

· 研究论文 ·

基于复合纳米微粒修饰和磁性分离富集的一次性有机磷农药酶传感器

杨欣¹, 巫远招¹, 谢东华², 闻伟刚², 干宁*¹

(1 新型功能材料及其制备科学国家重点实验室, 宁波大学 材化学院, 浙江 宁波 315211;

2 宁波出入境检验检疫局 技术中心, 浙江 宁波 315200)

摘要: 在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 微粒上固定乙酰胆碱酯酶 (AChE), 制得磁性复合粒子 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}/\text{AChE}$ 。通过磁力将其吸附于涂覆了碳纳米管 (CNTs)/纳米 ZrO_2 /普鲁士蓝 (PB)/Nafion(Nf)复合膜的丝网印刷碳电极 (SPCEs) 表面, 制得一次性有机磷农药 (OPs) 酶传感器。采用扫描电镜 (SEM)、X 射线荧光光谱 (XRFs) 表征传感器的制备过程, 采用循环伏安法 (CV) 和示差脉冲伏安法 (DPV) 研究了传感器的电化学性质。利用 OPs 对 AChE 的抑制作用, 以硫代乙酰胆碱 (ATCh) 为底物, 对乐果进行了检测。在 $\text{pH}=7.5$ 的 0.1 mol/L 硝酸钾溶液中, 乐果浓度的对数与酶电极的抑制率 (A) 在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mg/L}$ 间呈良好的线性关系, 检测限为 $5.6 \times 10^{-7} \text{ mg/L}$, 用于实际样品白菜检测时的添加回收率在 $88\% \sim 105\%$ 之间, 与气相色谱法 (GC) 所得结果一致。该传感器采用复合纳米粒子修饰电极表面, 具有较高的比表面活性, 响应迅速, 检测限低; ZrO_2 可特异性地富集样品中的 OPs, 磁性纳米颗粒包被 AChE 可实现磁场分离和电极表面更新, 且具有高灵敏度、低样品量、一次使用可抛弃、便携式等特点, 可用于蔬菜等农产品中痕量 OPs 的快速、简便、准确检测。

关键词: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 碳纳米管; 纳米 ZrO_2 ; 乙酰胆碱酯酶; 有机磷农药

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2009.04.07

中图分类号: TP213.3; TQ450.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)04-0441-08

ADisposable Organophosphorus Pesticides Enzyme Biosensor Based on Composite Nano-particles and Magnetic Separation with Enrichment Modified Screen-printed Carbon Electrodes

YANG Xin¹, WU Yuan-zhao¹, XIE Dong-hua², WEN Wei-gang², GAN Ning*¹

(1 State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science, Faculty of Material Science and Chemical Engineering of Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China;

2 The Technical Center of Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315200, Zhejiang Province, China)

Abstract The composite magnetic particle composed of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ /acetylcholinesterase (AChE) was synthesized and was absorbed on the surface of screen-printed carbon electrodes (SPCEs) coated with carbon nanotubes (CNTs)/nano- ZrO_2 /prussian blue (PB)/nafion (Nf)-membrane through magnet A

收稿日期: 2009-08-02 修回日期: 2009-10-09

作者简介: 杨欣 (1983-), 男, 湖南桃江人, 在读硕士研究生, E-mail: 01yangxin@163.com; 通讯作者 (Author for correspondence): 干宁 (1974-), 男, 博士, 副教授, 主要从事电化学分析教学与科研。联系电话: 0574-8760983; E-mail: ganning@nbu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (20805024); 浙江省自然科学基金 (Y106725, Y4080023); 宁波市自然科学基金 (2008A610048, 2008A610072); 浙江省大学生科技创新基金资助项目。

disposable organophosphorus pesticides (OPs) enzyme biosensor was developed for the determination of dimethoate. Different technologies were employed to study the construction process and electrochemical properties of the biosensor. In pH 7.5 0.1 mol/L KNO_3 solution, the rate of inhibition (A) of the AChE by OPs was related linearly to the concentration of dimethoate in the range from 1.0×10^{-6} to 1.0×10^{-2} mg/L with a detection limit of 5.6×10^{-7} mg/L. The recovery was 88%–105% for chinese cabbage. The results of the analytical method were comparable with that of gas chromatography method. The proposed biosensor has high surface activity due to the modification with composite nano-particles, rapid response, specific strong adsorption to OPs and was easily renewed by removal of the magnet. It showed the merits of high sensitivity, disposable design, low consume of sample and portability compared with other enzyme biosensors. This convenient, fast and sensitive voltammetric test method is suitable for the fast analysis of OPs.

