

检测水中有机磷农药的酶传感器

陈向强, 何苗, 蔡强, 朱仕坤, 施汉昌

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 采用丝网印刷技术制作厚膜型电极, 通过交联法将乙酰胆碱酯酶固定在电极上, 开发快速检测水中有机磷农药的酶传感器。采用循环伏安法对电极所做的检测结果表明电极彼此间的差异在 10% 以内, 具有较好的一致性。通过在交联剂、酶和底物等方面优化传感器的工作参数, 确定了戊二醛、酶和底物的浓度分别为 0.2%、0.5 mg/mL 和 10 mmol/L 时, 传感器响应最好。在交联固定酶的情况下, 根据酶活受到有机磷抑制的原理, 采用时间-电流法对特丁硫磷和对硫磷进行了检测。结果表明: 这 2 种有机磷的检测限都可以达到 1 ng/mL, 线性区间 1~10 000 ng/mL。在物理吸附固定酶的情况下, 采用循环伏安法对特丁硫磷进行了检测。结果表明: 采用循环伏安法检测的灵敏度比采用时间-电流法的灵敏度要高。

关键词: 酶生物传感器; 丝网印刷电极; 乙酰胆碱酯酶; 有机磷农药

中图分类号: X859 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2006)08-1627-04

Detecting Organophosphorus Pesticide in Water Environment Using an Enzyme Biosensor

CHEN Xiang-qiang, HE Miao, CAI Qiang, ZHU Shi-kun, SHI Han-chang

(Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Based on a screen printed carbon electrode which contained a sensitive film prepared by crosslinking acetylcholine esterase (AChE) with glutaraldehyde on the surface of working electrode, an amperometric enzyme biosensor was taken on the determination of organophosphorus (OP) pesticide in water environment. Cyclic voltammetry was applied to assess the coherence of prepared screen printed electrodes. The results show that the variation is less than 10%. The sensor sensitivity was optimized with respect to content of enzyme, crosslinker and substrate. The best sensitivity is obtained using 0.2% of glutaraldehyde, 0.5 mg/mL of AChE and 10 mmol/L of acetylthiocholine chloride (ATChCl). Amperometric $I-t$ curve was conducted to detect the decrease rate of the current after the addition of two kind of OPs (terbufos and parathion), respectively. The detection limit for two kind of OPs are found to be 1 ng/mL with the linear range 1 ng/mL~10 000 ng/mL. Cyclic voltammetry was conducted to detect parathion on the sensors which immobilized AChE by physical adsorption. The results show that it can achieve a better sensitivity than amperometric $I-t$ curve.

Key words enzyme biosensor; screen printed electrode; acetylcholine esterase; organic phosphate pesticide

近年来,用于快速检测有机磷农药残留的电化学传感器引起人们的重视^[1~5]。酶传感器通过结合酶抑制与电化学分析技术,使得检测结果具有较好的可靠性和较高的检测限。与其它分析技术相比,这种检测方法对仪器设备的要求低,操作相对简便。通过采用丝网印刷工艺制备电极^[6],能够进一步降低酶传感器的检测成本,使大规模地生产低成本、小型化的一次性生物传感器成为可能^[7,8]。本研究是根据有机磷农药对乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholine Esterase, AChE) 产生抑制作用的原理,开发基于丝网印刷电极的检测水环境中有机磷农药的酶传感器,实现水环境中有机磷农药的快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料与保存

AChE (Fluka, 01023。配制溶液时,取 5mg

AChE 粉末,5mg 牛血清白蛋白于 1mL 离心管中,加入 500 μ L 超纯水混合均匀;再分装在 50 个 1mL 的离心管中,置于 -20℃ 冰箱中冻存,其酶活检测见 GB/T 5009.199-2003^[9];氯化硫代乙酰胆碱 (Sigma, A5626);牛血清白蛋白 (北京益利);铁氰化钾 (广西西陇);二硫代二硝基苯甲酸 (Fluka, 43760);特丁硫磷 (上海安谱, 45313);对硫磷 (上海安谱, 45607)。

