

鸡肝酯酶在有机磷和氨基甲酸酯类 农药检测中的应用研究

徐 斐¹, 许学勤², 张慧君¹, 姜 觅¹, 华泽钊¹

(1. 上海理工大学食品科学与工程研究所, 上海 200093 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 利用农药对酯酶活力的抑制反应, 分别采用游离的和固定化的鸡肝酯酶, 对不同浓度的敌敌畏、敌百虫、马拉硫磷和西维因进行了测定。结果发现, 在低浓度时, 农药浓度的对数值与其对应的酶活抑制率之间具有较好的线性关系; 并且与游离鸡肝酯酶相比, 固定化酶不同程度地降低了对农药检测的下限值。敌敌畏、马拉硫磷和西维因的检测下限值依次从游离酶检测时的 0.001、4.34 和 2.52mg/L, 降低到了用固定化酶检测时的 0.00004、0.0004 和 0.78mg/L。固定化的鸡肝酯酶对敌百虫的检测下限改善不大。

关键词: 鸡肝酯酶; 农药检测; 检测限; 固定化

Experiment Study on Utilization of Chicken Liver Esterase in Determination of
Organophosphate and Carbamate Pesticides

XU Fei¹, XU Xue-qin², ZHANG Hui-jun¹, JIANG Mi¹, HUA Ze-zhao¹

(1. Institute of Food Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China
2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Based on the esterase inhibition actions of pesticides, different concentrations of dichlorvos, trichlorfon, malathion and carbaryl were determined by free and immobilized chicken liver esterase. The results showed that there are reasonable linear relationships between the logarithm of pesticides' concentrations and the inhibition ratio of esterase activity in lower concentration zones both for free and immobilized enzymes. With application of immobilized chicken liver esterase, the detection limits are 0.001, 4.34 and 2.52mg/L respectively for dichlorvos, malathion and carbaryl while after the free chicken liver esterase immobilized treatment, they are respectively lowered to 0.00004, 0.0004 and 0.78mg/L. However there is no obvious improvement in determination limit for trichlorfon with immobilized esterase.

Key words chicken liver esterase; determination of pesticides; detection limits; immobilization

中图分类号: TS201.6 TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0237-04

有机磷和氨基甲酸酯类农药因具有高效和低残留的优点而被广泛应用于农业生产中, 但这两类农药都具有较强的急性毒性, 对环境生物安全和人类健康会产生较大的危害^[1-2]。因此, 如何快速地对空气、水和食品中的有机磷和氨基甲酸酯类农药进行检测是个十分重要的问题。目前, 有关快速检测此类农药的报道中, 大部分是通过酶抑制法来实现的, 所使用的酶主要为商品胆碱酯酶酶制剂^[3-7], 但该酶价格昂贵, 而且由于检测时是在体外进行抑制, 部分农药对乙酰胆碱酯酶的抑制并不明显, 需要附加氧化助剂或预处理, 以提高对农药

检测的灵敏度; 同时, 有人利用植物来源或动物来源(肝脏、血液等)的酯酶粗提液, 通过测定总酯酶或胆碱酯酶活力的抑制程度对有机磷农药和氨基甲酸酯类农药进行检测^[8-10]。然而研究结果表明, 如果没有辅助性氧化作用, 植物酯酶仅对个别有机磷类农药(如敌敌畏)有较明显的抑制响应^[9-10]。

我们的前期研究发现, (缺乏胆碱酯酶活性的)鸡肝酯酶具有类似于乙酰胆碱酯酶对农药抑制的响应^[11], 而固定化具有改善小麦酯酶对敌敌畏抑制响应的作用^[12]。因此, 为了解鸡肝总酯酶活性抑制法检测农药的潜能, 能

收稿日期: 2006-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(50176032); 上海市高校优秀青年教师后备人选科研项目;

上海市科委重大科技攻关项目(05DZ19101); 上海市重点学科建设项目(T0503)