Key words $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$, carbon nano tubes, nano- ZrO_2 , acetylcholinesterase, organophosphorus pesticides

有机磷农药 (OPs) 是我国目前最常用的一类杀虫剂, 其在食品和环境中的残留已严重危害人类健康。因此, 对 OPs 残留进行及时、准确的监控与检测十分必要。传统的 OPs 检测方法如: 气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱-质谱联用法 (GC/MS), 尽管能比较准确地检测多种 OPs 残留量, 但其设备昂贵、样品前处理繁琐、分析周期长、并需要专门的操作人员^[1-3]。为了对食品中的痕量 OPs 残留进行现场分析, 研制一种便携式、低成本、高灵敏度的分析方法具有显著的社会及经济效益。电化学酶传感器具有灵敏度高、特异性强及易于自动化等优点, 非常适合于 OPs 残留的现场快速筛查^[4-9]。但目前报道的该类酶传感器也存在不足: 一是通常采用的 OPs 抑制酶-乙酰胆碱酯酶 (AChE) 等在固定于电极过程中易失活, 电极不易长期保存; 二是常见的电极材料 (如金、铂、玻碳等) 价格昂贵, 使用成本高; 三是绝大部分酶传感器有效传感面积小, 也无法直接对样品中的 OPs 进行富集, 导致其灵敏度偏低。如何克服这些缺点已成为酶传感器能否成功走向 OPs 现场检测的关键。近年来, 基于丝网印刷碳电极 (SPCEs) 的一次性电极得到了迅速发展, 其最大优点是能够批量生产, 成本低且为一次性使用, 避免了同一电极检测多个样本时的交叉干扰。碳纳米管 (CNTs) 具有比表面积大, 能明显促进生物分子的电子传递等特性^[10-13]; Fe_3O_4 (核) /Au (壳) (金磁复合纳米微粒, 简称 GMP) 既可快速标记生物分子又具有超顺磁性, 在生物物质分离上有重要的应用, 如将酶包被在 GMP 表面, 可通过外磁场控制将其吸附到电极表面成膜, 移去磁场后可实现电极表面更新^[14]; Nafion (Nf) 是一种全氟化

高分子聚合物阳离子交换剂, 并具有优良的成膜、分散及抗干扰能力, 已广泛用于生物传感器敏感膜构建^[15]; 纳米氧化锆 (Nano- ZrO_2) 具有对磷酸根的选择性吸附能力, 可以对 OPs 进行富集^[16-17]。

本课题组曾采用 SPCEs 构建了一类快速测定 OPs 和氨基甲酸酯类农药的双酶传感器^[18]。本研究首先在核壳结构 GMP 微粒上吸附 AChE, 制得磁性复合粒子 GMP-AChE, 再通过磁力将其吸附于含 CNTs/ ZrO_2 /普鲁士蓝 (PB) /Nf 复合膜的 SPCEs 表面, 采用 PB 作电子媒介体降低检测电位^[19-20], 制得新型 OPs 检测酶传感器 (SPCEs | CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf | GMP-AChE), 并用于白菜样品中 OPs 的代表——乐果的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660B 电化学工作站 (上海辰华仪器公司); 三电极集成的 SPCEs (西班牙 DroptSens 公司, 其中: 工作电极为修饰电极, 参比电极为印刷 Ag/AgCl 电极, 对电极为印刷碳电极); Zetasize Nano ZS90 (ZEN 3690) 纳米粒度仪 (马尔文仪器有限公司, 英国); Hitachi S-3400N 型能谱扫描电镜 (Hitachi 公司, 日本); S2 RANGER X 射线荧光光谱仪 (Bruker 公司, 德国); GC-14B 型气相色谱仪 (日本岛津公司); NdFeB 稀土强磁铁 (杭州强磁器材有限公司)。

硫代乙酰胆碱 (ATCh)、乙酰胆碱酯酶 (AChE) (烟台京蓬生物科研有限公司, 活性: 200 U/g); 1 000 mg/mL 的乐果标准品 (Signa 公司); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 纳米金磁微粒 (陕西北美基因股份

有限公司, 5 mg/mL, 粒径 30 nm); 多壁碳纳米管 (深圳纳米港有限公司); Nafion(Nf) 溶液 (上海河森电气有限公司); 硝酸钾 (用氢氧化钾调节 pH 值)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、普鲁士兰 (PB) 及其他试剂均为分析纯; 白菜样品 (宁波家家乐超市, 生产日期: 2009年6月)。

1.2 纳米 ZrO_2 GMP-AChE 复合粒子的制备及 SPCEs| CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf| GMP-AChE 酶电极的构建

参照文献 [16] 的溶胶-凝胶法制备了纳米 ZrO_2 并进行了粒度分析, 其最大粒径为 47.6 nm, 最小粒径为 18.3 nm, 粒径分布宽度为 29.3 nm, 占微粒数总量最多 (43.3%) 的粒径为 31.5 nm。

AChE-GMP 将 100 μ L GMP 溶液和 1 mL AChE (0.1 g/mL) 溶液于离心管中均匀混合, 置于恒温摇床在 180 r/min, 37 $^{\circ}$ C 下使其发生偶合反应, 20 min 后即得。

SPCEs| CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf| GMP-AChE 电极: 将质量分数为 0.1% 的 Nafion(Nf)、质量浓度为 0.5 mg/mL 的碳纳米管 (CNTs)、0.02 mol/L 普鲁士兰 (PB) 和 4 mg/mL ZrO_2 的 5 μ L DMF 溶液均匀涂覆于丝网印刷碳电极 (SPCEs) 表面, 待其自然干燥后继续滴加包被有 AChE 的 5 μ L GMP-AChE 复合粒子溶液于上述电极表面, 通过外加磁场的作用将其吸附于 SPCEs 表面, 洗脱非特异性吸附后, 即得酶电极。使用时在电极底部加一块磁铁, 借助磁力将复合粒子吸附于电极表面, 更新电极时, 移去磁铁即可冲出 GMP-AChE 复合粒子。