1.2 酶传感器的制备与检测

酶传感器的工作原理是:首先在丝网印刷电极上通过戊二醛交联固定 AChE,催化加入的底物氯化硫代乙酰胆碱 (acetylthiocholine chloride, ATChCl) 发生水解反应;生成的产物巯基胆碱被溶

收稿日期:2005-09-06;修订日期:2005-11-10

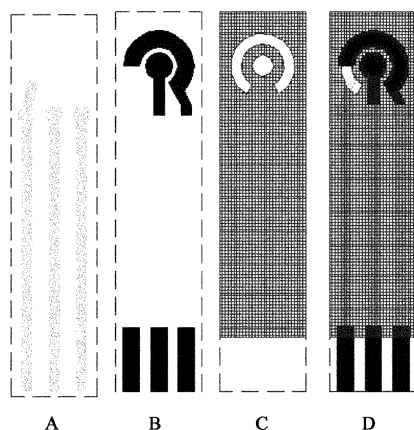
基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA649160)

作者简介:陈向强(1981~),男,硕士研究生,主要研究方向为水污染控制, E-mail: chenxq99@mails.tsinghua.edu.cn

液中的铁氰根离子氧化,同时产生的亚铁氰根离子在一定的工作电位下,在电极表面发生氧化反应,产生氧化电流,从而将化学浓度信号转化为可测量的电信号^[10].

1.2.1 丝网印刷电极的制备

①清洗电极基板(聚对苯二甲酸乙二醇酯,简称聚酯,PET),置于 105 °C 的干燥箱中干燥 15min. ②在 PET 上印刷银浆 (Acheson, ED427SS) 后置于 105 °C 的干燥箱中干燥 15min. ③印刷上碳浆 (JUJO, Jelcon CH-1) 后置于 105 °C 的干燥箱中干燥 15min. ④印刷上绝缘浆 (JUJO, 9000 Series PET INK) 后置于 105 °C 的干燥箱中干燥 5min. ⑤制备好电极放置于 4 °C 冰箱中干燥保存. 丝网印刷电极的制备程序见图 1.



A. 印刷银层;B. 印刷碳层;C. 印刷绝缘层;D. 完整的电极

图1 丝网印刷电极的制备

Fig. 1 Preparation of screen printed electrode

1.2.2 AChE 的固定化

采用戊二醛交联法在丝网印刷电极上固定 AChE. 戊二醛是一种双功能团试剂,它能够使蛋白质分子之间、酶分子与凝胶/聚合物之间交联形成三维网状结构而使蛋白质分子固定化.

1.2.3 酶传感器的检测

首先采用循环伏安法对电极的一致性进行检测.检测程序是:在电极上滴加 5 μ L 0.5 mg/mL 酶溶液、20 μ L 铁氰化钾定标溶液,静置 5min;然后滴加 20 μ L 10 mmol/L ATChCl 溶液,静置 5min 后,立即进行循环伏安检测.

采用时间-电流法对酶传感器检测时的反应条件进行优化.优化的内容包括:酶的载量、交联剂的浓度以及底物的浓度,以便提高电流响应.检测程序是:在制作好的酶传感器上滴加 20 μ L 铁氰化钾定标溶液,静置 5min;再滴加 20 μ L 10 mmol/L ATChCl 溶

液,静置 5min 后,立即进行时间-电流检测.

1.3 有机磷的检测

有机磷通过磷酰基与 AChE 活性中心的丝氨酸羟基作用生成难以水解的磷酰化酶,从而抑制 AChE 水解 ATChCl 的活性^[9,11].通过检测酶传感器在加入有机磷前后反应中产生的电流变化,从而推算出有机磷的浓度^[2,10~14].检测程序是:在制作好的酶传感器上滴加 5 μ L 有机磷溶液,20 μ L 铁氰化钾定标溶液,静置 5min;再滴加 20 μ L 10 mmol/L ATChCl 溶液,静置 5min 后,立即进行时间-电流检测.

