

聚硫堇修饰的一次性酶传感器检测 辛硫磷农药残留

陈文飞, 丁建英*, 黄虹程, 汪嘉栩, 薛忆
(常熟理工学院生物与食品工程系, 常熟 215500)

摘要: **目的** 研制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。**方法** 通过循环伏安法将电子媒介体硫堇电聚合在丝网印刷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, 制成一种新型的有机磷农药生物传感器。**结果** 在有机磷农药辛硫磷浓度为 0.01~500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 酶电极抑制率(%)与辛硫磷的浓度(c)的对数呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9886, 检出限以抑制率 10%的农药浓度计算为 0.006 $\mu\text{g/mL}$ 。**结论** 研制出成本低廉, 使用方便, 具有响应快、灵敏度高的有机磷农药生物传感器, 可应用于果蔬中有机磷农药的快速检测。

关键词: 酶传感器; 硫堇; 有机磷农药; 丝网印刷电极

Fabrication of disposable organophosphorus pesticide enzyme biosensor modified by polythionine

CHEN Wen-Fei, DING Jian-Ying*, HUANG Hong-Cheng, WANG Jia-Xu, XUE Yi

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

ABSTRACT: Objective To develop an amperometric biosensor for the detection of organophosphorus pesticides in vegetables. **Methods** The novel enzyme electrode biosensor was fabricated with acetylcholinesterase(AChE) immobilized by chitosansilica on the surface of the polythionine modified screen printed electrode. **Results** The inhibition rate versus the logarithm of Phoxim concentration was linear over the range of 0.01 to 500 $\mu\text{g/mL}$ with the linear correlation coefficient of 0.9886. The detection limit for Phoxim calculated by inhibition rate of 10% was 0.006 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Organic phosphorus pesticide biosensor was successfully developed, which was expected to be used for rapid detection of organophosphorus pesticides in fruit and vegetables with its low cost and easy use, had the advantages of fast response and high sensitivity.

KEY WORDS: enzyme biosensors; thionine; organophosphorus pesticide; screen printed electrode

1 引言

有机磷农药残留是目前常见的食品安全问题之

一, 国内对有机磷农药残留的快速检测方法主要是基于酶抑制原理的比色法与速测卡法^[1,2], 这种检测已经难于满足人们检测便捷性和灵敏性的要求。电化

基金项目: 苏州科技局应用基础研究计划项目(SYN201210)、江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目

Fund: Supported by Suzhou Science and Technology Bureau of Applied Basic Research Program (SYN201210), and the Practice Innovation Training Program Projects for the Jiangsu College Students.

*通讯作者: 丁建英, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: dingjianying123@tom.com

*Corresponding author: DING Jian-Ying, Associate Professor, College of Biotechnology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China. E-mail: dingjianying123@tom.com

学酶生物传感器具有快速、方便、灵敏的特点^[3],在有机磷农药检测方面有了一些研究报道^[4,5],比如酶抑制法主要用于果蔬中有机磷和氨基甲酸酯类农药的残留检测,不能检测其他类型的农药,且不能给出定性和定量结果,最低检出浓度偏高,导致某些农药品种的检测结果显示假阴性^[6];在气相色谱法(GC)方面,卫红^[7]用岛津气相色谱仪 GC-14B、火焰光度检测器 FPD 测定有机磷农药乐果、甲基对硫磷、乙基对硫磷的含量;在薄层色谱法(TLC)方面,樊伟等^[8]建立了茶叶中高效氯氟氰菊酯和联苯菊酯残留的高效薄层色谱分析法。在这种色谱条件下高效氯氟氰菊酯和联苯菊酯的最小检测限分别为 10 ng 和 20 ng。

