

采用酶抑制法检测大枣中的农药残留

雷甜甜^{1,2,3}, 刘世军^{1,2,3*}, 唐志书^{1,2,3}, 唐绒绒^{1,2,3}, 王 锦^{1,2,3}, 刘垚润^{1,2,3}

(1. 陕西中医药大学/陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712083; 2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712083; 3. 陕西省风湿与肿瘤类中药制剂工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712083)

摘要:目的: 大枣中可能含有有机磷及氨基甲酸酯类的农药残留成分, 使用酶抑制法测其农药残留。方法: 大枣样品经乙酰胆碱酯酶水解后, 在分光光度计 412nm 处测定吸光度求得抑制率, 判断是否含有农药残留。结果: 经检测, 五种大枣样品的抑制率均小于 70%, 为阴性。结论: 该方法具有操作简便、快速、测定方法易于掌握的优点。

关键词: 大枣; 农药残留; 酶抑制法

素有“天然维生素丸”之称的大枣, 具有补中益气, 养心安神的功效^[1]。民间有“日食三颗枣, 百岁不显老”之说。常食大枣可治疗脾胃虚弱、食少便溏、失眠等疾病^[1]。随着社会的发展, 人们保健意识的增强, 大枣中的农药残留也逐渐被人们关注, 若大枣中含有大量有机磷及氨基甲酸酯类农药残留成分则会直接导致食用者中毒; 少量则会堆积在人体, 富集到一定量, 导致人们患病。如何方便快捷的检测大枣中农药残留量是如今亟待解决的问题。目前, 我国常见的快速检测农药残留的技术有酶抑制法、免疫分析法、活体生物测定法和生物传感器法等。上述四种检测农残的方法各有优缺点。酶抑制法是现阶段常用的有机磷和氨基甲酸酯类农药的快速检测方法, 且具有检测速度快、成本低、操作简单的优点, 所以得到了广泛应用, 中华人民共和国卫生部在 2003 年就将此方法制定为蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药快速检测的国标方法。酶抑制法检测大枣农残未见文献报道, 本实验即是通过酶抑制法测得大枣样品 3min 前后吸光度之差来确定其是否存在农药残留问题。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 缓冲溶液(30.0014 g 十二水磷酸氢二钠与 4.1632 g 二水磷酸二氢钠用 1 000 mL 蒸馏水溶解); 乙酰胆碱酯酶(Size: 50 mg Activity: 200 $\mu \cdot g^{-1}$); 底物: 25 mg 碘化硫代乙酰胆碱

(Size: 1g Purity: $\geq 98.0\%$) 用 3 mL 缓冲液溶解; 显色剂: 160 mg DTNB(Size: 1 g) 与 15.6 mg 碳酸氢钠用 20 mL 缓冲液溶解^[2](以上试剂均由索莱宝公司提供); 五种大枣样品均购自咸阳嘉惠市场。

1.1.2 仪器 HH-2 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司), FA2004B 电子天平(准确度为 0.0001 g, 上海佑科仪器仪表有限公司), UV-2600 紫外分光光度计(岛津)。

1.2 方法

1.2.1 检测原理 此方法是模拟生物的中毒机理, 利用生物中枢和周围神经系统中乙酰胆碱酯(AChE)的活性能被有机磷、氨基甲酸酯类农药专一性地抑制, 而造成神经传导介质胆碱的积累进而影响其正常传导使生物中毒。若样品中农药残留含量较高, 则会抑制酶的活性, 基质不能被水解, 样品中加入的显色剂就不显色或颜色变化很小; 若样品中农药残留含量较低, 则不会抑制酶的活性, 基质能被水解, 水解产物与样品中的显色剂就会发生颜色变化。用分光光度计在特定波长下测定反应前后 3 min 吸光度的变化, 计算出抑制率进而就可判断该样品中的农药残留是否超标^[3]。

1.2.2 检测步骤 实验组: 取 0.2 g 样品切碎, 放入提取瓶中, 加入 50 mL 缓冲液, 振荡 2~3 min, 倒出提取液, 抽滤, 取 3 mL 溶液于小试管中, 加入 50 μ L 酶, 50 μ L 显色剂, 混匀后, 于 38 $^{\circ}$ C 下培养 30 min, 加入 50 μ L 底物, 混合摇匀倒入比

收稿日期: 2017-08-01 修回日期: 2017-10-11

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目(201610716009/2152); 省级项目(2015KTCL03-14); (15JF001); (2015FWPT-01); [陕财(2013)171号]。

