

# 基于电沉积壳聚糖-碳酸钙-纳米金的有机磷农药生物传感器

张伟龙<sup>1</sup>, 贾飞<sup>1</sup>, 何良兴<sup>2</sup>, 王周平<sup>1\*</sup>, 魏云潇<sup>2</sup>

(1. 江南大学食品学院, 无锡 214122;

2. 杭州市余杭区农产品监测中心, 杭州 311119)

**摘要:** **目的** 制备基于壳聚糖-碳酸钙-纳米金复合膜固定乙酰胆碱酯酶的新型电化学传感器。**方法** 一步电沉积壳聚糖、碳酸钙和纳米金修饰到玻碳电极, 由于电沉积过程有气泡产生, 使沉积到电极上的碳酸钙微粒形成了三维多孔的结构, 利于酶比较分散的固定在电极表面, 提高检测效率; 同时纳米金的引入不仅增大了电极比表面积, 而且促进电子的快速传递, 放大了检测信号。**结果** 将制备的生物传感器用来检测有机磷农药乐果, 检测限为 2.5 pg/mL, 检测时间只需要 7 min。**结论** 该生物传感器检测法实现了对有机磷农药快速、超灵敏的检测。

**关键词:** 乙酰胆碱酯酶; 纳米金; 碳酸钙; 乐果

## Electrodeposited chitosan-calcium carbonate-gold nanoparticles composite film based biosensor for organophosphorous pesticide

ZHANG Wei-Long<sup>1</sup>, JIA Fei<sup>1</sup>, HE Liang-Xing<sup>2</sup>, WANG Zhou-Ping<sup>1\*</sup>, WEI Yun-Xiao<sup>2</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Yuhang District Supervising and Testing Center for Agricultural Product, Hangzhou 311119, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a novel biosensor based on chitosan-calcium carbonate-gold nanoparticles composite film immobilizing acetylcholinesterase. **Methods** The chitosan, calcium carbonate and gold nanoparticles were one-step electrodeposited onto a glassy carbon electrode. Due to the bubble generated in the electrodeposit process, the generated micro-CaCO<sub>3</sub>-based matrix showed a three-dimensional porous structure, providing a favorable and biocompatible micro-environment to dispersedly immobilize enzyme onto it and improve the detection effect. With the introduction of gold nanoparticles, the signal was amplified and the transmission of electrons was accelerated. **Results** The prepared biosensor showed a favorable electrochemical behavior with a detection limit of 2.5 pg/mL and detection time of 7 min for dimethoate. **Conclusion** The established method is ultrasensitive and rapid, and can be used to detect organophosphorous pesticide.

**KEY WORDS:** acetylcholinesterase; gold nanoparticles; calcium carbonate; dimethoate

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAK08B01)、浙江省质量技术监督系统科研计划项目(20100223)、江苏省科技支撑计划项目(BE2011621, BE2010679)、教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-11-0663)

\*通讯作者: 王周平, 博士, 教授, 博导, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wangzp@jiangnan.edu.cn

## 1 引言

有机磷农药由于其药效高、毒性大、易于被降解、广谱性等特点,正被广泛地应用于农业防治以及家庭、仓储杀虫等方面,但大量使用后产生的环境危害也日益严重。有机磷农药残留通过食物链作用在人体累计而引起的致畸、致癌、致突变等危害,如农药的急慢性中毒,特别是果蔬食品污染后引发的群体中毒事件屡有发生<sup>[1]</sup>。一些传统检测方法如气相色谱法、液相色谱法和质谱法已被广泛应用于有机磷农药的检测,但这些方法所需设备昂贵,测定时间较长且成本高,需要专业技术人员操作,不适合现场快速检测<sup>[2]</sup>。因此,发展能快速、灵敏、准确和简便地检测有机磷农药的传感器技术尤为重要。

纳米金作为一种功能型材料,具有比表面积大、吸附力强、生物相容性好;此外,纳米金具有良好的导电性和宏观隧道效应,能够促进电子快速传递,从而实现信号放大<sup>[3]</sup>;其独特的活性位点和电子态使纳米金具有非同寻常的催化作用,虽然具体的机理并没有完全被研究透<sup>[4]</sup>。研究表明,纳米金具有可吸附酶、血凝素、蛋白质抗原和抗体等生物分子且有效保持其生物活性等特性,已被广泛用于制备传感器<sup>[5]</sup>。碳酸钙是一种天然矿物质,具有良好的生物相容性,同时能够增强酶的性能,将碳酸钙微球作为母体来固定酶也有良好的利用前景<sup>[6]</sup>。

