

基于酶传感器的农药浓度便携式实时测量装置*

陈志刚^{1,2} 张启甲¹ 邱白晶¹ 王 坤¹ 吴春笃³

(1. 江苏大学现代农业装备与技术省部共建教育部重点实验室, 镇江 212013;

2. 江苏大学环境学院, 镇江 212013; 3. 扬州环境资源职业技术学院, 扬州 225127)

【摘要】 设计了一种应用酶传感器的便携式农药浓度测量装置,由丝网印刷酶电极、信号调理电路和单片机 C8051F040 组成。酶传感电极修饰方法使涂层电荷转移电阻减小而加速电荷转移。装置检测出酶抑制率与农药(西维因)浓度的对数在农药(西维因)质量浓度为 5 ng/mL ~ 2 μ g/mL 时呈线性关系,最低检出限为 1.7 ng/mL,检出时间小于 161 s,系统尺寸小,可采用电池供电,为数量级 μ g/L 的农药质量浓度现场检测(如农药喷雾现场)提供了一种便携式快速测量装置。

关键词: 农药浓度 酶传感器 测量装置

中图分类号: S237; S481+.8; X859 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2011)11-0178-05

Portable and Real-time Device for Measuring Concentration of Pesticides Used with Enzyme Sensing Electrode

Chen Zhigang^{1,2} Zhang Qijia¹ Qiu Baijing¹ Wang Kun¹ Wu Chundu³

(1. Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education & Jiangsu Province, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China 2. School of the Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China 3. Yangzhou Vocational College of Environment and Resources, Yangzhou 225127, China)

Abstract

A kind of portable device for measuring concentration of pesticides used with enzyme sensor was designed. It included screen-printed enzyme electrode, signal conditioning circuit and MCU C8051F040. The preparation of enzyme electrode made the coated resistance of charge transfer reduced, charge transfer accelerated; and a reliable liner relationship between the inhibition of enzyme and $\log[\text{carbaryl}]$ was obtained from 5 ng/mL to 2 μ g/mL, with the detection limitation of 1.7 ng/mL. Response time of the device was less than 161 s. The size of the device was small and the power was supported by battery. It provided a portable device for rapid measuring and spotty concentration of pesticide in μ g/L level.

Key words Concentration of pesticides, Enzyme sensor, Measuring device

引言

喷雾现场监测^[1]中需要农药浓度的快速检测技术。现今农药浓度主要通过实验室仪器检测。其中高精度检测设备有气相^[2]及高效液相色谱仪-质谱仪联用^[3]、分光光度计^[4]和近红外光谱仪^[5]。这类设备检测灵敏且准确,但不能现场应用。目前可

用于现场检测的是速测卡检测,它通过显色变化进行检测,需对颜色变化进行处理,如图像处理等,再进行定量分析。

酶传感技术是目前应用于农药浓度快速检测的前沿性研究方向。酶传感器可以实现现场检测和定量分析,其中酶的固定材料和酶种类的不同对农药浓度检测的影响是重点研究领域,许多学者对此进

收稿日期: 2011-05-12 修回日期: 2011-07-03

* 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2008AA100905、2006AA10A305-3)和江苏省属高校自然科学重大基础研究项目(10KJA470007)

作者简介: 陈志刚,教授,主要从事农业环境工程研究, E-mail: chenzg@ujs.edu.cn

通讯作者: 邱白晶,教授,博士生导师,主要从事农业工程及自动化研究, E-mail: qbj@ujs.edu.cn

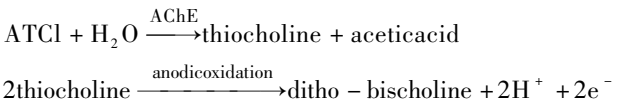
行了研究^[6-10],而对酶的固定材料差异和抑制效果不同的实验确定是目前酶传感速测装置的研究难点。

