

基于酶抑法的农产品农药残留快速检测系统及影响因素分析

裘正军, 陆江峰, 何 勇^{*}

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310029)

摘 要: 为快速检测农产品农药残留, 开发了基于酶抑制法的农产品农药残留快速检测系统。该检测系统由固体光源、样品池、单片机测量电路板及微机等组成, 通过测量经酶抑制反应后样品液的吸光度值实现农产品中农药残留的快速检测。研究了吸光度随反应时间的变化关系、温度对酶活性的影响及农药残留浓度与酶抑制率的关系。结果表明吸光度随反应时间逐渐增加, 反应前期增速快, 线性度好, 适合测量; 酶在 20~ 40℃ 时具有最佳的活性, 灵敏度高; 农药残留对酶的抑制作用明显, 当抑制率高于 70% 时可判定农药残留超标。

关键词: 农药残留; 检测系统; 酶抑法; 酶抑制率; 单片机

中图分类号: S481+.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2007)9-0229-05

裘正军, 陆江峰, 何 勇. 基于酶抑法的农产品农药残留快速检测系统及影响因素分析[J]. 农业工程学报, 2007, 23(9): 229 - 233.

Qiu Zhengjun, Lu Jiangfeng, He Yong. Rapid detection system development and influence factor analysis for pesticide residues in agricultural products by enzyme inhibition method[J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(9): 229- 233. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

农药是现代农业生产中不可缺少的生产资料, 其广泛应用大大提高了农作物的产量。但是农药过量不合理的使用对生态环境和人体健康造成了威胁, 农药残留的危害已经引起了人们的高度重视^[1-3]。目前在农产品中使用的化学农药以有机磷、氨基酸脂类农药为主, 这两类农药对人体都有较高毒性。研究适合现场快速检测果蔬等农产品中农药残留的检测仪器和系统, 对于保障农产品和食品安全具有重要的意义。

国内外农药残留的检测技术可分为化学检测、生化检测和生物检测三大类, 目前研究较多的有色谱分析法^[4-6]、免疫分析法^[7,8]、生物传感器法^[9-11]、酶抑制法^[12-14]等。色谱分析法可分为气相色谱、高效液相色谱、气-质联用等分析技术, 测量准确性高, 但仪器投资大, 对操作人员要求高, 不适合现场检测。免疫分析法是将抗体抗原反应与现代检测手段相结合的超微量分析

法, 具有操作简单、灵敏度高、检测费用低等优点, 但是研发过程长、抗体制备难度大, 只适用于单一农药残留量的检测分析。生物传感器法是将传感器技术与农药免疫技术相结合的一种技术, 根据敏感物质可分为酶传感器、微生物传感器、组织传感器、基因传感器、免疫传感器等, 它具有检测灵敏度高、反应时间短、仪器自动化程度高等特点, 但在分析结果的稳定性和使用寿命等方面还需进一步研究。

酶抑制法是利用有机磷农药的毒理特性建立的一种快速检验方法, 具有检测速度快、成本低、操作简单等特点。本研究采用酶抑制法来检测农产品中的农药残留, 研究了反应时间、温度、农残浓度对酶水解反应的影响关系, 开发了基于光吸收度的快速测量仪, 实现农产品中农药残留的快速检测。

1 系统原理与硬件设计

1.1 测量原理

本研究采用酶抑制法检测农药的残留。酶抑制法是一种简便、灵敏、经济的快速检测方法。该方法是根据有机磷和氨基甲酸酯类农药能抑制昆虫的中枢和周围神经系统中乙酰胆碱酯酶(AchE)的活性, 造成神经介质乙酰胆碱(Ach)的积累, 使昆虫中毒致死这一毒理学原理对农药残毒进行检测。如果样品提取液中不含农药残留或残留量很低, 酶的活性就不被抑制, 底物被水解, 水解产物与显色剂发生显色反应; 反之, 如果样品提取液中的农药残留量较高时, 酶的活性就被抑制, 底物不被

