

用于有机磷农药检测的植物酯酶生物传感器的研究

姜 彬,冯志彪*

(东北农业大学理学院应用化学系,黑龙江哈尔滨 150030)

摘 要:报道了一种用于有机磷农药检测的电流型生物传感器。从小麦中提取植物酯酶,纯化后作为生物传感器的酶源,以 CuTAPC/SWCNT/GC 修饰电极为基体电极,采用气相沉积法制备 TiO_2 凝胶,通过凝胶包埋法制备植物酯酶生物传感器。该传感器具有良好的稳定性和重现性。当对硫磷、辛硫磷和氧化乐果浓度分别在 $0.5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ 、 $10^{-9} \sim 10^{-5}$ 、 $0.5 \times 10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 范围内时,抑制率与其浓度的对数呈线性关系,检测限分别为 3.24×10^{-10} 、 1.26×10^{-9} 、 6.60×10^{-9} mol/L。

关键词:生物传感器,植物酯酶,有机磷农药,检测

Study on biosensor based on plant esterase for determination of organophosphorus pesticide

JIANG Bin, FENG Zhi-biao*

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: An amperometric biosensor for the determination of organophosphorus pesticide was described. The biosensor was based on plant esterase which was extracted from wheat. After purified, the plant was immobilized on CuTAPc/SWCNT/GC electrode by a vapor deposited titania sol-gel film. The biosensor exhibited a good reproducibility and recovery ratio. The inhibition versus the logarithm of concentration was linear to parathion, phoxim and omethoate over the concentration ranges of $0.5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L, $10^{-9} \sim 10^{-5}$ mol/L and $0.5 \times 10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L with the detection limits of 3.24×10^{-10} , 1.26×10^{-9} and 6.60×10^{-9} mol/L, respectively.

Key words: biosensor; plant esterase; organophosphorus pesticide; determination

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)10-0364-04

我国是农药生产和使用大国,使用农药所造成的环境污染和食品中的残留问题,正日益受到政府和公众的关注。近年来,随着生物传感技术的迅猛发展,酶生物传感器以简单、廉价、易于微型化等优势成了有机磷农药(OPs)传统分析方法的最佳替代品。以往的酶生物传感器研究集中在动物胆碱酯酶上^[1-3],但动物胆碱酯酶价格昂贵、不易保存,检测成本较高,限制了其应用。与动物胆碱酯酶相比,植物酯酶具有酶源广泛、价格低廉等优点,经过纯化的植物酯酶对农药的敏感程度可与胆碱酯酶相媲美,目前基于植物酯酶抑制法测定有机磷农药的研究已有很多,但多采用的是分光光度法或纸片法,基于植物酯酶的生物传感器的研究尚未见报道。本文从小麦中提取植物酯酶,纯化后作为生物传感器的酶源,以 CuTAPc/SWCNT/GC 修饰电极为基体电极,采用气

相沉积法将植物酯酶包埋于 TiO_2 凝胶中,制备了用于有机磷农药检测的植物酯酶生物传感器,并对该生物传感器的制备及应用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

α -萘酚、固兰盐 B、 α -乙酸萘酯 fluka; 钛酸异丙酯 国药集团上海试剂公司; 40% 氧化乐果、对硫磷、辛硫磷 山东曹达化工有限公司; 单壁碳纳米管 深圳纳米港; 东农黑小麦 东北农业大学。

PASTAT30 型电化学工作站 AUTOLAB; nHS-25 型酸度计 上海精科雷磁; KQ-500DV 数控超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 植物酯酶的提取

取适量小麦粉碎至均匀粉粒状,称取 5g 小麦粉按照 1:5 (w/w) 的比例加入蒸馏水,磁力搅拌 30min,再以 3000r/min 离心 30min,弃去沉淀,取上清液依次用 0.65、0.45 μm 的微孔滤膜过滤,即得到粗制的小麦酶液。将粗酶液经 23% (w/w) PEG/16% (w/w) NaH_2PO_4 双水相体系萃取后,依次经 Sephadex G-

