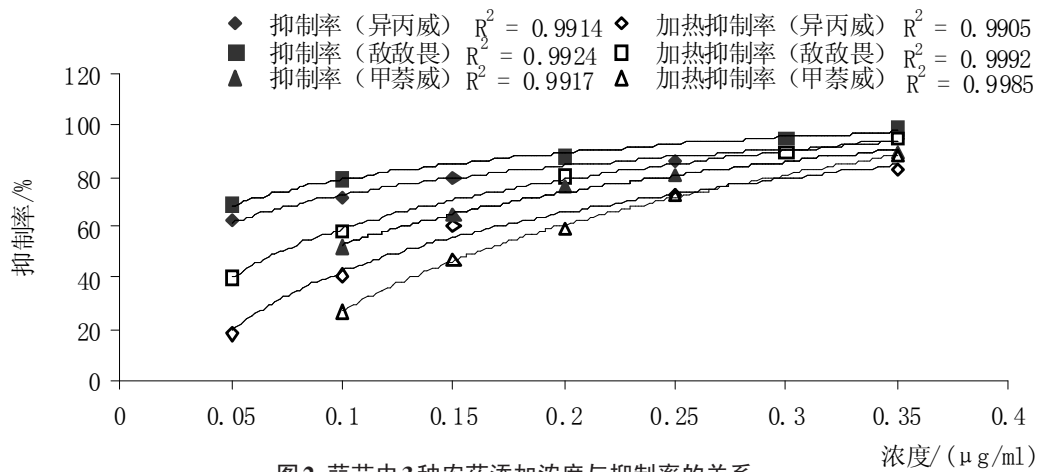


图2 蒜苗中3种农药添加浓度与抑制率的关系

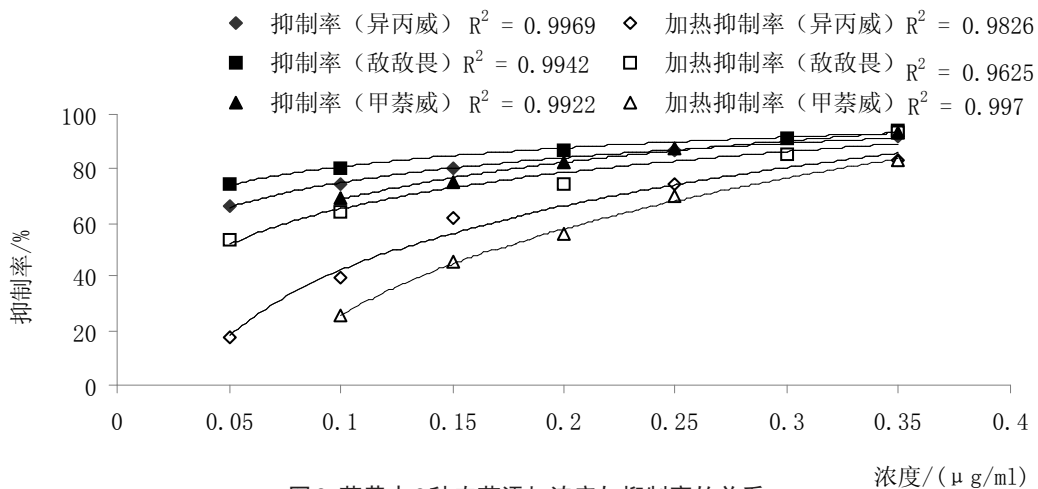


图3 蒜黄中3种农药添加浓度与抑制率的关系

2.2.3 残留农药加热处理后稳定性验证 1.2.5 试验结果表明,异丙威(叶蝉散)的平均抑制率和加热平均抑制率分别为 69.8%和 71.4%,敌敌畏的平均抑制率和加热平均抑制率分别为 73.4%和 72.9%,甲萘威(西维因)的平均抑制率和加热平均抑制率分别为

58.5%和 55.3%。由此可以看出经过加热处理和未经加热处理的抑制率相差不大,说明农药在 120 °C 下加热 1 min 保持良好的稳定性。因此,试验前处理的优化方法不会对残留农药造成损失,可以在实际检测中应用。

