

化学发光生物传感器法测定食品中有机磷与氨基甲酸酯类农药残留

王晓朋¹, 曾梅¹, 万德慧¹, 唐晗¹, 赵彬媛², 周雅倩², 刘晓宇^{1,2*}

(1. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070; 2. 环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: **目的** 构建一种用于检测食品中有机磷与氨基甲酸酯类农药残留的高灵敏度生物传感器, 建立一种用于测定食品中两类农药残留的新方法。 **方法** 以固定化乙酰胆碱酯酶(AChE)为识别元件与底物碘化硫代乙酰胆碱(ATCI)特异性反应, 采用微流控芯片与化学发光仪作为检测元件, 以鲁米诺与铁氰化钾作为化学发光体系, 通过流动注射分析法来检测农药残留。 **结果** 当有机磷类农药辛硫磷、敌敌畏、乐果浓度范围分别在0.1~10、0.08~10、0.8~15 $\mu\text{g/mL}$ 时, 相关系数分别为0.9923、0.9903、0.9904, 检出限分别为0.047、0.054、0.388 $\mu\text{g/mL}$; 当氨基甲酸酯类农药克百威、西维因、灭多威浓度分别在0.08~15、0.1~10、0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 相关系数分别为0.9926、0.9972、0.9944, 检出限分别为0.049、0.051、0.080 $\mu\text{g/mL}$ 。传感器性能评价实验结果显示, 在最佳条件下对辛硫磷、敌敌畏、乐果、克百威、西维因、灭多威分别测定6次, 结果RSD值均小于7%, 精密度较好; 以碘化硫代乙酰胆碱(ATCI)为底物, 连续通入鲁米诺与铁氰化钾化学发光体系6次, 所得RSD值小于8%, 稳定性较好; 将实验制备的固定化AChE储存于pH值为8.0的磷酸盐缓冲溶液中, 每隔10 d测一次化学发光峰值, 结果显示两个月内相对活力下降为23%, 保存时间较长; 将传感器用于测定包菜、苹果样品中的农残, 添加回收率在90%~99%之间, 显示精密度较好, 可用于测定食品中的农药残留量。 **结论** 此生物传感器性能良好, 适用于测定食品中的有机磷与氨基甲酸酯类农残。

关键词: 有机磷; 氨基甲酸酯; 乙酰胆碱酯酶; 微流控芯片; 化学发光; 生物传感器

Determination of organophosphorus and carbamates pesticide residues in foods by chemiluminescence biosensor

WANG Xiao-Peng¹, ZENG Mei¹, WAN De-Hui¹, TANG Han¹, ZHAO Bin-Yuan²,
ZHOU Ya-Qian², LIU Xiao-Yu^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Key laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Objective To create a high-sensitivity biosensor for detecting organophosphorus and carbamates pesticides in foods and establish a new method to determine these two kinds of pesticides. **Methods** Immobilized acetylcholinesterase (AChE) was used as recognition element of the sensor, reacting specifically with the substrate of acetylthiocholine iodide(ATCI), the micro-fluidic chip with CL analyzer was used as

基金项目: 华中农业大学国家级大学生创新创业训练计划项目(20130504035)

Fund: Supported by the National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Huazhong Agricultural University (20130504035)

通讯作者: 刘晓宇, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与农业资源综合利用。E-mail: liuxiaoyu@mail.hzau.edu.cn

***Corresponding author:** LIU Xiao-Yu, Professor, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China. E-mail: liuxiaoyu@mail.hzau.edu.cn

detecting element, and luminol-potassium ferricyanide system was used in chemiluminescence system.

Results When the concentration of proximal, dichlorvos, dimethoate ranging from 0.1~10, 0.08~10, and 0.8~15 $\mu\text{g/mL}$, respectively, the correlation coefficients were 0.9923, 0.9903, and 0.9904, and the detection limits were 0.047, 0.054, and 0.388 $\mu\text{g/mL}$, respectively. When the concentrations of carbofuran, carbonyl, and methomyl were ranging from 0.08~15, 0.1~10, and 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$, respectively, the correlation coefficients were 0.9926, 0.9972, and 0.9944, and the detection limits were 0.049, 0.051, and 0.080 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The evaluation of biosensor performance indicates good precision, when determining all 6 kinds of pesticides under optimal conditions, RSD was below 7%; when the substrate of ATCI was injected into chemiluminescence system 6 times discontinuously, RSD was below 8%, which indicated good stability; immobilized AChE was stored in phosphate buffer(pH=8.0), detecting activity every 10 d, lasting for two months, the relative enzymatic activity decreased only 23%, indicating a good storage stability; the biosensor was used to detect samples of cabbage and apple, fortified recoveries were between 90%~99%. **Conclusion** This biosensor has a good performance, therefore it can be used to determine pesticides in foods.

KEY WORDS: organophosphorus; carbamates; acetylcholinesterase; micro-fluidic chip; chemiluminescence; biosensor

1 引言

农药的应用对于我国农业的发展发挥了巨大的作用,有机磷与氨基甲酸酯类农药是其中的重要组成部分。但是农药滥用的同时也对环境及人体带来了无法避免的危害。有机磷及氨基甲酸酯类农药俗称“神经毒剂”,能与人体兴奋传导物质乙酰胆碱的分解酶乙酰胆碱酯酶特异性结合,使人痉挛,严重则会导致死亡^[1]。因此,国家标准规定了农药使用的限量标准^[2],而为了执行这些标准,就必须有与之对应的检测方法测定农药残留,以判断农药是否超标。

