

黄曲霉毒素氧化酶/壳聚糖-单壁碳纳米管/聚邻苯二胺修饰电极对杂色曲霉素的检测

陈俊华, 李世川, 姚冬生, 刘大岭

暨南大学生命科学技术学院 微生物技术研究所, 广州 510632

摘要: 将黄曲霉毒素氧化酶(AFO)固定在壳聚糖(CS)-单壁碳纳米管(SWCNTs)杂交膜中, 组装在聚邻苯二胺(POPD)修饰的金电极(Au)表面, 制备了对杂色曲霉素(ST)敏感的生物传感器(AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au)。运用原子力显微镜(AFM)、傅立叶变换红外光谱(FT-IR)和交流阻抗技术(EIS)对电极组装过程进行了表征。循环伏安法研究表明, AFO在修饰电极上发生了准可逆的氧化还原反应, 是表面控制过程, 其式量电位为 -0.436 V (vs. Ag/AgCl), 说明包埋在CS-SWCNTs中的AFO和电极之间发生了直接电子传递。AFO修饰电极对ST具有明显的电催化作用, 其表观米氏常数 K_M^{app} 为 $7.13\text{ }\mu\text{mol/L}$, 催化电流与ST浓度在 $10\sim 310\text{ ng/mL}$ 范围内呈线性关系, 相关系数为 0.997 , 检出限为 3 ng/mL ($S/N=3$), 响应时间小于 10 s 。组装的生物传感器具有较好的稳定性与重现性, 连续检测 20 ng/mL 的ST标准溶液 11 次, 电流值RSD为 3.9% ; 放置一个月后, 其电流响应值仍为初始值的 85.6% 。该方法具有较高的选择性和灵敏度, 应用于实际样品检测时, 其回收率在 $87.6\%\sim 105.5\%$ 之间。建立的ST含量的电化学测定方法简便快捷, 测定结果令人满意。

关键词: 黄曲霉毒素氧化酶, 杂色曲霉素, 单壁碳纳米管, 聚邻苯二胺, 生物传感器

Detection of sterigmatocystin based on the novel Aflatoxin-Oxidase/chitosan-single-walled carbon nanotubes/poly-o-phenylenediamine modified electrode

Junhua Chen, Shichuan Li, Dongsheng Yao, and Daling Liu

Institute of Microbial Biotechnology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: A sensitive electrochemical biosensor based on Aflatoxin-Oxidase (AFO) was developed for detection of sterigmatocystin (ST). The enzyme was immobilized on chitosan-single-walled carbon nanotubes (CS-SWCNTs) hybrid film, which attached to the poly-o-phenylenediamine (POPD)-modified Au electrode. The fabricated procedures of the biosensor were characterized with atomic force microscopy (AFM), fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The cyclic voltammetric results of the biosensor indicated that AFO exhibited a surface-controlled and quasi-reversible electrochemical redox behavior with a formal potential of -0.436 V (vs. Ag/AgCl) in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0), which resulted from the direct electron transfer between entrapped AFO and the underlying electrode. The enzymatic electrode exhibited an excellent electrocatalytic response to ST. The linear range of ST determination was from 10 ng/mL to 310 ng/mL with correlation coefficient of 0.997 , the

Received: October 3, 2009; **Accepted:** November 2, 2009

Supported by: Key Science and Technology Program of Guangdong Province (No. 2005B20401004).

Corresponding author: Daling Liu. Tel: +86-20-85228422; Fax: +86-20-85226223; E-mail: tldl@jnu.edu.cn

广东省科技攻关项目(No. 2005B20401004)资助。

detection limit was 3 ng/mL (S/N=3), and the response time was less than 10 seconds. The apparent Michaelis-Menten constant (K_M^{app}) was estimated to be 7.13 $\mu\text{mol/L}$. The biosensor had the advantages of good repeatability and stability, remaining 85.6% of its original current value after storage at 4°C for a month, and the RSD for 11 replicate determination of 20 ng/mL ST was 3.9%. This AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au modified electrode showed high selectivity and sensitivity in real sample analysis, giving values of recovery in the range of 87.6%–105.5%. The proposed method can be applied to the determination of ST in real samples with satisfactory results.

