

基于 Fe_3O_4 磁分子印迹纳米粒子比色检测蔬菜中 6-苄氨基腺嘌呤残留

Colorimetric detection of 6-benzylaminopurine residues in vegetables based on Fe_3O_4 magnetic molecular-imprinted nanoparticles

刘艺丹^{1,2} 栗鑫^{1,2} 王婧丽^{1,2} 李脉泉^{1,2} 刘霞^{1,2}

LIU Yidan^{1,2} LI Xin^{1,2} WANG Jingli^{1,2} LI Maiquan^{1,2} LIU Xia^{1,2}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128;

2. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

(1. School of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要: [目的] 实现蔬菜中 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA) 残留的快速、灵敏、可视化检测。[方法] 基于 Fe_3O_4 磁分子印迹纳米粒子 (Fe_3O_4 MMIP NPs) 的类过氧化物酶活性和特异识别性, 构建了一种简单、快速、高选择性检测 6-BA 的比色方法, 并用于蔬菜中 6-BA 残留检测。[结果] 在 pH 4.0、 H_2O_2 浓度 0.02 mol/L、TMB 浓度 0.02 mol/L 和反应时间 5 min 时, Fe_3O_4 MMIP NPs 表现出最佳的类过氧化物酶催化活性。6-BA 在 1~300 ng/mL 质量浓度范围内与空白和样品吸光度值的差值呈良好的线性关系, 检测限为 0.697 ng/mL。该方法被成功应用于蔬菜 (黄瓜、西红柿、黄豆芽、绿豆芽) 中 6-BA 残留检测, 回收率为 83.47%~106.76%, 相对标准差为 0.37%~5.66%。此外, 4 °C 下, Fe_3O_4 MMIP NPs 贮存 60 d 后仍能保持良好的催化活性。[结论] 基于 Fe_3O_4 MMIP NPs 检测 6-BA 的比色方法具有简便、快速、经济等优势, 能够用于蔬菜中 6-BA 残留检测, 具备一定的可靠性和实用性。

关键词: 磁分子印迹纳米粒子; 类过氧化物酶; 6-苄氨基腺嘌呤; 比色检测; 蔬菜

Abstract: [Objective] Achieving a rapid, sensitive, and visual detection of 6-benzylaminopurine (6-BA) residues in vegetables. [Methods] Based on the peroxidase-like activity and specific recognition of Fe_3O_4 magnetic molecularly imprinted nanoparticles (Fe_3O_4 MMIP NPs), a simple, rapid and highly

selective colorimetric method was established to detect 6-BA residues in vegetables. [Results] Fe_3O_4 MMIP NPs exhibits optimal peroxidase-like catalytic activity at pH 4.0, 0.02 mol/L TMB, 0.02 mol/L H_2O_2 and a reaction time of 5 min. 6-BA showed a good linear relationship with the difference between the blank and the sample absorbance value in the mass concentration range of 1~300 ng/mL with a limit of detection at 0.697 ng/mL. The method was successfully applied to the detection of 6-BA residues in vegetables (cucumber, tomato, bean sprouts, mung bean sprouts). The recovery rate was 83.47%~106.76%, with a relative standard deviation of 0.37%~5.66%. In addition, Fe_3O_4 MMIP NPs could still maintain good catalytic activity after 60 days of storage at 4 °C. [Conclusion] The colorimetric method for the detection of 6-BA based on Fe_3O_4 MMIP NPs has the advantages of simplicity, rapidity, economy, and can be used for the detection of 6-BA residues in vegetables, which has certain reliability and practicability.

Keywords: magnetic molecularly imprinted nanoparticles; peroxidase-like; 6-benzylaminopurine; colorimetric detection; vegetables

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 31671931); 湖南省自然科学基金 (编号: 2020JJ4354)

作者简介: 刘艺丹, 女, 湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者: 刘霞 (1976—), 女, 湖南农业大学教授, 博士。

E-mail: liuxiaspr@aliyun.com

收稿日期: 2024-04-03 **改回日期:** 2024-05-30

6-苄氨基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA) 是一种人工合成的细胞分裂素, 具有促进细胞分裂和诱导发育的作用^[1], 还可用作果蔬保鲜, 延缓果实衰老^[2], 常被添加到豆芽中促进生长。但过量使用 6-BA 会对眼睛、皮肤和上呼吸道造成损伤^[3]; 可能还会对生殖系统及神经系统造成损伤, 严重的可引起急性中毒、癌症及性早熟^[4]。2015 年中国发布公告, 严禁在豆芽生产中添加 6-BA^[5]。目前, 常见的 6-BA 检测方法有高效液相色谱法

