

# 纳米金修饰乙酰胆碱酯酶生物传感器 快速检测农药马拉松研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2017.01.009

东红明 刘 媛  
刘可可 邓 燕

湖南工业大学  
绿色包装与生物纳米技术  
应用湖南省重点实验室  
湖南 株洲 412007

**摘要:**以纳米金和乙酰胆碱酯酶修饰自制的纳米多孔类碳糊电极(nano-PPCPE),制备了一种新型纳米多孔乙酰胆碱酯酶(AChE)生物电化学传感器。并根据有机磷酸类农药对AChE的特征性抑制机理,将该传感器应用于农药马拉松的检测中。实验结果表明:加入金纳米粒子做信号放大元后,传感器的峰电流大幅度增加;马拉松检测的最佳温育时间为14 min;以制备的AChE传感器检测马拉松农药,当马拉松的质量浓度在 $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-13}$  g/mL范围内时,酶的抑制率与其浓度的负对数值呈现出良好的线性关系,其线性方程为 $I=19.43C-181.4$ ,  $C=-\lg(\rho/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}))$ ,线性相关系数 $R=0.996$ ,最低检测限为 $5.0 \times 10^{-14}$  g/mL。

**关键词:** 纳米金; 乙酰胆碱酯酶; 生物传感器; 马拉松; 检测限

**中图分类号:** TP212.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-7100(2017)01-0053-06

## 1 背景知识

有机磷类农药是一种高效的杀虫剂,因其价格低廉而被广泛应用于农作物的虫害治理中<sup>[1-3]</sup>。而这类农药的乱用、滥用,会造成农作物农药残留量超标,当这类农作物被人类摄取或长期与之接触时,有机磷类农药可通过抑制胆碱酯酶的活性而引发一系列的疾病,严重时可导致死亡。因此,加强对农作物中有机磷类农药残留物的检测具有十分重要的意义。

传统的对于农作物中有机磷类农药残留物的检测方法,主要包括气相色谱法<sup>[4-5]</sup>、高效液相色谱法<sup>[6]</sup>、气相色谱质谱联用法<sup>[7-8]</sup>以及液相-质谱联用法<sup>[9]</sup>。

这些方法虽然都可以检测农作物中农药残留物的含量,但不能实现实时、快速、现场农药残留量的检测,同时存在费时、成本高等缺点。因此,寻求快速、高效的有机磷类农药残留量检测方法,已成为当前电化学传感器领域的研究热点。

已有研究表明,有机磷农药检测的最适底物为乙酰胆碱酯酶(acetyl cholinesterase, AChE),当AChE固定在基体电极表面时,会与底物碘化硫代乙酰胆碱(S-acetylthiocholine iodide, ATChI)发生反应,生成具有电化学活性的硫代胆碱,产生不可逆的氧化峰。而当加入有机磷类农药使AChE的活性受到抑制时,硫代胆碱的氧化电流值会随之减少,乙酰胆碱酯酶传感器通过检测硫代胆碱的氧化电流变化来

收稿日期: 2016-06-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61471168)

作者简介: 东红明(1990-),女,湖北恩施人,湖南工业大学硕士生,主要研究方向为生物传感器与分子诊断,  
E-mail: 1215957570@qq.com

通信作者: 邓 燕(1971-),女,湖南武冈人,湖南工业大学教授,主要从事生物传感器与生物分析方面的研究,  
E-mail: hndengyan@126.com

指示酶的活性, 将峰电流变化值换算成酶的抑制率, 进而完成有机磷农药的检测<sup>[10]</sup>。有机磷农药检测的原理如图 1 所示。

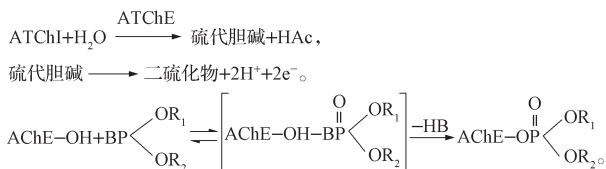


图 1 检测有机磷农药的反应机理图

Fig. 1 The reaction mechanism diagram of detecting Organophosphorus pesticide

当 AChE 的活性受到有机磷类农药抑制时, 硫代胆碱的氧化电流会相应地减少, 且电流减少量与农药的浓度成正相关。AChE 与有机磷类农药可发生不可逆的生物化学反应而使其活性降低, 因而被广泛应用于有机磷类农药残留的分析与检测中<sup>[11-13]</sup>。本研究拟以纳米金为电流信号放大元和乙酰胆碱酯酶修饰自制的纳米多孔碳糊电极 (nano-porous pseudo-carbon paste electrode, nano-PPCPE), 构建一种新型乙酰胆碱酯酶电化学生物传感器, 以期实现有机磷类农药残留的快速、实时检测, 并为其他有机磷类农药残留量的检测提供理论参考。