现行的农药残留测定方法有气相色谱质谱联用技术、高效液相色谱法、波谱法等^[3,4],但这些方法如高效液相色谱法,前处理较复杂,专业性较强,设备成本昂贵,无法满足现场检测、快速检测的目的。此外还有免疫分析法、酶抑制率法、速测卡法^[5-7]等快速检测方法,也存在对有机磷农药敏感性差、性质不稳定的缺点。而应用生物传感器^[8]能够弥补上述方法无法满足的现场、快速检测的需求。据文献报道^[9,10],酶生物传感器对有机磷与氨基甲酸酯类农药的检测有较好的重现性与稳定性。本研究将化学发光与固定化乙酰胆碱酯酶^[11,12]生物传感器结合,旨在构建一种快速检测有机磷与氨基甲酸酯类农药的残留的新方法。

生物传感器由识别元件、转换元件及检测元件构成,由识别元件承担特异性识别及反应工作,之后经

换能元件将生化信号转化为可识别的电信号,以达到检测的目的^[13,14]。与传统方法相比,生物传感器有灵敏度高、选择性好、分析速度快的特点^[15]。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

BPCL 微弱化学发光仪(中国科学院生物物理所); HL-2 恒流泵(上海沪西分析仪器厂有限公司); 超声波清洗器 SB-3200DT(宁波新芝生物科技股份有限公司); 组织捣碎机(PHILIPS); 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); AB204-E 电子分析天平(上海天平仪器厂); 722 可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司); HH-4 恒温水浴(国贸电器有限公司); AB204-E 电子分析天平(上海天平仪器厂); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(武汉科尔仪器设备有限公司)。

碘化硫代乙酰胆碱(ATCI, 纯度 99%, Sigma 公司); 电鳗乙酰胆碱酯酶(AChE, Sigma 公司); 壳聚糖(250g, 脱乙酰度 96%, 分子量 30 万, 浙江金壳生物化学有限公司); 铁氰化钾(500g, 纯度 \geq 99.0%, 天津市塘沽区德华化学试剂); 鲁米诺(1g, 纯度 99%, 美国 Sigma 公司); 解磷定(2-PAM, 25 g, 纯度 99%, 美国 Sigma 公司); 敌敌畏标液(100 $\mu\text{g/mL}$, 农业部环境保护科研监测所研制); 辛硫磷标液(100 $\mu\text{g/mL}$, 农业部环境保护科研监测所研制); 乐果标液(100 $\mu\text{g/mL}$, 农业部环境保护科研监测所研制); 西维因标液(100 $\mu\text{g/mL}$, 农业部环境保护科研监测所研制); 克百威

标液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 农业部环境保护科研监测所研制); 灭多威标液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 农业部环境保护科研监测所研制); 实验用蔬菜均购自华中农业大学集贸市场。

2.2 实验方法

2.2.1 芯片设计

微流控芯片是用于制作芯片的材料单晶硅、无定形硅、玻璃、金属和有机聚合物如环氧树脂、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)、和聚二甲基硅氧烷(PDMS)等, 采用微细加工技术在芯片上构建由微通道、微反应室、储液池等功能单元构成的微流路系统^[16,17]。高分子聚合物材料种类多, 加工成型方便, 价格便宜, 尤其是高聚物材料有良好的光学性质、化学惰性、电绝缘性和热性能等, 使其在微流控芯片领域的应用具有得天独厚的优势^[18]。近年来高聚物为材料的芯片应用广泛。

本研究以具有良好的综合力学性能的高分子聚合物聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)为原料, 采用铣床刻蚀法刻蚀微通道。研究采用溶剂键合法键合芯片, 用二氯乙烷和异丙醇(1:1, v:v)键合, 在显微镜下观察键合效果, 键合的微流控芯片平整光滑, 沟道通畅, 无阻塞现象。且向微通道里注入品红溶液, 结果溶液在通道里流动顺畅, 显微镜下观察发现通道边沿无渗漏。微流控芯片如图 1 所示(单位: mm)。

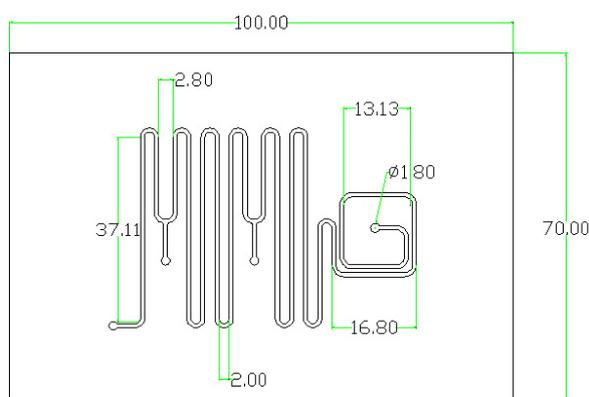
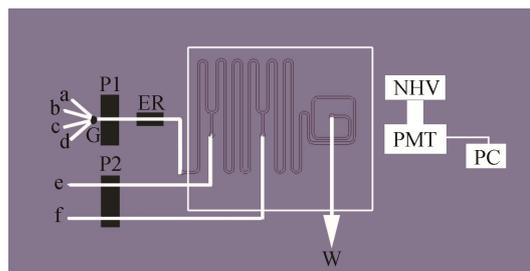


图 1 聚甲基丙烯酸甲酯流通池示意图

Fig. 1 Schematic diagram of polymethyl methacrylate flow cell

2.2.2 化学发光生物传感器流路设计

传感器主要包括固定化酶柱和化学发光仪, 其他辅助装置包括蠕动泵、八通阀、及微机(如图 2)。



a: PBS; b: 碘化硫代胆碱底物溶液; c: 恢复剂 2-PAM; d: 样品; e: 铁氰化钾溶液; f: 鲁米诺溶液; G 为八通阀; ER: 酶柱; P1、P2: 第 1、2 恒流泵; PMT: 光电倍增管; NHV: 负高压; W: 废液; PC: 计算机。

