

用于测量农药残留的小麦酯酶的选择

肖建军, 华泽钊, 徐 斐, 李保国

(上海理工大学 食品科学与工程研究所, 上海 200093)

摘 要: 为研制探测农药残留的生物传感器, 研究了农药乐果[*O*, *O*-二甲基 *S*-(*N*-甲基氨基甲酰甲基) 二硫代磷酸酯] 对各种小麦植物酯酶的抑制; 从小麦中提取植物酶, 以农药乐果为抑制剂, 采用分光光度法研究了乐果对各种小麦酯酶活性的影响; 研究显示, 不同品种小麦酯酶对农药乐果的敏感度不同, 在所研究的品种中, 豫麦 39 和小麦周 9 对乐果较敏感, 研究结果说明了选择小麦酶源的必要性。

关键词: 农药残留; 生物传感器; 植物酶

中图分类号: S481.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2002)02-0011-04

有机磷农药被认为是非持久农药, 其降解半衰期 ($DT_{1/2}$) 一般在几周至几个月。研究表明, 有机磷农药在某些环境条件下也会有较长的残存期, 并在动物体内产生蓄积作用。有机磷农药对人体和生态环境具有的长期潜在效应仍然是值得关注的问题^[1]。有些地区农产品中农药含量超标严重, 国内最好的地区也有 5% 的农产品农药残留量超标, 严重的地区高达 85%。要预防、严禁农药残留量超标的农产品上市的重要手段之一是制度化地对上市农产品进行检测。目前, 测量农药残留量主要采用色谱法, 该法虽然可靠, 但耗时、成本高, 需要受过专门训练的技术人员操作, 只适合在实验室检测, 不适合在现场检测^[2]。在农药残留量检测中, 需要快速、廉价的检测设备^[3]。

近年来, 国际上正在研制能快速检测农药的生物传感器, 但至今仍处于实验室阶段, 未见有实用化产品^[4], 本文报道为研究检测农药残留量的生物传感器所作的应用基础研究。

自从 1951 年 Giang 与 Hall 发现有机磷农药在体外也能抑制胆碱酯酶以来, 绝大多数研究报告都是基于动物胆碱酯酶被抑制这一原理的^[5]。进一步的研究中发现, 有机磷水解酶(organophosphorus hydrolase, 简称 OPH) 能有效地水解有机磷农药, 可以监测水解产物来测定有机磷农药的含量^[6]。但是无论是动物酯酶还是有机磷水解酶都不太适合现场快速检测使用, 这是因为动物酶源不仅取材不便, 而且必须冰冻保存, 而有机磷水解酶则价格昂贵。农药对植物酯酶也产生抑制作用, 利用植物酶的抑制技术, 可测定果蔬中有机磷农药和氨基甲酸酯农药^[7]。植物酶源丰富, 取材方便、制备简单, 在玉米、大米、小米和面粉酶源中, 面粉酶对农药较敏感, 所以本研究选用面粉酶作为检测有机磷农药的酶源。以前的研究者从普通面粉中提取酶, 其缺点是, 每批面粉的来源不同, 其酶的活性有可能不同。小麦有许多品种, 不同品种的小麦酯酶对农药的敏感程度可能不同, 本研究就是为探索各种小麦酯酶对农药的敏感度, 从而选择对农药最敏感的品种作为测定农药残留量的酶源而进行的。

收稿日期: 2001-07-19; 修回日期: 2001-12-13

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(59836240)

作者简介: 肖建军(1962-), 男, 四川蓬溪人, 副教授, 博士研究生。

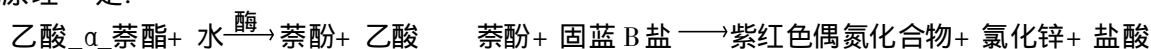
(上接 10 页)

Abstract: The oxidation of *o*-dianisidine(ODA) has been investigated at platinum minigrid electrode by UV-Vis optically transparent thin-layer electrochemistry technique. From the experimental results of thin-layer voltammograms and UV-Vis spectro-electrochemistry of ODA in pH 2.0 BR buffer, it was found that the oxidation of ODA is a two electron transfer reversible process. In addition, the formal potential V^0 and electron transfer number n were calculated from spectra at different potentials. The diffusion coefficient was measured by single potential step chrono-absorptiometry.

