

锦龟酯酶与树鼯酯酶对部分有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感性研究

Study on sensitivity of esterase from *Chrysemys* and *Tupaia belangeri* to some organophosphorus and carbamate pesticide

宋燕飞^{1,2}

陈祥贵^{1,2}

向俊丞¹

SONG Yan-fei^{1,2} CHEN Xiang-gui^{1,2} XIANG Jun-cheng¹

王 玮¹

阴鹏飞¹

杨 潇¹

WANG Wei¹ YIN Peng-fei¹ YANG Xiao¹

(1. 西华大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610039; 2. 宜宾西华大学研究院, 四川 宜宾 644004; 3. 西华大学食品非热加工重点实验室, 四川 宜宾 644004; 4. 西华大学食品非热加工工程技术研究中心, 四川 宜宾 644004)

(1. School of Food and Biological Engineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China; 2. Yibin Xihua University Research Institute, Yibin, Sichuan 644004, China; 3. Key Laboratory of Food Non Thermal Processing, Yibin, Sichuan 644004, China; 4. Engineering Technology Research Center of Food Non Thermal Processing, Yibin, Sichuan 644004, China)

摘要:以 Ellman 法测定锦龟头酯酶酶活,以吲哚乙酸酯为底物测定树鼯肝部酯酶酶活,并用正交试验确定最佳反应体系条件,比较几种特异性酶抑制剂的抑制效果;采用酶抑制法考察锦龟酯酶和树鼯酯酶对有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的敏感性。结果表明:锦龟酯酶酶活测定方法的最佳条件为孵育温度 35 ℃、孵育时间 15 min、缓冲液 pH 7.5;树鼯酯酶活测定的最佳条件为孵育温度 25 ℃、孵育时间 15 min、缓冲液 pH 8.0;锦龟酯酶对盐酸多奈哌齐敏感性最高;树鼯酯酶对双(4-硝基苯基)磷酸酯敏感性最高;锦龟酯酶和树鼯酯酶对敌百虫、辛硫磷、敌敌畏、速灭磷、磷胺、速灭威、克百威、灭多威、涕灭威、甲萘威的检出限均低于国标所规定的农药最大残留量限量。锦龟酯酶与树鼯酯酶粗提物具有良好的农药敏感性,可作为新型酶源用于酶抑制法检测有机磷和氨基甲酸酯类农药残留。

关键词:锦龟;树鼯;农药;敏感性

Abstract: The esterase activity of *Chrysemys* was determined by Ellman method, and the indole acetate was used as substrate to determine the esterase activity of *Tupaia belangeri*. The optimum reaction conditions were determined by orthogonal array design, and the inhibition effects of several specific enzyme inhibitors were compared; The enzyme inhibition method was used to investigate the sensitivity of esterase from *Chrysemys* and *Tupaia belangeri* to organophosphorus and carbamate pesticides. The optimum conditions of esterase activity determination of *Chrysemys* were: incubation temperature 35 ℃, incubation time 15 min, buffer pH 7.5; The optimum conditions of esterase activity determination of *Tupaia belangeri* were: incubation temperature 25 ℃, incubation time 15 min, buffer pH 8.0. The most sensitive to *Chrysemys* esterase was donepezil hydrochloride, the most sensitive to *Tupaia belangeri* esterase was bis (4-nitrophenyl) phosphate. The detection limits of esterase from *Chrysemys* and *Tupaia belangeri* on trichlorfon, phoxim, dichlorvos, mevinphos, phosphamidon, metolcarb, carbofuran, methomyl, aldicarb and carbaryl were all lower than the maximum residue limits stipulated by national standards. The extracts of esterase from *Chrysemys* and *Tupaia belangeri* showed high sensitivity to pesticide, which could be used as a new enzyme source in the enzyme inhibition method for rapid detection organophosphorus and carbamate pesticide.