2 结果与讨论

2.1 电极的一致性

图 2 是在电极上滴加试剂后,并静置一段时间后检测得到的扫描曲线,可以看出此时的扫描曲线相对稳定,电极上发生的反应接近于可逆的氧化还原反应.通过考察扫描曲线上的还原峰电位 (E_{pc})、还原峰电流 (I_{pc})、氧化峰电位 (E_{pa})、氧化峰电流 (I_{pa})、峰峰电位差 (ΔE_p) 5 个参数来对电极进行一致性研究.表 1 是对峰电位和峰电流进行比较后得到的结果.从相对标准差的计算结果来看,除了还原峰电流的相对标准差为 6.3 % 外,其余参数的相对标准差均在 5 % 以内,说明电极的一致性比较好.

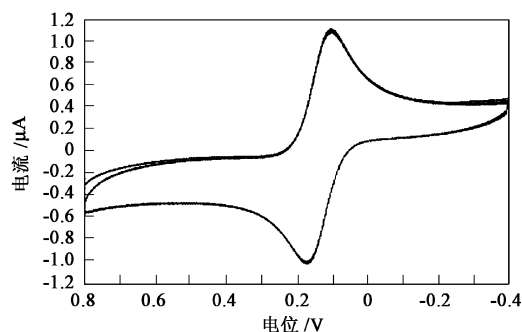


图2 在电极上加入试剂后得到的循环伏安扫描图

Fig. 2 CV scanning after injection of reagent on the electrode

表1 丝网印刷电极的一致性研究

Table 1 Uniformity of electrochemical parameters for screen-printed electrodes by applying cyclic voltammetry

电极	E_{pc}/V	I_{pc}/nA	E_{pa}/V	I_{pa}/nA	$\Delta E_p/V$
1	0.083	2 128	0.182	1 880	0.099
2	0.090	2 083	0.188	1 857	0.098
3	0.087	1 969	0.191	1 714	0.104
4	0.090	2 055	0.188	1 799	0.098
5	0.078	2 162	0.183	1 891	0.105
6	0.097	1 960	0.195	1 709	0.098
7	0.087	2 024	0.188	1 773	0.101
平均值	0.087	2 054	0.188	1 803	0.100
相对标准差	0.063	0.034	0.022	0.039	0.028

2.2 酶传感器检测参数的优化

在一定的范围内,酶传感器上酶载量越大,电流响应越大.图3是对固定化酶中采用的酶浓度进行研究后得到的电流响应图.浓度为0.1 mg/mL AChE产生的电流信号与背景电流相差不大,大约为20~30 nA,而背景电流为5~10 nA.当AChE浓度为0.5 mg/mL时,得到的电流响应较好,为50~60 nA.因此在后续1实验中,固定化实验中所采用的AChE浓度均为0.5 mg/mL.

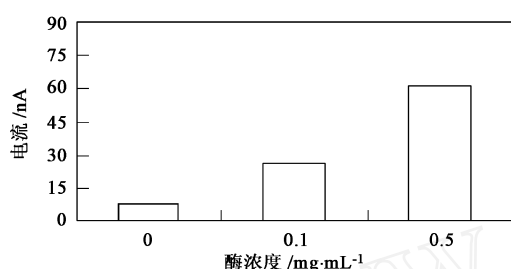


图3 不同AChE浓度得到的电流响应

Fig. 3 Current response of different AChE concentration

图4是对固定化过程中采用的戊二醛浓度进行研究后得到的电流响应图.可以看出戊二醛浓度为0.2%时,固定化效果最好.但是这种交联固定的方法也有局限性,需要在固定化的过程中精确控制酶膜的形成条件,包括环境温度、溶液pH值、离子强度以及反应的时间等因素.而且酶膜形成后,膜的厚度也会对传感器的响应产生影响:酶膜较厚时,扩散阻力增大,电流响应减小,响应时间延长;当戊二醛浓度较低时,固定化的酶量降低;当浓度较低时,又会降低酶活.因此在后续的研究中还应当对这种固定化方法进行改进.

