

植物酯酶光纤传感器检测有机磷农药

栾崇林, 金兴良, 马文石, 汪军¹ (1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳518055; 2. 深圳市海洋与渔业监测站, 广东深圳518049; 3. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东广州510640)

摘要 [目的] 探究植物酯酶检测有机磷农药的效果。[方法] 采用研究溶胶凝胶法包埋植物酯酶的方法, 制备有机磷传感膜, 将该传感膜与光纤等器件耦合成有机磷光纤生物传感器, 观测该传感器的稳定性及灵敏度。[结果] 将该传感器用于检测7种有机磷农药观察发现, 有机磷农药浓度在0.010~10.000 μg/ml 浓度范围内, 抑制率与农药浓度的对数值呈良好线性关系, 样品加标回收率在90.8%~96.3%, 测定值的相对标准偏差小于5%, 常见无机阴阳离子对测定无显著干扰。[结论] 该传感器可应用于蔬菜中有机磷农残检测。

关键词 植物酯酶; 有机磷农药; 溶胶凝胶; 光纤传感器

中图分类号 O657 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)28-08794-02

Detecting Organophosphorus Pesticide by Optical Fiber Sensor of Botanic Esterase

LUAN Chong-lin et al (School of Applied Chemistry and Biotechnology, Shenzhen Vocational Technology College, Shenzhen, Guangdong 518055)

Abstract [Objective] The aim of the research was to explore the effects of detecting organophosphorus pesticide by using plant esterase. [Method] Plant esterase was embedded by sol-gel method to prepare organophosphorus sensing film. This sensing film, optical fiber and so on were coupled to organophosphorus optical fiber biosensor and the stability and sensitivity of this sensor were observed. [Result] When this sensor was applied to detect 7 kinds of organophosphorus pesticides, the inhibition rate showed a good linear relationship with the logarithm value of pesticide concentration in the range of organophosphorus pesticide concentration of 0.010~10.000 μg/ml. The recovery of standard addition was 90.8%~96.3%, and relative standard deviation was less than 5% and common inorganic anions and cations had no significant disturbance on the detection. [Conclusion] This sensor could be used in the detection of organophosphorus pesticide residues in vegetables.

Key words Plant esterase; Organophosphorus pesticide; Sol-gel; Optical fiber sensor

酶等生物分子在空气-水界面易发生氧化还原反应或三级结构的变化, 从而失去活性。如果将生物分子固定在生物相容的惰性材料中, 那么它们就可以有效地保持其生物活性, 延长其使用时间^[1]。利用溶胶凝胶法固定胆碱酯酶, 检测有机磷农药在国内外已有报道^[2]。但胆碱酯酶来源于动物体, 价格贵, 保存较为困难。植物酯酶来源广、成本低、易保存。近年来已有用植物酯酶检测有机磷农药的报道^[3-4]。笔者研究了溶胶凝胶法包埋植物酯酶的方法, 制备了有机磷传感膜, 将该传感膜与光纤等器件耦合成有机磷光纤生物传感器。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 仪器。PORS-15 型光谱仪, 配有石英分支光纤(北京普析通用仪器有限责任公司); XB14 型超声波振荡仪(英国 Grant 仪器设备有限公司); UV-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.1.2 试剂。四甲氧基硅烷(TMOS)(99%, 德国 ABCR 化学试剂公司), PVA(中国医药集团上海化学试剂公司), 盐酸(广州化学试剂二厂), 固蓝 B 盐(中国医药集团上海化学试剂公司), 植物酯酶(实验室提取), 乙酸-萘酯(国药集团化学试剂有限公司)。以上试剂未注明者皆为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

1.1.3 pH 值 6.0 磷酸盐缓冲溶液。分别取浓度为 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液 12.3 ml 和浓度为 0.2 mol/L 的 NaH₂PO₄ 溶液 87.7 ml, 混合配制成 pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲溶液。

1.1.4 有机磷农药标准品。敌敌畏、辛硫磷、毒死蜱、马拉硫磷、杀螟硫磷、二嗪磷和甲基磷(农业部环境保护研究所)。

1.2 传感膜的制备

1.2.1 杂化溶胶的制备。取一定量的 TMOS 于锥形瓶中, 再

加入一定量的去离子水, 利用超声波振荡 15 min, 再置于 50℃ 水浴中预热, 并电磁搅拌 5 min, 然后滴加 2 ml 0.1 mol/L 盐酸, 约 10 min 滴加完毕, 再继续恒温反应 90 min, 即得二氧化硅溶胶。取 8.5 g 5% PVA 水溶液于锥形瓶中, 50℃ 水浴中预热搅拌 5 min, 然后向其中滴加 1.5 ml 二氧化硅溶胶, 约 10 min 滴加完毕后再反应 90 min, 即得到 PVA/SiO₂ 有机无机杂化溶胶。

1.2.2 植物酯酶的固定。PVA/SiO₂ 溶胶中加入一定量的固蓝 B 盐溶液, 然后置于旋涡振荡器上以 50 r/min 的转速振荡 3 min, 加入适量 pH 值 6.0 磷酸盐缓冲溶液, 再向其中加入一定量的植物酯酶溶液, 改以 20 r/min 的速度振荡 3 min。最后, 将得到的混合溶胶均匀涂布在载玻片上, 置于 4℃ 冰箱内, 水平面上干燥 24 h 后即得到有机磷传感膜。

