

王承克,陈丹,张俊俊,等. 免标记法快速检测啉虫脒的研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):324-327.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.094

免标记法快速检测啉虫脒的研究

王承克,陈丹,张俊俊,陆峰

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212032)

摘要:发展了一种利用纳米金探针,免标记法检测啉虫脒的方法。本方法基于适配体能够使纳米金在 NaCl 溶液中保持一定的稳定性,当啉虫脒存在时,由于啉虫脒与适配体特异性的相互作用,使纳米金稳定性降低,在 NaCl 存在时发生聚集的原理,根据溶液吸收光谱 630 nm 波长处吸光度值的改变,利用酶标仪实现了啉虫脒的快速定量检测。检测线性范围为 2~20 nmol/L,检测限为 2 nmol/L,检测过程在 5 min 内即可完成。本方法还成功用于实际水样(校园湖水)中啉虫脒的检测。结果表明此方法具有较好的选择性和较高的灵敏度,对解决农产品和食品中农药残留等食品安全问题具有重要意义。

关键词:啉虫脒;纳米金;适配体;酶标仪;检测

中图分类号: O657.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0324-04

啉虫脒(acetamiprid)是一种被广泛使用的烟碱类高效杀虫剂,具有很强的触杀、胃毒和内吸杀虫作用,主要作用于昆虫神经突触后膜的乙酰胆碱受体,起到杀虫作用^[1-2]。由于其对于哺乳动物具有较低的毒性,同时与目前常见的有机磷类、氨基甲酸酯类农药不存在交叉抗性,啉虫脒在现代农业中被广泛使用。然而,由于过量使用或不当操作,在农产品或食品中有时会在一定程度上存在农药残留,特别是在谷物、蔬菜和水中累积的啉虫脒会对人体健康带来隐患,对人体外周血淋

巴细胞具有一定的毒性,还会诱发 DNA 损伤;啉虫脒在水体中的残留对于水生生物,如鱼、虾、藻类等具有高致毒性,对于家蚕、鸟类、蜜蜂等也有较高的毒性,给环境安全带来隐患,也给农业带来较大的损失^[3-6]。因此,农产品、食品和水体中啉虫脒的检测对于保障食品安全具有重要意义。

目前,常见的检测啉虫脒的方法包括高效液相色谱、气相色谱和酶联免疫吸附测定法等^[7-11],尽管这些方法可以用于灵敏检测实际样品中的啉虫脒,但是由于所用仪器昂贵,耗时较长,且操作繁琐,限制了其在食品安全快速检测中的应用。建立一种快速、灵敏、便捷地检测食品中啉虫脒的方法对于保障食品安全很有必要。

适配体是一种经指数富集的配体系统进化技术筛选出的能与待测分子发生特异性相互作用的 DNA/RNA 片段,由于其合成便利、成本低、易于设计、亲和力强、特异性好的优点,被广泛用于小分子的检测^[12-15]。另一方面,功能化的纳米金

收稿日期:2015-06-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:21305032);中国博士后科研基金(编号:2014M551522);江苏省博士后科研基金(编号:1402073B)。

作者简介:王承克(1984—),男,河南平顶山人,博士,讲师,硕士生导师,主要从事食品安全分析研究。Tel:(0511)88780201;E-mail:wangck@ujs.edu.cn。

390~450、500~550 nm 之间,此结果可作为利用紫外-可见吸收光谱检测农药的定性分析。由图 2 可以看出,把血清样本按同比例配成血清水溶液后检测的吸收光谱,得出正常、高血糖、高血脂、高血糖高血脂的吸收光谱图基本相同,峰位也相同,都为 278 nm,只是具体的峰值不同。由图 3 可以看出,同一浓度的戊唑醇加入不同生化指标血清中,278 nm 处的吸收峰都产生显著的衰减现象,但是衰减的程度不同,高血脂血清的衰减程度大于正常血清、高血糖血清和高血糖高血脂血清。通过利用 Matlab 对血样中戊唑醇药液浓度值与 326、566 nm 处吸光度的关系建立了线性回归模型,发现 566 nm 处的函数模型比 326 nm 处的函数模型拟合效果更好。该结果可为吸收光谱检测不同生化指标中农药残留作参考。为进一步研究农药与血清样本相互作用吸收光谱检测作理论依据,并且在医学上农药中毒急救有重要的参考价值。

参考文献:

[1] 黄新辉,张发亮,马淑惠,等. 新型杀菌剂戊唑醇的合成工艺[J].

