

生物酶电化学传感器在有机磷农药检测的研究进展

张媛媛¹, 王少伟¹, 徐强², 李欣², 张明明², 张升晓²

(1. 山东省烟台生态环境监测中心, 山东 烟台 264004; 2. 鲁东大学 化学与材料科学学院, 山东 烟台 264039)

摘要: 有机磷农药在农业和生活中应用非常广泛, 因而持续存在于水源、水果、蔬菜和加工食品中, 对人类健康和环境造成极大的危害. 因此, 建立快速便捷、高灵敏度和高选择性的有机磷农药检测方法是很有必要的. 生物传感检测技术能够满足有机磷农药分析的需要, 得到了广泛的应用. 本文综述了多种电化学生物传感器检测有机磷农药的原理和方法, 通常包括抑制酶电极和催化反应酶电极. 抑制酶电极所采用的生物酶包括乙酰胆碱酯酶(AChE)、丁酰胆碱酯酶、酪氨酸酶和碱性磷酸酶等, 反应酶电极主要采用有机磷酸水解酶. 通过对比表明, 基于AChE抑制酶电极的电流生物传感器具有最高的灵敏度, 其线性范围在 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限能够达到 $1 \times 10^{-11} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: 有机磷农药; 检测; 电化学生物传感器; 生物酶

中图分类号: O657.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-8020(2020)03-0239-05

有机磷化合物能够高效杀灭各种害虫, 在农业领域得到了广泛的应用, 但也引起了水资源、蔬菜、水果和加工食品等的污染, 对生态环境和人类健康造成极大的危害^[1]. 为监控有机磷农药的污染, 建立快速可靠的检测方法至关重要. 目前, 有机磷农药的分析方法主要有比色法、毛细管电泳法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、核磁共振波谱法、酶联免疫吸附测定法等, 然而这些方法存在样品预处理步骤复杂、耗时较长、设备昂贵、难以现场检测等缺点^[2]. 酶电极法具有选择性好、灵敏度高、测量速度快、使用方便、不破坏样品等优点, 从而在生化研究、监测等方面可发挥重要的作用. 目前, 有机磷传感器包括测量剩余酶活性的抑制酶电极, 例如乙酰胆碱酯酶(AChE)、丁酰胆碱酯酶(BChE)、酪氨酸酶、碱性磷酸酶等, 还包括测量水解能力的酶, 如有机磷酸水解酶(OPH). 本文主要综述电化学生物传感器在有机磷农药检测中的研究进展.

1 抑制酶生物传感器

1.1 抑制酶电化学生物传感器原理

首先, 在抑制酶生物传感器中不存在有机磷化

合物时, AChE/BChE可与底物乙酰硫代胆碱或丁酰硫代胆碱生成硫代胆碱, 硫代胆碱在外加电压下会发生氧化-二聚反应; 当有机磷化合物存在时, AChE/BChE则无法将乙酰硫代胆碱或丁酰硫代胆碱转化为硫代胆碱, 因此氧化反应在电极产生的电流与样品中有机磷的量成反比关系^[3], 以此实现定量测定有机磷化合物的目标. AChE/BChE生物传感器用于检测有机磷化合物的原理如图1所示.

电化学生物传感器利用电极分析生物组分或生物受体(酶)生成的电活性成分, 产生的信号可以通过氧化还原反应中的电流变化检测, 称为电流生物传感器, 也可以检测反应介质中溶液pH值的变化, 称为电位生物传感器^[4].

1.2 电流型抑制酶有机磷生物传感器

在电流生物传感器中, 工作电极和参比电极电压保持恒定, 酶催化的氧化还原反应产生净电流, 净电流的大小与样品中电极活性物质的浓度成比例. 当有机磷化合物存在时, AChE的活性被抑制, 通过采用不同的基质固定AChE, 可以得到多种电流生物传感器, 检测有机磷农药具有不同检测限和线性范围.