Keywords: *Chrysemys*; *Tupaia belangeri*; pesticide; sensitivity

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31271872);四川省科技厅科技计划项目(编号:18MZGC0276);四川省科技厅重点研发项目计划资助(编号:2018SZ0340)

作者简介:宋燕飞,女,西华大学在读硕士研究生。

通信作者:陈祥贵(1967—),男,西华大学教授,博士。

E-mail: chen_xianggui@mail.xhu.edu.cn

收稿日期:2019-08-13

农药残留一直是各国食品安全体系建设重点关注的内容^[1]。中国是一个农业大国,农药使用十分广泛且管理困难,迫切需要发展适合基层监测监管的农药残留快速检测手段^[2-3]。因此,采取及时、有效、快速的检测方法对农产品质量安全进行监管显得尤为重要。

在现有的农药残留检测中,气相色谱法^[4]、气相色谱质谱联用法^[5-6]、高效液相色谱法^[7-8]和液相色谱质谱联用法^[9-10]作为传统的手段,可以有效检测出果蔬中的农药残留量,但检测成本高、耗时长、不利于快速检测。而酶抑制法作为一种体外检测农药残留量的新型方法,具有操作简便、快速、灵敏度高、无需昂贵的仪器等特点,特别适合基层现场检测,是目前农药残留快速检测常用的方法^[11]。

酶抑制法中,检测用酶是影响酶抑制法灵敏性和准确性的关键因素。国内外报道^[12-14]用于农药残留检测的酶传感器所用酶绝大多数为乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE),且主要来自电鳗、家蝇和牛红细胞,酶源非常单一。课题组^[15]前期研究中通过同源建模和分子对接预测各种酯酶对不同农药的敏感性,该方法在预测丝氨酸水解酶对有机磷农药的敏感性方面表现出良好的性能,发现锦龟头酯酶和树鼩肝部酯酶具有较高的应用前景。试验拟以锦龟头酯酶和树鼩肝部酯酶为研究对象,确定酶促反应的最佳检测条件,测定两种酶对常见有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药的 IC_{50} 和 LOD 值,为科学评价以锦龟头酯酶、树鼩酯酶为酶源在酶抑制法中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

锦龟头部、树鼩肝部粗酶:保存于 -20°C ,中国科学院昆明动物研究所;

敌敌畏、敌百虫、氧化乐果、速灭磷、甲胺磷、对硫磷、乐果、磷铵、久效磷、毒死蜱、辛硫磷、克百威、速灭威、甲萘威、灭多威、涕灭威、丁硫克百威:国家农药质检中心;

碘化硫代乙酰胆碱(ATChI)、5,5'-二硫代-2,2'-二硝基苯甲酸(DTNB)、吡啶乙酸酯(3-Acetoxyindole):分析纯,美国 Fluka 公司;

其他试剂:分析纯,美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪: SpectraMax i3x 型,美国 Molecular Devices 公司;

电子天平: TB-214 型,北京赛多利斯仪器有限公司;

超低温冰箱: Ultra Freeze3410 型,丹麦 Heto 公司。

1.3 锦龟乙酰胆碱酯酶与树鼩酯酶的相对酶活测定

1.3.1 锦龟乙酰胆碱酯酶 根据 Ellman 法^[16]测定并稍作修改。依次取 $50\ \mu\text{L}$ 磷酸缓冲液($0.1\ \text{mol/L}$, $\text{pH}\ 7.5$)、 $50\ \mu\text{L}$ 锦龟头酶液、 $100\ \mu\text{L}$ ATChI ($1.5\ \text{mmol/L}$)加入 96 孔

板, 35°C 下处理 $15\ \text{min}$, 加入 $100\ \mu\text{L}$ DTNB($1.5\ \text{mmol/L}$)显色,通过在 $412\ \text{nm}$ 处连续测量 $5\ \text{min}$ 内 OD 值的变化来检测相对酶活。同时以酶抑制法常用酶源电鳗乙酰胆碱酯酶在最适条件下的相对酶活作为对照酶活^[17]。按式(1)计算锦龟头酯酶相对酶活。