(HPLC)^[6]、表面增强拉曼光谱法(SERS)^[7]、电化学方法^[8]和酶联免疫吸附法^[9]等,这些方法具有检测限低、准确度高等优势,但 HPLC、SERS 存在仪器价格昂贵、步骤繁琐、耗时且需要专业人员操作;电化学方法受基质效应影响较大、稳定性不佳;酶联免疫吸附法成本较高,灵敏度有限。因此,研发一种快速、简单、灵敏的蔬菜中残留 6-BA 的检测方法对于食品安全具有重要意义。

纳米酶(nanoenzyme)是一类具有类过氧化物酶催化活性的纳米材料,具有稳定性高、化学性质独特、表面易调节和生物相容性等优点,解决了天然酶制备困难、成本高、易失活等问题^[10-11]。Gao 等^[12]研究发现,Fe₃O₄ 纳米粒子(Fe₃O₄ NPs)具有与天然过氧化物酶相似的催化活性。Fe₃O₄ NPs 因制备工艺简单,原料廉价易得,超顺磁性、稳定性好等优点,已被广泛应用于食品分析、医疗诊断等领域^[13-16]。

分子印迹聚合物(MIP)是应用分子印迹技术制备的一种可特异性识别目标分子的聚合物。选用合适的功能单体与模板分子结合后,通过加入交联剂和引发剂成为聚合物,再用洗脱剂去除模板分子后产生识别空腔,该空腔可特异性吸附模板分子^[17-18]。MIP 具有成本低、易于

合成、亲和力高,可选择性识别特定分子的能力,且长时间贮藏后仍能保持选择性^[19]。

磁分子印迹聚合物纳米粒子(MMIP NPs)是 Fe₃O₄ NPs 与 MIP 的结合体,具有类过氧化物酶催化活性、特异性吸附和磁分离特性^[20]。Li 等^[21]基于 Fe₃O₄ MMIP NPs 开发出一种简单、高选择性比色传感,用于检测牛奶中的诺氟沙星。Guo 等^[22]开发了一种多功能 MMIP NPs,在 60 min 内氧化 TMB 产生比色信号,能够高效地检测食品中的卵黄抗体。Zhou 等^[23]通过多巴胺自聚合制备了高特异性和过氧化物酶活性的 MIPs@Fe₃O₄-NH₂,在 1~250 μmol/L 范围内,吸光度值与原儿茶素(PCA)浓度呈负相关,检测限为 0.841 μmol/L,该方法可快速、高特异性检测绿茶中的 PCA。

课题组^[24-25]前期制备了 Fe₃O₄ MMIP NPs 和 Fe₃O₄ 磁非分子印迹纳米粒子(Fe₃O₄ MNIP NPs),并验证了其类过氧化物酶催化活性。研究拟以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)为显色底物,构建一种检测 6-BA 的比色方法(显色原理见图 1),并将其应用于蔬菜样品中 6-BA 的检测,同时与 ELISA 方法进行比较,以验证所建方法的准确性。