作者简介: 徐斐(1972-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全速检测技术。

否通过酶的固定化作用进一步得以提高, 本文拟选择四种有代表性的有机磷和氨基甲酸酯类农药, 通过测定总酯酶活力, 对游离的和经离子交换固定化的鸡肝酯酶检测这4种农药的情况进行考察、比较。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡肝 上海市大江食品公司提供, 离子交换树脂 上海华昌公司。敌敌畏、马拉硫磷、敌百虫、西维因、 α -乙酸萘酯、固兰B、Tris、氯化钾、乙二胺四乙酸(EDTA)、十二烷基磺酸钠(SDS)、乙酸、2,6-二叔丁基对甲酚、甲苯磺酰氟、丙酮、柠檬酸钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 鸡肝酯酶的制备

将30.0g新鲜鸡肝与100ml Tris-乙酸缓冲溶液(0.1mol/L的Tris溶液, 含0.1mol/L的KCl和0.001mol/L的EDTA, 用乙酸调pH值至7.4)混合, 再加入2,6-二叔丁基对甲酚和甲苯磺酰氟, 使这两种试剂的最终浓度分别为45 μ mol/L和115 μ mol/L。用组织捣碎机(DS-1型, 上海标本模型厂)将上述混合物打成匀浆, 所得匀浆在离心机(90-1型, 北京通用离心机厂)上以5000r/min的转速离心10min后, 上清液即为鸡肝酯酶, 贮于-18℃冻藏备用。

1.2.2 固定化鸡肝酯酶的制备

按4ml/1g的比例, 将鸡肝酯酶液与经酸碱处理过的树脂混合, 在摇床上摇晃一定时间后, 将固定化酶树脂与酶液分开。按树脂:液体=1g:10ml的比例, 用去离子水对以上固定化酶进行洗涤。最后将固定化酶浸在蒸馏水中, 于4℃条件贮存备用。

1.2.3 总酯酶活力的测定

根据K. Van Asperen^[12]所述方法改进, 具体方法如下。

1.2.3.1 游离鸡肝酯酶活力的测定

将酶液用pH6.4的缓冲液适当稀释。在3ml稀释酶液中加入50 μ l底物(16mmol/L α -乙酸萘酯的丙酮溶液)混合均匀, 在30℃恒温水浴中保温反应5min, 然后与0.5ml显色剂(0.8%固兰B的3.6%SDS)溶液混合均匀, 再于30℃条件下保温5min。以不加底物(α -乙酸萘酯)的反应液作空白, 在595nm处读取以上反应液的吸光度。根据下式计算酶液的活力。

$$E_L = D \times \frac{K \times A}{5} \times 10^{-3} \quad (\text{U/ml}) \quad (1)$$

式(1)中, E_L 为酶液的酯酶活力(U/ml); D为酶液的稀

释倍数; K为 α -萘酚标准曲线的斜率(10⁻⁶M/OD); A为反应液的吸光度(OD), U为国际酶活单位(10⁻⁶mol/min)。

1.2.3.2 固定化鸡肝酯酶活力的测定

称取适量离心脱水的固定化酶, 投入20ml pH6.4的缓冲溶液(预先恒温于30℃水浴)中。随即加入50 μ l 40mmol/L的 α -乙酸萘酯丙酮溶液, 并立即(用恒温水浴中的摇床)摇晃反应5min, 然后吸取反应液3ml, 与0.5ml(溶于3.6%SDS中的)0.8%固兰B溶液混合均匀, 于30℃恒温水浴保温5min。用不加底物(α -乙酸萘酯)的反应显色液作空白, 在595nm读取以上反应显色液的吸光度。按下式计算固定化酶的活力。

$$E_s = \frac{20 \times K \times A}{5 \times W} \times 10^{-3} \quad (\text{U/g}) \quad (2)$$

式(2)中, E_s 为固定化酶活力(U/g), W为固定化酶质量(g), 其余符号意义同(1)式。

1.2.4 农药抑制试验

用pH6.4缓冲溶液将农药稀释为不同浓度(10~0.01mg/L)的溶液。用这些不同浓度的农药溶液取代以上酶活测定方法中的缓冲液, 测定游离或固定化酶的总酯酶活力, 按下式计算不同浓度农药对被测酶活的抑制率。

$$I(\%) = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 100 \quad (3)$$

式(3)中, I为抑制率(%); E_1 为无农药抑制时的酯酶活性(U/ml或U/g); E_2 为某一浓度农药抑制时的酯酶活性(U/ml或U/g)。

1.2.5 检测下限

参考Lea Pogacnik^[13]应用的LOD₃。(LOD为limit of detection的缩写, σ 为抑制率标准差)概念, 本文将检测下限规定为: 与3倍抑制率标准差平均值相对应的农药浓度值。