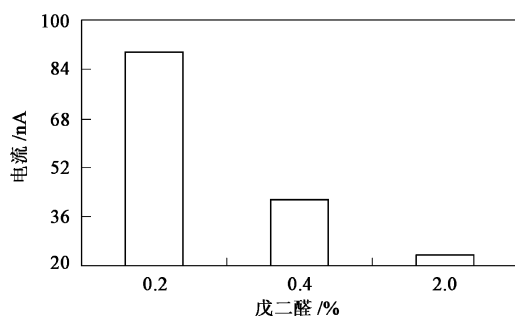


图4 不同戊二醛浓度得到的电流响应

Fig. 4 Current response of different glutaraldehyde concentration

图5是对反应中加入的底物浓度进行研究后得到的电流响应图.可知在底物浓度大于10 mmol/L后,电流响应随底物浓度的升高的变化值就越来越小了.因此在后续的实验研究中,底物的浓度均采用

10 mmol/L.根据Lineweaver-Burk作图法,可以求出酶促反应中的半反应速率 K_m ^[15].在20s,40s,60s时的3个时间点上的半反应速率分别为:4.38 mmol/L,4.60 mmol/L,4.98 mmol/L,相关系数均在0.996以上.

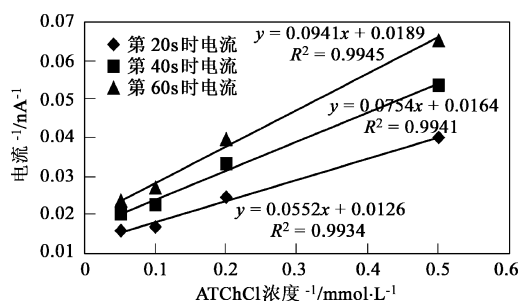


图5 不同ATChCl浓度得到的电流响应

Fig. 5 Current response of different ATChCl concentration

2.3 利用传感器对有机磷农药进行检测

图6是利用上述制备的传感器,采用时间-电流法对特丁硫磷进行检测得到的电流响应图.其中,上面的虚线代表特丁硫磷浓度为0 ng/mL时的电流响应;下面的虚线代表检测时的背景电流.加入的特丁硫磷浓度越大,检测得到的电流响应也越小.其中,1 ng/mL与0 ng/mL的特丁硫磷存在下得到的电流响应相差为21 nA;20s时10 000 ng/mL与1 ng/mL的特丁硫磷存在下得到的电流响应相差为29.1 nA.所得到的检测限可以达到1 ng/mL,线性区间为1~10 000 ng/mL,相关系数为0.974.

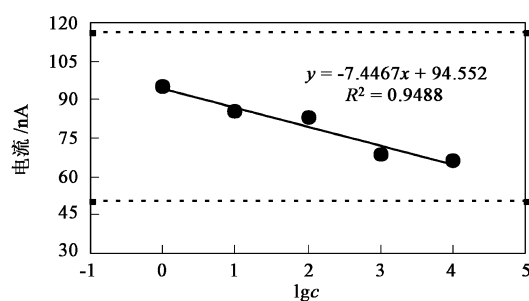


图6 时间-电流法检测特丁硫磷存在下的电流响应

Fig. 6 Current response under the existence of terbufos by using amperometric *I-t* curve

采用同样的方法对另一种有机磷(对硫磷)的检测结果也表明,检测限可以达到1 ng/mL,线性区间为1~10 000 ng/mL,相关系数为0.967,检测结果见图7.

此外,本研究还在电极上通过物理吸附固定酶的情况下,采用循环伏安法对特丁硫磷进行了检测,检测结果见图8.其中,上面的虚线代表特丁硫磷浓度为0 ng/mL时的电流响应;下面的虚线代表检测

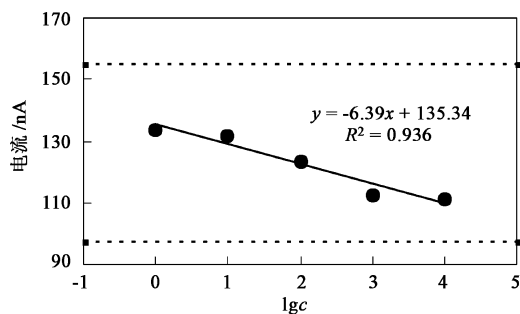


图7 时间-电流法检测对硫磷存在下的电流响应

Fig.7 Current response under the existence of parathion by using amperometric $I-t$ curve

时的背景电流.可以看出,与时间-电流法相比,所得到的电流响应更大,不同浓度之间的电流响应差值也更大.因此,在后续研究中应当对交联剂戊二醛的浓度继续进行优化,并采用循环伏安法进行检测,以便获得更好的检测结果.

