

基于多孔碳球修饰硼掺杂金刚石电极的 甲基对硫磷检测

赵凤娟^{1*}, 罗耀¹, 聂冬锐², 沈金灿¹, 熊贝贝¹, 韩瑞阳¹, 岳振峰¹

(1. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 深圳 518045;
2. 辽宁出入境检验检疫局技术中心 大连 116001)

摘要: **目的** 研究甲基对硫磷检测的快速检测方法。**方法** 用多孔碳球材料修饰硼掺杂金刚石(BDD)电极, 将乙酰胆碱酯酶(AChE)固定在修饰电极表面制得酶传感器, 用于甲基对硫磷的检测。对所制备的酶传感器进行电化学表征, 对实验参数进行优化。**结果** 底物氯化乙酰胆碱的产物在 AChE/BDD 电极和 AChE/多孔碳球/BDD 电极上的氧化峰电流分别为 0.4930 μA 和 1.102 μA , 峰电流提高了 123.53%。在 AChE/多孔碳球/BDD 电极上, 建立抑制率与甲基对硫磷浓度的负对数的对应关系, 在浓度范围 10^{-10} ~ 10^{-7} g/L 内呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y=-13.20297X+148.375$, 相关系数 R^2 为 0.9985。按抑制率为 10%计算检出限为 3.02×10^{-12} g/L。对实际样品黄瓜汁进行检测, 样品回收率为 92.60%~102.00%。**结论** 此方法简单、快速、灵敏度高, 适合用于实际样品中的甲基对硫磷残留分析。

关键词: 多孔碳球; BDD 电极; 乙酰胆碱酯酶; 氯化乙酰胆碱; 甲基对硫磷

Determination of methyl parathion based on porous carbon spheres-modified boron-doped diamond electrode

ZHAO Feng-Juan^{1*}, LUO Yao¹, NIE Dong-Rui², SHEN Jin-Can¹, XIONG Bei-Bei¹,
HAN Rui-Yang¹, YUE Zhen-Feng¹

(1. Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China;
2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To study the rapid determination method of methyl parathion. **Methods** Porous carbon spheres were prepared and used to modify boron-doped diamond (BDD) electrode. The acetylcholinesterase (AChE) was fixed to the modified electrode surface, and then was used to detect methyl parathion. The obtained enzyme sensor was characterized electrochemically, and the experimental parameters were optimized. **Results** The oxidation peak current of ATCl product was 0.4930 μA and 1.102 μA on the AChE/BDD electrode and AChE/porous carbon spheres/BDD electrode, and the peak current was enhanced by 123.53%. The sensor had a good linear relationship with the concentration of methyl parathion in the range of 10^{-10} ~ 10^{-7} g/L, with a linear

基金项目: 国家质检总局科技项目(2012IK187)、深圳市基础研究项目(JC201105190972A)、深圳市科技研发资金项目(JSGG20130624152620659)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2012IK187), Shenzhen Basical Research Project (JC201105190972A), and Shenzhen Science and Technology Research and Development Project (JSGG20130624152620659)

*通讯作者: 赵凤娟, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhaojf-1982@163.com

*Corresponding author: ZHAO Feng-Juan, Senior Engineer, Food Inspection Center of CIQ-Shenzhen, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: zhaojf-1982@163.com

equation of $Y = -13.20297X + 148.375$ ($R^2 = 0.9985$) and a detection limit of 3.02×10^{-12} g/L. The sensor could be used for detecting cucumber juice samples, with recovery rate of 92.60%~102.00%. **Conclusion** This method is simple, fast, and highly sensitive, and it is suitable for the detection of methyl parathion.