图 2 化学发光生物传感器流路图

Fig. 2 The flow analysis system of chemiluminescence biosensor

2.2.3 化学发光生物传感器使用流程

首先进行生物传感器操作条件优化, 在最优化条件下进行农药浓度检测。传感器的具体操作步骤如下:

1) 基线: 调节化学发光仪的负高压为 400 V, 开启恒流泵 P1、P2, 使 pH 为 8.0 的磷酸盐缓冲溶液 a、3 mmol/L 铁氰化钾溶液 e 和 0.6 mmol/L 鲁米诺溶液 f 分别通过管道, 直到基线稳定, 记录发光强度为 I_0 ;

2) 基础酶活的测定: 旋转八通阀 G, 用 0.05 mmol/L 的底物溶液 b 替代磷酸盐缓冲溶液 a 通入管路, 通入时间为 70 s, 然后将三通阀重新转回原来的位置, 停止注入 ATCh 的底物溶液, 通入磷酸盐缓冲溶液 a, 记录化学发光强度最低值 I_0 , 即初始酶活;

3) 剩余酶活的测定: 待基线回到原发光强度后, 停止恒流泵 P2, 调整八通阀, 停止注入磷酸盐缓冲溶液 a, 通入样品溶液 d, 注入时间为 20 min, 然后调整八通阀 G, 通入磷酸盐缓冲溶液 a, 以去除样品溶液。开启泵 P2, 重复步骤 2)记录的化学发光强度最低值 I_1 , 即为剩余酶活性;

4) 酶活恢复: 停止恒流泵 P2, 调整八通阀 G, 使浓度为 1 mmol/L 恢复剂 2-PAM 溶液 c 过酶反应器, 持续 15 min, 旋转八通阀, 通入磷酸盐缓冲溶液 a 5 min, 以去除 2-PAM 溶液;

5) 复活后的酶活测定: 开启恒流泵 P2, 重复步骤 2)记录化学发光最低值 I_2 , $I_2 - I_1$ 为相对化学发光强度值, 选取发光强度最大, 发光值波动最小为最佳发光条件;

6) 待检测结束后用清水冲洗管道。

2.2.4 农药的测定

固定化酶的抑制效果用农药样品溶液通过酶反应器前后的酶活差值 $I_1 - I_0$ 占基础酶活 $I - I_0$ 的百分比表

示。其抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{I_i - I_0}{I_j - I_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{恢复率}(\%) = \frac{I - I_j}{I - I_0} \times 100 \quad (2)$$

其中 I 为基线化学发光强度; I_0 为未通入农药时的化学发光强度; I_i 为通入农药后的化学发光强度; I_j 为通入恢复剂后的化学发光强度。

2.2.5 乙酰胆碱酯酶的固定及性能优化

根据文献^[19-21], 并加以改正。首先配制 18 mL 浓度为 5% 的壳聚糖溶液(2.5% 的乙酸溶液), 在锥形瓶中加入 50 mL 液体石蜡, 并加入 1.5 mL 分散剂 Span-80, 在一定转速下, 逐滴加入壳聚糖溶液, 继续高速搅拌使溶液液滴分散均匀, 然后逐滴加入 0.8 mL 的戊二醛溶液(体积浓度为 25%), 40 °C 水浴加热交联反应 1h。反应结束后, 使之与 2.5 mol/L NaOH: 无水乙醇(v:v=1:1)溶液混合震荡, 之后静置, 去除油层和水层, 用去离子水多次洗涤到中性, 最后将制得的微球于 4 °C 冰箱存放。

称取 0.500 g 壳聚糖微球加入 2.0 mL 浓度为 0.4% GA 溶液充分震荡 15 min, 然后用蒸馏水反复冲洗以除去多余的戊二醛溶液。称取 0.500 g 经活化后的微球, 加入 1.2 U 的酶液, 4 °C 振荡 20 h, 用 PBS(0.1 mol/L, pH7.5) 冲洗抽滤以除去表面吸附的游离酶, 在 4 °C 的 PBS 中保存备用。在此条件下测得酶活回收率为 75.35%, 连续测定 6 次, RSD 值为 5.76%。

参考 Ellman^[22] 的方法, 并加以改善。移取 3 mL PBS 溶液(0.1 mol/L, pH=8.0)和 0.015 g 固定化酶于 10 mL 比色管中, 混匀。30 °C 水浴 30 min 后, 依次加入 100 μL DTNB (20 mmol/L) 和 20 μL ATCh (100 mmol/L), 混匀, 412 nm 处比色。静置 1 min 后迅速读出吸光度, 取出比色皿慢慢摇动, 混匀反应体系, 每隔 1 min 读数, 连续测定 5 min。酶活力(U/g)用每 g 酶溶液每 1 min 水解底物的 μmol 数表征。

$$U[\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})] = V \times A / (K \times L \times m)$$

式中:

V —反应体系的总体积(mL);

A —吸光度随时间的变化率(1/min);

L —测定酶活力时溶液的光径长度, 即比色皿光程(mm), $L=10$;

K —消光系数[L/(mmol·mm)], $K=1.36$;

m —称取的固定化酶的质量(g)。

2.2.6 酶柱制备

将含有固定化酶的缓冲溶液摇匀, 用胶头滴管(酶活力在 1 U 左右)吸取酶液, 加到 4 cm×4 mm(*i.d.*)的短塑料玻璃管中, 玻璃短管两端拉成 1 mm(*i.d.*)的尖口。两端用粘有筛绢(孔径为 0.05 mm)的带孔橡皮塞封住, 制得固定化酶柱。

