

纳米银/辣根过氧化物酶自组装免疫传感器测定蜂蜜中的青霉素

杜平, 商希礼, 高志杰, 岳武, 李长海

(滨州学院化学工程系, 山东滨州 256603)

摘要: 利用层层自组装技术, 成功将氨基苯磺酸、纳米银和辣根过氧化物酶标记的青霉素抗体固定在玻碳电极表面。实现了聚氨基苯磺酸/纳米银放大型电化学免疫传感器的制备, 建立了一种高灵敏度检测青霉素的电化学分析方法。辣根过氧化物酶催化过氧化氢氧化还原 3,4-二氨基苯甲酸产生电流信号, 进行电化学检测, 实现蜂蜜中青霉素的定量测定。同时对测定缓冲液的 pH、反应温度和时间等进行了优化, 最佳条件下, 在 0.05~6.00 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内传感器响应电流和青霉素浓度呈良好线性关系, 线性方程为 $\Delta i(10^{-5}\text{A}) = -0.7265C + 4.1522$, 相关系数为 0.9946, 检出限为 1.02 $\mu\text{g/L}$ 。同时利用该传感器对蜂蜜样品中的青霉素进行了测定, 测定结果与酶联免疫法进行了对比, 可知该法测定青霉素灵敏度高, 具有良好的选择性和稳定性, 适用于检测蜂蜜样品中的青霉素残留。

关键词: 氨基苯磺酸; 纳米银; 辣根过氧化物酶; 青霉素

文章篇号: 1673-9078(2014)9-253-257

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.042

Determination of Penicillin in Honey by the Nano-Ag / Horseradish Peroxidase Self Assembly Immunosensor

DU Ping, SHANG Xi-li, GAO Zhi-jie, YUE Wu, LI Chang-hai

(Department of Chemical Engineering, Binzhou University, Binzhou 256603, China)

Abstract: Aminobenzene sulfonic acid, nano-Ag particles and horseradish peroxidase (HRP) labelled penicillin antibody was successfully immobilized on the glassy carbon electrode by the layer-by-layer assembly technique. The poly aminobenzene sulfonic acid/nano-Ag /HRP amplified electrochemical immunosensor was prepared and an enhanced sensitivity electroanalysis method for the detection of penicillin was established. HRP can catalyze the reduction of H_2O_2 to promote the oxidation of 3,4-diaminobenzoic acid, causing the changes of the peak current, thus realizing the detection of penicillin by the current changes. The effects of buffer solution pH, reaction temperature and time were investigated. Under optimized conditions, the current response of the sensor showed a good linear relationship with the concentration of penicillin within 0.05~6.00 $\mu\text{g/L}$, with a correlation coefficient of 0.9946 and the detection limit of 1.02 $\mu\text{g/L}$. The penicillin content in the honey samples was also detected by the modified electrode, and the detection results were compared with the traditional ELISA method. It is proved that this method has good sensitivity and specificity and suitable for detection of penicillin residues in honey samples.

Key words: aminobenzene sulfonic acid; nano Ag; horseradish peroxidase; penicillin

青霉素是一种广谱抗生素, 又名盘尼西林, 能破坏细菌的细胞壁并在细菌细胞的繁殖期起杀菌。常用于治疗和预防禽类各类敏感菌, 过量使用不仅破坏禽类肠道微生物群产生抗药性, 而且会导致动物体内青霉素的累积残留^[1]。长期食用含有过量青霉素的蜂蜜、鸡蛋等食品, 将会给人体带来不可逆转的损害。因此各国加强了对动物源性食品中青霉素的检测, 欧盟规定最高残留限量为 4.0 $\mu\text{g/L}$ 。我国是农产品出口大国, 建立快速有效的检测青霉素的方法势在必行。

收稿日期: 2014-04-17

收稿日期: 滨州学院博士基金(2009Y02); 滨州市科技厅资助项目(2013ZC1603)

