

聚硫堇修饰的有机磷农药生物传感器的研制

丁建英,周永涛,汪嘉栩,陈文飞,陈梦琳

(常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏常熟 215500)

摘要:研制了一种用于蔬菜中有机磷农药残留快速检测的电化学酶传感器。通过循环伏安法将电子媒介体硫堇电聚合在玻碳电极上作为电子传递体,用壳聚糖凝胶将乙酰胆碱酯酶固定于聚硫堇电极表面,制成了新型的有机磷农药生物传感器。结果表明在有机磷农药乐果浓度为0.1~60 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,酶电极抑制率(%)与乐果的浓度(C)的对数呈良好的线性关系,相关系数为0.9961,检出限以抑制率10%的农药浓度计算为0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词:酶传感器,硫堇,有机磷农药,玻碳电极,乙酰胆碱酯酶

Fabrication of organophosphorus pesticide biosensor modified by polythionine

DING Jian-ying, ZHOU Yong-tao, WANG Jia-xu, CHEN Wen-fei, CHEN Meng-lin

(College of Biotechnology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: An amperometric biosensor for the detection of organophosphorus pesticides in vegetables was developed. This novel bienzyme electrode biosensor was fabricated with acetylcholinesterase (ACHE) immobilized by chitosan/silica on the surface of the polythionine modified glassy carbon electrode. Under optimal experimental conditions. The inhibition rate versus the logarithm of dimethoate concentration was linear over the range of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ to 60 $\mu\text{g/mL}$ with the linear correlation coefficient of 0.9961. The detection limitation for dimethoate, calculated by inhibition rate of 10%, was 0.05 $\mu\text{g/mL}$.

Key words: enzyme biosensors; thionine; organophosphorus pesticides; acetylcholinesterase

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)12-0074-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.006

有机磷农药因其高效、低残留在农业生产领域得到越来越广泛的应用,但由此带来的环境污染日趋严重,同时农产品中有机磷农药的残留对人体健康产生危害。我国的农药残留分析技术始于20世纪50年代,近年来取得了重要进展。目前,检测农产品中有机磷残留的国标方法主要为气相色谱法^[1],优点是准确,灵敏,但是设备昂贵,费时费力。为了达到快速筛查有机磷农药污染蔬菜,我国出台了蔬菜中有机磷农药残留快速检测标准,即GB-T 5009.199-2003《蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量快速检测》,该法是基于酶抑制原理的速测卡法和分光光度法,其特点为检测较为迅速,但易受样品本底颜色的干扰,且准确性偏低。电化学酶生物传感器由于制作简单、具有使用方便、灵敏、快捷等优点,因此在医学^[2]、环境^[3]、食品^[4]等领域有较多的研究应用。目前也有一些文献报导相关有机磷农药生物传感器的研究^[5-8],但尚无基于电子介体硫堇的有机磷农药生物

传感器的报道。

硫堇是一种吩噻嗪类染料,具有电子传递作用,在电化学酶传感器中有较多的研究应用,可提高电极的灵敏度、稳定性^[9-12]。

本文首次将硫堇聚合于玻碳电极表面,用壳聚糖溶胶凝胶将胆碱酯酶固定聚硫堇电极表面,研制了乙酰胆碱酯酶生物传感器用于有机磷农药残留的检测,该传感器具有良好的稳定性、灵敏度,该酶电极具有制备简单,使用方便,将该传感器用于蔬菜样品中有机磷农药留的快速检测显示出较好的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乙酰胆碱酯酶 AChE 500U/mg, Sigma公司; 氯化硫代乙酰胆碱 ATCh Sigma公司; 碳纳米管 深圳碳纳米港有限公司; 壳聚糖 浙江金壳生物有限公司; 乐果 上海析友分析仪器有限公司; 其他试剂均为分析纯试剂; 实验用水 均为二次蒸馏水。