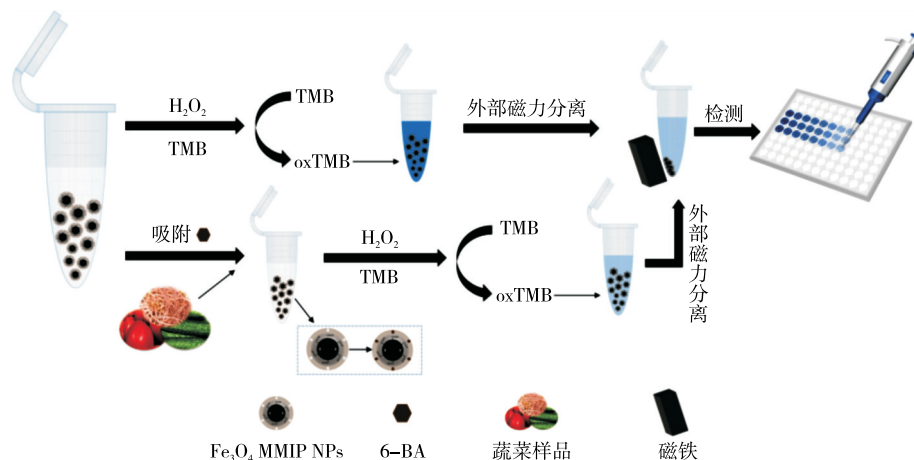


图 1 Fe₃O₄ MMIP NPs 比色检测 6-BA 原理

Figure 1 Principle for the colorimetric determination of 6-BA based on the Fe₃O₄ MMIP NPs

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、6-糠氨基嘌呤(6-KT)、2-异戊烯腺嘌呤(2-IP):纯度≥98%,上海瑞永生物科技有限公司;

α-萘乙酸(NAA):上海国药集团化学试剂有限公司;

TMB、邻苯二胺(OPD)、2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS):纯度≥99%,麦克林生物化学有限公司;

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D):纯度≥98%,阿拉丁生物

有限公司;

黄瓜、西红柿、黄豆芽、绿豆芽:市售;

Fe₃O₄@COOH 纳米酶、Fe₃O₄ MMIP NPs:实验室自制;

试验用水均为超纯水;

ELISA 试剂盒:上海科兴有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平:DATY224R 型,日本岛津公司;

离心机:TG16 MW 型,湖南赫西仪器装备有限公司;

多功能酶标仪:Multiskan GO 1510 型,美国 Thenm Scientific 公司;

紫外分光光度计: Lambda 365 型, 美国 PerkinElmer 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 Fe_3O_4 MMIP NPs 类过氧化物酶的催化活性测定

在含有 1.2 mg Fe_3O_4 MMIP NPs 离心管中, 依次加入 800 μL HAc-NaAc 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 4.0), 150 μL H_2O_2 (0.01 mol/L) 和 50 μL 显色底物 (0.02 mol/L 的 TMB/ABTS/OPD), 25 $^\circ\text{C}$ 反应 4 min 后, 在外部磁力下分离上清液, 测定 550~750 nm 处的吸收光谱。

1.3.2 检测方法的可行性分析 向 1.2 mg Fe_3O_4 MMIP NPs/ Fe_3O_4 MNIP NPs 中加入 200 μL 6-BA (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 室温孵育 20 min 后去除上清液, 依次加入 800 μL HAc-NaAc 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 4.0), 150 μL H_2O_2 (0.01 mol/L) 和 50 μL TMB (0.02 mol/L), 混匀, 25 $^\circ\text{C}$ 反应 4 min, 在外部磁力下分离上清液, 测定 550~750 nm 处的吸收光谱。

1.3.3 比色检测条件优化 考察缓冲液 pH、 H_2O_2 浓度、TMB 浓度及反应时间对 Fe_3O_4 MMIP NPs 催化活性的影响, 试验方法同 1.3.2, 测定其在 652 nm 处的吸光度值, 每个试验平行测定 3 次。

1.3.4 比色检测 6-BA 残留 最佳检测条件下, 将 200 μL 不同浓度的 6-BA 标准溶液分别与 1.2 mg Fe_3O_4 MMIP NPs 室温静置 20 min, 去除上清液后, 依次加入 HAc-NaAc 缓冲液、 H_2O_2 和 TMB, 混匀, 25 $^\circ\text{C}$ 反应 5 min, 外部磁力分离上清液, 检测 652 nm 处的吸光度。以 6-BA 浓度为横坐标, 空白与样品吸光度值的差值 ($\Delta A_{652\text{ nm}}$) 为纵坐标, 建立检测 6-BA 的标准曲线。

选择两种 6-BA 的结构类似物 6-KT、2-IP 和两种非结构类似物 (植物生长调节剂) 2,4-D、NAA (各物质初始质量浓度均为 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 考察检测方法的选择性。同时, 考察 Fe_3O_4 MMIP NPs 对上述物质的吸附效率, 均平行测定 3 次。