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——相对酶活, %;

m_1 ——锦龟头 OD 值变化;

m_2 ——电鳗 OD 值变化。

1.3.2 树鼩酯酶 根据酶片法^[18]测定并稍作修改。分别取 $100\ \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液($0.1\ \text{mol/L}$, $\text{pH}\ 8.0$)、 $50\ \mu\text{L}$ 树鼩肝部酶液加入 96 孔板, 25°C 下孵育 $15\ \text{min}$, 加入 $50\ \mu\text{L}$ 吡啶乙酸酯($8\ \text{mmol/L}$), 通过 $5\ \text{min}$ 内连续测量 $610\ \text{nm}$ 处荧光强度的变化来检测相对酶活。同时以酶抑制法常用酶源猪肝酯酶在最适条件下的相对酶活作为对照酶活^[17]。按式(2)计算树鼩酯酶的相对酶活。

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

c ——相对酶活, %;

m_1 ——树鼩酯酶的荧光值变化;

m_2 ——猪肝酯酶的荧光值变化。

1.4 酯酶抑制率的检测

在酶促反应体系中,分别加入不同浓度的酶抑制剂,同时以未加抑制剂组为对照组。分别按 1.3 的方法测定相对酶活,并按式(3)计算抑制率。

$$c = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

c ——抑制剂, %;

m_1 ——无抑制时反应体系 OD 值;

m_2 ——有抑制时反应体系 OD 值。

1.5 锦龟头酯酶与树鼩酯酶酶促反应条件的优化

1.5.1 pH、温度和反应时间对酶促反应的影响 在温度 35°C , 反应时间 $15\ \text{min}$ 下, 考察 pH ($6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5$) 对相对酶活的影响; 在 $\text{pH}\ 7.5$, 反应时间 $15\ \text{min}$ 下, 考察温度 ($20, 25, 30, 35, 40^{\circ}\text{C}$) 对相对酶活的影响; 在温度 35°C , $\text{pH}\ 7.5$ 下, 考察反应时间 ($5, 10, 15, 20, 25\ \text{min}$) 对相对酶活的影响。

1.5.2 正交试验 在单因素试验的基础上,选取最适 pH 值、温度、时间设计三因素三水平正交试验,优化酶促反应条件。

1.6 农药敏感性(IC_{50})研究

按 1.4 方法测量锦龟头酯酶和树鼩酯酶抑制率,根据不同农药浓度 ($2 \times 10^{-3}, 2 \times 10^{-4}, 2 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-6}, 2 \times$

$10^{-7}, 2 \times 10^{-8}$ mol/L) 的酶抑制率 C , 以抑制剂浓度负对数 ($-\lg C$) 为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制折线图, 通过抑制率曲线方程, 当 $y = 0.5$ 时, 抑制率为 50%, 计算得到 IC_{50} 。

1.7 数据处理

采用 Origin 8、SPSS 16.0 和 Excel 等分析软件对试验数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 pH、温度、反应时间对酶活力的影响

由图 1 可知, 锦龟酯酶最佳反应条件为 pH 7.5、温度 35 °C、反应时间 15 min; 树鼯酯酶最佳反应条件为 pH 8.0、温度 25 °C、反应时间 15 min。

2.2 最优反应条件确定

2.2.1 锦龟酯酶 根据单因素试验结果选择适宜参数水平, 建立三因素三水平正交试验因素水平表见表 1, 正交

试验结果见表 2, 方差分析见表 3。

由表 2、3 可知, 各因素对锦龟酯酶酶活影响次序为 $pH > 温度 > 反应时间$, 且三者对酶活的影响均极显著, 其中 pH 对酶活测定影响最大; 最佳反应条件为 $A_2 B_2 C_2$, 即 pH 7.5、温度 35 °C、反应时间 15 min。验证实验 ($n = 9$) 测得, 该条件下相对酶活为 $(108.440 \pm 0.176)\%$ 。

