

微波萃取——植物酶抑制法快速检测蔬菜中有机磷农药残留

钟树明 袁东星* 李权龙 张 军

(厦门大学环科中心 厦门大学海洋环境科学国家教育部重点实验室 厦门 361005)

摘 要 应用植物酶抑制法检测蔬菜中的农药残留。用小柱对样品进行预处理,可去除叶绿素和杂质的干扰、提高方法灵敏度。采用微波辅助萃取,能有效地去除蔬菜本身含有的植物酶对显色反应的影响,提高萃取效率和灵敏度。所建立的方法快速、灵敏、可靠。

关键词 蔬菜 有机磷农药 微波萃取 植物酶

Rapid Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Vegetables using a Plant-hydrolase Inhibition Technique with Microwave Extraction

Zhong Shuming, Yuan Dongxing, Li Quanlong, Zhang Jun

(Environmental Science Research Center, Research Lab of SEDC of Marine Environment, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract A technique of plant-hydrolysis inhibition with microwave extraction has been developed to determine organophosphorus pesticide residues in vegetables. The chlorophyll existing in vegetables is removed using a mini-column filled with Celite 545. The plant-hydrolysis enzyme is inactivated under microwave irradiation. The extraction efficiency with microwave is higher than those of shaking and heating extraction methods.

Key words Vegetables, Organophosphorus, Microwave extraction, Plant-hydrolase

有机磷农药进入机体后,主要抑制胆碱酯酶(ChE)的活性,造成体内乙酰胆碱积聚,引起神经传导功能的紊乱^[1],据此原理发展而来的乙酰胆碱酯酶抑制法,广泛应用于检测有机磷农药残留^[2,3],但是乙酰胆碱酯酶来源于动物体,价格昂贵,不易保存。近年来发展了植物酶抑制法检测有机磷农药残留^[4]。植物酶能促使橙色的 2, 6-二氯乙酰胆碱酯水解,水解产物胆碱为蓝色,最大吸收波长为 605nm。因此,可根据反应溶液在水解前后的颜色变化,判断农药对酶的抑制程度,有机磷农药存在时,植物酶的活性受抑制,胆碱的蓝色变浅。植物酶来源广泛,价格低廉,逐渐得到推广应用。然而,在常规方法萃取蔬菜中农药残留的同时,叶绿素和植物酶也会同时被萃出,对测定结果有一定的影响。本研究应用微波萃取,结合过柱法预处理蔬菜样品,有效地抑制了蔬菜中植物酶和叶绿素对测定的影响,所发展的方法可快速定量分析样品中的残留农药。

1 实验部分

钟树明 男, 25 岁, 硕士生, 现从事环境分析化学研究工作。*联系人
国家自然科学基金(20077022)资助项目
2001-06-18 收稿, 2001-07-27 修回

1.1 仪器和试剂

配有聚四氟乙烯密封消化罐的 Orient MDS-9000 型微波消解系统（西安奥瑞特科技发展有限公司）；BECKMAN DU-8B 紫外-可见分光光度计，带恒温装置（美国产）；XK 95-I 型多用振荡器（江苏新康仪器厂）；LD4-2 离心机（北京医用离心机厂）；TC-15 套式恒温器（浙江新华医疗器械厂）。

2, 6-二氯乙酰酞酚指示剂^[5]：取 0.1mol 干燥的 2, 6-二氯酞酚钠盐固体（德国产，上海试剂有限公司进口分装）于锥形瓶中，加入 0.3mol 的乙酸酐，振荡器中振荡 2h。室温下静置 1h 后加入 600g 碎冰块，1.5h 后过滤，水洗，滤出物溶于乙醚中，加无水硫酸钠干燥，在水浴上蒸发至约 10mL，然后加入 4 倍体积的石油醚稀释或加石油醚直到出现结晶为止。过滤，滤液冰冻冷却后得晶体，再用乙醚/石油醚重结晶一次。真空干燥。晶体避光保存。称取所得晶体 10.0mg，溶于 10.0mL 1, 4-二氧六环（分析纯，上海试剂三厂）中，即得 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 6-二氯乙酰酞酚指示剂，避光保存。