1.3.5 Fe_3O_4 MMIP NPs 的重用性和稳定性 根据反应体系在 652 nm 处的吸光度变化, 及 Fe_3O_4 MMIP NPs 对

6-BA (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的吸附效率, 评估 Fe_3O_4 MMIP NPs 的重用性, 具体试验步骤同 1.3.4。每次反应结束后, 先用 1 mL 甲醇-乙酸混合溶液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙酸}}$ 为 9:1) 洗涤 Fe_3O_4 MMIP NPs 数次, 再使用 1 mL 超纯水洗涤 3 次。制备的 Fe_3O_4 MMIP NPs 于 4 $^\circ\text{C}$ 下保存不同天数, 检测其催化活性和吸附效率, 考察其贮藏稳定性。

1.3.6 实际样品中 6-BA 的检测 以黄瓜、西红柿、黄豆芽、绿豆芽作为实际样品。称取 10 g (精确到 0.01 g) 样品, 加入 20 mL 甲醇, 超声 15 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 重复两次, 合并上清液于 55 $^\circ\text{C}$ 旋蒸浓缩近干, 甲醇定容至 5 mL (GB/T 23381—2009)。通过加入不同浓度的 6-BA 标准溶液进行回收试验, 同时做空白对照, 并与市售 ELISA 试剂盒的加标回收结果进行对比。

1.3.7 数据分析 各试验均平行测定 3 次, 取平均值进行数据分析。采用 SPSS Statistics 26 软件进行统计学数据处理, 采用 Origin 2024 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 Fe_3O_4 MMIP NPs 的类过氧化物酶催化活性

Fe_3O_4 MMIP NPs 能催化 H_2O_2 氧化底物 TMB、ABTS、OPD 发生明显的显色反应, 使溶液分别呈蓝色、绿色和黄色 [图 2(a)], 说明所制备的 Fe_3O_4 MMIP NPs 具有良好的类过氧化物酶催化活性。此外, 相同条件下, Fe_3O_4 MMIP NPs 催化 H_2O_2 氧化 TMB, 在最佳吸收波长 (652 nm) 处的吸光度值显著高于 ABTS (415 nm) 和 OPD (450 nm) 的, 且吸收峰较为对称。考虑到 ABTS 对眼睛、呼吸道和皮肤有刺激性作用, OPD 对机体具有致突变作用, 选择 TMB 作为显色底物。

2.2 检测方法的可行性

由图 2(b) 可知, Fe_3O_4 MMIP NPs 的加入能加速 H_2O_2 分解, 进而氧化 TMB, 使溶液呈蓝色, 其吸收峰强度 (曲线 a) 明显高于 H_2O_2 -TMB 体系 (曲线 e), 说明 Fe_3O_4 MMIP NPs 具有类过氧化物酶活性。此外, H_2O_2 -TMB 体系颜色为浅蓝色, 可能是 H_2O_2 部分分解产生的

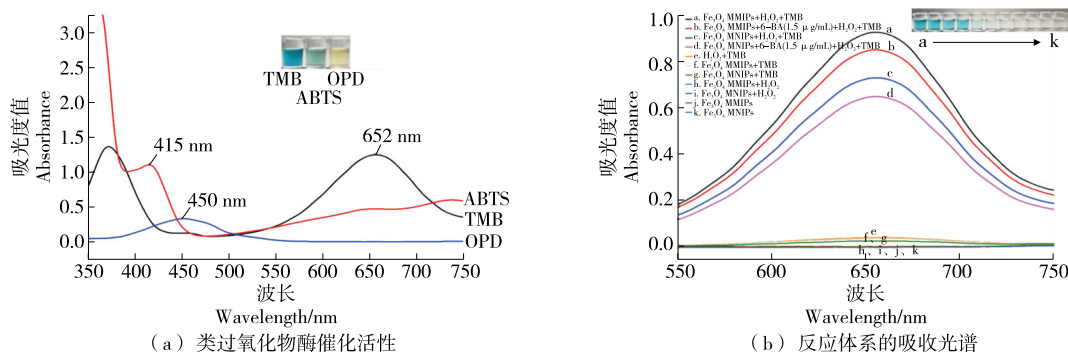


图 2 Fe_3O_4 MMIP NPs 的类过氧化物酶催化活性及不同反应体系的吸收光谱

Figure 2 Peroxide-like catalytic activity of Fe_3O_4 MMIP NPs, absorption spectra of different reaction systems

