

乙酸酞酚酯—丁酰胆碱酯酶法农药残留

快速检测反应体系

宛梅丹, 徐汉虹, 黄晓杏, 廖美德, 胡林

(华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 利用红色的乙酸酞酚酯在丁酰胆碱酯酶作用下被水解成蓝色的酞酚和乙酸, 筛选获得乙酸酞酚酯—丁酰胆碱酯酶法的优化反应条件, 从而建立乙酸酞酚酯—丁酰胆碱酯酶法农药残留快速检测反应体系, 即在 pH 8.0 的磷酸缓冲液中, 添加 0.05 mL 丁酰胆碱酯酶溶液, 在 41°C 下保温 6 min 后, 加入 0.05 mL 乙酸酞酚酯溶液, 在波长 630 nm 下测定 6 min 前后的光密度。本方法方便快捷, 对甲胺磷、敌敌畏、克百威、灭多威等农药的检测结果显示, 该方法对有机磷类和氨基甲酸酯类农药都比较敏感。

关键词: 丁酰胆碱酯酶; 乙酸酞酚酯; 农药残留

中图分类号: S481.8; S63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2007)02-0061-04

Rapid Detection of Pesticide Residues with BuChE and

Indophenol Acetate Reaction System

WAN Mei-dan, XU Han-hong, HUANG Xiao-xing, LIAO Mei-de, HU Lin

(Key Lab of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: According to the principle that the red indophenol acetate was hydrolyzed by BuChE to blue indophenol and acetic acid. The best reaction parameters of the indophenol acetate-BuChE method were selected and then reaction system of rapid pesticide residues detection via this method was established, namely, the best reaction conditions were pH 8.0 as reaction system, with 0.05 mL BuChE and 0.05 mL indophenol acetate, then preserved for six minutes at 41 °C and detected the absorption peak value at 630 nm. It was found that this cholinesterase was sensitive to organophosphorus and carbamate pesticides, such as methamidophos, dichlorvos, carbofuran, methomyl etc.

Key words: BuChE; indophenol acetate; pesticide residue

在农作物的病虫害防治中,化学防治因其具有效果好、见效快、使用方便、经济等优点,在防治农作物病虫害、提高农作物产量和改善农产品品质等方面发挥了重要的作用^[1-2]。但随着害虫抗性的产生,农药的用量也不断加大,农药残留已成为突出问题,因食用被农药污染的瓜果、蔬菜而引起的中毒事故屡见不鲜^[3]。我国是农药生产和使用大国,有机磷和氨基甲酸酯类农药是我国目前主要应用的农药品种,也是发生农药残留超标和农药中毒事故的主要

来源^[4]。为保证农药的正确使用,实现农产品的安全生产,针对有机磷和氨基甲酸酯类农药残留测定的技术近年来越来越受到重视。其中,酶抑制测定农药残毒技术因方法简便、反应迅速、结果稳定、成本低廉等特点而获得了广泛应用^[5]。利用乙酰胆碱酯酶对乙酸酞酚酯水解反应而进行的农药残毒检测法本实验室已有研究,但该法直接应用于农药检测的条件尚未优化,且不同的酶源以及不同的反应体系对检测灵敏度有较大的影响。本研究旨在对基于乙

收稿日期:2005-10-20

作者简介:宛梅丹(1981—),男,硕士研究生;通讯作者:徐汉虹(1961—),男,教授,E-mail:hhxu@scau.edu.cn

基金项目:农业部项目“农药残留快速检测技术研究”

酸酞酚酯水解作用丁酰胆碱酯酶法进行优化,以获得快速、稳定、高效的检测条件,为此,本文系统研究了 pH 值、保温温度对底物乙酸酞酚酯稳定性的影响及其与丁酰胆碱酯酶活力的关系,乙酸酞酚酯与丁酰胆碱酯酶不同浓度配合与反应速度的关系,筛选获得胆碱酯酶-乙酸酞酚酯法的优化反应条件。