收稿日期: 2006-11-23 修订日期: 2007-08-18

基金项目: 十一五国家科技支撑项目(2006BAD10A04); 国家自然科学基金资助项目(30600371); 浙江省自然科学基金资助项目(Y505280)

作者简介: 裘正军(1971-), 男, 博士, 副教授, 主要从事农业信息化与自动化研究。杭州市凯旋路268号 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 310029。Email: zjqiu@zju.edu.cn

^{*}通讯作者: 何 勇, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农业机械化、信息化与精准农业研究。杭州市凯旋路268号 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 310029。Email: yhe@zju.edu.cn

水解或水解速度显著降低,当加入显色剂时就不显色或颜色变化很小。因此,农药残留量与显色反应后的颜色相关,通过测量反应液吸光度的变化,绘制标准曲线就可以检测农产品中有机磷或氨基甲酸酯类农药的残留情况。

通常以乙酰硫代胆碱(AsCh)作为水解反应的底物,在乙酰胆碱酯酶的作用下乙酰硫代胆碱被水解成硫代胆碱和乙酸,硫代胆碱和二硫双对硝基甲酸(DTNB)产生显色反应,使反应液呈黄色,在分光光度计 410 nm 处有最大吸收峰,可测得酶活性被抑制的程度。

1.2 系统总体结构

检测系统主要由固体光源、样品池、光敏传感器、数据采集器等组成,其结构如图 1 所示。

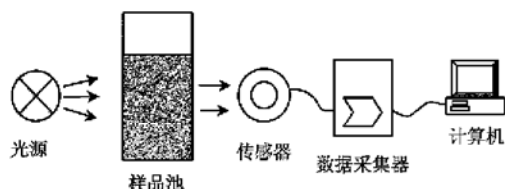


图 1 检测系统的结构

Fig. 1 Structure of inspecting system

光源使用波长为 410nm 的固体发光管,显色反应物在该波长光谱段具有最大的吸收率,灵敏度最高。与分光光度计相比,使用固体光源简化了光路的结构,降低了测量系统的成本。待测样品与试剂在样品池中进行水解显色反应,反应后的液体颜色深度与样品的农药残留相关。采用硅光电池检测透射光的强度,由数据采集器对传感器的输出信号进行采集和处理,计算出样品的吸光度值,并可通过 RS-232C 串行口将采集的数据实时地传送到 PC 机作进一步处理。

显色剂本身对光也有一定吸收作用,为了消除显色剂吸光率的影响,测量时需同时测量不加样品的参照溶液的吸光度值,然后再计算抑制率。

抑制率的计算过程如下:

1) 测量相对透射光强 S ;

2) 计算透光度

$$T = \lg^{(1/S)}$$

3) 计算吸光度

$$A = A_0 - T$$

式中 T_0 ——初始透光度; T ——当前透光度。

4) 计算抑制率

$$I = \frac{(A_R - A_S)}{A_R} \times 100\%$$

式中 A_R ——参照溶液吸光度; A_S ——样品溶液吸光度。

1.3 数据采集器设计

数据采集器的功能为检测样品溶液的透光度,计算出样品对酶水解反应的抑制率,判断农药残留是否超标,再将测量结果显示在 LCD 屏或从微型打印机输出,还具有与计算机联机通讯的功能。数据采集器的结构如图 2 所示。

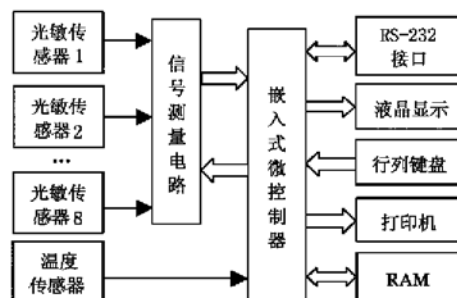


图 2 数据采集器结构

Fig. 2 Data logger based on micro-controller

数据采集器是一个以 Atmel 公司的 AT89S52 微控制器为核心的智能测量系统,主要包括 6 个部分:

