

# 基于石墨烯的丁酰胆碱酯酶传感器法 快速测定水产品中的孔雀石绿

郝雅茹<sup>1</sup>, 李亭<sup>1</sup>, 张薇<sup>2</sup>, 李书国<sup>1</sup>

(1. 河北科技大学生工学院, 河北石家庄 050018) (2. 河北省食品检验研究院, 河北石家庄 050051)

**摘要:** 本文以壳聚糖 (Chitosan) 和石墨烯 GS 为复合修饰材料, 通过交联技术固定化丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 制备了 BuChE/CS/GS/GCE 纳米酶传感器, 建立了一种快速而灵敏测定水产品中孔雀石绿 (Malachite Green, MG) 的方法。研究了 BuChE/CS/GS/GCE 纳米酶传感器修饰材料、电解质、固定酶量、抑制时间等对酶传感器响应电流的影响, 优化了酶传感器法测定 MG 的试验条件, 结果如下: 修饰材料 CS 与 GS 之比为 1:2, 0.10 mol/L 的 PBS 为电解质、pH 7、抑制时间为 11 min、酶活是 4.0 U/mL。在此条件下, 该酶传感器的响应电流与电解质溶液中 MG 的浓度在  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.1 \times 10^{-6}$  mol/L 范围内成线性关系 ( $I_p = -6.97C_{MG} + 22.81$ ,  $R^2 = 0.9885$ ), 最低检测限为  $2.80 \times 10^{-8}$  mol/L (S/N=3), 加标回收率在 96.36%~99.78%。该方法用于水产品中 MG 的测定具有简捷、灵敏度高、选择性好、稳定性好、重复性好等优点, 用于水产品中孔雀石绿的快速检测是可行的。

**关键词:** 孔雀石绿; 食品安全; 石墨烯; 酶传感器; 水产品; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2020)12-267-273

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0564

## Preparation of Graphene-based Butyrylcholinesterase Biosensors for the Rapid Determination of Malachite Green in Sea Foods

HAO Ya-ru<sup>1</sup>, LI Ting<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, LI Shu-guo<sup>1</sup>

(1. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

(2. Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050051, China)

**Abstract:** Graphene-based butyrylcholinesterase biosensors were prepared utilizing chitosan (CS) and graphene nanosheets (GS) composites to immobilized butyrylcholinesterase (BuChE) on the glass carbon electrode by crosslinking technology, the rapid and sensitive method for the determination of malachite Green (MG) in sea foods was developed. Effects of biosensor modified materials, electrolyte solution, enzyme activity and inhibition time on response current of enzyme biosensor were investigated. The optimum analytical parameters for determination of Malachite Green were determined as follows: the ratio of CS to GS was 1:2, the electrolyte solution was 0.1 mol/L PBS, the pH was 7, the inhibition time was 11 min, and the enzyme activity was 4.0 U/mL. Under optimum conditions, the response currents of the enzyme biosensor had a good linear relationship with MG concentration with a detection range from  $1.00 \times 10^{-7}$  mol/L to  $1.10 \times 10^{-6}$  mol/L. The linear equation was  $I_p = -6.97C_{MG} + 22.805$  ( $R^2 = 0.9885$ ), with the limit of detection (LOD) as  $2.80 \times 10^{-8}$  mol/L (S/N=3). The addition standard recovery of the developed method was 96.36% to 99.78%. The developed method is simple, rapid and sensitive with good selectivity and excellent repeatability, which is practicable for rapid determination of MG or LMG in sea foods.

**Key words:** malachite green; food safety; graphene; enzyme biosensor; aquatic product; rapid determination

引文格式:

郝雅茹, 李亭, 张薇, 等. 基于石墨烯的丁酰胆碱酯酶传感器法快速测定水产品中的孔雀石绿[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 267-273

HAO Ya-ru, LI Ting, ZHANG Wei, et al. Preparation of graphene-based butyrylcholinesterase biosensors for the rapid determination of malachite green in sea foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 267-273

收稿日期: 2020-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20876165), 河北省市场监督管理局科技计划重点项目 (2020ZD15)

作者简介: 郝雅茹 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工中有害物质快速检测与安全控制技术

通讯作者: 李书国 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全控制及快速检测技术

孔雀石绿 (malachite green, MG) 是水产养殖中禁用的代表性物质的一种, 隐孔雀石绿 (leucomalachite green, LMG) 是 MG 进入人类或动物机体后通过生物转化生成脂溶性的物质, 具有致癌、致畸、致突变等危害, 所以国际癌症研究中心将其列为致癌物<sup>[1]</sup>, 因此世界各国明确禁用 MG, 对水产品中 MG 及其代谢产物 LMG 的残留均有严格明确的限量标准<sup>[2]</sup>。2002 年 5 月我国将其列为水产养殖中的禁用药物。因此研究开发 MG 及其代谢产物 LMG 残留的快速、灵敏检测方法, 对保障水产品的质量安全具有重要意义。