常见的青霉素的检测方法主要有微生物法^[2]、高效液相色谱法^[3]、质谱法^[4]、荧光免疫法^[5]等, 这些方法在检测青霉素时具有较好的灵敏度和特异性, 但药品预处理操作繁琐, 步骤复杂, 不适合实际样品的检测。利用电化学方法的灵敏、快速和抗原抗体的特异性巧妙结合, 设计和研发电化学免疫传感器, 在食品、医药、临床检测方面具有巨大的潜在应用价值。

纳米银不仅具有较大的比表面积、良好的生物兼容性和催化活性, 可用于固定和标记生物活性分子^[6-8], 为生物活性分子提供发生氧化还原反应所需的类原生环境^[9]。同时纳米银与半胱胺(-SH)之间能通过 Ag-S 键发生强的共价键合, 实现修饰电极上的直接电

化学,因此被广泛的应用于电化学传感器的制备[10]。

3,4-二氨基苯甲酸-过氧化氢-辣根过氧化物酶是一种良好的酶联体系[11]。辣根过氧化物酶(HRP)能够催化过氧化氢^[12,13]氧化还原 3,4-二氨基苯甲酸,从而获得稳定的氧化还原峰。通过检测氧化还原峰电流的变化,可间接测定青霉素的含量。本文利用氨基苯磺酸、半胱胺、纳米银和标记青霉素抗体的 HRP 对玻碳电极进行了层层自组装,制备了纳米银放大型的电化学辣根过氧化物酶免疫传感器,研究了修饰电极的电化学性质及测定的影响因素,并利用制备的新型传感器对蜂蜜样品中的青霉素进行了检测,方法具有操作简单、灵敏度高、响应快、检测限低,稳定和重现性好等优点。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂材料

CHI660C 电化学工作站,上海辰华仪器公司;三电极系统:玻碳电极为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝为对电极。青霉素(科密欧试剂,500 mg);超级数显恒温器(CS501-SP,上海精密实验仪器有限公司);硼氢化钠(NaBH_4 ,天津市光复精细研究所);硝酸银(AgNO_3 ,上海国药集团有限公司);氨基苯磺酸(ABSA,上海国药集团有限公司);半胱胺(CA,北京百灵威科技有限公司);3,4-二氨基苯甲酸(3,4-DBA,北京百灵威科技有限公司);青霉素抗体(北京奥博森生物科技有限公司); β -内酰胺类 ELES 试剂盒(北京奥博森生物科技有限公司);实验过程中所用的水均为超纯水。

1.2 纳米银的制备

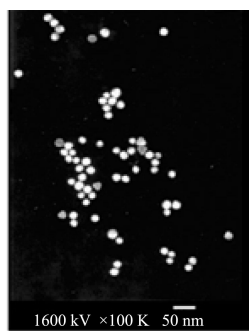


图1 胶体银溶液的扫描电镜图

Fig.1 SEM of the nano-Ag colloid solution

利用溶胶凝胶法^[14],以 NaBH_4 为还原剂,制备了纳米银溶胶。将事先配制好的 2 mol/L AgNO_3 溶液置于棕色瓶中 4 °C 下保存。取新鲜配制好的 2 mol/L

NaBH_4 溶液 2 mL 于冰水浴中进行磁力搅拌。剧烈搅拌下,用移液管移取上述 AgNO_3 溶液 1 mL 逐滴加入 NaBH_4 中,反应一段时间,溶液的颜色由无色变为浅棕色,待溶液颜色不再加深,即得到浅棕色胶体银溶液,扫描电镜图见图 1。