安徽农业科学,2007,35(1):144-192.

- [2] 王爱华,徐宝强. 戊唑醇使用方法[J]. 河北果树,2009(4):41.
- [3] 丁蕊艳. 戊唑醇在苹果、水稻及土壤上的残留动态研究[D]. 济南:山东大学,2012.
- [4] 李洪,周游,李伟声,等. 戊唑醇在黄瓜和土壤中的检测方法及其残留动态研究[J]. 西南农业学报,2014,27(3):1159-1164.
- [5] 王汉成,周明国,张艳军. 戊唑醇对立枯丝核菌的抑制作用及在水稻上的应用[J]. 农药学报,2007,9(4):357-362.
- [6] 黄鑫,王隆勇,高乃云. 工业污水消毒脱色的紫外-可见吸收光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(10):2739-2742.
- [7] 邵思蜜,苏海楠,张熙颖,等. 光谱学方法对钝顶螺旋藻异藻蓝蛋白活性构象研究[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(6):1643-1646.
- [8] 梁晶,冯素玲. 光谱法和分子对接法研究盐酸氨基溴素与人血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析,2011,31(4):1020-1024.

探针作为一种新型的传感器,具有易于制备、易于功能化,且具有很好的光学性质等优点,在金属离子、蛋白质、小分子的检测中受到人们的日益关注^[16-19]。近年来,也有一些报道以适配体功能化纳米金为探针,对生物分子进行检测,例如,Luo等利用半胱胺功能化纳米金在适配体存在时,加入四环素前后溶液吸收光谱的改变,对四环素进行灵敏检测^[20];Chen等利用纳米金和荧光分子修饰的适配体的相互作用,通过测定溶液荧光光谱的改变实现了对卡那霉素的灵敏检测^[21];Peinetti等通过测定纳米金和适配体相互作用后加入磷酸腺苷时阻抗的变化,实现了磷酸腺苷的灵敏检测^[22]。以上研究都显示出较好的选择性和较高的灵敏度,然而,由于实验中需要用到荧光光谱仪、电化学工作站等仪器,在快速简便检测小分子方面存在一定不足,利用实验室常见的固定波长酶标仪对实际样品中的啉虫脒进行快速灵敏检测具有一定的创新性。

基于啉虫脒与适配体特异性的相互作用和纳米金在分散和聚集状态时吸收光谱的改变,本研究拟发展一种免标记的新方法,以实现缓冲溶液和实际水样中啉虫脒的高选择性和快速灵敏检测。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

啉虫脒、异稻瘟净、硫酸卡那霉素购于 Aladdin 化学试剂有限公司,赭曲霉毒素 A 购于新加坡 Pribolab 公司,二水合氯金酸购于美国 Sigma 公司,根据文献^[23]选取能与啉虫脒发生相互作用的适配体(5'-TGTAATTTGCTGTCAGCGGTTCTT-GATCGCTGACACCATATTAT GAAGA-3'),并由上海生工生物工程股份有限公司合成纯化,使用前溶于去离子水中,试验

