

农药残留生物快速检验方法(综述)

杨大进 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

农药残留的理化分析方法是基于农药本身的化学性质或结构特点进行分析的方法,是农药残留工作人员首先考虑建立的方法。理化分析方法不仅在发达国家,而且在发展中国家也被普遍采用。一般仲裁方法或标准方法均采用理化分析方法。为了在理化分析方法中避免干扰物质的影响,对试样的前处理普遍要求比较高,因此费时、费试剂,局限于实验室使用。农药残留的生物测定方法是利用生物的生理生化反应来判断农药残留的含量以及农药污染的情况,在测定时无需前处理或前处理比较简单、速度快、直观,但假阳性、假阴性情况可能会出现,有些方法几乎适用于所有农药品种、而有些方法却又具有极强的特异性,故常被作为快速检验方法在食物中毒或在现场中使用,因此这些方法在特定的场合具有一定的使用价值。农药的快速测定方法一直是困扰农药科学工作者的一道难题,工作开展了很多但收效并不大,我国近些年在农药残留的快速检验方法方面的新技术、新成果不多,国外近些年有不少应用分子生物学的方法出现,值得我们借鉴,现就国内外的农药残留生物快速检验方法作一介绍。

1 活体生物测定法

1.1 发光细菌体内的荧光素在有氧参与时经荧光酶的作用会产生荧光,但当受到某些有毒化合物作用时发光会减弱,其减弱的程度与毒物的浓度呈一定的线性相关关系,利用这一特点对农药残留试样进行测定。

袁东星向发光菌冻干粉中加入 3% 的 NaCl 溶液激活发光菌,试样同样以 3% 的 NaCl 溶液超声提取,向提取液中加入发光菌后 15min 即可检测发光强度,方法的最小检出浓度为 3 mg/L。⁽¹⁾目前,该方法已能测定甲胺磷、水胺硫磷、氧化乐果、敌敌畏、辛硫磷、甲基异柳磷等常用有机磷农药。

该方法的优点是快速、简便、灵敏、价廉,适用于现场,缺点是农药浓度与发光强度的线性关系不够准确,因此只能半定量。

1.2 以实验室饲养的敏感性家蝇为试验材料,以这种家蝇接触供试食品后的中毒程度来表示该种食品的含毒程度。这种方法可以用来对食品中杀虫剂、杀

菌剂、除草剂以及其他污染物进行测定。家蝇是一种容易饲养、尤其对拟除虫菊酯农药敏感性高的理想试验昆虫,在美国等发达国家普遍使用该方法。我国在这方面也进行了大量工作,中国农业科学院植物保护研究所的王政国进行了大量研究工作并选育出了一种敏感性高的家蝇品系。⁽²⁾

具体做法是在 25℃ 左右,相对湿度在 70% 的试验条件下,将 10 g 捣碎混匀的试样平分于两个试验瓶中,将试样平铺在瓶底上,对含水量大的蔬菜、水果先在瓶底铺上滤纸,然后将捣碎的试样铺在滤纸上。从家蝇笼中取经二氧化碳麻醉后的三日龄家蝇成虫移入试验瓶中,每瓶 50 头,3 h 后观察家蝇的死亡情况。同时以未施农药的该种食品试样作为对照。

结果的判定见表 1。

表 1 家蝇的死亡率与农药残留之间的关系

组别	死亡率 %	表示结果
对照组	0	家蝇及方法无问题,结果可靠
	>0	家蝇或方法有问题,结果不可靠,需重做
试验组	0~4	安全或比较安全
	5~10	可能会有农药残留超过限量标准
	11~100	农药污染严重

该方法的优点是对产品中各种有毒物质均可进行测定,无需仪器、无需前处理,灵敏度比较高,缺点是最好要有与该产品同时种植的未施农药的产品作为对照方能保证结果的准确,此外只能估算食品中有毒物质的量。

2 生物测定法

这一测定方法基于某些农药能抑制中枢和周围神经系统中乙酰胆碱酯酶(Ache)活性,造成神经传导介质乙酰胆碱(Ach)的积累,影响正常的神经传导,使昆虫中毒而致死的这一生化反应原理。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。这一方法的应用已有相当长的历史,至今仍有相当的使用价值,可适用于多种农药。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少,酶的活性就不被抑制,基质可以水解,水解产物通过使用显色剂或本身具有颜色而显色;反之,如果农药残留量比较高,酶的活性就会被农药所抑制,基质就不水解,从而不显色。薄层法和纸片法通过显色程度或斑点大小、称重、溶出法可以进行定性或半定量分析。比色法可采用吸光度值来计算胆碱酯酶的抑制率,一般认为抑制率在 16% 以上者残留量比较高。^(3,4)