Key words: Thin-layer spectro-electrochemistry; *o*-Dianisidine; Formal potential; Electron transfer number; Diffusion coefficient

1 酶法测定农药残留量的原理

采用植物酶测定农药残留量的工作原理是依据农药能抑制植物酶的活性,能产生这种反应的农药包括有机磷农药和某些氨基甲酸酯农药。利用这一原理可以将某种酯酶置于薄层色谱板、纸片或者试管中,使酶与试样进行反应,如果试样中没有农药残留或残留量极小,酶的活性不被抑制,基质可以水解,水解产物通过显色剂或本身具有颜色而显色;反之,如果农药残留量较高,酶的活性就会被农药所抑制,水解产物减少或没有产物生成。酶被抑制的程度又可用比色法来测定。显色反应的原理^[8]是:



酶可以使乙酸 α -萘酯(1-naphthyl acetate)水解为萘酚和乙酸,萘酚与显色剂固蓝 B 盐(fast blue B salt)作用形成紫红色的偶氮化合物,从而完成显色反应。当酶被抑制的程度不同,紫红色偶氮化合物的产量不同,溶液颜色深浅不同。

2 实验部分

2.1 材料与设备

小麦:豫麦 18、豫麦 39、豫麦 9345、周 9,均来自中国国家小麦工程中心(郑州);农药乐果[O,O-二甲基 S-(N-甲基氨基甲酰甲基)二硫代磷酸酯],上海农药厂生产;乙酸 α -萘酯,上海青浦合成试剂厂生产;固蓝 B 盐购于上海化学试剂公司。

722S 分光光度计(上海分析仪器厂);微型振荡器(江苏金坛医疗仪器厂);离心机(北京医用离心机厂);恒温水浴(上海医用仪表厂);多功能食品加工机(上海海菱电器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 植物酯酶制备 用蒸馏水作提取液,小麦与水的质量比为 1:5,在 4℃浸泡 15 h,用食品加工机制汁,加工 2 min,将汁倒出,然后以 4 000 r/min 的速度离心 1 min,将上清液过滤得小麦酯酶。

2.2.2 基液配制 将 100 mg 乙酸 α -萘酯溶于 80 mL 无水乙醇。

2.2.3 显色液配制 将 125 mg 固蓝 B 盐溶于 80 mL 蒸馏水,以 180 次/min 的速率振荡 30 min。

2.2.4 抑制剂制备 以农药乐果为抑制剂。乐果原样为 40% 乳油,用苯作为溶剂,先用苯将乐果稀释为质量分数 $w = 1\%$ 的溶液,然后用蒸馏水稀释以制备其余乐果标样。试验的乐果标样 w 分别为 1×10^{-6} 、 10×10^{-6} 和 100×10^{-6} 。所有溶液都置于冰箱的冷藏室内保存。

2.2.5 酶反应速度测定 测定时取蒸馏水或乐果溶液 2 mL,在恒温水浴中预热 15 min,加酶 0.087 mL,在 31.6℃恒温水浴中进行 10 min 酶抑制反应。为了提高可比性,对无抑制反应的情况,酶和蒸馏水也在水浴中再保温 10 min;然后加显色液 0.087 mL,加基液 0.13 mL,振荡 5 s 后在水浴中进行显色反应。取显色反应时间 1、2、4、6、8、10 min,在 524 nm 波长测定吸光度 A 的变化。测定时,在蒸馏水中加酶和显色液各 0.087 mL,以此作为测定无抑制情况的吸光度的参照;在同含量乐果溶液中加入酶和显色液各 0.087 mL,以此作为测定抑制情况的吸光度的参照。

3 结果与讨论

3.1 不同品种小麦酶的显色反应进程

当显色反应温度为 31.6℃,无抑制的显色反应、 w 为 10×10^{-6} 和 100×10^{-6} 乐果溶液的显色反应进程如表 1 所示,表 1 中数据为吸光度。在显色反应初期阶段,反应速度较快;随着显色反应的进行,反应速度越来越慢。在该温度下,显色反应进行 8 min 时,显色反应基本停止,在显色反应 10 min 时,吸光度反而有下降的趋势。如豫麦 9345 无抑制反应时,显色反应 8 min 时的吸光度为 1.74,而在显色反应 10 min 时的吸光度却降至 1.635。引起这种现象的原因是显色反应温度较高,引起产物析出而悬浮于溶液中。由此可见,在反应温度较高时,显色反应时间不宜长。

3.2 农药乐果对各种小麦酶活性的抑制情况

设各种小麦酯酶没受农药乐果抑制时的吸光度为 A_1 ,受乐果抑制时的吸光度为 A_2 ,则小麦酯酶

受乐果的抑制程度: $R = (A_1 - A_2) / A_1$ 。

表 2 是在 31.6 ℃进行显色反应和抑制反应时, 经不同显色反应时间后, 各种小麦酯酶受农药乐果抑制的程度。由表 2 比较可知, 乐果的质量分数由 10×10^{-6} 增加到 100×10^{-6} 时, 酶被抑制程度有明显的增长, 特别是在显色反应时间较短的情况下。这说明实验所用小麦酯酶对农药乐果较敏感。

