

纳米酶应用于农产品中有机磷农药残留检测技术进展

郭家梁¹, 孙畅², 李倬林², 吕呈蔚², 李铁柱², 韩勇³, 胡济美³, 范亚军^{1*}, 黄威^{2*}

(1. 长春师范大学生命科学学院, 长春 130032; 2. 吉林省农业科学院农产品加工研究所, 长春 130033; 3. 中国国际工程咨询公司, 北京 100048)

摘要: 有机磷农药的泛用会导致环境问题以及粮食问题, 对环境的生物多样性以及人类健康易造成不良影响。因此, 对环境及食品中有机磷农药的监测显得十分必要。应用纳米酶检测有机磷农药是一种快速的检测手段, 通过综述纳米酶种类、特点以及在有机磷农药检测方面的各项技术进展, 可为农药快速检测技术应用提供参考。

关键词: 纳米酶; 有机磷; 农药残留; 检测技术; 比色法

中图分类号: TS207.5*3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)01-0108-05

Progress in the Detection of Organophosphorus Pesticide Residues in Agricultural Products

GUO Jialiang¹, SUN Chang², LI Zhuolin², LYU Chengwei², LI Tiezhu², HAN Yong³, HU Jimei³, FAN Yajun^{1*}, HUANG Wei^{2*}

(1. College of Life Sciences, Changchun Normal University, Changchun 130032; 2. Institute of Agricultural Products Processing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 3. China International Engineering Consulting Corporation, Beijing 100048, China)

Abstract: The widespread use of organophosphorus pesticides can lead to environmental problems and food problems, which are likely to have adverse effects on environmental biodiversity and human health, and the application of nano-enzymes for organophosphorus pesticide detection is a rapid detection tool. The types, characteristics and technical progress of nano-enzymes in organophosphorus pesticide detection were reviewed in this paper, which could provide reference for the application of rapid pesticide detection technology.

Key words: Nano-enzymes; Organophosphorus; Pesticide residues; Detection technology; Colorimetry

农产品中农药残留问题是关乎国计民生的问题, 现代农业生产高度依赖农药来提高作物产量^[1-2]。但是, 过量使用农药会导致其进入水体及土壤中, 逐渐积累并最终被农产品吸收或附着被人体摄入, 进而对人体健康造成各种不良影响。在所有农药中有机磷类农药约占全球农药总量的33%(16.5亿磅), 位居全球农药使用量第1位^[3]。作

为全球使用最广泛的农药, 有机磷农药是磷酸、磷酸、硫代磷酸、次磷酸和其他磷酸衍生物的统称^[4], 如果摄入人体, 将会抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 造成体内乙酰胆碱的积累, 进而诱发各种疾病。测定有机磷农药时通常使用精密仪器, 如气相色谱仪^[5], 液相色谱仪^[6], 或者利用生物检测法或酶抑制法进行检测和鉴定^[7-8]。

天然酶能催化多种生物与化学反应, 同时, 酶抑制法可以用于农产品检测。然而, 酶易受恶劣环境条件的影响, 例如极端温度和pH值, 最终导致酶活性显著变性和相关分析应用无效。与天然酶相比, 纳米酶具有成本低、耐恶劣环境、易于生产、可长期使用等优点。农药安全检测需要满足高灵敏度、特异性和重现性的检测要求。现有的检测手段往往依赖于天然酶或者大型专业仪器设

收稿日期: 2023-01-05

基金项目: 吉林省科技厅重点研发计划项目(20210203182SF)

作者简介: 郭家梁(1998-), 男, 在读硕士, 从事生物化学与分子生物学研究。

通讯作者: 范亚军, 女, 博士, 副教授, E-mail: xisofan0524@126.com

黄威, 男, 硕士, 副研究员, E-mail: huangwei501@126.com

备,这些已有的方法有着敏感、特异性和可重复的优点,但耗时、昂贵,并且需要复杂的仪器和训练有素的人员,因此不是十分满足简单、快速的需求^[9-13]。天然酶的纯化涉及高成本和耗时的程序,酶的大规模生产成本高,实现起来很困难,并且天然酶稳定性差,不易储存和运输。专业仪器需要专业人员操控,不方便现场检测。面对日益严峻的食品安全形势,传统检测手段的弊端愈发凸显。人工酶模拟物已成为有效避免天然酶缺陷的有效替代方案,可用于检测食品中的农药残留^[14]。