基于一次性丝网印刷电极的有机磷农药生物传感器的研究较少,本实验主要研究聚硫堇修饰的一次性丝网印刷酶电极检测有机磷农药残留的相关内容。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]。本研究将硫堇聚合于一次性丝网印刷电极表面,用壳聚糖溶胶凝胶将乙酰胆碱酯酶固定于聚硫堇电极表面,利用有机磷农药乙酰胆碱酯酶对底物催化作用的抑制,研制出一种快速、灵敏、使用方便的电化学酶传感器用于快速检测果蔬中有机磷农药残留。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,操作、使用方便的特点,将其用于蔬菜样品中有机磷农药留的快速检测,显示了该传感器较好的准确性。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

乙酰胆碱酯酶 AChE, 500 U/mg, Sigma 公司; 辛硫磷 上海阿拉丁试剂有限公司; 氯化硫代乙酰胆碱 ATCh, Sigma 公司; 壳聚糖 浙江金壳生物有限公司; 其他试剂 均为分析纯试剂; 实验用水均为二次蒸馏水; 磷酸盐缓冲溶液(以下简称 PBS)。

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; 一次性丝网印刷电极 无锡市申瑞生物制品有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 硫堇的电聚合

将丝网印刷电极参照文献^[13]的方法进行电聚合,

将电极置于 5 mmol/L 硫堇醋酸缓冲溶液(pH=4.5)中,在-0.4~0.3 V 电压范围内以 0.05 V/s 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置于 pH=7.0 的 PBS 缓冲溶液上方保存。

2.2.2 酶电极的制备

用移液枪吸取 20 μ L 壳聚糖溶液(0.10 g 壳聚糖溶于 10 mL 1%的乙酸溶液)与 30 μ L 乙酰胆碱酯酶溶液(0.50 mg 乙酰胆碱酯酶溶解于 1 mL 的 0.01 mol/mL PBS 溶液)混合均匀,用微量注射器吸取 10 μ L 滴加到备用的电极上,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 10~12 h,待滴于电极上的混合物干燥后备用。

2.2.3 电化学分析方法

用循环伏安法对酶电极制备过程及特性进行了表征;在工作电位 0.28 V、室温(25 \pm 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 0.24 mg/mL 的底物 ATCh 中的响应电流 I_1 ,酶电极在不同浓度辛硫磷溶液中浸泡 15 min 后对 0.24 mg/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:

$$\text{抑制率} = \frac{i_1 - i_2}{i_1} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 酶电极的电化学特征

3.1.1 酶传感器的循环伏安特性

在 5 mL 0.10 mol/L 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 显示了丝网印刷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)是经过硫堇聚合后的电极在 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 0.10 mol/L 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(0.24 mg/mL)后的 CV 图,从图 2(b)中可见,可以看出在电位 0.12 V 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辛硫磷(0.4 $\mu\text{g/mL}$)溶液中浸泡 15 min 后, 在含氯化硫代乙酰胆碱的 PBS 溶液中的 CV 图, 在电位 0.12 V 左右处氧化电流明显减小, 表明在经过有机磷农药辛硫磷浸泡后对酶电极表面乙酰胆碱酯酶产生了抑制作用。

3.1.2 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, 在工作电位 0.28 V、室温(25 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 在 5 mL pH 为 7.0 的 PBS 缓冲液中(磁力搅拌的环境下), 每次加入 20 μL (12 mg/mL)氯化硫代乙酰胆碱,