KEY WORDS: porous carbon spheres; boron-doped diamond electrode; acetylcholinesterase; acetylcholine chloride; methyl parathion

1 引言

甲基对硫磷是一种产量大、应用广泛的高毒有机磷类杀虫剂,用于防治水稻、棉花、玉米等农作物上的多种害虫,保证了农产品的丰收。然而,过量使用会造成环境污染越来越严重。水体、大气、土壤中的甲基对硫磷残留通过人们的日常饮食而影响人体健康^[1,2]。甲基对硫磷会对人体造成伤害,比如对神经元中的乙酰胆碱酯酶浓度有影响,会产生抑制作用,引起神经系统内的神经元末梢的急性中毒,进一步造成体内血脑屏障系统功能的信息紊乱^[3,4]。

目前为止,常见的检测甲基对硫磷残留的方法有气相色谱法、液相色谱法、薄层色谱法等,尽管这些方法具有良好的准确性和灵敏度,但是由于检测成本高,仪器操作复杂专业,前处理要求高,时间周期长等缺点,一般仅限于实验室的检测分析,不适用于我国小规模、分散的农产品及销售体系中的现场快速检测^[5-7]。基于乙酰胆碱酯酶传感器的电化学方法因其具有快速、灵敏度高、检测仪器简单、受环境干扰少、时间短,成本低、易于现场检测等优点,成为解决农药残留快速检测问题的一种新方法^[8,9]。由于具有高的导电性、良好的生物相容性及较大的比表面积等优点,很多碳材料如碳球^[10]、碳纳米管^[11]、石墨烯及复合材料^[12,13]等都被成功地应用于固定乙酰胆碱酯酶检测甲基对硫磷农药,获得了高灵敏度和低检出限。多孔碳球^[14]具有高比表面积、良好的生物相容性、加快电子转移等优势,但据我们所知,目前没有关于多孔碳球固定乙酰胆碱酯酶的报道。

本实验采用硼掺杂金刚石(BDD)电极为工作电极,以多孔碳球作为修饰材料,将乙酰胆碱酯酶固定到修饰电极上制得酶传感器,以用于甲基对硫磷的检测。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

氯化乙酰胆碱(ATCl)和乙酰胆碱酯酶(AChE,

C3389型, 500 U/mL) 购买于 Sigma 公司。甲基对硫磷(分析纯)购买于中国药品生物制品检定所。铁氰化钾、氢氧化钠、无水磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钾等来自于天津市科密欧化学试剂有限公司。所有化学试剂均是分析纯。

2.2 实验仪器

电化学实验在电化学工作站 CHI-660D (上海辰华仪器有限公司)上进行。工作电极为硼掺杂金刚石(BDD)电极,对电极为铂丝电极,参比电极为 Ag/AgCl 电极(饱和 KCl)电极。

2.3 方法

2.3.1 AChE/多孔碳球/BDD 传感器的制备

多孔碳球根据文献^[13]制备。BDD 电极分别用无水乙醇、丙酮、蒸馏水超声清洗三次。先后分别取适量制备好的多孔碳球悬浊液与一定量的 AChE 酶溶液滴至电极表面,干燥,即制得 AChE/多孔碳球/BDD 传感器。

2.3.2 检测原理

AChE 酶能催化底物 ATCl 水解产生乙酸和胆碱,胆碱具有电化学特性,在电极表面发生氧化反应,产生氧化电流;当加入有机磷农药时,由于有机磷农药和 AChE 底物结构类似,能够与酶的活性中心有效结合,导致酶的活性降低,通过测定电流的降低可以计算 AChE 酶的抑制率,酶的抑制率和农药浓度有关,从而可间接对有机磷进行测定, AChE 的百分抑制率可以按下面公式进行计算:

$$A = [(I_0 - I) / I_0] \times 100\%$$

式中: A 代表 AChE 的百分抑制率, I_0 是指酶未被有机磷农药抑制时水解产物胆碱发生氧化反应产生的响应电流, I 是指酶被有机磷农药抑制后酶电极产生的响应电流。

2.3.3 标准曲线的绘制

用 AChE/多孔碳球/BDD 电极固定好后,量取 5.0 mL、pH 7.5 的 PBS(0.1 mol/L)缓冲液于电解池中,取 50 μ L、0.1 mol/L ATCl 溶液加入电解池,用差分脉