本研究首先用柠檬酸钠还原法制得纳米金,利用壳聚糖的溶解特性<sup>[7]</sup>,将壳聚糖、碳酸钙微粒和纳米金一步电沉积到电极表面,形成了疏松多孔的复合膜。碳酸钙微粒表面由于沉积过程中气体的逸出产生许多孔洞,这样的结构不仅有利于酶的固定,而且在后续检测过程中使得农药能够尽快与酶作用产生抑制,从而缩短检测的时间。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

乙酰胆碱酯酶(500 U/mg)、氯化乙酰胆碱(99%)、壳聚糖(90%)(Sigma Aldrich 公司);乐果标准品(100  $\mu\text{g/mL}$ )(北京伟业科创有限公司);氯金酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钙、碳酸氢铵、无水硫酸钠、柠檬酸钠、冰乙酸、二氯甲烷等(分析纯,国药集团(上海)化学试剂有限公司);实验用水均为 Milipore 超纯水( $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ );有机菠菜(无锡八佰伴城市超市)。

### 2.2 仪器与设备

电化学工作站(CHI660D, 上海辰华仪器有限公司),以玻碳电极(3mm)为工作电极, Ag/AgCl 电极(3 mol/L KCl)为参比电极,铂丝为对电极组成三电极系统;扫描电子显微镜(S-4800, 日本 Hitachi 公司);透射电子显微镜(JEM-2100HR, 日本 JEOL 公司)。

### 2.3 纳米金的制备

制备前,用王水(体积比为 3 : 1 的浓盐酸和浓硝酸)浸泡相关容器,再用超纯水润洗。参考 Grabar<sup>[8]</sup>的方法并加以改进:向容器中加入 99.16 mL 超纯水,再加入 0.84 mL 2.5% 的氯金酸溶液,用转子搅拌均匀,煮沸 10 min 至溶液为褐黄色;再向沸腾溶液中加入 5 mL 2% 的柠檬酸三钠溶液,此时溶液变为深蓝黑色,继续煮沸 10 min,溶液颜色逐渐变淡;然后停止加热,持续搅拌 12 min;取下容器,在室温下冷却,得到酒红色的纳米金溶液。

### 2.4 壳聚糖溶液和盐溶液的配制

称取 0.05 g 壳聚糖溶于 10 mL 2 mol/L 醋酸溶液中得到 0.5% 的壳聚糖溶液,用氢氧化钠溶液调节到 pH 至 5.0;称取 0.28 g 碳酸氢铵和 0.1 g 氯化钙溶于 50 mL 水,用盐酸调节到 pH 至 5.0;取 5 mL 盐溶液、300  $\mu\text{L}$  壳聚糖和 100  $\mu\text{L}$  纳米金混合,超声 30 min,得到均匀分散液。

### 2.5 电极修饰

将三电极系统置于上述分散液,在 -3.0 V 下沉积 30 min,用超纯水清洗电极以除去残留的溶液,室温晾干;用移液枪吸取 5  $\mu\text{L}$  乙酰胆碱酯酶滴涂到修饰电极表面,置于 25  $^{\circ}\text{C}$  1 h;电极之前分别用粒径为 1.0、0.3、0.05  $\mu\text{m}$  的氧化铝粉末打磨至镜面,并依次用超纯水、无水乙醇、超纯水超声清洗 5 min,用氮气吹干。

### 2.6 样品处理

将菠菜叶片撕下展开,将农药乐果标准品均匀喷洒在叶片上,挥发至干,然后切碎混匀。称取 10.00 g 混匀的试样,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 35 g 无水硫酸钠脱水,剧烈振摇;再加入 0.4 g 活性炭进行脱色;之后加 70 mL 二氯甲烷,在振荡器上振摇 30 min,用滤纸对混合物进行过滤。量取 35 mL 滤液,室温下在通风橱中自然挥发至近干,用二氯甲烷少量

研洗残渣 3 次, 移入 5 mL 带刻度离心管中, 并定容至 2.0 mL 备用。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 材料与电极表征