## 2 实验部分

### 2.1 主要试剂

质量浓度为 500 mg/mL 的马拉松、90% 脱乙酰的壳聚糖, 均为阿拉丁试剂 (上海) 有限公司生产;

碘化乙酰硫代胆碱 ATChI (生化试剂), 体积分数为 5% 的 Nafion- 甲醇溶液, 均为国药集团化学试剂有限公司生产;

AChE (500 U/mg)、HAuCl<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 均为 Sigma 公司生产;

其他试剂均为实验室常规试剂, 且本实验所用试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水, 所有沉积溶液在插入电极前均通入 N<sub>2</sub> 以去除 O<sub>2</sub>。

### 2.2 实验仪器

电化学工作站, PGSTAT302N 型, 瑞士万通中国有限公司生产;

232 型饱和甘汞电极、0.5 mm × 37.0 mm 的铂丝电极, 均为武汉高仕睿联科技有限公司生产;

超纯水仪, RM-220 型, Aquapro 生产。

### 2.3 纳米多孔乙酰胆碱酯酶生物电化学传感器的制备

首先, 按照文献 [14] 中提供的方法自制 Nano-PPCPE, 参照 G. Frens 的方法<sup>[15]</sup> 制备金纳米粒子 (gold nanoparticles, GNPs), 所制得的 GNPs 的直径为 14 nm 左右;

然后, 将 3.0 μL 质量分数为 0.5% 的壳聚糖 (chitosan, CS) 溶液滴涂于自制的 nano-PPCPE 上, 晾干;

其次, 将 4.0 μL GNPs (金粒子体积分数为 0.01%) 滴涂于 CS 涂层上, 晾干;

接下来, 将 4.0 μL AChE 酶溶液滴涂于 GNPs 上, 晾干;

最后, 将 3.0 μL 体积分数为 5% 的 Nafion- 甲醇溶液滴涂于 AChE 酶上, 室温下自然晾干。

经如上操作, 将各组分层组装, 依次固定于自制的 nano-PPCPE 上, 从而制得新型纳米多孔乙酰胆碱酯酶生物电化学传感器, 即 NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE 传感器。

### 2.4 有机磷类农药马拉松的检测

以制备好的 NF/AChE/GNPs/CS 修饰的 nano-PPCPE 为工作电极、铂丝电极为对电极、饱和甘汞电极为参比电极, 构建三电极系统, 并将该三电极系统放入含有 10 mL 浓度为 2.0 × 10<sup>-4</sup> mol/L 的 ATChI 以及浓度为 0.1 mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液 (phosphate buffer, PB) 的电解液中, 并以 0.1 V/s 的扫描速度, 运用循环伏安法 (cyclic voltammetry, CV) 以及线性扫描法 (linear sweep voltammetry, LSV) 测定其初始电流 *i*<sub>1</sub>。然后, 将该 AChE 纳米多孔生物电化学传感器从电解液中取出, 用浓度为 0.1 mol/L、pH 值为 7.4 的 PB 缓冲液冲洗干净, 于室温条件下自然晾干。晾干后, 将该修饰电极转入含有一定浓度的农药马拉松溶液中, 缓慢搅拌下使 AChE 与马拉松培育一定时间, 然后取出传感器, 用浓度为 0.1 mol/L、pH 值为 7.4 的 PB 缓冲液冲洗干净, 并于室温条件下自然晾干。将再次晾干后的传感器放回原电解池中, 采用 LSV 法测定 AChE 被抑制后上述传感器对应的稳态峰电流 *i*<sub>2</sub>; 参照初始电流求出被不同浓度农药马拉松抑制后测定的相对应的传感器峰电流减少值, 然后根据下面的公式求得传感器上 AChE 的抑制率 *I*<sub>inhibition</sub>:

$$I_{\text{inhibition}} = [(i_2 - i_1) / i_1] \times 100\%$$

### 3 结果与讨论

#### 3.1 AChE 纳米多孔生物电化学传感器的电化学行为

当分别以 NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE 和 NF/AChE/CS/nano-PPCPE 为工作电极, 构建三电极系统, 并分别以浓度为 0.1 mol/L、pH 值为 7.4 的 PB 空白缓冲溶液和含有  $2 \times 10^{-4}$  mol/L ATChI 的 0.1 mol/L、pH 值为 7.4 的 PB 缓冲溶液为底液, 以 0.1 V/s 的扫描速度, 利用循环伏安法进行扫描, 所得 CV 图像如图 2 所示。