磷酸盐缓冲溶液（ $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）：混合 94.7mL $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液和 5.3mL $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液，得 pH 为 8.0 的磷酸盐缓冲液。

面粉酶溶液^[6]：称取 5g 市售面粉于锥形瓶中，加入 20mL 蒸馏水，在振荡机上振荡 30min，以 $2000\sim 3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 在离心机上离心 10min，上清液用针筒式过滤器过滤，得面粉酶溶液，置于 4°C 冰箱中保存。

50%甲胺磷乳油（福建三农公司），50%久效磷乳油（青岛农药厂），50%辛硫磷乳油（江苏省城市利民化工厂），增效甲基异柳磷乳油（青岛双收农药公司），80%敌敌畏乳油（江苏梅兰公司），氧化乐果乳油（中国人民解放军第九七一五工厂），17.5%增效水胺硫磷乳油（湖北省仙桃市农药厂），40%乐果乳油（沈阳新城公司），敌百虫原粉（南宁化学工业集团）。

预处理柱：在直径 1cm，10mL 的塑料离心试管下部钻一直径约为 2mm 的小孔，依次填入少量玻璃纤维和 1g 硅藻土 545（上海试剂有限公司进口分装）。

1.2 样品的制备

取市售蔬菜，用清水洗净，晾干。配一定浓度的甲胺磷或久效磷水溶液，取 20mL 农药溶液均匀地喷洒在 100g 蔬菜上，晾至蔬菜表面无水分止。

1.3 样品预处理

振荡法：取蔬菜菜叶 10g，适当剪碎，置 25mL 离心管中，加入 10mL 磷酸盐缓冲液，振荡 1min，萃取液过预处理柱，接收流出液。

微波法：取蔬菜菜叶 10g，适当剪碎，置于聚四氟乙烯密封消化罐中，加入 10mL 磷酸盐缓冲液，密封，置于微波消解系统，在功率 400W 下萃取 2min，萃取液冷却后过预处理柱，接收流出液。

加热法：取蔬菜菜叶 10g，适当剪碎，置于烧杯中，加入 10mL 磷酸盐缓冲液，在 88°C 的水浴中加热搅拌 2min，萃取液冷却后过预处理柱，接收流出液。

1.4 酶抑制率的分光光度法测定

在 1cm 比色皿中依次加入 2.7mL 过柱后的萃取液、0.2mL 面粉酶溶液，在 40°C 下恒温 10min，

在波长 605nm 处读取吸光值,加 0.1mL 2,6-二氯乙酰苯酚指示剂,40℃下再恒温 10min,在 605nm 处读取吸光值。

用 2.7mL 的磷酸盐缓冲液替代萃取液,在同上操作后,得空白溶液的吸光值。按下式计算抑制百分率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{空白}}} \times 100$$

式中 $\Delta A_{\text{空白}}$ 表示显色前后空白溶液的吸光值变化; $\Delta A_{\text{样品}}$ 表示样品的吸光值变化。

抑制率与样品中有机磷农药浓度的对数成正比^[7], 可通过抑制率的大小确定样品中的农药浓度。

2 结果和讨论

2.1 预处理柱的填充剂和填充量

叶类蔬菜在预处理过程中,叶绿素和其它杂质也同农药一起被萃取出来,绿色的叶绿素对显色反应的结果有干扰,因此为提高方法的灵敏度,应在预处理过程中尽量去除叶绿素。报道的消除叶绿素干扰的方法是取萃取液的上清液^[8],或通过铺有硅藻土 545 的滤纸过滤。叶类蔬菜样品体积较大,在萃取液不多的情况下,不易得到上清液。通过铺有硅藻土 545 的滤纸过滤能取得一定的去叶绿素效果,但过滤时间长,吸附剂用量大。本工作研究了不同吸附剂对叶绿素和农药的吸附情况,分别取未过柱的样品萃取液和过柱后的样品萃取液,在波长 645nm 读取吸光值,叶绿素去除效果以过柱后样品的吸光值 $A_{\text{过柱}}$ 与未过柱样品的吸光值 $A_{\text{未过柱}}$ 的百分比率表示,实验结果显示样品经填充有硅藻土 545 或硅镁型吸附剂的小柱过柱后,约只有 15% 的叶绿素残留在样品中,说明硅镁型吸附剂和硅藻土 545 对叶绿素有很好的吸附作用。