1 纳米酶的种类

纳米酶是由具有特定纳米结构的无机或有机的纳米材料制成,具有独特的物理化学性质,可在温和的温度和生理pH值等生理条件下催化天然酶底物的生化反应。它遵循与天然酶相同的酶动力学和催化机制^[15]。

大多数纳米酶的动力学遵循 Michaelis-Menten 动力学方程,只有少数例外。就机理而言,纳米酶也是如同天然酶一样,首先与相应的底物结合,然后通过表面催化反应将其转化为产物。纳米酶只是加快反应速率,但不会改变反应平衡。但与天然酶不同的是纳米酶表面通常具有多个活性位点,这让纳米酶可以催化多种底物,具有多种酶活性,同时通过科学设计,其活性可以超过天然酶的酶活性。

自2007年阎锡蕴课题组首次发表纳米颗粒四氧化三铁有纳米酶活性以来,已有多种材料被确认有模拟天然酶的能力,例如:糊精、金属络合物、贵金属基纳米酶、石墨烯、卟啉、聚合物和树枝状大分子等^[16]。

目前已经发现的纳米酶大致可以按照酶活性分为类氧化酶、类过氧化物酶(POD)、类过氧化氢酶(CAT)、类超氧化物歧化酶(SOD)。大部分纳米酶类酶活性都是以上四类中的某种或某些,拥有氧化酶活性的纳米酶可以在氧气存在的条件下催化显色剂3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB)显蓝色并且不需要过氧化氢的参与;拥有类过氧化物酶活性的纳米酶可以在催化过氧化物时产生如自由基这样的瞬时反应中间体,进一步与另一种底物进行反应;拥有类过氧化氢酶活性的纳米酶可以在中性或碱性条件下将过氧化氢分解为氧气和水;拥有超氧化物歧化酶样活性的纳米酶可以催化超氧化物进行歧化反应生成氧气和过氧化

氢。另外据报道,有些纳米酶还显现出切割基因组DNA的能力。除此之外,还发现过具有硝酸还原酶活性的CdS-Pt纳米颗粒,以及具有泛醌氧化还原酶活性的PtNPs纳米颗粒^[17]。

按照材料分类,则可以分类为金属材料类、碳基材料类、金属氧化物类和其他材料类。纳米酶会因其纳米材料的属性而显现出很多材料学的性质。纳米酶的典型纳米尺度因素,如尺寸、形态和表面积等显著影响纳米酶的活性,这为调节其活性提供了优越的策略^[18]。纳米酶作为一种具有生物学活性的纳米材料,天然具有材料本身的性质与生物学活性等多种特性,比如铁磁性纳米酶的磁性,可以用于磁性分离目标分子,进一步增强检测的灵敏度^[19]。基于牛血清白蛋白制备的纳米金簇具有荧光性,可通过荧光淬灭现象显示反应进程。纳米银簇具有的杀菌性,可用于杀死体内病原微生物等^[20]。近十几年,研究人员已经使用不同的纳米材料成功地模拟出来多种天然酶的活性。作为一个新兴的研究领域,会有越来越多种类的纳米酶被进一步发现。

2 纳米酶在农药快速检测中的应用

近年来,由于纳米材料独特的催化性能和优势,纳米酶在农产品农药残留检测中的应用越来越广泛。

2.1 电化学传感法

电化学传感法是通过电化学生物传感器将化学反应产生的信号转换为可测量的电信号,以实现特异性、可靠性和重复性的检测方式^[21-22]。纳米材料可以增加传感器的电催化能力,同时,有一些纳米酶也具有电化学方面的性质,可以用于建立电化学检测体系^[23-24]。常用的方法是将纳米酶制成涂层或以其他方式覆盖在电极上以实现酶生物传感器来量化各种参数。通过升高反应温度和多巴胺诱导的效应相结合,用加速凝胶动力学的方法合成了具有良好生物相容性、孔隙率和高表面积的双金属AuPt-PDA水凝胶电化学生物传感器^[25],该传感器可用于检测有机磷农药。这种AuPt-PDA水凝胶可作为固定乙酰胆碱酯酶的平台。应用水凝胶进行酶的载体提供的微环境可提供优异的传感稳定性,该方法实现了天然酶和纳米酶固定化,适用于非实验室环境下的有机磷检测。反应体系可以被缩小为手持大小,相较于精密仪器,有着对环境要求低,所使用的纳米酶相较于天然酶更加稳定且酶活性更高等优点,同时