乙酸酞酚酯法的检测原理为在乙酰胆碱酯酶作用下,红色的乙酸酞酚酯被水解成蓝色的酞酚和乙酸,酞酚在 630 nm 处有最大吸收峰,因此可在此波长下测定反应前后的光密度之差 ($\Delta D_{630\text{ nm}}$) 来表征酶的活力, $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 越大,表示酶活力越大。

有机磷或氨基甲酸酯类农药是胆碱酯酶的抑制剂,当加进有机磷或氨基甲酸酯类农药后,胆碱酯酶的活性被抑制,反应速度降低,生成物量降低。测 $D_{630\text{ nm}}$ 值变化,可算出酶活性被抑制程度(用抑制率表示)。抑制率按下式计算:

$$\text{抑制率} = \frac{\Delta D_c - \Delta D_s}{\Delta D_c} \times 100\%,$$

式中: ΔD_c 为对照管 6 min 后与 6 min 前光密度之差; ΔD_s 为样本管 6 min 后与 6 min 前光密度之差。

1 材料与方法

1.1 供试材料及试剂

乙酸酞酚酯: Sigma 公司; 丁酰胆碱酯酶: 东莞市绿健生物科技有限公司; 吐温-20: 温州市化学用料厂; 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠: 广州化学试剂厂; 四氢呋喃、丙酮: 天津市化学试剂一厂; 72.69% 甲胺磷、95% 敌敌畏、97% 克百威和 98% 灭多威原药(均为质量分数): 深圳瑞德丰农药股份公司。

1.2 主要仪器设备

7230G 可见分光光度计, 电热恒温水浴锅, 电热鼓风干燥箱, 1702-MP8 型电子天平。

1.3 试剂配制方法

1.3.1 磷酸缓冲溶液的配制 将溶液 A ($0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 溶液) 和溶液 B ($0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 溶液) 按不同体积比混合至 100 mL, 定容至 200 mL, 使其 pH 值分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5。

1.3.2 丁酰胆碱酯酶溶液的配制 取 30 mg 丁酰胆碱酯酶粉溶于 6 mL pH 8.0 的磷酸缓冲溶液中即为丁酰胆碱酯酶酶液(3 d 内配制, 在 4 °C 下保存)。

1.3.3 乙酸酞酚酯溶液的配制 称 24.4 mg 乙酸酞酚酯, 加入 0.5 mL 吐温-20, 溶于四氢呋喃, 最后定容至 10 mL, 在 4 °C 下保存。

1.3.4 几种测试用农药的溶液配制(现配现用) 分别称取一定质量的甲胺磷、敌敌畏、克百威、灭多

威原药, 溶解后再用磷酸缓冲液稀释成为一系列质量浓度的溶液, 其中甲胺磷为 0.40、0.20、0.10 和 0.05 mg/L, 敌敌畏为 1.6、0.8、0.4 和 0.2 mg/L, 克百威为 1.2、0.6、0.3 和 0.15 mg/L, 灭多威为 4.8、2.4、1.2、0.6 和 0.3 mg/L。

1.4 测定方法

1.4.1 pH 对乙酸酞酚酯稳定性的影响 在试管中分别加入 pH 分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的缓冲溶液 3.95 mL, 在 37 °C 下保温 6 min, 加入 0.05 mL 的乙酸酞酚酯溶液, 立即测定并记录 3、6 和 9 min 前后的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值, 以不加乙酸酞酚酯溶液作为空白对照。每个处理重复 3 次。

1.4.2 保温温度与乙酸酞酚酯稳定性的关系 在试管中加入 pH 为 8.0 的缓冲溶液 3.95 mL, 分别在 35、37、39、41 和 43 °C 下保温 6 min 后, 加入 0.05 mL 的乙酸酞酚酯溶液, 立即测定并记录 3、6 和 9 min 前后的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值, 以不加乙酸酞酚酯溶液作为空白对照。每个处理重复 3 次。

1.4.3 pH 值与丁酰胆碱酯酶活力的关系 在试管中分别加入 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的缓冲溶液 3.85 mL, 丁酰胆碱酯酶酶液 0.1 mL, 混匀后在 37 °C 下保温 6 min, 加入 0.05 mL 的乙酸酞酚酯溶液, 立即测定并记录 3、6 和 9 min 前后的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值, 以不加乙酸酞酚酯溶液作为空白对照。每个处理重复 3 次。

