

有机磷农药快速检测方法的研究进展

张少恩, 桑丽雅*, 王振国, 陈青州, 杨中飞, 陈笑笑, 王伟萍

(杭州南开日新生物技术有限公司, 杭州 311215)

摘要: 目前有机磷农药在农业生产中应用广泛, 但是其在食品、水及环境中的残留对人体产生较严重的健康威胁。传统的检测方法比较耗时, 且需要大型仪器设备, 不适合现场测定, 因此有机磷农药的快速检测方法的开发十分重要。本文综述了免疫分析法、酶抑制法及生物传感器法在有机磷农药检测中的应用, 以期为相关检测人员的工作和对有机磷农药残留的快速检测方法的继续研究提供参考。

关键词: 有机磷农药; 免疫分析法; 酶抑制法; 生物传感器

Research progress on rapid detection methods of organophosphorus pesticides

ZHANG Shao-En, SANG Li-Ya*, WANG Zhen-Guo, CHEN Qing-Zhou, YANG Zhong-Fei,
CHEN Xiao-Xiao, WANG Wei-Ping

(Hangzhou NanKai Biotech Co., Ltd., Hangzhou 311215, China)

ABSTRACT: At present, organophosphorus pesticides are widely used in agricultural production, but their residues in food, water and the environment pose serious health threats to the human body. The traditional detection method is time-consuming and requires large-scale instruments and equipment, which is not suitable for on-site measurement. Therefore, the development of rapid detection methods for organophosphorus pesticides is very important. This paper reviewed the applications of immunoassay, enzyme inhibition and biosensor methods in the detection of organophosphorus pesticides, in order to provide references for the work of relevant testing personnel and the continued research on rapid detection methods of organophosphorus pesticide residues.

KEY WORDS: organophosphorus pesticide; immunoassay; enzyme inhibition method; biosensor

1 引言

由于人口的增加和经济的发展, 全球农业生产与果蔬消费都有着显著增加。果蔬中常用的农药包括有机磷酸酯、有机氯、氨基甲酸酯、三嗪等^[1,2]。在工业化生产过程中, 这些农药及其代谢产物会在食品、水和土壤中有所残留。其中, 有机磷农药(organophosphate pesticide, OP)可以通过与乙酰胆碱酯酶结合起作用, 破坏神经功能, 导致瘫痪和死亡, 其结构如图 1 所示^[3]。一般人群主要通过使用受污染的食物(如谷物、蔬菜和水果等)接触 OP 农药, 从而对其健康产生威胁^[4]。在中国, 蔬菜中甲胺磷, 毒死蜱和对硫磷的最大残留限量分别为 0.05、0.1、0.01 mg/kg, 因此

食品中的有机磷农药残留的检测十分重要^[5]。传统的农药残留检测方法准确可靠, 但大多数都是比较耗时, 而且需要训练有素的技术人员^[6~12], 不适合现场检测, 因此快速、简便、有效的 OP 残留检测方法的开发也非常重要。

本文对现有的 OP 农药的快速检测方法进行了总结, 以期为相关检测人员的工作和对 OP 农药残留的快速检测方法的继续研究提供参考。

2 免疫分析法

免疫分析法(immunoassay, IA)是一种以抗体作为生物化学检测器对化合物、酶或蛋白质等物质进行定性和定量分析的分析技术^[13], 是一种简单、快速、灵敏且具有成本

*通讯作者: 桑丽雅, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 150391436@qq.com

*Corresponding author: SANG Li-Ya, Hangzhou NanKai Biotech Co., Ltd., Hangzhou 311215, China. E-mail: 150391436@qq.com