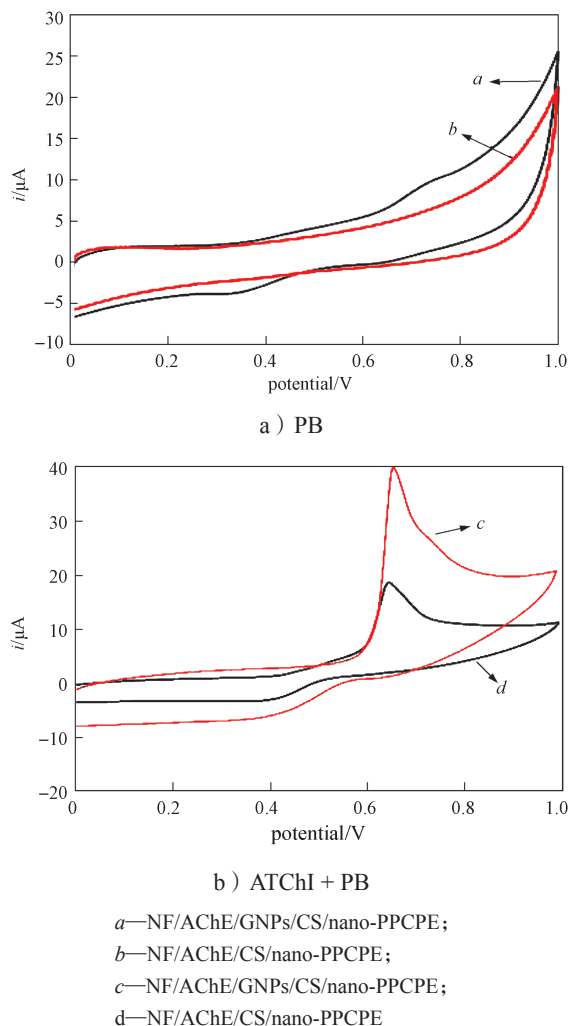


图 2 各工作电极在空白缓冲液中的 CV 图

Fig. 2 CV graph of different modified electrodes in blank buffer

如图 2a 所示, 在 PB 空白缓冲溶液中, 选用的两种修饰电极均未观察到明显的氧化还原峰, 说明该电位区间内不存在电化学活性物质。而如图 2b 所示, 在含有碘化乙酰硫代胆碱的 PB 缓冲溶液中, 两种修

饰碳糊电极的循环伏安图中均出现了一个不可逆的氧化峰。

由图 2b 还可看出, 以纳米多孔类碳糊电极为基体电极构建的纳米金修饰的 AChE 纳米多孔生物电化学传感器 (NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE, 见曲线 c) 的电流信号明显强于没有纳米金的 AChE 生物电化学传感器 (NF/AChE/CS/nano-PPCPE, 见曲线 d) 的, 这一结果说明, 加入金纳米粒子做信号放大元后, 传感器的峰电流大幅度增加, 从而进一步证明金纳米粒子可以加快电子在电极间的传递。

#### 3.2 马拉松与 AChE 反应的最佳时间选择

因有机磷类农药与乙酰胆碱酯酶的结合需要一定的时间, 而乙酰胆碱酯酶的抑制程度又会直接影响 AChE 纳米多孔传感器的电化学性能。因此, 为了测定马拉松抑制 AChE 活性的准确性, 必须选择合适的培育时间。更改马拉松与 AChE 的培育时间, 重复 2.4 中的操作, 分别获得对应的培育时间下 AChE 的抑制率, 然后以 AChE 的抑制率对培育时间作图, 所得结果如图 3 所示。

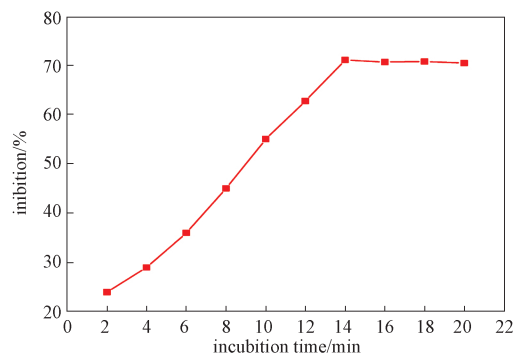


图 3 NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE 在马拉松中的培育时间对 AChE 抑制率的影响曲线

