

# 基于纳米四氧化三铁/壳聚糖/石墨烯纳米复合膜修饰的乙酰胆碱酯酶生物传感器检测毒死蜇农药

王辉<sup>1</sup>, 段玉瑶<sup>1</sup>, 李笑<sup>1</sup>, 陈栋菲<sup>2</sup>, 刘刚<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学现代精细农业系统集成研究教育部重点实验室和农业部农业信息获取技术重点实验室, 北京 100083) (2. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博 255049)

**摘要:** 研究了一种采用纳米四氧化三铁 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、壳聚糖 (Chit) 和石墨烯纳米材料 (GR) 复合膜修饰的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 生物传感器 (NF-AChE/Chit- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GR/GCE) 用于毒死蜇农药的检测。该修饰电极的纳米复合膜结合了纳米四氧化三铁独特的吸附和生物相容性、壳聚糖优异的粘合性能以及石墨烯纳米材料大的比表面积和高的电子传递性能的优点, 为乙酰胆碱酯酶提供一个良好的结合界面。通过循环伏安法、交流阻抗谱和方波伏安法研究发现新型修饰电极的电化学性能得到较大提高。在最优检测条件下, 方波伏安法测定发现农药的抑制率与毒死蜇浓度在 0.05  $\mu\text{g/L}$ ~4.5  $\mu\text{g/L}$  范围内呈现良好的线性关系, 线性相关系数 0.997, 最低检出限为 0.02  $\mu\text{g/L}$  ( $S/N=3$ )。将该新型生物传感器用于检测蔬菜样品中毒死蜇的含量, 表现出良好的稳定性和优异的检测精度。

**关键词:** 电化学; 有机磷农药; 生物传感器; 石墨烯; 纳米四氧化三铁

文章编号: 1673-9078(2016)2-276-282

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.040

## A Sensitive Acetylcholinesterase Biosensor Based on Nanocomposite Films of Ferroferric Oxide Nanoparticle, Chitosan, and Graphene for the Detection of Chlorpyrifos Pesticide

WANG Hui<sup>1</sup>, DUAN Yu-yao<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>1</sup>, CHEN Dong-fei<sup>2</sup>, LIU Gang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Precision Agriculture System Integration Research, Ministry of Education, and Key Laboratory of Agricultural Information Acquisition Technology, Ministry of Agriculture, China Agricultural University, Beijing 100083.)

(2. School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

**Abstract:** Ferroferric oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles, chitosan (Chit), and graphene (GR) composite films and Nafion (NF) solution were used to modify the glassy carbon electrode (GCE) in order to prepare an acetylcholinesterase (AChE) amperometric biosensor (NF-AChE/Chit- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GR/GCE) for the detection of chlorpyrifos pesticide. This modified electrode combined the unique absorbability and biocompatibility of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, the excellent adhesiveness of chitosan, and the large specific surface area and excellent electron transport properties of graphene nanomaterials for providing a good binding interface for AChE. The results of cyclic voltammetry, alternating current (AC) impedance spectroscopy, and squarewave voltammetry showed that the electrochemical properties of the newly modified electrode were greatly improved. Under optimum conditions, the results from squarewave voltammetry revealed that the inhibition rates on AChE activity had a good linear relationship with chlorpyrifos concentrations in the range from 0.05  $\mu\text{g/L}$  to 4.5  $\mu\text{g/L}$ ; the linear correlation coefficient was 0.997 and the detection limit was 0.02  $\mu\text{g/L}$  ( $S/N = 3$ ). Finally, this proposed biosensor was applied to determine the chlorpyrifos content in vegetable samples, and it was found that it showed excellent reproducibility and accuracy.

**Key words:** electrochemistry; organophosphorus pesticides; biosensor; graphene; ferroferric oxide nanoparticles

农药的使用消灭和控制了危害农业林业的病虫

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20120008110033)

作者简介: 王辉 (1988-), 男, 学生, 在读博士, 研究方向: 电化学检测

通讯作者: 刘刚 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 精细农业系统集成及传感器研究

草及其他有害生物, 同时也严重危害人类的健康和生存环境<sup>[1]</sup>。据报道我国农药有效利用率利为 30%, 约 70% 残留在环境中, 造成严重的环境污染<sup>[2]</sup>。大量散失的农药挥发到空气中, 流入水体中, 沉降聚集在土壤中, 严重污染农、畜、渔、果产品, 并通过食物链的富集作用转移到人体, 间接对人体产生危害<sup>[3-4]</sup>。