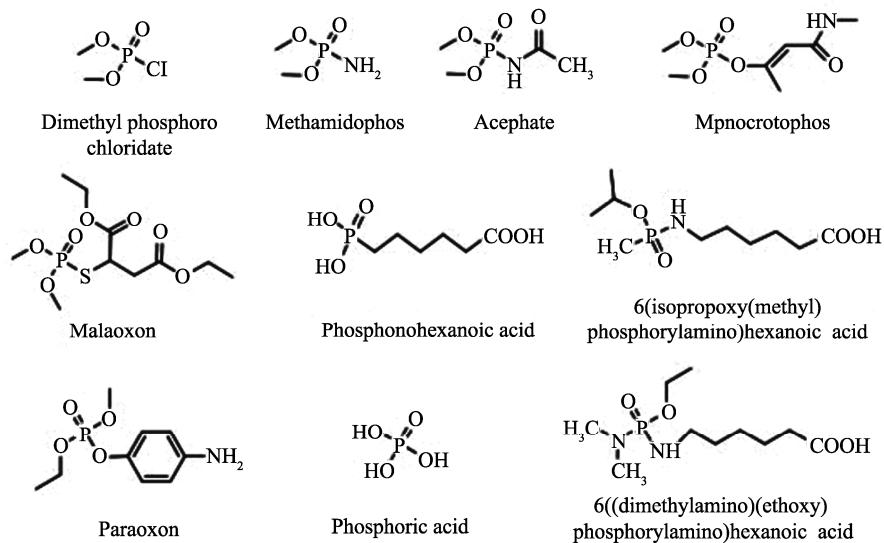


图 1 有机磷农药的结构
Fig.1 Structures of organophosphate pesticides

效益的高通量分析方法，逐渐被用于检测有机硫代磷酸酯农药，如二嗪农、杀螟松、倍硫磷、和对硫磷^[14-16]。

2.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法的基本原理是将抗原抗体之间特异性免疫反应和酶对底物的高度催化效应结合起来，以酶促反应的放大作用来显示初级免疫反应。在合适的载体上，采用第一抗体与抗原结合，再用带有酶标记的第二抗体与抗体—抗原结合的复合物结合。在一定底物参与下，酶标记复合物上的酶催化底物使其水解、氧化或还原成另一种带色物质，由于酶的降解产物与显色成正比，因此可通过肉眼观察或酶标仪测定，从而确定未知抗原是否存在及其含量^[17]。

邢玮玮等^[18]通过酶联免疫吸附分析法对食品中的有机磷农药残留情况进行测定，并对萃取溶剂进行了优化，测定结果与实际结果相近。吴雅欣^[19]利用间接竞争 ELISA 法建立了检测食品中毒死蜱单残留的方法，检出限达到 0.027 μg/mL，且结果与气相色谱法结果相当。邹茹冰等建立了化学发光酶联免疫分析法同时检测谷物和蔬菜中 3 种有机磷农药残留的方法，该方法线性关系良好、准确度高、灵敏度高。Alcocer 等^[20]采用 O, O-二乙基-2-丁烯酸磷酸酷作半抗原，制备出具有广谱性的多克隆抗体，以间接竞争方法检测食品中 10 种有机磷农药，该方法检出限达到了 0.3~23 ng/孔。

虽然酶免疫测定能够准确识别样品中的有机磷农药，但仅限于实验室中操作，不能在现场条件下进行操作。因此，需要一种更好的现场应用方法来分析生物样品中的农药残留。

2.2 胶体金免疫色谱技术

免疫色谱分析(immunochromatographic analysis, ICA)，

也称为免疫亲和层析技术。胶体金免疫色谱技术是胶体金免疫层析技术，是以胶体金作为示踪标志物，应用于抗原抗体反应中的一种新型免疫标记技术。此方法将分散状态下肉眼无法观察到的胶体金颗粒通过免疫反应聚集在反应膜上，使检测信号放大，肉眼能够观察。胶体金的这种显色方式为物理显色，无需底物参与反应^[21]。以胶体金作为标签的 ICA 技术与 ELISA 相比的优势在于其检测过程简单方便，不需要大型仪器设备(如洗板机、酶标仪等)，也不需要专业人员进行检测。