CHI660C 电化学工作站 上海辰华仪器公司; 超声波清洗器 上海声析超声仪器有限公司; 旋涡混合器 上海精科实业有限公司; 玻碳电极、饱和甘

收稿日期: 2013-09-11

作者简介: 丁建英(1967-),女,硕士研究生,副教授,研究方向:食品品质控制。

汞电极、Pt电极 上海辰华仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 玻碳电极的预处理 将玻碳电极(GC, 直径为4mm)分别用 Al_2O_3 抛光粉抛光至镜面, 然后分别在无水乙醇和二次蒸馏水中超声清洗各3min。用氮气吹开后备用。

1.2.2 硫堇的电聚合 将预处理好的玻碳电极参照文献[13]的方法置于 $5mmol \cdot L^{-1}$ 硫堇醋酸缓冲溶液(pH=4.5)中, 在-0.4~0.3V电压范围内以 $0.05V \cdot s^{-1}$ 的速率循环扫描50圈形成聚硫堇膜。聚合后的电极用二次蒸馏水冲洗后放在pH=7.0的PBS缓冲溶液内保存。

1.2.3 酶电极的制备 用移液枪吸取 $80\mu L$ 壳聚糖溶液(0.3g壳聚糖溶于10mL 1%的乙酸溶液)与 $20\mu L$ 乙酰胆碱酯酶溶液(0.5mg乙酰胆碱酯酶溶解于1mL的0.01mol/L PBS溶液)混合均匀, 用微量注射器吸取 $8\mu L$ 滴加到备用的电极上, 置于 $4^\circ C$ 冰箱10~12h, 待滴于电极上的混合物干燥后备用。

1.2.4 电化学分析方法 采用三电极体系, 用循环伏安法对酶电极制备过程及特性进行了表征; 工作电位0.7V、室温(25 ± 1) $^\circ C$, 在磷酸缓冲液中(磁力搅拌下), 用计时电流法研究酶电极的催化性能, 检测条件的优化, 并根据酶电极在 $0.21mg/mL$ 的底物ATCh中的响应电流 I_1 , 酶电极在不同浓度乐果溶液中浸泡15min后对 $0.21mg/mL$ 的ATCh的响应电流 I_2 , 计算各种浓度农药相对应的抑制率, 抑制率计算公式^[14]为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{I_1 - I_2}{I_1} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 酶电极的电化学表征

2.1.1 酶传感器的循环伏安特性 在 $5mL$ $0.1mol \cdot L^{-1}$ pH为7.0的磷酸缓冲溶液(PBS)中, 采用循环伏安法研究电极的电化学特性。图1显示了玻碳电极在聚合硫堇前后在PBS中的循环伏安曲线, 图1(a)为裸电极在PBS溶液中的循环伏安图像, 没有出现明显的氧化-还原峰, 图1(b)为聚硫堇电极在PBS中的循环伏安图像, 有明显的氧化-还原峰, 说明了硫堇成功聚合在电极表面, 并形成了良好的导电膜, 且能发生良好可逆反应。图2为酶电极在 $0.1mol \cdot L^{-1}$ pH为7的PBS溶液中的循环伏安(CV)曲线。图2(a)为聚硫堇电极表面修饰壳聚糖凝胶和乙酰胆碱酯酶混合物后制备成的酶电极在PBS溶液中的CV图, 图2(b)为测试底液中加入乙酰胆碱酯酶的催化底物氯化硫代乙酰胆碱($0.21mg/mL$)后的CV图, 从图2(b)中可以看出, 在电位0.7V左右出现了明显的氧化峰, 说明修饰在电极表面的乙酰胆碱酯酶对底物氯化硫代乙酰胆碱有明显的电催化作用。图2(c)为酶电极在有机磷农药乐果($1.0\mu g/mL$)溶液中浸泡15min后, 在含氯化硫代乙酰胆碱的PBS溶液中的CV图, 在电位0.7V处氧化电流明显减小, 表明在经过有机磷农药乐果浸泡后对酶电极表面乙酰胆碱酯酶产生了抑制作用。