目前, 国内外 MG 以及 LMG 的残留检测方法以仪器检测方法和免疫方法为主, 应用最广泛的是高效液相色谱 (HPLC)、高效液相色谱—串联质谱 (HPLC-MS), 该类方法检测限低、准确度高, 但因其设备昂贵、对检测人员技术要求高、耗时长等特点并不适用于现场大批量快速检测<sup>[3-10]</sup>。免疫方法应用最多的是酶联免疫吸附法, 此类方法特异性强, 样本容量大但存在假阳性几率问题, 还需进一步测定<sup>[11-15]</sup>。而电化学方法灵敏度高、速度快、样品前处理简单等特点, 在食品安全领域近几年来发展迅速。Ana M S 等用 Nafion/CeO<sub>2</sub> 和 1.0% SDS 阴离子表面活性剂修饰玻碳电极, 采用差分脉冲测定水样中的 MG, 检测限为  $1.03 \times 10^{-6}$  mol/L<sup>[16]</sup>。Rahman M 选择浓度为  $4 \times 10^{-5}$  mol/L CPB 阳离子表面活性剂添加在标准溶液中, 用 MWCNTs 水溶液修饰电极来测定水产品中的 MG, 检测限为  $2.0 \times 10^{-7}$  mol/L<sup>[17]</sup>。酶传感器尤其是基于胆碱酯酶抑制型传感器近年来被广泛应用于检测季铵盐类化合物、有机磷农药残留的检测、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、西维因、克百威、抗胆碱酯酶药物等物质<sup>[18-25]</sup>, 而利用酶传感器用于快速检测 MG, 目前国内还未曾有过相关报道。

本文以 Chitosan (CS) 和 Graphene (GS) 为复合修饰材料, 以交联技术固定化 BuChE 酶制备 BuChE/CS/GS/GCE 纳米酶传感器, 进而建立一种快速灵敏测定水产品中的孔雀石绿的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

孔雀石绿 (>98%)、隐孔雀石绿 (>98%), 山东西亚化学股份有限公司; S-碘化丁酰硫代胆碱 (BTCi)、丁酰胆碱酯酶 (BuChE), 上海源叶生物科技有限公司; 壳聚糖 (Chitosan, CS)、磷酸缓冲溶液 (0.01 mol/L PBS), 北京索莱宝生物科技有限公司;

石墨烯 (Graphene, GS), 北京德科岛金科技有限公司; 50%戊二醛, 天津市大茂化学试剂厂; 对甲苯磺酸、盐酸羟胺、乙醇、重铬酸钾均为分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司; 红星斑鱼, 购自石家庄市某便民市场; 试验用水均为去离子水。

### 1.2 仪器与设备

LK98B II 型微机电化学分析系统, 天津兰力科化学电子技术有限公司; 三电极系统、电解杯, 上海 CHI 仪器公司; FA 2204 型电子分析天平, 上海菁海仪器有限公司; KQ 2200 型超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司; GZX-9070MBE 型电热鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 电极预处理以及酶电极制备

将玻碳电极 (直径 3 mm) 用 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粉末 (粒径 0.05 μm) 打磨抛光成镜面, 然后再依次在 50%硝酸、无水乙醇、去离子水中分别清洗 3 min, 然后玻碳电极用氮气吹干待用。

准确称量 0.02 g GS 于 10 mL N,N-二甲基甲酰胺溶液中超声处理 10 min 制得均匀分散的 0.02 mg/mL 的 GS 悬浊液。准确称量 30 mg CS 溶于 20 mL 的 1.0% 冰醋酸超声处理 10 min 制得 1.5 mg/mL CS 悬浊液。按照 CS:GS=1:2、1:3、1:1、2:1、3:1 体积比制得不同配比的混合修饰液, 超声处理 20 min, 取上述混合修饰液 5.0 μL 于干净的玻碳电极表面, 在红外干燥后得 CS/GS/GCE 修饰电极, 于 4 °C 左右冷藏备用。

取 5 mL 的 50%戊二醛溶液于 95 mL 的 PBS 溶液中得 2.5%戊二醛溶液。准确称量 7.143 mg BuChE 于 10 mL 2.5%戊二醛溶液得 8 U/mL 的 BuChE 酶溶液。准确称量 0.5 g 牛血清蛋白 (BSA) 于 50 mL 磷酸缓冲溶液得 1.0% BSA 封闭液。取 5 μL BuChE 溶液滴涂于 CS/GS/GCE 修饰电极表面 39 °C 晾干, 最后用 1.0% 的牛血清蛋白液封闭, 制得 BuChE/CS/GS/GCE 酶修饰电极, 于 4 °C 左右贮存备用。