有机磷农药检测的方法主要有气相色谱法(GC)<sup>[5]</sup>、气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[6]</sup>、液相色谱法(HPLC)<sup>[7]</sup>、液相色谱-质谱法(LC-MS)<sup>[8]</sup>、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)<sup>[9]</sup>、生物传感技术检测<sup>[10-11]</sup>；其中生物传感技术中的酶抑制法相比其它方法，具有检测设备体积小、价格低廉、耗时短、易操作、准确度高等优点。因此，研究开发稳定性好、灵敏度高和抗干扰能力强的有机磷农药检测传感器具有重要的意义。

石墨烯<sup>[12]</sup>是一种由碳原子构成的二维纳米材料，理论厚度仅为一个碳原子的厚度；具有大的比表面积、高的导电性和室温电子迁移率，以及优异的机械力学性能；同时还具有电化学窗口宽，电化学稳定性好，电荷传递电阻小，电催化活性高和电子转移速率快等电化学特性，被广泛的应用在检测传感器上<sup>[13-14]</sup>。纳米四氧化三铁<sup>[15-16]</sup>表面光滑性差，形成了凹凸不平的原子台阶，增加了化学反应的接触面；另外，良好的导电性、高度均匀性、优异的生物相容性且无毒副作用等特点，在生物传感器中常被用作支持基质来固定酶，能够促进酶的直接电子转移，增强电催化反应活性。

本研究基于毒死蜱农药对乙酰胆碱酯酶活性的抑制原理，采用纳米四氧化三铁/壳聚糖/石墨烯纳米复合膜修饰的电流型生物传感器。该电极结合了纳米四氧化三铁、石墨烯纳米及壳聚糖优良的性能，具有高的检测精度和良好的稳定性，为检测蔬菜样品中毒死蜱的含量提供了一种新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

CHI-660D 电化学工作站及配套的软件(上海辰华仪器有限公司)；BSA224S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)；HLH-1 红外灯(重庆华伦弘力实业有限公司)；KQ5200 超声清洗仪(昆山舒美超声仪器有限公司)；PHSJ-3F 型酸度计(上海雷磁仪器)；Direct-Q8 超纯水机(美国 Millipore 公司)；离心机(精骐公司)；工作电极为修饰后的玻碳电极( $d=3\text{ mm}$ )，参比电极为 SCE 电极(饱和 KCl 溶液)、对电极为铂电极(天津艾达恒晟科技发展有限公司)。

石墨烯纳米材料(南京先丰纳米材料科技有限公司)；乙酰胆碱酯酶(Type C3389, 500 U/mg 提取于电鳗)、氯化硫代乙酰胆碱(ATC1)、解磷定、毒死蜱、壳聚糖和 Nafion 均购买于美国 Sigma 公司；纳米四氧化三铁(可莱纳米新材料有限公司)；环己酮、丙酮、二甲基甲酰胺(北京化工厂)；0.1 mol/L pH 7.0 磷酸

盐缓冲溶液(PBS)由  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  原液混合制备。实验用到的试剂为分析纯，水为高纯水。

### 1.2 电极的制备

将玻碳电极依次用  $0.3\ \mu\text{m}$  和  $0.05\ \mu\text{m}$  的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  悬浊液的麂皮纸上打磨抛光至镜面，后用乙醇和超纯水超声清洗，并在氮气环境下吹干；将清洗后的玻碳电极放入 0.5 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中用循环伏安法扫描活化(电压范围为  $-0.6\ \text{V}$  到  $1.0\ \text{V}$ )，得到稳定的 CV 图后停止；取 0.2 g/L 的石墨烯溶液  $2.0\ \mu\text{L}$ ，滴涂到活化后电极表面，红外烤灯下干燥；之后取 2.0 g/L 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  与壳聚糖混合悬浊液  $4.0\ \mu\text{L}$ ，滴涂到电极表面并在  $50\ ^\circ\text{C}$  环境中干燥；给修饰好的 Chit- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GR/GCE 电极表面修饰  $7.0\ \mu\text{L}$  的 AChE (0.1 U) 溶液，在  $4\ ^\circ\text{C}$  环境中晾干；最后，修饰  $2.0\ \mu\text{L}$  浓度为 0.2% Nafion 溶液。将得到的 NF-AChE/Chit- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GR/GCE 用 pH 7.0 的磷酸缓冲液清洗后存在  $4\ ^\circ\text{C}$  干燥环境中。