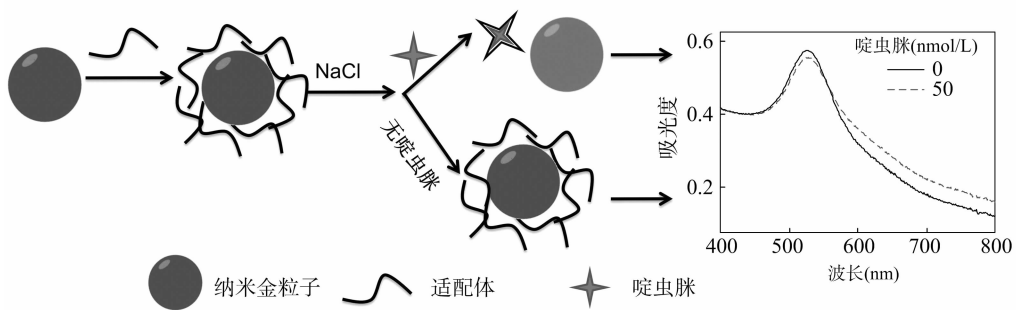


图1 啉虫脒检测原理示意

2.2 可行性论证

为验证试验的可行性,在纳米金探针溶液中加入适配体和不同浓度的啉虫脒,最后加入不同浓度的 NaCl 溶液,如图 2 所示,当溶液中不含有啉虫脒时,溶液光谱最大吸收峰位于 520 nm 处,而当溶液中存在 50 nmol/L 啉虫脒时,溶液光谱明显红移,520 nm 处吸光度降低,而 630 nm 处吸光度值明显增大,此现象说明啉虫脒与适配体的结合使纳米金的稳定性降低。基于该性质可用于啉虫脒的检测。后续试验为了减少光谱测定时间,简化操作步骤,选取 630 nm 作为溶液特征吸收波长,同时使用了能快速(1~2 s)、高通量测定溶液 630 nm 处吸光度值的酶标仪。

2.3 试验条件的优化

使用免标记法测定啉虫脒,溶液光谱变化与试验反应条

用水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

溶液紫外-可见光谱扫描使用 Varian Cary 100 紫外可见光谱仪(美国),溶液 630 nm 处波长记录使用 Multiscan MK3 酶标仪(美国)。

1.2 缓冲溶液中啉虫脒的检测

粒径为 13 nm 的纳米金,利用文献^[24-25]方法,使用柠檬酸钠还原氯金酸溶液法制备。向 100 μ L 纳米金溶液中加入终浓度为 40 nmol/L 的适配体和不同浓度的啉虫脒后,再加入 NaCl 溶液,使其终浓度为 150 mmol/L,反应 10 min,利用酶标仪记录溶液 630 nm 处吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 传感器的设计原理

表面包覆有柠檬酸根离子的纳米金由于表面所带的负电荷,相互排斥,在溶液中保持分散状态,当加入 NaCl 时,由于 NaCl 破坏了纳米金表面的双电层,使纳米金的稳定性大大降低,从分散状态转变为聚集状态,溶液颜色由红色转变为蓝紫色,相应的溶液光谱会发生红移,630 nm 处吸光度值也会明显增加^[26],如图 1 所示。当适配体单链 DNA 存在时,纳米金表面的柠檬酸根被适配体取代,由于 DNA 侧链磷酸基团与纳米金非特异性相互作用,使纳米金带负电,当加入一定浓度的 NaCl 时,纳米金可以保持一定的稳定性而不发生聚集,溶液颜色仍为红色。而当待测物质啉虫脒存在时,由于啉虫脒与适配体特异性亲和作用,适配体构型发生改变,从纳米金表面脱落,再加入 NaCl 时,纳米金会发生明显聚集,溶液颜色由红色变为蓝紫色。随待测溶液中啉虫脒浓度的改变,纳米金溶液光谱也逐渐改变^[27],基于此可以方便快捷地检测溶液中的啉虫脒。