第一作者简介: 雷甜甜(1994-), 女, 陕西合阳人, 陕西中医药大学 14 级中药制药本科生。

通信作者: 刘世军(1974-), 男, 高级工程师, 博士, 主要从事中药饮片炮制工艺、制剂工艺、物质基础与质量标准研究。

色皿中,立即放入仪器的样品皿中关闭样品池盖,于 412 nm 波长下比色^[4]。

对照组:取 3 mL 缓冲液,其它步骤同实验组相同,得出空白对照溶液。

1.2.3 结果计算

$$\text{抑制率}(\%) = [(\Delta A_0 - \Delta A_t) / \Delta A_0] \times 100\%^{[5]}$$

式中 ΔA_0 对照组 3 min 后与 3 min 前吸光度之差

ΔA_t 实验组 3 min 后与 3 min 前吸光度之差

2 结果分析

表 1 检测大枣中农药残留结果(酶抑制法)

样品	对照组 ΔA_0	A_1 (3min 前吸光度值)	A_2 (3min 后吸光度值)	抑制率/%	结果
样品 1	0.338	0.500	0.826	3.55	阴性
样品 2	0.362	0.560	0.847	20.72	阴性
样品 3	0.348	0.540	0.818	20.11	阴性
样品 4	0.351	0.665	0.916	28.49	阴性
样品 5	0.377	0.922	1.139	42.44	阴性

2.2.2 结果分析 从表 1 可知,每个样品的对照组 ΔA_0 均不同,这是由于时间上存在差异导致测得的吸光度不同;且抑制率均 $<50\%$,说明所购大枣样品中不存在有机磷或氨基甲酸酯类农药,本实验中由于称取 4 g 大枣样品所得的样品液的吸光度值不稳定,进行了样品的稀释,通过实验确定比例为 0.2 g:50 mL 缓冲液为最佳测定条件。

3 评价

采用酶抑制法检测农药残留可以有效地防止市场上劣质大枣的存在,防止人们食用大枣农药中毒事故的发生,加强了批发市场上大枣的管理,威慑药农滥用农药的行为,对提高大枣质量有重大的参考作用。但该方法所用试剂贮放严格,需严格按照说明书进行贮放,否则会使试剂失效。且该方法只能检测有机磷和氨基甲酸酯类农药,不能用于检测其它类型的农药。

4 讨论

配制缓冲液时,需注意磷酸盐试剂是否含结晶水,若含有结晶水则需进行适当换算,且配制缓冲液必须用蒸馏水或纯净水,否则会影响准确性。配制好的酶试剂及底物要在 2~8℃ 温度条件下保存,以确保酶的活性,因此,应在冰箱中保存,但不能冻至结冰。水浴后的溶液加入底物后,应立

2.1 实验结果判定

当抑制率小于 50% 时,结果为阴性,基本上说明不含氨基甲酸酯类或有机磷类农药残留;当抑制率大于等于 50% 时,结果为阳性,说明氨基甲酸酯类或有机磷类农药肯定存在^[5](抑制率的范围一般在 $-10\% \sim 110\%$ 之间)。检测结果一旦超出此范围,则说明操作过程有失误的地方,故需要重新检测^[4]。

2.2 实验结果及结果分析

2.2.1 实验结果 分别对五种大枣样品进行测定,每组样品测量 4 组,取平均值,求出抑制率。

马摇匀,放入测定仪器内,否则会影响数据准确性。每个实验组应测定 4 组数据,求得平均值以减少误差。

乙酰胆碱酯酶根据酶活性情况按要求用缓冲液溶解,空白 ΔA 值控制在 0.3 以上,如果 $\Delta A < 0.3$,则表明酶活性不够。应该通过增加水浴温度、延长水浴时间、调节酶浓度、加入激活剂等方法来调节。

参 考 文 献:

- [1] 刘世军,唐志书,崔春利,等. 大枣化学成分的研究进展[J]. 云南中医学院学报,2015,38(03):96-100.
- [2] 黄狮,庄建玲,张君,等. 农药残留快速检测技术的研究进展[J]. 南方农业,2014,(36):157-159.
- [3] 王志波. 酶抑制法检测蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留以及对该检测方法的评价[J]. 长江蔬菜,2009,(18):73-74.
- [4] 杨东鹏,张春荣,董民,等. 酶抑制分光光度法检测蔬菜上有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的方法的研究[J]. 有机农业与食品科学,2004,20(04):58-61.
- [5] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.199-2003 蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量的快速检测[S]. 北京:中国标准出版社,2003.