冲伏安法进行扫描, 记录并保存不加农药的实验数据, 然后向电解池中加入不同体积的甲基对硫磷标准溶液, 将其浓度稀释为 1.00×10^{-11} 、 5.00×10^{-11} 、 1.00×10^{-10} 、 5.00×10^{-10} 、 1.00×10^{-9} 、 5.00×10^{-9} 、 1.00×10^{-8} 、 5.00×10^{-8} 、 1.00×10^{-7} 、 5.00×10^{-7} g/L。用差分脉冲伏安法扫描, 记录并保存数据, 计算甲基对硫磷的抑制率, 做抑制率与浓度负对数曲线图, 找出有线性关系的浓度范围, 然后在此范围内做标准曲线。按照抑制率为 10%^[15-17], 计算检出限。

2.3.4 实际样品的检测

选取新鲜黄瓜榨汁, 将黄瓜汁用无水乙醇定容至 25 mL 配成样品溶液。采用标准加入法测定样中甲基对硫磷含量及回收率, 根据前面建立的标准曲线方程可以计算相应的甲基对硫磷含量。

3 结果与分析

3.1 裸 BDD 电极与多孔碳球修饰 BDD 电极的电化学行为

图 1 显示的是 $10.00 \text{ mmol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 在不同电极上的循环伏安结果。可以看出, 裸电极 BDD 的氧化峰电流为 $45.15 \mu\text{A}$, 多孔碳球修饰的 BDD 电极的氧化峰电流为 $82.6 \mu\text{A}$, 峰电流提高了 82.95%, 说明多孔碳球修饰电极具有好的电催化活性, 可以增大反应表面积, 加快反应速率。

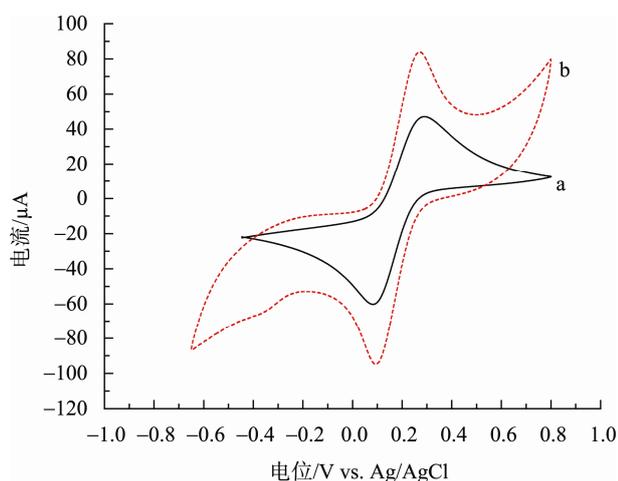


图 1 裸 BDD (a)、多孔碳球/BDD (b) 电极在 $10 \text{ mmol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (含 0.1 mol/L KCl) 溶液中的循环伏安曲线; 扫描速度: 50 mVs^{-1}

Fig. 1 Cyclic voltammograms of BDD (a) and porous carbon spheres/BDD (b) in $10 \text{ mmol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ containing 0.1 mol/L KCl ; scanning rate: 50 mVs^{-1}

图 2 显示的是底物 ATCI 在 AChE/BDD 和 AChE/多孔碳球/BDD 上的电化学行为。可以看出, 不同电极上都有明显的电流信号, 这是由于底物 ATCI 的水解产物胆碱发生的氧化反应。裸电极的峰电流值为 $0.4930 \mu\text{A}$, 用多孔碳球修饰过后的电极, 峰电流值达到了 $1.102 \mu\text{A}$, 峰电流提高了 123.53%, 这可能是由于多孔碳球的高比表面积和生物相容性可以固定更多的酶并保持活性, 良好的导电性可以提高电极的灵敏度。