Keywords: Aflatoxin-Oxidase, sterigmatocystin, single-walled carbon nanotubes, poly-o-phenylenediamine, biosensor

杂色曲霉毒素(Sterigmatocystin, ST)是一种致癌致畸的真菌毒素,是黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT)的合成前体,二者结构相似,都是由双呋喃环与氧杂蒽醌连接组成^[1]。ST 是国际癌症研究机构划分的 2B 类致癌物质,与肺癌、肝癌、胃癌密切相关,是粮食、饲草、玉米、小麦、花生等谷物中的主要真菌污染源^[2],因此测定 ST 的含量具有重要意义。目前测定 ST 的方法主要有薄层层析法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、液质联用法(LC-MS)、气质联用法(GC-MS)和偶联质谱法(Tandem MS)等^[3]。上述方法中,大多数需要繁琐的样品前处理,此外,由于 ST 发荧光的强度远不如黄曲霉毒素,而使用衍生化的方法则容易引入较大的误差,灵敏准确的检测通常需要使用质谱检测器。酶生物传感器由于其检测快速、操作简单、选择性高、检测范围宽等优点而得到广泛的发展。

碳纳米管(Carbon nanotubes, CNTs)自发现以来,因其明显的量子效应、电催化特性以及电选择性等,在电化学和电分析化学中广泛应用^[4]。壳聚糖(Chitosan, CS)富含大量的氨基和羟基,具有很好的生物兼容性、稳定性,对酶有较好的亲和力,并能有效防止酶和电子媒介体的渗漏,广泛用于修饰电极的制备^[5]。将碳纳米管分散在 CS 中,不仅解决了碳纳米管的溶解性问题,还提高了 CS 的导电性,所形成的 CS-CNTs 复合物膜在生物传感器中作为酶的固定载体引起了广泛的关注^[6]。

前期工作研制的多壁碳纳米管/酶生物传感器对 ST 具有较好的响应,检测下限可达 41.6 ng/mL,但该传感器在检测实际样品时电极容易被钝化,且干扰严重^[7]。本研究采用了具有选择渗透特性的聚邻苯二胺(Poly-o-Phenylenediamine, POPD)导电聚合物膜和更好电催化特性的单壁碳纳米管(Single-

walled carbon nanotubes, SWCNTs)为酶膜固定化材料制作酶电极以增强电极的抗干扰性和稳定性。

黄曲霉毒素氧化酶(Aflatoxin-Oxidase, AFO)即黄曲霉毒素解毒酶,是一种对黄曲霉毒素 B1 及其类似物 ST 具有解毒作用的氧化还原酶^[7-8]。本研究利用该酶作为 ST 的分子识别元件,用 CS-SWCNTs 膜作为酶的固定化载体,POPD 膜作为选择性阻挡层,组装了 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 修饰电极,研究了 AFO 修饰电极的直接电化学性质,以及对 ST 电催化行为,并首次实现了对实际样品中 ST 的检测。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

CHI660C 型电化学工作站(上海辰华仪器公司),实验采用三电极系统:金电极(Au,内径为 2 mm)或修饰电极为工作电极,Ag/AgCl(饱和 KCl)电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极。EQUINOX-55 型傅立叶红外光谱仪(Bruker Co., Germany)。AUTOPROBE CP RESEARCH 型原子力显微镜(Thermo Co., USA)。

杂色曲霉毒素(Sterigmatocystin, ST),牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma 公司,壳聚糖(CS, 85%~90%的脱乙酰度,平均分子量为 1×10^6 g/mol,浙江澳兴生物科技有限公司),单壁碳纳米管(SWCNTs,直径 < 2 nm,长度 5~15 μm ,纯度 > 95%,深圳纳米港公司),邻苯二胺(OPD,分析纯,上海化学试剂有限公司)使用前重结晶两次提纯。实验用水为二次蒸馏水,所有电化学实验均在室温下进行。

1.2 电极的制备

1.2.1 POPD/Au 修饰电极的制备

金电极在使用前依次用 1.0 μm 、0.3 μm 和 0.05 μm 的氧化铝粉打磨至镜面,分别用无水乙醇和二次蒸馏水超声 3 min,在 0.5 mol/L 的硫酸中进行循环伏

安扫描(-0.2~1.5 V, 0.1 V/s)直至出现稳定的金的特征峰。将预处理好的 Au 电极置于 N₂ 饱和的含 0.05 mol/L 邻苯二胺的 0.1 mol/L 硫酸电聚合液中, 在-0.2~1.3 V 电位窗口, 以 0.1 V/s 的扫速循环伏安电聚合 60 圈, 即可在电极表面形成一层聚邻苯二胺膜, 记为 POPD/Au。

