

2007-11-28

Determination of Malathion Based on Carbon Nanotubes Modified Electrode Incorporating Acetylcholinesterase

Lu ZHANG

Yao-dong ZHANG

Hong-lan QI

Recommended Citation

Lu ZHANG, Yao-dong ZHANG, Hong-lan QI. Determination of Malathion Based on Carbon Nanotubes Modified Electrode Incorporating Acetylcholinesterase[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2007 , 13(4): 431-435.

DOI: 10.61558/2993-074X.1848

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol13/iss4/15>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号: 1006-3471(2007)04-0431-05

多壁碳纳米管修饰酶电极测定马拉硫磷

张 璐, 张耀东*, 漆红兰

(陕西省生命分析化学重点实验室, 陕西师范大学化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 应用化学交联法将巴西日圆线虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 固定于多壁碳纳米管修饰的玻碳电极表面, 制备用于有机磷农药检测的电化学生物传感器。研究了巯基胆碱 (TCh) 在该修饰电极上的电化学生物行为。优化实验条件得出, 响应电流与马拉硫磷的浓度在 $6.0 \times 10^{-10} \sim 6.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, 检出限为 $1.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。测定了湖水中马拉硫磷的含量, 回收率为 97% ~ 105%。

关键词: 生物传感器; 碳纳米管; 马拉硫磷; 有机磷; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: O646

文献标识码: A

有机磷农药是目前广泛使用的农药, 但它会残留在农产品中并与乙酰胆碱酯酶 (AChE) 结合形成磷酸化乙酰胆碱酯酶, 使酶失去活性, 导致人体神经功能的严重伤害, 甚至死亡。传统的有机磷检测方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法与色谱联用法等^[1-3]。尽管这些方法灵敏准确, 但是在检测之前, 样品要经过繁琐的预处理, 费时、成本高, 而且仪器设备大多昂贵, 需有专业技术人员维护, 不适用于现场检测。基于有机磷能抑制 AChE 催化活性而研制的有机磷生物传感器已有报道^[4-7], 但其灵敏度有待提高。碳纳米管 (CNT) 修饰电极不仅具有普通碳糊电极再现性好、应用范围广、制作简便等特点, 而且还兼备导电性好、比表面积大等优点, 目前已成为化学修饰电极和电化学生物传感器等领域的研究热点^[8-11]。本文应用交联法将巴西日圆线虫乙酰胆碱酯酶固定于多壁碳纳米管修饰的玻碳电极表面, 研制了测定马拉硫磷的碳纳米管修饰酶电极, 并用于测定湖水中马拉硫磷的含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

BAS100B/W 电化学工作站 (Bioanalytical Systems, Inc, NC, USA)。三电极系统: 工作电极为碳纳米管修饰电极 ($\varnothing 3 \text{ mm}$) 或玻碳电极; 辅助电极为铂丝

电极; 参比电极为饱和甘汞电极 (SCE)。

巴西日圆线虫乙酰胆碱酯酶 (AChE, 557 U \cdot mL $^{-1}$) 承德国 University of Stuttgart, Schmid R 教授馈赠。乙酰巯基胆碱 (ATCh)、巯基胆碱 (TCh)、牛血清蛋白 (BSA) 购自 Sigma 公司, 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 马拉硫磷标准样品 (北京应天意标准样品有限公司)。多壁碳纳米管 (MWNT, 深圳纳米港有限公司), 0.10 mol \cdot L $^{-1}$ PBS (pH = 7.5), 0.10 mol \cdot L $^{-1}$ ATCh 储备液用 0.10 mol \cdot L $^{-1}$ PBS 缓冲液配制, 置于冰箱中 4 $^{\circ}$ C 保存。其它试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。

1.2 MWNT 修饰酶电极的制备

玻碳电极首先用 0.30 μ m Al $_2$ O $_3$ 悬浊液打磨至镜面, 依次在无水乙醇及二次水中各超声清洗 3 min, 然后用二次水冲洗干净。MWNT 先经浓硝酸与浓高氯酸 (体积比 7:3) 的混合溶液超声清洗 5 h, 然后经二次蒸馏水洗至中性, 再用丙酮洗涤, 60 $^{\circ}$ C 干燥^[12]。称 1.0 mg 处理过的 MWNT 加入 1.0 mL DMF 超声 10 min, MWNT 均匀分散于 DMF 形成黑色悬浮液。取悬浮液 20 μ L 滴涂于处理好的玻碳电极表面, 待溶剂完全挥发后, 再滴涂含 5 μ L AChE, 2 μ L BSA (70 mg \cdot mL $^{-1}$) 和 3 μ L 戊二醛 (~0.25%) 的混合液, 于室温下交联反应 30 min