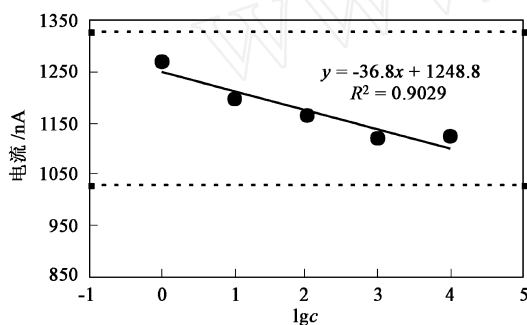


图8 循环伏安法检测对硫磷存在下的电流响应

Fig.8 Current response under the existence of terbufos by using cyclic voltammetry

2.4 讨论

实验结果表明使用AChE酶传感器可以实现对有机磷的检测,具有一定的可行性.利用乙酰胆碱酯酶进行检测的主要作用机制是利用乙酰胆碱酯酶受到有机磷的抑制作用前后的酶催化能力的变化来实现检测的.通过与电化学分析方法相结合,实现了快速、准确检测的目的.当然,本研究目前还仅是一个开始,在酶电极的制备工艺和性能表现以及酶传感器的检测工艺等问题上还有待进一步深入研究.

3 结论

(1) 利用丝网印刷技术制作厚膜型电极,采用循环伏安法对电极所做的检测结果表明电极彼此间的差异在10%以内,具有较好的一致性;通过交联法把乙酰胆碱酯酶固定在电极上,在此基础上建立了酶传感器的检测方法,优化传感器的工作参数为:酶

浓度0.5 mg/mL,戊二醛浓度为0.2%,底物浓度为10 mmol/L为最佳工作条件,传感器的响应最好.

(2) 在交联固定酶的情况下,采用时间-电流法对2种有机磷(特丁硫磷、对硫磷)进行了检测,检测限可以达到1 ng/mL,线性区间1~10 000 ng/mL,可满足水环境中的检测要求.此外,还在物理吸附固定酶的情况下,采用循环伏安法对特丁硫磷进行了检测,检测结果表明采用循环伏安检测得到的灵敏度要比采用时间-电流法的灵敏度要高.

参考文献:

- [1] Engblom S. The phosphate sensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, 13: 981~994.
- [2] Nunesa G, Dalb P, Yamanakac H, *et al.* Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 362: 59~68.
- [3] Sotiropoulou S, Chaniotakis N. Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530: 199~204.
- [4] Devic E, Li Dunhai, Dauta A, *et al.* Detection of anatoxin-a(s) in environmental samples of cyanobacteria by using a biosensor with engineered acetylcholinesterases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 8: 4102~4106.
- [5] 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, 67: 92~94.
- [6] 熊祥玉.丝网印刷与微电子技术[J]. *丝网印刷*, 2000, 1: 12~15.
- [7] Gogol E, Evtugyn G, Marty J, *et al.* Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors[J]. *Talanta*, 2000, 53: 379~389.
- [8] Sirvent M, Merkoci A, Alegret S. Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 442: 35~44.
- [9] GB/T 5009.199-2003,蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量的快速检测方法[S].
- [10] Tova, Neufeld, Eshkenazi I, *et al.* A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, 15: 323~329.
- [11] 何奔,王琦琛,虞骥.快速检测毒死蜱残留量的酶膜生物传感器研究[J]. *上海环境科学*, 2003, 22(10): 687~690.
- [12] Kuly J, D'Costa E J. Electrochemical biosensors for pesticide determination in food samples[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1991, 252: 109.
- [13] Martorell D, Cespedes F, Martinez-Fabregas E, *et al.* Amperometric determination of pesticides using a biosensors based on a polishable graphite-epoxy biocomposite[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1994, 290: 343.
- [14] Martorell D, Cespedes F, Martinez-Fabregas E, *et al.* Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on a polishable, 7, 7, 8, 8-tetracyanoquinodimethane-modified, graphite-epoxy biocomposite[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 337: 305~313.
- [15] 王希成.生物化学[M].北京:清华大学出版社, 2001. 67~75.