表 1 锦龟酯酶酶促反应条件正交试验因素设计水平表

Table 1 Orthogonal array design table of esterase from Chrysemys

水平	A pH	B 温度/°C	C 反应时间/min
1	7.0	30	10
2	7.5	35	15
3	8.0	40	20

表 2 锦龟酯酶酶促反应条件正交试验及结果

Table 2 Orthogonal array design and results of esterase from Chrysemys

试验号	A	B	C	相对酶活/%		
1	1	1	1	66.338	66.108	66.994
2	1	2	2	82.694	82.004	83.001
3	1	3	3	62.315	61.998	62.843
4	2	1	2	86.635	86.105	86.998
5	2	2	3	98.345	98.014	98.854
6	2	3	1	57.088	56.258	57.846
7	3	1	3	51.176	51.176	51.164
8	3	2	1	53.519	53.014	53.882
9	3	3	2	56.011	56.001	56.103
k_1	70.449	68.050	58.982			
k_2	80.690	78.186	75.114			
k_3	53.569	58.472	70.612			
R	27.121	19.714	16.132			

表 3 方差分析表[†]

Table 3 Variance analysis of enzymatic reaction conditions of esterase from Chrysemys

来源	III 型平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	6 354.678	6	1 059.113	45.537	<0.001
截距	125 732.528	1	125 732.528	5 405.895	<0.001
pH	3 377.772	2	1 688.886	72.614	<0.001
温度	1 738.171	2	869.086	37.367	<0.001
时间	1 238.735	2	619.368	26.630	<0.001
误差	465.168	20	23.258		
总计	132 552.400	27			
校正总计	6 819.847	26			

[†] $R^2 = 0.932; R_{adj}^2 = 0.911$ 。

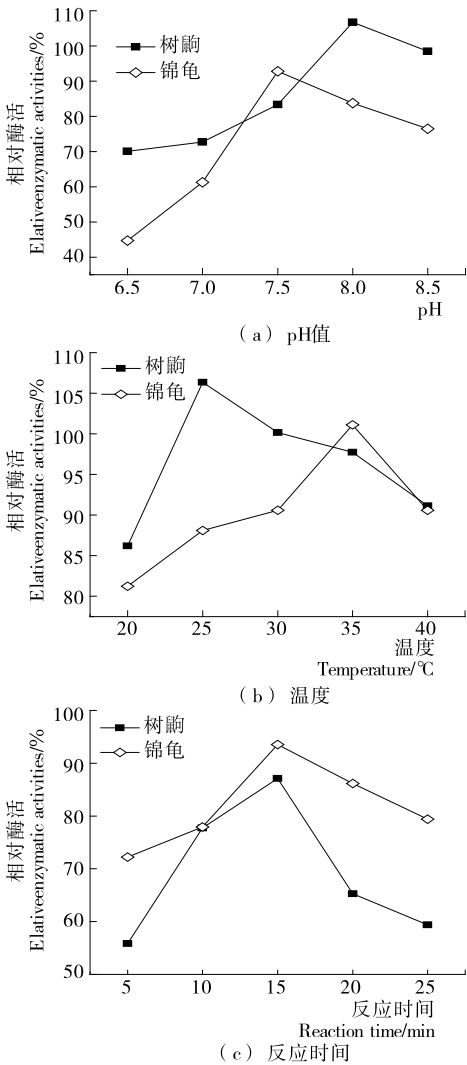


图 1 反应条件对酶活的影响

Figure 1 The effects of on enzyme activity ($n = 3$)

2.2.2 树鼩酯酶 根据单因素试验结果选择适宜参数水平,建立三因素三水平正交试验因素水平表,见表4,正交试验结果见表5,方差分析见表6。

由表4、5可知,各因素对树鼩酯酶影响大小为温度>pH>反应时间,pH、温度对树鼩酯酶影响差异极显著;树鼩酯酶最佳反应条件为A₂B₂C₂,即pH 8.0、温度25℃、时间15 min。验证实验(n=9)测得,该条件下相对酶活为(113.569±0.351)%。

表4 树鼩酯酶酶促反应条件正交试验因素设计水平表
Table 4 Orthogonal array design table of esterase from Tupaia belangeri