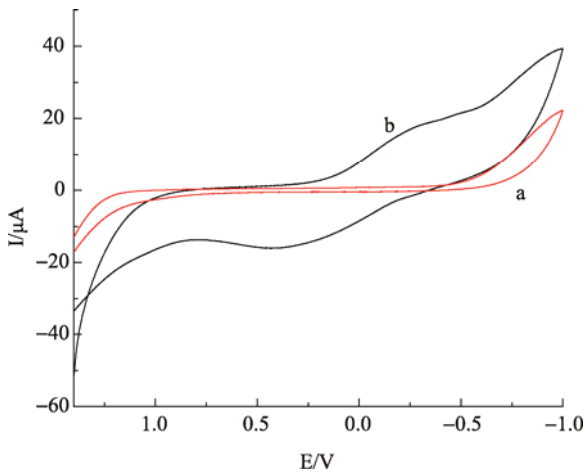


图 1 不同修饰电极在 PBS 中的 C-V 图

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

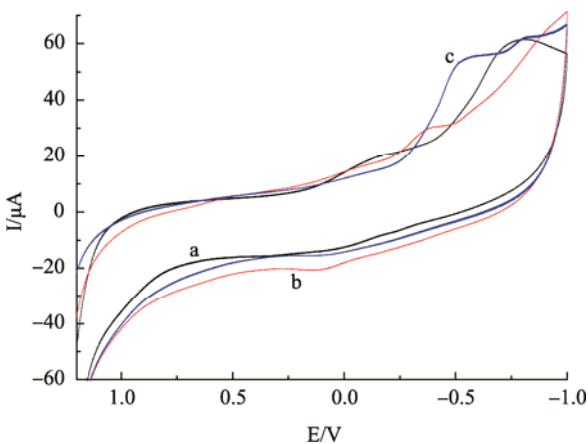


图 2 酶电极在 PBS 缓冲液中的循环伏安图

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 0.24 mg/mL ATCH 的 PBS 液, c 为 b 经过有机磷农药辛硫磷(0.40 $\mu\text{g/mL}$)溶液浸泡后

图 3 表明: 随着测试底液中底物 ATCH 不断加入, 酶电极的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, 当底物的浓度达到 0.90 mg/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 0.20~0.30 mg/mL 时, 酶电极对底物的电流响应最为灵敏, 所以本实验选择 0.24 mg/mL 的底物浓度进行检测条件的优化实验及抑制试验。

3.2 酶传感器检测条件的优化

3.2.1 pH 的影响

由于酶需要在适宜的 pH 环境中才可以表现出最佳的催化能力, 所以酶电极检测体系溶液的 pH 对乙

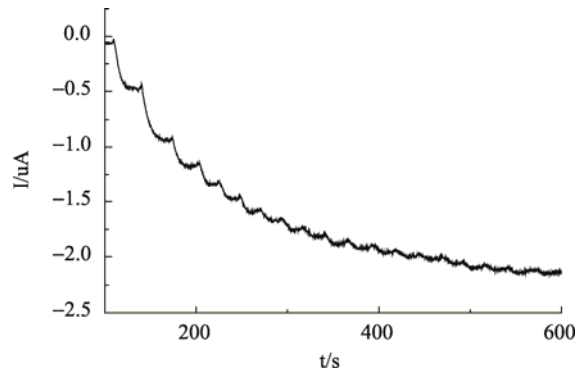


图 3 酶电极对不同浓度 ATCH 的电流-时间响应曲线

Fig. 3 I-T curve of enzyme electrode response to different concentrations of ATCH

注: 测试底液为 10 mL pH7.0 的 0.10 mol/L PBS 溶液, 工作电位 0.28 V

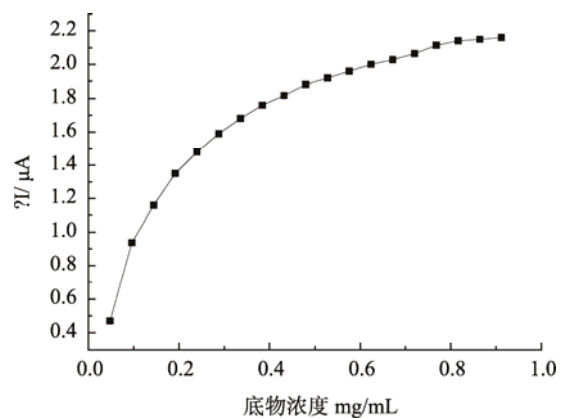


图 4 响应电流与底物 ATCH 浓度的关系

Fig. 4 Current relationship with concentrations of ATCH

酰胆碱酯酶的催化活力影响较大。因而需要通过实验对其 pH 环境进行优化并找出最佳 pH 环境。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 值在 pH=7 左右波动。本实验考察了酶电极在 pH 值为 5.5~8.5 范围的磷酸缓冲液中对 0.24 mg/mL LACTH 的响应电流(图 5)。实验发现, 酶电极在 pH 为 8.0 时酶电极对 0.24 mg/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。