Fig. 3 Effect of the incubation time of NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE in marathron on the inhibition rate

根据图 3 所示 NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE 在马拉松溶液中的培育时间对 AChE 抑制率的关系曲线可以看出, 随着培育时间的延长, 乙酰胆碱酯酶受到抑制的程度逐渐增大。当培育时间为 14 min 后, 乙酰胆碱酯酶的抑制率逐渐趋于稳定, 此时马拉松与乙酰胆碱酯酶的酶活性位点结合处于一动态平衡。因此, 取 14 min 作为马拉松检测的最佳温育时间。

#### 3.3 有机磷酯类农药马拉松的检测

马拉松培育 14 min 后, 将制备的传感器分别以

CV法和LSV法检测不同质量浓度马拉松溶液的电  
流响应值, 所得结果如图4和5所示。

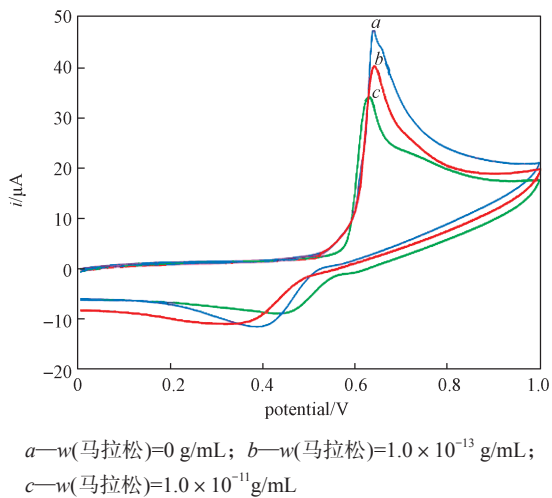
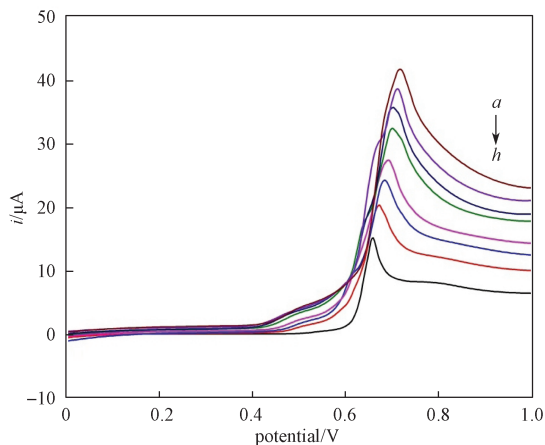


图4 NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE 经不同浓度  
马拉松抑制后的 CV 图

Fig. 4 CV of NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE after  
inhibition with different concentration of maratho



a— $w(\text{马拉松})=1.0 \times 10^{-13} \text{ g/mL}$ ;  
b— $w(\text{马拉松})=5.0 \times 10^{-13} \text{ g/mL}$ ;  
c— $w(\text{马拉松})=1.0 \times 10^{-12} \text{ g/mL}$ ;  
d— $w(\text{马拉松})=5.0 \times 10^{-12} \text{ g/mL}$ ;  
e— $w(\text{马拉松})=1.0 \times 10^{-11} \text{ g/mL}$ ;  
f— $w(\text{马拉松})=5.0 \times 10^{-11} \text{ g/mL}$ ;  
g— $w(\text{马拉松})=1.0 \times 10^{-10} \text{ g/mL}$ ;  
h— $w(\text{马拉松})=5.0 \times 10^{-10} \text{ g/mL}$

图5 NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE 经不同浓度  
马拉松抑制后的 LSV 图

Fig. 5 LSV of NF/AChE/GNPs/CS/nano-PPCPE after  
inhibition with different concentration of maratho

由图4所示 CV 法测定不同浓度的马拉松丙酮溶  
液下的电流响应曲线可以看出, 峰电流的强度随着马

拉松浓度的增加而减少, 但峰电位基本稳定, 这表明  
峰电流与马拉松浓度呈负相关。

由图5所示 LSV 法测定不同马拉松丙酮溶液下  
的电流响应曲线可以看出, 峰电流的强度随马拉松浓  
度的增加而减少, 但峰电位基本稳定, 这表明峰电  
流与马拉松浓度呈负相关。

