

快速检测痕量铜的光电型传感器的研制

商璟,柴春彦,翁芝莹,张洪才,刘国艳*
(上海交通大学农业与生物学院,上海 200240)

摘要: 利用铜对葡萄糖氧化酶的抑制作用,以及葡萄糖氧化酶-辣根过氧化物酶-葡萄糖(Glu)-邻联甲苯胺(OT)偶联反应体系生成蓝色底物的原理,将Glu与OT固定化制成试纸条,插入自制的便携式单色光反射计,组装出检测铜的光电型传感器。当铜的质量浓度范围为1 mg/L~100 mg/L时,光反射强度值与铜的质量浓度呈良好的线性关系。在优化的试验条件下,该方法的检测限为0.064 mg/L,检测时间为5 min。

关键词: 铜;光电型传感器;葡萄糖氧化酶-辣根过氧化物酶-葡萄糖-邻联甲苯胺;快速检测

中图分类号:O657.3 文献标识码:B 文章编号:1006-2009(2012)02-0045-03

Research of Photoelectric Sensor for Fast Test of Trace Copper

SHANG Jing, CHAI Chun-yan, WENG Zhi-ying, ZHANG Hong-cai, LIU Guo-Yan*
(College of Biology and Agriculture, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: A photoelectric sensor was composed by home-made portable monochromatic light reflector which inserted a test strip with immobilized glucose and *o*-tolidine for copper detection. Principle of the photoelectric sensor was that inhibitory effect of copper on glucose oxidase formed blue substrate by using a coupling reaction system of glucose oxidase-horseradish peroxidase-glucose-*o*-tolidine. There was good correlative linearity between 1 mg/L~100 mg/L copper solution and light reflecting intensity. The detection limit of method was 0.064 mg/L, testing time 5 minutes after optimization of the experimental condition.

Key words: Copper; Photoelectric sensor; Glucose oxidase-horseradish-glucose (Glu)-*o*-tolidine (OT); Fast test

适量的铜对生物生长有好处,但是长期接触高浓度的铜会对身体造成严重的毒害作用。含铜工业废水的排放及高铜饲料的使用会导致周围环境中的铜严重超标,为了将环境中铜的浓度控制在安全范围内,利用有效的手段检测铜势在必行^[1]。铜的检测方法主要有原子吸收光谱法和分光光度法,具有定量准确的特点,但在应用中有一定的局限性,如样品前处理复杂,检测时间长,需要大型仪器,不能实现现场检测等^[2-7]。传感器检测技术具有测量迅速、操作简便、便于携带、可实现现场检测等优点,可以弥补上述方法的不足。今利用铜离子抑制葡萄糖氧化酶-辣根过氧化物酶-葡萄糖(Glu)-邻联甲苯胺(OT)偶联反应体系生成蓝色底物的原理,将底物固定化制成试纸条,用光电型传感器检测痕量铜,实现了铜的现场快速检测。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

PHS-3C型精密pH计,上海精密仪器仪表有限公司;袖珍型光电传感检测设备,自行研制。

氯化汞、葡萄糖(Glu)、邻联甲苯胺(OT)、葡萄糖氧化酶(GOD)、辣根过氧化物酶(HRP),分析纯,上海化学试剂采购供应站;水溶性壳聚糖、硅胶,分析纯,上海国药集团。

1.2 试验方法

1.2.1 传感器的设计与组装

收稿日期:2011-05-27;修订日期:2011-12-19

基金项目:上海市科委技术标准专项基金资助项目(06DZ05036)

作者简介:商璟(1987—),女,山东聊城人,在读研究生,研究方向为食品安全检测。

* 通讯作者:刘国艳 E-mail: liuguoyan22@hotmail.com

在袁景淇实验室(上海交通大学电子信息与电气工程学院自动化系)研究生的帮助下,共同完成了光电型传感器的设计与组装。传感器的硬件系统主要由以下几部分构成:①试纸条;②光源;③光转频率转换器;④电源管理器;⑤液晶显示器;⑥复位芯片;⑦单片机。其工作原理为:从光源发出的光投射到试纸条的测试区后被反射,反射光由光转频率传感器接收并转换为电信号进行传输,经过单片计算机数据处理,最终显示在显示器上,且电信号的强度与试纸条测试区的颜色深浅成正比。光电型传感器的硬件系统见图1。