#### 1.3.2 溶液的制备

BTCi 底物溶液的制备: 准确称量 0.0388 g BTCi 用 PBS 溶解、定容于 100 mL 容量瓶中得 1.2 mol/L BTCi 底物溶液, 于 4 °C 左右储存备用。

BuChE 酶溶液的制备: 准确称量 7.143 mg BuChE 用 2.5%戊二醛溶解、定容于 10 mL 容量瓶中得 8.0 U/mL 的酶溶液, 并以此为原液依次稀释为 6.0 U/mL、4.0 U/mL、2.0 U/mL、1.0 U/mL, 于 4 °C 左右储存备用。

MG 标准溶液的制备: 准确称量 92.70 mg MG, 用 1.2 mol/L BTCi 底物溶液溶解、定容与 1000 mL 容量瓶中得到  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L MG 标准溶液, 并以此为原液依次稀释为  $1.1 \times 10^{-6}$ 、 $0.9 \times 10^{-6}$ 、 $0.7 \times 10^{-6}$ 、 $0.5 \times 10^{-6}$ 、 $0.3 \times 10^{-6}$ 、 $0.1 \times 10^{-6}$  mol/L 梯度浓度的溶液, 于 4 °C 左右储存备用。

### 1.3.3 酶传感器法测定 MG

电化学分析方法测定均采用三电极系统, 玻碳电极或修饰电极为工作电极、Ag/AgCl 为参比电极、铂丝为辅助电极。以 1.2 mol/L BTCi 的标准溶液为模板采用快速循环伏安法 (扫描电位为 0~1 V, 扫描速度为 50 mV/s), 测定底物氧化、还原行为, 然后以 BuChE/CS/GS/GCE 酶修饰电极再次测定 BTCi 底物, 最后以 BuChE/CS/GS/GCE 酶修饰电极测定同浓度含有 MG 的 BTCi 底物溶液, 每组数据测定三次取平均值, 记录 MG 对 BuChE 的抑制率。(最优实验条件: 1.2 mol/L BTCi 底物配制  $1 \times 10^{-6}$  mol/L MG 溶液)。

## 1.4 样品的 MG 及 LMG 的测定

### 1.4.1 鱼肉的处理

从红星斑鱼肉中取可食部分, 捣碎均匀。准确称取 10 g 捣碎样品于 100 mL 离心管中, 加入 1.5 mL 的 25% 盐酸羟胺水溶液、2.5 mL 的 1.0 mol/L 对甲苯磺酸溶液, 涡旋混均 30 s, 加入 20 mL 乙腈, 4500 r/min 离心 10 min 后取上清液, 再用 20 mL 乙腈重复提取残渣, 合并上清液, 加入 10  $\mu$ L 的 0.1  $\mu$ mol/L 高锰酸钾溶液, 最后用乙腈定容到 50 mL 得到待测样品, 于 4 °C 下储存备用。

### 1.4.2 红星斑鱼的测定

将 BuChE/CS/GS/GCE 修饰酶电极浸泡含在待测样品 1.0 mL+1.0 mL PBS (含 BTCi 底物) 中 11 min, 采用快速循环伏安法 (扫描电位为 0~1 V, 扫描速度为 50 mV/s), 测定氧化峰响应电流值, 每组数据测定三次取平均值。

## 1.5 数据统计分析方法

以上测定均为三组平行实验数据的平均值为准。运用 SPSS 18.0 进行统计分析, 以单因素方差分析 (one-way analysis of variance) 进行显著性差异方面的分析 ( $p < 0.05$ ), 相关的数据图运用 OriginLab Origin Pro V 8.0 绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 BuChE 酶传感器测定 MG 的机理