图 1(a)为制备的纳米金的透射电镜图, 可以看出纳米金的粒径大约在 15 nm 左右, 而且分散性良好; 图 1(b)为电沉积了壳聚糖-碳酸钙-纳米金的电极的扫描电镜图, 可以看出, 沉积的碳酸钙微粒呈六面体状, 表面有很多因沉积过程产生气体而形成的孔洞, 这种形貌有利于酶的固定。此外, 也可以看出纳米金比较分散地沉积在了壳聚糖膜上。

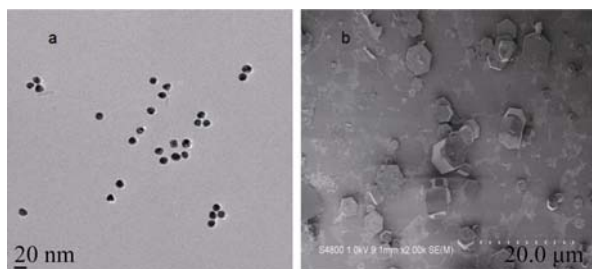


图 1 制备的纳米金透射电镜图(a)和修饰电极的扫描电镜图(b)

Fig. 1 The TEM image of gold nanoparticles and the SEM image of modified electrode

#### 3.2 电化学表征

##### 3.2.1 不同修饰电极的响应信号

图 2 为修饰了不同材料的电极在 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液中的循环伏安曲线, 由图可以看出, 修饰了碳酸钙-壳聚糖的电极信号值要比单纯的修饰壳聚糖的略高, 这是因为电沉积的碳酸钙使得致密结构的壳聚糖膜变得疏松<sup>[9]</sup>; 修饰了纳米金的电极信号值比没有修饰的要高, 表明纳米金的加入, 使得电极表面电子传输的速率加快<sup>[10]</sup>。

##### 3.2.2 修饰电极在不同扫速下的循环伏安图

如图 3 所示, 从上至下, 扫速分别为 20、50、80、100、120、150、180、200、250 mV/s, 随着扫描速率的增大, 峰电流值不断增大; 由插图可以看出, 扫速与峰电流直接呈现线性相关, 表明修饰电极在氯化胆碱溶液的催化反应为一个表面扩散过程, 与文献<sup>[11]</sup>结论一致。

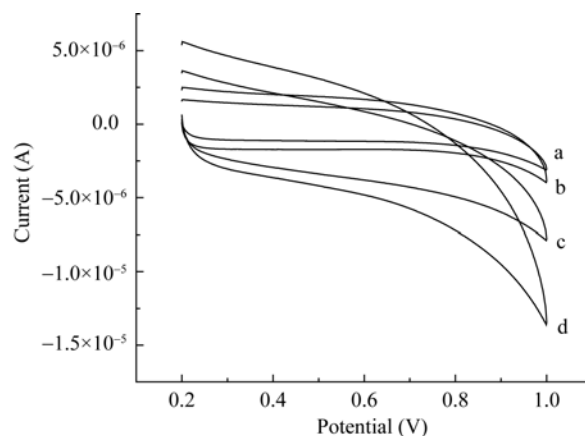


图 2 不同修饰电极在磷酸缓冲液(pH=7.0)中的循环伏安曲线: (a)壳聚糖, (b)壳聚糖-碳酸钙, (c)壳聚糖-纳米金, (d)壳聚糖-碳酸钙-纳米金修饰电极

Fig. 2 Cyclic voltammograms of glassy electrodes modified by chitosan (a), chitosan-calcium carbonate (b), chitosan-gold nanoparticles (c), chitosan-calcium carbonate-gold nanoparticle (d)

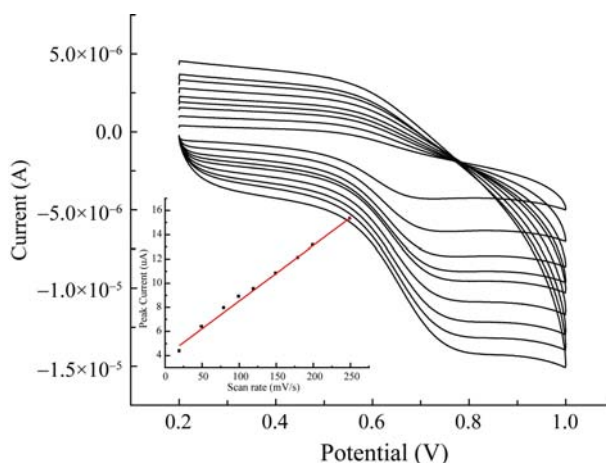


图 3 修饰电极在氯化乙酰胆碱溶液中不同扫速下的循环伏安图; 插图: 扫速与峰电流关系图

Fig. 3 Cyclic voltammograms of various scan rates in acetylcholine solution; inset: the relationship between scan rate and peak current