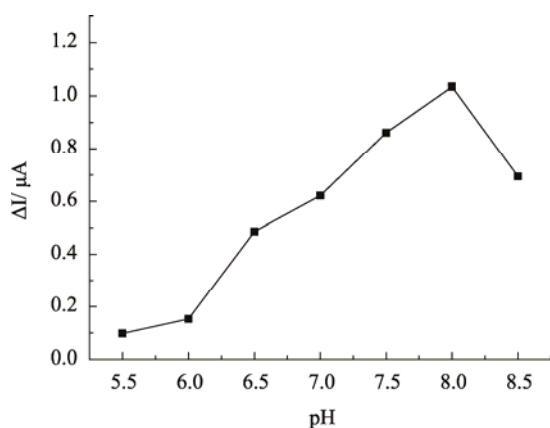


图 5 pH 对酶电极响应的影响

Fig. 5 Effect of pH on the enzyme electrode response

注: 测试体系为含 ACTH 浓度为 0.21 mg/mL 的 0.1 mol/L PBS 溶液。

3.2.2 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 °C 左右最强。本实验中, 在 pH=8.0 的磷酸缓冲溶液中, 15~35 °C 范围内考察了酶电极对 0.24 mg/mL 底物标准溶液的响应(图 6)。实验表明, 随着温度升高, 响应电流不断增大, 当达到 30 °C 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。(实际过程中, 考虑到电极表面硫基的稳定性、酶电极的灵敏度和实际使用中的便捷性, 且在 25 °C 时酶电极的响应电流较大, 因此测定时底液温度选择为 25 °C)

3.2.3 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, 如图 7 所示, 1.0 μg/mL 的辛硫磷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 5~15 min 时抑制率随着时间的延长迅速增加, 在 15 min 抑制率达高峰, 而在 15 min 之后抑制率稳定有轻微下降, 因此在抑制率曲线的制作过程中选择 15 min 作为最佳抑制时间。

3.3 有机磷农药对酶传感器的抑制率曲线及实际样品的测定

3.3.1 有机磷农药的抑制率曲线

将有机磷农药辛硫磷按照一定比例稀释制成梯

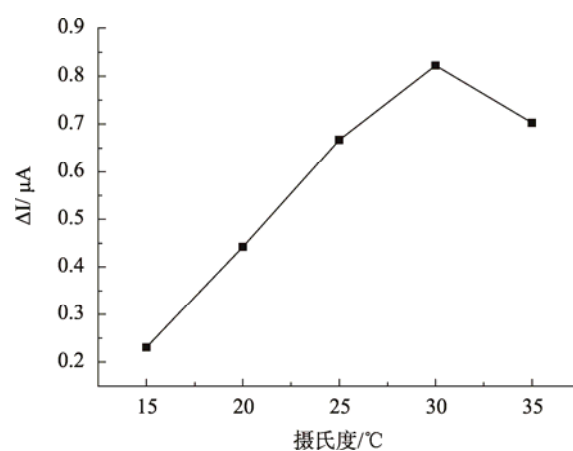


图 6 温度对酶电极响应的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the enzyme electrode response