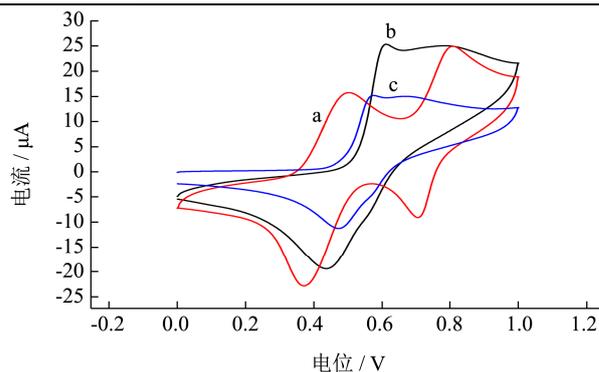


图1 玻碳电极上的电化学行为

Fig.1 Electrochemical behavior on the glassy carbon electrode

注: a. GCE (BTCi); b. GCE(BTCi+BuChE); c. GCE (BTCi+BuChE+MG)。

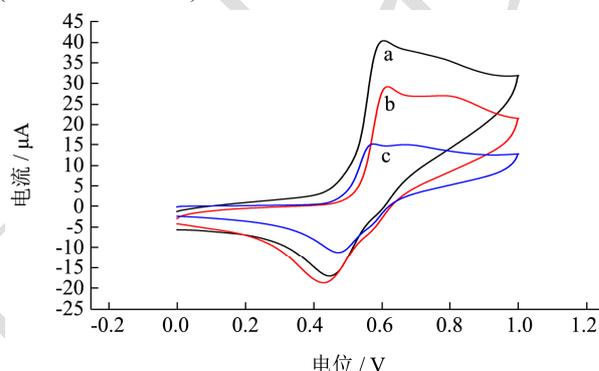


图2 MG 在酶修饰电极上的电化学行为

Fig.2 Electrochemical behavior of MG on enzyme biosensor

注: a. CS/GS/GCE(0  $M_{MG}$ ); b. CS/GS/GCE( $1 \times 10^{-6}$   $M_{MG}$ ); c. CS/GS/GCE( $1 \times 10^{-5}$   $M_{MG}$ )。

利用循环伏安 (Cyclic Voltammetry, CV) 法研究了 S-碘化丁酰硫代胆碱 (BTCi) 的电化学性质、丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 对 S-碘化丁酰硫代胆碱催化作用及孔雀石绿对其抑制作用, 结果如图 1 所示。图 1a 说明 S-碘化丁酰硫代胆碱在 GCE 电极发生了电化学氧化还原反应, 其 CV 图谱表明在 0.45 V 和 0.8 V 处出现两个氧化峰, 在 0.37 V 和 0.7 V 出现两个还原峰, 说明 BTCi 是分两步进行氧化还原的; 图 1b 表明 BuChE 酶催化 BTCi 水解为胆碱胆碱在 GCE 电极发生电化学氧化还原反应, 其 CV 图表明在 0.6 V 出现一个氧化峰, 在 0.42 V 出现一个还原峰, 而且峰电流显著增大, 这是因为 BuChE 酶将 BTCi 水解成胆碱所致, 而胆碱的电化学氧化还原是一步完成的, 同时也说明 BuChE 酶成功固定在 GCE 电极之上; 图 1c 表示在底物 (BTCi) 中含有  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度的 MG 时 BTCi 的电化学氧化还原 CV 图, 结果表明在 BuChE 酶和 MG 存在情况下, BTCi 的氧化还原过程只有一个氧化峰和一个还原峰, 而且其峰电流显著下降, 这表明 MG 与丁酰胆碱酯酶活性位点结合抑制其活性, 从而

使得 BTCi 水解产物量下降<sup>[26]</sup>, 进而影响 BTCi 水解产物的电化学氧化还原反应, 使酶传感器响应电流下降。

利用循环伏安法研究了 BuChE/CS/GS/GCE 酶传感器的表征, 如图 2a 所示, 结果表明 BuChE/CS/GS/GCE 酶修饰电极后氧化峰电流增大了 1.3 倍左右, 是因为石墨烯 (GS) 表面积大、电子迁移率高、电学性能突出能够促进电极表面电子快速传递, 而 CS 结构中含大量羟基、乙酰氨基和氨基等强极性基团, 其良好生物相容性、成膜性能够防止 GS 脱落; 图 2b 和 2c 为在底物 (BTCi) 中分别含有  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L、 $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度的 MG 的 BTCi 在 BuChE/CS/GS/GCE 酶传感器上的循环伏安图, 由其结果可知 MG 可以抑制 BuChE 酶活性, 进而影响 BTCi 水解及水解产物的电化学氧化还原反应, 且与 MG 的浓度有关, MG 浓度越大, 抑制能力越强, BTCi 水解产物的氧化峰电流下降越多。