将不同浓度下对应的电流值绘制成曲线, 得到的  
结果如图6所示, 其中横座标为  $C=-\lg(\rho/(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}))$ ,  
 $\rho$  为马拉松质量浓度。

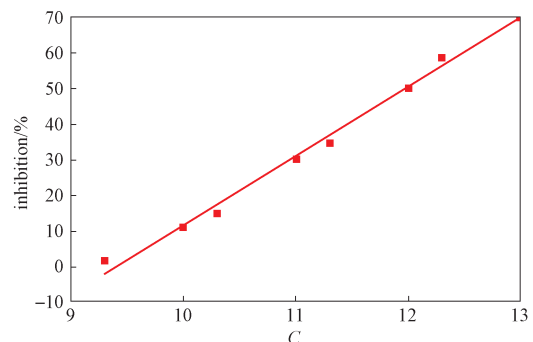


图6 马拉松浓度的负对数值与抑制率间的关系图  
Fig. 6 The relationship between the concentration of  
marathon and inhibition

从图6中可以看出, 酶的抑制率随着马拉松浓  
度负对数值的增加而增大, 这表明酶的抑制率与马  
拉松的浓度呈负相关。且当马拉松浓度在  $1.0 \times 10^{-10}$ ~  
 $1.0 \times 10^{-13} \text{ g/mL}$  范围内时, 酶的抑制率  $I$  与其浓度  $\rho$   
的负对数值呈现出良好的线性关系。其线性方程为:  
 $I=19.43C-181.4$ ,  $C=-\lg(\rho/(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}))$ , 线性相关系数  
 $R$  为 0.996, 检测限为  $5.0 \times 10^{-14} \text{ g/mL}$ 。

## 4 结论

本研究以纳米金和乙酰胆碱酯酶修饰自制的纳  
米多孔类碳糊电极, 构建一种新型的纳米乙酰胆碱酯  
酶电化学传感器, 以实现快速、实时检测农药马  
拉松。实验结果表明:

1) 各工作电极在空白缓冲液中的 CV 图显示,  
加入金纳米粒子做信号放大元后, 传感器的峰电流会  
大幅度增加, 从而进一步证明金纳米粒子可以加快电  
子在电极间的传递。

2) 马拉松溶液的培育时间对电流响应的关系结  
果表明, 马拉松检测的最佳温育时间为 14 min。

3) 以制备的纳米乙酰胆碱酯酶电化学传感器  
检测马拉松农药时, CV 法和 LSV 法测定的结果均表

明峰电流与马拉松浓度呈负相关; 酶的抑制率与马拉松质量浓度的负对数呈现出良好的线性关系, 且其线性方程为  $I=19.43C-181.4$ ,  $C=-\lg(\rho/(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}))$ , 线性相关系数  $R=0.996$ 。且其检测限较低, 为  $5.0 \times 10^{-14} \text{ g/mL}$ ; 检测线性范围较宽, 为  $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-13} \text{ g/mL}$ 。