收稿日期: 2020-05-02; 修回日期: 2020-06-06

基金项目: 国家自然科学基金(21207059)

第一作者简介: 张媛媛(1978—), 女, 山东济宁人, 硕士, 研究方向为环境分析. E-mail: jinanzzy@163.com

通信作者简介: 张升晓(1977—), 男, 山东临沂人, 副教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向为环境化学. E-mail: ldzxsx@ldu.edu.cn

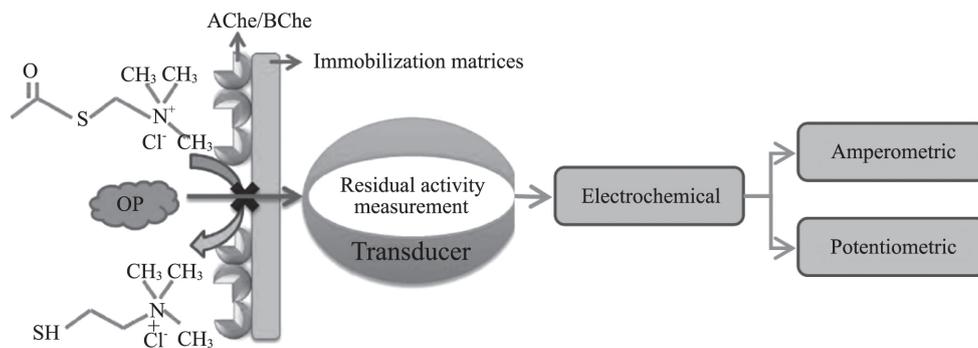


图1 AChE/BChE 抑制酶生物传感器作用原理

Fig. 1 A representation of AChE/BChE inhibition based OP biosensors

在众多基于 AChE 的电流生物传感器中,将 AChE 固定到邻苯二胺/碳/酞菁钴丝网印刷电极检测有机磷化合物如敌敌畏、对硫磷和谷硫磷^[5],得到最低的检测限($1 \times 10^{-11} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和线性范围($1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。通过 15 min 的交联反应将 AChE 固定到玻璃薄膜/金电极上,检测对硫磷的检测限为 $1.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,线性范围在 $1.45 \sim 7.26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间;将 BChE 固定到普鲁士蓝修饰的丝网印刷电极得到的电流生物传感器,对氧磷和甲基毒死蜱的检测限分别为 4 ppb 和 1 ppb^[6]。通过将 BChE 及包含胆碱氧化酶的 BChE 固定到卡拉胶凝胶上制备电流生物传感器,用于检测水样和标准样品中的对氧磷,其检测限分别为 4.5 和 $4.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[7-8]。Arduini 等^[9]将 BChE 交联到包含普鲁士蓝纳米颗粒的丝网印刷电极上制备电流生物传感器,放置 60 天后检测对氧磷的检测限为 1 ppb,显示出良好的稳定性,因此在农业、食品生物传感方面有很好的应用前景。

在其他电流生物传感器研究中,酪氨酸酶交联到酞菁钴得到的生物传感器检测甲基对硫磷,线性范围为 $2.28 \times 10^{-8} \sim 3.8 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测二嗪磷的线性范围为 $6.24 \times 10^{-8} \sim 1.64 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10]。酪氨酸酶交联固定到 1,2-萘醌-4-磺酸盐和普鲁士蓝制备的电极,检测对氧磷的线性范围为 $10^{-7} \sim 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11]。将酪氨酸酶固定到卡拉胶得到的新型酶传感器用于检测乐果、对氧磷和马拉硫磷^[12],检测限分别为 10^{-6} , 5×10^{-6} 和 $5 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,线性范围分别为 $2 \times 10^{-6} \sim 0.2$, $10^{-5} \sim 10^{-2}$, $10^{-5} \sim 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。碱性磷酸酶交联的藻类牛血清蛋白/ZnO 纳米颗粒/玻碳电极用于检测毒死蜱,不受乙酰甲胺磷、马拉硫磷、三唑磷等其

他农药及碱金属的干扰^[13]。抑制电流生物传感器检测有机磷化合物具有响应快速、灵敏度高、线性范围宽等优点,缺点在于有干扰物质如重金属、氨基甲酸酯农药存在时特异性不足。

1.3 电位型抑制酶有机磷生物传感器

样品中分析物的存在会引起溶液 pH 值的改变,电位型生物传感器将离子选择性电极上吸附的氢离子(H^+)转换为电信号测定分析物浓度^[4]。Lvnikskii 和 Rishpon 将 AChE 共价交联到聚乙烯亚胺包覆的玻碳电极得到电位生物传感器,并将其用于测定有机磷农药敌敌畏^[14],其检测限可以达到 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Ivanov 等^[15]将 AChE 用戊二醛交联到尼龙和纤维素薄膜/pH 电极,将其保存 30 天后对敌百虫的检测限能够达到 $0.038 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