1.4.4 保温温度与丁酰胆碱酯酶酶活力的关系 在试管中分别加入 pH 值为 8.0 的缓冲溶液 3.85 mL, 丁酰胆碱酯酶酶液 0.1 mL, 将反应体系分别在 35、37、39、41 和 43 °C 下保温 6 min 后, 加入 0.05 mL 的乙酸酞酚酯溶液, 立即测定并记录 6 min 前后的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值, 以不加乙酸酞酚酯溶液, 作为空白对照。每个处理重复 3 次。

1.4.5 乙酸酞酚酯和丁酰胆碱酯酶不同浓度的配合与反应速度的关系 在试管中分别加入 pH 值为 8.0 的缓冲溶液和丁酰胆碱酯酶酶液适量, 混匀后在 41 °C 下保温 6 min, 加入适量的乙酸酞酚酯溶液, 立即测定并记录 6 min 前后的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值, 以不加乙酸酞酚酯溶液作为空白对照。每个处理重复 3 次。

1.4.6 酶对有机磷和氨基甲酸酯类农药的灵敏性试验 把已配好的甲胺磷、敌敌畏、灭多威农药各取 3.90 mL 于试管中, 加丁酰胆碱酯酶酶液 0.05 mL, 混匀后在 41 °C 下保温 6 min, 加入乙酸酞酚酯溶液 0.05 mL, 立即测定并记录 6 min 前后的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值, 以磷酸缓冲液代替农药作为参比对照。每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 乙酸萘酚酯的稳定性

2.1.1 pH 值与乙酸萘酚酯稳定性的关系 从图1中可以看出,随着 pH 的增大,乙酸萘酚酯渐不稳定,在 pH 6.5 ~ 8.0 时,直线变化都比较平稳,pH 8.0 时, $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 的变化值也仅为 0.019,而 pH 8.5 时,直线急剧上升, $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 由 0.026 增加到 0.090,变化值较大,说明乙酸萘酚酯在 pH 8.5 较不稳定。