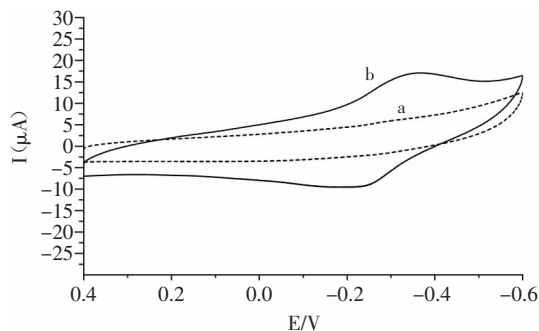


图1 不同修饰电极在PBS中的CV图

Fig.1 Cyclic voltammograms of different electrodes
注:a为裸电极;b为聚硫堇电极。

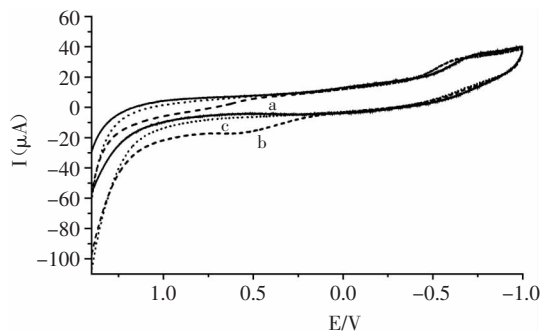


图2 酶电极在PBS缓冲液中的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms of enzyme electrodes in PBS buffer
注:a为酶电极在PBS液,b为酶电极在含有 $0.21mg/mL$ ACTH的PBS液,c为b经过有机磷农药乐果($1.0\mu g/mL$)溶液浸泡后。

2.1.2 酶传感器对底物的催化 本实验研究了酶电极对底物溶液(ATCh)的计时电流响应情况, 工作电位0.7V、室温(25 ± 1) $^\circ C$, 在 $5mL$ pH为7.0的 $0.1mol/L$ 磷酸缓冲液中(磁力搅拌的环境下), 每次加入 $30\mu L$ ($12mg/mL$)氯化硫代乙酰胆碱, 由图3可知, 随着测试底液中底物ATCh不断加入, 酶电极的催化响应电流也不断变大, 显示了经乙酰胆碱酯酶修饰的电极对底物具有良好的响应性能, 图4显示酶电极响应电流随着底物ATCh浓度的增加, 响应电流增大, 当底物的量 $1.23mg/mL$ 以后, 响应电流的接近恒定, 不再明显变化, 说明此时修饰于电极上的乙酰胆碱酯酶已催化作用达最大, 在ATCh浓度为 $0.2 \sim 0.5mg/mL$ 时, 酶电极对底物的电流响应最为灵敏, 本实验选择 $0.21mg/mL$ 的底物浓度进行检测条件的优化实验及抑制实验。