收稿日期: 2009-10-20 * 通讯联系人

作者简介: 姜彬(1977-),男,讲师,在读博士,研究方向:化学,食品科学。

150FF 凝胶柱层析和 Procainamide 亲和凝胶柱层析纯化后得到纯化植物酯酶酶液, 冷冻干燥后, 保存备用。

1.3 CuTAPc/SWCNT/GC 修饰电极的制备

将 SWCNT 样品按文献^[4]方法处理后, 用水配成 1mg/mL 的溶胶备用。玻碳电极先用 HNO_3 (68%, 分析纯)、KOH、超纯水依次清洗, 然后用 $0.3\mu\text{m}$ 和 $0.05\mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 的悬浊液抛光成镜面, 再分别用丙酮、无水乙醇、超纯水超声波清洗。电极在空气中风干后, 在电极表面滴加一定量的 SWCNTs 水溶胶, 干燥后置于含有 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ CuTAPc 单体和 0.1 mol/L 高氯四丁铵 (TBAP) 的支持电解质的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (DMF) 溶液中, $-0.4 \sim 0.9 \text{ V}$ 循环伏安扫描若干次, 制得 CuTAPc/SWCNT/GC 修饰电极, 然后依次用丙酮和蒸馏水清洗电极。

1.4 传感器的制备

取适量植物酯酶溶液滴加到 CuTAPc/SWCNT/GC 修饰电极表面, 然后将电极置于盛有钛酸异丙酯液体的密闭容器中, 使电极表面垂直悬挂在液体上方, 25°C 下恒温放置 6h, 密闭容器内的饱和 $\text{Ti}(\text{i-PrO})_4$ 蒸气被电极表面的酶溶液吸收, 在电极表面缓慢形成 TiO_2 凝胶膜, 同时植物酯酶被包埋于凝胶膜中, 得到植物酯酶生物传感器, 将所制备的传感器用超纯水反复冲洗后, 保存备用。

1.5 实验方法

电化学测试前, 先将传感器在 PBS 缓冲溶液中浸泡 5min 以洗去未结合的酶液。植物酯酶传感器为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 将三电极体系浸入到 0.1 mol/L $\text{pH} = 6.0$ 的 PBS 缓冲溶液中, 扫描至背景电流稳定后, 加入 α -乙酸萘酯溶液, 使其浓度达到 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 30°C 下搅拌 10min, 加入适量 CTAB 使其浓度达到 0.05%, 在静止的溶液中记录产生的循环伏安扫描 (扫描范围 $0 \sim 0.8 \text{ V}$, 扫描速率 100 mV/s), 记录峰电流 I_0 , 在另一份磷酸盐缓冲溶液中加入一定浓度的农药, 温育 15min 后, 加入同样浓度的乙酰硫代胆碱溶液, 测得峰电流 I_1 。计算出各种浓度的农药相对应的峰电流的衰减值, 并根据下式计算农药对植物酯酶生物传感器的抑制率:

$$\text{抑制率 } I(\%) = (I_0 - I_1) / I_0 \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 支持介质的影响

研究了在不同种类的电解质溶液 HAc-NaAc 缓冲液、 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、B-R 缓冲液对传感器检测的影响, 结果表明, 该传感器在 $\text{pH} = 6.0$ 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液中响应信号最好, 酶活最大。

2.2 修饰电极的电化学性质

植物酯酶传感器的循环伏安曲线如图 1, 与在空白溶液中的循环伏安曲线相比, 在 α -乙酸萘酯溶液中的循环伏安曲线中在 0.4 V 左右出现明显的氧化峰, 说明制得的生物传感器对 α -乙酸萘酯的水解有明显的催化作用。

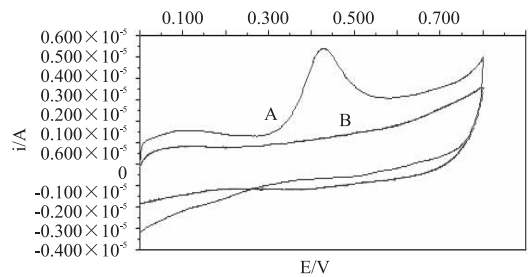


图1 植物酯酶传感器在 α -乙酸萘酯溶液中的循环伏安曲线

2.3 pH 对传感器响应电流的影响

酶的活性与 pH 有关, 每种酶都有适合的 pH 范围, 通常是在一定 pH 下其活性最大, 称为最适 pH。植物酯酶的最适 pH 是 6.5 左右, 但固定化后, 由于其所处的外部环境发生变化, 最适 pH 可能会发生变化。图 2 是传感器在不同 pH 的相同浓度的底物溶液中的响应电流。由图 2 中可以看出, $\text{pH} = 6.0$ 时传感器的响应电流达到最大, 说明固定化后植物酯酶的最适 pH 为 6.0。