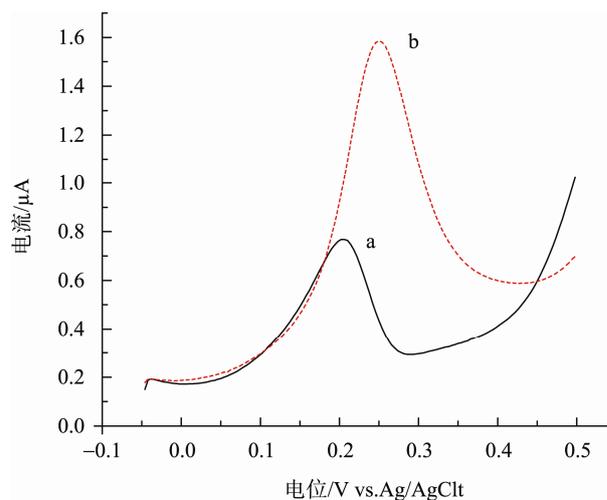


图 2 (a) AChE/BDD、(b) AChE/多孔碳球/BDD 在 $5 \text{ mL pH} 7.5$ 的 PBS (0.1 mol/L) 缓冲溶液 (含 $50 \mu\text{L}$ 、 0.1 mol/L ATCI 溶液) 中的差分脉冲曲线

Fig. 2 DPV responses of (a) AChE/BDD and (b) AChE/porous carbon spheres/BDD in pH 7.5 PBS containing $50 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L ATCI

3.2 最佳抑制时间的选择

采用生物传感器对有机磷农药进行分析, 抑制时间是影响检测过程的一个重要因素。图 3 反应了抑制时间对该传感器响应信号的影响。可以看出, AChE/多孔碳球/BDD 浸在 $5.00 \times 10^{-8} \text{ g/L}$ 甲基对硫磷标准溶液中时, 抑制率会随时间的增加而增加。时间超过 10 min 后, 甲基对硫磷对 AChE 的抑制率趋于平缓, 所以最佳抑制时间选为 10 min。

3.3 标准曲线的绘制

选取最优实验参数, 按照 2.3.3 所述实验步骤, 得到不同浓度甲基对硫磷抑制后的差分脉冲结果, 如图 4 所示。可以看出, 随着甲基对硫磷的浓度依次增大, 底物 ATCI 的水解产物胆碱产生的电信号逐渐降低, 这是由于甲基对硫磷与酶的结合导致胆碱的

生成量降低。计算不同浓度甲基对硫磷溶液的抑制率, 根据甲基对硫磷的浓度负对数与抑制率对应关系作图, 如图 5 和图 6。可以得出, 在浓度范围 $1.00 \times 10^{-10} \sim 1.00 \times 10^{-7} \text{ g/L}$ 内, 抑制率与甲基对硫磷的浓度负对数有良好的线性关系, 线性方程为: $Y = -13.20297X + 148.375$, 相关系数为 $R^2 = 0.9985$ 。按照抑制率为 10% 计算检出限为 $3.02 \times 10^{-12} \text{ g/L}$, 低于相关文献报道结果^[18,19]。

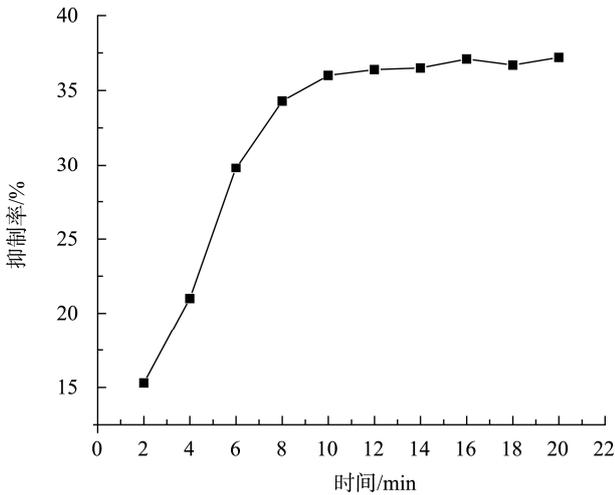


图 3 $5.00 \times 10^{-8} \text{ g/L}$ 甲基对硫磷作用时间与抑制率的关系图
Fig. 3 Relationship between inhibition rate and inhibition time with $5.00 \times 10^{-8} \text{ g/L}$ methyl parathion

