

文章编号: 100025013(2010)0100372-04

# 荧光探针自组装膜对久效磷农药的检测

杨光昕, 孙向英, 刘 斌

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 采用 CdSe 量子点作为荧光探针, 将巯基丙酸稳定的 CdSe/聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)和乙酰胆碱酯酶(ACHE)通过静电吸引法, 层层组装到石英表面, 构建一种荧光性自组装多层膜 Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA. 利用有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制机理, 成功地将自组装膜用于痕量久效磷农药的检测. 实验表明, 在乙酰胆碱酯酶被抑制 16 min, 底物乙酰胆碱浓度为  $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的条件下, 该膜对久效磷的检测限低至  $48.64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 所构建的自组装膜稳定性较好、灵敏度较高, 可以再生使用.

**关键词:** 量子点; 荧光探针; 乙酰胆碱酯酶; 自组装膜; 有机磷农药

**中图分类号:** O 657.31; X 132

**文献标识码:** A

有机磷农药(OPS)杀虫效率高、易分解, 已成为最常用的一类农药. 然而, 这类农药却属于神经性毒剂, 能与胆碱酯酶(CHE)结合, 形成性质稳定的磷酸化胆碱酯酶, 使酶失去活性, 严重伤害人的神经功能, 甚至会导致死亡<sup>[1]</sup>. 因此, 如何快速有效地检测环境中的残留农药成为人们非常关心的问题. 目前, 常用的农药残留检测方法包括色谱法、色谱-质谱联机等<sup>[24]</sup>. 这些大型精密仪器检测结果准确、可靠, 但仪器价格昂贵、检测成本高、检测费时, 且不能实现现场检测. 酶抑制法具有检测速度快、成本低, 以及无需复杂样品前处理过程等特点, 成为重要的快速检测方法. 一般的酶传感器, 其固定酶的方式大部分采用包埋法和交联法, 不利于回收且不能长久保持酶的活力. 采用静电吸引的自组装法固定酶, 可以长期保持酶的活性, 具有制备简单、成本低、能再生使用等优点<sup>[5]</sup>. 荧光性自组装膜在化学与生物传感方面有广泛的应用前景<sup>[68]</sup>. 本文主要制备量子点为荧光探针的自组装膜, 并对久效磷农药进行检测.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Varian 公司); Model 828 酸度计(美国 Orion 公司); 乙酰胆碱酯酶, 久效磷(美国 Sigma Aldrich 有限公司); 乙酰胆碱(上海化学试剂有限公司); 所用试剂均为分析纯, 实验用水由 Mill2Q 基础型纯化水系统提供.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 KHSe 的制备** 按照文[9]所述, 将  $0.2 \text{ mmol}$  的 Se 粉和  $0.4 \text{ mmol}$  的  $\text{KBH}_4$  置于反应器中, 加入  $2 \text{ mL}$  超纯水, 反应数小时, 底部黑色硒粉消失, 得到无色澄清溶液, 储存备用.

**1.2.2 CdSe 量子点的制备** 参照文[10]方法, 将  $1.6 \text{ mol}$  的  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  和  $2 \text{ mol}$  的巯基丙酸溶于  $120 \text{ mL}$  超纯水中, 用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 调节 pH 值至 9.6. 将溶液置于三口烧瓶中, 用高纯氮气除氧 30 min. 在剧烈搅拌下, 向上述溶液中加入新制备的 KHSe 溶液, 煮沸回流 14 h 并储存备用.

**1.2.3 石英基底的预处理** 将石英片切割成  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$  的方片, 依次在超纯水、无水乙醇中超声清洗 10 min. 然后, 在 Piranha 溶液(质量分数为 98% 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  与体积分数 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的体积比为 7B3)中处理 10 min. 最后, 用超纯水清洗, 氮气吹干.

收稿日期: 20081221

通信作者: 孙向英(1962), 女, 教授, 主要从事光电传感和环境监测的研究. E-mail: liumy@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20575023); 福建省国际合作重点项目(2006I0021); 福建省自然科学基金资助项目(D0710017, D0810016, U0850008); 教育部留学回国人员科研启动项目(2008 年度)

1.2.4 Quartz/PDDA/ CdSe 自组装膜的制备 将经上述预处理过的石英片放入  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA) 溶液中 30 min, 取出后用超纯水清洗, 氮气吹干; 将 Quartz/ PDDA 膜浸泡在所制备的 CdSe 量子点溶液中组装 1 h, 形成 CdSe 量子点自组装膜, 然后用超纯水清洗, 氮气吹干, 待用.