1.3 修饰电极的制备

抛光后预处理后的玻碳电极经 0.1 mol/L 的硫酸溶液中进行电化学清洗。浸入 2.0×10^{-3} mol/L ABSA 溶液中进行循环伏安扫描(扫描电压为 -1.5~2.5 V,扫速 100 mV/s),二次去离子水冲洗后,自然晾干。将电极放入 2m 的 CA 溶液中 12 h,清洗后,再次浸入制备好的胶体 Ag 溶液中静置 8 h,电极用 0.02 mol/L pH 7.0 PBS 洗涤干净。最后,取浓度为 1 mg/mL 的辣根过氧化物酶标记的青霉素抗体(HRP-Ab*)10 μL 滴加在修饰电极表面;之后在 4 °C 冰箱中浮育过夜后,用 0.02 mol/L pH 7.0 PBS 去除未结合的 HRP-Ab*,最后取 10 μL 0.2% BSA 滴加在玻碳电极表面 2 h,以除去非特异性吸附。制备好的修饰电极放在 4 °C 冰箱中保存备用。

1.4 实验方法

利用循环伏安法和交流阻抗法表征修饰电极。循环伏安法在 1.0×10^{-3} mol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 0.1 mol/L 的 KCl 混合溶液中进行。交流阻抗法在 1.0×10^{-2} mol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 0.1 mol/L 的 KCl 混合溶液中进行。将三电极系统放入 5 mL pH 7.0 PBS (含有 7.5×10^{-3} mol L^{-1} 3,4-二氨基苯甲酸) 溶液中,利用 CHI 660C 电化学工作站进行差分脉冲伏安测定。

2 结果与讨论

2.1 传感器的自组装

传感器通过层层自组装技术将氨基苯磺酸、纳米银及辣根过氧化物酶标记的青霉素抗体固定在玻碳电极上。HRP 催化 H_2O_2 氧化还原 3,4-二氨基苯磺酸,可以引起电流的变化,当青霉素抗体与抗原发生特异性的结合时,可以引起电流的变化;根据电流的变化从而确定青霉素的浓度。

首先通过电化学聚合是电极表面形成一层聚氨基苯磺酸膜,由于磺酸基的存在,使得电极表面带负电;而半胱胺一侧质子化的氨基带正电,能与与聚氨基苯磺酸通过静电吸引力实现了电极表面的牢固结合,另一端的巯基通过 Ag-S 共价键实现了纳米银在 CA 单层上的均匀固定。最后,标记有青霉素抗体的辣根过

氧化物酶以三维的形式固定在纳米银上，制备了放大型的电化学免疫传感器，电极组装过程见图 2。CA 单层在电极表面的有效固定，是纳米银在电极上固定均匀的重要前提^[11]。纳米银既保留了银粒子的生物活性，又起到电子小传导中心的作用，能够加快电子有效的传递速度^[15]。同时它还能够通过提供与酶接触的较大比表面积，在三维结构上提供固定 HRP 的更多位点，最大限度的负载酶，起到信号放大的作用，大大提高了传感器检测的灵敏度。

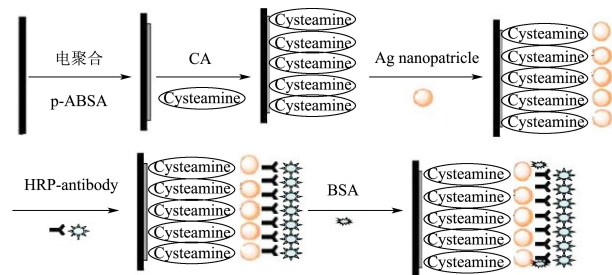


图 2 免疫传感器的组装

Fig.2 The scheme picture of the modification of the immunosensor

2.2 传感器的电化学表征

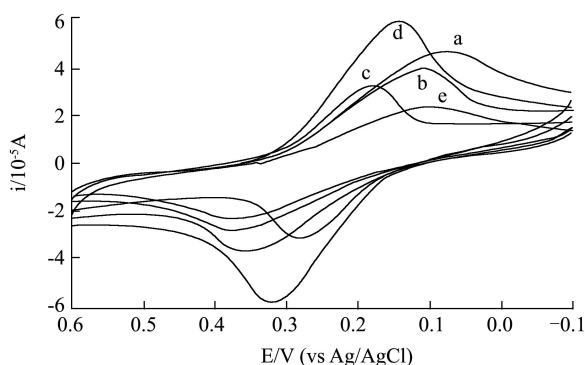


图 3 不同修饰电极在 $K_3Fe(CN)_6$ 和 KCl 溶液中的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammogram of different modified electrodes in the solution of $K_3Fe(CN)_6$ and KCl