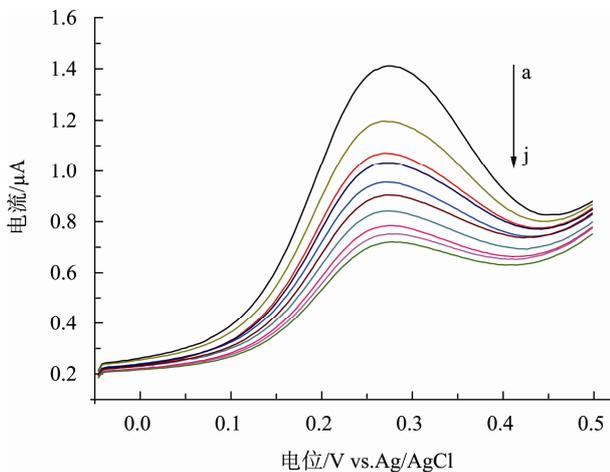


图 4 不同浓度甲基对硫磷抑制后的差分脉冲图
从 a 到 j 浓度依次为 1.00×10^{-11} 、 5.00×10^{-11} 、 1.00×10^{-10} 、 5.00×10^{-10} 、 1.00×10^{-9} 、 5.00×10^{-9} 、 1.00×10^{-8} 、 5.00×10^{-8} 、 1.00×10^{-7} 、 $5.00 \times 10^{-7} \text{ g/L}$

Fig. 4 DPV responses of ATCl after incubation with different concentrations of methyl parathion
From (a) to (j): 1.00×10^{-11} , 5.00×10^{-11} , 1.00×10^{-10} , 5.00×10^{-10} , 1.00×10^{-9} , 5.00×10^{-9} , 1.00×10^{-8} , 5.00×10^{-8} , 1.00×10^{-7} , $5.00 \times 10^{-7} \text{ g/L}$, respectively

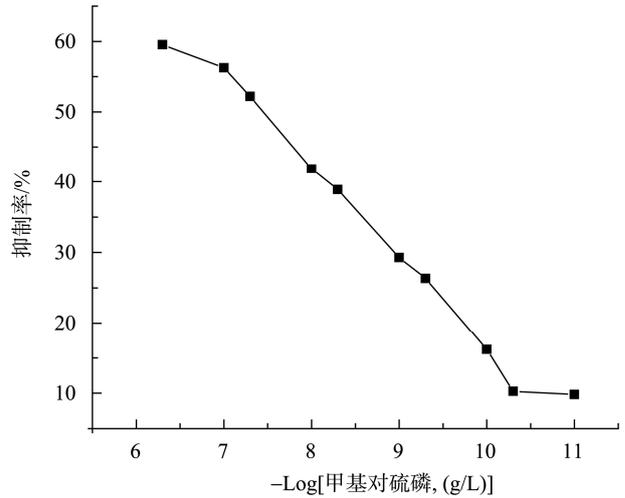


图 5 不同浓度甲基对硫磷溶液与抑制率的关系图
Fig. 5 Relationships between inhibition rate and methyl parathion concentrations

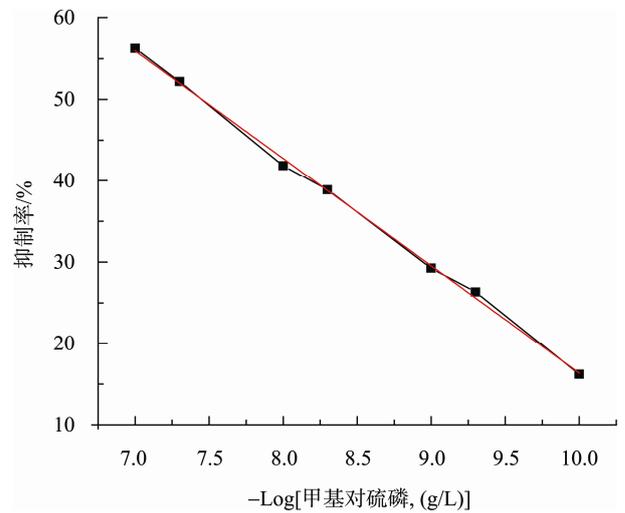


图 6 甲基对硫磷溶液浓度与抑制率的线性关系图
Fig. 6 Linear relationships between inhibition rate and methyl parathion concentrations