1.3 试验方法

1.3.1 样品前处理 取匀浆后的白菜待测样品 10~20 g, 加入质量分数为 5% 的丙酮溶液 99 mL, 振摇 3 min, 过滤, 减压蒸馏至底部基本干燥, 加入 10 mL 丙酮溶解, 过滤得样品提取液, 待测。

1.3.2 OPs 残留分析

1.3.2.1 本方法 ATCh 经过 AChE 催化水解后, 生成具有电化学活性的乙酰胆碱 (TCh)。当 OPs 抑制了 AChE 活性时, TCh 的生成量会显著下降, 由电流下降程度可对 OPs 定量。具体步骤如下: 首先向电极表面反应腔 (图 1, 容积约为 30 μ L) 加入 25 μ L 含 1 mmol/L ATCh 底物的 0.1 mol/L 硝酸钾, 并检测其响应电流为 I_0 , 再向其中加入最终质量浓度分别为 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-2} mg/L 的乐果标准品, 35 $^{\circ}$ C 下抑制 5 min 以后检测响应电流为 I 按下式

计算 AChE 的抑制率:

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

式中: A 为 AChE 酶的抑制率 (与 OPs 残留具有正相关性); I_0 为未被 OPs 抑制的酶电极稳态响应电流 (空白电流); I 为 OPs 抑制后酶电极的稳态响应电流。根据 A 与 OPs 对数浓度得到标准曲线, 采用标准曲线法进行 OPs 定量。

循环伏安法 (CV) 和示差脉冲伏安法 (DPV) 实验均在以含 1.0 mmol/L 底物 ATCh 的 pH = 7.5, 0.1 mol/L 的硝酸钾溶液作为支持电解质中进行, 电位扫描范围均为 +0.6 ~ -0.2 V (vs Ag/AgCl)。酶电极不使用时, 于 4 $^{\circ}$ C 下贮存。传感器检测系统及酶电极对 OPs 的分析原理见图 1。

1.3.2.2 GC 法^[21] 色谱柱 DB-1701 石英毛细管柱, 30 m \times 0.25 mm \times 0.32 μ m; 程序升温: 80 $^{\circ}$ C (0.5 min) $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 240 $^{\circ}$ C (3 min), 进样温度 270 $^{\circ}$ C, 检测器温度 250 $^{\circ}$ C; 进样量 1 μ L。

1.3.3 实际样品和回收率检测 为了评估该酶电极应用于实际样品检测的可行性, 以白菜为代表测定其添加回收率。将白菜磨碎, 加入一定浓度的乐果标准品, 按照 1.3.1 节中方法进行提取后采用上述方法检测。

2 结果与讨论

2.1 传感器制作过程中各阶段获得电极的表征

采用扫描电镜 (SEM) 对传感器制作过程中获得的电极 (SPCEs| CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf| SPCEs| CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf| GMP-AChE) 表面进行了表征。图 2 a 显示 SPCEs 表面有明显的片状石墨层; SPCEs| CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf 电极表面出现了明显的 CNTs 管网结构, 这表明 CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf 能覆盖在 SPCEs 表面成膜; SPCEs| CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf| GMP-AChE 的 SEM 如图 2 c 出现了大量分散良好, 且粒径约为 300~500 nm 的纳米岛状颗粒, 比 GMP (30 nm) 粒径明显增加, 这表明 GMP-AChE 颗粒固定在了电极表面。

采用 X 射线荧光光谱 (XRFs) 对最终得到的 SPCEs| CNTs/ ZrO_2 /PB/Nf| GMP-AChE 酶电极表面进行了表征 (图片未附), 显示了 $Zr\text{-}K\alpha$ 峰 2.1 keV、 $Fe\text{-}K\alpha$ 峰 6.4 keV、 $Au\text{-}K\alpha$ 峰 9.7 keV 和 $S\text{-}K\alpha$ 峰 2.3 keV, 由于 ZrO_2 含有 Zr 元素, GMP 含有 Fe

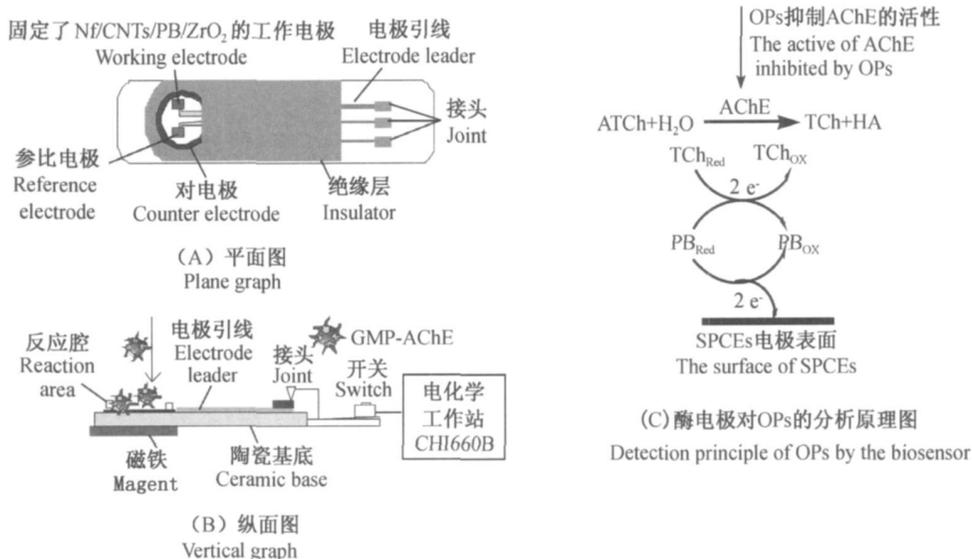


图 1 检测系统中传感器的 (A) 平面图、(B) 纵面图及 (C) 酶电极对 OPs 的分析原理图

Fig. 1 The scheme of enzyme biosensor apparatus from the plane (A), vertical direction (B), and the detection principle of OPs by biosensor (C)