## 2.2 实验条件的优化

### 2.2.1 不同 pH 对酶传感器响应电流的影响

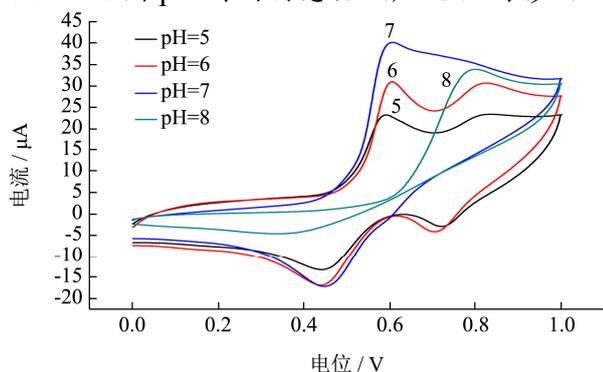


图 3 不同 pH 对酶传感器响应电流的影响

Fig.3 Effect of different pH on response current of enzyme biosensor

研究了电解质溶液的 pH 值对 BuChE/CS/GS/GCE 酶传感器响应电流的影响, 一般来说 pH 主要从两个方面影响被测定的物质的响应电流, 一方面通过影响酶的活性间接影响峰电流, 另一个是直接对底物产生作用。本文依次测定 pH=5、6、7、8 条件下酶催化底物对应氧化峰电流的情况, 由图 3 可知在 pH=4、5、6 偏酸性条件下酶活略有下降, 酶传感器发生的反应有是两个氧化峰两个还原峰, pH=8 碱性条件下底物与酸发生反应生成的物质只有氧化峰且电位向右移动, 碱性条件对酶解反应以及水解产物电化学氧化还原反应的影响更大, 而 pH=7 时酶活性最大, 对应产生的氧化峰电流最大, 因此确定电解质溶液的 pH 为 7。

### 2.2.2 不同抑制时间对催化底物氧化峰峰电流的影响

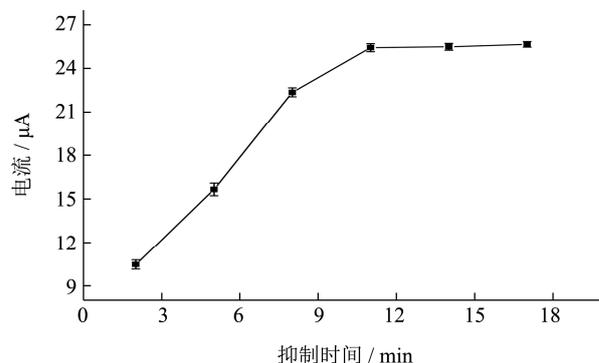


图 4 不同抑制时间对酶传感器响应电流值的影响

Fig.4 Effect of different inhibition time on response current of enzyme biosensor

分别对 BuChE/CS/GS/GCE 酶修饰电极抑制 2、5、8、11、14、17 min, 然后利用快速循环伏安法测定, 结果如图 4 所示, 在 2~11 min 时间范围内, 随着 MG 与 BuChE 酶接触时间的增加, 氧化峰电流减量 (即酶传感器响应电流值) 逐渐增大, 且在 11 min 时酶响应电流达到最大, 随着抑制时间增加, 酶传感器响应电流变化趋于平稳, 说明在 11 min 时, 抑制率最大, 同时考虑检测时间, 所以选择最佳抑制时间为 11 min。

### 2.2.3 BuChE 不同酶活对酶传感器响应电流的影响

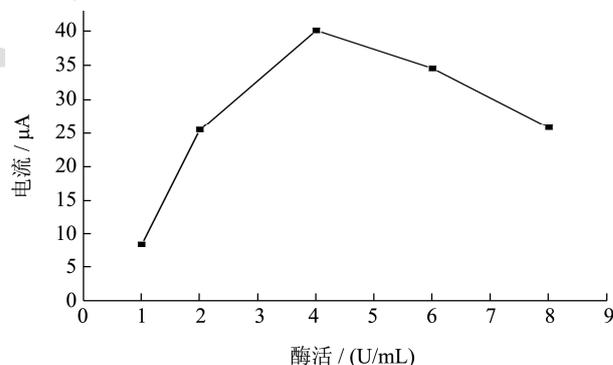


图 5 不同酶活对酶传感器响应电流的影响

Fig.5 Effect of different enzyme activities on response current of enzyme biosensor

依次测定了 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 U/mL BuChE 对酶传感器响应电流的影响, 每次滴加 5.0 μL, 结果如图 5 所示, 在 1.0~4.0 U/mL, 随着酶活增大, 酶传感器响应电流增大, 说明在 1.0~4.0 U/mL 范围内底物的量充足且随着酶活增大而增大, 随着酶活继续增大, 其响应电流反而减小, 是因为酶是生物大分子, 本身没有电活性, 酶固载量过多反而阻碍 MG 的传质速率及电子传递速率, 因此选择最佳固定酶活为 4.0 U/mL。