1) 光强测量通道。由光电传感器、信号测量电路组成。采用硅光电池作光敏传感器,信号测量电路包括多路模拟开关、放大器及 A/D 转换器。8 通道信号测量功能可同时测量参照样品和多个检测样品的吸光度。

2) 温度测量。温度会影响乙酰胆碱酯酶的活性,造成抑制率测量不准,系统通过对温度测量来校正测量数据。温度传感器使用 DALLAS 公司的 DS18B20 单线式数字式温度传感器^[15],温度测量范围为 $(-55 \sim +125)^\circ\text{C}$,测温分辨率为 0.5°C 。

3) 微控制器。AT89S52 是一款性价比很高的微控制器,内置 8K 字节的 FLASH ROM,看门狗定时器,全双工串行口。微控制器主要完成光强和温度的采集、处理、存储、显示、打印、通讯等功能。

4) 数据存储。数据存储采用内置电池的非易失性 RAM,关机掉电时 RAM 中的数据也不会丢失,总共可存储 1000 条检测记录。

5) 人机接口。设计了行列键盘,用于输入控制命令;采用 192×64 点阵式 LCD,显示数字、曲线、汉字及图形等;采用热敏式微型打印机打印测量结果。

6) RS-232C 通讯接口。通讯接口实现微控制器串行口的 TTL 逻辑电平与标准的 RS-232C 电平的相互转换,通过串行口可将测量数据上传到计算机中处理。

2 试验与讨论

2.1 吸光度随反应时间的变化

乙酰胆碱酯酶对底物的水解反应是一个渐进的过

程, 一般而言, 只要时间足够长, 酶就能将底物完全水解, 从而使吸光度达到最大值。图3为无农药残留样品液的吸光度值随反应时间的变化关系。

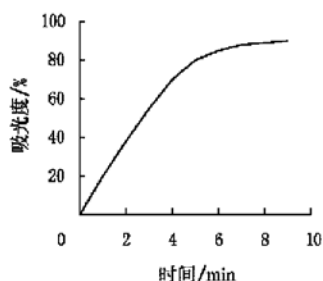


图3 吸光度随反应时间的变化

Fig. 3 Changes of light absorbency with time

从图3中可以看出, 样品液的吸光度值随着反应时间逐渐增加。在初始阶段吸光度值增加较快, 第5分钟时, 吸光度就达到80%左右, 说明在这一阶段水解反应速度快; 而在后期, 吸光度值变化缓慢, 第9分钟后吸光度基本不变, 表明酶的水解反应基本结束, 吸光度达到了最大值。

有机磷农药的存在会抑制酶的活性, 从而影响水解反应速度, 其表现为吸光度的增加速度变慢, 但只要时间足够长, 酶仍然可以将底物完全水解从而使吸光度达到最大值。因此, 反应结束时的吸光度值并不能够真实反映农药残留情况。从图3中可以看出, 反应初期吸光度值不仅上升快且基本呈线性增加, 农药残留的浓度对溶液吸光度的增加速度产生影响, 因此宜采用反应初期3~5 min时吸光度的变化值来计算抑制率。

2.2 温度对酶活性的影响

乙酰胆碱酯酶的活性受到多种因素的影响, 如温度、溶液的pH值、底物浓度等, 其中温度的影响最大。温度试验的目的是找出温度对酶活性的影响程度, 确定适宜的反应温度范围, 对检测数据进行温度校正。图4为乙酰胆碱酯酶在不同温度下的活性关系。

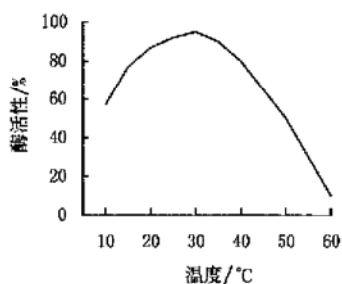


图4 温度对酶活性的影响

Fig. 4 Influence of temperature on AChE activation

从图4中可以看出, 随着温度的升高, 酶的活性逐渐增大, 在30°C左右时达到最高峰, 随后随着温度的增

加活性逐渐下降。因此, 过低的温度和过高的温度都会降低酶的活性, 而酶活性的降低会影响测量的灵敏度。最佳的测量温度应在20~40°C之间, 同时应对测量数据进行适当的温度校正, 才能得到准确的测量结果。