常用的酯酶可以有:牛、猪等家畜的肝脏酯酶、人血浆或血清、马血清、蝇或蜜蜂头的脑酯酶、兔或鼠的羧酸酯酶等。^(5,6)酶的制备方法与酶源有关,这方面的报道比较多,其中台湾农业试验所郑允的从家蝇头中分离出乙酰胆碱酯酶,制成粉状酶,稳定、储存方便,值得借鉴。⁽⁷⁾

乙酸羟基吡啶、乙酸-5-溴-羟基吡啶、乙酸萘酯或羧酸酯、氯化、溴化或碘化乙酰胆碱、靛酚乙酸酯等可以作为酶的基质。^(8~11)

显色分为以下几种情况,(1)利用乙酰胆碱水解产物为乙酸和胆碱,通过酸碱指示剂溴百里酚蓝与乙酸作用,农药残留高时显蓝色、无农药或农药残留低时显黄色进行区别;(2)利用基质乙酸-β-萘酯水解产物β-萘酚与显色剂固蓝 B 作用形成紫红色偶氮化合物;(3)利用乙酸羟基吡啶水解产物吡啶酚自身氧化成靛蓝而显蓝色;(4)利用靛酚乙酸酯水解产物本身有色的特点。

生物化学法检测农药的灵敏度与使用的酶、所利用的显色反应以及反应时间、反应温度有密切的关系(酶、基质、显色剂与灵敏度的关系见表 2),⁽¹²⁾反应时间对检测灵敏度的影响可认为反应时间延长一倍、灵敏度可提高一个数量级,每此反应的温度均应保持恒定故在实际应用时要对各种条件加以选择。

表 2 酶、基质、显色剂对灵敏度的影响(以西维因为例)

酶	基质与显色剂	最小检出量 ng
鼠肝酯酶	乙酸萘酯+固蓝 B	0.50
猪肝酯酶	乙酸靛酯	0.05
人血浆	氯化乙酰胆碱+溴百里酚蓝	200.00
牛肝酯酶	乙酸-5-溴-羟基吡啶	5.00
蜜蜂脑酯酶	乙酸靛酯	0.001

该方法的优点是能对抑制胆碱酯酶的农药品种

进行快速灵敏地检测、前处理简单、检测时间短、所需仪器设备简单,适用于现场测定,缺点是使用的酶、基质和显色剂有一定的特异性,需控制的条件比较多。

3 分子生物学法

该方法利用化学物质在动物体内能产生免疫抗体的原理,将小分子农药化合物与大分子生物物质结合成大分子,并使之在动物体内产生抗体,对抗体筛选制成试剂盒,通过抗原、抗体之间发生的酶联免疫反应(ELISA 反应),依靠比色来确定农药的残留量。

国内近年来已由北京农业大学研究出杀菌剂阿维菌素 Avermectin B₁、⁽¹³⁾三氮苯类除草剂莠去净、西玛津、扑草净⁽¹⁴⁾等抗体,农业部环境保护研究所研究了杀虫剂对硫磷的抗体,⁽¹⁵⁾但均未克隆,故尚无正式产品。国内已研制出的抗体具有较高的检测水平,例如,莠去净最小检出浓度达 1 ng/mL,西玛津可达 0.5 ng/mL,而且均具有特异性。国外在这方面研究的时间比较长,并认为这是一个发展方向。美国农业部指出要对没有特异性快速检测方法的拟除虫菊酯类、环戊二烯类、敌菌灵类农药发展 ELISA 法。美国目前使用的 ELISA 试剂盒对有机磷类农药普遍的最小检出浓度达 20 μg/kg,对氨基甲酸酯类农药普遍的最小检出浓度达 300 μg/kg,分别达到其 MRL 值的一半。^(16,17)日本环境毒理学研究所 Machiko SAKA 等人使用美国 Ohmicron 公司生产的呋喃丹、灭多威、毒死蜱 ELISA 试剂盒进行了对照试验,苹果、日本夏橙、甘蓝试样使用甲醇提取、磷酸缓冲液稀释后进行 ELISA 测定,结果显示低浓度水平结果不准确,较高浓度测定结果可靠,该方法与丙酮提取, C₁₈、Florisil 净化,气相色谱分析的方法相比测定结果略低,三种农药的最小检出量分别达 0.1、0.5、0.2 μg/L。目前,已有不少成品试剂盒进入我国市场,据提供的资料包括对二恶英、多氯联苯等 9 种工业废物,对六六六、滴滴涕、杀螟硫磷、地亚农、对硫磷等 15 种杀虫剂,2,4-D、甲草胺等 16 种除草剂以及目前使用普遍争议较大的瑞毒霉、腐霉利等 4 种杀菌剂进行检测的酶联免疫试剂盒。成品酶联免疫试剂盒使用起来很简单,试样只需捣碎用甲醇提取即可。试剂盒既有使用测试管,使用配套的分光光度计检测的,也有针对大量试样检测的多孔板型,使用酶标仪进行检测的。最小检出量一般可达 μg/kg 水平,有些农药品种甚至可到 ng/kg 水平。