水平	A pH	B 温度/℃	C 反应时间/min
1	7.5	20	10
2	8.0	25	15
3	8.5	30	20

表5 树鼩酯酶酶促反应条件正交试验及结果

Table 5 Orthogonal array design and results of esterase from Tupaia belangeri

试验号	A	B	C	相对酶活/%		
1	1	1	1	67.250	67.104	67.885
2	1	2	2	82.750	82.524	83.994
3	1	3	3	63.942	64.114	65.240
4	2	1	2	81.529	80.994	81.798
5	2	2	3	103.162	103.645	104.885
6	2	3	1	76.859	79.245	76.554
7	3	1	3	61.158	61.555	62.084
8	3	2	1	79.774	79.668	79.224
9	3	3	2	71.020	70.994	72.014
k ₁	71.314	69.979	74.628			
k ₂	87.184	88.562	78.433			
k ₃	70.651	70.607	76.087			
R	16.533	18.583	3.805			

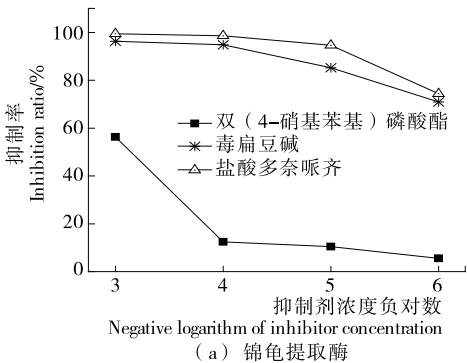


表6 树鼩酯酶酶促反应条件方差分析表[†]

Table 6 Variance analysis of enzymatic reaction conditions of esterase from Tupaia belangeri

误差源	III型平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	3 674.974	6	612.496	48.748	<0.001
截距	158 849.060	1	158 849.060	12 642.616	<0.001
pH	1 615.083	2	807.541	64.271	<0.001
温度	1 995.416	2	997.708	79.406	<0.001
时间	64.475	2	32.238	2.566	0.102
误差	251.291	20	12.565		
总计	162 775.325	27			
校正总计	3 926.265	26			

[†] R²=0.936; R_{adj}²=0.917。

2.3 特异性抑制分析

由图2(a)可知,当盐酸多奈哌齐、毒扁豆碱浓度分别为10⁻³、10⁻⁴ mol/L时,锦龟提取酶抑制率基本达到100%;当浓度分别为10⁻⁵、10⁻⁶ mol/L时,抑制率下降,但抑制率>70%;当双(4-硝基苯基)磷酸酯浓度为10⁻³ mol/L时,抑制率为56.32%,但在10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ mol/L时,抑制率均<20%;锦龟提取酶对3种酶抑制剂的敏感性顺序为盐酸多奈哌齐>毒扁豆碱>双(4-硝基苯基)磷酸酯,表明锦龟头部分提取的粗酶中可能主要为AChE酶。

由图2(b)可知,当抑制剂浓度为10⁻³、10⁻⁴ mol/L时,双(4-硝基苯基)磷酸酯、毒扁豆碱对树鼩提取酶抑制率均≥94%,当抑制浓度为10⁻⁵、10⁻⁶ mol/L时,抑制率下降,但抑制率>70%;树鼩酶对3种酶抑制剂的敏感性顺序为双(4-硝基苯基)磷酸酯>毒扁豆碱>盐酸多奈哌齐,表明树鼩肝部分提取的粗酶中可能主要为酯酶。

2.4 对不同浓度有机磷类、氨基甲酸酯类农药的敏感性

由图3可知,随着农药浓度的降低,5种有机磷农药对锦龟酯酶、树鼩酯酶的抑制率逐渐降低。当农药终浓度由10⁻⁴ mol/L下降到10⁻⁹ mol/L时,锦龟酯酶抑制率下降最明显的是速灭磷和辛硫磷,下降了68%;树鼩酯酶