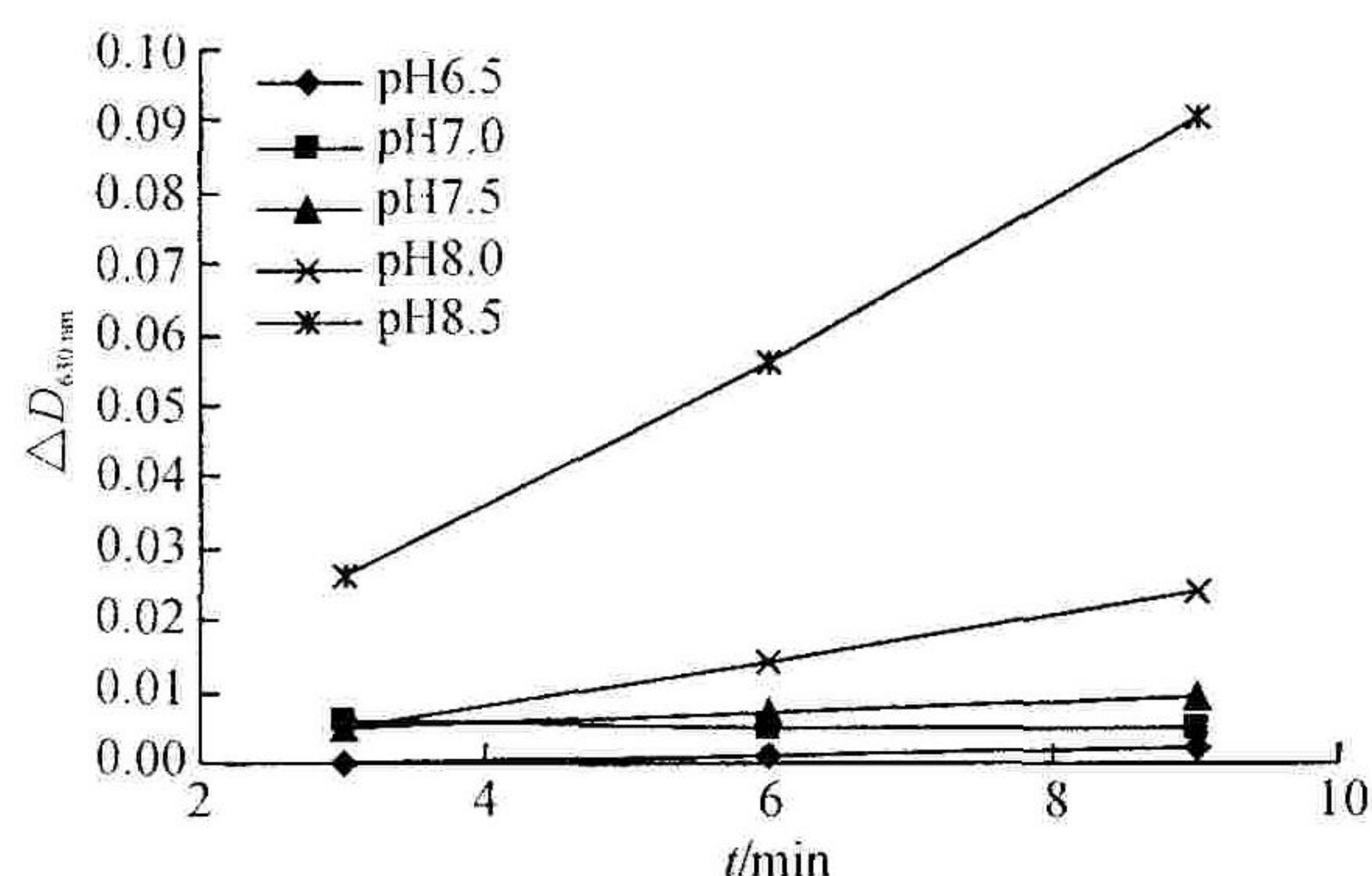


图1 pH 值与乙酸萘酚酯稳定性关系

Fig. 1 Variation of stability of indophenol acetate under different pH

2.1.2 保温温度与乙酸萘酚酯稳定性的关系 从图2中可以看出,在 35 ~ 41 °C 时 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 变化比较平稳,乙酸萘酚酯是比较稳定的,而 43 °C 时 3、6 和 9 min $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值分别为 0.023、0.054 和 0.085,变化较大,说明 43 °C 时乙酸萘酚酯容易被水解,不稳定性增加。