2.2.7 样品前处理

擦去样品(包菜、苹果)表面泥土, 取代表性可食部分, 用组织捣碎机捣碎, 取样品 5 g, 置于 50 mL 烧杯中, 加 10 mL 丙酮超声 5 min, 不停振摇, 收集滤液; 然后向烧杯中再加入 10 mL 丙酮, 振摇 3 min, 合并滤液, 移入装有 5 g 无水硫酸钠的玻璃漏斗中, 吹干丙酮, 向离心管中加入 10 mL 的磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L, pH8), 取 10 mL 上清液用微孔过滤器过滤后待用。

3 结果与分析

3.1 化学发光生物传感器条件优化

3.1.1 鲁米诺浓度的影响

鲁米诺作为发光剂, 直接影响着化学发光体系。本研究考察了浓度为 0.2~1.0 mmol/L 的鲁米诺溶液, 化学发光趋势如图 3 所示: 随着鲁米诺浓度的增大, 相对化学发光强度呈增大趋势。但是噪声很大, 信噪比降低, 同时浓度为 0.6 mmol/L 时便可满足测量所需的发光值。综合考虑以上因素, 选取鲁米诺浓度为 0.6 mmol/L。

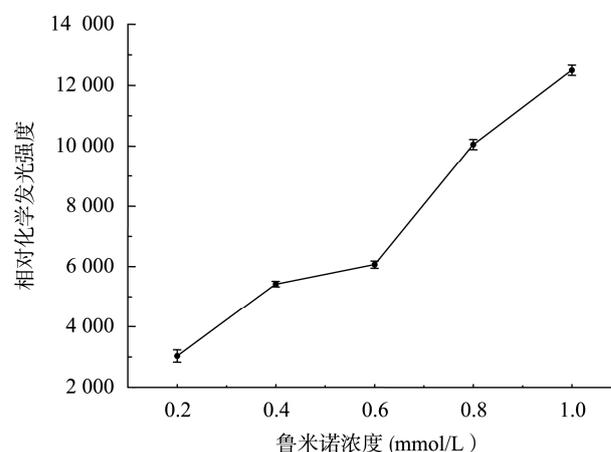


图3 鲁米诺浓度对相对化学发光强度的影响($n=3$)

Fig. 3 The effect of luminol concentrations on relative chemiluminescence intensity($n=3$)

3.1.2 铁氰化钾浓度的影响

铁氰化钾在碱性条件下可氧化鲁米诺产生化学发光, 是影响化学发光体系的重要因素。本研究在 pH 值与鲁米诺浓度一定的条件下, 考察了浓度为

1~6 mmol/L 铁氰化钾溶液, 化学发光趋势如图所示: 在浓度为 3 mmol/L 时达到最大化学发光值, 故选择铁氰化钾的浓度为 3 mmol/L。

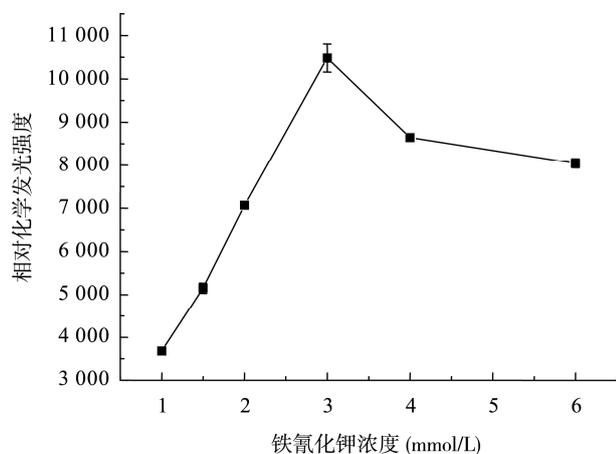


图 4 铁氰化钾浓度对相对化学发光强度的影响($n=3$)

Fig. 4 The effect of potassium ferricyanide concentration on relative chemiluminescence intensity ($n=3$)

3.1.3 流速的影响

在化学发光微流动注射体系中, 试剂混合和反应速度迅速, 因此必须选择合适的流速, 保证试剂能够充分混合并能获得较高的化学发光强度。流速太快样品来不及混合反应, 不能有效地采集反应信号, 并且流路压力过大, 易造成管路泄露; 流速太慢不易形成连续的流体。

本研究考察了 0.20~0.45 mL/min 的流速情况下的发光趋势, 如图 5 所示: 随着流速的增大, 相对化学发光强度不断增大, 基线达到平衡的时间逐渐延长。但是随着流速的增加, 化学发光的值波动较大, 泵压也相应增加。综合考虑达到平衡所需时间, 以及实验所需发光强度, 选择流速为 0.40 mL/min。

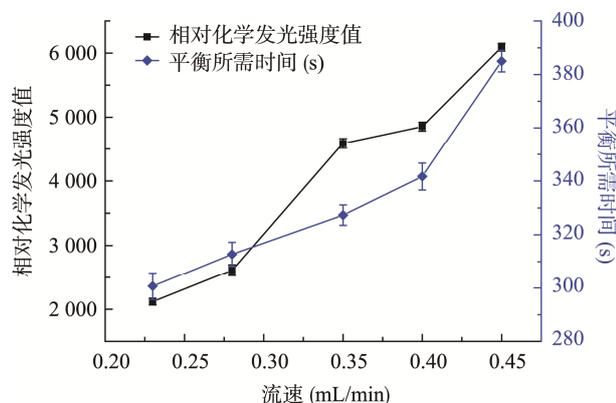


图 5 恒流泵流速对相对化学发光强度的影响($n=3$)