### 2.2.4 CS 与 GS 不同配比对催化底物氧化峰峰电流的影响

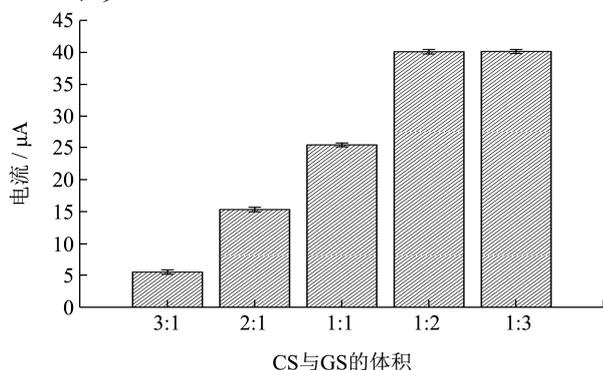


图 6 CS 与 GS 不同配比对底物氧化峰电流的影响

Fig.6 Effect of different ratio of CS and GS on peak current of substrate oxidation

CS/GS 混合液的用量影响底物的氧化峰电流值,就修饰液的配比而言,按照上述 1.3.1 修饰液的配制,研究了 CS 与 GS 的体积比为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3,实验结果如图 6:二者体积比为 1:2 时氧化峰电流最大,3:1、2:1、1:1、1:2 对应峰电流值逐渐增大,是因为 GS 表面积大、电子迁移率高、电学性能突出能够促进电极表面电子快速传递,而 CS 结构中含大量羟基、乙酰氨基和氨基等强极性基团,其良好生物相容性、成膜性能能够防止 GS 脱落,所以随着 CS 越大膜越厚反而阻碍电流的传递,随着 GS 继续增峰电流变化不大,是因为 GS 于 CS 结合率达到最大,所以选择 CS:GS 为 1:2。

### 2.3 MG 标准曲线

在最优试验条件下,利用线性扫描法(LSV)用 BuChE/CS/GS/GCE 酶传感器依次测定按照 1.3.2 配制好的  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.1 \times 10^{-6}$  mol/L 不同 MG 浓度氧化峰响应电流情况。由上图 7 可知 MG 氧化峰响应电流与浓度在  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.1 \times 10^{-6}$  mol/L 范围内成线性其线性方程:  $I_p(\mu\text{A}) = -6.97\text{CMG}(\mu\text{mol/L}) + 22.805$ , ( $R^2 = 0.9885$ ),其最低价检测限为  $2.8 \times 10^{-8}$  mol/L ( $S/N=3$ )。与 Nurul H A P 文献报道相比<sup>[26]</sup>,本方法构建的纳米酶传感器具有一定的创新性,可以作为快速检测水产品中 MG 残

留的分析方法。

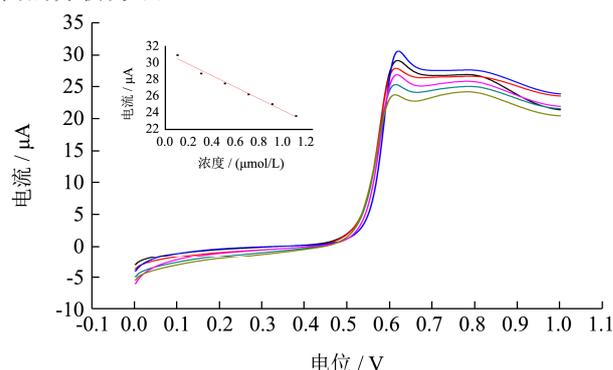


图 7 不同浓度 MG 对底物氧化峰电流值的影响

Fig.7 Effect of different concentration of MG on the peak current value of substrate oxidation

注:内嵌图 MG 标准曲线。

### 2.5 电化学传感器抗干扰性、稳定性和重现性

研究了与 MG 结构相似的 LMG 以及常见水产品中常见有害物质氯霉素、磺胺二甲基嘧啶对 MG 对酶电极峰电流的影响。制备好的纳米酶传感器在分别含 LMG、氯霉素、磺胺二甲基嘧啶及重金属铅、镉、砷的 BTCi 底物溶液中,抑制相同时间,测定其酶传感器的响应电流,试验结果表明这些物质对该纳米酶传感器的电化学响应电流并无明显的影响,表明其他物质对酶活性没有干扰,该纳米酶传感器抗干扰性良好。将制备好的酶传感器置于  $-4^\circ\text{C}$  避光保存,7 d 后相同条件下进行检测,电流值的变化率不超过 8.7%,表明该酶传感器的稳定性较好。分别制备不同批次的 3 支酶传感器,测定同一浓度 MG,相对标准偏差为 6.16%,表明该纳米酶传感器重现性较好。