注: 测试体系为含 ACTH 浓度为 0.21 mg/mL 的 pH8.0 的 0.10 mol/LPBS 溶液。

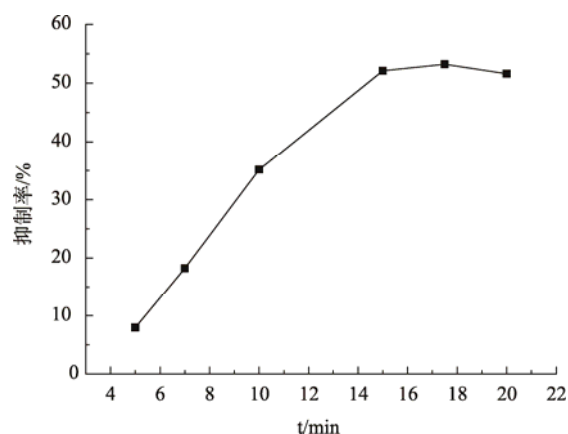


图 7 抑制时间的优化

Fig. 7 Optimization of suppression time

注: 测试体系为含 ACTH 浓度为 0.21 mg/mL 的 pH8.0 的 0.10 mol/LPBS 溶液。

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-时间曲线测定不同浓度辛硫磷农药对酶电极的抑制率。由于有机磷农药对 AChE 有抑制作用, 经过抑制后的酶电极在 0.24 mg/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辛硫磷溶液 0.01~500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系(见图 8), 抑制率与有机磷农药辛硫磷浓度的对数的线性关系方程为: 抑制率(%)=47.6524+17.013logC, 相关系数 $R=0.9886$, 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 0.006 $\mu\text{g/mL}$, 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。

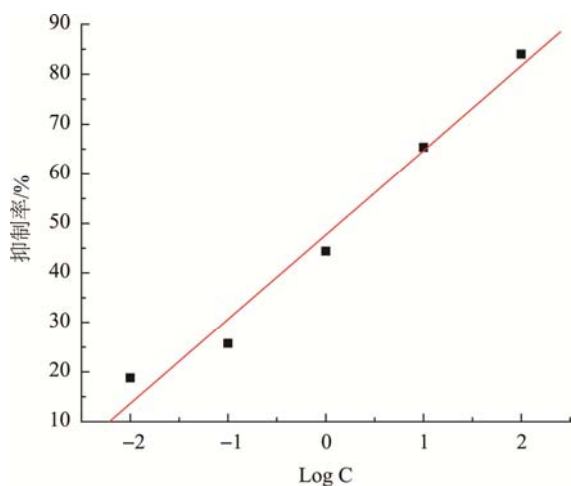


图 8 有机磷农药抑制率曲线

Fig. 8 Curve of inhibition rate of organophosphate

注: 测试底液为含 ACTH 浓度为 0.21 mg/mL 的 5 mL pH8.0 的 0.10 mol/LPBS 溶液。

3.3.2 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 20 min 测定一次, 连续测 6 次, 得出其响应电流, 其相对标准偏差为 8.97%。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, 置于 PBS 溶液的上方, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 10 d 后再次测定其响应电流, 可以达到原响应电流的 86.12%, 说明该酶电极具有较好的稳定性。

3.3.3 酶电极对实际样品的回收率测定

取洗净的样品(不含有机磷农药的青菜样品), 在

其上喷洒一定浓度的辛硫磷, 置于小烧杯中, 并加入适量的丙酮溶液浸泡, 密封避光静置 12 h。以上述提取的溶液为待测的实际样品, 在 0.10 mol/LPBS 缓冲溶液中采用三电极系统对样品进行回收率测定。本实验分别对青菜样品进行四次平行测定, 由表 1 可知, 该方法得到的青菜样品回收率的平均值为 97.50%, 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 青菜四个样品回收率实验结果

Table 1 Results of recovery of green vegetable samples

青菜质量(g)	加入浓度($\mu\text{g/mL}$)	回收浓度($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)	变异系数(%)
3.13	1.0	0.975(均值)	97.50(均值)	4.32

4 结论

本研究将硫堇聚合于一次性丝网印刷电极表面制备了可用于果蔬中有机磷残留检测的电化学酶传感器, 该传感器制作简单, 成本低廉, 使用方便, 具有响应快、灵敏度高, 并具有较好的稳定性, 有望用于果蔬样品中有机磷农药的快速检测。