3.4 实际样品的检测

采用标准加入法测定黄瓜汁中甲基对硫磷含量及回收率, 根据前面建立的标准曲线方程可以计算相应的甲基对硫磷含量。由表 1 可以看出, 所测加标回收率 92.60%~102.0%, 符合实验要求, 适合用于实际样品中的甲基对硫磷残留分析。

4 结论

本实验制备 AChE/多孔碳球/BDD 传感器, 用于甲基对硫磷的检测。结果表明, 与裸电极相比, 多孔

表 1 黄瓜汁样品中甲基对硫磷的检测
Table 1 Recovery ratios of methyl parathion in cucumber juice samples.

样品名称	标准加入量(g/L)	测定总量(g/L)	回收率(%)	RSD%(n=3)
黄瓜汁	1.00×10^{-8}	9.60×10^{-9}	96.00	7.51
	1.00×10^{-9}	1.02×10^{-9}	102.00	9.23
	5.00×10^{-9}	4.63×10^{-9}	92.60	4.65
	5.00×10^{-10}	4.97×10^{-10}	99.40	6.42

碳球修饰电极可以增大反应表面积, 提高电极导电性, 提高检测灵敏度。对黄瓜汁样品进行检测, 所测加标回收率 92.60%~102.0%, 符合实验要求, 适用于实际样品中的甲基对硫磷残留分析。

参考文献

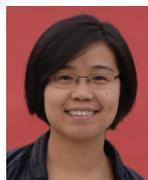
- [1] 黄斌, 汪春红. 甲基对硫磷慢性毒性研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(6): 1.
Huang B, Wang CH. Study progress on chronic-toxic effects of methyl parathion [J]. J Environ Health, 2008, 25(6): 1.
- [2] Garcia SJ, Abu-Qare AW, Borton AJ, et al. Methyl parathion: a review of health effects [J]. Toxicol Environ, 2003, 6: 185–210.
- [3] 赖志伟, 宋瑞坤, 徐彩菊, 等. 三种有机磷农药和经 S9 代谢后对淋巴细胞转化的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 3(2): 197.
Lai ZW, Song RK, Xu CJ, et al. Effect of three organophosphorous insecticides unmetabolized and metabolized by S9 on lymphocyte proliferation [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 1990, 3(2): 197.
- [4] 徐德祥, 孙美芳, 魏凌珍, 等. 甲基对硫磷的免疫毒作用研究 [J]. 中国公共卫生学报, 1998, 17(4): 229–230.
Xu DX, Sun MF, Wei LZ, et al. Studies on immunotoxicity of methylparathion [J]. Chin J Public Health, 1998, 17(4): 229–230.
- [5] 刘淑娟, 谭正初, 钟兴刚, 等. 基于二氧化锆纳米粒子固定乙酰胆碱酯酶的甲基对硫磷传感器 [J]. 传感技术学报, 2009, 22(5): 614–617.
Liu SJ, Tan ZC, Zhong XG, et al. Studies on a novel parathion-methyl biosensor design based on acetylcholinesterase immobilized by zirconia nanoparticle [J]. Chin J Sensor Actuat, 2009, 22(5): 614–617.
- [6] 李焱辛, 董全. 有机磷农药残留检测技术的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2010, 4: 13–15.
Li YX, Dong Q. Detection technical progress of organophosphorus pesticide residue [J]. China Food Nutr, 2010, 4: 13–15.
- [7] 张艳林. 有机磷农药残留检测方法研究进展 [J]. 科技信息, 2009, 24(23): 53.
Zhang YL. Advances in research into organophosphates pesticide residues detection [J]. Sci Technol Inform, 2009, 24(23): 53.
- [8] 倪永年, 邱萍. 电化学分析在有机农药残留量分析中的应用 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(2): 103–106.
Ni YN, Qiu P. Application of electrochemical methods in organic pesticide residues analysis [J]. J Instrum Anal, 2003, 22(2): 103–106.
- [9] 魏福祥, 韩菊, 刘庆洲, 等. 胆碱酯酶生物传感器测定有机磷农药敌敌畏 [J]. 河北科技大学学报, 2003, 24(4): 92–94.
Wei FX, Han J, Liu QZ, et al. Determination of dichlorvos by a acetylcholinesterase biosensor [J]. J Hebei Univ Sci Technol, 2003, 24(4): 92–94.
- [10] Wei M, Zeng GY, Lu QY. Determination of organophosphate pesticides using an acetylcholinesterase-based biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticles and carbon spheres [J]. Microchim Acta 2014, 181: 121–127
- [11] Du D, Chen W J, Zhang W Y, et al. Covalent coupling of organophosphorus hydrolase loaded quantum dots to carbon nanotube/Au nanocomposite for enhanced detection of methyl parathion [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25: 1370–1375.
- [12] Wu S, Lan XQ, Cui LJ, et al. Application of graphene for pre-concentration and highly sensitive stripping voltammetric analysis of Organophosphate pesticide [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 699: 170–176.
- [13] Gong JM, Miao XJ, Zhou T, et al. An enzymeless organophosphate pesticide sensor using Au nanoparticle- decorated graphene hybrid nanosheet as solid-phase extraction [J]. Talanta, 2011, 85: 1344–1349.
- [14] Kim Y, Cho CY, Kang JH, et al. Synthesis of Porous Carbon Balls from Spherical Colloidal Crystal Templates [J]. Langmuir, 2012, 28: 10543–10550.
- [15] Du D, Chen SZ, Cai J, et al. Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide [J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23: 130–134
- [16] Zheng ZZ, Zhou Y, Li X, et al. Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots [J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26: 3081–3085.