### 1.3 抑制率计算

农药对酶的抑制率 ( $I\%$ )，计算公式如下：

$$I\% = (I_1 - I_2) / I_1 \times 100\%$$

其中， $I_1$  和  $I_2$  分别为农药抑制前后 NF-AChE/Chit- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GR/GCE 电极在含有 0.5 mmol/L ATC1 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中响应电流大小。

### 1.4 样品前处理

将市场购买的蔬菜(白菜，菠菜)用高纯水冲洗多次后晾干；将不同浓度毒死蜱农药均匀地喷洒在蔬菜上，放置一段时间后，分别称取 10.0 g 外层叶片将其打成汁，并加入 20.0 mL 的丙酮和 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液混合物 (1/9, V/V) 超声处理 30 min，然后用离心机将悬浊液离心，取上层清液用于检测。

### 1.5 实验方法

将三电极系统分别插入 5.0 mmol/L  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  + 0.1 mol/L KCl 溶液和含有 0.5 mmol/L ATC1 的 PBS 溶液中，用循环伏安法 (CV) 和阻抗谱 (EIS) 研究修饰电极的电化学性能；方波伏安法 (SWV) 用于优化电极的检测参数和检测有机磷农药的含量。检测农药含量时，NF-AChE/Chit- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /GR/GCE 浸泡在被测样品中 10 min，后用 pH 7.0 的 PBS 溶液冲洗电极表面；将检测后的修饰电极放入 5.0 mmol/L 解磷定溶液中 15 min 恢复酶活性。

## 2 结果与讨论

## 2.1 电极表征

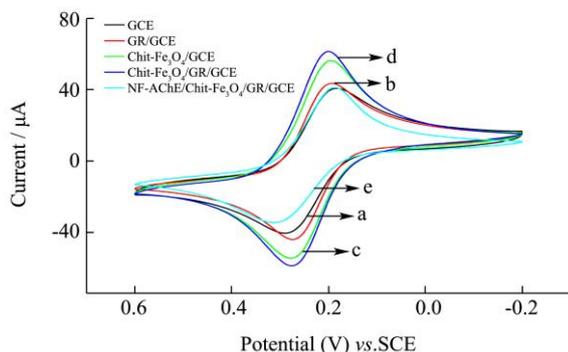


图 1 不同电极在 5.0 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  + 0.1 mol/L KCl 溶液中的循环伏安响应

**Fig.1 Cyclic voltammetric response of different electrodes in 5.0 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  + 0.1 mol/L KCl solution with a scan rate of 50 mV/s**

注：扫描速率 50 mV/s; (a) GCE, (b) GR/GCE, (c) Chit- $Fe_3O_4$ /GCE, (d) Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE, (e) NF-AChE/Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE.

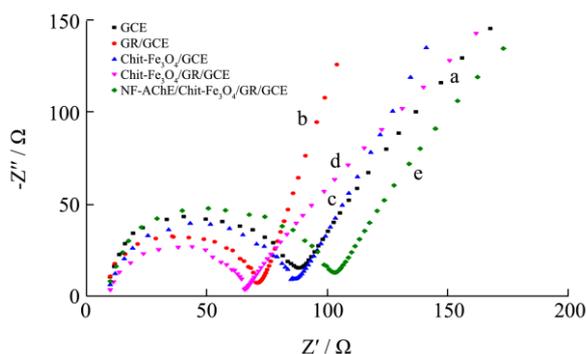


图 2 不同电极在 5.0 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  + 0.1 mol/L KCl 溶液中的交流阻抗谱(频率范围为 0.1~ $10^6$  Hz)

**Fig.2 AC impedance spectra of different electrodes in 5.0 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  + 0.1 mol/L KCl solution with the frequencies from 1 to  $10^6$  Hz**

注：(a) GCE, (b) GR/GCE, (c) Chit- $Fe_3O_4$ /GCE, (d) Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE, (e) NF-AChE/Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE.