还可以多信号输出使结果更加精确。

2.2 比色检测法

比色检测法是应用纳米酶检测方法中常见的一种,其原理是通过色差分析来量化反应的进程。应用于纳米酶上有多种比色方法,如,纳米酶中的纳米金簇等具有光学性质,半胱氨酸以及柠檬酸盐修饰的纳米金簇与硫辛酸反应,分散时显红色,聚集后显蓝色。Sun等通过对硫辛酸修饰的纳米金簇进行诱导,使金簇可以被硫胆碱诱导聚集,在检测苹果汁中的对氧离子残留时金簇由红变蓝,从而实现比色法检测^[26]。

另外,还可以使用显色剂及显色产物的颜色,纳米酶可以与3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB)、硫代胆碱等反应实现比色法检测,同时也可以可以在纳米材料表面修饰官能团来提高比色检测的灵敏度。George Ellman于1960年首次提出用比色法检测生物组织中的乙酰胆碱酯酶活性,乙酰胆碱被水解生成硫代胆碱,硫代胆碱与二硫代二硝基苯甲酸离子反应产生黄色产物,通过测量黄色的强度来衡量酶的活性,在反应体系中添加有机磷农药可以减少硫代胆碱的生成,产生浅黄色,从而实现定性分析^[27]。

同时,有机磷农药也可以抑制丁酰胆碱酯酶、羧酸酯酶、碱性磷酸酶(ALP)和酪氨酸酶等天然酶^[21]。通过这种酶抑制法来偶联显色反应,通过肉眼可见的颜色变化分辨检测体系中是否存在农药^[28]。基于纳米酶构建的比色纸基传感器可用于有机磷农药的检测,该方法中合成的 γ -MnOOH具有类氧化酶的活性,能在催化显色剂3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB)时显现蓝色;在用乙酰胆碱酯酶可以催化相应的底物生成硫胆碱之后,可以利用硫胆碱拥有较强的还原性可将 γ -MnOOH还原成 Mn^{2+} ,抑制了其催化TMB变成蓝色的TMB氧化物的能力,利用该方法成功实现了大白菜中有机磷农药的检测^[29]。

另外,Chu Shengnan等开发了一种基于氧化石墨烯(GO)的比色法^[30],用于有机磷农药的灵敏检测。该测定法依赖于氧化石墨烯固有的过氧化物酶样活性,在乙酰胆碱酯酶和胆碱氧化酶存在的情况下通过多步酶催化产生颜色反应。利用小型氧化石墨烯具有与辣根过氧化物酶竞争的高活性和稳定性,实现有机磷农药的检测。该方法测定出的有机磷农药如乐果,甲基对氧磷和毒死蜱的相应LOD低于2 ppb,低于中国国家食品安全标准采用的最大残留限量。此外,检测可以在40

min内完成,并且对有机磷农药浓度在1~200 ng/mL的线性响应。该方法具有直接可视化的优势,方便快捷,同时具有检测限低,对低浓度的农药也有高灵敏性等优势。

2.3 荧光法

荧光法是一种利用荧光共振能量转移(FRET)的原理,例如利用纳米酶的荧光淬灭现象,通过荧光强度的变化来检测有机磷农药的方法。即当淬灭吸收带与荧光探针的发射带重叠时,FRET诱导荧光淬灭^[31]。荧光检测较比色检测更灵敏,受基质影响较小,检测限更低^[30]。Xie等构建了一种简单、绿色、灵敏的双信号(荧光法和比色法)检测有机磷农药的方法。在这种方法中,纳米金簇(AuNPs)不仅作为比色探针,而且作为荧光吸收剂。金纳米粒子通过内过滤效应可以有效地淬灭g-C₃N₄的荧光。乙酰胆碱酯酶(AChE)可以催化乙酰胆碱(Ach)生成硫代胆碱,从而导致AuNP聚集和荧光恢复,同时伴随着从红葡萄酒色到蓝色的颜色变化^[32]。