2.3 农药残留浓度与抑制率

甲胺磷、敌敌畏、克百威、灭多威是果蔬等农产品中主要的农药残留, 本试验研究了不同浓度的农药残留对酶抑制率的影响关系。将标准浓度的农药加蒸馏水稀释后得到不同浓度的待测样品液, 试验依据NY/T 448-2001《蔬菜上有机磷和氨基甲酸酯类农药残毒快速检测方法》的要求进行。图5、图6、图7和图8为这4种农药的试验结果图。

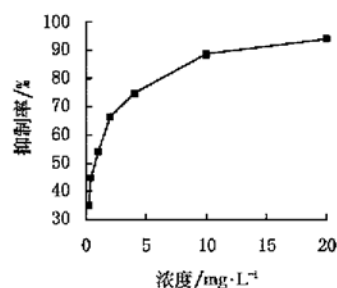


图5 甲胺磷浓度与抑制率

Fig. 5 Inhibition rate vs. concentration of methamidophos

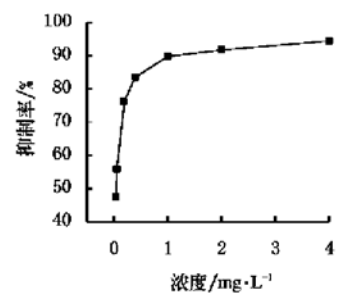


图6 敌敌畏农药浓度与抑制率

Fig. 6 Inhibition rate vs. concentration of dichlorvos

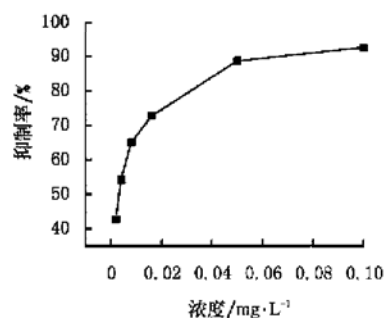


图7 克百威浓度与抑制率

Fig. 7 Inhibition rate vs. concentration of carbofuran

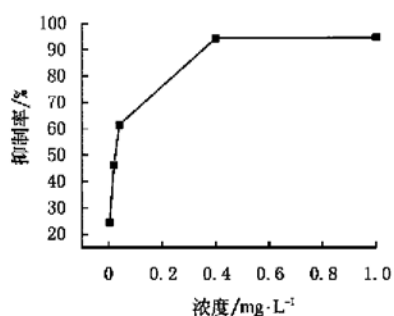


图8 灭多威浓度与抑制率

Fig. 8 Inhibition rate vs. concentration of methomyl

结果表明抑制率与农药残留浓度呈正相关,抑制率随着农药残留浓度的增加而提高,当浓度达到一定量后,抑制率接近100%。不同农药的毒性存在差异,对抑制率的影响也不同,达到同样抑制率时的农残浓度差异较大。根据农产品中农药残留的要求,当抑制率小于40%时,农药残留较低,可判定产品合格;抑制率在40%~70%之间时,为可疑农残超标产品,需复查确定;抑制率大于70%,农药残留浓度较高,可判定该农产品农药残留超标。实际应用时可对同一样品进行多次检测,确保测量的准确性。

3 结 论

1) 开发了基于酶抑制法的农产品农药残留快速检测系统,能同时测量多个样品液的吸光度值,具有自动检测、数据存储、温度校正、结果打印、联机通讯等功能。

2) 吸光度随水解反应时间不断增加,直至最大值,宜采用反应初期3~5 min时吸光度的变化量来计算酶抑制率,应同时测量参照液的吸光度值,提高测量的准确性。

3) 酶的抑制率与农药残留浓度密切相关,当抑制率大于70%时,农药残留浓度较高,可判定该农产品中农药残留超标。

4) 酶的水解反应受多种因素的影响,需要进一步研究最佳反应温度、最佳反应时间、底物浓度和样品液pH值的影响,提高测量的准确性。

[参 考 文 献]