Fig. 5 The effect of constant-flow pump speed on relative chemiluminescence intensity ($n=3$)

3.1.4 底物浓度的影响

底物硫代乙酰胆碱对化学发光强度影响很大。本实验考察了 0~100 mmol/L 浓度条件下底物对化学发光强度的影响。结果如图 6 所示, 底物浓度在 0~20 mmol/L 范围内, 化学发光强度随着底物浓度的增加而急剧上升; 而当底物浓度大于 20 mmol/L 后, 吸光度积分值趋于平缓。所以选择底物最佳浓度为 20 mmol/L。

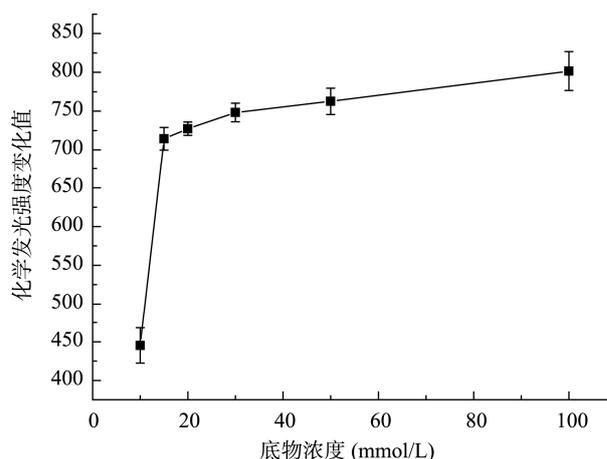


图 6 底物浓度对化学发光强度变化值的影响($n=3$)

Fig. 6 The effect of substrate concentration on chemiluminescence intensity ($n=3$)

3.1.5 底物与酶接触时间的影响

在一定范围内, 底物与酶作用的时间越长, 生物传感器显示化学发光强度变化越明显。但由于有机磷和氨基甲酸酯类农药是底物竞争性抑制剂, 将影响农药对酶抑制程度的准确性。

本实验研究了底物浓度为 20 mmol/L 时与酶作用 20~120 s 时间范围内对化学发光强度的影响。从图 7 所示, 作用时间在 20~100 s 范围内, 化学发光值逐渐增强, 当超过 70 s 后, 化学发光强度变化缓慢, 并且化学发光积分值峰形变得钝和宽, 出现拖尾现象。所以选择最佳的酶与底物的接触时间为 70 s 作为后续的研究。

3.1.6 农药抑制时间的影响

乙酰胆碱酯酶与有机磷或氨基甲酸酯类农药的反应, 类似于酶与底物的反应。首先二者形成酶-农药复合物, 随后农药的酰基转移到酶活性中心丝氨酸上的羟基使酶丧失活性, 从而使酶-受到抑制。农药对乙酰胆碱酯酶的抑制时间不同, 生物传感器的响应值变化也不同。

本研究选用 1 $\mu\text{g/mL}$ 的敌敌畏标准溶液考察了

5~30 min 抑制时间内, 生物传感器响应值的变化, 趋势图如图 8 所示: 在 5~20 min 时间范围内, 随着农药与酶反应器接触时间的延长, 酶活受抑制的程度不断增强, 当抑制时间大于 20 min 时, 酶活抑制率虽然还有上升趋势, 但是变化幅度较小。因此, 本研究最终选择 20 min 作为农药抑制时间。

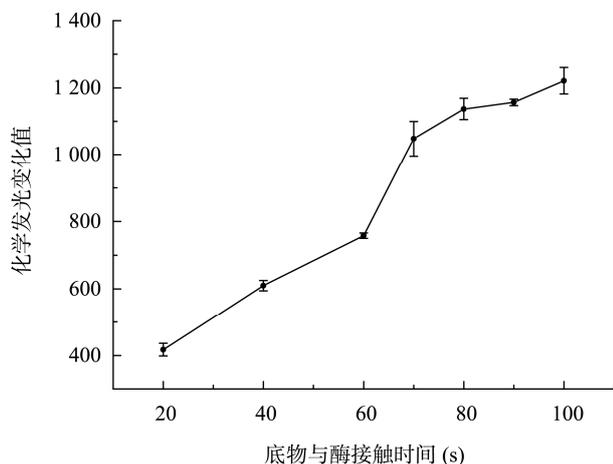


图 7 底物与酶接触时间对化学发光强度变化值的影响($n=3$)

Fig. 7 The effect of substrate contacting time on chemiluminescence intensity ($n=3$)

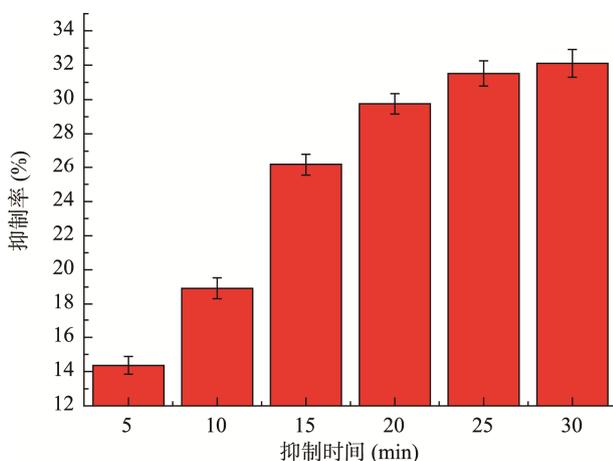


图 8 农药抑制时间对酶活力的影响($n=3$)

Fig. 8 The effect of inhibition time on inhibition rate($n=3$)