将 BChE 固定到聚氯乙烯塑料得到电位生物传感器^[16],在 pH 值为 2.0 ~ 10.5 的范围内显示出对丙溴磷良好的选择性,其线性范围为 $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 BChE 用戊二醛耦合到薄膜得到的电位生物传感器对敌百虫具有较快的响应时间,检测限为 $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[17]。以丝网印刷的 2,3,6-三甲基- β -环糊精作为离子载体,构建基于 BChE 的高灵敏电位生物传感器,将其用于检测人血清中的马拉硫磷^[18],检测限达到 $8 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,线性范围为 $10^{-6} \sim 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。电位型生物传感器具有的较低检测限和良好的重现性,适用于检测食品和农产品中的有机磷农药。

2 催化酶生物传感器

2.1 催化酶生物传感器原理

有机磷水解酶是氨基水解酶家族中一种细菌酶,它们对拥有 P—O, P—S, P—F, P—CN 键的有机磷化合物具有广泛的特异性,例如对氧磷、对硫磷、蝇毒磷、二嗪农、毒死蜱、甲基对硫磷等。在有机磷水解酶生物传感器中,有机磷水解酶催化有机磷化合物水解生成对硝基苯酚(图2),这些水解反应可以被传感器识别,其信号正比于有机磷农药的浓度^[19]。

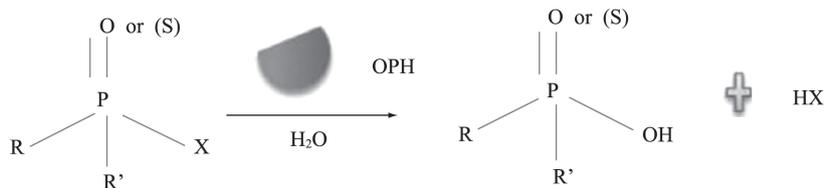


图2 有机磷化合物在有机磷水解酶作用下的反应

Fig. 2 Mode of action of OP compounds on the activity of the organophosphorus hydrolase

有机磷水解酶的水解反应能够导致溶液 pH 的变化或者产生电活性物质,可以分别通过电位或者电流传感器进行定量测定(如图3所示)。对氧磷、对硫磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷等有机磷农药在有机磷水解酶的作用下很容易水解,产生电活性物质 4-硝基苯酚,在设定的电压下发生氧化反应产生净电流,此电流作为生物传感器的信号被记录下来,其信号大小与样品中有机磷农药的浓度成比例。

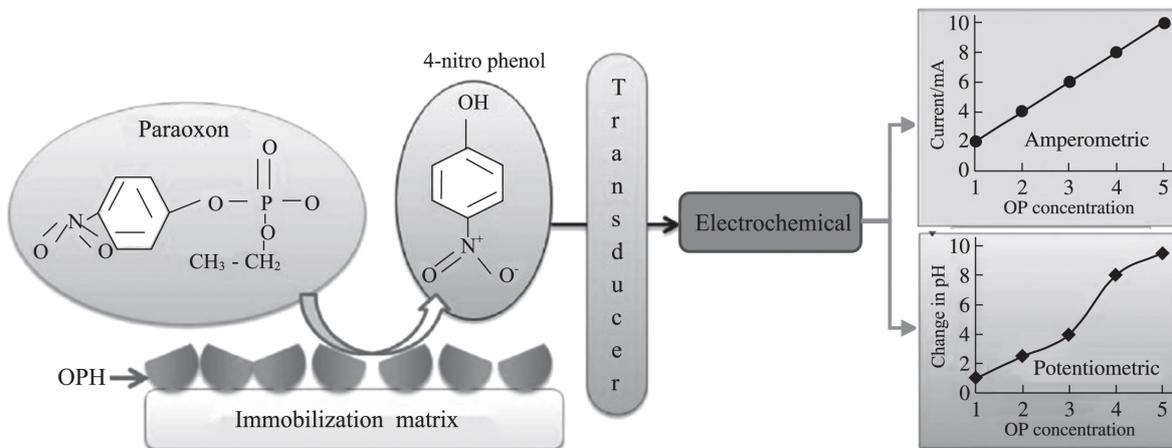


图3 基于有机磷水解酶的有机磷生物传感器测定原理

Fig. 3 An overview of organophosphorus hydrolase based OP biosensors

2.2 有机磷水解酶电流生物传感器

研究者构建出大量的电流生物传感器用于检测有机磷农药^[20-22]。这些生物传感器固定在不同的基质上,检测限和线性范围都很接近。将有机磷水解酶固定到碳棒电极上得到电流生物传感器^[23],对氧磷和甲基对硫磷的检测限分别为 9×10^{-14} 和 $7 \times 10^{-14} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这种方法优点在于不受其他一些有色化合物的干扰,测定时无需加入其他酶和试剂,但一些小分子物质如抗氧化剂、含巯基的化合物、谷胱甘肽等在测定电压下会被氧化从而干扰测定。