1.2.2 CS-SWCNTs/POPD/Au 修饰电极的制备

SWCNTs 使用前按文献[9]的方法进行纯化。取纯化处理过的 2 mg SWCNTs 分散于 4 mL 0.5% 的 CS 溶液中(0.5% 的 CS 溶液用 1% 的乙酸配置)超声 30 min, 得到分散均匀的 0.5 mg/mL 的 SWCNTs 浅黑色混悬液。取 5 μ L CS-SWCNTs 滴于 POPD/Au 修饰电极表面, 室温下自然晾干, 得 CS-SWCNTs/POPD/Au 修饰电极。

1.2.3 AFO 酶修饰电极的制备

AFO 的制备参照 Liu 等报道的方法^[10]。酶液浓度为 5 mg/mL, 比活力为 240 U/mg (1U 定义为每分钟降解 1 μ mol ST 所需要的酶量)。取 10 μ L AFO 酶溶液置于 CS-SWCNTs/POPD/Au 电极表面, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中干燥组装过夜, 得到 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 酶修饰电极, 用前在 PBS 中浸泡 5 min, 电极不用时置于 4 $^{\circ}$ C 干燥保存。为了进行对照实验, 用 BSA 代替 AFO 制备了 BSA/CS-SWCNTs/POPD/Au, 制作程序与 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 相似。

1.3 实验方法

酶修饰电极对 ST 的电化学行为用循环伏安法(CV)和稳态计时电流法进行测量。CV 检测的电位窗口是-0.8~0.2 V, 扫描速度为 0.1 V/s; ST 的检测电位是-0.4 V, 在搅拌条件下, 待背景电流稳定后, 加入一定量的 ST, 计算稳态响应电流。所有电位都是以 Ag/AgCl(饱和 KCl)电极为参比。

2 结果与讨论

2.1 原子力显微镜(AFM)表征

用原子力显微镜对电极表面进行了表征, 如图 1A 所示, 碳纳米管均匀分散在壳聚糖中形成一个粗糙的载体表面, 这为酶的结合提供了充足的位点。当 AFO 固定在 CS-SWCNTs 载体后(图 1B), 其电极表面出现许多岛状物质, 表面变得平缓, 并且

厚度增加了约 40 nm, 说明 AFO 已被修饰到电极表面。

2.2 红外光谱分析

根据蛋白质的酰胺 (1700~1600 cm⁻¹, 产生于肽链上 C=O 的伸缩振动)和酰胺 (1620~1500 cm⁻¹, 产生于肽链上 N-H 弯曲和 C-N 伸缩)基团的红外吸收特征峰的位置可以判断蛋白质的二级结构是否发生变化或变性^[11]。如图 2 显示, AFO 固定在 CS-SWCNTs 杂交膜内的酰胺 I 峰和酰胺 II 峰分别为 1654 cm⁻¹和 1542 cm⁻¹(谱线 a), 与自由状态 AFO 的酰胺峰(1655 cm⁻¹)和酰胺峰(1543 cm⁻¹)非常接近(谱线 b), 这说明 AFO 在 CS-SWCNTs 膜内基本保持了其天然构象, 同时也表明 CS-SWCNTs 杂交纳米膜能够有效地实现对 AFO 的无损固定化, 是一种优良的酶固定化材料。

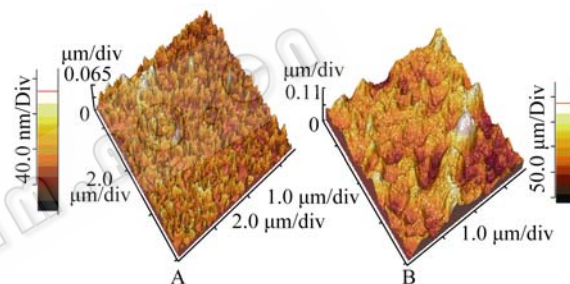


图 1 CS-SWCNTs 修饰电极(A)和 AFO-CS-SWCNTs 修饰电极(B)的原子力显微镜图

Fig. 1 AFM images of the CS-SWCNTs (A) and the AFO/CS-SWCNTs (B) modified electrode.