3.1.7 恢复时间的影响

有报道^[23]发现 3 种胍类化合物对辛硫磷抑制乙酰胆碱酯酶具有重活化作用。目前常用的重活化剂多为胍类化合物, 如氯磷定、双复磷、甲磺磷定、双磷定等。本研究区采用碘解磷定(2-PAM)作为乙酰胆碱酯酶的复活剂, 选用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的敌敌畏溶液作用酶反

应器 20 min 后, 研究 1 mmol/L 2-PAM 对酶活恢复的最佳时间。研究考察了 5~30 min 恢复时间对传感器化学发光强度的影响, 结果如图 9 所示: 当 2-PAM 溶液的作用时间等于或大于 15 min 时, 受到抑制的固定化酶的活力可以恢复到初始酶活的 87% 以上, 延长恢复时间可以更好地恢复酶活, 但综合考虑检测时间和恢复率等因素, 确定恢复时间为 15 min 比较合适。

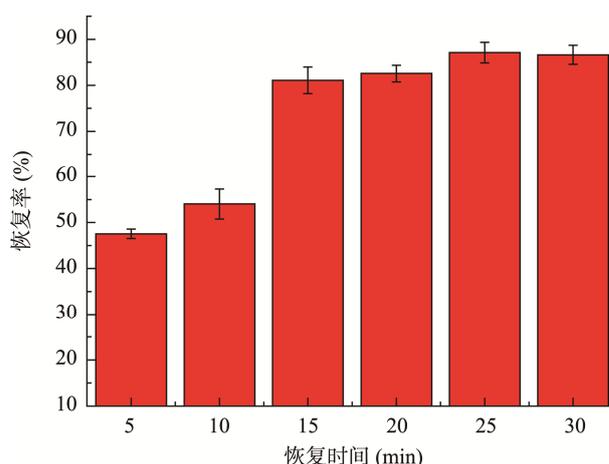


图 9 恢复时间对酶活恢复率的影响($n=3$)

Fig. 9 The effect of recovery time on recovery rate($n=3$)

3.2 标准曲线的建立

分别配制浓度为 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的辛硫磷标准溶液, 浓度为 0.08~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的敌敌畏标准溶液, 浓度为 0.8~15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乐果标准溶液, 浓度为 0.08~15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的克百威标准溶液, 浓度为 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西维因标准溶液, 浓度为 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的灭多威标准溶液。

在最佳条件下测定化学发光值, 取农药的对数浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标, 酶活抑制率(%)为纵坐标, 做线性回归方程, 并计算线性相关系数; 以酶活抑制率为 5% 作为检出限, 结果如表 1 所示。

3.3 精密度实验

在最佳条件下对含有辛硫磷、敌敌畏、乐果、克百威、西维因、灭多威的溶液分别测定 6 次, 如表 2 所示, 其 RSD 均小于 7%, 可见所研制的传感器具有较好的精密度。

3.4 稳定性实验

在没有农药抑制的条件下, 向传感器连续 6 次流动注射底物 ATCh (0.05 mmol/L, 40 s), 所得到的峰值见图 10。由图可知, 虽然传感器的基线随着注射次数

的增加而产生一定的漂移, 但是传感器对底物的响应较好(RSD=7.75%, n=6), 表现出良好的稳定性。

3.5 酶柱保存稳定性

将固定化酶保存在 4 °C, 含 0.02% NaN₃、浓度为 0.1 mol/L, pH=8.0 的磷酸盐缓冲液中, 每 10 d 测定一次化学发光值, 持续两个月, 结果见图 11。固定化

酶的活力在整个保存期内(60 d)稍有下降, 与原酶活相比, 2 个月内仅降低了 23%。

3.6 样品检测及添加回收率

取包菜、苹果样品各三份, 分为三组, 分别向包菜样品中添加不同量的辛硫磷标品, 分别为加标前辛硫磷含量的 80%、100%、120%; 向苹果样品中添

表 1 农药的线性相关方程、相关系数与检出限
Table 1 Regression equation, correlation coefficient and limit of detection of pesticides

种类	线性范围(μg/mL)	线性方程	相关系数(R ²)	检出限(μg/mL)
辛硫磷	0.1~10	$Y = 10.366X + 18.995$	0.9923	0.047
敌敌畏	0.08~10	$Y = 16.22X + 25.614$	0.9903	0.054
乐果	0.8~15	$Y = 7.2755X + 8.0116$	0.9904	0.388
克百威	0.08~15	$Y = 19.843X + 31.059$	0.9926	0.049
西维因	0.1~10	$Y = 16.22X + 25.614$	0.9972	0.051
灭多威	0.1~10	$Y = 12.001X + 18.182$	0.9944	0.080

表 2 精密度实验结果
Table 2 The results of precision experiment

农药	检测次数(μg/mL)						RSD 值(%)
	1	2	3	4	5	6	
辛硫磷	1.982	2.071	2.032	2.206	2.301	1.871	6.897
敌敌畏	1.117	1.172	1.093	1.106	1.038	1.002	5.539
乐果	2.212	2.082	2.193	1.926	2.036	2.124	4.628
克百威	1.024	1.041	1.074	1.176	1.137	1.021	5.435
西维因	1.087	1.106	1.171	1.038	0.965	1.026	6.577
灭多威	1.106	1.047	1.175	1.098	1.037	1.041	4.520