#### 3.3 条件优化

##### 3.3.1 电沉积时间

图 4 是电极在不同沉积时间下的循环伏安曲线, 可以看出开始随着时间的延长, 信号值越来越大, 这是因为沉积上的碳酸钙-纳米金越来越多, 使得电极表面电极传输速率逐渐增大; 但 30 min 后信号值逐渐降低, 这是因为沉积时间太长, 造成电极表面沉积的膜过厚, 与文献<sup>[12]</sup>发现类似。

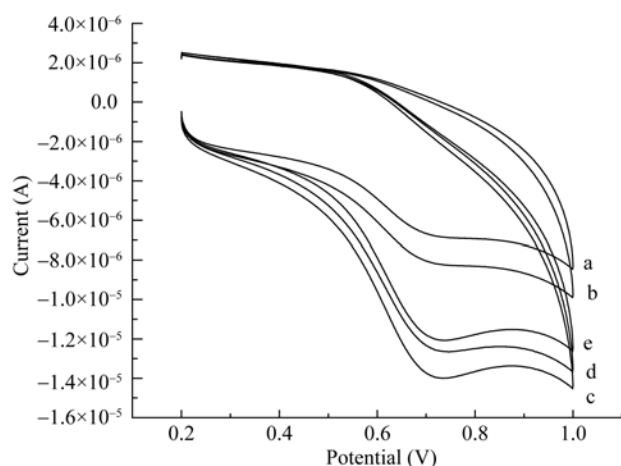


图4 不同电沉积时间修饰电极在氯化乙酰胆碱溶液中的循环伏安曲线: a、b、c、d和e线分别为电沉积时间2、15、30、45和60min

Fig. 4 Cyclic voltammograms of modified electrodes with different electrodeposition time 2 min(a), 15 min(b), 30 min(c), 45 min (d), 60 min(e).

### 3.3.2 响应时间

由于受工作面积与底物扩散速率的影响,固定酶和底物之间需要一定的反应时间。如图5所示,随着反应时间的延长,峰电流值呈增大趋势,当反应时间到达120 s,之后峰电流趋向稳定,表明酶促反应达到最大。

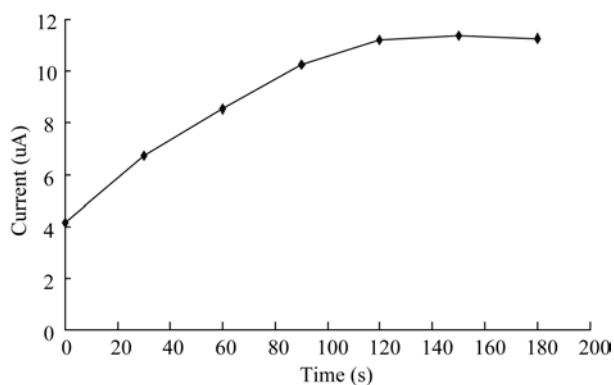


图5 响应时间与峰电流的关系图

Fig. 5 The relationship between the response time and peak current

### 3.3.3 抑制时间

农药对固定酶的抑制需要一定的时间<sup>[13]</sup>,如图6所示:随着浸泡时间的延长,峰电流值逐渐减小,因为越来越多的固定酶被农药抑制,进而催化产生的电活性物质硫代胆碱也越来越少;当抑制时间达到5 min,再延长抑制时间峰电流几乎不变。

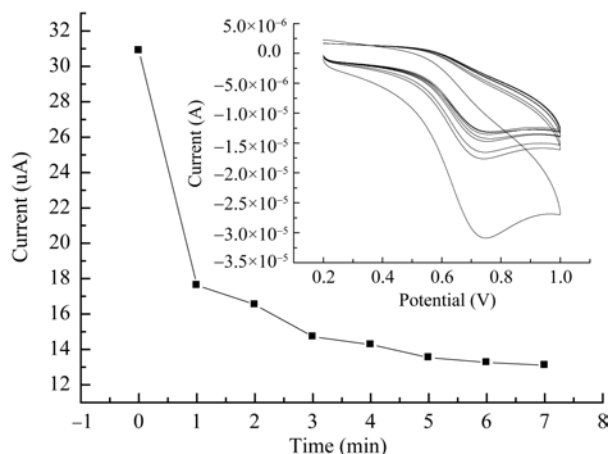


图6 修饰电极在农药里抑制时间同峰电流的关系;插图:不同抑制时间下的循环伏安曲线

Fig. 6 The relationship between inhibition time and peak current; inset: CVs of the modified electrode in acetylcholine solution with various inhibition time