1.2.5 Quartz/PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 自组装膜的制备 先将 Quartz/ PDDA/ CdSe 膜置于  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液中浸泡 10 min, 然后用超纯水清洗, 氮气吹干, 在膜表面再组装一层 PDDA. 将 Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA 膜浸泡在每升 500 单位,  $\text{pH}=7.7$  的乙酰胆碱酯酶磷酸缓冲液中 1 h. 为了防止乙酰胆碱酯酶在膜表面的泄漏, 利用层层沉积方式, 在最外层再组装一层 PDDA. 取出后用二次水冲洗干净, 氮气吹干, 储存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  阴暗处. 组装示意图如图 1 所示.

### 1.3 实验机理

乙酰胆碱酯酶能催化水解乙酰胆碱生成乙酸, 底物的催化分解速度受乙酰胆碱酯酶活性的影响. 当底液中加入有机磷农药后, 酶的活性受到抑制, 底物乙酰胆碱催化水解的速度降低, 在相同的时间内生成乙酸的量减小, 进而影响底液 pH 值的变化. 在 pH 值为  $6.0\sim 9.0$ , CdSe 量子点的荧光强度随溶液 pH 值的降低发生猝灭, 并与 pH 值的变化呈一定的线性关系. 因此, 可以依据量子点荧光强度猝灭程度的变化, 计算酶活性损失即抑制率, 从而间接检测农药残留量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 自组装膜荧光光谱表征

将制得的 Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 自组装膜置于石英比色皿中, 调整膜表面与入射光的夹角为  $50^{\circ}$ , 以保证最大限度的接受荧光信号且干扰最小. 分别测定 Quartz/ PDDA, Quartz/ PDDA/ CdSe, Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 膜表面及 CdSe 溶液在激发波长为  $360\text{ nm}$  的荧光光谱, 结果如图 2 所示.

由图 2 可知, Quartz/ PDDA 没有荧光峰, Quartz/ PDDA/ CdSe 和 Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 膜表面可发射出 CdSe 特性的荧光光谱, 其发射波长在  $564\text{ nm}$  处, 和 CdSe 溶液相荧光峰位置相同. 由此可证明, CdSe 已组装到石英表面上.

### 2.2 自组装膜测定久效磷条件的选择

2.2.1 pH 值 乙酰胆碱酯酶在常温 ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), pH 值为 8 时, 其活性最高. 底液 pH 值范围的确定, 还受荧光探针量子点的 pH 值线性响应范围等因素的影响. 为此, 底液的 pH 值确定为 9 左右.

2.2.2 乙酰胆碱浓度 将制备的 Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 自组装膜置于  $1\text{ mL}$ , pH 值为 9 左右的底液中, 依次加入一定浓度的乙酰胆碱, 反应完成后测得体系的荧光强度, 结果如图 3 所示. 图 3 表明, 随着乙酰胆碱的加入, 体系荧光强度逐渐降低; 当乙酰胆碱浓度达到  $7.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 荧光强度趋于稳定. 因此, 选取乙酰胆碱浓度为  $8.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

2.2.3 抑制时间 将传感器浸入含有久效磷浓度为  $537.6\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的体系中, 酶传感器的活性将受到抑制. 随着抑制时间的延长, 体系中 CdSe 的荧光强度逐渐降低. 当反应时间达到  $16\text{ min}$  时, 荧光强度逐渐平稳, 表明久效磷对乙酰胆碱酯酶的抑制时间为  $16\text{ min}$ . 因此, 选择体系的反应时间为  $16\text{ min}$ .

### 2.3 自组装膜对久效磷的检测

将 Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 自组装膜置于  $8.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酰胆碱, pH 值为

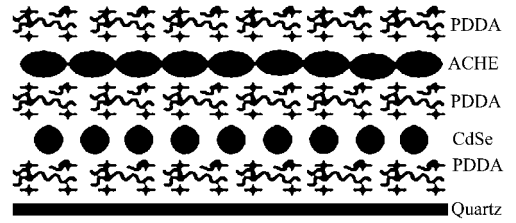


图 1 Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 自组装膜组装示意图

Fig. 1 Establishment mechanism of Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA