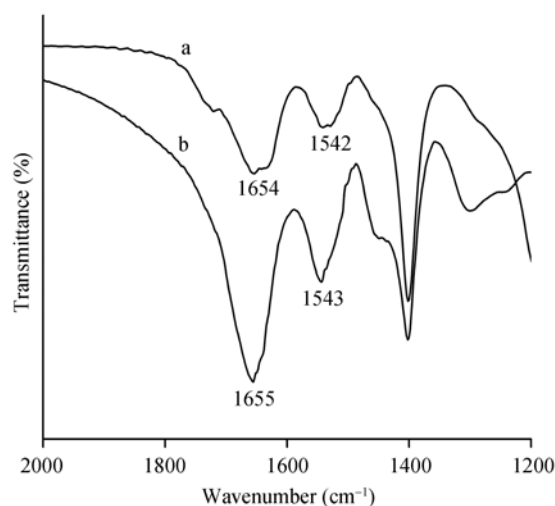


图 2 CS-SWCNTs 膜内 AFO (a) 和自由态 AFO (b) 的傅立叶红外光谱图

Fig. 2 Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) of AFO embedded in CS-SWCNTs film (a) and free AFO (b).

2.3 电化学交流阻抗分析

电化学交流阻抗谱(EIS)是表征修饰电极界面导电性质变化的有力手段。图 3 是不同修饰电极在 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) + 0.1 mol/L KCl 溶液中测得的交流阻抗谱图, 位于高频的半圆部分(半圆直径)对应电子传递阻抗(R_{ct}), 位于低频的直线部分对应扩散控制 Warburg 阻抗。由图可见, 裸 Au 电极(曲线 a)几乎为一条直线, 表明电子传递到电极表面只受扩散控制, 电极上不存在阻挡电子传输的物质。当在电极上电聚合 POPD 膜后, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针分子不能透过致密的 POPD 膜(曲线 c), R_{ct} 显著变大($R_{\text{ct}} = 3200 \Omega$)。当再组装一层 CS-SWCNTs 后(曲线 b), 其 R_{ct} (1050 Ω) 小于 POPD/Au, 这是由于 SWCNTs 能促进电子转移, 同时与 POPD 膜通过 π - π 共轭作用形成针孔缺陷, 构成了探针分子转移的通道。当进一步吸附 AFO 分子后, R_{ct} 增大到 4700 Ω (曲线 d), 这说明 AFO 不仅仅吸附在电极表面, 而且还占据了 CS-SWCNTs 纳米膜内部分 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 向电极扩散的通道, 阻碍了电子与电极之间的传递, 结果表明酶膜组装成功。

2.4 AFO 的直接电化学

循环伏安(CV)图(图 4)显示, 裸 Au 电极在 PBS 中没有电化学响应(曲线 a), 当电聚合 POPD 膜后(曲线 b), 其电流明显变大, 说明 POPD 成功聚合在电极表面形成了很好的导电膜。与 CS-SWCNTs/POPD/Au

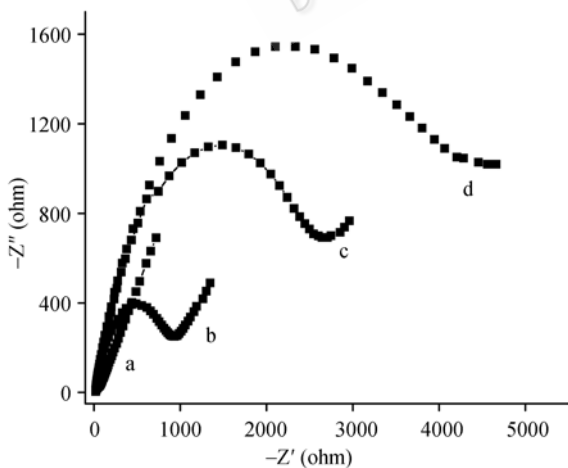


图 3 不同修饰电极的交流阻抗谱

Fig. 3 Electrochemical impedance spectra (EIS) of different electrodes in 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) solution containing 0.1 mol/L KCl. a: bare Au; b: CS-SWCNTs/POPD/Au; c: POPD/Au; d: AFO/CS-SWCNTs/POPD.