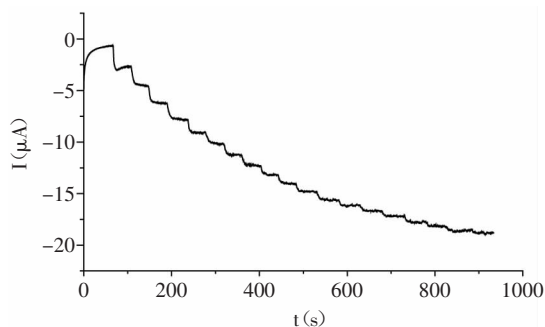


图3 酶电极对不同浓度ATCh的电流-时间响应曲线
Fig.3 Enzyme electrode response to i-t curve of ACTH

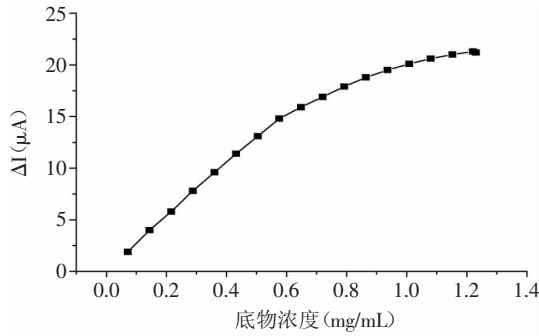


图4 响应电流与底物ACTH浓度的关系

Fig.4 Current relationship with the concentration of ACTH

2.2 酶传感器检测条件的优化

2.2.1 pH的影响 酶电极检测体系溶液中的pH对酶电极表面酶的催化活性的影响很大,因为酶在一定的pH范围内才表现出较好的催化活性。在某一pH时,酶的催化活性会达到最高,此时的pH为最适pH,一般最适pH在中性(pH=7)左右波动。本实验由于将酶修饰于电极表面后酶催化的微环境发生了变化,其催化的最适pH也可能发生变化。本实验考察了酶电极在pH为6.0~9.0范围的0.1mol/L磷酸缓冲液中对0.21mg/mL ACTH的响应电流(图5)。实验发现,酶电极在pH为8.0时酶电极对0.21mg/mL的氯化硫代乙酰胆碱催化时的响应电流最大,且在pH超过8.0后,响应电流逐渐下降,这是由于溶液的碱性过大,影响了乙酰胆碱酯酶的活性。故后续的实验中以pH为8.0的磷酸缓冲溶液为测试底液。

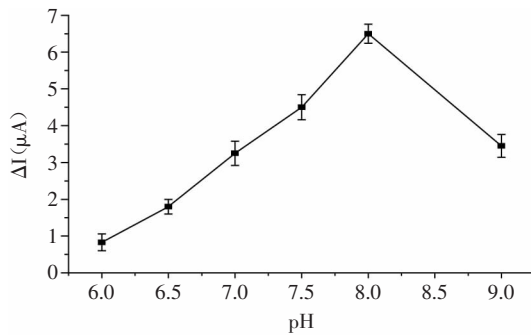


图5 pH对酶电极响应的影响

Fig.5 Effect of pH on the enzyme electrode response

2.2.2 温度的影响 温度是影响酶电极催化反应的另一个重要因素。而且酶的活性也与温度有着直接关系,温度升高,酶的催化反应速度加快,但温度过高会使酶蛋白变性而失活。一般情况下酶的活性在37℃左右最强。本实验中,在含ACTH浓度为0.21mg/mL的pH=8的0.1mol/L磷酸缓冲溶液中,10~40℃范围内考察了酶电极对0.216mg/mL底物标准溶液响应的影响(图6)。实验表明,随着温度升高,响应电流不断增大,当达到30℃时,电极响应电流值达到最大,说明此时酶的活性最大,催化速率最高,进一步升高温度时可能部分酶变性而失活,酶的活性开始下降导致了催化电流的下降。但是实际过程中,考虑到电极表面巯基的稳定性、酶电极的灵敏度和实际使用中的

便捷性,且在25℃时酶电极的响应电流较大,因此测定时底液温度选择为25℃。

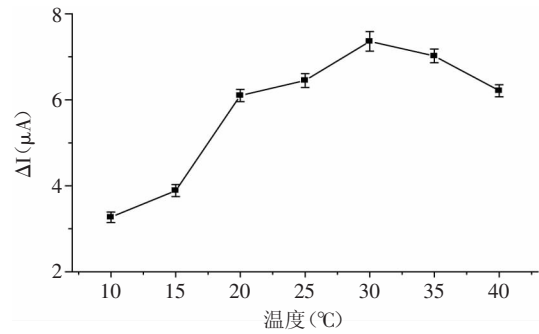


图6 温度对酶电极响应的影响

Fig.6 Effect of temperature on the enzyme electrode response

2.2.3 抑制时间的选择 酶电极在有机磷农药中抑制的时间长短对固定在其上的乙酰胆碱酯酶活性有着重要影响,测试体系为含ACTH浓度为0.21mg/mL的pH8.0的0.1mol/L PBS溶液。如图7所示,1.0μg/mL的乐果对乙酰胆碱酯酶的抑制作用随着时间的延长抑制率逐渐增大,在抑制时间5~15min时抑制率随着时间的延长迅速增加,在15min抑制率达高峰,而在20min时抑制率无明显上升,因此在抑制率曲线的制作过程中选择15min作为最佳抑制时间。