2.4 电化学信号和比色法结合

Jin等提出了一种整合天然酶和纳米酶功能的一体式多合一酶-无机杂化纳米ACC-HNFs的仿生矿化组装^[33]。采用ACC-HNFs构建高性能人工酶级联系统,构建了一种用双电化学和比色信号读出的便携式纸上实验室生物传感器。与传统的单一模态分析方法相比,这种基于人工酶级联系统的双读出平台可以在人工酶级联系统中使ACC-HNFs表现出较高的催化活性,这可以归因于其较大的比表面积能够减少基片扩散,缩短电子转移距离。这种方法的分析结果不仅可以通过肉眼观察明显的颜色变化进行初步筛选,而且可以通过电化学信号进行准确量化,灵敏度显著提高。更重要的是,两组结果可以相互认证,可以有效避免误报和错报。该纸基生物传感器无须复杂的样品前处理或精密仪器,适用于现场监测。

2.5 利用智能手机进行检测

利用智能手机辅助进行有机磷农药的检测是近些年热门的发展方向,其方法具有携带方便,快捷,无须专业操作人员等优点^[21]。

Deshuai Kong等通过集成Ag⁺门控刺激响应水凝胶制造了一种允许对有机磷农药进行便携式和可视化的定量分析的有机磷农药检测试剂盒。该方法采用SiQDs/OPD探针,可以成功地基于比率FL信号准确识别对氧磷,从而轻松屏蔽环境影响产生的假阳性结果。通过智能手机内置摄像头,

对试剂盒的光学图像进行记录,并使用 Image J 软件进行量化。由于该方法使用高度普及的智能手机便可完成检测,因此有望应用于对有机磷农药的现场监测^[34]。

3 总结和展望

农产品中的农药残留会带来各种环境以及健康问题,对物种多样性、粮食安全以及水资源产生负面影响。而针对有机磷农药的纳米酶检测法中,电化学传感法需要携带电学测量仪器,相较于比色法那样可以缩小到一张试纸或者试剂盒里,它在便携性方面的发展前景较小,但有制备成可反复利用的检测仪器的可能性。而荧光法则需要配合荧光检测仪器使用,其与电化学传感法都相较于比色法更灵敏,有着更低的检测限。鉴于三者都可以制作成较为便携的系统且都有着和智能手机配合使用的可能性,未来发展前景可能是将三种方式同时使用于一个系统中,在检测中发展出更准确稳定的三信号输出模式。

在农产品中的农药残留问题日益被重视的当下,可以检测是否残留但是无法定量检测的速测手段以及可以量化检测但是需要专业的仪器设备与操作人员的仪器手段,已经无法满足日益复杂的市场环境。物流的发展和普遍化,使得快速、精准、能够保存的时间长并且可以方便快捷检测的手段正成为一种迫切的需求。利用纳米酶的农药检测法拥有方便快捷,能够保存的时间长,准确度高,并可以将结果量化表示等优势。相对于传统手段,纳米酶更能满足当今市场需求。在农产品农药安全检测中有着广阔的前景。

参考文献:

- [1] 王义生,刘洪涛. 农药分析方法的现状及展望[J]. 吉林农业科学, 2000, 45(6): 29-31.
- [2] 张金花,刘亚光,任金平,等. 环境中有机磷农药降解方法的研究进展[J]. 吉林农业科学, 2009, 34(4): 37-40.
- [3] Dries M A V D, Lamballais S, Marroun H E, et al. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and brain morphology and white matter microstructure in preadolescents [J]. Environmental Research, 2020, 191: 110047.
- [4] Kaushal J, Khatri M, Arya S K, et al. A treatise on Organophosphate pesticide pollution: current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination[J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 2021, 207: 111483.
- [5] 李芳,张静,杨中,等. QuEChERS/液质联用法测定蔬菜中 17 种农药残留[J]. 吉林农业科学, 2013, 38(3): 93-96.
- [6] 张云月,汪洋洲,高月波,等. 微生物农药联合防治亚洲玉米螟的研究[J]. 东北农业科学, 2022, 47(4): 70-73, 141.
- [7] Li W, Tang J, Wang Z, et al. Micro-/mesoporous fluorescent polymers and devices for visual pesticide detection with portability, high sensitivity, and ultrafast response[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022(4): 5815-5824.
- [8] Bai F, Sun Z, Wu H, et al. Porous one-dimensional nanostructures through confined cooperative self-assembly[J]. Nano Letters, 2011(12): 5196-5200.
- [9] Carballares D, Rocha-martin J, Fernandez-lafuente R, et al. Preparation of a sixenzyme multilayer combi-biocatalyst: reuse of the most stable enzymes after inactivation of the least stable one[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2022, 10: 3920-3934.
- [10] Aanreou V G, Clonis Y D. Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazin[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 460(2): 151-161.
- [11] Bahadur N M, Watanabe S, Furusawa T, et al. Rapid one-step synthesis, characterization and functionalization of silica coated gold nanoparticles[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2011, 392(1): 137-144.
- [12] Rajni Bala, Suman Dhingra, Munish Kumar, et al. Detection of organophosphorus pesticide-Malathion in environmental samples using peptide and aptamer based nanoprobes[J]. Elsevier, 2017, 311: 111-116.
- [13] Mujawar S, Utture S C, Dasgupta S, et al. Optimization of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry conditions for multiresidue analysis of pesticides in grapes in compliance to EU-MRLs[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 600-607.
- [14] Huang L, Sun D, Pu H, et al. Development of Nanozymes for Food Quality and Safety Detection: Principles and Recent Applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(5): 1496-1513.
- [15] 卢雄,宋丹丹,高发明. 纳米材料电化学传感器检测农药残留研究进展[J]. 燕山大学学报, 2020, 44(3): 313-322.
- [16] 吴昊. 单原子纳米酶在有机磷农药检测中的应用[D]. 武汉: 华中师范大学, 2020.
- [17] 蔡瑞,刘建波,吴晓春. 贵金属基纳米酶的研究进展[J]. 高等学校化学学报, 2021, 42(4): 1188-1201.
- [18] 马昊楠. 农药残留与人体健康-警惕有机磷农药危害[J]. 首都医药, 2014, 42(4): 1188-1201.
- [19] Wong E L S, Vuong K Q, Chow E. Nanozymes for Environmental Pollutant Monitoring and Remediation [J]. Sensors, 2021, 21(2): 408.
- [20] Hayama T, Yoshid H, Todoroki K, et al. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(14): 2203-2210.
- [21] Zhai R, Chen G, Liu G, et al. Enzyme inhibition methods based on Au nanomaterials for rapid detection of organophosphorus pesticides in agricultural and environmental samples: A review [J]. Journal of Advanced Research, 2022, 37: 61-74.

- [22] Pundir A C S, Ashish M B, Preeti A. Bio-sensing of organophosphorus pesticides: a review[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 140: 111348.
- [23] Chauhan N, Pundir C S. An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 701(1): 66-74.
- [24] Navyatha B, Singh S, Nara S. Au Peroxidase nanozymes: Promises and applications in Biosensing[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 175: 112882.
- [25] Wu Y, Jiao L, Xu W, et al. Polydopamine-Capped Bimetallic Au Pt Hydrogels Enable Robust Biosensor for Organophosphorus Pesticide Detection[J]. *Small*, 2019, 15(17): 1900632.
- [26] Sun J, Guo L, Bao Y, et al. A simple, label-free AuNPs-based colorimetric ultrasensitive detection of nerve agents and highly toxic organophosphate pesticide[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 28: 152-157.
- [27] Ellman G L, Courtney K D, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
- [28] Wang Y, Liang M, Wei T. Types of Nanozymes: Materials and Activities[M]. Singapore: Springer Singapore, 2020: 41-77.
- [29] Sapsford Kim E, Berti Lorenzo, Medintz Igor L. et al. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(28): 4562-4589.
- [30] Chu S, Huang W, Shen F, et al. Graphene oxide-based colorimetric detection of organophosphorus pesticides via a multi-enzyme cascade reaction[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(10): 5829-5833.
- [31] Cao J, Wang M, Yu H E, et al. An overview on the mechanisms and applications of enzyme inhibition-based methods for determination of organophosphate and carbamate pesticides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(28): 7298-7315.
- [32] Xie H, Bei F, Ho J, et al. A highly sensitive dual-signaling assay via inner filter effect between g-C₃N₄ and gold nanoparticles for organophosphorus pesticides[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 255: 2232-2239.
- [33] Jin R, Kong D, Zhao X, et al. Tandem catalysis driven by enzymes directed hybrid nanoflowers for on-site ultrasensitive detection of organophosphorus pesticide[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 141: 111473.
- [34] Jin R, Kong D, Yan X, et al. Integrating Target-Responsive Hydrogels with Smartphone for On-Site ppb-Level Quantitation of Organophosphate Pesticides[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(31): 27605-27614.

(责任编辑:王昱)