收稿日期: 2007-06-26 修订日期: 2007-08-03 * 通讯作者, Tel: (86-29) 85303825 E-mail: ydzhang@snnu.edu.cn

国家自然科学基金项目 (No 3060494) 资助

使 AChE 固定在 MWNT 修饰电极上. 然后置于 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中于 4.0°C 保存备用.

1.3 马拉硫磷的测定

将制备好的 MWNT 修饰酶电极插入含有 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATCh 5.0 mL 的 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中, 控制工作电极电位 $+0.70 \text{ V}$, 常温下计时电流法测定, 稳定电流记为 I_0 . 另将酶电极置于 5.0 mL 含有马拉硫磷的溶液或湖水中, 抑制 2.0 min 取出酶电极, 用水冲洗干净, 插入含有 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATCh 5.0 mL 的 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中, 控制工作电极电位 $+0.70 \text{ V}$, 计时电流法测定, 稳定电流记为 I_1 以百分抑制率 $k = [(I_0 - I_1) / I_0] \times 100\%$ 作马拉硫磷的定量分析.

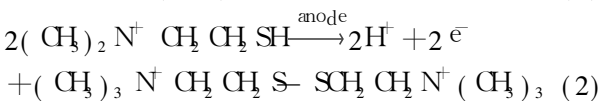
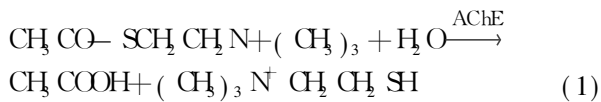
2 结果与讨论

2.1 TCh 在 MWNT 修饰电极上的电化学行为

图 1 分别示出 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCh 在 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液中, 于玻碳电极和 MWNT 修饰电极的循环伏安曲线. 由图可见, 在玻碳电极 (a) 上 TCh 的 $E_{pa} = 550 \text{ mV}$, $E_{pc} = 425 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 125 \text{ mV}$; 而对 MWNT 修饰电极 (b) 其 $E_{pa} = 497 \text{ mV}$, $E_{pc} = 395 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 102 \text{ mV}$. 后者的 ΔE_p 减小, 说明反应的可逆性增强; 而且 E_{pa} 负移 53 mV , 峰电流明显增大, 说明碳纳米管对 TCh 的氧化具有电催化作用, 从而大幅度地提高了 TCh 的电流响应值.

2.2 实验条件的优化

以 AChE 催化活性为依据的抑制型酶电化学传感器是将 AChE 固定在电极表面, 测定酶催化底物乙酰巯基胆碱 (ATCh) 产生的巯基胆碱 (TCh) 的氧化电流. 如果试样含有有机磷农药残留物必将导致酶的活性降低, 从而使上述产生的巯基胆碱氧化电流下降. 其基本过程可表示如下:



据此, 本文将 AChE 固定在 MWNT 修饰玻碳电极, 制成了新型的电化学传感器, 用于检测有机磷. 这一生物传感器也是一种抑制型传感器, 其检测方法即如在实验部分 (1.3) 所述, 不言而喻.

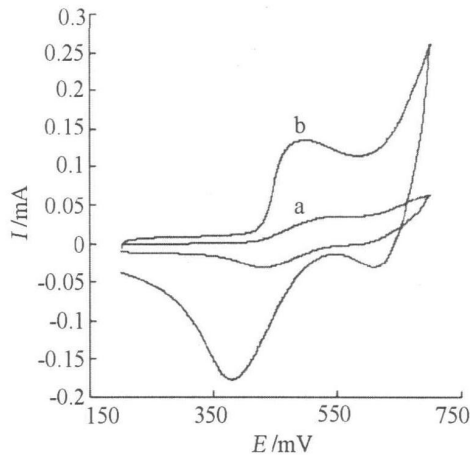


图 1 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCh 在 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲溶液中于玻碳电极 (a) 和修饰电极 (b) 上的循环伏安曲线 $\text{pH} = 7.5$ 扫速 50 mV/s

Fig 1 Cyclic voltammetric of $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCh in $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS solution at the bare GC (a) and MWNT modified (b) electrodes $\text{pH} 7.5$, scan rate 50 mV/s

酶电极对 TCh 氧化越灵敏, 该传感器对有机磷的响应也就越灵敏. 以下分别考察以 MWNT 修饰电极测定 TCh 的最优化响应条件.