### 3.4 线性范围与检测限

用制备的传感器检测不同浓度乐果标准溶液中,得到图7所示的循环伏安曲线,利用峰电流值与对应的乐果浓度绘制得图7插图所示的线性曲线( $Y = 0.2194X - 0.5457$ ,  $R^2 = 0.993$ ),线性范围为0.01~100 ng/mL,检测限为2.5 pg/mL,相对于其他已报道有机磷农药传感器拥有更低的检测限<sup>[7,14,15]</sup>。

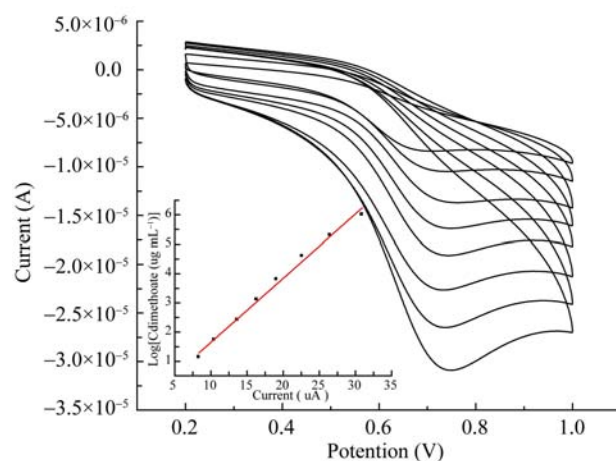


图7 制备的传感器被不同浓度乐果抑制后在氯化乙酰胆碱溶液中的循环伏安图;插图:峰电流值与农药浓度对数值的线性关系

Fig. 7 CVs of the prepared biosensor inhibited by different concentrations of pesticide in acetylcholine solution; inset: Calibration curves of the prepared sensor toward organophosphorus pesticide standards

### 3.5 加标回收实验

根据 2.6 的方法处理菠菜样品, 进行加标回收试验, 结果如表 1 所示。

表 1 所制备生物传感器对菠菜样品钟乐果加标回收测定结果( $n=5$ )

Table 1 The recoveries of dimethoate in spinach samples( $n=5$ )

| 加入浓度(ng/mL) | 测定浓度(ng/mL) | 回收率   |
|-------------|-------------|-------|
| 0.5         | 0.48        | 96%   |
| 10.0        | 9.75        | 97.5% |
| 200         | 206         | 103%  |

### 3.6 传感器评估

根据方法 2.6 制备了 6 根修饰电极, 分别在同一底物中进行电化学测试, 得到结果如图 8 所示, 可见其电化学行为基本一致, 经过计算得到制备的 6 个传感器之间的相对标准偏差为 6.64%, 表明该方法制备的传感器重现性良好。

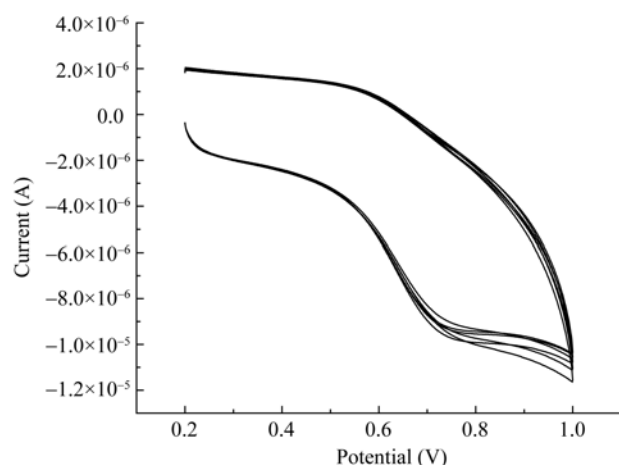


图 8 六根修饰电极在氯化乙酰胆碱溶液中的循环伏安曲线

Fig. 8 CVs of six modified electrodes in acetylcholine solution

## 4 结 论

本研究运用电沉积技术将壳聚糖-碳酸钙-纳米金一步修饰到电极表面, 并用该复合膜固定乙酰胆碱酯酶, 成功制备了检测有机磷农药的生物传感器。由于纳米金的信号放大和碳酸钙微粒对酶良好的固定效果, 使得该传感器相对于其他有机磷农药传感器拥有更低的检测限, 更高的检测效率; 该方法良好的重现性为今后实际应用奠定了良好的基础。