分别取未过柱的农药溶液和过柱后的农药溶液,按实验步骤测定,对比它们的抑制率值,可判断农药被吸附剂吸附的情况。结果发现经硅镁型吸附剂预处理后的农药保存率为 62.2%,说明硅镁型吸附剂对农药有一定的吸附作用;样品经硅藻土 545 预处理后的农药保存率是 99.0%,则可以认为硅藻土 545 对农药的吸附作用可以忽略。

因硅藻土 545 对叶绿素去除效果好且不影响样品中农药的浓度,故选其作为预处理柱填充材料。比较了填有不同量的硅藻土 545 预处理柱对叶绿素和农药的吸附情况,发现 1g 硅藻土 545 就能有效提高方法灵敏度。故此选用填有 1g 硅藻土 545 的小柱作为样品的预处理柱。

2.2 微波萃取条件的确定

微波萃取法已被应用于萃取土壤及沉积物样品中的杀虫剂^[9]。微波萃取的参数主要有微波功率、萃取时间和萃取压力。由于有机磷农药在一定条件下会发生分解,因此,萃取压力不宜过大,微波功率不宜过高,萃取时间不宜过长。

2.2.1 微波功率 取喷洒过 100mg·L⁻¹ 甲胺磷农药

的蔬菜作为样品,萃取 2min, 试验了微波功率对有机磷农药萃取效率的影响。样品中有机磷农

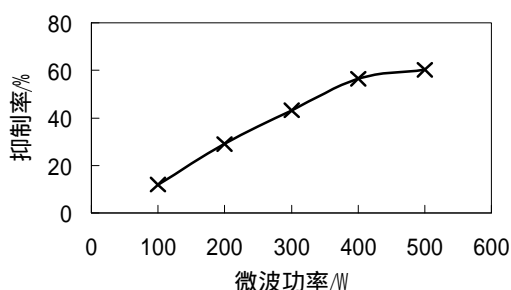


图 1 微波功率对样品酶抑制率的影响

药的萃取效率可通过酶抑制率表现, 即抑制率与萃取效率成正比。结果如图 1。可以看出, 有机磷农药的萃取率在微波功率小于 400W 时随微波功率的增大而增大, 功率 400W 和 500W 时, 萃取效率很接近, 但微波功率大于 500W 后, 会萃取出较多的叶绿素和其它杂质, 对显色结果有较大的干扰, 所以实验选择微波功率为 400W。

2.2.2 萃取时间 在微波功率一定时, 萃取时间影响萃取温度。控制微波功率为 400W, 取喷洒过 100mg L^{-1} 甲胺磷农药的蔬菜作为样品, 改变萃取时间, 试验了萃取时间对有机磷农药萃取率的影响, 结果如图 2。实验结果表明, 有机磷农药的萃取效率随萃取时间的增长而增大, 萃取时间大于 3min 后, 萃取率达到最大, 但有过多的叶绿素和其它杂质一起被萃取出, 对显色反应的干扰大。萃取时间为 2min 时, 萃取率接近于最大, 而杂质的干扰则明显较小, 故选择萃取时间为 2min, 此时样品溶液的温度为 88°C 。综上结果, 确定微波萃取的实验条件是功率 400W, 萃取时间 2min。

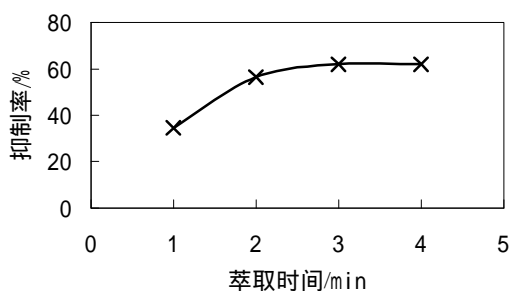


图 2 萃取时间对样品酶抑制率的影响

2.3 微波、加热和振荡萃取法的比较

2.3.1 蔬菜中含有的植物酶对测定结果的影响 本测定方法所依据的显色反应与酶的量有关。植物酶来源于植物体, 蔬菜中亦含有一定量的植物酶, 如果不去除, 对测定结果会有一定的影响。