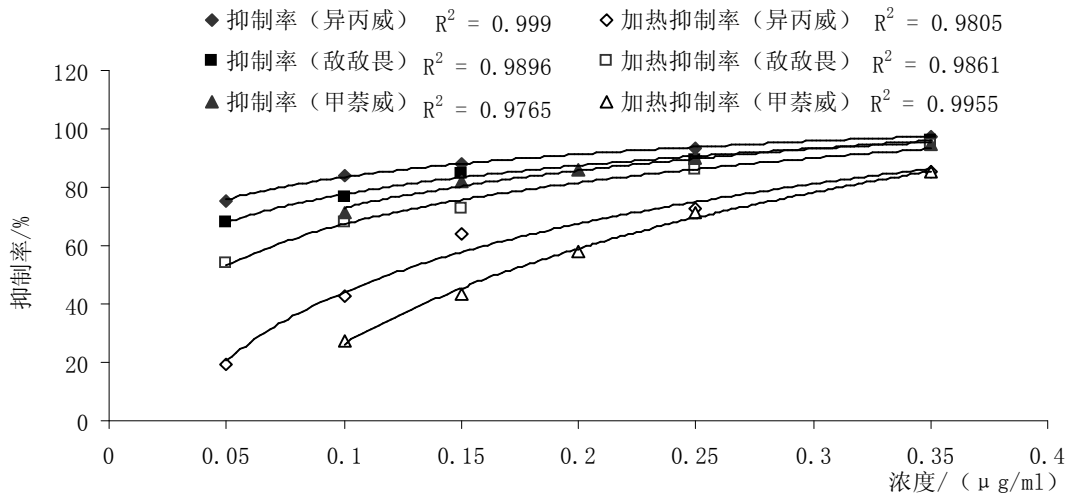


图4 大蒜中3种农药添加浓度与抑制率的关系

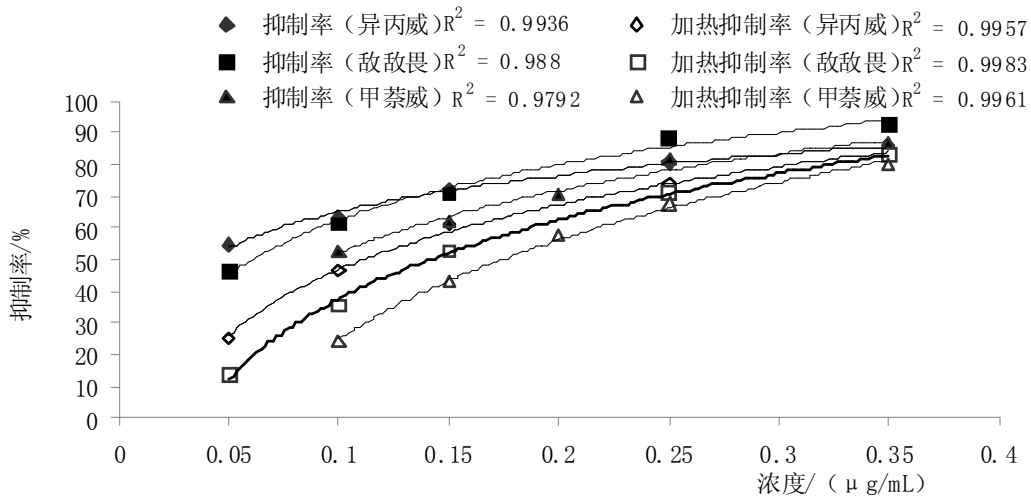


图5 韭菜中3种农药添加浓度与抑制率的关系

3 结论

笔者的试验结果表明,在用酶抑制法检测蒜苗、蒜黄、大蒜、韭菜4种农药残留的过程中,增加一步对样品提取液的加热处理,可以在一定程度上消除假阳性对试验结果的影响,且加热处理并不造成残留农药的损失。最佳加热时间1 min,加热温度韭菜(80℃)、蒜黄(100℃)、蒜苗(110℃)、大蒜(120℃)笔者认为,辛辣蔬菜中可能含有的某种特殊物质能抑制酶的活性,使其不能与底物充分结合,从而干扰检测结果,产生假阳性现象。加热处理使特殊物质发生变化,使之不再能抑制酶的活性,假阳性现象得以消除。通过对酶抑制法检测4种辛辣蔬菜农药残留方法的改进,提高了此方法的适用范围和准确性,设想对实际检测其他辛辣蔬菜农药残留具有推广意义。

参考文献

[1] 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.现代农药,2004,4(2):25-27,42.

[2] 赵建庄,康国瑞.快速测定果蔬中农药残留量的方法研究.农业环境保护,2002,21(1):70-71.
 [3] 李顺,纪淑娟,李东华.酶抑制法快速检测蔬菜中有机磷农药残留的最佳条件研究.食品科技,2007,1(3):171-173.
 [4] 张学健,胡春,张洪琼,等.酶抑制率法快速测定蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留.中国卫生检验杂志,2005,15(7):874.
 [5] 王玉丽,王玉振.蔬菜农药残留速测法——酶抑制法.山东蔬菜,2006,3:39-40.
 [6] 王军,朱鲁生,林爱军,等.农药残留速测技术研究进展.农药科学与管理,2003,2(1):17-20.
 [7] 沈海斌,樊晓青,郁樊敏,等.几种蔬菜对酶的抑制率实验初报.上海蔬菜,2004(5):15-17.
 [8] 蒲晓亚,张贵安.乙酰胆碱酯酶抑制率法可快速检测米面果蔬中有机磷农药残留.食品质量与安全,2008,8:53-55.
 [9] 李顺,纪淑娟,孙焕.酶抑制法快速检测蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的研究现状.食品与药品,2006,8(7):29-30.
 [10] 滕威,柳琪,张海松,等.NT/Y 448-2001 标准方法的验证分析.食品研究与开发,2003,24(2):95-96.
 [11] 李治祥.浅析安徽省蔬菜农药残留检测特点.农药科学与管理,2003,24(4):35-37.
 [12] 葛静,王素利,钱传范,等.韭菜中农药残留酶速测法假阳性消除研究.食品科学,2008,29(4):299-301.