注：(a) GC; (b) p-ABSA/GC; (c) CA/p-ABSA/GC; (d) Ag/CA/p-ABSA/GC; (e) HRP-Ab*/Ag/CA/p-ABSA/GC。

以循环伏安法对修饰电极进行了表征，见图 3 所示。曲线 a 为 GC 的循环伏安曲线，得到一条良好的氧化还原峰。曲线 b 为聚氨基苯磺酸修饰的电极的循环伏安曲线，峰电流明显降低，表明电化学聚合使得电极表面带负电，与溶液中的 $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ 相互排斥，氧化还原峰电流明显减小。当电极组装了一层巯基乙胺后，如曲线 c 所示，由于电极周围溶液中离子的静电排斥，氧化还原峰电流再次降低。曲线 d 为纳米银修饰电极的循环伏安曲线。曲线 d 的峰电流较曲线 c 和曲线 a 均有较大的增加，纳米银引入电极

表面后，增大了电极表面的有效表面积，又由于纳米银粒子本身的特殊性质，提高了化学反应的活性，加快了电子的传递速率，使得电极上的电化学反应可逆性增强，氧化还原峰电流明显增大。曲线 e 是固定了 HRP-Ab* 的纳米银修饰电极，曲线的 i_{pa} 和 i_{pc} 分别较曲线 d 明显变小，结果说明 HRP-Ab* 已成功固定在修饰电极上。

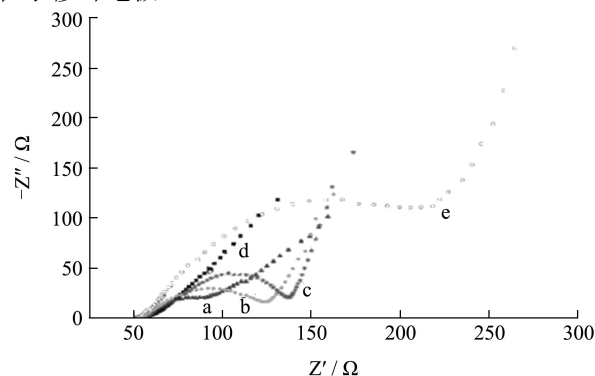


图 4 不同修饰电极在 $K_3Fe(CN)_6$ 和 KCl 溶液中的交流阻抗图

Fig.4 Electrochemical impedance of different modified electrodes in the solution of $K_3Fe(CN)_6$ and KCl

注：(a) GC; (b) p-ABSA/GC; (c) CA/p-ABSA/GC; (d) Ag/CA/p-ABSA/GC; (e) HRP-Ab*/Ag/CA/p-ABSA/GC。

交流阻抗法是在频率变化过程中测量电极表面阻抗的方法，通过测定电极表面修饰各种物质前后表面阻抗的变化，可以成功实现生物传感器的设计表征。图 4 为不同修饰电极在 $K_3Fe(CN)_6$ 和 KCl 溶液中的获得的交流阻抗图。曲线 a 为 GC 的交流阻抗图，在高频部分出现很小的半圆，表明铁氰化钾更容易到达电极表面发生氧化还原反应^[16]。曲线 b 和曲线 c 分别为聚氨基苯磺酸和半胱胺相继修饰的电极的阻抗谱，高频部分半圆依次增大，说明电极表面修饰物质的存在降低了电极的导电性，阻碍电子转移。曲线 d 近似一条直线，表明此时电极有良好的导电性，证明了电极上修饰的纳米银电子小传导中心的作用，能够加快电子有效的传递速度和电极的导电性。固定了 HRP-Ab* 后曲线 e，在高频部分出现了非常明显的半圆，说明不导电物质的存在阻碍了电荷在电极表面的有效传递。图 4 与图 3 结果一致，说明了电化学修饰电极已成功完成了固定。