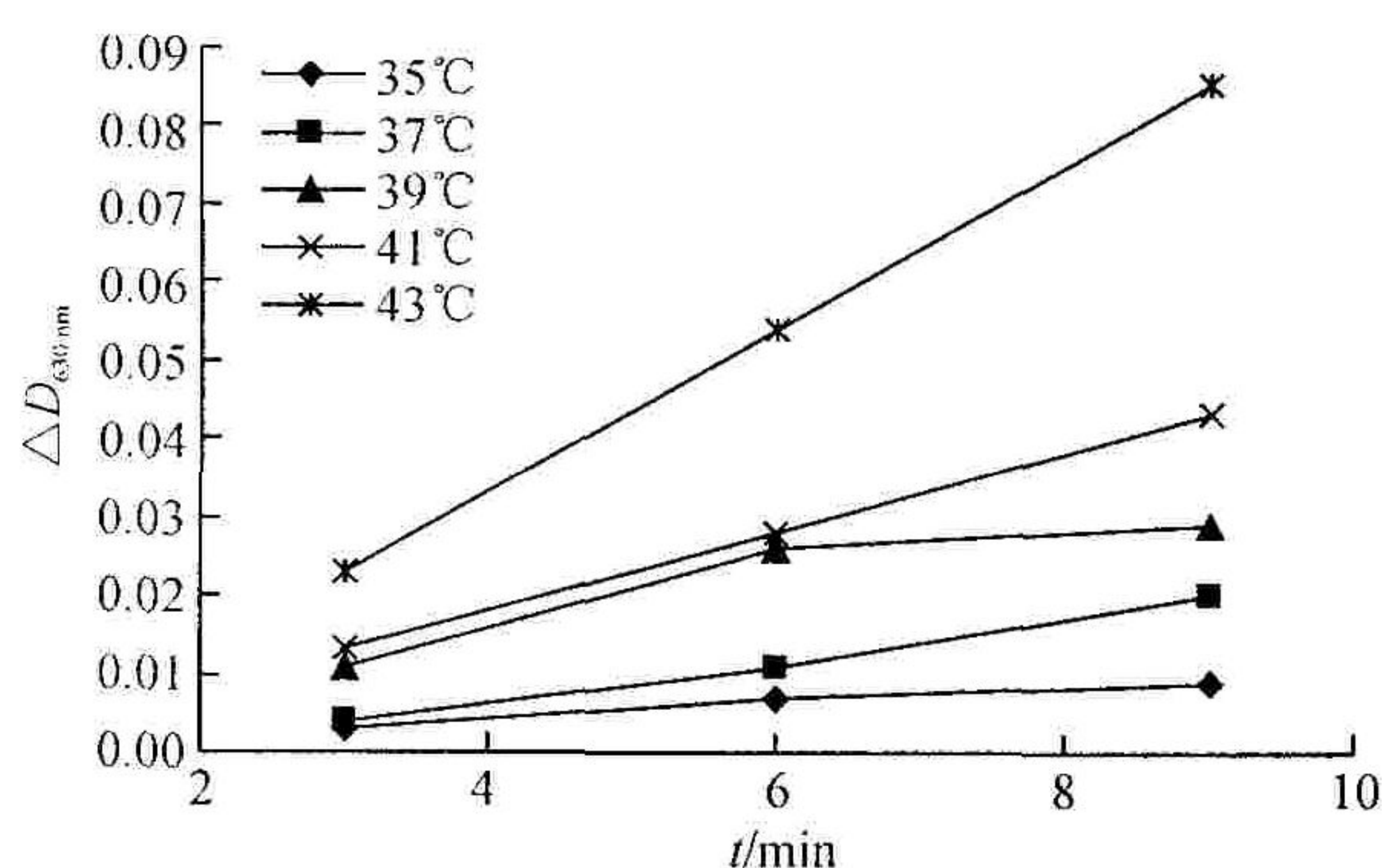


图2 保温温度与乙酸萘酚酯稳定性关系

Fig. 2 Variation of stability of indophenol acetate under different temperature

2.2 丁酰胆碱酯酶的作用条件

2.2.1 pH 值与丁酰胆碱酯酶活力的关系 从图3中可以看出,随着 pH 的增大, $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 也渐大,pH 6.5 和 pH 7.0 的直线变化平稳,pH 7.5 变化渐大,到 pH 8.0 时直线急剧上升, $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 值在 6 min 处已

是 0.084,即酶的活力处于最佳状态.结合 pH 值与乙酸萘酚酯稳定性关系试验,选取 pH 8.0 的磷酸缓冲液作为以下试验的反应体系。

2.2.2 保温温度与丁酰胆碱酯酶活力的关系 在不同的温度下丁酰胆碱酯酶的活力表现明显地不同.35、37、39、41 和 43 °C 的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 分别为 0.102、0.117、0.143、0.185 和 0.204,虽然 43 °C 的 $\Delta D_{630\text{ nm}}$ 最大,但结合保温温度与乙酸萘酚酯稳定性关系试验,应选取 41 °C 作为反应体系的保温温度。