分子生物学法的优点是特异性强、灵敏度高、快速简便,可准确定性、定量,适用于现场,缺点是由于

制备抗体比较困难,因此目前抗体数量还较少,如果在不能肯定试样中的农药品种的情况下,检测具有一定的盲目性,此外有可能出现假阳性或假阴性现象。

4 参考文献

- 1 袁东星,等. 蔬菜中有机磷农药残留的发光菌快速测定. 环境化学, 1997, 16(1): 77~81
- 2 梁同庭. 蔬菜中农药残毒配套监测技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1990, 27~28
- 3 高希武. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识, 1987, 24(4): 245~246
- 4 Mannlis S, et al. Acetylcholinesterase of aphiscitricola. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1981, 15: 267~274
- 5 Winterlin W, et al. Detection of cholinesterase-inhibiting pesticide following separation on Thin-layer Chromatograms. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1968, 16(5): 808~812
- 6 Mendoza C, et al. Enzymatic detection of ten organophosphorus pesticide and carbaryl on Thin-layer Chromatograms. Analyst, 1968, 93: 34~38
- 7 郑允. 生化法检验杀虫剂残毒之简介. 台湾农业试验所, 1985
- 8 Bauyun P, et al. The detection of organophosphorus pesticides

- on thin-layer chromatograms. Analyst, 1964, 89 (1062): 615~618
- 9 Mendoza C, et al. Enzyme inhibition and chromatographic techniques comparative studies and application to pesticide residue analysis. International Journal of Environment Analytical Chemistry, 1974, 3: 171~183
- 10 Gunter Z. Analytical method for pesticide and plant growth regulators. Academic Press, 35~40
- 11 深圳天福贸易有限公司. 农药速测卡应用指南, 4
- 12 樊德方. 农药残留量分析与检测. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 46~47
- 13 李俊锁,等. 梨中 Avermectin B₁ 残留的酶联免疫吸附测定. 植物保护学报, 1996, 23(4): 333~337
- 14 单国明,等. 三氮苯类除草剂的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法研究. 中国农业大学学报, 1997, 1(3): 52~58
- 15 刘长武,等. 对硫磷的人工抗原合成与鉴定. 环境科学学报, 1992, 12(3): 377~381
- 16 Pesticid residue rapid test development by USDA. Pesticide and Toxic Chemical News, 1991, 19(13): 14
- 17 Machiko SAKA, et al. Analysis of pesticide residue in agriculture products by magnetic particle ELISA. Japan - America Pesticide Residue Work. Tokyo. 1996, 9: 152~153

毛细管电泳技术及其在食品化学领域的应用(综述)

王竹天 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

刘 宁 辽宁省食品卫生监督检验所 (110005)

毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE), 又称高效毛细管电泳(HPCE), 是八十年代后期分析化学, 特别是分析生物化学的重大进展, 是九十年代最有影响的分离手段之一, 它有高效、快速、微量和易于自动化等特点, 被认为是对传统电泳技术的重大突破。

CE 是经典电泳技术和现代微柱分离相结合的产物, 和 HPLC 比较具有柱效高、试样和流动相用量少, 分析速度快等特点。由于其符合了以生物工程为代表的生命科学各领域中对多肽、蛋白质、核苷酸及脱氧核糖核酸的分离的要求, 近几年来得到迅速发展。由于 CE 在分析领域里的发展前景广阔, 渗透于分析化学各领域, 在食品化学应用方面也不断发展, 能够在不同基质食品中分析有机酸、蛋白质、阴阳离子、食品添加剂、农药残留、毒素、维生素等几乎所有食品卫

生要求的范围。

CE 的基本原理和分离模式

CE 统指以高压电场为驱动力, 以毛细管为分离通道, 依据试样中各组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术。在电解质溶液中, 带电粒子在电场作用下, 以不同的速度向其所带电荷相反方向迁移的现象叫电泳。在电场作用下, 双电层中的水合阳离子引起流体整体朝负极方向移动的现象叫电渗。CE 所用的石英毛细管柱在较大 pH 值范围内(pH>3)其内表面带负电, 和溶液接触时形成硅-溶液双电层。粒子在毛细管内电解质中的迁移速度等于电泳和电渗流 EOF 两种速度的矢量和。阳离子的移动方向和电渗流一致, 最先流出; 中性粒