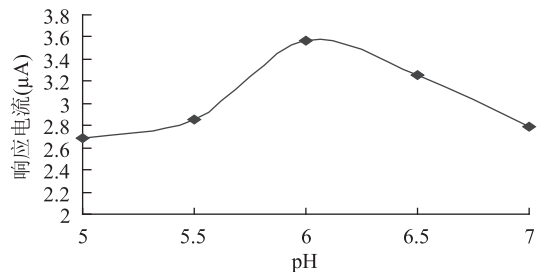


图2 pH 对响应电流的影响

2.4 底物浓度的影响

不同浓度 α -乙酸萘酯溶液的响应电流如图 3 所示, 可以看出, 在 α -乙酸萘酯浓度较低的情况下, 响应电流值与 α -乙酸萘酯的浓度成良好的线性关系, 其线性方程为 $y = 3.7x + 0.934$, 但浓度超过 0.05 mmol/L 之后, 线性关系不明显, 响应电流增大的趋势变缓, 这是因为此时酶的催化能力已达到饱和, 受底物浓度影响不大, 因此选择 0.05 mmol/L 作为农药测定的最适底物浓度。

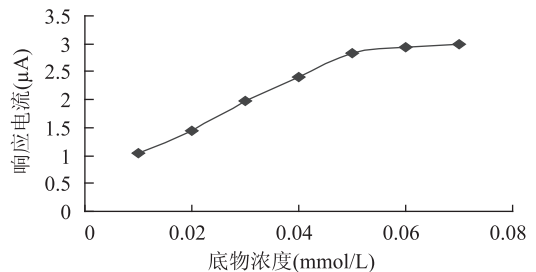


图3 底物浓度对响应电流的影响

2.5 给酶量和固定化时间的影响

传感器制备时, 植物酯酶的负载量对传感器的响应有着重要影响。用量太少, 传感器的响应电流太小, 影响检测的灵敏度; 用量太大会造成试剂的浪费。图 4 是载有不同量的植物酯酶的生物传感器在相同溶液中的响应情况。可以看出, 负载量为 $25\mu\text{L}$ 酶溶液的传感器的峰电流达到最大, 即使继续增加酶的负载量, 电流也不再增大, 当底物浓度较小时, 甚至出现下降的趋势, 此时酶制剂已达到饱和, 酶促

表2 三种有机磷农药的检测参数

	线性范围 (mol/L)	线性方程	相关系数	检测限 (mol/L)	最低检出浓度 (mol/L)
对硫磷	$0.5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$	$I(\%) = 16.601lgc + 167.54$	0.9947	3.24×10^{-10}	1.49×10^{-10}
辛硫磷	$1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$	$I(\%) = 12.11lgc + 118.49$	0.9930	1.26×10^{-9}	4.41×10^{-10}
氧化乐果	$0.5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$	$I(\%) = 14.926lgc + 131.71$	0.9966	6.60×10^{-9}	3.80×10^{-9}

反应主要受底物浓度的限制,且酶的负载量太大还可能导致空间位阻增大,影响电子在电极表面的传递,致使响应电流降低。故选择 25 μ L 作为最佳给酶量。

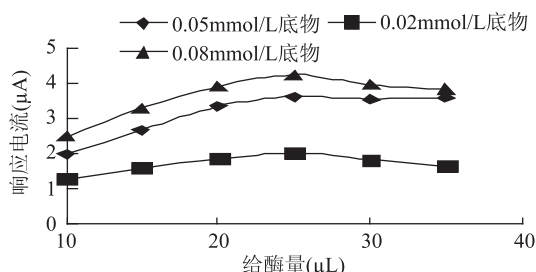


图4 给酶量对响应电流的影响

固定化时间的长短直接影响到凝胶膜的厚度,对传感器的稳定性和灵敏度有着重要的影响,凝胶膜太薄,则在测定过程中酶容易脱落,引起酶的流失,使传感器的稳定性下降;凝胶膜过厚时,电极表面电阻太大,妨碍电子的传递。