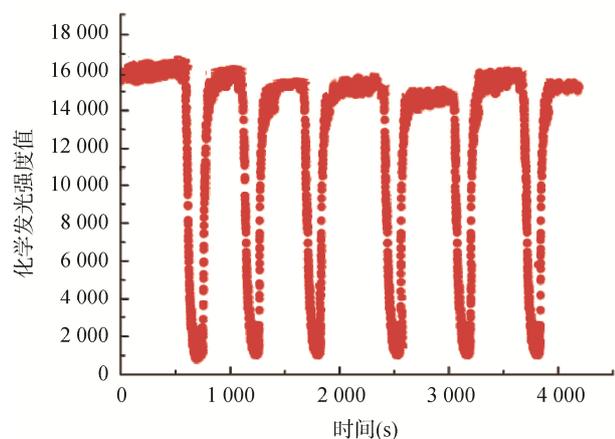


图 10 多次注射底物 ATCh 后传感器的响应值
Fig. 10 Responses of the biosensor to repeated injection of ATCh

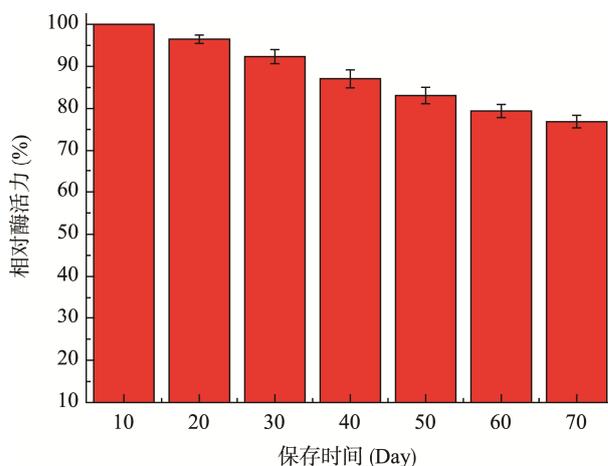


图 11 传感器化学发光强度随时间的变化(n=3)
Fig. 11 The stability of microfluidic biosensor(n=3)

表3 农药在包菜、苹果中的添加回收率与相对标准偏差
Table3 Pesticides recoveries and relative standard deviation in cabbage, apple

样品	农药种类	加标前量±SD值 (μg/g)	加标量 (μg/g)	期望值 (μg/g)	测量值±SD值 (μg/g)	回收率±SD (n=3)
包菜	辛硫磷	1.297±0.04	1.000	2.297	2.194±0.101	0.900±0.084
		1.297±0.04	1.300	2.597	2.477±0.104	0.909±0.083
		1.297±0.04	1.560	2.857	2.743±0.115	0.929±0.072
		2.31±0.066	1.800	4.110	4.071±0.049	0.982±0.033
苹果	西维因	2.31±0.066	2.260	4.570	4.512±0.154	0.977±0.073
		2.31±0.066	2.600	4.910	4.827±0.093	0.971±0.036

加不同量的西维因标品,分别为加标前含量的80%、100%、120%,1 h后按2.2.7方法处理,用所建立的生物传感器在最优测定条件下进行测定。选用辛硫磷标准曲线对包菜中的辛硫磷含量与加标回收率进行计算,选用西维因标准曲线对苹果中的西维因含量与加标回收率进行计算,结果如表3所示,可以看出各个样品回收率均大于90%,在90%~99%之间,平均偏差8.5%,具有较好的回收率,表明此方法对检测包菜、苹果中的有机磷及氨基甲酸酯类农药残留检测结果较为准确。

4 结论

本研究构建了微流控芯片与固定化酶柱结合的化学发光生物传感器法测定有机磷与氨基甲酸酯农药残留的新方法。同时建立了辛硫磷、敌敌畏、乐果、克百威、西维因、灭多威的标准曲线。当农药残留浓度在一定范围内时,化学发光值与农药对数浓度有良好的线性关系($R^2 > 0.99$),辛硫磷检测范围为0.1~10 μg/mL,检出限为0.047 μg/mL;敌敌畏检测范围为0.08~10 μg/mL,检出限为0.054 μg/mL;乐果检测范围为0.8~15 μg/mL,检出限为0.388 μg/mL;克百威检测范围为0.08~15 μg/mL,检出限为0.049 μg/mL;西维因检测范围为0.1~10 μg/mL,检出限为0.051 μg/mL;灭多威检测范围为0.1~10 μg/mL,检出限为0.080 μg/mL,研究扩大了检测的线性范围,为农药残留的检测提供了一种新思路。

同时,本研究对传感器的性能进行了评价,测试指标有精密度、稳定性、加标回收率、酶柱保存活性等。实验证明,此生物传感器有着良好的性能,适用于农药残留的快速分析,具有操作简单、效率高、工作量小的特点。此外该方法检出限小于我国相关标准规定的蔬菜、水果中农药最高残留限量(MRL)值(0.2

mg/kg和0.5 mg/kg)的要求,因此本法完全满足对蔬菜、水果中有机磷和氨基甲酸酯农药残留的分析。

参考文献

- [1] Chowdhary S, Bhattacharyya R, Banerjee D. Acute organophosphorus poisoning [J]. Clin Chim Acta, 2014, 431: 66-76.
- [2] GB2763-2014 食品中农药最大残留限量[S].
GB2763-2014 The maximum pesticides residue limits in foods [S].
- [3] 万圣, 吕延成. 有机磷及氨基甲酸酯类农药残留检测研究进展[J]. 广东农业科学, 2009, (03): 110-112.
Wan S, Lv YC. Advances in research into carbamates and phosphorus pesticides residue detection [J]. Guangdong Agric Sci, 2009, (03): 110-112.
- [4] 蒋新. 果蔬中有机磷农药残留快速检测方法研究进展[J]. 农业灾害研究, 2013, 3(7): 55-57.
Jiang X. Advance of rapid detection technologies of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables [J]. J Agric Catastroph, 2013, 3(7): 55-57.
- [5] 张雪, 王海. 速测卡法与酶抑制率法检测蔬菜农药残留的比较[J]. 河南科学, 2012, (09): 1234-1236.
Zhang X, Wang H. Comparison of measurement card and enzyme inhibition method on the rapid detection of pesticide residues in vegetables [J]. Henan Sci, 2012, (09): 1234-1236.
- [6] 陈兴江, 邱雪柏, 商胜华, 等. 农残速测卡和速测仪在烟叶农药残留检测中的应用[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(6): 102-105.
Chen XJ, Qiu XB, Shang SH, et al. Application of rapid detection card and instrument in detecting pesticide residue in tobacco [J]. Guizhou Agric Sci, 2013, 41(6): 102-105.
- [7] 李莉梅, 沙月娥, 彭海燕, 等. 酶抑制率法快速检测茶叶中农药残留的研究[J]. 湖南农业科学: 下半月, 2013 (6): 33-34.
Li LM, Sha YE, Peng HY, et al. Study on enzyme inhibition method on the rapid detection of pesticides in tea [J]. Hunan Agric Sci, 2013, (6): 33-34.
- [8] Choi JW, et al. Optical organophosphorus biosensor consisting