Kim 等^[15]基于使用胶体金作为标记的竞争性抗原包被形式的免疫色谱测定(ICA)检测有机磷杀虫剂毒死蜱，该方法检测添加到农业样品中的毒死蜱标准品和毒死蜱的 ICA 检出限分别为 10 和 50 ng/mL，测定时间小于 10 min，适用于毒死蜱的快速现场测试。刘莹^[22]研制了有机磷农药的胶体金免疫层析快速检测试纸条，结果表明该方法可以检出杀螟硫磷、甲基对硫磷、对硫磷等 9 种有机磷农药，最低检出浓度可达 0.25 mg/kg，可用于多种有机磷农药的初筛。

3 酶抑制法

在体外环境下，昆虫神经中枢中的乙酰胆碱酯酶会收到氨基甲酸酯类农药或有机磷农药的抑制，且抑制率与农药的浓度具有一定的相关性^[23]。胆碱酯酶可催化靛酚乙酸酯(红色)水解为乙酸与靛酚(蓝色)，有机磷或氨基甲酸酯类农药对胆碱酯酶有抑制作用，使催化、水解、变色过程发生改变，由此可判断出样品中是否有高剂量的有机磷或氨基甲酸酯类农药存在^[19]。

雷甜甜等^[24]使用酶抑制法测定大枣中的有机磷及氨基甲酸酯类的农药残留成分，该方法操作简便、快速，但

是灵敏度不高。张瑜等^[25]开展了酶抑制法测定蔬菜中有机磷农药的假阴性风险研究,发现应用酶抑制率法快速检测蔬菜农药残留存在一定的假阴性风险,仍需要采用气相色谱法和液相色谱法进行定量确证,才可以有效降低假阴性率。

用酶抑制法检测食物中有机磷农药时反应时间短、检测迅速、操作简单,但是由于酶试剂容易失活,该方法结果不太稳定且重复性较差^[26]。而且由于部分农药对酶抑制作用效果不明显或无作用,容易造成假阳性效果,还需要用其他的方法对结果进行验证^[27]。

4 生物传感器

生物传感器由于其高选择性和灵敏度引起了全世界许多研究人员的关注,该方法操作便捷、适合现场测定。生物传感器对农药敏感,而且可以将样品中农药的浓度转换为可检测的信号,其基本组成如图2所示^[28]。传感器中有一个固定的生物元素(生物感受器),其可以识别复杂混合物中的目标分子(待测物),转换元件(信号转换器)可以将分析物与生物受体相互作用产生的生化信号转换为电子信号,信号放大后,结果可以直接显示在屏幕上^[29]。

生物传感器的特异性和灵敏度与生物感受器的类型息息相关,全细胞或微生物的亚细胞片段、抗体、DNA序列等都可以作为生物受体,但是由于农药主要是根据酶抑制原理设计的,目前使用的测定有机磷农药的生物传感器主要是使用酶作为生物受体^[30]。信号转换器是另一个决定生物传感器准确性的关键元件,根据其类型,酶抑制生物传感器又可分为电位传感器、电流传感器、电导传感器、光电化学传感器等^[31]。电位传感器、电流传感器和电导生物传感器通常被称为电化学生物传感器,其基本原理如图3所示^[28]。电位生物传感器主要是利用样品基质中游离乙酸或丁酸引起pH值变化,进而利用pH指示剂进行定性分析^[32]。电流传感器包括单酶传感器和双酶传感器。单酶传