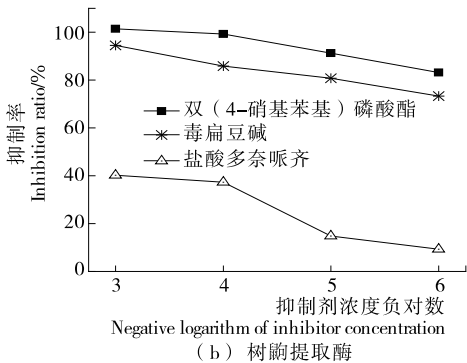


图2 酶特异性抑制剂对酶活的影响

Figure 2 Effect of inhibitors on enzyme activity (n=3)

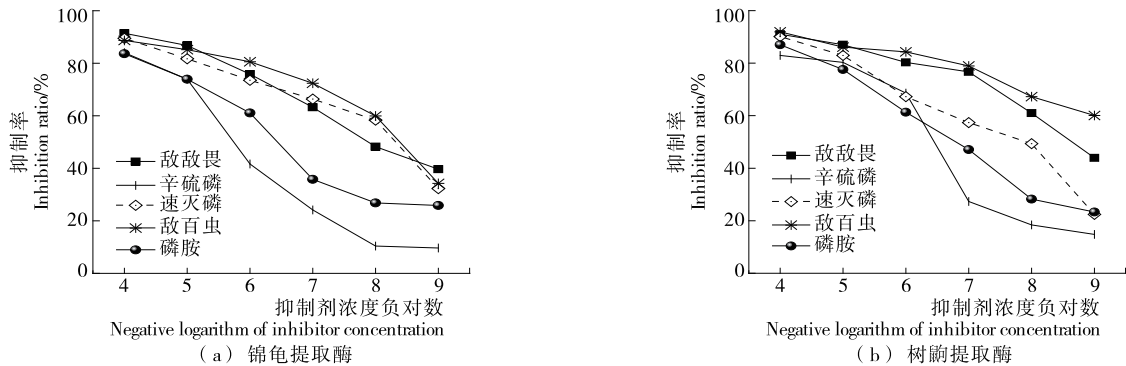


图 3 有机磷农药对酶的抑制效果

Figure 3 Inhibition effect of enzyme activity on organophosphorus pesticides ($n=3$)

抑制率中,敌敌畏、敌百虫、速灭磷、磷胺、辛硫磷分别下降了 52%,61%,57%,59%,74%。

由图 4 可知,5 种氨基甲酸酯类农药对锦龟酯酶、树鼩酯酶抑制率都较高。当农药终浓度由 10^{-4} mol/L 下降到 10^{-9} mol/L 时,5 种氨基甲酸酯类农药对锦龟酯酶抑制率随农药浓度降低逐渐降低,下降率最高的为克百威,下降了 74%;而树鼩酯酶中下降率最高的为速灭威,下降了 73%。

由表 7 可知,锦龟酯酶对有机磷类农药的敏感性顺序为敌百虫>敌敌畏>速灭磷>辛硫磷>磷胺;对氨基甲酸酯类农药的敏感性顺序为涕灭威>甲萘威>灭多威>克百威>速灭威。树鼩酯酶对有机磷类农药的敏感性顺序为敌敌畏>速灭磷>敌百虫>磷胺>辛硫磷;对氨基甲酸酯类农药的敏感性顺序为甲萘威>速灭威>涕灭威>克百威>灭多威。试验方法所选酶对几种有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感性高于目前已开发的试剂