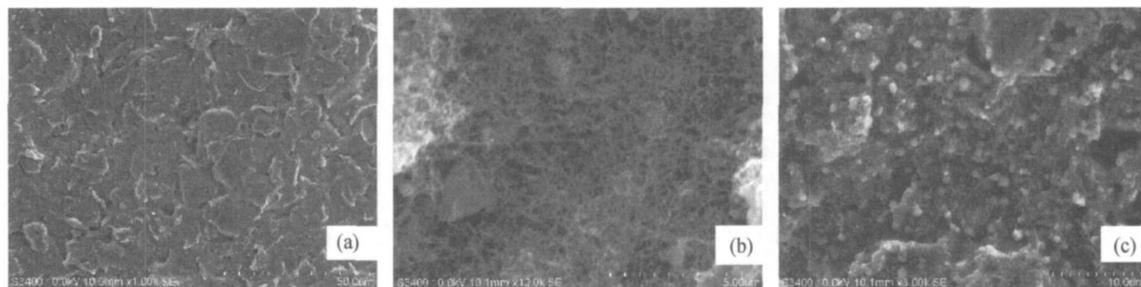


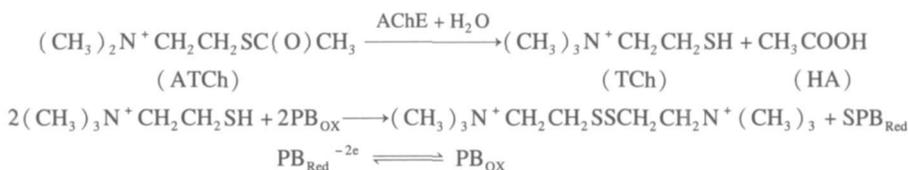
图 2 SPCEs (a)、SPCEs | CNTs/ZrO₂/PB/Nf (b) 及 SPCEs | CNTs/ZrO₂/PB/Nf | GMP-AChE (c) 的扫描电镜图
Fig. 2 The SEM images of SPCEs (a), SPCEs | CNTs/ZrO₂/PB/Nf (b), SPCEs | CNTs/ZrO₂/PB/Nf | GMP-AChE (c)

和 Au 元素, AChE 含有 S 元素, 进一步说明 ZrO₂、GMP 和 AChE 被修饰到了 SPCEs 表面。

2.2 传感电极的电化学特性以及对乐果的检测

在含 1.0 mmol/L 底物 ATCh 的 25 μL 硝酸钾溶液中, 比较了不同电极的 CV 曲线 (图 3)。采用 SPCEs | CNTs/ZrO₂/Nf | GMP-AChE 电极 (a) 测定时出现一对明显的氧化还原峰, E_{pa} (阳极) = +0.59 V, E_{pc} (阴极) = +0.41V, 分别对应 ATCh 酶水解产物 TCh 的氧化还原反应。(a) 电极表面

Nf 膜中加入 PB 后生成本研究传感电极-SPCEs | CNTs/ZrO₂/PB/Nf | GMP-AChE 电极 (b), 其氧化还原峰电位明显负移 [E_{pa} (阳极) = +0.39 V, E_{pc} (阴极) = +0.20 V], 峰电流增大, 这说明 PB 的加入可以降低 ATCh 底物的氧化还原电位并加快 TCh 的电子传递。其原理为^[19]: ATCh 的酶水解产物 TCh 将氧化态 PB (PB_{ox}) 还原为还原态 PB (PB_{red}), 后者在电极表面被重新氧化为 PB_{ox}, 用方程式表示如下:



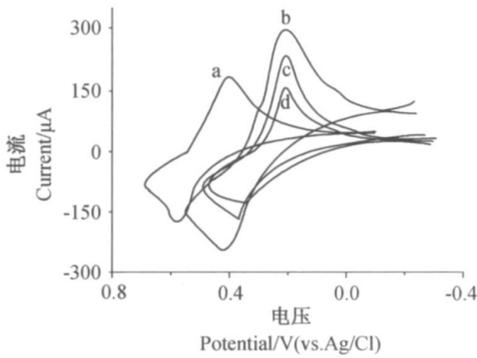


图3 SPCEs/CNTs/ZrO₂/Nf/GMP-AChE (a)、SPCEs/CNTs/ZrO₂/PB/Nf/GMP-AChE (b)、SPCEs/ZrO₂/PB/Nf/GMP-AChE (c)及 (c)电极被乐果抑制以后 (d)在 1.0 mmol/L ATCh底物中的循环伏安图