2.3 有机磷水解酶电位生物传感器

将有机磷水解酶通过物理吸附、戊二醛交联及共价交联等方法固定到膜、丝网印刷电极、微球、纳米颗粒等基质上得到的有机磷水解酶电极,可以用于有机磷农药的检测^[24]。通过共价方式将有机磷水解酶连接到氨基丙基三乙氧基硅烷/戊二醛上,保存 70 天后测定对氧磷的检测限为 $1 \times 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,显示出良好的稳定性^[25]。然而,将有机磷水解酶交联到玻璃膜上保存 30 天后,最高的检测限只能达到 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[26]。电位生物传感器构建方法简单,所需的转换装置很容易在

市场买到.该方法存在的问题是 pH 敏感的电极传感器的信号响应极为依赖样品溶液的缓冲能力,即使是很微小的 pH 值变化可能会导致生物传感器灵敏度一定程度的降低.

3 结论和展望

本综述总结了各种抑制酶和催化酶有机磷生物传感器的构建和测定有机磷农药的进展.尽管基于 AChE、BChE、酪氨酸酶、碱性磷酸酶、有机磷水解酶等的生物传感器检测有机磷农药具有很高的选择性和特异性,然而也存在酶纯化成本高和耗时长的缺点,并且酶的热稳定性较差,对 pH 和温度要求严格.其中,基于 AChE 的有机磷生物传感器由于其抑制作用的不可逆性、价格低廉、容易处置及分析实际样品时的方便快捷的自动化操作过程,具有良好的应用前景.除此之外,以核酸适配体为生物识别元件的亲生物传感器是一种新颖的分析有机磷农药的方法.适配体生物传感器具有高的热稳定性,可以构建简单方便的便携式装置用于有机磷农药的分析.因此,只有将生物识别元件、纳米材料合成和电信号传导效率充分的结合,才能得到拥有高灵敏度、良好的重现性和特异性的检测有机磷化合物的生物传感器.随着更加可靠有效的固定基质和微电子技术的发展,构建便携式分析装置将是未来的发展方向.

参考文献:

- [1] PUNDIR C S, MALIK A, Preety. Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review [J]. *Biosensors & Bioelectronics* 2019, 140: 5 – 17.
- [2] YAO S, MEYER A, HENZE G. Comparison of amperometric and UV – spectrophotometric monitoring in the HPLC analysis of pesticides [J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1991, 339: 207 – 211.
- [3] RAJANGAM B, DANIEL D K, KRASTANOV A I. Progress in enzyme inhibition based detection of pesticides [J]. *Engineering in Life Sciences* 2017, 18: 4 – 19.
- [4] ANDREESCU S, MARTY J L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications [J]. *Biomolecular Engineering* 2006, 23: 1 – 15.
- [5] BONNET C, ANDREESCU S, MARTY J L. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 481: 209 – 211.
- [6] PUNDIR C S, CHAUHAN N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 429: 19 – 31.
- [7] CAMPANELLA L, ACHILLI M, SAMMARTINO M P, et al. Butyrylcholine enzyme sensor for determining organophosphorus inhibitors [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1991, 321: 237 – 249.
- [8] CAMPANELLA L, LUCA D S, SAMMARTINO M P, et al. A new organic phase enzyme electrode for the analysis of organophosphorus pesticides and carbamates [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 385: 59 – 71.
- [9] ARDUINI F, FORCHIELLI M, AMINE A, et al. Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase [J]. *Microchimica Acta* 2014, 182: 643 – 651.
- [10] VIDAL J C, ESTEBAN S, GIL J, et al. A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide [J]. *Talanta*, 2006, 68: 791 – 799.
- [11] SAJJADI S, GHOORCHIAN H, TAVAKOLI H. Choline oxidase as a selective recognition element for determination of paraoxon [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24: 2509 – 2514.
- [12] CAMPANELLA L, LELO D, MARTINI E, et al. Organophosphorus and carbamate pesticide analysis using an inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor; comparison by butyrylcholinesterase + choline oxidase and application to natural waters [J]. *Analytica Chimica Acta* 2007, 587: 22 – 32.
- [13] PABBI M, KAUR A, MITTAL S K, et al. A surface expressed alkaline phosphatase biosensor modified with flower shaped ZnO for the detection of chlorpyrifos [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 258: 215 – 227.
- [14] IVNITSKII D M, RISHPON J. A potentiometric biosensor for pesticides based on the thiocholine hexacyanoferrate (III) reaction [J]. *Biosensors and Bioelectronics* 1994, 9: 569 – 576.
- [15] IVANOV A N, EVTUGYN G A, GYURCSÁNYI R E, et al. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination [J]. *Analytica Chimica Acta* 2000, 404: 55 – 65.
- [16] IMATO T, SHIBASHI N. Potentiometric butyrylcholine