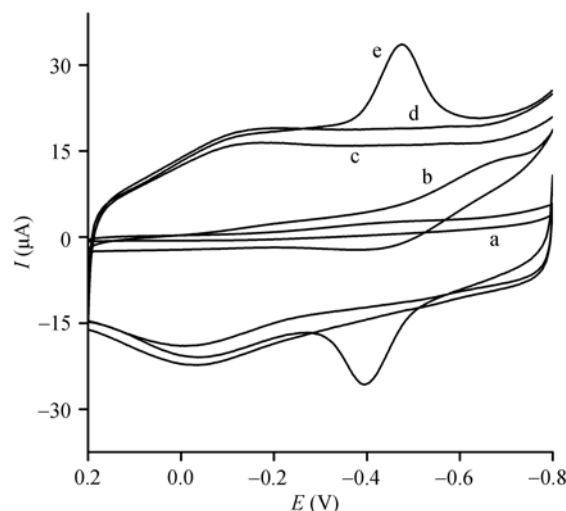


图 4 不同修饰电极的循环伏安图

Fig. 4 Cyclic voltammograms of bare Au (a), POPD/Au (b), BSA/CS-SWCNTs/POPD/Au (c), CS-SWCNTs/POPD/Au (d), and AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au (e) in 0.1 mol/L pH 7.0 PBS. Scan rate: 0.1 V/s.

修饰电极(曲线 d)相比, AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 酶电极(曲线 e)出现了一对明显的基本对称的氧化还原峰, 当用 BSA 代替 AFO 组装酶电极时(曲线 c), 没有出现这对氧化还原峰, 说明曲线 e 中的一对峰是 AFO 发生直接电子转移所产生的伏安峰。由曲线 e 可知, AFO 的氧化峰电位(E_{pa})和还原峰电位(E_{pc})分别为 -0.396、-0.476 V, 峰电位差(ΔE_{p})为 0.08 V, 计算得到它的式量电位(E°)为 -0.436 V(vs. Ag/AgCl); 此外, AFO 的氧化还原峰电流之比 $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}} = 0.97$, 接近 1。上述实验结果表明, 修饰电极上的 AFO 发生了准可逆的电化学反应。电聚合在 Au 表面的 POPD 膜与 CS-SWCNTs 相互作用形成特殊的多孔结构, 表现出了良好的电子传输与离子通透能力, 使 AFO 的电化学反应能够产生较好的氧化还原峰。

图 5 是不同扫速时, AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 电极在 PBS 中的 CV 图。结果表明: 在 0.01~0.2 V/s 扫描速度范围内, 随着扫速(v)的增加, 氧化峰和还原峰电位几乎不变; 同时发现, AFO 的氧化还原峰电流与 v 之间均呈线性关系(图 5 插图), 回归方程分别为: $I_{\text{pc}}(\mu\text{A}) = 90.135 v (\text{V/s}) + 0.5812$ ($r = 0.9954$); $I_{\text{pa}}(\mu\text{A}) = -88.39 v (\text{V/s}) - 0.1606$ ($r = 0.9988$), 说明修饰电极上的 AFO 电化学反应是受表面控制过程的, 同时 AFO 已经很好地组装到了 CS-SWCNTs 载体上。

溶液 pH 值对酶修饰电极的循环伏安行为有重要影响, 如图 6 所示, 随着 pH 值的增大(pH 5.5~8.0), 氧化还原峰电位均负移, 表示 AFO 的氧化还原反应伴随质子的传递。E°' 与 pH 值呈线性关系, 线性方程: $E^{\circ'} (V) = -0.0532 \text{ pH} - 0.0644$ ($r = 0.9959$), 斜率为 -53.2 mV/pH , 接近于交换电子数和质子数相等时的理论值 -58.0 mV/pH , 这表明该电极过程为等电子等质子传递过程。在 pH 7.0 时, 响应电流最大, 综合考虑电极的响应性能和使用寿命, 试验选择测试底液的 pH 值为 7.0。

2.5 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 对 ST 的电催化作用

图 7 是 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 修饰电极在

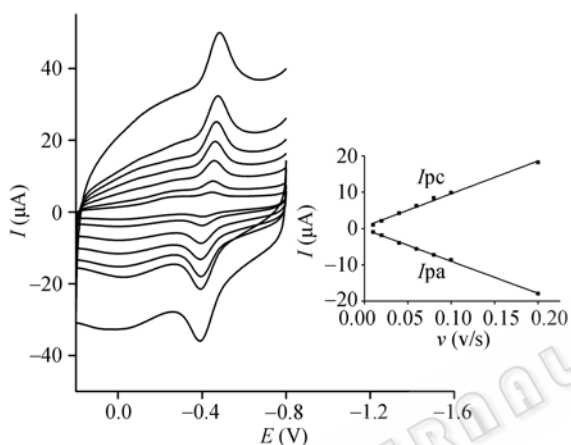


图 5 扫速对电极响应的影响
Fig. 5 Influence of scan rate on peak current of AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au in 0.1 mol/L pH 7.0 PBS. Scan rate: 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 and 0.2 V/s (from inner to outer). Inset: plots of peak current vs. scan rate.