1) pH 的选择

支持电解质的 pH 对 TCh 的电化学行为有较大的影响. 图 2 是应用计时电流法测定的 TCh 在 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中于 MWNT 电极上氧化电流随溶液 pH 值的变化关系, 工作电压为 0.60 V . 如图, 当溶液的 pH 为 $4.0 \sim 6.0$ 时, 氧化电流随 pH 的增大而增大, 至 pH 约为 7.5 响应电流达到最大, 过此, 则氧化电流反而下降. 本实验选择 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 的 pH 为 7.5 以获得最大电流响应.

2) 碳纳米管用量的影响

MWNT 的用量直接影响着 MWNT 修饰电极对 TCh 的电化学响应. 图 3 示出改变 MWNT 修饰电极的 MWNT 滴涂量 (见 1.2) (滴涂液体积), 计时电流法测定 TCh 在修饰电极上的电化学响应. 如图, 随 MWNT 用量增加, 响应电流上升, 至 $20 \mu\text{L}$ 之后, 电流反而有所下降. 据此, 本实验中选择 MWNT 的用量为 $20 \mu\text{L}$.

3) 工作电位的选择

图 4 给出选定的 MWNT 滴涂量 ($20 \mu\text{L}$) 和 $\text{pH} = 7.5$ 的缓冲溶液中, TCh 于 MWNT 上的氧化电流

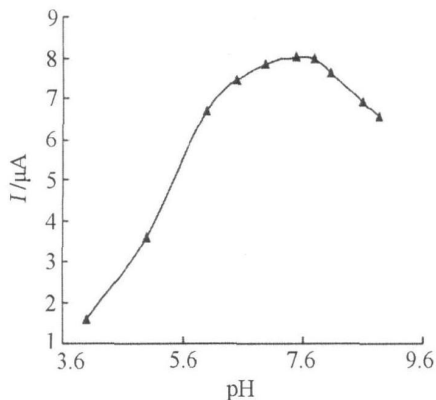


图 2 计时电流法测定 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCh 在 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中氧化电流随溶液 pH 值变化关系
MWNT 修饰电极上工作电极电位 0.60 V

Fig 2 Variation of the chronoamperometric response current with buffer solution pH value for the $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCh in $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS at MWNT modified electrode working potential 0.60 V

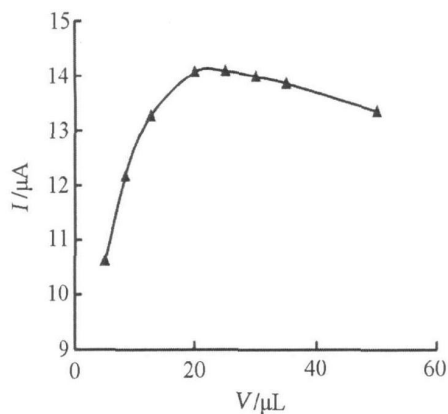


图 3 计时电流法 TCh 氧化电流随工作电极 MWNT 修饰量 (滴涂液体积) 的变化

Fig 3 The chronoamperometric response current of TCh vs dropping volume of MWNT solution on the electrode surface
 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS containing $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCh, $\text{pH} = 7.5$, working potential 0.60 V

随电极电位的变化. 如图所示, 当工作电极电位小于 0.45 V , TCh 不被氧化; 大于 0.65 V 时, TCh 的氧化电流趋于稳定. 据此, 本文选择工作电极电位为 0.70 V .

在上述选定的试验条件下, TCh 的氧化电流与 TCh 的浓度在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

之间呈良好的线性关系, 线性方程为 $I(\mu\text{A}) = 0.16C(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 0.45$ ($R=0.9933$), 检出限为 $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 测定 TCh 的相对标准偏差为 4.2% ($n=11$, $C=4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 这说明 MWNT 修饰电极具有良好的重现性.