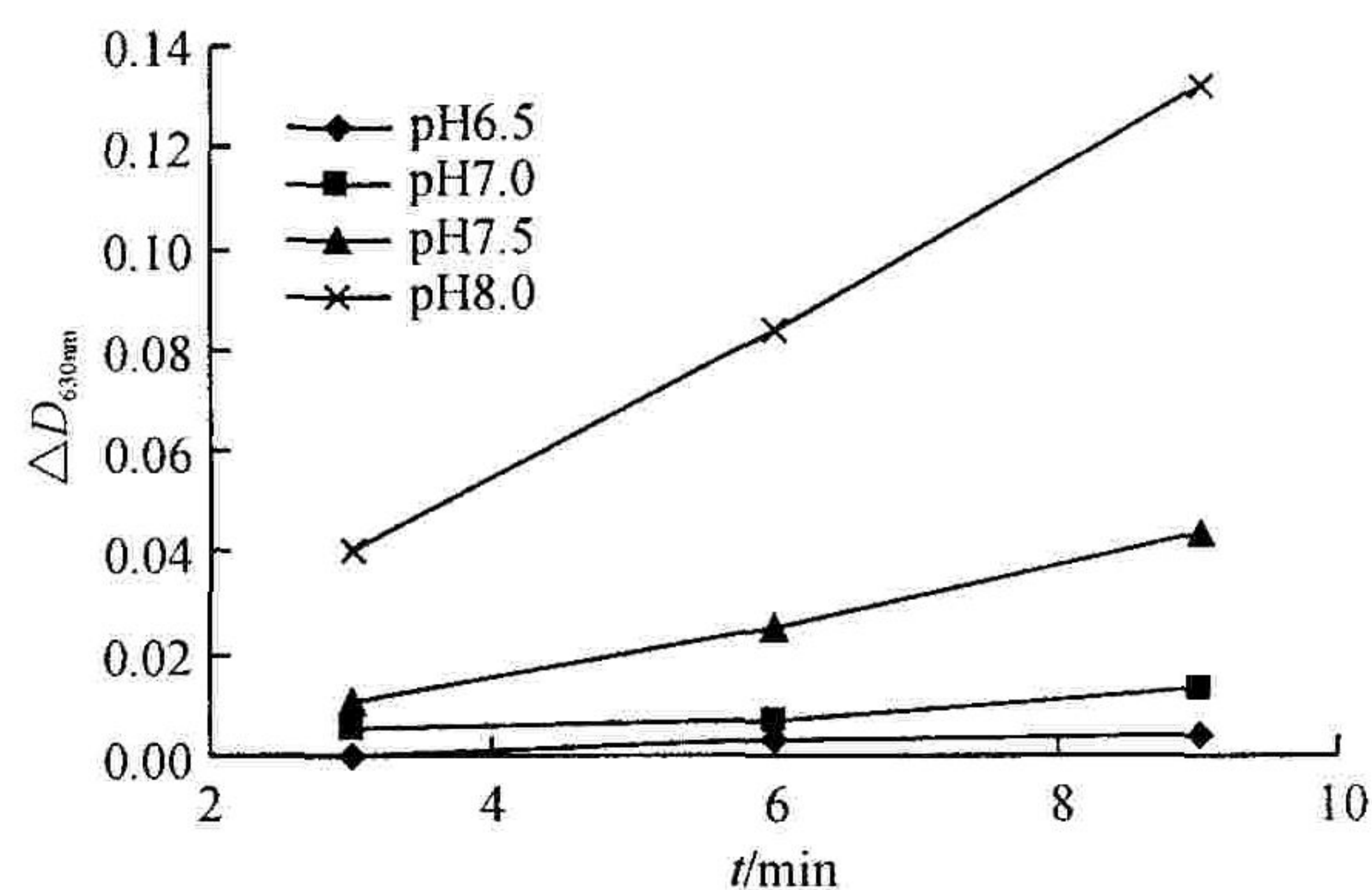


图3 pH 值与丁酰胆碱酯酶活力关系

Fig. 3 Variation of activity of BuChE under different pH

2.3 反应体系的确立

根据以上的试验结果,以 pH 8.0 为缓冲体系,41 °C 为保温温度,保温时间 6 min,做乙酸萘酚酯和丁酰胆碱酯酶不同浓度的配合与反应速度关系的试验。

尽管反应速度随着乙酸萘酚酯和酶浓度的增大而增大,但考虑到经济成本,以 0.05 mL 的乙酸萘酚酯溶液和 0.05 mL 酶液就可以满足测定要求。

最终确立试验反应体系,即以 pH 8.0 为磷酸缓冲体系,添加 0.05 mL 丁酰胆碱酯酶酶液,在 41 °C 下保温 6 min,加入 0.05 mL 乙酸萘酚酯溶液,测定 6 min 前后的 $D_{630\text{ nm}}$ 值。