本文以 AChE 酶和纳米复合材料硫化镉-石墨烯(CdS-G)进行传感电极研究,结合设计的配套电路,设计基于酶传感的便携式农药浓度实时测量装置。

1 酶传感检测农药浓度方法和酶电极制备

1.1 酶传感检测农药浓度方法

酶传感器法是应用计时电流技术的电化学方法。在电解池内施加恒定电压,根据酶抑制原理,氯化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine chloride,简称 ATCl)在乙酰胆碱酯酶(AChE)催化作用下发生的反应为



电子转移在电解池中形成微弱电流信号。农药对 AChE 有抑制作用,可改变反应电流信号,由检测到的微电流可得到农药浓度与酶抑制率 $I_n(\%)$ 的关系^[11],其中酶抑制率与电流信号变化之间的关系为

$$I_n = \frac{i_1 - i_2}{i_1} \times 100\%$$

(1)

其中, i_1 为电极在无农药的底物溶液中测得的稳定电流信号; i_2 为电极在含有一定浓度农药溶液中浸泡一段时间后,测得的稳定电流信号。

1.2 酶电极制备

1.2.1 基底电极——丝网印刷电极

为实现农药浓度速测装置的便携性和快速实时性,基底电极选用丝网印刷电极(screen-printed electrode,简称 SPE),其结构如图 1 所示。其中工作电极(work electrode,简称 WE)和对电极(counter electrode,简称 CE)材料为石墨,参比电极(reference electrode,简称 RE)材料为 Ag|AgCl。实验选用上海易科达公司的丝网印刷电极产品,型号为 AC1.W4.R2。

1.2.2 酶电极制备方法选取

酶电极制备方法主要是基于酶固定方法的选择。酶的固定方法包括吸附法、包埋法、共价键合法

和交联法等传统方法及静电纺丝法、纳米技术处理等一些新型的固定方法。本文采用新型纳米复合材料硫化镉-石墨烯(CdS-G)^[12]处理技术进行酶的固定。

1.2.3 纳米复合材料(CdS-G)修饰固定 AChE 酶

具体步骤为:①在丝网印刷电极的工作电极表面滴涂 0.5% 的壳聚糖-醋酸溶液 6 μL 并在室温下晾干(记为 CHIT/SPE)。②称取 1 mg CdS-G 纳米复合物超声分散于 1 mL 二次蒸馏水中,超声处理 5 min 得到 1 mg/mL 均相分散液,取 6 μL 该分散液滴涂在 CHIT/SPE 工作电极表面得到 CdS-G-CHIT/SPE。③在丝网印刷电极的工作电极表面滴涂 6 μL AChE 溶液,并在室温下晾干得到丝网印刷酶电极 AChE-CdS-G-CHIT/SPE,置于 4℃ 冰箱中储存备用。

1.2.4 纳米复合材料(CdS-G)修饰电极性能分析

采用电化学阻抗图谱分析高频区电阻阻抗和低频区电容阻抗,确定其对电荷转移速率的影响。由于所研究的酶传感农药浓度速测方法中得到的信号为缓慢变化的直流微电流信号,故只考虑高频区电阻阻抗,而电阻阻抗值由圆弧的半径大小来表征,具体解析方法见图 2^[13]。

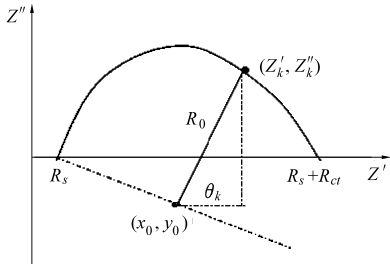


图 2 高频区阻抗解析示意图

Fig. 2 High frequency area impedance analytic schemes

将修饰前后的 SPE 电极分别在含有 5 mmol/L Fe(CN)₆^{3-/4-} 的 0.1 mol/L KCl 溶液中进行电化学交流阻抗技术分析,在幅值为 5 mV、频率范围为 0.01 Hz~100 kHz 的低频电势驱动下,得出两条修饰前后的电化学阻抗图谱,如图 3 所示。