2.3 测定条件优化

2.3.1 扫速的影响

考察了修饰电极在 0.02 mol/L pH 7.0 PBS (含 7.5×10^{-3} mol/L 3,4-DBA 和 4.0×10^{-3} mol/L H_2O_2) 溶液中，扫速对循环伏安曲线的影响。结果表明，修饰电极循环扫描过程中氧化还原峰电流之比 $i_{pa}/i_{pc} \approx 1$ ，

ΔE_p 约为 0.20 V, 可逆性良好。氧化峰和还原峰电流随着扫面速率的增加而增加, 回归方程为 $i_{pc} (10^{-5}A) = 4.9511v^{1/2} - 0.1663$, $i_{pa}(10^{-5}A) = -6.7180v^{1/2} - 0.4322$, 相关系数分别为 0.9987、0.9994, 这表明此电极反应是扩散控制的, 呈现表面波性质。

2.3.2 缓冲溶液 pH 值的影响

考虑到 pH 值对生物酶的稳定性和催化活性的影响, 考察了 pH 4.5~8.5 范围内, 0.02 mol/L 的磷酸溶液对传感器测定响应电流的影响。结果显示, 相同条件下, 随着 pH 的增大, 3,4-DBA 的氧化峰电流逐渐增大, 当达到 pH 7.0 时, 电流值达到最大, 之后逐渐降低。这是由于在强酸和强碱环境下, HRP 表面的活性中心将部分丧失其催化活性, 因此, 选择 pH 7.0 为最佳 pH。

2.3.3 免疫温度和时间的影响

分别将修饰电极浸入 1 $\mu\text{g/L}$ 青霉素抗原中反应 5、10、20、30、40、50 和 60 min 后, 进行循环伏安扫描测定。实验表明, 电流随着时间的增加逐渐降低, 30 min 时响应电流趋于最小值, 之后再增加时间电流基本不再变化, 说明 30 min 时抗体和抗原已基本结合完全。因此, 本实验选择 30 min 作为最佳的温育时间。

免疫温度对抗原和抗体的结合速度有着重要的影响。在所选择的的最佳反应条件下, 考察了 15~45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 免疫温度对传感器响应电流的影响。随温度的增加, 响应电流迅速增大, 37 $^{\circ}\text{C}$ 达到最大, 之后电流减小。这主要因为 15~37 $^{\circ}\text{C}$ 是辣根过氧化物酶活性适宜温度, 随温度升高, 酶活性增强, 催化 H_2O_2 对 3,4-二氨基苯甲酸的氧化还原, 所以电流增大, 而继续升温, 使得 HRP 的活性降低, 甚至发生酶的失活, 所以电流急剧下降。因此, 实验选择 37 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳反应温度。

2.4 标准曲线的测定

传感器上修饰的青霉素抗体与检测液中的青霉素在电极表面结合后, 将会阻碍电极上电子的传递速度, 造成响应电流的减小。实验将修饰电极放入含 3,4-二氨基苯甲酸和过氧化氢的磷酸缓冲液中进行差分脉冲伏安检测, 结果如图 9-A。在浓度为 0.05~6.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 峰电流与青霉素浓度呈良好的线性关系, 如图 9-B, 回归方程为 $\Delta i(10^{-5}A) = -0.7265C + 4.1522$, 相关系数为 $r = 0.9946$, 检测限为 1.02 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 蜂蜜中青霉素的检测