1.3 测定方法 将制好的传感膜分割成小圆片(D=4.00 mm, T=0.01 mm), 取一片置于分支光纤的浸入式探头中, 然后将探头插入样品池中(样品池处于 30℃ 水浴中), 加入样品 1.0 ml, 再加入 pH 值 6.0 磷酸盐缓冲溶液 1.6 ml, 抑制反应 10 min 后, 加入 1.6 mmol/L 乙酸-萘酯溶液 0.8 ml, 显色反应 12 min 后, 再于 520 nm 波长下测得吸光度值 A₁, 以二次蒸馏水代替样品测得吸光度值 A₀, 计算抑制率(IR)。

$$IR = (A_0 - A_1) / A_0 \quad (1)$$

1.4 几种有机磷农药的工作曲线 对敌敌畏、辛硫磷、毒死蜱、马拉硫磷、杀螟硫磷、二嗪磷和甲基磷 7 种有机磷农药在浓度 0.001、0.003、0.010、0.032、0.100、0.316、1.000、3.220 和 10.000 μg/ml 按“1.3”方法测定。以抑制率为纵坐标, 以有机磷浓度的对数值为横坐标, 绘制工作曲线。

由图 1 可知, 当有机磷农药浓度在 0.010~10.000 μg/ml, 抑制率与农药浓度的对数值呈良好的线性关系。

2 结果与分析

2.1 传感膜配方优化 为了优化传感膜配方, 采用正交设计试验, 改变杂化溶胶、固蓝 B 盐溶液和酶液的用量, 制备了

基金项目 深圳市科技计划项目(2004B121); 深圳职业技术学院科技基金项目(07K042BQ)。

作者简介 栾崇林(1965-), 男, 山东青岛人, 博士, 副教授, 从事分析测试科学及食品安全的研究。

收稿日期 2007-07-15

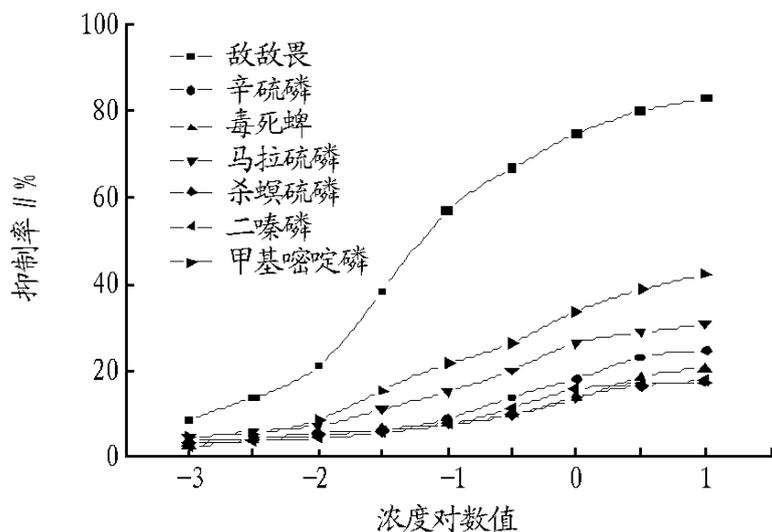


图1 7种有机磷农药对植物酯酶抑制率与浓度对数值的关系不同配方的传感膜。固定敌敌畏的浓度为 $0.100 \mu\text{g/ml}$,测定其对不同配方制得的传感膜中酶的抑制率。由表1可知,按照配方5制得的传感膜对酶的抑制率最大,达56%。

表1 传感膜的配方优化

配方	杂化溶胶 μ	固蓝B盐溶液 μ	酶液 μ	抑制率 %
1	1 600	200	200	48
2	1 700	200	100	42
3	1 800	200	50	39
4	1 700	100	200	50
5	1 800	100	100	56
6	1 900	100	50	41
7	1 800	50	200	53
8	1 900	50	100	54
9	2 000	50	50	43

2.2 光谱特征及传感机理 包含植物酯酶和显色剂固蓝B盐的有机磷传感膜与乙酸-萘酯作用生成-萘酚。生成的-萘酚与显色剂形成一种紫红色的偶氮化合物。在350~750 nm范围内,分别对传感膜在显色反应前后进行吸收曲线扫描。由图2可知,变色反应后,传感膜在520 nm出现了一个新的吸收峰。该峰应为显色反应生成物对应的吸收峰。由于有机磷可抑制植物酯酶的活性,减弱显色反应,有机磷含量越大,对植物酯酶的抑制率越大,传感膜颜色减弱的程度也就越大,因此通过对传感膜在520 nm处吸光值的测定,可计算有机磷的含量。