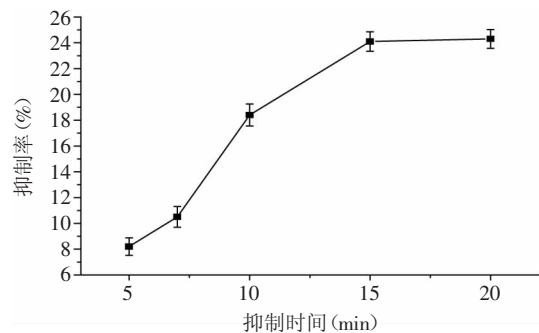


图7 抑制时间的优化

Fig.7 Optimization of suppression time

2.3 有机磷农药对酶传感器的抑制率曲线及实际样品的测定

2.3.1 有机磷农药的抑制率曲线 将乐果(40%乳油)按照一定比例稀释制成梯度浓度的溶液,用本文方法制成的酶电极在最优化条件下用电流-时间曲线测定有机磷农药乐果对酶电极的抑制率。测试底液为含ACTH浓度为0.21mg/mL的5mL pH8.0的0.1mol/L PBS溶液。由于有机磷农药对AChE有抑制作用,经过抑制后的酶电极在0.21mg/mL氯化硫代乙酰胆碱溶液中产生的催化电流明显比抑制前有明显降低,电流减小的程度与农药的浓度有一定的比例关系。以抑制率对农药浓度的对数作图,结果表明,农药对AChE的抑制率与农药浓度的对数在乐果溶液0.1~60μg/mL范围内呈良好的线性关系(见图8),抑制率与有机磷农药乐果浓度的对数的线性关系方程为:

(下转第86页)

166(2):368-379.

[15] Panasiuk R, Amarowicz R, Kostyra H, *et al.* Determination of α -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods[J]. Food Chemistry, 1998, 62(3):363-367.

[16] 柯雷芬, 白海英. 鹿茸多肽药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(2):138-140.

[17] FAO, WHO. WHO Expert consultation on allergenicity of

food derived from biotechnology[R]. Geneva: WHO, 2001: 12-13, 2001.

[18] 李英华, 董杰, 李剑虹, 等. 外源蛋白在模拟肠胃环境中稳定性测定模型初探[J]. 卫生研究, 2004, 33(4):433-436.

[19] 王金梅, 张占琴, 王学军, 等. 菜籽蛋白的制备及其体外模拟消化[J]. 中国油脂, 2008, 33(9):10-15.

[20] 孙敏杰, 木泰华. 蛋白质消化率测定方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(2):382-385.

(上接第76页)

抑制率(%)=42.29+24.85lgC, 相关系数 $R=0.9961$, 参考文献[15]将抑制率为10%时对应的农药浓度作为检出限, 其最低检出限为 $0.05\mu\text{g/mL}$, 最低检出限远低于该农药的国家最高残留限量标准, 说明酶电极具有较好的准确性和灵敏度。

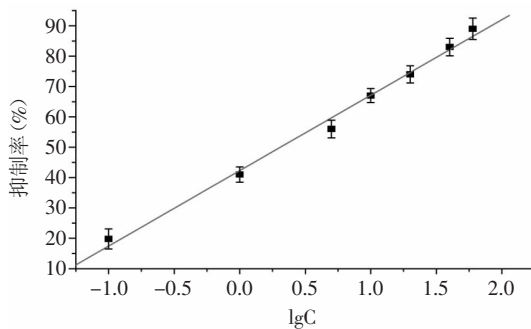


图8 有机磷农药抑制率曲线

Fig.8 Curve of inhibition rate of organophosphate

2.3.2 酶电极的重现性和稳定性 选择一个酶电极, 测定其对相同底液的响应电流, 每隔20min测定一次, 连续测6次, 得出其响应电流, 其相对标准偏差为7.8%。说明该酶传感器具有良好的重现性。另外选择一个修饰好的酶电极于PBS溶液内, 置于4℃冰箱中保存, 10d后再次测定其响应电流, 可以达到原响应电流的87%, 说明该酶电极具有较好的稳定性。