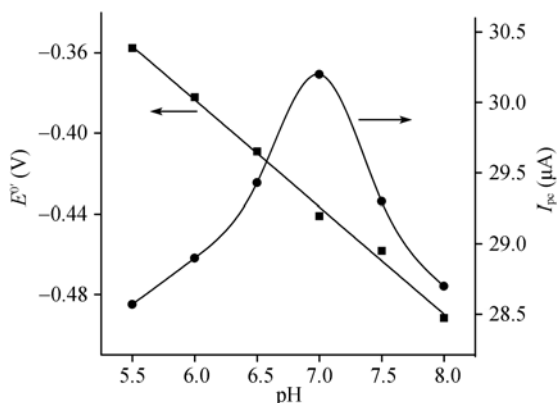


图 6 pH 值对 AFO 氧化还原式量电位和峰电流的影响
Fig. 6 Influence of pH on the cathodic peak current (I_{pc}) and formal potential ($E^{\circ'}$) of AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au. Other conditions are as the same as in Fig. 4.

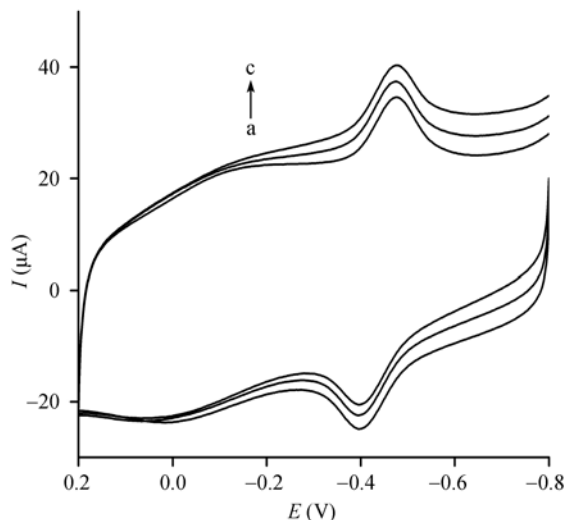


图 7 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 在含不同浓度 ST 的 PBS 中的循环伏安曲线

Fig. 7 Cyclic voltammograms of AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au in 0.1 mol/L pH 7.0 PBS containing 0 ng/mL (a), 10 ng/mL (b), and 20 ng/mL (c) ST. Scan rate: 0.1 V/s.

含有不同浓度 ST 的 PBS 中的循环伏安曲线。由曲线 a 可知, 在没有 ST 的电解质溶液中, AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 展现出一对可逆的氧化还原峰, 实现了 AFO 在修饰电极上的直接电化学反应。随着 ST 浓度的增加(如曲线 b 和 c), AFO 修饰电极的还原峰电流增大, 而氧化峰电流减小, 氧化峰与还原峰电位基本保持不变, 说明 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 对 ST 具有良好的电催化还原作用。上述实验结果表明, 固定在 CS-SWCNTs 复合材料中的 AFO 不仅可以进行有效的直接电子转移, 而且还保持了对 ST 的生物电催化活性。

图 8 描述了在恒定电位为 $-0.4 \text{ V (vs. Ag/AgCl)}$ 时, AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 对 ST 浓度变化的电流-时间响应情况。由图可见, 随着 ST 浓度梯度变化, 响应电流持续增大, 当 ST 浓度高于 380 ng/mL 时, 出现一个电流响应平台, 说明电极反应具有典型的 Michaelis-Menten 酶反应动力学特征。该酶生物传感器响应迅速且灵敏, 平均响应时间小于 10 s , 这归功于单壁碳纳米管与 POPD 膜的协同增效作用加速了电子在酶和 Au 电极表面的传递。酶电极的响应电流与 ST 浓度在 $10\sim 310 \text{ ng/mL}$ 范围内呈线性关系(图 8 插图), 线性回归方程为: $I (\mu\text{A}) = 0.0389 c (\text{ng/mL}) + 2.5825$ ($r=0.997$), 检出限为 3 ng/mL ($S/N=3$), 低于先前