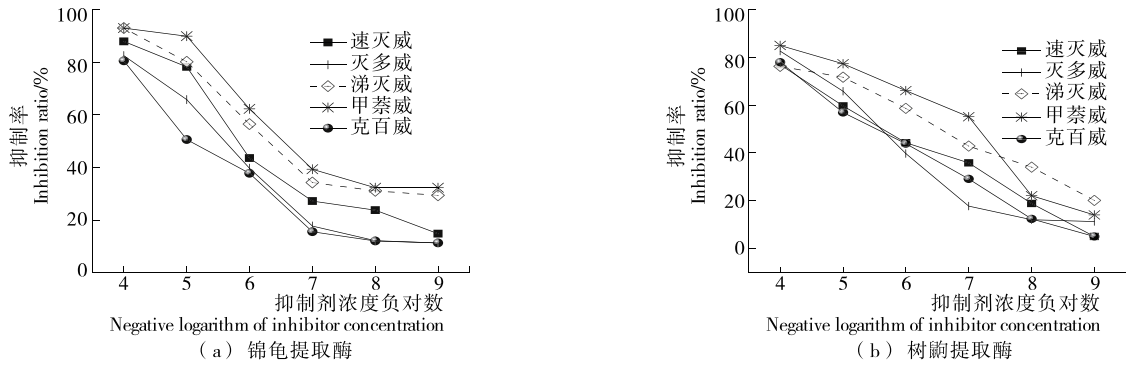


图 4 氨基甲酸酯类农药对酶的抑制效果

Figure 4 Inhibition effect of enzyme activity on carbamates pesticide ($n=3$)

表 7 酶对有机磷类和氨基甲酸酯类农药的 IC_{50}

Table 7 The comparison of sensitivity of AChE from Chrysemys to five organ phosphorus pesticides

农药	锦龟酯酶			树鼩酯酶		
	$IC_{50}/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOD/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MRL/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$IC_{50}/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOD/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MRL/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
敌百虫	9.295×10^{-4}	1.1964×10^{-6}	0.10~0.20	3.198×10^{-2}	4.1166×10^{-5}	0.10~0.20
辛硫磷	2.666	0.0039	0.05~0.10	60.020	0.0894	0.05~0.10
敌敌畏	1.292×10^{-3}	1.4275×10^{-6}	0.20~0.50	1.286×10^{-2}	1.4209×10^{-5}	0.20~0.50
速灭磷	0.259	2.9086×10^{-4}	0.02~0.10	2.122×10^{-2}	2.3784×10^{-5}	0.02~0.10
磷胺	6.352	0.0095	0.02~0.05	2.654	0.0039	0.02~0.05
速灭威	61.050	0.0504	无	1.785	0.0014	无
甲萘威	5.271	0.0053	1.00~2.00	0.120	1.2022×10^{-4}	1.00~2.00
灭多威	6.785	0.0055	0.20~0.50	3.353	0.0031	0.20~0.50
涕灭威	3.353	0.0031	0.01~0.10	6.501	0.0061	0.01~0.10
克百威	45.450	0.0502	0.02~0.20	2.356	0.0026	0.02~0.20

盒,且用量更低^[19]。根据 GB/T 18630—2002 所规定的酶抑制法样品前处理条件所计算的锦龟酯酶、树鼯酯酶对常用有机磷农药、氨基甲酸酯类农药的 LOD 值均小于 GB 2763—2019 所规定的 MRL。对比锦龟酯酶、树鼯酯酶的 IC_{50} 与 LOD 可知,两种酶对有机磷农药中敌百虫最为敏感,对含 P=O 基团有机磷类农药(敌百虫、敌敌畏、速灭磷)整体(除磷胺外)敏感性强于含 P=S 基团的有机磷类农药(辛硫磷);氨基甲酸酯类农药中涕灭威最为敏感。总体而言,两种酶对有机磷农药的敏感性高于氨基甲酸酯类农药。

3 结论

试验表明,锦龟酯酶酶活的最佳反应条件为孵育温度 35 ℃、孵育时间 15 min、缓冲液 pH 7.5;树鼯酯酶酶活的最佳反应条件为孵育温度 25 ℃、孵育时间 15 min、缓冲液 pH 8.0。抑制剂敏感性试验表明锦龟粗酯酶中主要为乙酰胆碱酯酶,而树鼯肝部提取的粗酶中主要酯酶为酯酶。而锦龟酯酶和树鼯酯酶对常见有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感性均较高,且用于酶抑制法的 LOD 值均小于 GB 2763—2019 所要求的农药最大残留量限量。目前乙酰胆碱酯酶主要从家蝇、电鳗中提取,来源较少,难以满足检测过程中的需求,试验所选用两种酶源,对多数有机磷农药和氨基甲酸酯类农药敏感性较好,可作为酶抑制法快速检测农药残留的候选酶源。试验中仅将粗酶作为试验用酶,为进一步揭示锦龟酯酶和树鼯酯酶对农药的敏感性,下一步可先将锦龟酯酶和树鼯酯酶纯化,再分析其对农药的敏感性。