由图 3 可以看出阻抗图谱在高频区的半圆部分,圆弧半径减小,由图 2 得出解析公式为 $R_{ct} = 2\sqrt{R_0^2 - y_0^2}$, $R_s = x_0 - \frac{R_{ct}}{2}$,相应无修饰材料 CdS-G 的电极电荷转移电阻值 $R_{cta} = 417\ \Omega$,使用修饰材料 GdS-G 后的电极电荷转移电阻值 $R_{ctb} = 100\ \Omega$,涂层电荷转移电阻明显减小,则相应的电子转移速度加快,在 CdS-G-CHIT/SPE 上更易实现,这说明 CdS-G 纳米复合物适宜作为 SPE 电极的涂层材料,并用于酶的固定。

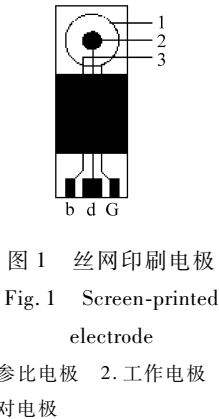


图 1 丝网印刷电极
Fig. 1 Screen-printed electrode

1. 参比电极 2. 工作电极
3. 对电极

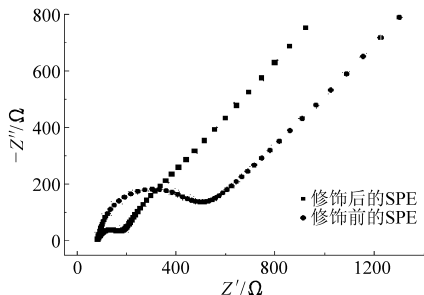


图 3 修饰涂层前后的电极电化学阻抗图谱

Fig. 3 Electrochemical impedance spectra of electrode with modified coating or no coating

2 农药浓度速测装置整体结构设计

装置整体结构如图 4 所示。由配套电路(单片机、丝网印刷酶电极信号调理电路)、转接口和丝网印刷酶电极组成。

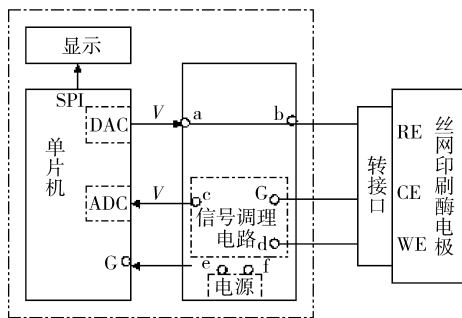


图 4 配套装置结构示意图

Fig. 4 Supported device structural diagram

单片机的主要连接有:①DAC 经 a 到 b 再到酶电极参比电极 RE 端,输出 0.72 V 恒定电压。②ADC 采用信号调理电路 c 端输出的电压信号,与信号地 G 端连通。③通过增强型串行外设接口 SPI 连接液晶显示模块。接入电源模块为信号调理电路供电。

采用转接口是因测量过程中需要进行酶电极的更换,而丝网印刷酶电极尺寸小,更换过程会影响检测速度,设计中采用以 USB-A 型公口改装的转接口,方便酶电极插拔,提高整体检测速度。

3 检测农药浓度的酶电极配套电路

常温烟雾机施药后空气中农药质量浓度数量级为 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[4],该浓度下施加恒定电压,丝网印刷酶电极输出缓慢变化的 μA 级电流信号。本文设计了单片机加调理电路作为配套电路,以完成农药浓度检测。

3.1 酶电极配套电路功能及参数要求

酶电极配套电路功能包括:提供恒定电压、微电流信号转换放大、数据采集和显示。

设定参数要求:①电路提供一路 0.72 V 恒定电压。② μA 级电流信号转换为 0 ~ 2.5 V 的电压信号。③A/D 模块处理精度不低于 10 位,D/A 模块可以输出保证小数点后 3 位精度的电压信号。④单片机有足够的 I/O 口,用于扩展显示模块。