用循环伏安法研究修饰电极在 5.0 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$ 和 0.1 mol/L KCl 的溶液中电化学特性。图 1 中可以看出,未修饰的 GCE (图 1a) 在  $K_4[Fe(CN)_6]$  溶液峰电流约为 38  $\mu A$ , 氧化峰电位与还原峰电位差 ( $\Delta E$ ) 为 108 mV; 在玻碳电极表面修饰石墨烯纳米材料 GR/GCE (图 1b), 电极的氧化还原峰电流略有增大、峰电位差  $\Delta E$  也略有减小, 由于石墨烯纳米材料优异的物理性能增大电极的比表面积和提升了导电性; Chit- $Fe_3O_4$ /GCE (图 1c) 的氧化还原峰电流比未修饰的 GCE 有显著的提升, 说明纳米四氧化三铁

材料良好的导电性和宏观隧道效应, 增加了化学反应的接触面; 石墨烯和纳米四氧化三铁复合膜修饰电极 Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE (图 1d), 具有强的氧化还原峰电流信号和较小的氧化还原峰电位差, 这说明 Chit- $Fe_3O_4$ /GR 复合膜有效的结合了石墨烯纳米材料与纳米四氧化三铁优良的性能, 具备良好的电子传递速率和活性位点, 使电极表面的电子传导性以及电化学反应的可逆性均得到了一定程度的提高; NF-AChE/Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE (图 1e), 由于 NF-AChE 膜导电性能差, 阻碍了电子在修饰电极表面的传输, 降低了电极的导电性能。

采用交流阻抗谱进一步研究修饰电极表面电化学反应的动力信息, 如图 2 所示。玻碳电极的阻抗约为 80  $\Omega$  (曲线 a), 相比之下修饰石墨烯纳米材料 GR/GCE (曲线 b) 和纳米四氧化三铁 Chit- $Fe_3O_4$ /GCE (曲线 c) 电极的阻抗小一些, 分别约为 60  $\Omega$ 、75  $\Omega$ , 主要由于纳米表面与界面效应、量子尺寸效应和优良的导电性能提高了电极的导电性; 而 Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE (曲线 d) 阻抗谱中的高频谱图的半圆弧半径明显减小约为 50  $\Omega$ , 这说明纳米四氧化三铁与石墨烯形成了一种新的复合膜, 该复合膜具有良好的电化学稳定性、高的电子传导率以及快的电化学反应速率, 降低了表面双电层厚度和加快了修饰电极表面的电子转移速率, 使  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  氧化还原电子对非常容易到达电极表面, 发生氧化还原反应; 由于酶是大分子蛋白质不导电, AChE 成功的修饰到 Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE 电极上, 修饰电极的电阻增大, 约为 100  $\Omega$ 。

## 2.2 对比

研究不同修饰电极对 ATCl 底物的电化学反应, 如图 3 所示。当 PBS 缓冲液中未加入 ATCl 底物时, GCE (图 3-a) 和 NF-AChE/Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE (图 3-b) 的循环伏安曲线都没有出现明显的氧化峰; 当在 PBS 缓冲液中加入 0.5 mmol/L ATCl 底物后, NF-AChE/Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE 对缓冲液中的底物 ATCl 有明显的响应 (图 3-e), 其循环伏安曲线在 660 mV 出有明显的不可逆氧化峰, 其氧化峰电流约为 15  $\mu A$ , 而 Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE 循环伏安曲线并没有观察到明显的氧化峰 (图 3-c), 说明检测到的氧化峰电流是由于 AChE 催化溶液中 ATCl 水解产生电活性物质硫代胆碱, 其氧化而形成的。没有修饰纳米四氧化三铁与石墨烯复合膜的电极 NF-AChE/GCE (图 3-d) 的氧化峰值明显小于修饰纳米四氧化三铁与石墨烯复合膜的 NF-AChE/Chit- $Fe_3O_4$ /GR/GCE, 说明纳米四氧化三铁

与石墨烯复合膜提高了酶与电极表面的电子转移速率。有机磷农药可以抑制 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极表面 AChE 的活性,降低了电极催化乙酰胆碱水解的能力,进而影响电极检测到胆碱的含量。因此, NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极可用于有机磷农药含量的检测。