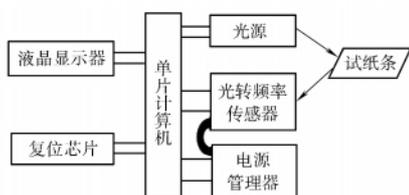


图1 光电型传感器的硬件系统

Fig. 1 Hardware system of photoelectric sensor

1.2.2 试验设计原理

铜离子对葡萄糖氧化酶有抑制作用,且抑制强度与铜离子浓度成正比。葡萄糖氧化酶催化葡萄糖形成过氧化氢,辣根过氧化物酶与过氧化氢反应形成氧化态的辣根过氧化物酶,同时氧化态的辣根过氧化物酶可以将底物邻联甲苯胺氧化成蓝色的物质,即葡萄糖氧化酶-辣根过氧化物酶-葡萄糖-邻联甲苯胺偶联反应体系生成蓝色物质。因此,不同浓度的铜离子与葡萄糖氧化酶孵育后,体系反应受抑制,且生成的蓝色物质的多少随铜离子的浓度大小呈规律性变化^[8-11],即体系的颜色强度与铜离子呈规律性变化。

该试验使用自制光电型传感器,利用铜离子抑制葡萄糖氧化酶-辣根过氧化物酶-葡萄糖-邻联甲苯胺偶联反应体系蓝色物质的生成,其显色强度通过传感器的光电技术转化为电信号,经微处理器转换成反射光强度值,显示在传感器屏幕上。根据不同浓度铜溶液所对应反射光强度绘制标准曲线,从而建立了一种检测铜的光电型分析方法。

1.2.3 反应底物膜片的制作

称取0.05 g 邻联甲苯胺溶于10 mL 无水乙醇中,加入20 mL pH值=5的NaAC-HAC缓冲溶液,再加入1 g 葡萄糖,混合均匀后倒入研钵。加

入2 g 水溶性壳聚糖和2.5 g 硅胶,充分研磨,得到黏稠状的成膜剂,在底物膜承载片上涂布成膜,放入烘箱中干燥。

1.2.4 快速检测铜试条的制作

用于测试铜的试纸条由以下几部分构成:①绝缘防水基片(0.9 cm × 2 cm);②反应底物膜片(0.9 cm × 1 cm);③过滤层(玻璃纤维,0.9 cm × 1 cm);④垫片(0.9 cm × 0.5 cm);⑤盖片(0.9 cm × 2 cm)。

将绝缘防水基片与盖片叠合后,采用机械冲压打孔法打孔,孔径约0.3 cm ~ 0.4 cm,孔壁距离基片边缘0.25 cm ~ 0.3 cm。试纸条的组装过程见图2。将绝缘防水基片作为第一层,然后对准光线透射孔,将第二层即反应底物膜片覆盖其上,再将过滤层准确覆盖到第二层上,将垫片粘在试纸条两边(起均匀厚度的作用),最后将盖片覆盖其上,形成一种"三明治"结构。组装时基片圆孔与盖片圆孔应严格重合。

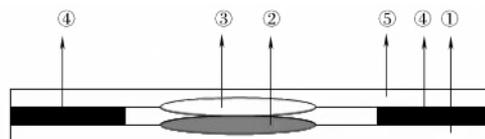


图2 快速检测铜试条的结构分解示意

Fig. 2 Sketch map of fast copper test strip

2 结果与讨论

2.1 重金属与酶最佳孵育时间的确定

将铜离子配制成1 mg/L、3 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、100 mg/L系列质量浓度,与葡萄糖氧化酶、辣根过氧化物酶进行孵育,分别观察孵育30 min、1 h、2 h、4 h后的试纸条显色梯度。试验结果表明,孵育1 h和2 h的铜溶液进行体系反应后所得的颜色肉眼易观察,且梯度较好;孵育30 min的铜溶液几乎对体系反应没有抑制,形成的颜色也无梯度;孵育4 h的铜溶液对体系反应抑制的强度太大,当铜溶液质量浓度 < 10 mg/L 时,体系反应所得的颜色就较浅,而 > 10 mg/L 时,反应后几乎没有颜色出现。因此,该试验选择1 h为最佳孵育时间。

2.2 不同质量浓度铜溶液显色反应后试条反射光强度随时间变化曲线

分别取质量浓度为1 mg/L、3 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、100 mg/L的铜溶液,与葡萄糖氧化酶和

辣根过氧化物酶双酶孵育最佳时间后,滴于制成的试条上进行显色反应,得到反射光强度随时间变化的曲线,见图3。

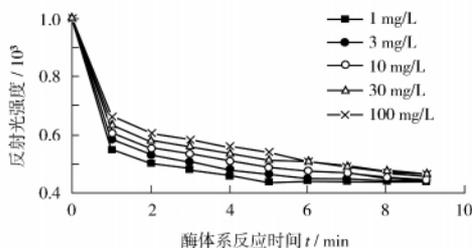


图3 不同质量浓度铜溶液显色反应后试条反射光强度随时间变化曲线

Fig. 3 Reflected light intensity after color reaction of copper test strip with time curve in copper solution of different concentration