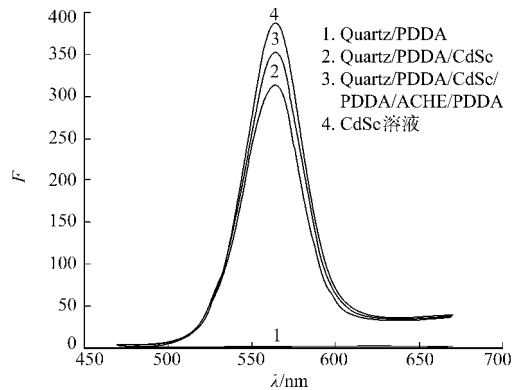


图 2 Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA 自组装膜荧光光谱表征图

Fig. 2 Surface fluorescence spectra of Quartz/ PDDA/ CdSe/ PDDA/ ACHE/ PDDA

9 的底液中, 加入不同浓度的久效磷溶液, 充分反应 16 min, 膜/液界面荧光光谱如图 4(a) 所示。

由图 4(a) 可知, 随着有机磷农药浓度的增加, 自组装多层膜表面量子点的荧光强度猝灭程度不断减小, 表明, 有机磷农药对膜上的乙酰胆碱酯酶有很强的抑制作用。抑制百分率  $\ln h$  的计算式为

$$\ln h = (I_0 - I) / I_0$$

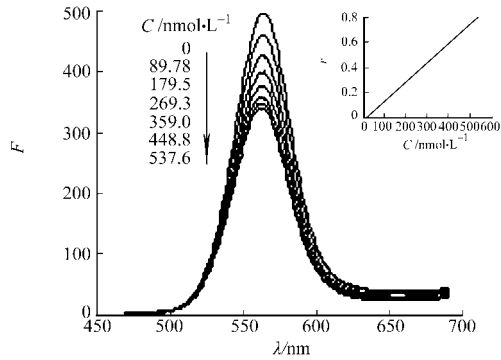
其中:  $I_0 = I - I_0$ ,  $I = I_1 - I_i$ ;  $I_0$ ,  $I$  是抑制前、后酶催化分解底物获得的酶活性信号,  $I$  是膜表面的初始荧光强度,  $I_0$  是加入一定的乙酰胆碱后测得膜表面的荧光强度,  $I_i$  是加入一定浓度久效磷充分反应后测得的膜荧光强度。

从图 4(a) 可知, 膜上乙酰胆碱酯酶的抑制率与久效磷的浓度呈现良好线性关系, 其线性方程为

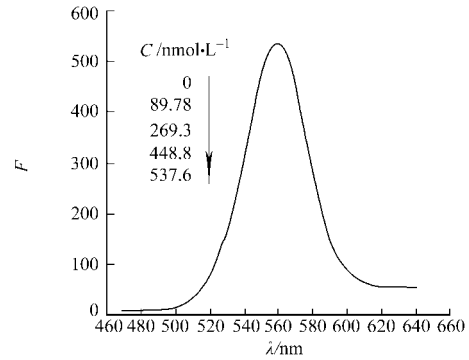
$$\ln h = 1.576 \times 10^{-6} C - 0.021561$$

其中:  $C$  为久效磷的浓度, 检测下限是  $48.64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而纯液相中基于  $\text{CdSe}$  为荧光探针的酶抑制法, 检测下限为  $1.472 \text{ Lmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 灵敏度远低于  $\text{Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA}$  自组装膜对久效磷的检测。与纯液相中相比, 自组装膜检测久效磷的灵敏度提高了近 100 倍。

将  $\text{Quartz/PDDA/CdSe}$  自组装膜置于  $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰胆碱底液中, 加入等浓度的久效磷溶液, 充分反应 16 min, 其荧光光谱如图 4(b) 所示。



(a) Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA 自组装膜



(b) Quartz/PDDA/CdSe 自组装膜

图 4 不同久效磷浓度下自组装膜的荧光光谱

Fig. 4 Fluorescent spectra of self-assembled multilayers films exposed to monocrotophos of different concentrations

由图 4(b) 可知, 没有组装乙酰胆碱酯酶的膜在反应过程中, 荧光强度几乎没有变化; 而组装了乙酰胆碱酯酶的膜 (图 4a), 其荧光猝灭程度随着久效磷的增加逐渐降低。说明, 乙酰胆碱酯酶已组装到膜表面上, 且久效磷农药确实对乙酰胆碱酯酶有抑制作用。