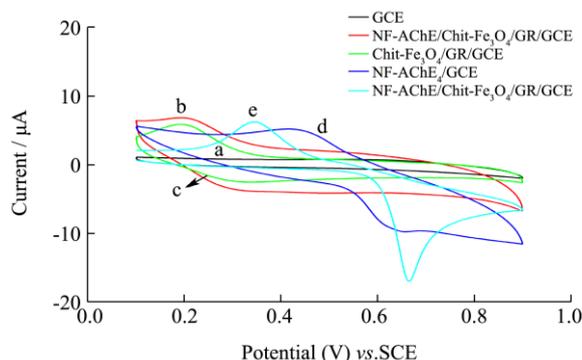


图3 (a) GCE 和 (b) NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 在 pH 7.0 PBS 溶液中的循环伏安响应; (c) Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE, (d) NF-AChE/GCE 和 (e) NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 在含 0.5mmol/LATCl 的 pH 7.0 PBS 溶液的循环伏安响应, 扫描速率 50 mV/s

Fig.3 Cyclic voltammetric responses of (a) GCE and (b) NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE in pH 7.0 PBS buffer solution; cyclic voltammetric responses of (c) Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE, (d) NF-AChE/GCE and (e) NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE in pH 7.0 PBS buffer solution containing 0.5 mmol/L ATCl at a scan rate of 50 mV/s

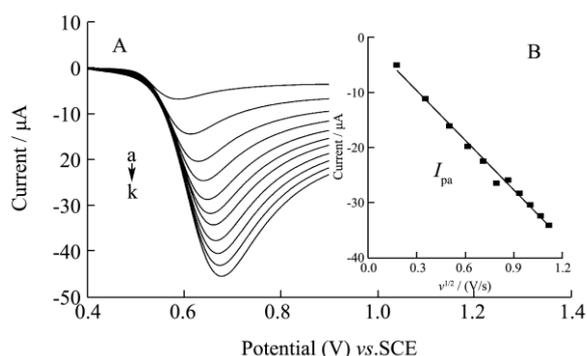


图4 (A) 不同扫描速率下 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极在 0.5 mmol/L ATCl 溶液中的循环伏安图, 从扫描速率依次为 10、40、80、120、160、200、240、280、320、360 和 400 mV/s; (B) 扫描速率与峰电流 ( $I_p$ ) 的线性关系

Fig. 4 (A) Cyclic voltammograms of NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE in 0.5 mmol/L ATCl solution with different scan rates, from a to k: 10, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, and 400 mV/s, respectively; (B) Linear relationship of peak current ( $I_p$ ) versus  $v^{1/2}$

### 2.3 扫描速度

研究扫描速率变化对修饰电极的电化学响应的影响,如图4所示。由图4-A可知,随着扫描速率逐渐增加,在 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 上的响应峰电位与峰电流随着扫描速率的增大而增大,其中氧化峰电流与  $v^{1/2}$  呈现良好的线性关系(图4-B),线性回归方程为  $I_{pa}(\mu A) = -30.07 v^{1/2}(V/s) + 0.724 (r=0.995)$ ,这说明修饰电极在 10~400 mV/s 范围内的反应是扩散控制过程。

### 2.4 实验条件优化

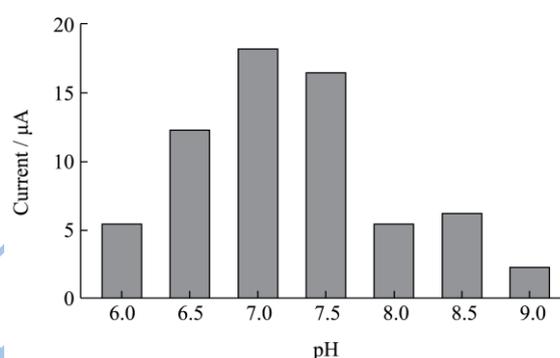


图5 pH 与 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 的响应峰电流关系  
Fig.5 Relationship between pH and peak current of NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE

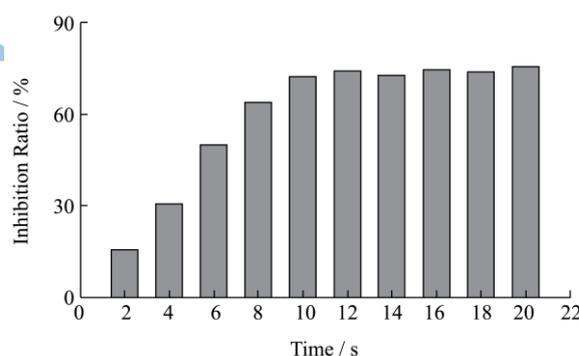


图6 抑制时间与 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 的抑制率关系  
Fig.6 Relationship between inhibition time and inhibition rate of NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE

研究 pH 的变化对修饰电极 AChE 活性的影响,用 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极检测不同 pH 下缓冲溶液中 0.5 mmol/L ATCl, 响应结果如图5所示。由于 AChE 是具有生物活性的大分子蛋白质,pH 的变化能会使其活性发生不可逆的丧失;当 pH 值为 7.0 时,检测峰电流的响应值达到最大,说明在中性的环境中 AChE 的活性最强,修饰电极表面活性离子基团性能最佳;当 PBS 缓冲液 pH 过高或者过低时,会改

变这些离子基团,进而改变活性位点的生物活性,使酶的催化性能降低。因此,检测缓冲液的最优 pH 值为 7.0。

研究酶抑制时间对 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极响应性能的影响。将修饰电极浸入到 10 μg/L 的毒死蜱溶液中分别抑制 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 min,然后将抑制后的电极放入含有 0.5 mmol/L ATC1 的 PBS 溶液中进行检测,记录对应的响应峰电流值,最后计算抑制率与抑制时间的关系,结果如图 6 所示。由二者的关系图可知,在 0~10 min 内,随着抑制时间的增加,抑制率逐渐增加;当抑制时间超过 10 min 后抑制率趋于平缓,表明农药抑制酶活性趋于饱和。因此,选择 10 min 为 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 的最佳抑制时间。

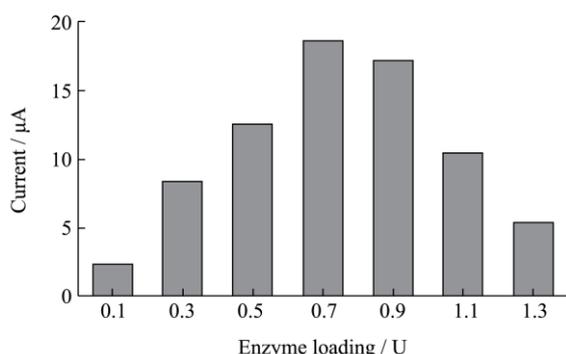


图 7 酶负载量与 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 的响应峰电流关系

Fig.7 Relationship between enzyme loading and peak current of NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE

研究电极表面 AChE 负载量与响应峰电流之间的关系。如图 7 所示,发现随着电极表面修饰 AChE 负载量的逐渐增大,电极检测峰电流会先增大后减小。这主要因为随着电极表面酶负载量增加,催化 ATC1 产生的硫代胆碱的量增加,电极检测到的响应峰电流也逐渐变大;另外,电极表面酶膜的厚度会随着 AChE 负载量的增加而逐渐增厚,这样会阻碍底物水解产生的硫代胆碱到电极的扩散,造成电极检测峰电流会逐渐减小。因此,选择 0.7 U 作为酶的最佳负载量。

表 1 乙酰胆碱酯酶传感器性能比较

Table 1 The performance of acetylcholinesterase biosensor

电极	检测范围/(μg/L)	检测限/(μg/L)	参考文献
AChE-Cd <sub>0.5</sub> Zn <sub>0.5</sub> S-rGO	1~1000	0.3	[17]
CLDH-AChE/GN-AuNPs/GCE	0.05~150	0.05	[18]
AChE/P/SPE	10~500000	6	[19]
NF-AChE/Chit-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /GR/GCE	0.05~4.5	0.02	本研究

## 2.6 稳定性和再现性

## 2.5 线性关系

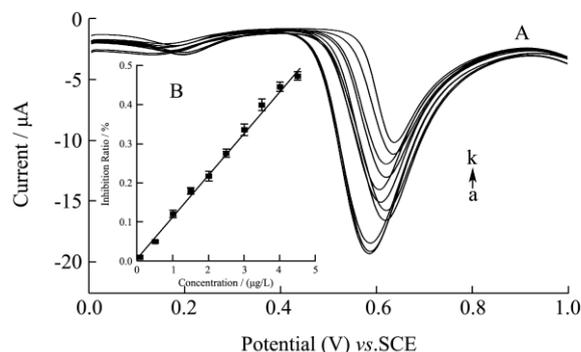


图 8 (A)不同浓度毒死蜱农药抑制 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 后上的方波伏安曲线(从 a 到 k 浓度依次为 0、0.05、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 μg/L; (B) 线性回归曲线