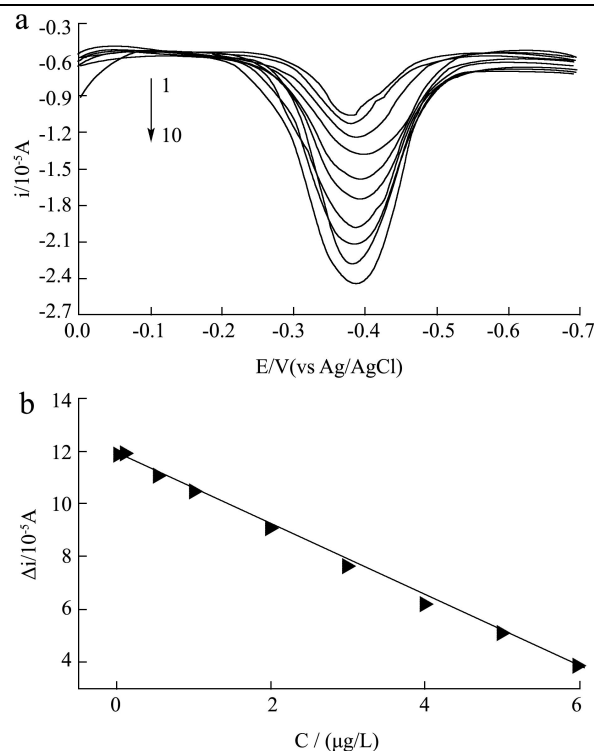


图 5 DPV 峰电流对青霉素浓度的线性关系图

Fig. 5 The linear relationship between the DPV current and the concentration of penicillin

注: 由上而下: 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 mol/L。

表 1 制备传感器电化学法与法检测蜂蜜中青霉素的结果对比

Table 1 The comparison of the methods of biosensor and ELISA on the detection of penicillin in honey samples ($n \geq 3$)

样品	传感器 /($\mu\text{g/L}$)	ELISA 法 /($\mu\text{g/L}$)	RSD /%	添加量 /($\mu\text{g/L}$)	回收率 /%
1	0.93	0.92	3.32	1.00	98.40
2	1.48	1.46	3.56	1.50	96.70
3	2.42	2.38	4.28	2.50	95.70

分别将 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、1.5 $\mu\text{g/L}$ 、2.5 $\mu\text{g/L}$ 的青霉素标准溶液加入到蜂蜜样品中, 利用制备的免疫传感器进行测定, 并将 ELISA 法测定结果对比(表 1)。结果显示, 两者测定结果没有明显区别, 制备传感器可以用于实际样品中青霉素的检测。

2.6 传感器的选择性和稳定性

在检测液中分别加入相同浓度的氨苄青霉素、罗红霉素和氯霉素, 其电流响应分别为为青霉素的 6.0%、4.2%、2.4%, 结果说明, 修饰电极的检测青霉素的过程中, 均无明显影响, 该免疫传感器看干扰能力和特异选择性较好。

将制备的修饰电极在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存一周后, 进行电

化学检测, 检测信号为初始峰电流的 94%, 两周后为初始峰电流的 90%, 说明电极具有良好的稳定性。

3 结论

本文利用层层自组装法制备了新型的免疫传感器, 在最佳条件下, 传感器对青霉素检测的线性范围为 0.05~6.00 $\mu\text{g/L}$, 最低检测限为 1.02 $\mu\text{g/L}$ 。该传感器灵敏度高、具有良好的选择性和稳定性。同时利用制备的传感器对蜂蜜样品进行了实际检测, 并与 ELISA 法进行了对比, 结果基本相同, 说明本传感器能够满足蜂蜜中青霉素的痕量检测要求。