表 1 各种小麦酯酶受乐果抑制的显色反应体系的吸光度
Table 1 Absorbance of color reaction systems of various wheat_esterases inhibited by dimethoate

Sample	Content of dimethoate $w / 10^{-6}$	Color reaction time t / min					
		1	2	4	6	8	10
Yumai 39(豫麦 39)	0. 0(无抑制)	0. 733	1. 088	1. 524	1. 710	1. 753	1. 744
	10	0. 564	0. 846	1. 197	1. 357	1. 412	1. 401
	100	0. 423	0. 641	1. 012	1. 262	1. 417	1. 496
Yumai 9345(豫麦 9345)	0. 0(无抑制)	0. 659	1. 064	1. 534	1. 725	1. 740	1. 635
	10	0. 581	0. 914	1. 291	1. 405	1. 416	1. 405
	100	0. 406	0. 649	1. 016	1. 273	1. 462	1. 576
Wheat Zhou 9(小麦周 9)	0. 0(无抑制)	0. 608	0. 984	1. 369	1. 487	1. 502	1. 510
	10	0. 509	0. 797	1. 024	1. 052	1. 057	1. 073
	100	0. 347	0. 533	0. 793	0. 913	0. 968	0. 988
Yumai 18(豫麦 18)	0. 0(无抑制)	0. 452	0. 780	1. 125	1. 196	1. 228	1. 242
	10	0. 398	0. 674	0. 901	1. 012	1. 016	1. 027
	100	0. 365	0. 582	0. 854	0. 970	1. 015	1. 012

表 2 乐果溶液对小麦酯酶的抑制程度
Table 2 Inhibition degree of dimethoate solution on various wheat_esterases $R / \%$

Sample	Content of dimethoate $w / 10^{-6}$									
	10					100				
	Color reaction time t / min					Color reaction time t / min				
	1	2	4	6	8	1	2	4	6	8
Yumai 39(豫麦 39)	23. 1	22. 2	21. 5	20. 6	19. 5	42. 3	41. 1	33. 6	26. 2	19. 2
Yumai 9345(豫麦 9345)	11. 8	14. 1	15. 8	18. 6	18. 6	38. 4	39. 0	33. 8	26. 2	16. 0
Wheat Zhou 9(小麦周 9)	16. 3	19. 0	25. 2	29. 3	29. 6	42. 9	45. 8	42. 1	38. 6	35. 6
Yumai 18(豫麦 18)	11. 9	13. 6	19. 9	15. 4	17. 3	19. 2	25. 4	24. 1	18. 9	17. 3

3.3 相同显色反应时间各种小麦酯酶受农药乐果抑制的比较

比较几种小麦酯酶在显色反应初期阶段对乐果的敏感度, 取 1 min 和 2 min 显色反应时间来考察。这里我们需要考察显色反应初期阶段, 这是因为在显色反应初期, 生成的产物含量较低, 因而逆反应速度对总反应速度没有显著影响; 其它各种反应产物的含量不会有明显变化, 反应按假一级反应进行, 测量的重现性较好^[9]。图 1 中 A 和 B 是质量分数为 1×10^{-6} 、 10×10^{-6} 和 100×10^{-6} 的乐果液对 4 种小麦酯酶的抑制程度比较。

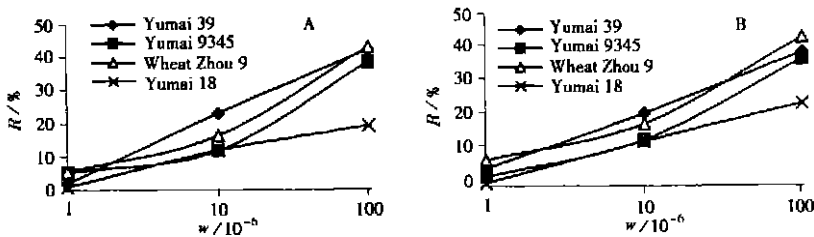


图 1 乐果含量对抑制程度的影响

Fig. 1 Inhibition degree of dimethoate on various wheat_esterases
A. 显色反应时间(color reaction time): 1 min; B. 显色反应时间(color reaction time): 2 min