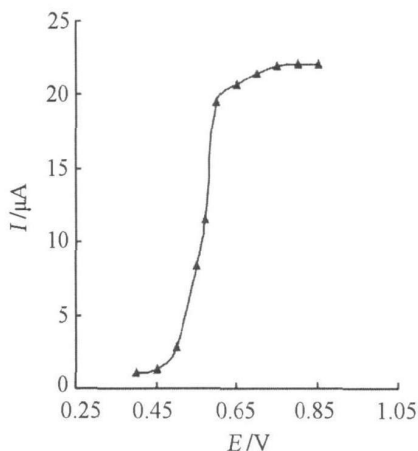


图 4 计时电流法 TCh 于 MWNT 修饰电极上氧化电流随工作电位的变化

Fig 4 The chronoamperometric response current of TCh vs working potential for the MWNT modified electrode in $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS containing $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCh, $\text{pH} = 7.5$, the dropping volume of MWNT solution is $20 \mu\text{L}$

2.3 马拉硫磷的测定

以 MWNT 修饰酶电极为工作电极, 按上述 (1.3) 马拉硫磷测定方法, 测定马拉硫磷浓度 $C_{\text{马拉硫磷}}$ 与抑制率 k 之间的变化关系, 结果如图 5 所示. 实验条件: 马拉硫磷原液浓度 95% , $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 含有 AChE $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.5$, 修饰电极的 MWNT 滴涂量 $20 \mu\text{L}$, 工作电极 0.70 V . 如图, 抑制率 k 与 $C_{\text{马拉硫磷}}$ 在 $6.0 \times 10^{-10} \sim 6.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 呈良好的线性关系: $k(\%) = 0.67C(10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 9.6$ ($R=0.9941$). 检出限为 $1.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 对 $4.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的马拉硫磷连续 7 次测定, 相对标准偏差 4% . 该方法的检测限低于气相色谱的检测限^[13].

2.4 实际样品中马拉硫磷的测定

采用标准加入法作回收实验^[14]. 采集人工湖

表 1 应用 MWNT修饰酶电极计时电流法测定湖水样品中马拉硫磷的结果

Tab 1 The malathion content in spiked lake water detected by using chronoamperometry with MWNT modified electrode

Sample/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Added/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Founded/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Recoveries/%
1.20×10^{-9}	2.00×10^{-9}	3.30×10^{-9}	105
1.20×10^{-9}	3.00×10^{-9}	4.20×10^{-9}	100
1.20×10^{-9}	1.00×10^{-9}	2.17×10^{-9}	97
6.06×10^{-10}	2.00×10^{-9}	2.60×10^{-9}	99.7
6.06×10^{-10}	3.00×10^{-9}	3.50×10^{-9}	97
2.00×10^{-9}	2.00×10^{-9}	4.00×10^{-9}	100
2.00×10^{-9}	3.00×10^{-9}	4.91×10^{-9}	97

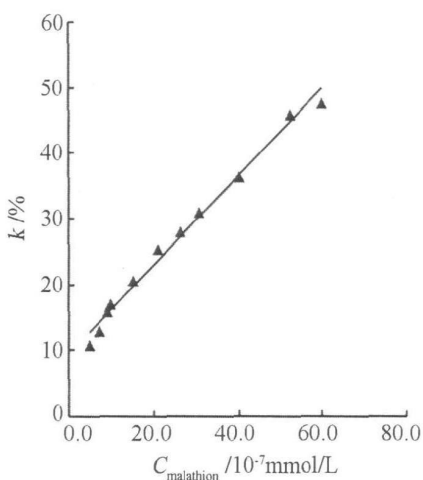


图 5 抑制率随马拉硫磷浓度的变化关系

$k = [(I_0 - I) / I_0] \times 100\%$, I_0 和 I 分别指未被和被有机磷抑制后的酶电极稳态响应电流

Fig 5 Percentage of inhibition k vs malathion concentration
 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS containing $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATCh, pH=7.5, the dropping volume of MWNT solution is $20 \mu\text{L}$, working potential 0.70V , $k = [(I_0 - I) / I_0] \times 100\%$, I_0 and I are current output before and after inhibition, respectively

湖水(陕西师范大学校内人工湖), 经过滤后分成 7 份, 每份各 10mL 置于 1000mL 容量瓶中, 其中 3 份加入 1.00mL $1.20 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2 份加入 1.00mL $6.06 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、剩余两份加入 1.00mL $2.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的马拉硫磷农药溶液, 定容。以 MWNT 修饰酶电极为工作电极, 分别测定马拉硫磷的含量, 结果见表 1。如表, 样品的加标回收率在 $97\% \sim 105\%$ 之间, 说明该传感器可应用于实际样品的测定。