参考文献

- [1] 王多加, 胡祥娜, 周向阳, 等. 蔬菜农药残留快速检测技术——胆碱酯酶速测卡法[J]. 食品科学, 2003, (6): 109-113. Wang DJ, Hu XN, Zhou XY, *et al.* Technique for rapid detection of pesticide residues in vegetables——The method of rapid test card cholinesterase [J]. Food Sci, 2003, (6): 109-113.
- [2] 王林. 食品安全快速检测技术手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 43-46. Wang L. Technical manual for rapid detection of food safety [M]. Chemical Industry Press of Beijing, 2009: 43-46.
- [3] 杨海朋, 陈东成, 李春辉, 等. 聚环糊精-碳纳米管有机磷农药生物传感器[J]. 化学传感器, 2010, 30(2): 52-56. Yang HP, Chen DC, Li CH, *et al.* Cyclodextrin polymer carbon nanotubes organic phosphorus pesticide biosensor [J]. Chem Sensors, 2010, 30(2): 52-56.
- [4] 周华, 王辉宪, 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. Zhou H, Wang HX, Liu DY, *et al.* Organic phosphorus enzyme biosensors based on carbon nanotube modified pesticide detection [J]. Sensor World, 2008, (8): 23-26.
- [5] 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.
- Sun CY, Li HK, Ping H, *et al.* Detection of organic phosphorus fixation acetylcholinesterase biosensor AuNPs/Sol-gel composite membrane method of pesticide [J]. Chem J Chin Univ, 2011, 32(11): 2533–2538.
- [6] 李治祥. 浅析安徽省蔬菜农药残留检测特点[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(4): 35–37.
- Li ZX. The characteristics of the detection of pesticide residues in vegetables of Anhui Province[J]. Pestic Sci Admin, 2003, 24(4): 35–37.
- [7] 卫红. 气相色谱法测定废水中有机磷农药[J]. 现代科学仪器, 1999, 3(9): 34–35.
- Wei H. Determination of organophosphorus pesticide in waste water by gas chromatography [J]. Mod Sci Instrum, 1999, 3(9): 34–35.
- [8] 樊伟, 汤锋, 岳永德. 高效薄层色谱法分析茶叶中高效氯氟氰菊酯和联苯菊酯农药残留[J]. 分析仪器, 2010, (2): 36–39.
- Fan W, Tang F, Yue YD. Analysis of the effect of fluoride in tea cypermethrin and bifenthrin residue, thin layer chromatography [J]. Anal Instrum, 2010, (2): 36–39.
- [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.
- Kong B, Mu SL. Electrochemical behavior of Thionine polymerization and poly Thionine [J]. J Chem Phy, 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.
- Wu Y, Chen CY, Zhao B. *et al.* Poly thionine/multi wall carbon nanotubes modified salbutamol electrochemical sensor based on construction [J]. Food Sci, 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.
- Li CX, Zeng YL. Research of double enzyme thionine type glucose sensor based on in situ electropolymerization [J]. J Anal Sci, 2006, (3): 243–247.
- [12] 蔡称心, 鞠焜先, 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.
- Cai CX, Ju YX, Chen HY. Properties of polythionine modified microband gold electrode and on catalyticoxidation of NADH [J]. Chem J Chin Univ, 1995, 16(3): 369–371.
- [13] 魏福祥, 韩菊. 乙酰胆碱酯酶电极反应机制[J]. 河北科技大学学报, 2005, 26(2): 106–209.
- Wei FX, Han J. Acetylcholinesterase enzyme electrode reaction mechanism [J]. J Hebei Univ Sci Technol, 2005, 26(2): 106–209.
- [14] 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.
- Ding JY, Han JZ, Feng ZM, *et al.* Study on disposable hydrogen peroxide biosensor based on poly Thionine [J]. Food Sci Technol, 2010, 35(4): 265–268.
- [15] Nidhi C, Chandra S. An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe₃O₄ nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides [J]. Electrochimica Acta, 2012, 67: 79–86.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



陈文飞, 本科, 主要研究方向为食品科学与食品安全检测。
E-mail: 1224457253@qq.com



丁建英, 副教授, 主要从事食品安全检测研究。
E-mail: dingjianying123@tom.com