2 结果与分析

2.1 农药对游离鸡肝酯酶的抑制

选用敌敌畏、敌百虫、马拉硫磷和西维因四种农药对游离鸡肝酯酶进行了抑制试验。结果见表1、表2和图1。由图1可知, 鸡肝酯酶的受抑制程度随着农药浓度升高而升高; 并且, 在低浓度时, 酶的抑制率与农药浓度的对数值有较好直线关系(见表2)。这与Rainina E I^[14]等人采用*E. coli*细胞检测对氧磷和Ivanov AN等人^[3]采用胆碱酯酶检测蝇毒磷时得到的曲线相似。这说明通过测定鸡肝酯酶的受抑制程度可以定量推知农药的浓度。但不同农药对酶的抑制能力的强弱是不同

表1 不同农药浓度抑制下游离鸡肝酯酶的活性
Table 1 Activities of free esterase of chicken liver with the inhibition by pesticides

浓度(mg/L)	敌敌畏 $E_i \pm SD(U/L)$	敌百虫 $E_i \pm SD(U/L)$	马拉硫磷 $E_i \pm SD(U/L)$	西维因 $E_i \pm SD(U/L)$
10.0	0.32 ± 0.070	1.35 ± 0.181	3.60 ± 0.147	3.15 ± 0.089
5.0	0.49 ± 0.153	1.60 ± 0.236	4.11 ± 0.049	3.94 ± 0.073
2.5	0.86 ± 0.115	2.41 ± 0.156	4.54 ± 0.187	4.25 ± 0.087
0.5	1.19 ± 0.131	3.01 ± 0.227	4.52 ± 0.162	4.53 ± 0.016
0.1	2.30 ± 0.040	3.52 ± 0.172	4.51 ± 0.204	4.52 ± 0.131
0.0	4.50 ± 0.102	4.54 ± 0.194	4.58 ± 0.150	4.54 ± 0.079

表3 不同农药浓度抑制下固定化鸡肝酯酶的活性
Table 3 Activities of immobilized esterase of chicken liver with the inhibition by pesticides

农药浓度(mg/L)	敌敌畏 $E_s \pm SD(U/g)$	敌百虫 $E_s \pm SD(U/g)$	马拉硫磷 $E_s \pm SD(U/g)$	西维因 $E_s \pm SD(U/g)$
10	0.07 ± 0.009	0.21 ± 0.008	0.36 ± 0.007	0.83 ± 0.022
5	0.10 ± 0.013	0.29 ± 0.014	0.47 ± 0.034	1.03 ± 0.029
2.5	0.11 ± 0.011	0.34 ± 0.010	0.48 ± 0.011	1.13 ± 0.025
0.5	0.12 ± 0.016	0.59 ± 0.021	0.52 ± 0.030	1.30 ± 0.006
0.25				1.32 ± 0.005
0.1	0.30 ± 0.032	0.94 ± 0.025	0.65 ± 0.039	
0.125				1.32 ± 0.019
0.05	0.39 ± 0.016	1.13 ± 0.010	0.71 ± 0.026	
0.01	0.61 ± 0.031	1.17 ± 0.011	0.91 ± 0.031	
0.00	1.35 ± 0.014	1.19 ± 0.066	1.29 ± 0.017	1.33 ± 0.084

表2 图1中四种农药的浓度对数值与酶抑制率在低浓度时各拟合曲线($I=a+blgC$)中的参数及检测下限

Table 2 Parameters in equations ($I=a+blgC$) fitted from lower concentration portion of the curves in fig 1 and the detection limits of pesticides

参数项	敌敌畏	敌百虫	马拉硫磷	西维因
斜率(b)	23.67	21.03	34.39	42.22
线性关系(R^2)	0.95	0.99	1.00	0.94
线性范围(mg/L)	0.1~5	0.1~5	2.5~10	2.5~10
检测下限(mg/L)	0.001*	0.04*	4.34	2.52