取不含农药的蔬菜样品, 按实验步骤, 分别用振荡萃取、微波萃取和加热萃取法处理样品, 在萃取液中加入指示剂, 用分光光度法测定加入指示剂前后吸光值的变化 ΔA , ΔA 越大, 表明酶活性越大, 即经预处理后的酶越多。实验结果显示, 蔬菜样品经振荡萃取, 加入指示剂后溶液的吸光值变化达 0.2454; 蔬菜样品经微波萃取和加热萃取, 加入指示剂后溶液的吸光值基本无变化。这一结果表明, 振荡萃取因在常温常压下进行, 所萃取得的酶最多, 而微波辐射和加热均能使植物酶失去活性, 能有效去除蔬菜中本身含有的植物酶对测定结果的影响, 尤以微波处理为佳。

2.3.2 样品经预处理后农药的保留率 振荡萃取过程在常温常压下快速进行, 不存在有机磷农药被消解或降解等问题, 预处理柱对有机磷农药基本无吸附作用, 故农药基本保留在萃取液中。而微波萃取是否对待测农药有降解作用, 还需要研究。

配制 0.1 、 1.0 、 10.0 mg L^{-1} 的甲胺磷水溶液, 在微波功率 400W 下消解 2min, 以甲胺磷溶液经微波处理后与处理前对酶的抑制率的百分比率表示样品经微波处理后农药的保留率, 三次实验的结果分别为 95.7%、104%和 102%, 说明, 在微波功率 400W 下处理消解 2min, 农药基本无损耗。加热萃取是在常压下进行的, 在 88°C 加热萃取前后, 样品中农药浓度基本不变。

2.3.3 微波、加热和振荡萃取效果的比较 为了比较微波萃取、加热萃取和振荡萃取的萃取效率, 取喷洒有不同浓度甲胺磷农药的蔬菜, 按实验步骤分别进行三种萃取, 测定蔬菜中农药含量, 结果如表 1 所示。

由于滴落、挥发和降解等原因, 残留在蔬菜中的农药只是喷洒上的一小部分。比较可知,

微波萃取的萃取效果最好, 加热萃取次之, 振荡萃取最差。微波萃取由于能对萃取体系中的不同组分进行选择性地加热, 热效率高, 提高了萃取效率^[10]。微波辐射能有效使蔬菜本身含有的植物酶失去活性, 去除干扰, 提高方法灵敏度。微波萃取还能同时处理多个样品, 缩短分析时间。振荡萃取法的萃取效果不佳, 除萃取效率低外, 蔬菜本身含有的植物酶对显色效果亦有影响。

表 1 微波、加热和振荡萃取蔬菜中甲胺磷的浓度

农药喷洒浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	检测浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
	微波萃取	加热萃取	振荡萃取
1.0	0.099	0.054	未检出
10.0	0.79	0.60	0.45
100.0	8.8	6.4	5.8

2.4 敌敌畏浓度与抑制率的关系

以敌敌畏浓度的对数对抑制率作图, 得关系曲线图 3。从图 3 可以看出, 当敌敌畏溶液浓度 C 在 $0.01\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \sim 0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间时, 浓度的对数与抑制率基本成线性关系。

农药加酶混合后的恒温时间与酶活性被抑制程度密切相关, 一般恒温时间越长, 反应时间越长, 酶活性被抑制程度越高。所以要严格控制恒温反应时间, 以保证数据的准确性。

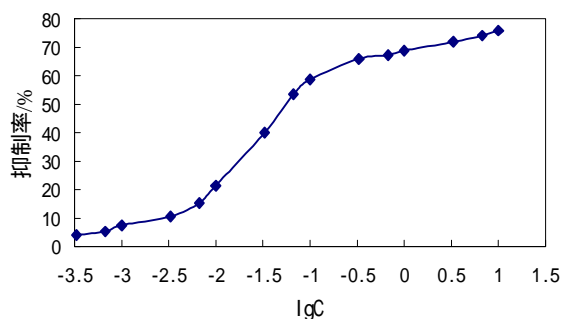


图 3 敌敌畏浓度对数与抑制率的关系曲线

2.5 几种常见的有机磷农药的测定限

研究了几种常见有机磷农药的工作曲线, 发现抑制率在 5%~10% 已落入工作曲线的线性范围, 即能够测定。以抑制率 10% 作为方法的测定限, 得各种农药的测定限如表 2 所示:

表 2 几种有机磷农药的测定限/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

农药	甲胺磷	敌敌畏	乐果	氧化乐果	水胺硫磷	辛硫磷	敌百虫	甲基异柳磷
测定限	0.012	0.0040	0.048	0.17	0.15	0.10	0.0074	0.0015

几种常见的有机磷农药的测定限在 $0.0015 \sim 0.17 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围, 比文献报道的测定限 $0.04 \sim 20.0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 低一个数量级^[11], 根据 FAO/WHO1985 年第 16 届食品法典委员会所采纳的农药残留最高标准, 各种农药残留应在 $0.1 \sim 10.0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围。实验证明, 所建立的方法基本能满足各种农药的检测要求。

将同一甲胺磷溶液平均分成 5 份, 按实验步骤测定, 得方法的相对标准偏差为 1.8%, 说明方法的精密度较高。

2.6 与经典方法的比较

为了验证方法的可靠性, 取喷洒有不同浓度久效磷农药的同一蔬菜样品, 用已建立的植物酶法和国家标准法(二氯甲烷萃取, 气相色谱法测定^[12]), 进行了有机磷农药的分析测定, 结果如表 3 所示。

从表 3 可以看出,与标准气相色谱法相比,微波萃取-植物酶法的萃取效率略低,属系统误差。如同表 2 的结果趋势一样,加热萃取和振荡萃取的测定结果更低。但是气相色谱法需要繁杂的预处理过程,耗用大量的二氯甲烷等有机溶剂,检测成本昂贵。

表 3 国家标准法和植物酶法测定的蔬菜中久效磷含量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

样品序号	农药喷洒浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	国家标准法 (气相色谱法)	植物酶法		
			微波萃取	加热萃取	振荡萃取
1	5.0	0.23	0.21	0.17	0.13
2	1.0	0.047	0.041	0.032	未检出

3 结论

与振荡萃取和加热萃取相比,用微波法萃取蔬菜中的有机磷农药残留,具有萃取效率高、能有效去除蔬菜中含有的植物酶的干扰、同时萃取多个样品等特点,采用预处理柱净化法能有效去除萃取液中的叶绿素和其它杂质,可提高检测灵敏度。与已有的基于酶分析的方法相比,所建立的方法有去除蔬菜中含有的植物酶和叶绿素干扰、灵敏度较高等优点,所建立的预处理手段优化了植物酶抑制技术检测蔬菜中有机磷农药残留的方法。

参考文献

- [1] 郑微云, 翁恩琪. 环境毒理学概论. 厦门: 厦门大学出版社, 1993:123~125.
- [2] 李治祥, 黄士忠, 翟延路. 中国环境科学, 1991, 11(4):311~313.
- [3] Shulamit M, Isaac I, Albert S P. Pesticide biochemistry and physiology, 1981, 15:267~274.
- [4] 曹金鸿, 郑集声. 分析化学, 1983, 11(4):267~272.
- [5] David N K, Robert M G, Miller F G. Org. Chem., 1959, 24:1743~1750.
- [6] 李治祥, 翟延路. 环境科学学报, 1987, 7(4):472~478.
- [7] George G Guilbault. 酶法分析. 北京: 科学出版社, 1977:195~200.
- [8] 韩承辉, 王乃岩. 环境保护, 1998, 12:31~32.
- [9] Font N, Hernandez F, Hogendoorn E A et al. J. Chromatoge, 1998, 798(1/2):179~186.
- [10] 陈猛, 袁东星, 许鹏翔. 分析测试学报, 1999, 18(2):82~86.
- [11] 韩承辉, 谷巍. 环境化学, 2000, 19(2):187~189.
- [12] GB/T 5009.20-1996 食品中有机磷农药的测定方法.