由图 1 可清楚地看出, 乐果质量分数在 $1 \times 10^{-6} \sim 100 \times 10^{-6}$ 范围内, 豫麦 39 和小麦周 9 对乐果较敏感; 10×10^{-6} (w) 的乐果对豫麦 39 抑制程度最强, 其次是小麦周 9, 对豫麦 9345 和豫麦 18 的抑制程度差不多, 但比豫麦 39 要低得多; 对于 100×10^{-6} (w) 的乐果溶液, 仍然是豫麦 39 和小麦周 9 较为敏感, 但与 10×10^{-6} 相比, 豫麦 39、豫麦 9345、小麦周 9 的敏感度的差异在减小。在所研究的小麦品种中, 豫麦 18 对乐果的敏感度显然是最低的。由图 1 还可以看出, 显色反应时间较短时, 各小麦酯酶对农药的敏感度差异较大, 如对于 10×10^{-6} 的乐果溶液, 显色反应 1 min 时敏感度的差异明显大于显色反应 2 min。

4 结 论

鉴于我国农药的残留情况, 开展普及性监测农药是必要的, 为了普及农药残留量监测, 必须降低检测成本。在酶法检测中, 酶的成本是检测成本的重要组成部分, 所以普及农药残留量检测的重要前提之一是选择资源丰富、价格低廉的酶源。植物酶能满足这种要求。

植物酯酶可被农药抑制, 在植物酯酶中, 小麦酯酶对农药较为敏感。然而, 不同的小麦品种的酯酶对农药的敏感度是不一样的, 以本研究为例, 豫麦 39 对农药乐果最敏感, 豫麦 18 最不敏感。为了准确、定量测定农药残留量, 必须选定一种对农药较为敏感的小麦作为酶源。而且, 对于同一品种小麦, 产地不同和种植方法不同时, 小麦酯酶对农药的敏感度的差异是否在容许的范围内, 需要作进一步的研究, 以确定可以进行定量分析而且具有互换性的植物酯酶酶源。

参考文献:

- [1] 华小梅, 江希流. 我国农药环境污染与危害的特点及控制对策[J]. 环境科学研究, 2000, 13(3): 40–43.
- [2] RAININA E I, EFREMENCO E N, VARFOLOMEYEV S D, *et al.* The development of a new biosensor based on recombinant *E coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins[J]. Biosensors & Bioelectronics, 1996, 11(10): 991–1000.
- [3] GOGOLE V, EVTUGYN G A, MARTY J L, *et al.* Amperometric biosensors based on nafion coated screen printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors[J]. Talanta, 2000, 53(2): 379–389.
- [4] SINGH A K, FLOUNDES A W, VOLPONI J V, *et al.* Development of sensors for direct detection of organophosphates[J]. Biosensor & Bioelectronics, 1999, 14(9): 703–713.
- [5] 黄文凤, 蔡 琪, 黄 敏, 等. 便携式农药残留毒性快速测试仪——水果和蔬菜农药残留动力学速测方法[J]. 分析测试学报, 2000, 19(6): 87–89.
- [6] MULCHANDANI P, MULCHANDANI A, KANEVA I, *et al.* Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents 1: Potentiometric enzyme electrode[J]. Biosensors & Bioelectronics, 1999, 14(1): 77–85.
- [7] 李治祥, 翟延路. 应用植物酶抑制技术测定蔬菜水果中农药残留量[J]. 环境科学学报, 1987, 7(4): 472–478.
- [8] NANDA KUMAR N V, VISWESWARIAH K, MAJUMDER S K, *et al.* Quantification of cholinesterase inhibition on TLC for estimation of parathion[J]. Agr Biol chem, 1976, 40(2): 431–432.
- [9] 罗庆尧, 邓延倬, 蔡汝秀, 等. 分光光度分析[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 292.

Selection of Plant_esterase for Detection of Pesticide Residue

XIAO Jian_jun, HUA Ze_zhao, XU Fei, LI Bao_guo

(Institute of Food Science and Engineering, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The inhibition effect of pesticide of dimethoate on various plant_esterases has been studied to develop a biosensor for detection of pesticide residue. Effect of the inhibitor of dimethoate on activities of plant_esterases from different kinds of wheats was evaluated by spectrophotometric measurement. The results indicated the inhibiting sensitivity of dimethoate to plant_esterases from different wheats were not the same. Among the kinds of wheate studied, the esterases from the wheats of Yumai 39 and Zhou 9 are more sensitive than others. It was found that the selection of wheat plant_esterases for cheap detection of pesticide residue is necessary.

Key words: Pesticide residue; Biosensor; Plant_esterase