注：* 根据线性关系外推预测的检测下限值。

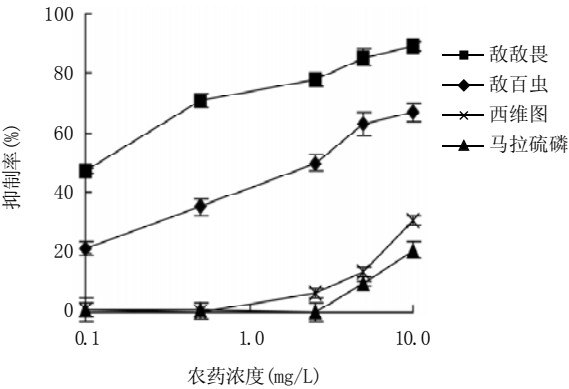


图1 不同农药浓度对游离鸡肝酯酶的抑制
Fig.1 Inhibition rate of free esterase of chicken liver at different concentrations of pesticides

的，其中，敌敌畏和敌百虫对游离鸡肝酯酶活力的抑制要强于另二种农药。因此，采用酶抑制法进行农药测定，无法得到各种农药的农药浓度数据；换言之，该法只能以某种农药作为定量标准，而检测结果均以毒

性相当的某种农药的浓度计。
2.2 农药对固定化鸡肝酯酶的抑制及与游离酶的比较
在相同的试验条件下，用固定化鸡肝酯酶进行抑制试验，得到的结果见表3、表4和图2。可以看出，利

表4 图2中农药浓度对数值与固定化鸡肝酯酶抑制率在低浓度时拟合曲线($I=a+blgC$)的参数及检测下限

Table 4 Parameters in equations ($I=a+blgC$) fitted from lower concentration portion of the curves in fig 2 and the detection limits of pesticides

参数项	敌敌畏	敌百虫	马拉硫磷	西维因
斜率(b)	20.86	44.84	18.05	27.08
线性关系(R^2)	0.99	0.99	0.98	0.94
线性范围(mg/L)	0.01~0.5	0.05~0.5	0.1~2.5	0.5~10
检测限(mg/L)	0.00004*	0.045*	0.00043	0.78

注：* 根据线性关系外推预测的检测下限值。

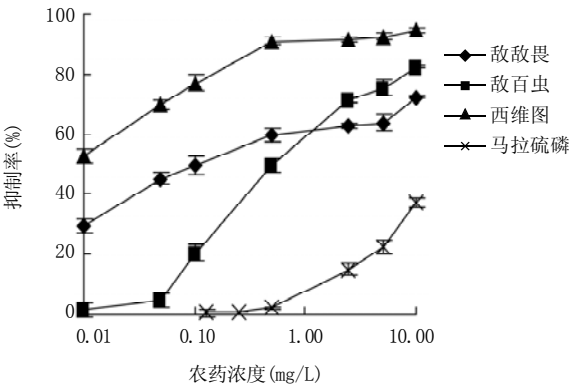


图2 不同农药浓度对固定化鸡肝酯酶的抑制
Fig.2 Inhibition rate of immobilized free esterase of chicken liver at different concentrations of pesticides

用固定化酶具有与游离酶相类似的对农药抑制的响应,即在一定浓度范围内,农药浓度对数值与酶活抑制率之间有较好线性关系。值得特别指出的是,与上面游离酶试验结果(见表2)相比,除对敌百虫的检测下限影响不大外,固定化鸡肝酯酶对其余三种农药的(实测到的或线性外推到的)检测下限均有程度不同的下降。敌敌畏、马拉硫磷和西维因的检测下限分别由游离酶检测时的0.001、4.34和2.52mg/L,降低到了用固定化酶检测时的0.00004、0.0004和0.78mg/L。许学勤等人^[15]和Lea Pogacnik^[13]报道过类似的固定化酯酶可降低农药检测下限值的实验结果。由于国标^[16]中规定的敌敌畏、马拉硫磷、西维因和敌百虫四种农药在果蔬中的最大残留限量分别0.2mg/kg、不得检出、2.0~2.5mg/kg和0.1mg/kg,因此根据表4的数据,应用固定化鸡肝酯酶不仅可满足国标要求,而且可允许样品预处理过程有较大的浓度变化(如对样品中农药提取时必要的稀释作用)。由于样品提取液可适当稀释,固定化酶应用于比色法检测时,也有可能降低背景色素成分对检测的潜在干扰。