2.3.3 酶电极对实际样品的回收率测定 取洗净的样品(不含有机磷农药的白菜和胡萝卜), 用刀切成小片, 在其上滴适量一定浓度的乐果农药, 置于小烧杯中, 并加入适量的丙酮溶液浸泡, 密封静置12h。以上述配制的溶液为待测的实际样品, 在 0.1mol/L PBS缓冲溶液中采用三电极系统对样品进行回收率测定。本实验分别对白菜和胡萝卜进行了平行五次测定, 由表1可知, 该方法的回收率分别为94.74%、101.68%, 说明该有机磷生物农药传感器对样品中农药残留含量的测定具有良好的准确度。

表1 蔬菜样品回收率实验结果

Table 1 Results of vegetable sample recovery

样品	加入浓度($\mu\text{g/mL}$)	回收浓度($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)
白菜	1.0	0.9474	94.74
胡萝卜	4.0	1.0168	101.68

3 结论

本研究将硫堇聚合于玻碳电极表面制备了可用于蔬菜中有机磷残留检测的电化学酶传感器, 该传感器具有响应快、灵敏度高, 并具有较好的稳定性。将该传感器用于蔬菜样品中有机磷农药乐果的快速检测, 显示出较高的准确性。

参考文献

- [1] 刘绍主编. 食品分析与检验[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2011:258-260.
- [2] 王永生, 李贵荣, 吕昌银, 等. 甘油三酯酶传感器的研制及应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2): 144-145.
- [3] 刘真真, 张敏, 姚海军, 等. 酶生物传感器的研究进展[J]. 东莞理工学院学报, 2007, 14(3):98-99.
- [4] Aleida S, Hernández C, María A. Hyjpxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness[J]. Food Chemistry, 2010, 123(3):949-954.
- [5] 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]. 分析实验室, 2007, 26(9):10-12.
- [6] 宋昭, 黄加栋, 胡敏, 等. 快速检测敌百虫浓度传感器酶电极的研究[J]. 传感器技术, 2005, 24(7): 16-18.
- [7] 周华, 王辉, 刘登友, 等. 基于碳纳米管修饰的酶生物传感器检测有机磷农药[J]. 传感器世界, 2008, (8):23-26.
- [8] 孙春燕, 李宏坤, 平红, 等. AuNPs/Sol-gel复合膜法固定乙酰胆碱酯酶生物传感器检测有机磷农药[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(11):2533-2538.
- [9] 孔冰, 穆绍林. 硫堇的电化学聚合及聚硫堇的性质[J]. 物理化学学报, 2001, 17(4):295-299.
- [10] 吴芸, 陈昌云, 赵波, 等. 基于聚硫堇/多壁碳纳米管共修饰沙丁胺醇电化学传感器构建[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 40-43.
- [11] 李春香, 曾云龙. 基于原位电聚合硫堇的双酶型葡萄糖传感器的研究[J]. 分析科学学报, 2006(3):243-247.
- [12] 蔡称心, 鞠焯先, 陈洪渊. 聚硫堇修饰微带金电极的性质及对NADH的催化氧化[J]. 高等学校化学学报, 1995, 16(3): 369-371.
- [13] 丁建英, 韩剑众, 冯志梅, 等. 基于聚硫堇的一次性过氧化氢生物传感器的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(4):265-268.
- [14] 魏福祥, 韩菊. 乙酰胆碱酯酶电极反应机理[J]. 河北科技大学学报, 2005, 26(2): 106-209.
- [15] Nidhi C, Chandra S. An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe_3O_4 nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides[J]. Electrochimica Acta, 2012, 67:79-86.