以上结果为进一步快速、实时、现场检测有机磷类农药残留提供了新的思路与方法。

#### 参考文献:

- [1] QIU Junlang, CHEN Guosheng, ZHOU Hong, et al. In Vivo Tracing of Organophosphorus Pesticides in Cabbage (*Brassica Parachinensis*) and Aloe (*Barbadensis*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 550(15): 1134-1140.
- [2] 王迪, 刘潇威, 刘岩, 等. 蔬菜、水果中12种限量有机磷农药残留量测定方法 [J]. *分析试验室*, 2010, 29(7): 37-41.  
WANG Di, LIU Xiaowei, LIU Yan, et al. Multiresidue Determination of Organophosphorus Pesticides in Vegetables and Fruits [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2010, 29(7): 37-41.
- [3] BLANKSON G K, OSEI-FOSU P, ADEENDZE E A, et al. Contamination Levels of Organophosphorus and Synthetic Pyrethroid Pesticides in Vegetables Marketed in Accra, Ghana [J]. *Food Control*, 2016, 68: 174-180.
- [4] SALEMI A, RASOOLZADEH R, NEJAD M M, et al. Ultrasonic Assisted Headspace Single Drop Micro-Extraction and Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detector for Determination of Organophosphorus Pesticides in Soil [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 769(26): 121-126.
- [5] GONZÁLEZ-CURBELO MÁ, HERNÁNDEZBORGES J, BORGES-MIQUEL T M, et al. Determination of Organophosphorus Pesticides and Metabolites in Cereal-Based Baby Foods and Wheat Flour by Means of Ultrasound-Assisted Extraction and Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction Prior to Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1313(25): 166-174.
- [6] HEIDARI H, RAZMI H. Multi-Response Optimization of Magnetic Solid Phase Extraction Based on Carbon Coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  Nanoparticles Using Desirability Function Approach for the Determination of the Organophosphorus Pesticides in Aquatic Samples by HPLC-UV [J]. *Talanta*, 2012, 99(18): 13-21.
- [7] NAN Jingxi, WANG Juan, PIAO Xiangfan, et al. Novel and Rapid Method for Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Edible Fungus Using Direct Gas Purge Microsyringe Extraction Coupled On-Line with Gas Chromatography Mass Spectrometry [J]. *Talanta*, 2015, 142(1): 64-71.
- [8] MERDASSA Y, LIU J F, MEGERSA N. Development of a One-Step Microwave-Assisted Extraction Method for Simultaneous Determination of Organophosphorus Pesticides and Fungicides in Soils by Gas Chromatography Mass Spectrometry [J]. *Talanta*, 2013, 114(10): 227-234.
- [9] XU Zhenlin, DENG Hao, DENG Xingfei, et al. Monitoring of Organophosphorus Pesticides in Vegetables Using Monoclonal Antibody-Based Direct Competitive ELISA Followed by HPLC-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(4): 1569-1576.
- [10] IVANOV A N, YOUNUSOV R R, EVTUGYN G A, et al. Acetylcholinesterase Biosensor Based on Single-Walled Carbon Nanotubes-Co Phthalocyanine for Organophosphorus Pesticides Detection [J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 216-221.
- [11] BAKAS I, HAYAT A, PILETSKY S, et al. Electrochemical Impedimetric Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymers/Sol-Gel Chemistry for Methidathion Organophosphorous Insecticide Recognition [J]. *Talanta*, 2014, 130(5): 294-298.
- [12] ZHAO Haiyan, JI Xueping, WANG Beibei, et al. An Ultra-Sensitive Acetylcholinesterase Biosensor Based on Reduced Graphene Oxide-Au Nanoparticles- $\beta$ -Cyclodextrin/Prussian Blue-Chitosan Nanocomposites for Organophosphorus Pesticides Detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 65(15): 23-30.
- [13] YU Guangxia, WU Weixiang, ZHAO Qiang, et al. Efficient Immobilization of Acetylcholinesterase onto Amino Functionalized Carbon Nanotubes for the Fabrication of High Sensitive Organophosphorus Pesticides Biosensors [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68(15): 288-294.
- [14] 刘可可, 刘媛, 东红明, 等. 纳米多孔类碳糊电极的制备工艺改进及其电化学行为 [J]. *湖南工业大学学*

报, 2015, 29(6): 80-84.  
LIU Keke, LIU Yuan, DONG Hongming, et al.  
Improvement of Nano-Porous Carbon Paste Electrode  
Preparation and Its Electrochemical Behavior[J]. Journal  
of Hunan University of Technology, 2015, 29(6): 80-

84.

[15] FRENS G. Controlled Nucleation for the Regulation of  
the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions[J].  
Nature, 1972, 241: 20-22.

## Study of an Acetylcholinesterase Biosensor for Rapid Detection of Marathon Based on Gold Nanoparticles

DONG Hongming, LIU Yuan, LIU Keke, DENG Yan

(Hunan Key Laboratory of Green Packaging and Application of Biological Nanotechnology,  
Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

**Abstract:** A new nano porous acetylcholinesterase (AChE) bioelectrochemical sensor was constructed based on gold nanoparticles (GNPs) and AChE modified self-made nano porous pseudo carbon paste electrodes (nano-PPCPE). The sensor was applied in the detection of marathon based on the representative inhibition mechanism between organophosphorus pesticide and AChE. The experimental results showed that the peak current of the sensor dramatically increased after adding gold nanoparticles as signal amplification. The best incubation time for marathon test was 14 min. The prepared AChE sensor was used to detect marathon. When the concentration of marathon was within the range from  $1.0 \times 10^{-10}$  to  $1.0 \times 10^{-13}$  g/mL, there was a good linear relationship between enzyme inhibition and the negative logarithmic of enzyme's concentration with the linear equation being  $I=19.43C-181.4$ ,  $C=-\lg(\rho/(g \cdot mL^{-1}))$ , the linear correlation coefficient being  $R=0.996$ , and the detection limit of  $5.0 \times 10^{-14}$  g/mL.

**Keywords:** gold nanoparticles(GNPs); acetylcholinesterase; biosensor; marathon; limit of detection