### 参考文献

- [1] 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, 2533–2538.
- [2] Sun XY, Xia KH, Liu B. Design of fluorescent self-assembled multilayers and interfacial sensing for organophosphorus pesticides[J]. Talanta, 2008, 76: 747–751.
- [3] Liu XP, Deng YJ, Jin XY, *et al.* Ultrasensitive electrochemical immunosensor for ochratoxin A using gold colloid-mediated hapten immobilization[J]. Anal Biochem, 2009, 389: 63–68.
- [4] Zheng B, Xie SP, Qian L, *et al.* Gold nanoparticles-coated egg-shell membrane with immobilized glucose oxidase for fabrication of glucose biosensor[J]. Sens Actuators B Chem, 2011, 152: 49–55.
- [5] Chai R, Yuan R, Chai YQ, *et al.* Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotrophin[J]. Talanta, 2008, 74: 1330–1336.
- [6] Shan D, Zhu MJ, Xue HG. Calcium carbonate nanoparticles: A host matrix for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23: 648–654.
- [7] Gong JM, Liu T, Zhang LZ, *et al.* One-step fabrication of three-dimensional porous calcium carbonate-chitosan composite film as the immobilization matrix of acetylcholinesterase and its biosensing on pesticide[J]. Electrochem Commun, 2009, 11: 1873–1876.
- [8] Grabar KC, Smith PC, Musick MD, *et al.* Natan, Kinetic control of interparticle spacing in Au colloid-based surfaces: rational nanometer-scale architecture [J]. J Am Chem Soc, 1996, 118: 1148–1153.
- [9] Zhang LB, Li YH, Wang EK. Solid-state electrochemiluminescence sensor based on the Nafion/poly(sodium 4-styrene sulfonate) composite film[J]. Talanta, 2009, 79: 454–459.
- [10] Shan CS, Yang HF, Niu L, *et al.* Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25: 1070–1074.
- [11] Sun CY, Lu W, Gao YF, *et al.* Electrochemiluminescence from  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  immobilized in poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/poly(styrenesulfonate)-poly(vinyl alcohol) composite films [J]. Anal Chim Acta, 2009, 632: 163–167.

- [12] Daiko Y, Katagiri K, Matsuda A. Thickness dependences of proton conductivity for ultrathin Nafion multilayers prepared via layer-by-layer assembly[J]. Solid State Ionics, 2010, 181: 197–200.
- [13] Zheng ZZ, Liu SQ, Tang ZY, *et al.* Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26: 3081–3085.
- [14] Du D, Ding JW, Zhang AD, *et al.* Determination of carbaryl pesticide using amperometric acetylcholinesterase sensor formed by electrochemically deposited chitosan[J]. Colloid Surface B, 2007, 58: 145–150.
- [15] Du D, Ding JW, Zhang AD. One-step electrochemically depos-

ited interface of chitosan-gold nanoparticles for acetylcholinesterase biosensor design[J]. J Electroanal Chem, 2007, 605: 53–60.

(责任编辑: 张宏梁)

### 作者简介



张伟龙, 男, 硕士在读, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: zwl\_049@yahoo.com.cn



王周平, 博士, 教授, 博导, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: wangzp@jiangnan.edu

---

## “食品添加剂”专题约稿

《食品安全质量检测学报》感谢各位专家的大力支持! 本刊自 2010 年 1 月创刊以来, 得到本领域专家及管理部門的充分肯定, 在国内食品安全与质量研究领域的影响越来越大。

近年来, 食品安全得到了国家越来越多的重视, 但我国的食品安全问题仍较严重。2011 年出现的“染色”馒头、“瘦肉精”、“特仑苏”牛奶 OMP 物质等多个食品安全事件, 引起了公众对食品安全问题的恐慌。鉴于此, 学报特别策划了“食品添加剂”专题, 围绕不良食品添加剂的检测、食品添加剂的滥用、误用等问题展开讨论, 计划在 2013 年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

### 投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [tougao@chinafoodj.com](mailto:tougao@chinafoodj.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部