3 结 论

通过敌敌畏、敌百虫、马拉硫磷和西维因四种农药对游离和固定化鸡肝酯酶的抑制试验及比较,发现鸡肝酯酶可用于有机磷和氨基甲酸酯类农药的检测;采用离子交换法固定鸡肝酯酶,不仅不会影响农药对鸡肝酯酶的抑制,反而降低了农药的检测限。但若若要得出量的检测数据,必需选择合适的农药作为定量标准。

参考文献:

- [1] 林玉锁, 龚瑞忠, 朱忠林. 农药与生态环境保护[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 57-59.
- [2] 唐除痴, 李煜昶, 陈彬. 农药化学[M]. 天津: 南开大学出版社, 1998: 18-25.
- [3] IVANOV A N, EVTUGYN G A, GYURCSANYI R E. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 404: 55-65.
- [4] NEUFELD T, ESHKENAZI I, COHEN E. A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, 15: 323-329.
- [5] VILLATTE F, MARCEL V, ESTRADA MONDACA S. Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, 13(2): 157-164.
- [6] KUMARAN S, MORITA M. Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil[J]. *Talanta*, 1995, 42(4): 649-655.
- [7] 余孝颖, 雷晟. 胆碱酯酶场效应管传感器[J]. *分析化学*, 1996, 24(5): 521-524.
- [8] BAKER J E, FABRICK J A, ZHU KY. Characterization of esterases in malathion-resistant and susceptible strains of the teneral parasitoid *Anisopteromalus calandrae*[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28: 1039-1050.
- [9] 韩承辉, 谷巍, 王乃岩, 等. 快速测定水中有机磷农药方法的研究[J]. *环境化学*, 2000, 19(2): 187-189.
- [10] 李治祥, 翟延路. 应用植物酯酶抑制技术测定蔬菜水果农药残留量[J]. *环境科学学报*, 1987, 7(4): 472-478.
- [11] 张慧君, 许学勤, 徐斐, 等. 用于农药残留快速检测的两种酶的比较[J]. *分析化学*, 2004, 32(11): 1517-1520.
- [12] VAN A K, et al. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method[J]. *J Ins Physiol*, 1962(8): 401-416.
- [13] LEA P, MLADEN F. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, 14(6): 569-578.
- [14] RAININA E I, et al. The development of a new biosensor based on recombinant *E. coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 1996, 11(10): 991-1000.
- [15] 许学勤, 徐斐, 华泽钊. 用于有机磷农药残留快速检测的固定化小麦酯酶研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(5): 122-125.
- [16] 中国标准出版社第一编辑室. 农药残留国家标准汇编[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.



信 息

波兰发现胶原质可保持肉类营养

波兰农业大学的研究人员发现:往肉里注射胶原质可保持肉类营养,抑制碘和V B₁的流失。

研究者发现在储存和烹饪肉制品时,猪肉肉丸可能失去一定百分比的碘和V B₁。英文《农业与食品科学杂志》报道,通过增加胶原纤维和胶原质水解产物可以使肉里的碘化钾得到饱和,这种方法比使用精制碘盐的方法更加有效。胶原质能使鲜肉保持一定的营养,它也适合被用作冷冻储存的肉类。

在研究中,胶原质被加入到肉球里,充当碘盐的作用。在储存和烹饪这些肉球的时候,对碘和V B₁的含量水平进行测定。结果显示,他们都被保存在肉里。

V B₁能帮助人体细胞把碳水化合物转变成能量。在许多食物中都可以被发现,例如,瘦肉,特别是猪肉。缺少V B₁将导致神经紧张、虚弱、疲劳、甚至精神疾病。

缺碘可以引起碘失调病症(IDD),例如:它可以阻碍智力的发展,在许多国家都是一个亟待解决的大问题。这项研究将帮助一些缺碘国家免除疾病的困扰。

国际缺碘病症委员会(ICCID)的教授Hans Burgi称,食物中的碘很不稳固,但没必要在所有的肉中都加入胶原质。在一些缺碘地区,胶原质可能更大程度的帮助他们。