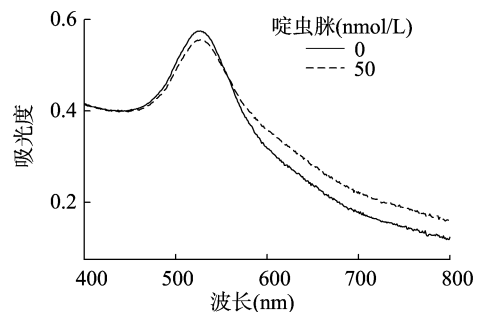


图2 含有不同浓度啉虫脒时溶液的紫外-可见吸收光谱

件密切相关,包括适配体浓度、NaCl 浓度、加入 NaCl 后反应时间、反应体系的 pH 值等。为使该传感器获得最佳的检测性能,分别对上述试验条件进行优化。

试验结果表明,适配体浓度在 40 nmol/L 时,如图 3A 所示,随着所加入的 NaCl 浓度逐渐增加,加入 50 nmol/L 啶虫脒前后,纳米金溶液在 630 nm 处吸光度值逐渐产生差异,当 NaCl 浓度达到 150 mmol/L 时,加入啶虫脒前后溶液 630 nm 处吸光度值存在最大差异,继续增加 NaCl 浓度,吸光度值差值逐渐减小。这是由于当 NaCl 浓度较低时,纳米金溶液始终保持较为稳定状态,纳米金呈分散状态,溶液光谱差异较小,而当 NaCl 浓度较高时,即使不存在啶虫脒的竞争性作用,吸附在纳米金表面的适配体也不足以维持纳米金溶液的分散状态,即溶液中的纳米金已经完全聚集,造成溶液 630 nm 处吸光度值差异减小;只有在 NaCl 浓度适中时,由于啶虫脒的竞争性作用,吸附在纳米金表面的适配体脱落,使其稳定性降低,而不存在啶虫脒的溶液,由于纳米金表面的适配体的保护作用,使纳米金在加入 NaCl 后保持分散状态,溶液 630 nm 处吸光度值差异最大。同时试验结果表明,在加入 NaCl 5 min 后,吸光度值即保持稳定。因此,本试验选择 40 nmol/L 为适配体最佳浓度,150 mmol/L 为最适 NaCl 浓度,在加毕 NaCl 后反应 5 min,使用酶标仪测定溶液在 630 nm 处吸光度值。

试验还对体系 pH 值进行优化,如图 3B 所示,当 pH 值在 5.5~8.5 间,溶液在 630 nm 处吸光度值均比不含有啶虫脒的溶液吸光度值大,在 pH 值为 7.5 时存在最大差异,这可能是由于不同 pH 值时,纳米金与适配体亲和力存在差异,同时不同 pH 值对纳米金稳定性也存在一定影响。后续试验中,采用 pH 值为 7.5 作为最佳试验条件。

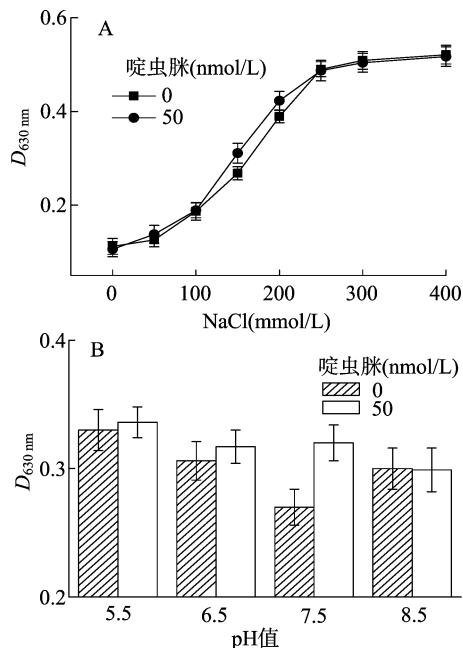


图3 啶虫脒浓度为0 nmol/L和50 nmol/L时溶液630 nm处吸光度随NaCl浓度的改变(A)、随pH值的改变(B)

2.4 啶虫脒的检测曲线

在最优化试验条件下,考察该传感器对啶虫脒的检测能力。图4为纳米金溶液中含有不同浓度啶虫脒时630 nm处吸光度值的变化。从图4可以看出,在0~50 nmol/L浓度范围内,溶液630 nm处吸光度值随啶虫脒浓度的增加而增加,说明随着啶虫脒的增加,结合在纳米金表面的适配体量逐渐减少,纳米金在NaCl存在时的稳定性也逐渐降低。图4插图显

示在2~20 nmol/L范围内,溶液在630 nm处吸光度值与啶虫脒浓度线性相关。线性方程为 $D_{630\text{ nm}} = 0.2727 + 0.0013 \text{ Cacacetamiprid}$,相关系数 ($R^2 = 0.94$),传感器对啶虫脒检出限为2 nmol/L。