- [17] Nidhi C, Pundir CS. Amperometric determination of acetylcholine—A neurotransmitter, by chitosan/gold-coated ferric oxide nanoparticles modified gold electrode [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61: 1–8.
- [18] Yin HS, Ai SY, Xu J, *et al.* Amperometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase on gold nanoparticles and silk fibroin modified platinum electrode for detection of methyl paraoxon, carbofuran and phoxim [J]. J Electroanal Chem, 2009, 637: 21–27.
- [19] Lee HS, Kim YA, ChoYA, *et al.* Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based

biosensor [J]. Chemosphere, 2002, 46: 571–576.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



赵凤娟, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: zhaofj-1982@163.com

“肉制品加工与贮藏”专题征稿

随着生活质量的提高和人们饮食需求的多样化发展, 作为主要蛋白质来源的肉制品的需求量将会越来越大, 到 2015 年, 我国肉类产量将达到 8500 万吨, 同时国内外对肉制品加工技术研究的也在不断深入, 区别于传统肉制品的新型肉制品的研发使得肉制品具有更好的风味、更高的营养价值。但是在肉制品的加工及贮藏过程中也存在着诸如有害物质的产生、致病菌的存在等食品安全问题。

鉴于此, 本刊特别策划了“肉制品加工与贮藏”专题, 由东北农业大学的孔保华教授担任专题主编。孔保华教授现任东北农业大学食品学院副院长, 同时兼任中国畜产品加工常务理事, 肉品加工分会副主任, 中国农学会农产品加工分会常务理事, 黑龙江省食品科学学会常务理事, 中国农业机械学会农副产品加工分会副理事长, 黑龙江省天然产物工程学会副理事长, 黑龙江省发酵工程学会理事, 全国屠宰加工标准化技术委员会委员, 国家农产品加工技术研发体系畜产品加工专业委员会常务理事, 主要从事肉品科学、水产品科学和技术的研究。本专题主要围绕肉制品加工关键技术、肉制品加工副产物综合利用、新型肉制品研究开发(低盐、低脂、功能性肉制品等)、加工过程中有害物质的产生规律、调控机理和检测技术、肉制品中致病微生物的检测及防控措施、加工高新技术的应用、肉制品的质量安全研究和风险评估等方面或您认为领域内的有意义的内容进行论述, 计划在 2015 年 1 月出版

本刊编辑部及孔保华教授特邀请各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