Fig 3 CVs of SPCEs/CNTs/ZrO₂/Nf/GMP-AChE (a), SPCEs/CNTs/ZrO₂/PB/Nf/GMP-AChE (b), SPCEs/ZrO₂/PB/Nf/GMP-AChE (c) and (c) inhibited by 1.0 × 10⁻³ mg/L dimethoate (d) in 1.0 mmol/L ATCh

(b)电极的氧化还原峰电流较无CNTs修饰电极-SPCEs/ZrO₂/PB/Nf/GMP-AChE (c)有较大增加,推测是因为CNTs的掺入增加了电极比表面积,加速了PB的电子传递速度。在传感电极中加入 1.0 × 10⁻³ mg/L 的乐果溶液,并于 35 °C 抑制 5 min 后,峰电流明显下降 (d),这是由于乐果抑制了AChE的活性,降低了其对ATCh的催化,导致电流下降。

2.3 酶电极的制备及测定条件优化

2.3.1 Nf膜中CNTs、PB、ZrO₂浓度 研究了Nf膜中CNTs浓度对DPV响应电流的影响(图4),在含底物ATCh的25 μL硝酸钾中进行DPV实验,当CNTs的质量浓度 ≤ 0.5 mg/mL时,DPV还原峰电流随着Nf膜中CNTs质量浓度的增加而增大;质量浓度 > 0.5 mg/mL时电流变化已经不明显,且背景电流变得较大。因此,实验中选择CNTs质量浓度为0.5 mg/mL。Nf膜中PB浓度对DPV响应电流的影响结果见图5。DPV还原峰电流随着Nf膜中PB浓度的增加而增大,但当PB浓度超过0.02 mol/L时,DPV响应电流反而降低,故选择PB浓度为0.02 mol/L。Nf膜中ZrO₂浓度对DPV响应电流的影响见图6。随着ZrO₂浓度增加,DPV响应电流下降,当质量浓度超过4.0 mg/mL以后,电流基本不再改变,这说明此时ZrO₂对乐果的富集已经达到饱和,因此,确定

ZrO₂的质量浓度为 4.0 mg/mL。

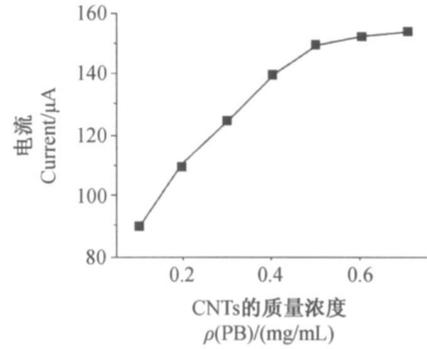


图4 CNTs质量浓度对DPV响应电流的影响
Fig. 4 Effect of the concentration of CNTs on DPV current

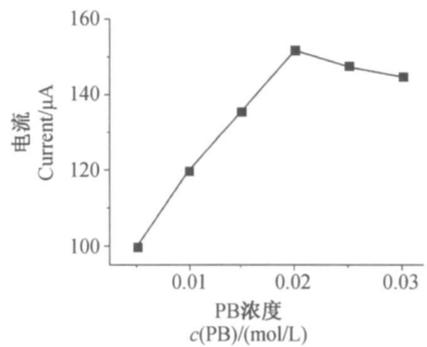


图5 PB浓度对DPV响应电流的影响
Fig. 5 Effect of the concentration of PB on DPV current

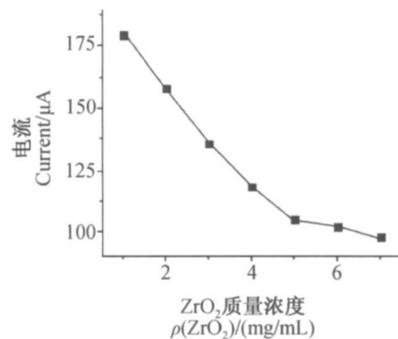


图6 ZrO₂质量浓度对DPV响应电流的影响
Fig. 6 Effect of the concentration of ZrO₂ on DPV current

2.3.2 抑制时间、温度及pH 首先考察了抑制时间对OPs抑制AChE效果的影响,结果见图7。

在开始5 min内OPs对酶的抑制率迅速增大,5 min后抑制率变化不大,故选择抑制时间为5 min。pH值对酶反应有一定影响(图8),在pH

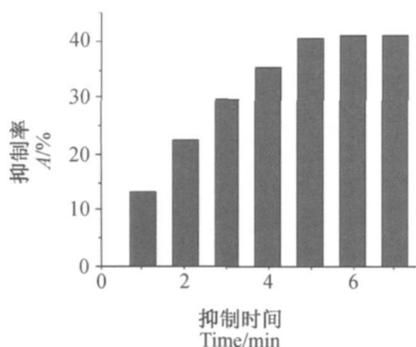


图 7 抑制时间对抑制率的影响

Fig. 7 Effects of inhibition time on A

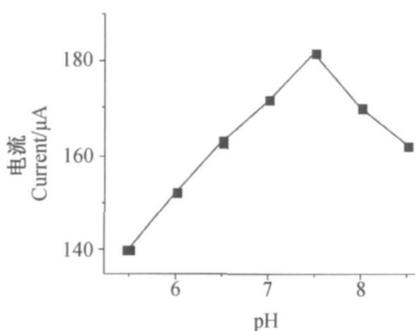


图 8 溶液 pH 对 DPV 响应电流的影响

Fig. 8 Effects of pH on DPV current

为 7.0~8.0 之间时, AChE 催化活性较高, 考虑到 OPs 一般在 pH 较高时易发生水解, 故选择接近中性微偏碱的 pH 值 7.5 作为测定条件。考察了酶电极在 20~45 °C 范围内对底物的催化电流响应 (图 9), 实验结果表明温度在 35 °C 时 DPV 还原峰电流达到最大。