2.4 酶对农药的灵敏性

甲胺磷、敌敌畏、克百威和灭多威的国家标准最高残留限量分别是 0.1、0.2、0.5 和 2 mg/L^[6],从图4可以看出,这几种农药的最高残留限量的抑制率都达到 50% 以上。

虽然农药对酶活性的抑制灵敏度不一样,但趋势是一样的,即农药浓度越高,酶活性被抑制率也就越大.另外,酶抑制率小于 60% 时,各农药对酶活性的抑制随浓度变化较大,而当抑制率大于 60% 时,抑制率随农药浓度的变化趋于平缓.因此,为免假阳性的产生^[7-8],以 60% 抑制率为检测方法的判断参数。

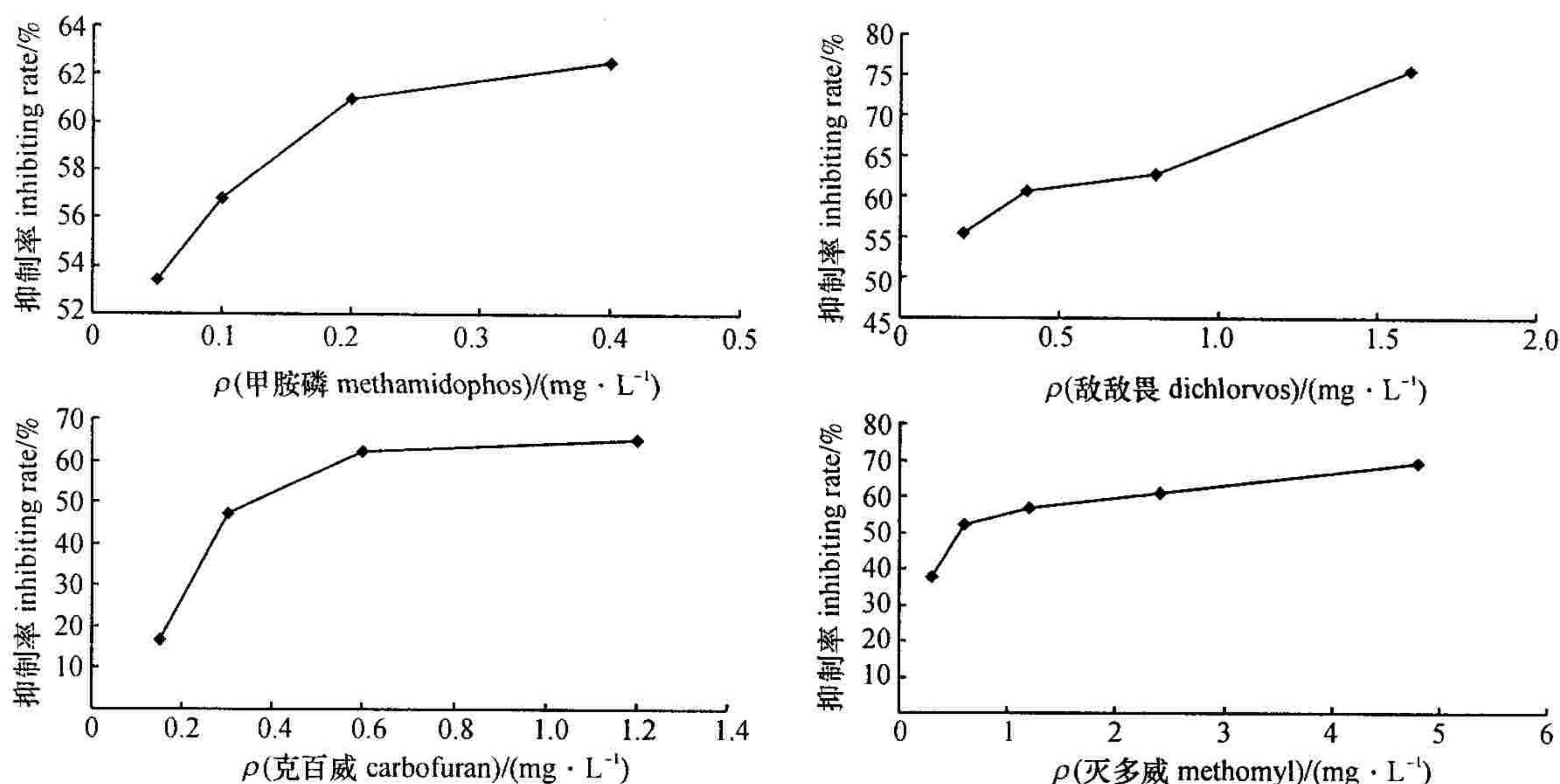


图4 4种测试农药的抑制率

Fig.4 Inhibiting rate of four kinds of tested pesticides

3 讨论与结论

农药残留的分析方法多种多样,既有仪器法,又有酶抑制法.在酶抑制法中因酶源及检测分析手段的不同,又形成了许多检测体系.因胆碱酯酶抑制比色法具有灵敏度高、特异性强、操作简便、运转费用低等特点,所以它在分析化学、食品卫生、临床医学和农业化工及环境保护等领域有着较广泛的用途^[9].胆碱酯酶活性抑制法可以检出单一农药残留量,也可以检出多种农药,有机磷酸酯和氨基甲酸酯类的综合残留量,更能准确表征农产品的安全程度.在我国,蔬菜生产大多较为分散,销售的蔬菜要保持新鲜,蔬菜由采收到市场销售,所经时间很短,市场上的蔬菜没有充分的时间用理化方法进行分析,更需要一种简便、灵敏、经济的快速检测方法.

胆碱酯酶-碘化硫代乙酰胆碱法是目前农药残留快速检测中广泛应用的一种测定方法,但它的测定步骤较为繁琐,保温时间较长,需要30 min.丁酰胆碱酯酶-乙酸酞酚酯法与胆碱酯酶-碘化硫代乙酰胆碱法相比,又有其优越性,首先是乙酸酞酚酯既是底物又是显色剂,其颜色由反应前的红色变为反应后的蓝色,不用另外加显色剂,检测简便,降低成本;再者是在不影响酶灵敏度情况下保温时间大大缩短,由原来的30 min缩短到6 min,整个检测过程只需十几分钟,更突出了“快速”二字,更适于我国蔬菜农药残留的检测.