3.2 核心器件选取和信号调理电路设计

3.2.1 单片机选取

为实现装置的便携性,单片机需集成 12 位多通道 ADC、12 位 DAC、多种串口和 Flash 存储器等,以完成采集信号、输出恒定电压信号、便于通信和扩展的功能。

单片机选用 51 系列单片机 C8051F040。芯片尺寸为 12 mm × 12 mm × 1.2 mm。

3.2.2 运算放大器选取

考虑到运算放大器的输出误差受失调电压 V_{os} 、偏置电流 I_b 的影响^[14],故选取偏置电流 I_b 远小于被测电流 I_i 、输入阻抗 R_{in} 远大于反馈电阻 R_f 的运算放大器。

信号调理电路选用 CA3140 集成运放和 OP07 运算放大器。

3.2.3 信号调理电路设计

信号调理电路设计为 I/V 转换放大电路,电路如图 5 所示。图中 R_2 、 R_5 为输入平衡电阻,以减小输入失调电流,并联电容 C_1 、 C_2 为消振电容。输入 I_i 与输出 V_0 的关系为

$$V_0 = \frac{I_i R_1 R_4}{R_3} \quad (2)$$

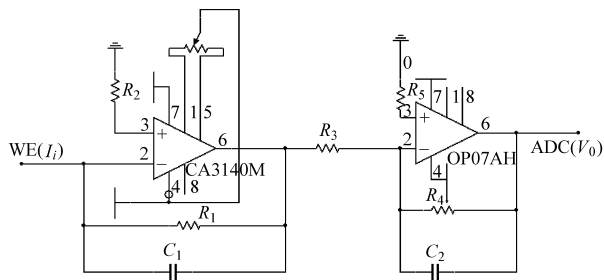


图 5 配套电流转换放大电路

Fig. 5 Supported circuit of the current converter and amplifier

电阻 R_1 、 R_3 、 R_4 取值范围为 $\text{k}\Omega$ 级。调节可变电阻 R_1 、 R_4 ,可得到不同的放大倍数,放大倍数不大于 5×10^5 即可。通过实验测得的电流信号大小确定 R_1 和 R_4 取值。信号调理电路板为 55 mm × 40 mm 的 PCB 板。

4 农药浓度速测装置性能测定

4.1 装置性能测定参数

性能测定参数包括农药质量浓度在 $\mu\text{g}/\text{L}$ 级时的装置检出时间、装置可检出的线性浓度范围及最

低检出限。

4.2 参数测定方法

具体步骤为：①取丝网印刷酶电极放入含有 2 mmol ATCl 的 5 mL pH 值为 7.0 的 0.1 mol/L 的 PBS 溶液中,测量抑制前的响应信号。②将该丝网印刷酶电极取出,依次浸泡在不同质量浓度的样本溶液中抑制 2 min,再次放入该 PBS 溶液,测量抑制后的响应信号。

4.3 装置性能测定实验设计

样本为氨基甲酸酯类农药西维因(carbaryl)。实验选取质量浓度分别为 0、0.005、0.008、0.02、0.08、0.1、0.2、0.5、2 μg/mL 的西维因溶液。

检测仪器为农药质量浓度速测装置和 CHI660B 型电化学工作站。所有的测定均在室温(25℃)条件下进行。

4.4 测定结果及分析

4.4.1 装置检出时间的确定

应用计时电流技术,测量在不同西维因农药质量浓度下电流随时间的变化情况,如图 6 所示。曲线由上至下依次为在质量浓度 0、0.005、0.008、0.02、0.08、0.1、0.2、0.5、2 μg/mL 的西维因农药溶液中浸泡 2 min 后测得的 $I-t$ 曲线,对曲线由上到下标记为 1~9。

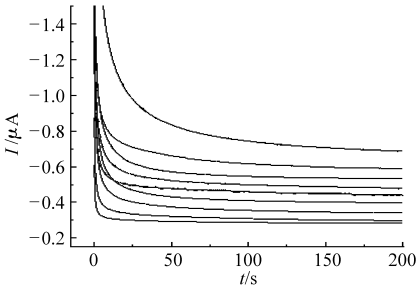


图 6 浸泡于不同农药(西维因)质量浓度的稳定电流响应
Fig.6 Stable current response after incubation in different concentrations of carbaryl solution