表1 是不同固定化时间制得的生物传感器对相同溶液进行 10 次重复测定所得峰电流的相对平均偏差,图5 是不同固定化时间制得的生物传感器对不同底物浓度的溶液进行测定得到的峰电流。由表1 和图5 可知,固定化时间为 6h 时,所得的传感器稳定性和灵敏度均较好,因此选择 6h 为凝胶固定时间。

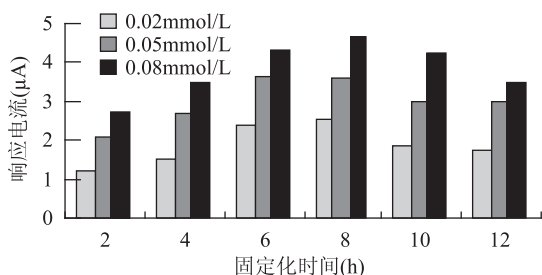


图5 固定化时间对响应电流的影响

表1 固定化时间对传感器稳定性的影响

固定化时间(h)	2	4	6	8	10
相对平均偏差(%)	10.8	6.4	2.3	3.1	2.7

2.6 抑制时间的影响

实验表明,选用的两种有机磷农药对植物酯酶的抑制作用在开始的 5min 内迅速增强,至 10min 时,抑制作用已完成 99%,故选择 10min 作为有机磷农药对植物酯酶的抑制时间。

2.7 农药的测定

以抑制率 $I(\%)$ 对农药浓度对数作图,结果表明,二者在一定范围内呈线性关系。按抑制率为 10% 时的农药浓度为检测限,以信噪比的 3 倍为最

低检出浓度,检测参数如表 2 所示。在不同测定范围内,考察了传感器农药标准溶液响应的重现性(以抑制率的大小为指标)。使用同一支传感器对相同浓度的农药溶液进行 10 次平行测定,其相对平均偏差不超过 6.13%,按照同样的方法制备 10 支传感器对相同浓度的农药溶液进行平行测定,其相对平均偏差不超过 3.48%,说明该方法具有良好的精密性,完全可以满足测定要求。

2.8 样品的测定

自行培育白菜样品四组,在生长过程中分别喷洒适量 2mmol/L 对硫磷、辛硫磷、氧化乐果和敌敌畏农药,即得到含有四种农药残留的蔬菜样品。

称取 50.00g 试样,切成 1cm² 左右的小块,置于 300mL 烧杯中,加入 50mL 水和 100mL 丙酮,用组织捣碎机提取 1~2min。匀浆液经铺有二层滤纸和约 10g Celite 545 的布氏漏斗减压抽滤。从滤液中分取 100mL 移至 500mL 分液漏斗中,加入 10~15g 氯化钠使溶液处于饱和状态。猛烈振摇 2~3min,静置 10min,使丙酮从水相中盐析出来,水相用 50mL 二氯甲烷振摇 2min,再静置分层。将丙酮与二氯甲烷提取液合并,再以约 40mL 二氯甲烷分数次洗涤容器和氯化钠,洗涤液也并入烧瓶中,用旋转蒸发器浓缩至约 2mL,浓缩液定量转移至 25mL 容量瓶中,定容至刻度。

由表 3 中可以看出,样品的加标回收率介于 95.8%~107.8% 之间,说明该方法用于实际样品的检测具有较好的效果。

表3 实际样品的加标回收率

	测定浓度 (μ g/kg)	添加浓度 (μ g/kg)	测定总浓度 (μ g/kg)	加标回收率 (%)
对硫磷	8.43	5.00	13.24	96.2
辛硫磷	14.65	5.00	20.04	107.8
氧化乐果	10.74	5.00	15.53	95.8

3 结论

本文以 CuTAPC/SWCNT/GC 修饰电极为基体电极,通过 TiO₂ 凝胶包埋法制备植物酯酶生物传感器。该传感器对硫磷、辛硫磷和氧化乐果的检测限分别为 3.24×10^{-10} 、 1.26×10^{-9} 和 6.60×10^{-9} mol/L,且具有较好的稳定性,具有一定应用前景。