本研究筛选获得的丁酰胆碱酯酶-乙酸酞酚酯

法的优化反应条件:以pH 8.0的磷酸缓冲液为反应体系,添加0.05 mL酶液,在41℃下保温6 min后,加入0.05 mL乙酸酞酚酯溶液,在波长630 nm下测定6 min前后的光密度.此种检测方法简便易行,在检测有机磷和氨基甲酸酯类农药残留上具有一定的应用前景.

参考文献:

- [1] 安泰. 农药残留[J]. 环保视窗, 2003(2): 45.
- [2] 洪海林, 胡宇舟. 农药在生态环境中的残留与控制综述[J]. 湖北植保, 2001(6): 35-36.
- [3] 吴明. 农药的残留毒性[J]. 农资科技, 1994(2): 39.
- [4] 黄德智, 岳永德, 汤锋. 农药残留分析的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(4): 523-526.
- [5] 刘玲, 王文琪, 王多加. 果蔬农药残留快速检测方法比较试验[J]. 蔬菜, 2001(3): 26-28.
- [6] 叶纪明, 何艺兵, 陶传江. 中国农药残留量国家标准情况介绍[J]. 农药科学与管理, 2000, 21(4): 20-23.
- [7] 纪淑娟, 赵丽丽. 快速检测果菜类蔬菜有机磷农药残留结果分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(1): 14-16.
- [8] 黄文凤, 蔡琪, 林而立, 等. 酶催化动力学光度法快速测定蔬菜中的农药残留毒性[J]. 现代科学仪器, 2000(2): 29-32.
- [9] 侯学文, 何衍彪, 徐汉虹. 胆碱酯酶抑制法检测辛硫磷农药残留[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2003, 27(2): 181-184.

【责任编辑 李晓卉】