由图3可见,向试条滴加不同质量浓度的铜溶液后,曲线急剧下降且呈梯度,大约5 min后曲线逐渐趋近,最后几乎汇集于一点。由于试验没有采取反应终止,随着时间增加,酶与底物的反应受铜的影响越来越弱,最终趋向于充分反应,进而导致显色越来越明显。5 min时不同曲线的梯度良好,且反应较为充分。因此,该试验确定最佳反应时间为5 min。

2.3 光电型传感器检测铜的标准曲线的建立

将100 mg/L铜标准储备液稀释成1 mg/L、3 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、100 mg/L标准应用液系列,在37℃、pH值=5的条件下,与双酶孵育最佳时间后,滴入铜测试条的加样孔中。采用自制光电传感器,测定试条在最佳反应时间后的反射光强度,使用origin 6.0软件,绘制铜溶液质量浓度与试条显色后反射光强度变化的标准曲线,即光电型传感器检测铜的标准曲线,见图4。

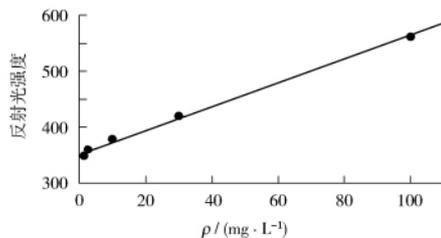


图4 光电型传感器检测铜的标准曲线

Fig. 4 Standard curve for copper test by photoelectric sensor

由图4可见,当铜离子质量浓度在1 mg/L~100 mg/L范围时,随着质量浓度增加,试条显色反应后的反射光强度逐渐增加,且铜离子质量浓度与反射光强度成正比。试条显色反应后的反射光强度与相应铜离子质量浓度呈良好线性关系,回归方程为 $Y = 352 + 2.12X$, $R^2 = 0.997$ ($p < 0.0001$)。

2.4 反应体系最佳pH值的确定

当反应体系的pH值>8或<2时,葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶的活性受到极大的抑制,几乎失去活性。该试验将反应体系的pH值依次调节为2~7,在无重金属孵育的条件下,得到反应体系的分光光度值曲线。由曲线可以看出,当pH值从2增加到5时,曲线急剧下滑,说明体系反应的颜色变深,即反应更为充分;而pH值从5增加到7时,曲线又缓慢上升,说明体系反应的颜色变浅,即反应不如之前充分。因此,当曲线到达最低点即pH值=5时,体系反应最为充分,显色最深,即反应体系的最佳pH值=5。

2.5 检测限的测定

取系列质量浓度的铜溶液,根据3倍标准偏差除以斜率,分别用该方法和原子吸收光谱法进行检测限测定。结果显示,该方法检测限为0.064 mg/L,而原子吸收光谱法的检测限为0.008 mg/L,由此可见,该方法的灵敏度不及原子吸收光谱法。

2.6 其他金属离子对吸光值的影响

试验了 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{6+} 、 Pb^{2+} 等5种常见离子对测定结果的影响,结果误差范围在±5%之内,可认为不影响测试。测得典型干扰离子的允许质量浓度上限分别为: Hg^{2+} 1 mg/L、 Cd^{2+} 100 mg/L、 Fe^{3+} 200 mg/L、 Cr^{6+} 200 mg/L、 Pb^{2+} 500 mg/L。

2.7 方法准确性

用光电型传感器与原子吸收光谱法检测50个已知浓度的含铜标样,回收率分别为89%与97%;选取25个含铜标样和25个不含铜的标样,测试的准确率分别为88%与99%。由此可以看出,该方法的准确性还有待于进一步提高。

3 结语

该试验所建立的铜的光电型传感器检测方法,与确证性的原子吸收光谱法相比,灵敏度、准确性方面还有待提高。但该方法检验成本低廉,检测迅速(只需5 min),操作简单,经过进一步的改进,有

(下转第50页)

表 2 标准曲线、方法检出限及精密度与加标回收试验结果

Table 2 Test results of standard curve, method detection limit, precision and spiked recovery