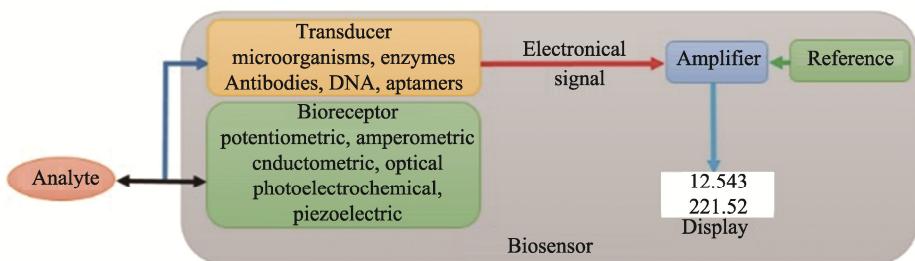
感器是利用乙酰胆碱或丁酰胆碱水解产生硫代胆碱,其本身被氧化成二硫醇,从而产生与样品中抑制剂浓度成反比的电流;双酶传感器是利用乙酰胆碱或丁酰胆碱水解产生硫代胆碱,然后通过胆碱氧化酶氧化以产生过氧化氢,从而通过电流法检测样品中的农药浓度^[33-35]。光电化学生物传感器主要是通过乙酰硫代胆碱水解的硫代胆碱产生与抑制剂浓度成比例的光电流测定样品中的农药浓度^[36]。光化学酶生物传感器利用酶的高选择性,待测物质从样品溶液中扩散到生物催化层在固定化酶的催化下生成一种待测物质,当底物扩散速度与催化产物生成速度达成平衡时即可得到一个稳定的光信号,其大小与底物浓度成正比^[37]。

关桦楠^[13]以玻碳电极作为信号转换器,分别利用纳米氧化锌和纳米氧化硅以及多壁碳纳米管作为电极修饰材料,设计了快速检测果蔬中有机磷和氨基甲酸酯农药残留的电化学酶生物传感器,其精确度、重现性、准确性均良好。

生物传感器选择性高,可以直接在复杂试样中进行测定工作,而且可以反复多次使用,其耗时短、仪器体积小,适合于现场测定^[38-41]。但是生物传感器目前仍存在稳定性、重读性和准确性不足的问题,因此需要研究新型的酶固定技术已提高其实用性^[42-45]。

5 结论与展望

传统的农药残留检测方法准确可靠,但大多数都是比较耗时,而且需要训练有素的技术人员,不适合现场检测;免疫法可以能够准确识别样品中的有机磷农药且可以同时测定多个样品,但该方法需要用到大型仪器,仅限于实验室中操作,不能在现场条件下进行操作;生物传感器选择性高,且耗时短、仪器体积小,适合于现场测定,但是目前仍存在稳定性、重读性和准确性不足的问题,需要进一步研究。在今后的研究中,需要继续开发并完善有机磷农药的快速检测方法,实现现场实时测定的同时提高其灵敏度、特异性即准确性。