3 结 论

MWNT 能明显地增强电子传递, 增大电极的有效面积; 以其修饰玻碳电极, 对 TCh 的氧化具有电催化作用, 峰电流显著增大, 从而大幅度提高了 TCh 的电流响应值。使用 AChE/MWNT/GC 电极由计时电流法检测马拉硫磷, 其检出限和相关系数分别为 $1.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.9941。

参考文献 (References):

[1] Rodil R, Quintana J B, Remolina T. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of nonionic organophosphorus flame retardants and plasticizers in wastewater samples [J]. Analytical Chemistry, 2005, 77: 3083-3089.

[2] Cai C S, Harrington P D B. Prediction of substructure and toxicity of pesticides with temperature constrained-cascade correlation network from low-resolution mass spectra [J]. Analytical Chemistry, 1999, 71: 4134-4141.

[3] Hauser B, Schellin M, Popp P. Membrane-assisted solvent extraction of triazines, organochlorine and organophosphorus compounds in complex samples combined with large-volume injection-gas chromatography/mass spectrometric detection [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76: 6029-6038.

[4] Lacorte S, Barcelo D. Validation of an automated precolumn exchange system (PROSPEKT) coupled to liquid chromatography with diode array detection: Application to the determination of pesticides in natural waters [J]. Analytica Chimica Acta, 1994, 296(3): 223-234.

[5] Orbulescu J, Constantine C A, Rastogi V K, et al. De-

- tection of organophosphorus compounds by covalently immobilized organophosphorus hydrolase [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78: 7016-7021.
- [6] Marv J L, Möneton N, Lacorre S, et al. Validation of an enzymatic biosensor with various liquid chromatographic techniques for determining organophosphorus pesticides and carbaryl in freeze-dried waters [J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 311(3): 265-271.
- [7] Walker J P, Asher, Sanford. Acetylcholinesterase based organophosphate nerve agent sensing photonic crystal [J]. Analytical Chemistry, 2005, 77: 1596-1600.
- [8] Moore R R, Banks C E, Compton R G. Basal plane pyrolytic graphite modified electrodes: comparison of carbon nanotubes and graphite powder as electrocatalysts [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76: 2677-2682.
- [9] Joshi K A, Tang J, Haddon R, et al. A disposable biosensor for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrode [J]. Electroanalysis, 2005, 17(1): 54-58.
- [10] Pan D W, Chen J H, Tao W Y, et al. Polyoxymerale modified carbon nanotubes: new catalyst support for methanol electro-oxidation [J]. Langmuir, 2006, 22: 5872-5876.
- [11] Lee C S, Baker S E, Marcus M S, et al. Electrically addressable bimolecular functionalization of carbon nanotube and carbon nanofiber electrodes [J]. Nano Letters, 2004, 4: 1713-1716.
- [12] Pogank L, Franko M. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 1999, 14(6), 30: 569-578.
- [13] LUO Tian (罗添), ZHOU Zhirong (周志荣), LIN Xiaobin (林小彬). Determination of lindane, malathion, carbaryl and deltamethrin in water by GC/MS/MS [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, (17) 3: 402-403.
- [14] TANG Jian-she (唐建设), XIANG Li (项丽). Determination of malathion residue in water by solid phase extraction-gas chromatography [J]. Modern Agriculture, 2005, 4(4): 23-24.

Determination of Malathion Based on Carbon Nanotubes Modified Electrode Incorporating Acetylcholinesterase

ZHANG Lu, ZHANG Yaodong*, QI Honglan

(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science of Shaanxi Province,
Shaanxi Normal University, Xi'an, 710062)

Abstract A biosensor for determination of organophosphorus pesticide based on the acetylcholinesterase and multi-wall carbon nanotubes modified electrode is fabricated. Under the optimal conditions, the chronoamperometric current at +0.70 V (vs SCE) increased linearly with the concentration of malathion in the range from 6.0×10^{-10} to 6.0×10^{-9} mol/L with a detection limit of 1.0×10^{-10} mol/L. The recoveries of malathion in lake water is 97% to 105% determined by this method.

Key words biosensors; carbon nanotube; malathion; organophosphorus pesticide; acetylcholinesterase