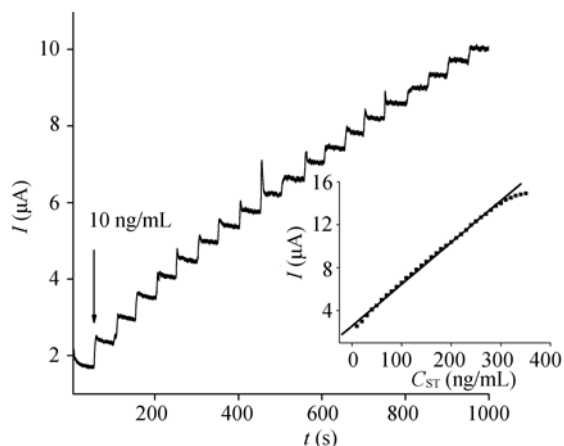


图 8 计时电流法检测传感器对 ST 的响应

Fig. 8 A typical amperometric *i-t* curve of AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au to successive addition of 10 ng/mL ST in 0.1 mol/L pH 7.0 PBS at -0.4 V. Inset: plots of current vs. concentration of ST.

报道的 41.6 ng/mL^[7], 也低于文献报道的 TLC 法检出限(140 ng/mL)^[12]和 GC-MS 法检出限(5 ng/mL)^[13]。

表观米氏常数 (Apparent Michaelis-Menten constant) K_M^{app} 是表征酶与底物之间亲和力大小的重要指标。它可由 Lineweaver-burk 方程^[14]求得: $1/I_{\text{ss}} = 1/I_{\text{max}} + K_M^{\text{app}}/(cI_{\text{max}})$, 式中 I_{ss} 是加入底物后测得的稳态电流, I_{max} 是加入饱和底物后测得的最大电流, c 是底物浓度。通过 $1/I_{\text{ss}}$ 与 $1/c$ 作图, 求得 K_M^{app} 为 7.13 $\mu\text{mol/L}$ 。较小的 K_M^{app} 说明 CS-SWCNTs 杂化膜载体上的 AFO 保持了较高活性, 与底物 ST 有较大的亲和力。

2.6 酶电极的稳定性和重现性

将一支 AFO/CS-SWCNTs/POPD/Au 电极置于含 20 ng/mL ST 的 pH 7.0 PBS 溶液中, 连续循环伏安扫描 50 圈, 峰形几乎保持不变, 峰电流下降 2.6% , 表明该酶电极的稳定性较好。用该生物传感器对 20 ng/mL ST 重复测定 11 次, 其电流响应的平均相对标准偏差(RSD)为 3.9% , 表明该电极具有较好的检测重复性。另外, 同时制备 7 根酶修饰电极, 相同条件下对 20 ng/mL ST 的响应电流的 RSD 为 4.4% 。表明该修饰电极具有较好的制作重现性。电极不用时置于 4°C 的 pH 7.0 PBS 溶液上方保存, 期间间歇性使用, 4 d 后响应信号为初始值的 95.5% , 30 d 后仍能保持 85.6% , 说明该修饰电极具有较长的使用寿命。

2.7 干扰试验

酶电极的抗干扰能力是表征酶电极是否优异的重要参数。在含 50 ng/mL ST 的 pH 7.0 PBS 溶液中进行测定, 控制相对误差不超过 $\pm 5\%$ 的条件下, 分别加入 1000 倍的 PO_4^{3-} 、 NO_3^- 、柠檬酸根、果糖、葡萄糖; 500 倍的 EDTA、 NH_4^+ 、草酸、 α -乳糖、抗坏血酸; 100 倍的甘氨酸、L-丝氨酸、尿酸、甲醇、油酸; 10 倍的 Fe^{3+} 、对硝基苯酚、乙酸等对测定不产生干扰, 可见该传感器具有较好的选择性和抗干扰能力。

2.8 样品测定及回收率试验

取 1 g 优质玉米粉, 加入不同浓度的 ST, 于 5 mL 80% 的甲醇溶液中振荡萃取 45 min, 5000 r/min 离心 10 min, 上清用 PBS 按 $1:5$ (V/V) 稀释, 然后按实验方法进行测定, 结果见表 1。所测得样品的相对标准偏差在 $2.8\% \sim 4.1\%$ 之间, 加标回收率在 $87.6\% \sim 105.5\%$ 之间, 平均回收率为 95.8% 。说明本方法可用于 ST 的电化学定量测定。

表 1 玉米样品中 ST 含量的测定

Table 1 Application of biosensor for ST determination in corn sample

Sample number	Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	RSD (%)	Recovery (%)
1	10	8.9	2.8	89.0
2	50	43.8	3.2	87.6
3	100	105.5	4.1	105.5
4	150	151.6	3.6	101.1

The data reported in the table represents the average of five measurements.