注: 黑色、蓝色和红色的箭头分别表示化学反应、生物信号和可检测的电信号

图2 生物传感器的基本组成
Fig.2 The basic components of biosensor

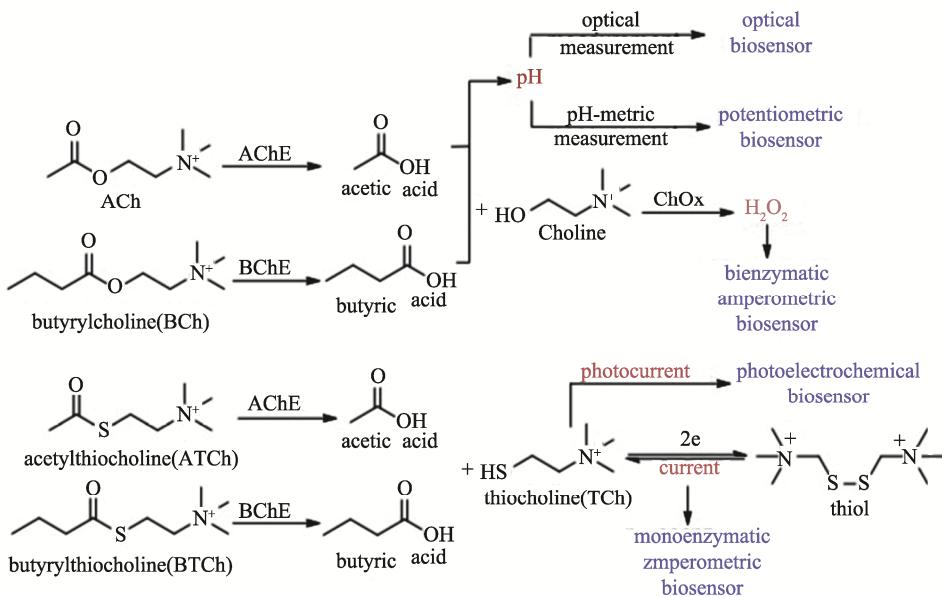


图3 电化学生物传感器的原理示意图
Fig.3 Principle of electrochemical biosensors

参考文献

- [1] Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology [Z].
- [2] Fantke P, Wieland P, Jurasko R, et al. Parameterization models for pesticide exposure via crop consumption [J]. Environ Sci Technol, 2012, 46: 12864–12872.
- [3] Shruti S, Ramrao G, Manisha S. Development of immunochromatographic assay for identification of organophosphate pesticides in environmental samples [J]. J Immun Immunochem, 2016, 37(2):167–188.
- [4] Bai Y, Zhou L, Wang J. Organophosphorus pesticide residues in market foods in Shaanxi area, China [J]. Food Chem, 2006, 98(2): 240–242.
- [5] GB 2763-2016 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. GB 2763-2016 National food safety standards-Maximum residue limits for pesticides in food [S].
- [6] Mahpishian S, Sereshti H. Three-dimensional graphene aerogel-supported iron oxide nanoparticles as an efficient adsorbent for magnetic solid phase extraction of organo-phosphorus pesticide residues in fruit juices followed by gas chromatographic determination [J]. J Chromatogr A, 2016, 1443: 43–53.
- [7] Wu LJ, Song Y, Hu MZ, et al. Application of magnetic solvent bar liquid-phase microextraction for determination of organo-phosphorus pesticides in fruit juice samples by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Chem, 2015, 176: 197–204.
- [8] Wu L, Song JY, Xu X, et al. Medium-assisted non-polar solvent dynamic microwave extraction for determination of organophosphorus pesticides in cereals using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Chem, 2014, 162(1): 253–260.
- [9] Su R, Xu X, Wang XH, et al. Determination of organophosphorus pesticides in peanut oil by dispersive solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011, 879(30): 3423–3428.
- [10] He LJ, Luo XL, Jiang XM, et al. Anew 1,3-dibutylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction to determine organophosphorus pesticides in water and fruit samples by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(31): 5013–5020.
- [11] Seebunrueng K, Santaladchaiyakit Y, Srijaranai S. Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples [J]. Chemosphere, 2014, 103: 51–58.
- [12] Seebunrueng K, Santaladchaiyakit Y, Srijaranai S. Vortex-assisted low density solvent liquid-liquid micro-extraction and salt-induced demulsification coupled to high performance liquid chromatography for the determination of five organophosphorus pesticide residues in fruits [J]. Talanta, 2015, 132: 769–774.
- [13] 关桦楠. 高效农药残留物检测酶纳米生物传感器的研制[D]. 哈尔滨: 东北农林大学, 2011.
- [14] Guan HN. Development of high-performance pesticide residue detection enzyme nanobiosensor [D]. Harbin: Northeast Agriculture and Forestry University, 2011.
- [15] Mercader JV, Montoya A. A monoclonal antibody-based ELISA for the analysis of azinphos-methyl in fruit juices [J]. Anal Chim Acta, 1997, 347: 95–101.
- [16] Kim YJ, Kim YA, Lee YT, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide fenitrothion: Influence of hapten conformation and sample matrix on assay performance [J]. Anal Chim Acta, 2007, 591: 183–190.
- [17] Zhang Q, Sun Q, Hu BS, et al. Development of a sensitive ELISA for the analysis of the organophosphorous insecticide fenthion in fruit samples [J]. Food Chem, 2008, 106: 1278–1284.
- [18] 曲云鹤. 农药残留的快速检测方法和仪器的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2010.
- [19] Qu YH. Research on rapid detection methods and instruments for pesticide residues [D]. Shanghai: East China Normal University, 2010.
- [20] 邢玮玮, 陈燕敏. 酶联免疫吸附分析法测定食品中有机磷农药残留[J]. 科技通报, 2018, 34(8): 50–54.
- [21] Xing WW, Chen YM. Determination of organophosphorus pesticide residues in food by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Sci Technol Bull, 2018, 34(8): 50–54.
- [22] 吴雅欣. 有机磷农药多残留 ELISA 方法探讨[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [23] Wu YX. Discussion on multi-residue ELISA method for