### 2.6 样品中 MG 的测定及加标回收实验

按照 1.4.1 节的方法处理样品,得到样品提取液,按照 1.4.2 测定红星斑鱼样品,未检测出 MG。对红星斑鱼实际样本进行加标回收率实验,每组数据测定三次取平均值并计算相对标准偏差,不同加标浓度下的平均回收率为 96.35%~99.78%,相对标准偏差 2.0%~2.6%,结果如下表 1 所示。

表 1 样品中 LMG 含量测定的结果

Table 1 Results of determination of LMG in samples (n=3)

样品	样品测定值/ $\mu\text{mol/L}$	加标量/ $\mu\text{mol/L}$	测定值/ $\mu\text{mol/L}$	回收率/%	相对标准偏差(n=3)/%
红星斑鱼	0.0012	0.2	0.1939	96.35	2.0
		0.6	0.5937	98.75	3.2
		1	0.9990	99.78	2.6

### 3 结论

本文以壳聚糖和石墨烯为复合修饰材料包埋固定化丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 制备 BuChE/CS/GS/GCE 纳米酶传感器, 并对酶传感器进行了表征, 结果表明该酶传感器制作简捷, 具有良好的重现性、稳定性。研究了 S-碘化丁酰硫代胆碱 (BTCi) 的电化学氧化还原反应过程、BuChE 催化底物电化学过程以及 MG 抑制 BuChE 活性的电化学反应过程; 优化了纳米酶传感器的制备条件和检测条件, 确定了纳米酶传感器法快速测定食品中 MG 的校正曲线、线性范围、检测限、加标回收率等参数。该酶传感器法可用于水产品中 MG 残留的检测, 具有简便快速、选择性好、灵敏度高、样品处理简单等优点, 可应用于水产品中孔雀石绿快速准确的测定。

### 参考文献

- [1] 徐向荣,郝青,彭加喜,等.水产品中残留孔雀石绿研究进展[J].热带海洋学报,2013,32(4):97-106  
XU Xiang-rong, HAO Qing, PENG Jia-xi, et al. Recent studies on residual malachite green in aquatic products [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2013, 32(4): 97-106
- [2] CULP S J, Mellick P W, Trotter R W, et al. Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F1 mice and F344 rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(8): 1204-1212
- [3] 吴红军,成强,臧素娟,等.高效液相色谱法测定水产品中孔雀石绿的残留量[J].现代农业科技,2015,23:295-298  
WU Hong-jun, CHENG Qiang, ZANG Su-juan, et al. Determination of residues of malachite green in aquatic products by HPLC [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015, 23: 295-298
- [4] Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki J. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1089(1-2): 187-192
- [5] 刘谦,刘丽丽,吴新欣,等.高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物的含量[J].理化检验(化学分册),2017,53(10):1209-1212  
LIU Qian, LIU Li-li, WU Xin-xin, et al. Determination of malachite green, crystal violet and its metabolites in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. PTCA (PART B: CHEM. ANAL), 2017, 53(10): 1209-1212
- [6] 张艳,冯翠霞,陈剑刚,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留[J].中国卫生检验杂志,2017,27(10):1385-1388  
ZHANG Yan, FENG Cui-xia, CHEN Jian-gang, et al. Determination of malachite green, crystal violet and their metabolite residues in aquatic product by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Tec, May. 2017, 27(10): 1385-1388
- [7] Scherpenisse P, Bergwerff A A. Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 529(1-2): 173-177
- [8] 张艺蓓,岳田利,乔海鸥,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物[J].食品科学,2014,35(10):179-184  
ZHANG Yi-bei, YUE Tian-li, QIAO Hai-ou, et al. Determination of malachite green, crystal violet and their metabolites in fishes by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Food Science, 2014, 35 (10): 179-184
- [9] Bergwerff A A, Scherpenisse P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals [J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2003, 788(2): 351-359
- [10] Valle L, Diaz C, Zanocco A L, et al. Determination of the sum malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067(1-2): 101-105
- [11] 吕芳,徐锐,林洪,等.水产品中孔雀石绿残留酶联免疫检测的基质干扰及消除方法[J].中国渔业质量与标准,2013,3(1): 59-64  
LYU Fang, XU Rui, LIN Hong, et al. Enzyme-linked immunoassay of malachite green in aquatic products: elimination source of matrix interference and elimination strategy [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2013, 3(1): 59-64
- [12] Lu L, Ai H P, Zhen Z L, et al. Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film [J]. Food Chemistry, 2017, 229: 403-408
- [13] 何万义.应用酶联免疫吸附法快速检测水产品中孔雀石绿残留[J].食品安全导刊 2016,18:117-118  
HE Wan-yi, Rapid detection of malachite green residues in aquatic products by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. China Food Safety Magazine, 2016, 18: 117-118