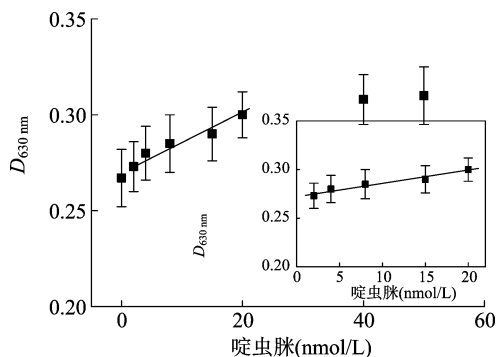


图4 溶液630 nm处吸光度值与啶虫脒浓度的线性关系

2.5 方法的选择性

试验还考察了该传感器对啶虫脒的选择性,结果如图5所示,在相同试验条件下,当溶液中存在50 nmol/L赭曲霉毒素A(真菌毒素)、异稻瘟净(农药)或卡那霉素(兽药)时,溶液在630 nm处吸光度值远远低于其对于目标分子啶虫脒的响应,表明该传感器对啶虫脒有着较高的选择性,该方法有很好的特异性。

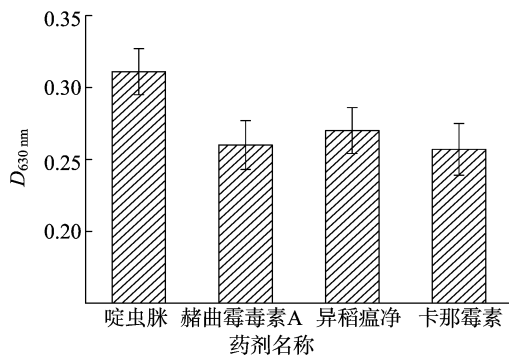


图5 免标记传感器对啶虫脒的选择性试验

2.6 实际样品的检测

为了验证该免标记传感器的实用性,本研究对实际水样(取自校园湖水)加标,进行啶虫脒的回收率试验。在测定前,水样首先用0.45 μm 孔径的滤芯过滤以去除其中的固体杂质,再利用本研究所建立的方法,在最优化条件下对啶虫脒进行定量分析,表1结果表明,当加入的啶虫脒在5~20 nmol/L时,回收率为90%~109%,RSD低于9%,说明该传感器能够用于实际样品中啶虫脒的检测。

表1 湖水中啶虫脒加标回收率测定

| 样品 | 加入量 (nmol/L) | 测出量 (nmol/L) | 回收率 (%) | 相对标准偏差 (%) |
|----|--------------|--------------|---------|------------|
| 1 | 5 | 4.5 ± 0.4 | 90 | 8.7 |
| 2 | 10 | 10.9 ± 0.9 | 109 | 8.3 |
| 3 | 20 | 21.8 ± 1.6 | 109 | 7.3 |

3 结论

本研究利用啶虫脒^[28]与其适配体特异性的相互作用以及纳米金优异的光学性质,构建了一种快速、灵敏检测溶液中

啮虫脒的方法,具有较好的灵敏度和特异性,操作简便,有望用于农产品或食品安全的快速分析。

参考文献:

- [1] Taillebois E, Alamiddine Z, Brazier C, et al. Molecular features and toxicological properties of four common pesticides, acetamiprid, deltamethrin, chlorpyrifos and fipronil [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, 23(7): 1540 - 1550.
- [2] 庾琴, 周华, 王静, 等. 啮虫脒在环境中的降解代谢及其安全性的研究进展[J]. *农药*, 2007, 46(4): 223 - 226.
- [3] 邓业成, 王荫长, 李洁荣, 等. 啮虫脒的杀虫活性研究[J]. *西南农业学报*, 2002, 15(1): 50 - 53.
- [4] 李广领, 姜金庆, 王自良, 等. 气相色谱法检测卷心菜中啮虫脒和吡虫啉残留[J]. *西北农业学报*, 2010, 19(9): 71 - 74.
- [5] Imamura T, Yanagawa Y, Nishikawa K, et al. Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans [J]. *Clinical Toxicology*, 2010, 48(8): 851 - 853.
- [6] Fogel M N, Schneider M I, Desneux N, et al. Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Ecotoxicology*, 2013, 22(6): 1063 - 1071.
- [7] Zhang B, Pan X, Venne L, et al. Development of a method for the determination of 9 currently used cotton pesticides by gas chromatography with electron capture detection [J]. *Talanta*, 2008, 75(4): 1055 - 1060.
- [8] Seccia S, Fidente P, Montesano D, et al. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid - phase extraction clean - up and liquid chromatography with diode - array detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1214(1): 115 - 120.
- [9] Jovanov P, Guzsvány V, Lazić S, et al. Development of HPLC - DAD method for determination of neonicotinoids in honey [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 40: 106 - 113.
- [10] Vichapong J, Burakham R, Srijaranai S. In - coupled syringe assisted octanol - water partition microextraction coupled with high - performance liquid chromatography for simultaneous determination of neonicotinoid insecticide residues in honey [J]. *Talanta*, 2015, 139: 21 - 26.
- [11] Watanabe E, Kobara Y, Baba K, et al. Determination of seven neonicotinoid insecticides in cucumber and eggplant by water - based extraction and high - performance liquid chromatography [J]. *Analytical Letters*, 2015, 48(2): 213 - 220.
- [12] Abbaspour A, Norouz - Sarvestani F, Noori A, et al. Aptamer - conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual - aptamer - based sandwich detection of staphylococcus aureus [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68: 149 - 155.
- [13] Qian Z S, Shan X Y, Chai L J, et al. A fluorescent nanosensor based on graphene quantum dots - aptamer probe and graphene oxide platform for detection of lead (II) ion [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68: 225 - 231.
- [14] Chang K W, Li J, Yang C H, et al. An integrated microfluidic system for measurement of glycated hemoglobin levels by using an aptamer - antibody assay on magnetic beads [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68: 397 - 403.
- [15] Souada M, Piro B, Reisberg S, et al. Label - free electrochemical detection of prostate - specific antigen based on nucleic acid aptamer [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68: 49 - 54.
- [16] 牛书操, 吕珍珍, 刘金钊, 等. 基于适配体的纳米金比色法快速检测雌二醇研究 [J]. *分析测试学报*, 2014, 33(7): 835 - 839.
- [17] Wang F, Liu S, Lin M, et al. Colorimetric detection of microcystin - LR based on disassembly of orient - aggregated gold nanoparticle dimers [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68: 475 - 480.
- [18] Hou L, Wu X, Chen G, et al. HCR - stimulated formation of DNzyme concatamers on gold nanoparticle for ultrasensitive impedimetric immunoassay [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68: 487 - 493.
- [19] Lin J H, Tseng W L. Ultrasensitive detection of target analyte - induced aggregation of gold nanoparticles using laser - induced nanoparticle Rayleigh scattering [J]. *Talanta*, 2015, 132: 44 - 51.
- [20] Luo Y, Xu J, Li Y, et al. A novel colorimetric aptasensor using cysteamine - stabilized gold nanoparticles as probe for rapid and specific detection of tetracycline in raw milk [J]. *Food Control*, 2015, 54: 7 - 15.
- [21] Chen J, Li Z, Ge J, et al. An aptamer - based signal - on bio - assay for sensitive and selective detection of kanamycin A by using gold nanoparticles [J]. *Talanta*, 2015, 139: 226 - 232.
- [22] Peinetti A S, Ceretti H, Mizrahi M, et al. Confined gold nanoparticles enhance the detection of small molecules in label - free impedance aptasensors [J]. *Nanoscale*, 2015, 7: 7763 - 7769.
- [23] Fan L, Zhao G, Shi H, et al. A highly selective electrochemical impedance spectroscopy - based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 43: 12 - 18.
- [24] Wang C, Liu D, Wang Z. Resonance light scattering as a powerful tool for sensitive detection of β - amyloid peptide by gold nanoparticle probes [J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(33): 9339 - 9341.
- [25] Wang C, Wang J, Liu D, et al. Gold nanoparticle - based colorimetric sensor for studying the interactions of β - amyloid peptide with metallic ions [J]. *Talanta*, 2010, 80(5): 1626 - 1631.
- [26] Lee J H, Wang Z, Liu J, et al. Highly sensitive and selective colorimetric sensors for uranyl (UO₂²⁺): development and comparison of labeled and label - free DNzyme - gold nanoparticle systems [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(43): 14217 - 14226.
- [27] Kim M S, Kim G W, Park T J. A facile and sensitive detection of organophosphorus chemicals by rapid aggregation of gold nanoparticles using organic compounds [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67: 408 - 412.
- [28] 樊飞龙, 李明, 李荣玉, 等. 水稻和土壤中噻虫胺、啮虫脒残留量高效液相色谱分析 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(1): 287 - 288.