- organophosphorus pesticides [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
- [20] Alcocer MJC, Doyen C, Lee HA, et al. Functional scfv antibody sequences against the organophosphorus pesticide chlorpyrifos [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(2): 335–337.
- [21] Suntornsuk L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(1): 29.
- [22] 刘莹. 有机磷农药的胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制[D]. 上海: 上海师范大学, 2009.
- Liu Y. Development of colloidal gold immunochromatographic rapid test strip for organophosphorus pesticides [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2009.
- [23] 刘小文, 罗江, 张墩, 等. 蔬菜中拟除虫菊酯农药残留分析方法的研究进展[J]. *理化检验(化学分册)*, 2013, 49(9): 1141–1147.
- Liu XW, Luo J, Zhang D, et al. Research progress on analytical methods of pyrethroid pesticide residues in vegetables [J]. *Phys Test Chem Anal B*, 2013, 49(9): 1141–1147.
- [24] 雷甜甜, 刘世军, 唐志书, 等. 采用酶抑制法检测大枣中的农药残留 [J]. *陕西农业科学*, 2018, 64(5): 5368.
- Lei TT, Liu SJ, Tang ZS, et al. Detection of pesticide residues in jujube by enzyme inhibition method [J]. *Shaanxi Agric Sci*, 2018, 64(5): 5368.
- [25] 张瑜, 魏维杰, 李岗, 等. 蔬菜农药残留酶抑制法快检假阴性风险的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(14): 1760–1763.
- Zhang Y, Wei WJ, Li G, et al. Study on the risk of false negatives in the rapid detection of pesticide residues in vegetables [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2018, 28(14): 1760–1763.
- [26] 刘家鹏, 赵列军. 农药残留的快速测定方法简介[J]. *环境科学与管理*, 2007, 32(11): 132–134.
- Liu JP, Zhao LJ. Introduction to rapid determination of pesticide residues [J]. *Environ Sci Manag*, 2007, 32(11): 132–134.
- [27] 蒙迪冰. 蔬菜农药残留快速检测常用技术比较[J]. *北京农业*, 2011, (9): 69–70.
- Meng DB. Comparison of common techniques for rapid detection of vegetable pesticide residues [J]. *Beijing Agric*, 2011, (9): 69–70.
- [28] Xu YL, Li FY, Ndikurwayo F, et al. Cholinesterases and engineered mutants for the detection of organophosphorus pesticide residues [J]. *Sensors*, 2018, (18): 4281–4395.
- Hassani S, Momtaz S, Vakhshiteh F, et al. Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment [J]. *Arch Toxicol* 2016, 91: 109–130.
- Bucur B, Munteanu FD, Marty JL, et al. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection [J]. *Biosensors*, 2018, 8: 27.
- [31] Šte'pánková Š, Vorc'áková K. Cholinesterase-based biosensors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31: 180–193.
- Andreou VG, Clonis YD. A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped brom cresol purple for in-field use [J]. *Biosens Bioelectron*, 2002, 17: 61–69.
- Pohanka M. Cholinesterase based amperometric biosensors for assay of anticholinergic compounds [J]. *Interdiscip Toxicol*, 2009, 2: 52–54.
- Pohanka M, Hrabinova M, Kuca K. Diagnosis of intoxication by the organophosphate vx: Comparison between an electrochemical sensor and ellman s photometric method [J]. *Sensors* 2008, 8: 5229–5237.