化合物	回归方程	相关系数 <i>r</i>	加标 0.200 μg/L		加标 0.200 μg/L		MDL	MDL(EPA 508)
			回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	<i>I</i> /(μg · L ⁻¹)	<i>I</i> /(μg · L ⁻¹)
α-硫丹	$y = 1.29 \times 10^3 x - 16$	0.999 7	87.1	4.8	87.8	4.3	0.010	0.009
β-硫丹	$y = 1.54 \times 10^3 x - 38$	0.999 5	88.2	4.0	89.6	3.9	0.008	0.024
硫丹硫酸酯	$y = 1.13 \times 10^3 x - 5$	0.998 8	93.7	4.3	94.3	4.0	0.010	0.002

表 3 实际水样测定结果

Table 3 Test results of water samples

化合物	样品 1		样品 2	
	测定值 ρ /(μg · L ⁻¹)	回收率/%	测定值 ρ /(μg · L ⁻¹)	回收率/%
α-硫丹	—	86.3	1.22	85.5
β-硫丹	—	87.7	—	86.3
硫丹硫酸酯	—	93.2	—	93.8

3 结语

采用气相色谱/负离子化学电离质谱法测定地表水中的硫丹及其代谢物,分析灵敏度高于普通的电子电离质谱法,与电子捕获检测方法接近,同时可以通过质谱对分析物定性。该方法灵敏度高,操作简单,可推广用于水体中其他电负性化合物的快速测定。

[参考文献]

[1] 朱鲁生,于建垒,李光德,等. 硫丹环境毒理研究进展[J]. 环境科学进展,1996,4(1):41-49.
 [2] 张莉. 基质标准校正-气相色谱-质谱法同时检测地下水中有有机氯农药和多环芳烃[J]. 分析实验室,2010,29(2):19-22.

[3] 谢增瑞,庞立新,程相华,等. 固相萃取 GC/MS 法对水溶液中硫丹的检验[J]. 质谱学报,2003,24:123-124.
 [4] 许秀艳,张颖,程麟钧,等. 固相萃取-GC/MS 法测定水中 16 种有机氯农药[J]. 环境监测管理与技术,2010,22(6):51-54.
 [5] 宗栋良,常爱敏,张光明,等. 深圳主要河流中农药类环境激素污染调查[J]. 环境监测管理与技术,2009,21(6):39-43.
 [6] 唐红卫,夏凡,刘鸣. 双柱双检测器气相色谱仪测定有机氯农药方法的研究[J]. 上海环境科学,2004,23(4):168-172.
 [7] 柯常亮,陈洁文,林钦,等. 鱼、虾、贝中硫丹残留量的气相色谱测定[J]. 农药,2009,48(7):515-518.
 [8] 张萌萌,王新红,闫景明,等. 大气颗粒物中硝基多环芳烃的气相色谱-化学电离离子-质谱联用法分析[J]. 环境化学,2010,29(3):376-382.

(上转第 47 页)

望成为更加完善的现场检测铜的新方法,为环境安全控制提供技术保障。

[参考文献]

[1] 顾咏红. 火焰、石墨炉原子吸收法测定地表水中铜和镉[J]. 环境监测管理与技术,2005,17(5):31-32.
 [2] 田宗祥,张玲清. 规模化养猪场排泄物和污水铜、锌含量的检测[J]. 畜牧与兽医,2010,42(7):45-46.
 [3] 周之荣,王文敏,章水萍. 氧化中性红褪色光度法测定食品中的痕量铜(II)[J]. 食品工业科技,2005,26(5):163-164.
 [4] 申金山,李献锐. 液相化学发光法测定粮食中的微量铜[J]. 食品工业科技,2001,22(3):78-79.
 [5] 陈长应. 溶剂浮选分光光度法测定生活饮用水中铜[J]. 环

境监测管理与技术,2009,21(3):50-51.
 [6] 欧阳云. 火焰原子吸收光谱法测定水质中低含量铜的质量控制[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(2):362.
 [7] 李方,侯旭,张新申. 茶叶、银杏叶中铅(II)、镉(II)的测定[J]. 分析化学,2003,31(3):380-381.
 [8] LI H, SADLER P J, SUN H. Coordination chemistry of metals in medicine: Target sites for bismuth[J]. Coordination Chemistry Reviews,1999(185):689-709.
 [9] 谢俊平,卢新. 酶抑制法快速检测食品中重金属研究进展[J]. 食品研究与开发,2010,31(8):220-223.
 [10] 李彤,伊丽丽,魏福祥,等. 重金属离子对葡萄糖氧化酶电极抑制作用的研究[J]. 河北科技大学学报,2009,30(2):166-170.
 [11] 刘京萍,李金,葛兴. 葡萄糖氧化酶抑制法检测食品中铜、锡、铅的残留[J]. 北京农学院学报,2007,22(4):59-62.