Fig.8 (A) Square wave voltammetry of NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE inhibited by various concentrations of chlorpyrifos (from a to k: 0, 0.05, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, and 4.5 μg/L, respectively); (B) Linear regression curve

将 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极依次置于含有不同浓度的毒死蜱溶液中抑制 10 min 后,放入含有 0.5 mmol/L ATC1 的 PBS 溶液中;用方波伏安法(初始点位: 0 V; 终止电位: 1.0 V; 电位增量: 0.004 V; 振幅: 0.025 V; 频率: 15 Hz; 静止时间: 2 s;)对溶液中底物进行检测,测得结果如图 8-A 所示。在最优检测条件下,没有被毒死蜱抑制的电极在 0.5~0.8 V 之间有很强的响应峰电流信号;随着毒死蜱浓度的增加,修饰电极表面乙酰胆碱酯酶活性受到不同程度的抑制,抑制的程度会随着毒死蜱浓度的增大而增大,两者在 0.05 μg/L~4.5 μg/L 范围内呈现良好的线性关系(图 8-B),其线性回归方程为:  $I = 0.105C + 0.005$ , 相关系数分别为 0.997, 检测下限为 0.02 μg/L (S/N=3)。如表 1 所示,实验研究电极与其它乙酰胆碱酯酶电极的比较,可知 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极具有较低检测限。

将制备好的 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 电极存储在 4 °C 的环境中,每隔七天用该修饰电极检测含

有 0.5 mmol/LATCl 的磷酸盐缓冲溶液, 记录检测峰电流信号。通过对比检测峰电流发现: 电极的响应峰电流在 0~14 d 内性能基本没有变化, 之后随着时间增加而检测电流值逐渐降低; 在 28 d 后响应电流大小降低为原电流的 91.23%, 在 42 d 后为原电流的 57.54%。说明电极在 0~28 d 内具有较好的稳定性。

采用同样步骤制备 5 支 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE, 经过 1.0 μg/L 毒死蜱农药抑制 10 min 后, 放入含 0.5 mmol/L 的 ATCl 的 PBS 中进行检测, 五支电极的抑制率的相对标准差为 4.51%。说明 NF-AChE/Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 传感器具有较好的再现性。

## 2.7 样本测试

为了验证该 NF-AChE /Chit-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GR/GCE 生物传感器对实际样品的毒死蜱农药的检测性能, 电极对实际样品进行检测, 结果如表 2 所示。在蔬菜样品中添加一定量的农药, 测得其回收率在 95.0%~108.0% 范围内, 相对标准偏差在 1.63%~3.21% 之间, 结果表明制备的生物传感检测蔬菜样品准确、快速, 可以用于实际样品的检测。将其检测结果与与高效液相色谱法的检测结果进行比较, 经 t 检验样本点测量值之间无显著性差异 (P>0.05)。

表 2 蔬菜中有机磷农药毒死蜱的检测结果

样品	添加毒死蜱 (mg/kg)	NF-AChE /Chit-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /GR/GCE			高效液相色谱	
		检测值/(mg/kg)	RSD/%	回收率/%	检测值/(mg/kg)	RSD/%
生菜	0	-	-	-	-	-
	1.0	0.95	1.63	95.0	0.99	4.35
	3.0	3.17	3.21	105.7	3.11	2.61
菠菜	0	-	-	-	0.02	2.66
	1.0	1.08	2.46	108.0	1.15	1.84
	3.0	3.22	3.03	107.3	3.17	3.58

## 3 结论

本研究以纳米三氧化二铁/壳聚糖/石墨烯复合膜作为电子媒介, 然后在电极表面依次修饰乙酰胆碱酯酶和 Nafion, 制作了一种基于有机磷农药对乙酰胆碱酯酶抑制的电流型生物传感器。并采用多种方法对其电化学性能和检测环境参数进行研究与优化, 构建了一种有机磷农药残留检测的新方法, 有望用于蔬菜等农产品中有机磷农药残留检测。