图 6 所示,曲线均无限趋向于某一直线。这样就涉及到两个基本的参数,即 $|k|$ 与 δ_0 。其中 δ_0 小于 10^{-5} , $|k|$ 为曲线上离散点斜率, $|k|$ 的确定方法为选取两点电流差值与时间差的比值^[15]。 δ_0 的选取决定因素:检测农药质量浓度数量级为 μg/L 时的农药质量浓度检测允许相对偏差范围 0~0.5 ng/mL 和相应检测的电流误差范围 0~3 nA。

利用上述方法得到图 6 中每条曲线在电流误差范围内的检出时间 $t_1 \sim t_9$, 计算平均值,得出检出时间均值为 160.7 s。

4.4.2 装置检测线性浓度范围及最低检出限确定

因检测到电流值的范围为 0.2~0.7 μA,故可设置电压放大倍数为 3.5×10^5 ,即电阻 R_1 、 R_3 、 R_4 可

取值为 700、10、5 kΩ。利用农药浓度速测装置在相同实验条件下进行实测,记录所得到的稳定电压值,并由式(2)计算稳定电流值。如表 1 所示。

表 1 装置在不同西维因质量浓度下测得的响应值
Tab.1 Voltage in different concentrations of carbaryl measured by device

西维因质量浓度 /μg·mL ⁻¹	V_0/V	$I_i/\mu A$	$ I_{CHI} /\mu A$	偏差/nA
0	0.246 8	0.705	0.702	3
0.005	0.207 9	0.594	0.596	2
0.008	0.188 5	0.539	0.536	3
0.02	0.170 5	0.487	0.485	2
0.08	0.157 0	0.449	0.447	2
0.1	0.139 5	0.399	0.401	2
0.2	0.121 2	0.346	0.343	3
0.5	0.106 5	0.304	0.303	1
2	0.070 7	0.202	0.204	2

由表 1 数据可以得出,农药浓度速测装置测得的电压值 V_0 经处理后得到测量电流 I_i ,与计时电流技术检出的电流值 I_{CHI} 最大偏差为 3 nA,说明该装置在检测误差范围内,可适用于农药浓度检测。

由装置测得的电流信号通过式(1)计算可得不同浓度西维因溶液浸泡后的酶抑制率 $I_n(\%)$ 。由酶抑制率与西维因农药浓度的校正曲线可知,酶抑制率与西维因浓度的对数 $\lg[\text{carbaryl}]$ 呈良好的线性关系,线性方程为 $y = 20.35 \lg x + 66.6$ ($C_1 \leq x \leq C_2$), C_1 为 5 ng/mL, C_2 为 2 μg/mL。线性相关系数为 0.978。装置检测农药(西维因)的线性质量浓度范围为 5 ng/mL~2 μg/mL,且在 3 倍噪声时得出其最低检出限为 1.7 ng/mL。

5 结论

(1)丝网印刷酶电极制备过程中,在无修饰材料 CdS-G 时电荷转移电阻 R_{cta} 为 417 Ω,利用 CdS-G 修饰电极后电荷转移电阻 R_{ctb} 为 100 Ω,涂层电荷转移阻抗减小 317 Ω,说明 CdS-G 纳米复合物适宜作为 SPE 电极的涂层材料,并适用于进行酶的固定。