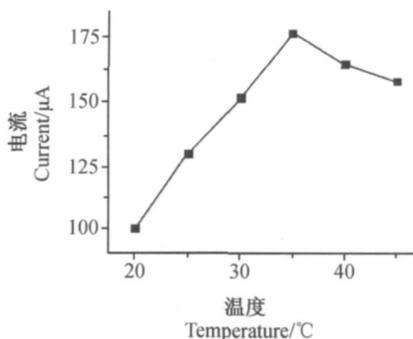


图 9 温育温度对 DPV 响应电流的影响

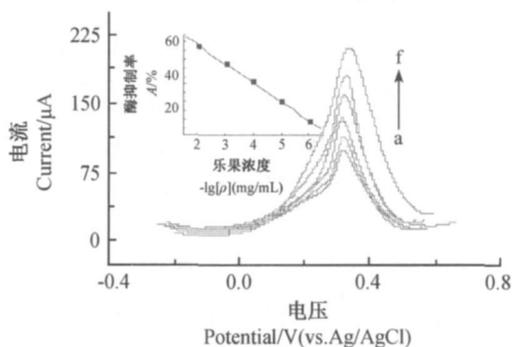
Fig. 9 Effect of incubation temperature on DPV current

2.3.3 电极表面 GM P-AChE 固定的量 比较了在电极表面固定不同量的 AChE 后对 1.0 mmol/L ATCh 的催化响应电流, 当固定 AChE 较少时, 响

应电流较小, 随着酶固定量的增大响应电流明显增大, 0.5 U 时响应电流达到最大, 继续增加酶固定量, 响应电流呈逐渐减小趋势。这可能是由于酶固定量过少, 对 ATCh 水解的催化作用太弱, 响应不够灵敏, 而酶固定量过多, 电极上的酶膜的厚度增加, 导致电阻增大。因此, 本实验选择 AChE 固定量为 0.5 U。

2.4 酶传感器对 OPs 的测定

在优化的实验条件下, 传感器的抑制率 (A) 与乐果质量浓度 ρ 的常用对数在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mg/L 范围内呈线性关系 (图 10), 线性回归方程为: $A(\%) = 148.13 - 11.20\rho (R^2 = 0.9983)$, 以 3 倍标准偏差法 (3σ) 计算得到该方法的检测限为 5.6×10^{-7} mg/L。明显优于 Nf 膜中未掺入 ZnO_2 的酶电极的线性范围 ($1.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ mg/L) 及检测限 (5.0×10^{-6} mg/L)。



(a) 1.0×10^{-2} , (b) 1.0×10^{-3} ,
(c) 1.0×10^{-4} , (d) 1.0×10^{-5} ,
(e) 1.0×10^{-6} , (f) 0 mg/L dimethoate

图 10 酶电极被不同浓度乐果抑制后的 DPV 响应图
(内插图为 A% 与乐果浓度的常用对数线性关系图)

Fig. 10 DPVs of the enzyme biosensor inhibited by different dimethoate
(Inset: The calibration curve of A% vs.)

由本文建立的酶传感器与 GC 法及其他 OPs 检测酶传感器综合比较的结果 (见表 1) 可见, 本传感器对 OPs 的检测下限、检测时间和稳定性均优于部分已报道的酶电极, 较 GC 方法有明显改进。其原因可能是: (1) 该电极表面敏感膜中的纳米 ZnO_2 对 OPs 具有选择性富集能力, 由此大大降低了检测限; (2) AChE-GM P 微粒是通过外加磁场均匀地分散在电极表面成膜, 磁力作用使其和电极表面更加靠近, 故而电子传递速度提高, 检测时间缩短; (3) 由于可采用磁场控制实现电极表面自动更新, 减少了干扰, 故而稳定时间较长。

表 1 本方法传感器与 GC 及其他酶传感器的性能对比

Table 1 The comparison between this biosensor method and GC or other enzyme biosensors

| 检测方法 Method | 线性范围 / (mg/L) Linear range | 检测限 / (mg/L) Detection limit | 检测时间 Detection time | 稳定时间 / d Stability time |
|--|--|---------------------------------|------------------------|----------------------------|
| 本方法 This method | $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ | 5.6×10^{-7} | 10 min | 40 |
| AChE/Au//PB/GCE ^[5] | $5.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-2}$ | 2.0×10^{-5} | 15 min | 19 |
| AChE/Nf/TCNQ/SPCEs ^[6] | $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^1$ | 2.1×10^{-3} | 12 min | 40 |
| AChE/Au-Fe ₃ O ₄ /GCE ^[7] | $1.7 \times 10^{-4} \sim 2.2 \times 10^{-1}$ | 8.6×10^{-5} | 15 min | 35 |
| GC ^[21] | $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.5$ | 1.0×10^{-2} | 4 h | \ |