- [14] 沈丽,张丽君,谭攀,等.酶联免疫检测试剂盒检测水产品中孔雀石绿的应用研究[J].食品工程,2012,2:58-61  
SHEN Li, ZHANG Li-jun, TAN Pan, et al. Application on enzyme-linked immunosorbent assay for determination of malachite green in aquatic products [J]. Food Engineering, 2012, 2: 58-61
- [15] 邢玮玮,王榕妹,王俊卿,等.酶联免疫吸附分析法测定水产品及水中孔雀石绿和无色孔雀石绿[J].化学研究与应用,2010,22(1):42-46  
XING Wei-wei, WANG Rong-mei, WANG Jun-qing, et al. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of malachite green and leucomalachite green in fish [J]. Chemical Research and Application, 2010, 22(1): 42-46
- [16] Sacara A M, Cristea C, Muresan L M. Electrochemical detection of Malachite Green using glassy carbon electrodes modified with CeO<sub>2</sub> nanoparticles and Nafion [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2017, 792: 23-30.
- [17] Rahman M M, Mollah M Y, Rahman M, et al. Electrochemical behavior of malachite green in aqueous solutions of ionic surfactants [J]. Electrochemistry, 2013, 2013(1):1-10
- [18] Shamagsumova R V, Efimova O Y, Gorbachuk V V, et al. Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on polylactide-nanosilver composite for the determination of anti-dementia drugs [J]. Analytical Letters, 2019, 52(10): 1558-1578
- [19] 袁蓓,赵凤娟,卫敏.基于乙酰胆碱酯酶传感器的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法研究[J].食品科技,2016,41(2):322-326  
YUAN Bei, ZHAO Feng-juan, WEI Min. Amperometric biosensor based on acetylcholinesterase for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. Food Science and Technology, 2016, 41(2): 322-326
- [20] 董静.新型电化学传感器对土壤和水中甲基对硫磷的检测研究[D].泰安:山东农业大学,2013  
DONG Jing. Detection of methyl parathion in soil and water by a new electrochemical sensor [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013
- [21] 谢修银,汪存信,王志勇.SDS 抑制乙酰胆碱酯酶反应的热动力学研究[J].化学学报,2006,21:2151-2156  
XIE Xiu-yin, WANG Cun-xin, WANG Zhi-yong. Thermokinetic studies on the inhibition of acetylcholinesterase reaction by SDS [J]. Acta Chimica Sinica, 2006, 21: 2151-2156
- [22] Raghu P, Madhusudana R T, Reddaiah K, et al. Acetylcholinesterase based biosensor for monitoring of malathion and acephate in food samples:a voltammetric study [J]. Food Chemistry, 2014, 142(3): 188-196
- [23] Chauhan N, Chawla S, Pundir C S, et al. An electrochemical sensor detection of neurotransmitter-acetylcholine using metal nanoparticles, material and conducting polymer modified electrode [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 89(Pt 1): 377-383
- [24] 卢雄.纳米材料修饰电极的乙酰胆碱酯酶传感器及农残检测研究[D].燕山大学,2018  
LU Xiong. Preparation of acetylcholinesterase nanomaterials modified electrode for the determination of pesticide residues [D]. Yanshan University, 2018
- [25] 沈冠男.基于介孔碳材料的乙酰胆碱酯酶传感器的制备及有机磷检测应用[D].吉林:吉林大学,2018  
SHEN Guan-nan. Preparation of acetylcholinesterase sensor based on mesoporous carbon materials for determination of organophosphorus pesticides [D]. Jilin: Jilin University, 2018
- [26] Hidayah A P N, Faridah S, Azura M S N, et al. Malachite green and leuco-malachite green detection in fish using modified enzyme biosensor [J]. Procedia Chemistry, 2016, 20: 85-89

## (上接第 219 页)

- [18] 孙维思,张仁堂,乔旭光.不同品种马铃薯混配粉面团流变学特性及对馒头品质的影响[J].食品与发酵工业,2017, 43(2):95-100  
SUN Wei-si, ZHANG Ren-tang, QIAO Xu-guang, et al. The effect of different kinds of potatoes on potato-wheat dough rheological and quality of steamed bun [J]. Food and Fermentation Industry, 2017, 43(2): 95-100
- [19] 冯世德,孙太凡.玉米粉对小麦面团和馒头质构特性的影响[J].食品科学,2013,34(1):101-104  
FENG Shi-de, SUN Tai-fan. Effect of corn flour on textural properties of wheat dough and Chinese steamed bread [J]. Food Science, 2013, 34(1): 101-104