参考文献

- [1] Švorc E, Sochr J, Rievaj M, et al. Voltammetric determination of penicillin V in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode [J]. *Bioelectrochemistry*, 2012, 88: 36-41
- [2] 李建龙, 潘道东, 朱浩嘉, 等. 碳纳米管-壳聚糖复合物免疫传感器检测牛奶中的青霉素[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2294-2299
LI Jian-long, PAN Dao-dong, ZHU Hao-jia, et al. Determination of penicillin in milk by the nanocomposite immunosensor [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(9): 2294-2299
- [3] Norouzi P, Ganjali MR, Daneshgar P, et al. Development of fast Fourier transformation continuous cyclic voltammetry as a highly sensitive detection system for ultra trace monitoring of penicillin V [J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, 360: 175-181
- [4] 蔡丽萍, 刘树彬, 李梅. 液相色谱/质谱对动物源性食品中残留抗生素的检测[J]. 河北化工, 2010, 33(2): 60-62
CAI Li-ping, LIU Shu-bin, LI Mei. Liquid chromatography-mass spectrometry to residue determination of antimicrobials in animal derived food [J]. *Hebei Chemical*, 2010, 33(2): 60-62
- [5] 戚勃, 杨贤庆, 李来好, 等. 琼胶寡糖对冻虾仁和罗非鱼片品质的影响[J]. 南方水产科学, 2012, 8(6): 72-79
QI Bo, YANG Xian-qing, LI Lai-hao, et al. Effect of agar-oligosaccharide on quality of frozen shrimp and Tilapia Fillets [J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(6): 72-79
- [6] Cao Y, Wang J, Xu YY, et al. Sensing purine nucleoside phosphorylase activity by using silver nanoparticles [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25: 1032-1036
- [7] Liu T, Zhong J, Gan X, et al. Wiring electrons of cytochrome c with silver nanoparticles in layered films [J]. *Chem. Phys. Chem.*, 2003, 4: 1364-1366
- [8] Ali S R, Mohsen J, Mehdi A, et al. A new electrochemical biosensor for hydrogen peroxide using HRP/AgNPs/cysteamine/p-ABSA/GCE self-assembly modified electrode [J]. *Korean J. Chem. Eng.*, 2012, 29(12): 1766-1770
- [9] Gan X, Liu T, Zhong J, et al. Effect of silver nanoparticles on the electron transfer reactivity and the catalytic activity of myoglobin [J]. *ChemBioChem*, 2004, 5: 1686-1691
- [10] Ren C B, Song Y H, Li Z, et al. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on a silver nanoparticles/cysteamine/gold electrode [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381(6): 1179-1185
- [11] Zhang S S, Du P, Li F. Detection of prostate specific antigen with 3,4-diaminobenzoic acid (DBA)- H_2O_2 -HRP voltammetric enzyme-linked immunoassay system [J]. *Talanta*, 2007, 72: 1487-1493
- [12] Zhu X L, Yang J H, Liu M, et al. Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer-cell-aptamer sandwich architecture [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2013, 764: 59-63
- [13] Zheng D, Zhu X, Ding X, et al. Sensitive detection of CD147/EMMPRIN and its expression on cancer cells with electrochemical technique [J]. *Talanta*, 2013, 105: 187-191
- [14] Wang G F, Wang W, Wu J, et al. Self-assembly of a silver nanoparticles modified electrode and its electrocatalysis on neutral red [J]. *Microchim. Acta.*, 2009, 164(6): 149-155
- [15] Shuang Zhao, Kai Zhang, Yingying Sun, et al. Hemoglobin/colloidal silver nanoparticles immobilized in titania sol-gel film on glassy carbon electrode: Direct electrochemistry and electrocatalysis [J]. *Bioelectrochemistry*, 2006, 69(1): 10-15
- [16] Ding C F, Zhao F, Ren R, et al. An electrochemical biosensor for α -fetoprotein based on carbon paste electrode of room temperature ionic liquid and gold nanoparticles [J]. *Talanta*, 2009, 78: 1148-1154