2.5 酶电极的精密度、制备重复性、稳定性及再生性

2.5.1 精密度(组内偏差)及重复性 通过对 3 个白菜样品中乐果的含量(经过 GC 确认的空白白菜中添加)进行测定以获得组内偏差,测得当乐果的质量浓度为 1.0×10^{-3} 、 5.0×10^{-3} 和 1.0×10^{-2} mg/L 时的组内变异系数分别为 3.2%、3.5% 和 2.9% ($n=5$), 说明该电极对 OPs 检测具有良好的精密度。制备重复性: 由于使用的 SPCEs 是同一批次印制, 因此其结构完全相同(包括电极材料、面积和碳层厚度等), 且只使用一次即抛弃(以避免同一电极检测多个样品时的交叉污染)。采用 5 个同一批次 SPCEs 制备的 OPs 酶电极, 对 1.0 mmol/L 的底物 ATCh 经过 5.0×10^{-3} mg/L 的乐果抑制 5 min 以后进行测定, 获得组间相对标准偏差(RSD)为 5.2% ($n=4$), 说明该传感器具有较好的制备重复性。

2.5.2 稳定性及再生性 酶电极在 4°C 冰箱中存放 30 d 后, 对 1.0 mmol/L 的底物 ATCh 测定时

的电流响应值为初始值的 93%; 存放 40 d 后仅下降为原来的 86%。表明制作的酶电极在 40 d 内比较稳定, 电极表面 AChE 的生物活性保持良好。

再生性: 移去磁铁, 用二次蒸馏水冲洗电极表面, 再用磁力固定新滴加的 $5 \mu\text{L}$ GM P-AChE 复合粒子对电极表面进行更新以后, 对 1.0 mmol/L 的底物 ATCh 测定时的电流响应值为初始值的 97%, 表明制作的酶电极具有较好的再生性。

2.6 样品测定

在优化后的酶反应条件下, 为验证本方法在实际样品——白菜检测中的可行性, 在其中两个经过 GC 确认的空白样品(A, B)以及两个检出微量乐果的(C, D)样品中加入乐果标准品, 样品处理后进行回收率测定, 采用本方法和标准 GC 法测定的结果见表 2 二者吻合性较好。加标回收率在 88%~105% 之间, RSD 在 1.9%~3.3% 间, 精密度和准确度均较好, 说明本方法可用于实际样品中痕量 OPs 的测定。

表 2 白菜样品中乐果的检测结果 ($n=3$)Table 2 Determination of dimethoate in Chinese cabbage samples ($n=3$)

| 样品 Sample | 次数 Number | 本法测定值 This method/(mg/L) | 添加水平 Spiked level/(mg/L) | 本法测定值 Found/(mg/L) | RSD /% | 本法回收率 Recovery /% | GC 测定值 GC result/(mg/L) |
|--------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------|----------------------|----------------------------|
| A | 1 | 0 | 1.0×10^{-3} | 9.1×10^{-4} | 2.3 | 91.0 | 9.1×10^{-4} |
| | 2 | 0 | 5.0×10^{-3} | 5.1×10^{-3} | 3.1 | 102.0 | 5.1×10^{-3} |
| | 3 | 0 | 1.0×10^{-2} | 9.4×10^{-3} | 3.3 | 98.0 | 9.8×10^{-3} |
| B | 1 | 0 | 1.0×10^{-3} | 9.6×10^{-3} | 2.1 | 96.0 | 9.8×10^{-3} |
| | 2 | 0 | 5.0×10^{-3} | 5.4×10^{-3} | 1.9 | 108.0 | 5.2×10^{-3} |
| | 3 | 0 | 1.0×10^{-2} | 10.1×10^{-3} | 2.4 | 101.0 | 9.6×10^{-3} |
| C | 1 | 3.1×10^{-9} | 3.0×10^{-3} | 6.0×10^{-3} | 3.3 | 104.0 | 5.1×10^{-3} |
| D | 1 | 2.0×10^{-9} | 2.0×10^{-3} | 3.9×10^{-3} | 3.2 | 95.0 | 3.8×10^{-3} |

3 结论

以 SPCEs 为基材, 通过外加磁场在其表面吸附 AChE 包被的 GM P 微粒, 制备外加磁场可控的一

次性酶电极, 对白菜样品中痕量 OPs 进行了检测, 结果令人满意。与常规的 GC 法及普通的酶电极相比具有以下优点: (1) 该一次性酶电极廉价(成本 < 2 元/片)、小巧且集成度高(pH 试纸大小且集

成三电极), 样品需要量少 (2 μL), 且同一批次制作的电极结果重现性良好, 避免了同一电极检测多个样本时的交叉干扰; (2) 检测条件温和 (室温)、快速、灵敏度高 (检测下限 1.0×10^{-6} mg/L); (3) 外磁场可控且能对 OPs 进行特异性富集。由于 GMP 磁性微球具有超顺磁性, 外加磁场时, 电极表面可以富集大量的 AChE 包被金磁微粒, 既扩增了电极比表面积, 又使该传感器的灵敏度和检测范围大大提高, 且由于金胶可长久保持酶活性, 提高了传感器的使用寿命; 纳米 ZrO_2 能够特异性地富集 OPs, 降低检测限; 将电子媒介体 (PB) 直接包被在电极表面, 避免了电子媒介体加入到溶液中且可以降低检测电位, 减少干扰。综上所述, 本研究构筑的外磁场可控一次性酶传感器, 是实现痕量 OPs 现场、快速、超灵敏检测可选用的最佳途径之一。在农药残留检测以及药物分析应用方面具有一定理论意义和实际价值。