- of acetylcholinesterase viologen hetero Langmuir-Blodgett film[J]. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16(9-12): 937-43.
- [9] 刘涛. 基于酶生物传感器对有机磷和氨基甲酸酯类农药检测的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- Liu T. Study on enzyme biosensor for determining organophosphorus and carbamates pesticides[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012.
- [10] Dan D, *et al.* Amperometric detection of triazophos pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on multiwall carbon nanotube-chitosan matrix [J]. *Sensor ActB: Chem*, 2007, 127(2): 531-535.
- [11] Ben ON, *et al.* A simple colorimetric enzymatic-assay, based on immobilization of acetylcholinesterase by adsorption, for sensitive detection of organophosphorus insecticides in olive oil [J]. *Food Control*, 2014, 46: 75-80.
- [12] Valdés-Ramírez G, *et al.* Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392(4): 699-707.
- [13] 徐书法, 国占宝, 曹坦, 等. 生物传感器及其在食品安全检测中的应用[J]. *现代科学仪器*, 2009 (6): 102-105.
- Xu SF, Guo ZB, Cao T, *et al.* Research of biosensor and its application to detection in food safety [J]. *Mod Sci Instrum*, 2008, (06): 102-105
- [14] 唐晗, 王晓朋, 吴中波, 等. 化学发光生物传感器检测食品中生物胺总量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, (05): 1349-1356.
- Tang H, Wang XP, Wu ZB, *et al.* Detection of total biogenic amines in foods by chemiluminescence biosensor [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, (05): 1349-1356.
- [15] 刘敬彪, 郭晓宇, 等. 生物传感器在有机磷农药检测中的应用[J]. *工业仪表与自动化装置*, 2008, (4): 37-40.
- Liu JB, Guo XY, *et al.* The application of biosensors to the detection of organophosphate pesticides[J]. *Instrum Auto*, 2008, (4): 37-40.
- [16] 汪美凤, 胡娟, 郑刚, 等. 微流控芯片在食品安全分析中的应用[J]. *食品工业科技*, 2011 (2): 401-403.
- Wang MF, Hu J, Zheng G, *et al.* Application of microfluidic chip in food safety analysis [J]. *Food Ind Technol*, 2011, 32(02): 401-403, 407.
- [17] 何晨光, 杨春江, 王馨. 微流控芯片技术的研究进展[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2010, (05): 357-360.
- He CG, Yang CJ, Wang X. Research progress on microfluidic chip technology [J]. *Chin Front Health Quar*, 2010, (05): 357-360.
- [18] 郑小林, 鄢佳文, 胡宁, 等. 微流控芯片的材料与加工方法研究进展[J]. *传感器与微系统*, 2011, 30(6): 1-4.
- Zheng XL, Yan JW, Hu N, *et al.* Research progress of materials and fabrication methods of microfluidic chip [J]. *Trans Microsyst Technol*, 2011, (06): 1-4, 7.
- [19] 李学斌, 祝华. 壳聚糖微球制备方法研究[J]. *药学进展*, 2005, (04): 166-169.
- Li XB, Zhu H. Research on preparation methods of chitosan microspheres [J]. *Prog Pharm Technol*, 2005, (04): 166-169.
- [20] 王怀玉, 董利民, 咎青峰, 等. 乳化交联法制备壳聚糖微球粘连原因分析[J]. *功能材料*, 2008, 38(A05): 1923-1925.
- Wang HY, Dong LM, Zan QF, *et al.* Reasons of adhesion of chitosan microsphere prepared by emulsion-crosslink [C]. The 6th academic conference of Chinese functional materials and its application, 2007.
- [21] 吴巧丽, 张少凡, 孙洋, 等. 食品安全级固定化载体-壳聚糖微球制备的条件[J]. *食品与机械*, 2012 (1): 26-28.
- Wu QL, Zhang SF, Sun Y, *et al.* Study of preparation conditions of food-grade immobilizationsupport-chitosan microsphere [J]. *Food Mach*, 2012, 28(1): 26-28.
- [22] Ellman GL, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharm*, 1961, 7(2): 88-95.
- [23] 张轶辉, 吴刚. 3种胍类化合物对中毒乙酰胆碱酯酶的重活化能力比较[J]. *华东昆虫学报*, 2006, (04): 301-304.
- Zhang YH, Wu G. Comparison on reactivations of poisoned acetylcholinesterase by three kinds of oximes [J]. *J East China*, 2006, 15(4): 301-304.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王晓朋, 本科, 主要研究方向为食品科学与工程。

E-mail: 937530451@qq.com



刘晓宇, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与农业资源综合利用。

E-mail: liuxiaoyu@mail.hzau.edu.cn