- [1] 刘英东. 化学农药对环境的危害及其防止对策的探讨[J]. 中国环境管理干部学院学报, 2006, 16(1): 84-86.
- [2] 陈小帆, 荣晓东, 何日荣, 等. 国内外水果农药残留管理概况[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 18-21.
- [3] 吕建华, 安红周, 郭天松. 农药残留对我国食品安全的影响及相应对策[J]. 食品科技, 2006, 31(11): 16-20.
- [4] Irani Mukherjee, Madhuban Gopal. Chromatographic techniques in analysis of organochlorine pesticide residues [J]. Journal of Chromatography A, 1996, 754: 33-42.
- [5] Garrido Frenicha A, Martinez Vidala J L. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1048: 199-206.
- [6] 刘荔彬, 端裕树, 秦亚萍, 等. 农产品中多种残留农药的气相色谱质谱快速检测[J]. 分析化学, 2006, 34(6): 783-786.
- [7] 高宏斌, 许艇, 李季. 免疫分析方法在拟除虫菊酯类农药残留检测中的应用进展[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊): 425-428.
- [8] 何佳, 许泓, 林安清, 等. 农药残留免疫分析法[J]. 口岸卫生控制, 2006, 11(1): 6-8.
- [9] 蒋雪松, 应义斌, 王剑平. 生物传感器在农药残留检测中的应用[J]. 农业工程学报, 2005, 21(4): 118-122.
- [10] 袁永海, 李建平. 电化学生物传感器在农药检测中的应用[J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 121-127.
- [11] 郑艺华, 王芳芳, 许学勤, 等. 检测有机磷农药残留生物传感器的温度特性[J]. 农业工程学报, 2005, 21(1): 132-135.
- [12] Barry W Wilson, Daniel E Arrieta, John D Henderson. Monitoring cholinesterases to detect pesticide exposure [J]. Chemico-Biological Interactions, 2005, 157: 253-256.
- [13] 曾小岚, 张歆, 付东立, 等. 酶抑制法测定蔬菜中的有机磷农药[J]. 环境监测管理与技术, 2004, 16(6): 12-14.
- [14] 温艳霞, 李建科. 酶抑制法在农残检测中的应用及乙酰胆碱酯酶的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 130-132.
- [15] 孙少伟, 戴义保, 章高琴. 基于DS18B20组网测温的研究[J]. 自动化仪表, 2006, 27(10): 42-45.

Rapid detection system development and influence factor analysis for pesticide residues in agricultural products by enzyme inhibition method

Qiu Zhengjun, Lu Jiangfeng, He Yong^{*}

(College of Bio-systems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In order to detect the pesticide residues quickly in farm products, a rapid detection system was developed to determine the pesticide residues in agricultural products based on the inhibition of organophosphates against acetylcholinesterase. The system mainly consists of a solid light, a sample container to store the liquid, a micro-controller based testing circuit and a personal computer. The amount of pesticide residues was determined by measuring the light absorbency of the sample liquid after inhibition reaction. The changes of light absorbency with reacting time, the influence of temperature on the activity of enzyme, and the relationship between the concentration of pesticide residues and the inhibition rate of enzyme were investigated. The results show that the light absorbency increases with reacting time, and the increment is much higher in initial reacting period; the enzyme has good performance at the temperature of 20~40℃; the inhibition rate of pesticide residues on the activity of enzyme is distinct, and it can be determined that the pesticide residues exceed the normal level when the inhibition rate exceeds 70 percent.

Key words: pesticide residues; detection system; enzyme inhibition method; enzyme inhibition rate; single-chip microcomputer