3 结论

利用导电聚合物 POPD 膜和 CS-SWCNTs 杂化材料固定 AFO, 成功构建了高灵敏的 ST 生物传感器。该方法有以下两个突出优点: 第一, 致密的 POPD 膜具有很好的选择透过性, 提高了传感器的抗干扰能力, 并且其表面含有大量的正电荷氨基, 为进一步固定生物活性分子、纳米材料提供了良好的固定矩阵; 第二, CS-SWCNTs 纳米膜具有大的比表面积和生物兼容性, 增加了酶的固定量, 并保持了酶的催化活性。该酶电极制备过程简单、灵敏度高、检测范围宽、检出限低, 具有很好的稳定性和

重现性。用于玉米样品检测时, 无需繁琐的样品预处理, 测定结果较为满意, 为实际样品中 ST 含量的检测提供了一种简便的新方法。

REFERENCES

- [1] Yao DS, Wen SM, Liu DL, *et al.* The primary study on the detection of sterigmatocystin by biologic enzyme electrode modified with the multiwall carbon nanotubes. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(4): 601–606.
姚冬生, 文圣梅, 刘大岭, 等. 多壁碳纳米管固定化生物酶修饰电极检测杂色曲霉素的初步研究. *生物工程学报*, 2004, **20**(4): 601–606.
- [2] Tian HJ, Liu XM. Survey and analysis on sterigmatocystin contaminated in grains in China. *J Hyg Res*, 2004, **33**(5): 606–608.
田禾菁, 刘秀梅. 中国粮食中杂色曲霉毒素污染状况调查及分析. *卫生研究*, 2004, **33**(5): 606–608.
- [3] Versilovskis A, Bartkevics V, Mikelsone V. Sterigmatocystin presence in typical latvian grains. *Food Chem*, 2008, **109**(1): 243–248.
- [4] Baughman RH, Zakhidov AA, Heer WA. Carbon nanotubes-the route toward applications. *Science*, 2002, **297**(2): 787–792.
- [5] Meng FP, Zhang AJ. Biofabrication with chitosan and its application progress. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(5): 665–671.
孟范平, 张爱静. 基于壳聚糖的生物组装技术及应用研究进展. *生物工程学报*, 2009, **25**(5): 665–671.
- [6] Tkac J, Whittaker JW, Ruzgas T. The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2007, **22**(8): 1820–1824.
- [7] Yao DS, Cao H, Wen SM, *et al.* A novel biosensor for sterigmatocystin constructed by multi-walled carbon nanotubes (MWNT) modified with aflatoxin-detoxifizymen (ADTZ). *Bioelectrochemistry*, 2006, **68**(2): 126–133.
- [8] Liu DL, Yao DS, Liang R, *et al.* Detoxification of Aflatoxin B₁ by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food Chem Toxicol*, 1998, **36**(7): 563–574.
- [9] Yu XZ, Mai ZB, Xiao Y, *et al.* Electrochemical behavior and determination of L-tyrosine at single-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 2008, **20**(11): 1246–1251.
- [10] Liu DL, Yao DS, Liang YQ, *et al.* Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifizyme from *Armillareilla tabescens* (E-20). *Food Chem Toxicol*, 2001, **39**(5): 461–466.
- [11] Kauppinen JK, Moffatt DJ, Mantsch HH, *et al.* Fourier self-deconvolution-a method for resolving intrinsically overlapped bands. *Appl Spectrosc*, 1981, **35**(3): 271–276.
- [12] Gimeno A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin, and penitrem A. *J Assoc Off Anal Chem*, 1979, **62**(3): 579–585.
- [13] Salhab AS, Russell GF, Coughlin JR, *et al.* Gas-liquid chromatography and mass spectrometric ion selective detection of sterigmatocystin in grains. *J Assoc Off Anal Chem*, 1976, **59**(5): 1037–1044.
- [14] Kamin RA, Wilson GS. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Anal Chem*, 1980, **52**(8): 1198–1205.