- sensor for organophosphate pesticides [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995, 10: 435 – 441.
- [17] REYBIER K, ZAIRI S, JAFFREZIC – RENAULT N, et al. The use of polyethyleneimine for fabrication of potentiometric cholinesterase biosensors [J]. *Talanta*, 2002, 56: 1015 – 1020.
- [18] KHALED E, HASSAN H N A, MOHAMED G G, et al. Disposable potentiometric sensors for monitoring cholinesterase activity [J]. *Talanta*, 83: 357 – 363.
- [19] SINGH B K. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7: 156 – 164.
- [20] MULCHANDANI P, CHEN W, MULCHANDANI A. Flow injection amperometric enzyme biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35: 2562 – 2565.
- [21] HOSSAIN M M, FAISAL S N, KIM C S, et al. Amperometric proton selective strip-sensors with a microelliptic liquid/gel interface for organophosphate neurotoxins [J]. *Electrochemistry Communications*, 2011, 13: 611 – 614.
- [22] CABARCAS M T B, STOYTICHEVA M, ZLATEV R, et al. Chitosan nanocomposite modified OPH – based amperometric sensor for organophosphorus pesticides determination [J]. *Current Analytical Chemistry*, 2018, 14: 75 – 82.
- [23] MULCHANDANI A, MULCHANDANI P, CHEN W. Amperometric thick-film strip electrodes for monitoring organophosphate nerve agents based on immobilized organophosphorus hydrolase [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71: 2246 – 2249.
- [24] ZHANG W, ASIRI A M, LIU D, et al. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 54: 1 – 10.
- [25] FLOUNDERS A W, SINGH A K, VOLPONI J V, et al. Development of sensors for direct detection of organophosphates: Part II: sol-gel modified field effect transistor with immobilized organophosphate hydrolase [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, 14: 715 – 722.
- [26] MULCHANDANI A, MULCHANDANI P, CHEN W. Enzyme biosensor for determination of organophosphates [J]. *Field Analytical Chemistry & Technology*, 1998, 2: 363 – 369.

Research Progress in Electrochemical Biosensors Based on Bio-enzyme for Detection of Organophosphorus Pesticides

ZHANG Yuanyuan¹, WANG Shangwei¹, XU Qiang², LI Xin², ZHANG Mingming², ZHANG Shengxiao²

(1. Yantai Center of Ecology and Environment Monitoring of Shandong Province, Yantai 264000, China;

2. School of Chemistry and Materials Science, Ludong University, Yantai 264039, China)

Abstract: Organophosphorus (OP) pesticides have been used widely as agricultural and household pest control agents and persist in our water resources, fruits, vegetables and processed food as health and environmental hazardous compounds. Thus, detection of these harmful OP pesticides at an ease with high sensitivity and selectivity is necessary. Bio-sensing technology meets these requirements and has been employed at a large scale for detection. The review describes the principle and strategy of various electrochemical OP biosensors for detection of OP pesticides in detail. The electrochemical biosensors are generally based on inhibition of enzyme, acetyl cholinesterase (AChE), butyryl cholinesterase (BChE), tyrosinase and alkaline phosphatase or enzyme (organophosphorus hydrolase, OPH) catalyzed reaction. The detection limits and linearity range of various OP biosensors have also been compared. AChE inhibition based amperometric OP biosensor exhibited the lowest detection limit of $1 \times 10^{-11} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with a linearity range of $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords: organophosphorus pesticides; detection; electrochemical biosensors; bio-enzyme

(责任编辑 刘军深)