参考文献:

- [1] ZHAO E C, ZHAO W T, HAN L J et al Application of Dispersive Liquid-liquid Microextraction for the Analysis of Organophosphorus Pesticides in Watermelon and Cucumber [J]. J Chromatogr A, 2007, 1175: 137-140
- [2] HAN Jian-ping (韩建平), GAO Jun (高钧), GE Zhi-qiang (葛志强). 丹参中有机磷农药残留量的气相色谱-质谱测定 [J]. Chin J Mat Med (中国中药杂志), 2007, 32(6): 550-552
- [3] XIE Hong-xue (谢洪学), HE Li-jun (何丽君), WU Yan (伍艳), et al 基于离子液体的液相微萃取-高效液相色谱法测定水中有机磷农药 [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2007, 35(2): 187-190
- [4] LIU G D, LIN Y H. Biosensor Based on Self-assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection / Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents [J]. Anal Chem, 2006, 78: 835-843
- [5] LONG Ya-ping (龙亚平), ZHANG Yao-dong (张耀东), QI Hong-lan (漆红兰), et al. 有机磷电化学生物传感器的研究 [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2006, 26(12): 1702-1705
- [6] ZHANG Jun (张君), WANG Yue-ling (王月伶), YUAN Zhuo-bin (袁倬斌). 可检测有机磷农药残留的丝网印刷酶电极 [J]. Acta Chim Sinica (化学学报), 2006, 64(5): 428-434
- [7] M N Hong (闵红), QU Yun-he (曲云鹤), LIXiao-hua (李晓华), et al Au 掺杂 Fe_3O_4 纳米粒子酶传感器的制备及其应用于有机磷农药检测的研究 [J]. Acta Chim Sinica (化学学报), 2007, 65(20): 2303-2308
- [8] DEO R P, WANG J, BLOCK I et al Determination of Organophosphate Pesticides at a Carbon Nanotube/Organophosphorus Hydrolase Electrochemical Biosensor [J]. Anal Chim Acta, 2005, 530: 185-189
- [9] WEI Y Y, LI Y, QU Y H, et al A Novel Biosensor Based on Photoelectro-synergistic Catalysis for Flow-injection Analysis System / Amperometric Detection of Organophosphorus Pesticides [J]. Anal Chim Acta, 2009, 643: 13-18
- [10] ZHANG S P, SHAN L G, TIAN Z R, et al Study of Enzyme Biosensor Based on Carbon Nanotubes Modified Electrode for Detection of Pesticides Residue [J]. Chin J Chem, 2008, 19: 592-594
- [11] XIAO F, RUAN C P, LIU L H, et al Single-walled Carbon Nanotube-ionic Liquid Paste Electrode for the Sensitive Voltammetric Determination of Folic Acid [J]. Sens Actuators B, 2008, 134: 895-901
- [12] SHA Y F, QIAN L, BAI H X, et al Multilayer Films of Carbon Nanotubes and Redox Polymer on Screen-printed Carbon Electrodes for Electrocatalysis of Ascorbic Acid [J]. Talanta, 2006, 70: 556-560
- [13] DU D, HUANG X, CAI J et al An Amperometric Acetylcholinesterase Sensor Based on Immobilization of Acetylcholinesterase on a Multivall Carbon Nanotube-Cross-Linked Chitosan Composite [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387: 1059-1065
- [14] QIU J D, XIONG M, LIANG R P, et al Synthesis and Characterization of Ferrocene Modified Fe_3O_4 @ Au Magnetic Nanoparticles and Its Application [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24: 2649-2653
- [15] G. Erdodu Voltammetric Determination of Methidathion Insecticide [J]. J Anal Chem, 2006, 61(7): 673-676
- [16] WANG M, LI Z Y. Nano-composite ZrO_2 /Au Film Electrode for Voltammetric Detection of Parathion [J]. Sens Actuators B, 2008, 133: 607-612
- [17] LIU G D, LIN Y H. Electrochemical Sensor for Organophosphate Pesticides and Nerve Agents Using Zirconia Nanoparticles as Selective Sorbents [J]. Anal Chem, 2005, 77: 5894-5901
- [18] GAN Ning (干宁), WANG Feng (王峰), YANG Xin (杨欣), et al 采用纳米修饰双酶电极生物传感器检测有机磷与氨基甲酸酯类农药 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2008, 10(3): 329-334
- [19] SUPRUN G E, EVTUGYN H, BUDN KOV F, et al Acetylcholinesterase Sensor Based on Screen-printed Carbon Electrode Modified with Prussian Blue [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 383: 597-604
- [20] LI J P, WEI X P, YUAN Y H. Synthesis of Magnetic Nanoparticles Composed by Prussian Blue and Glucose Oxidase for Preparing Highly Sensitive and Selective Glucose Biosensor [J]. Sens Actuators B, 2009, 139: 400-406
- [21] ZHOU Zhao-ting (周兆亭), YUAN Jin-peng (苑金鹏), YU Tian-hua (于天华). 气相色谱法分析蔬菜中残留农药 [J]. Shandong Sci (山东科学), 2005, 18(4): 22-25

(Ed JIN SH)