参考文献

- [1] 范宝光. 农药残留对食品安全的影响及其控制措施[J]. 中国农业信息, 2015, 3(6): 28-30.
- [2] 张爱琳, 樊秀花, 郑敏. 鸡血清胆碱酯酶的提取纯化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(5): 30-33.
- [3] 余以刚, 卢志洪, 朱珍, 等. 广州市售蔬菜有机磷农药残留情况调查分析[J]. 现代食品科技, 2010, 26(7): 742-745.
- [4] JAFARI M T, SARAJI M, SHERAFATM H. Polypyrrole/montmorillonite nanocomposite as a new solid phase micro-extraction fiber combined with gas chromatography-corona discharge ion mobility spectrometry for the simultaneous determination of diazinon and fenthion organophosphorus pesticides[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 814(7): 69-78.
- [5] MENEZES FILHO A, DOS SANTOS P N, PEREIRA P A D P. Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples[J]. Microchemical Journal, 2010, 96(1): 139-45.
- [6] FANG Jing, ZHAO Hong-zhi, ZHANG Yan-hao, et al. Performance of atmospheric pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of organochlorine pesticides in human serum[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(18): 4 185-4 191.
- [7] SANCHEZ M E, MENDEZ R, GOMEZ X, et al. Determination of diazinon and fenitrothion in environmental water and soil samples by HPLC[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2003, 26(8): 483-497.
- [8] SONG N E, KIM D B, LIM T G, et al. Determining pesticide residues in wheat flour by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry with QuEChERS extraction[J]. Food Additives & Contaminants 2019, 16(11): 1-11.
- [9] SHAYEGHI M, KHOOBDEL M, VATANDOOST H. Determination of organophosphorus insecticides (malathion and diazinon) residue in the drinking water[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2007, 10(17): 2 900-2 904.
- [10] SALM P, TAYLOR P J, ROBERTS D, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood[J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2009, 877: 568-574.
- [11] 麦昌青, 陈盛, 陈燕. 豇豆中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留酶抑制率快速检测方法[J]. 现代农药, 2016, 15(1): 41-43.
- [12] SUN Xia, WANG Xiang-you. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(12): 2 611-2 614.
- [13] VIOQUE-FERNANDEZ A, DE ALMEIDA E A, LOPEZ-BAREA J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation[J]. Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol, 2007, 145(3): 404-412.
- [14] LAGUERRE C, SANCHEZ-HERNANDEZ J C, KOHLER H R, et al. B-type esterases in the snail *Xeropictaderbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure[J]. Environ Pollut, 2009, 157: 199-207.
- [15] YANG Ling-ling, YANG Xiao, LI Guo-biao, et al. An integrated molecular docking and rescoring method for predicting the sensitivity spectrum of various serine hydrolases to organophosphorus pesticides[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96: 2 184-2 192.
- [16] 高希武. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍[J]. 昆虫知识, 1987(4): 245-246.
- [17] 何绍志. 美洲蟑螂乙酰胆碱酯酶的分离纯化及性质研究[D]. 成都: 西华大学, 2014: 8-13.
- [18] 刘永杰, 张金振, 曹明章, 等. 酶抑制法快速检测农产品农药残留的研究与应用[J]. 现代农药, 2004(2): 25-27.
- [19] 苏鹤, 罗俊霞, 赵建波. 一种商品化酶抑制—比色法快速检测农药残留试剂盒对 10 种有机磷农药的敏感性测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5 512-5 516.