## 2.4 传感器的可逆再生

有机磷农药抑制作用发生后, 酶的活性会被抑制。选择 22PAM 作为乙酰胆碱酯酶复能剂, 将与农药作用过的自组装膜置于质量分数为 2% 的 22PAM 溶液中, 室温下浸泡 30 min, 可使固定化的酶得到活化, 用磷酸缓冲液冲洗后可用于下一次检测。经过重生的自组装膜与初始状态的膜荧光强度相比, 恢复了 88% 左右, 如图 5 所示。这表明, 该自组装膜多层膜具有较好的可逆再生性。

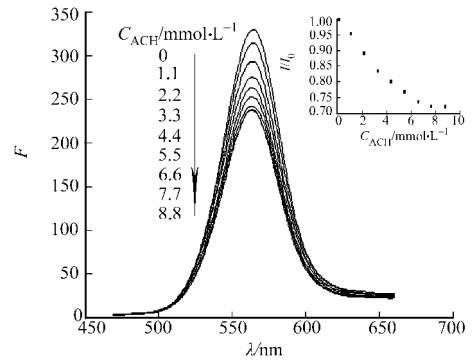


图 3 不同乙酰胆碱浓度下的 Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA 自组装膜荧光光谱

Fig. 3 Fluorescent spectra of Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA exposed to different concentration of ACH

图 5 再生前后 Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA 自组装膜的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of regeneration before and after the Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA

### 3 结束语

通过静电吸引作用,成功地将巯基丙酸稳定的 CdSe 量子点、乙酰胆碱酯酶层层组装在石英表面,构建了一种以量子点为荧光探针的酶抑制传感器。讨论自组装膜的组装条件,利用有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制机理,成功检测痕量久效磷。该方法具有制备方法简单、响应灵敏度高、可再生使用等优点,对有机磷残留的检测具有良好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] MILLARD C B, BROOMFIELD C A. Anticholinesterases: Medical applications of neurochemical principles[J]. J Neurochem, 1995, 64(5): 1909-1918.
- [2] LIU L B, HASHI Y, QIN W P. Development of automated online gel permeation chromatography-gas chromatography-mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural products[J]. J Chromatogr (B), 2007, 845(1): 62-68.
- [3] VEGA A B, FRENCH A G, VIDAL J L M. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2005, 538(1/2): 117-127.
- [4] CAI Z W, WANG D L, MA W T. Gas chromatography/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters by an isotope dilution technique[J]. Anal Chim Acta, 2004, 503(2): 263-270.
- [5] LIU Guodong, LIN Yuehe. Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/ amperometric detection of organophosphate pesticides and nerve agents[J]. Anal Chem, 2006, 78(3): 835-843.
- [6] SUN Xiangying, XIA Kaohao, LIU Bin. Design of fluorescent self-assembled multilayers and interfacial sensing for organophosphorus pesticides[J]. Talanta, 2008, 76(4): 742-751.
- [7] LIU Bin, SUN Xiangying, HE Fei. Preparation and characterization of a  $\text{Cu}^{2+}$  chemosensor based on fluorescent self-assembled sandwich bilayers[J]. Thin Solid Films, 2008, 516(8): 2213-2217.
- [8] 李 芳, 孙向英. 金基质的固体表面荧光法测定痕量  $\text{Mn}^{2+}$  [J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(1): 26-29.
- [9] ZHANG H, ZHOU Z, YANG B, et al. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles[J]. J Phys Chem (B), 2003, 107(1): 82-13.
- [10] CHEN Xianfeng, JOHN L, HUTCHISON, et al. A one-step aqueous synthetic route to extremely small CdSe nanoparticles[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2008, 319(1): 140-143.

## Determination of Monocrotophos Based on Self-Assembled Multilayer Films with Fluorescent Probes

YANG Guangxin, SUN Xiangying, LIU Bin

(College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** A fluorescent self-assembled multilayer films (Quartz/PDDA/CdSe/PDDA/ACHE/PDDA) was constructed by putting mercaptopropionic acid modified CdSe quantum dots (QDs), PDDA and acetylcholinesterase (ACHE) onto the quartz substrate alternately with the layer by layer assembly technique. And CdSe QDs on the films was used as fluorescent probes. By the enzymatic inhibition, the self-assembled multilayer films could be used to detect trace organophosphorus pesticides successfully. This method was used to detect monocrotophos as low as  $48.64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  under the optimal conditions that, inhibition time was 16 minutes, substrate concentration was  $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and the pH of substrate solution was about 9.0. The self-prepared multilayer films exhibited good regeneration, stability, and high sensitivity.

**Keywords:** quantum dots; fluorescent probe; acetylcholinesterase; self-assembled multilayers films; organophosphorus pesticide