参考文献

- [1] 康天放,刘润,鲁理平,等.再生丝素固定乙酰胆碱酯酶生物传感器[J].应用化学,2006,23(10):1099-1103.
- [2] 高慧丽,康天放,王小庆,等.凝胶-溶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.
- [3] Trojanowicz M. Determination of Pesticides Using

GC-MS测定软包装饮料中 光引发剂2-异丙基硫杂蒽酮的残留量

张耀海^{1,2}, 陈爱华¹, 赵其阳¹, 焦必宁^{1,*}, 周志钦^{2,*}

(1. 西南大学柑桔研究所, 重庆 400712;

2. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要:建立了气相色谱-质谱(GC-MS)检测软包装饮料中2-异丙基硫杂蒽酮(2-ITX)残留量的方法。样品用正己烷振荡提取,提取液用氟罗里硅土固相萃取小柱净化;采用单四极杆质谱进行样品筛选和定量,选取的监测离子为 m/z 184, 224, 239, 254。本方法的线性范围为0.02~50.0mg/kg,检测限(LOD)为0.005mg/kg,在0.10mg/kg和2.00mg/kg两个添加水平下,平均回收率为105.0%~124.3%(果汁)和125.0%~130.2%(牛奶),相对标准偏差(RSDs)为3.99%~5.00%(果汁)和3.47%~4.26%(牛奶)。该法前处理简单,污染小,重现性良好。

关键词:气相色谱,质谱,光引发剂,2-异丙基硫杂蒽酮,软包装饮料

Determination of 2-isopropylthioxanthone residue in packaged beverages by gas chromatography with mass spectrometry detection

ZHANG Yao-hai^{1,2}, CHEN Ai-hua¹, ZHAO Qi-yang¹, JIAO Bi-ning^{1,*}, ZHOU Zhi-qin^{2,*}

(1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China;

2. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: A simple method was developed for the trace determination of 2-isopropylthioxanthone (2-ITX) in packaged beverages. Samples were extracted from the food matrix using *n*-hexane, and further subjected to clean-up and preconcentration using solid-phase extraction prior to analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Data was acquired in selective ion monitoring (SIM) mode with the following ions: m/z 184, 224, 239 and 254 in screening method of GC-MS. The limit of detection (LOD) was 0.005mg/kg. In terms of juice samples, mean recoveries obtained at fortification levels 0.10~2.00mg/kg were in range of 105.0%~124.3% with relative standard deviations (RSDs) from 3.99% to 5.00%. As for milk samples, mean recoveries were in range of 125.0%~130.2% with RSDs from 3.47% to 4.26%. Compared with existing sample treatment, this method was reagent-effective, less toxic and more reproducible.

Key words: gas chromatography (GC); mass spectrometry (MS); photoinitiator; 2-isopropylthioxanthone (2-ITX); packaged beverages

中图分类号: TS206.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)10-0367-04

异丙基硫杂蒽酮(Isopropylthioxanthone, ITX)是目前食品纸质包装材料中使用最普遍的一种自由基

型高分子光引发剂,由于其在储存过程中容易挥发和迁移,能够穿过包装物或通过表面接触直接污染食品。赵洁^[1]和胡燕平^[2]等分别通过小鼠淋巴瘤和细菌回复突变实验,发现ITX各剂量组有致突变作用,突变频率均显著高于阴性对照组,并呈现显著的剂量-反应关系,提示这种高效光诱导剂对人体可能具有潜在的遗传毒性。ITX造成的食品污染的警钟却一再敲响:2005年11月雀巢公司因奶粉中检出ITX成分,被迫从法国、葡萄牙、西班牙及意大利等国紧急召回大量婴儿牛奶制品^[3]。2006年1月意大利

收稿日期:2010-03-04 * 通讯联系人

作者简介:张耀海(1977-),男,博士,副研究员,研究方向:农产品加工及质量安全检测。

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD47807);现代农业产业技术体系建设功能科学家岗位;柑桔学重庆市市级重点实验室开放基金(CKLC200803);重庆市自然科学基金(CSTC 2009BB1136)。

Electrochemical Enzymatic Biosensors[J]. Electroanalysis, 2002, 14(19-20):1311-1328.

[4] 余荣清,程大典,詹梦熊,等.液相化学腐蚀法用于碳纳米管的纯化及顶端开口研究[J].化学通报,1996(4):25-26.