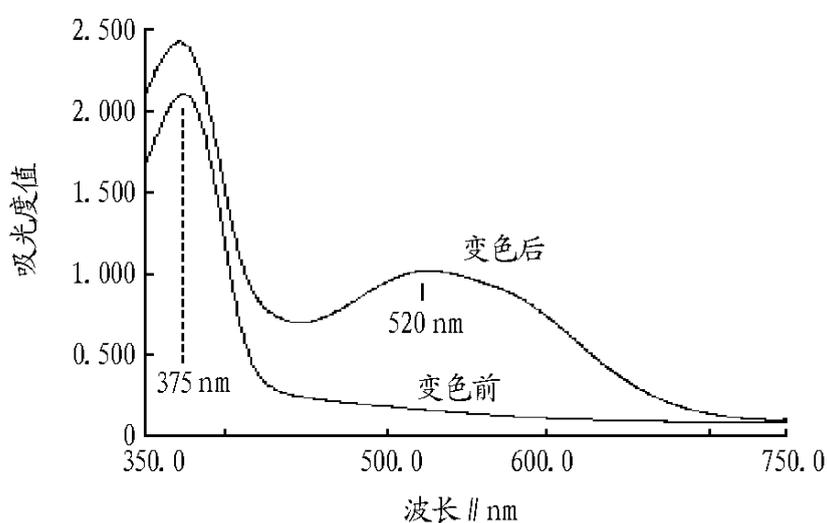


图2 传感膜变色前后吸收曲线

2.3 乙酸-萘酯用量选择 为了选取最佳乙酸-萘酯溶液的用量,分别对不同乙酸-萘酯溶液用量条件下膜的响应时间进行了测定。由表2可知,随着底物乙酸-萘酯用量的增加,传感膜的响应时间逐渐缩短。当乙酸-萘酯加入量达 0.80 ml 以后,响应时间不变,说明此时乙酸-萘酯用量相对

于传感膜中的酶来说已趋于饱和。因此,该文选定乙酸-萘酯溶液加入量为 0.80 ml 。

表2 不同底物组成时传感膜的响应时间

试验号	缓冲溶液体积 ml	乙酸-萘酯溶液体积 ml	响应时间 min
1	3.84	0.16	31
2	3.68	0.32	25
3	3.52	0.48	19
4	3.36	0.64	15
5	3.20	0.80	12
6	3.04	0.96	12
7	2.88	1.12	12

2.4 传感膜稳定性考察 将制得的传感膜置于pH值6.0磷酸盐缓冲溶液中,于4℃冰箱中保存。每天利用该传感膜对浓度为 $0.10 \mu\text{g/ml}$ 敌敌畏进行抑制率测定,共测定30 d。结果表明,在20 d内,所测的抑制率基本稳定,相对误差小于8%。

2.5 干扰试验 该文考察了常见阴阳离子 K^+ 、 Na^+ 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 对样品($0.100 \mu\text{g/ml}$ 敌敌畏)测定的干扰。以检测结果相对误差小于 $\pm 10\%$ 视为不干扰测定。试验结果表明,除 Fe^{3+} 在 $20 \mu\text{g/ml}$ 时,对测定结果有干扰外,其他离子在 $100 \mu\text{g/ml}$ 时不干扰测定。加入 1 ng/ml EDTA水溶液 0.2 ml ,可消除 Fe^{3+} 的干扰。

2.6 样品处理及测定 准确称取不同的有机蔬菜样品约10 g,喷洒 5 ml $0.100 \mu\text{g/ml}$ 敌敌畏(相当于每克样品加标量为 $0.050 \mu\text{g}$)。将菜叶剪碎,置于小锥形瓶中,加入 10 ml 丙酮,超声波振荡3 min,再静置3~5 min。取 1 ml 上层澄清液,按“1.3”进行测定。根据标准曲线,求得样品中有机磷残留量。

由表3可知,样品加标回收率在90.8%~96.3%,加标回收率测定值的平均相对标准偏差小于5%,表明植物酯酶法光纤传感器检测有机磷准确度较高。

表3 蔬菜样品中农残的检测结果

样品	加入量 μg	测定值	回收率	平均回收率 %	相对标准偏差 %
		μg	%		
麦菜	0.500	0.427	85.4	90.8	4.9
		0.456	91.2		
		0.432	86.4		
		0.470	94.0		
		0.485	97.0		
生菜	0.500	0.453	90.6	92.8	2.7
		0.446	89.2		
		0.471	94.2		
		0.473	94.6		
		0.476	95.2		
大白菜	0.500	0.445	87.6	91.2	4.8
		0.482	87.5		
		0.423	81.2		
		0.477	90.6		
		0.453	89.6		
青瓜	0.500	0.480	96.0	96.3	1.8
		0.471	94.2		
		0.478	95.6		
		0.495	99.0		
		0.483	96.6		

参考文献

- [1] 鞠焜先. 电分析化学与生物传感技术[M]. 北京: 科学出版社,2006: 230-257.
- [2] 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,2003,24(4): 92-94.
- [3] 钟树明, 袁东星, 金晓英, 等. 植物酶抑制技术用于检测蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留[J]. 环境化学,2002,21(2): 189-193.
- [4] 韩承辉, 谷巍, 王乃岩, 等. 快速测定水中有机磷农药方法的研究[J]. 环境化学,2000,19(2): 187-189.