- Campanella L, Lelo D, Martini E, et al. Organophosphorus and carbamate pesticide analysis using an inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor; comparison by butyrylcholinesterase+choline oxidase opee and application to natural waters [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 587: 22–32.
- Li X, Zheng Z, Liu X, et al. Nanostructured photoelectrochemical biosensor for highly sensitive detection of organophosphorous pesticides [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 1–5.
- 张君, 王月伶, 袁倬斌. 可检测有机磷农药残留的丝网印刷酶电极[J]. *化学学报*, 2006, 64(5): 428–434.
- Zhang J, Wang YX, Yuan YB. Screen-printed enzyme electrode for detecting organophosphorus pesticide residues [J]. *Acta Chim Sin*, 2006, 64(5): 428–434.
- [38] 林春绵, 胡晓燕, 张安平. 酶抑制法快速检测有机磷农药残留的研究进展[J]. *浙江工业大学学报*, 2009, 37(4): 386–391.
- Lin CM, Hu XY, Zhang AP. Research progress in rapid detection of organophosphorus pesticide residues by enzyme inhibition method [J]. *J Zhejiang Univ Technol*, 2009, 37(4): 386–391.
- [39] 于基成, 边辞, 赵娜, 等. 酶抑制法快速检测蔬菜中有机磷农药残留 [J]. *江苏农业科学*, 2006, (5): 170–172.
- Yu JC, Bian C, Zhao N, et al. Rapid detection of organophosphorus pesticide residues in vegetables by enzyme inhibition method [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2006, (5): 170–172.
- [40] 王丽红, 张林, 陈欢林. 有机磷农药酶生物传感器研究进展[J]. *化学进展*, 2006, 18(4): 440–452.
- Wang LH, Zhang L, Chen HL. Research progress of organophosphorus pesticide biosensors [J]. *Chem Prog*, 2006, 18(4): 440–452.
- [41] 刘润, 郝玉翠, 康天放. 基于碳纳米管修饰电极检测有机磷农药的生物传感器[J]. *分析试验室*, 2007, 26(9): 9–12.
- Liu R, Hao YC, Kang TF. Biosensor for detection of organophosphorus pesticides based on carbon nanotubes modified electrode [J]. *Lab Anal*, 2007, 26(9): 9–12.
- [42] 王改珍, 魏福祥, 王昌士, 等. 有机磷农药酶生物传感器的研究进展 [J]. *河北工业科技*, 2005, 22(4): 228–231.
- Wang GZ, Wei FX, Wang CS, et al. Research progress of organophosphorus pesticide biosensors [J]. *Hebei Ind Sci Technol*, 2005, 22(4): 228–231.
- [43] 高慧丽, 康天放, 王小庆, 等. 溶胶-凝胶法固定乙酰胆碱酯酶生物传感器测定有机磷农药[J]. *环境化学*, 2005, 24(6): 707–710.
- Gao HL, Kang TF, Wang XQ, et al. Determination of organophosphorus pesticides by sol-gel method with acetylcholinesterase biosensor [J]. *Environ Chem*, 2005, 24(6): 707–710.
- [44] 蒋雪松. 用于有机磷农药残留检测的免疫生物传感器的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- Jiang XS. Research on immunobiosensor for detection of organophosphorus pesticide residues [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [45] 梁刚, 满燕, 贾文珅, 等. 电化学生物传感器在有机磷农药分析中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(2): 433–438.
- Liang G, Man Y, Jian WK, et al. Application of electrochemical biosensors for the detection of organophosphorus pesticide [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(2): 433–438.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

张少恩, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 738225819@qq.com

桑丽雅, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 150391436@qq.com