## 参考文献

- [1] 郭荣. 我国生物农药的推广应用现状及发展策略[J]. 中国生物防治学报, 2011(01): 124-127  
GUO Rong. Extension, application and developmental strategies of biopesticides in China [J]. China Journal of Biological Control. 2011(01): 124-127
- [2] 潘攀, 杨俊诚, 邓仕槐, 等. 土壤-植物体系中农药和重金属污染研究现状及展望[J]. 农业环境科学学报, 2011(12): 2389-2398  
PAN Pan, YANG Jun-cheng, DENG Shihuai, et al. Proceedings and prospects of pesticides and heavy metals contamination in soil-plant system [J]. Journal of Agro-Environment Science. 2011, 12: 2389-2398
- [3] Liu Yan, Yang Shanli, Niu Weifen. Simple, rapid and green

- one-step strategy to synthesis of graphene/carbon nanotubes/chitosan hybrid as solid-phase extraction for square-wave voltammetric detection of methyl parathion [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 108: 266-270
- [4] Gong Jingming, Guan Zhangqiong, Song Dandan. Biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto layered double hydroxides for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 39(1): 320-323
- [5] Gao Ding, Chen ShiHeng, Zhang Qing, et al. Simultaneous determination of 35 organophosphorus pesticide residues in wheat flour by gas chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(4): 1116-1121
- [6] Molina-Ruiz Juan Manuel, Cieslik Ewa, Cieslik Iwona, et al. Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography-mass spectrometry [J]. Environment Science and Pollution Research, 2015, 22(1): 369-378
- [7] Amelin V G, Lavrukhin D K, Tretjakov A V, et al. Determination of polar pesticides in water, vegetables, and fruits by high performance liquid chromatography [J]. Moscow University Chemistry Bulletin, 2012, 67(6): 275-282

- [8] Forster Simon, Altmaier Stephan. Qualitative LC-MS Analysis of pesticides using monolithic silica capillaries and potential for assay of pesticides in kidney [J]. LC GC EUROPE, 2013, 26(9): 488-496
- [9] Berton Thierry, Mayhoub Flora, Chardon Karen, et al. Development of an analytical strategy based on LC-MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and their metabolites in meconium: application and characterisation of foetal exposure in France [J]. ENVIRONMENTAL RESEARCH, 2014, 132: 311-320
- [10] Mishra Rupesh K, Dominguez Rocio B, Bhand Sunil, et al. A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 32(1): 56-61
- [11] Chen Aiqiong, Du Dan, Lin Yuehe. Highly sensitive and selective immuno-capture/electrochemical assay of acetylcholinesterase activity in red blood cells: a biomarker of exposure to organophosphorus pesticides and nerve agents [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(3): 1828-1833
- [12] Vashist Sandeep Kumar, Luong John H T. Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites [J]. CARBON, 2015, 84: 519-550
- [13] Sun Wei, Wang Xiuzhen, Zhu Huanhuan, et al. Graphene-MnO<sub>2</sub> nanocomposite modified carbon ionic liquid electrode for the sensitive electrochemical detection of rutin [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 178: 443-449
- [14] 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 & Bioelectronics, 2015, 65: 23-30
- [15] Sadeghi Susan, Fooladi Ebrahim, Malekaneh Mohammad. A new amperometric biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Polyaniline/Laccase/Chitosan biocomposite-modified carbon paste electrode for determination of catechol in tea leaves [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(3): 1603-1616
- [16] Wang Yang, Wang Lu, Tian Tian, et al. A highly sensitive and automated method for the determination of hypoxanthine based on lab-on-valve approach using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs/beta-CD modified electrode [J]. Talanta, 2012, 99: 840-845
- [17] Liu Qian, Cai Jianrong, Huan Juan, et al. A visible light photoelectrochemical biosensor coupling enzyme-inhibition for organophosphates monitoring based on a dual-functional Cd<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.5</sub>S-reduced graphene oxide nanocomposite [J]. Analyst, 2014, 139(5): 1121-1126
- [18] Zhai Chen, Guo Yemin, Sun Xia, et al. An acetylcholinesterase biosensor based on graphene-gold nanocomposite and calcined layered double hydroxide [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 58-59: 8-13
- [19] Chen WenFei, Ding JianYing, Huang HongCheng, et al. Fabrication of disposable organophosphorus pesticide enzyme biosensor modified by polythionine [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(2): 653-658