(2)农药浓度速测装置检测农药(西维因)的线性质量浓度范围为 5 ng/mL~2 μg/mL,,线性相关系数为 0.978。最低检出限为 1.7 ng/mL。

(3)农药浓度速测装置的检出时间为 160.7 s,装置尺寸小,可采用电池供电,从而为农药浓度的现场检测提供了一种便携式实时测量装置。

参 考 文 献

- 1 邱白晶, 李坤, 沈成杰, 等. 连续可变量喷雾系统响应特性试验[J]. 农业机械学报, 2010, 41(9): 32 ~ 35.
Qiu Baijing, Li Kun, Shen Chengjie, et al. Response characteristics of variable-rate continuous spraying system[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(9): 32 ~ 35. (in Chinese)
- 2 Leslie S Ettre. M. S. Tswett and the invention of chromatography [M]//Leslie S Ettre, John V Hinshaw. Chapters in the Evolution of Chromatography. LCGC Europe, 2008: 49 ~ 85.
- 3 Wu Gang, Bao Xiaoxia, Zhao Shanhong. Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC - MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup [J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 646 ~ 654.
- 4 吴昊, 邱白晶, 汤伯敏. 药雾浓度沉降曲线拟合方法的试验[J]. 农业工程学报, 2008, 24(10): 118 ~ 121.
- 5 陈菁菁, 李永玉, 王伟, 等. 微量有机磷农药残留近红外光谱快速检测方法[J]. 农业机械学报, 2010, 41(10): 134 ~ 137.
Chen Jingjing, Li Yongyu, Wang Wei, et al. Determination of organophosphorus pesticide residue by using near-infrared spectroscopy[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(10): 134 ~ 137. (in Chinese)
- 6 Du Dan, Wang Minghui, Cai Jie, et al. One-step synthesis of multiwalled carbon nanotubes-gold nanocomposites for fabricating amperometric acetylcholinesterase biosensor [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, 143(2): 524 ~ 529.
- 7 Lin Yuehe, Lu Fang, Wang Joseph. Disposable carbon nanotube modified screen-printed biosensor for amperometric detection of organophosphorus pesticides and nerve agents [J]. Electroanalysis, 2004, 16 (1 ~ 2): 145 ~ 149.
- 8 Kanchan A Joshi, Jason Tang, Robert Haddon, 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.
- 9 孙霞, 王相友, 王小俞. 用于农药残留快速检测的生物传感器灵敏度筛选试验[J]. 农业工程学报, 2009, 25(3): 295 ~ 297.
- 10 Steven Bird, Tara D. Sutherland, Chip Gresham. OpdA, a bacterial organ phosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides [J]. Toxicology, 2008, 247(2 ~ 3): 88 ~ 92.
- 11 Sun Xia, Wang Xiangyou. Acetyl cholinesterase biosensor based on Prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(12): 2 611 ~ 2 614.
- 12 Wang Kun, Liu Qian. Graphemes enhanced electrochemiluminescence of CdS nanocrystal for H₂O₂ sensing[J]. Talanta, 2010, 82 (1): 372 ~ 376.
- 13 Murat Ates. Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces [J]. Progress in Organic Coatings, 2011, 71(1): 1 ~ 10.
- 14 Bao Binghao, Zhou Yadong, Yang Ping, et al. Theoretical and experimental study on novel weak current sensor using single nanocrystalline toroidal core with double-winding [J]. Sensors and Actuators A: Physical, 2008, 141(1): 84 ~ 88.
- 15 邱白晶, 赵晓丽, 贾卫东, 等. 基于图像的植物叶面雾滴接触角稳定区间法测量[J]. 农业机械学报, 2009, 40(5): 139 ~ 144.
Qiu Baijing, Zhao Xiaoli, Jia Weidong, et al. Stable interval method based on images to measure drop contact angles on plant leaf surfaces[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(5): 139 ~ 144. (in Chinese)
- 16 Sylvia K, Antje B. An embedded system for portable electrochemical detection [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 123(1): 336 ~ 343.
- 17 Alain Hildebrandt, Jordi Ribas, Ramon Bragos. Development of a portable biosensor for screening neurotoxic agents in water samples [J]. Talanta, 2008, 75(5): 1 208 ~ 1 213.
- 18 Huang Chun-Yueh, Mei-Jywan Syub, Yong-Shuen Chang. A portable potentiostat for the bilirubin-specific sensor prepared from molecular imprinting [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(8): 1 694 ~ 1 699.