氧气及存在于溶液、空气中的氧气氧化了 TMB。

曲线 a、b 分别为有无 6-BA 的可见光吸收峰, 6-BA 的存在使 Fe_3O_4 MMIP NPs- H_2O_2 -TMB 体系溶液颜色相对较浅, 在 652 nm 处的吸光度降低(曲线 b), 说明 6-BA 的存在可抑制 Fe_3O_4 MMIP NPs 类过氧化物酶活性。这是由于 6-BA 与 Fe_3O_4 MMIP NPs 表面部分空腔特异性结合, 使 Fe_3O_4 MMIP NPs 的表面催化面积减少, 催化活性降低。此外, 由于 Fe_3O_4 MNIP NPs 表面缺乏特定的空腔(曲线 c), 与 H_2O_2 之间形成屏障, 阻碍了 Fe_3O_4 MNIP NPs 对 H_2O_2 的催化, 故 Fe_3O_4 MNIP NPs- H_2O_2 -TMB 体系的吸收峰强度低于含有 Fe_3O_4 MMIP NPs 的体系(曲线 a、b)。在 Fe_3O_4 MNIP NPs- H_2O_2 -TMB 体系中加入 6-BA 后(曲线 d), 由于 Fe_3O_4 MNIP NPs 表面存在少量的非特异性吸附, 加大了对 Fe_3O_4 MNIP NPs 活性的抑制, 故吸收峰弱于 Fe_3O_4 MNIP NPs- H_2O_2 -TMB 体系(曲线 c)。

曲线 f、g、h、i 为 Fe_3O_4 MMIP NPs 存在下, H_2O_2 和 TMB 分别单独存在于体系的可见光吸收峰, 表明只有 H_2O_2 和 TMB 同时存在于体系中时, Fe_3O_4 MMIP NPs 催化反应才可发生; 虽然无 H_2O_2 的参与(曲线 f、g), 反应体系也出现了吸收峰, 这是由于空气中的少量氧气与溶液相接触, 缓慢氧化 TMB。曲线 j、k 分别为 Fe_3O_4 MMIP NPs、 Fe_3O_4 MNIP NPs 单独存在时的可见光吸收峰, 表明仅有催化剂单独存在的体系不发生催化反应。

综上, Fe_3O_4 MMIP NPs 比色检测 6-BA 具有可行性。

2.3 检测条件优化

由图 3 可知, 随着缓冲液 pH 的增大, 反应体系的吸光度值先增加后降低, 当缓冲液 pH 为 4.0 时, 反应体系的吸光度值达最大, 故选择 4.0 为最佳 pH。当 H_2O_2 浓度 $< 0.02 \text{ mol/L}$ 时, 反应体系的吸光度值快速增加, 继续增大 H_2O_2 浓度, 反应体系的吸光度值呈下降趋势, 故选择 H_2O_2 的最佳浓度为 0.02 mol/L 。显色底物 TMB 的浓度是影响比色反应的重要因素, 反应体系的吸光度值随 TMB 浓度的增加呈快速上升趋势, 但当 TMB 浓度 $> 0.02 \text{ mol/L}$ 时, 反应体系的颜色难以肉眼分辨, 因此选择 TMB 浓度为 0.02 mol/L 。当反应时间为 5 min 时, 反应体系的吸光度值变化趋于平稳, 出于快速检测的要求, 选择最佳反应时间为 5 min。因此, 比色检测的最佳条件为 pH 4.0, H_2O_2 浓度 0.02 mol/L , TMB 浓度 0.02 mol/L 和反应时间 5 min。

2.4 比色检测 6-BA

由图 4 可知, 随着 6-BA 质量浓度的增加, Fe_3O_4 MMIP NPs- H_2O_2 -TMB 反应体系在 652 nm 处的吸光度值逐渐降低, 表明 Fe_3O_4 MMIP NPs 能高选择性吸附 6-BA, 并抑制了 Fe_3O_4 @COOH 纳米酶的过氧化物酶活性。 $\Delta A_{652 \text{ nm}}$ 与 6-BA 质量浓度在 $1 \sim 300 \text{ ng/mL}$ 范围内具有良好的线性关系, 线性回归方程为 $y = 0.0015x + 0.0661$ ($R^2 = 0.9984$), 以 3 倍信噪比 ($S/N = 3$) 求得试

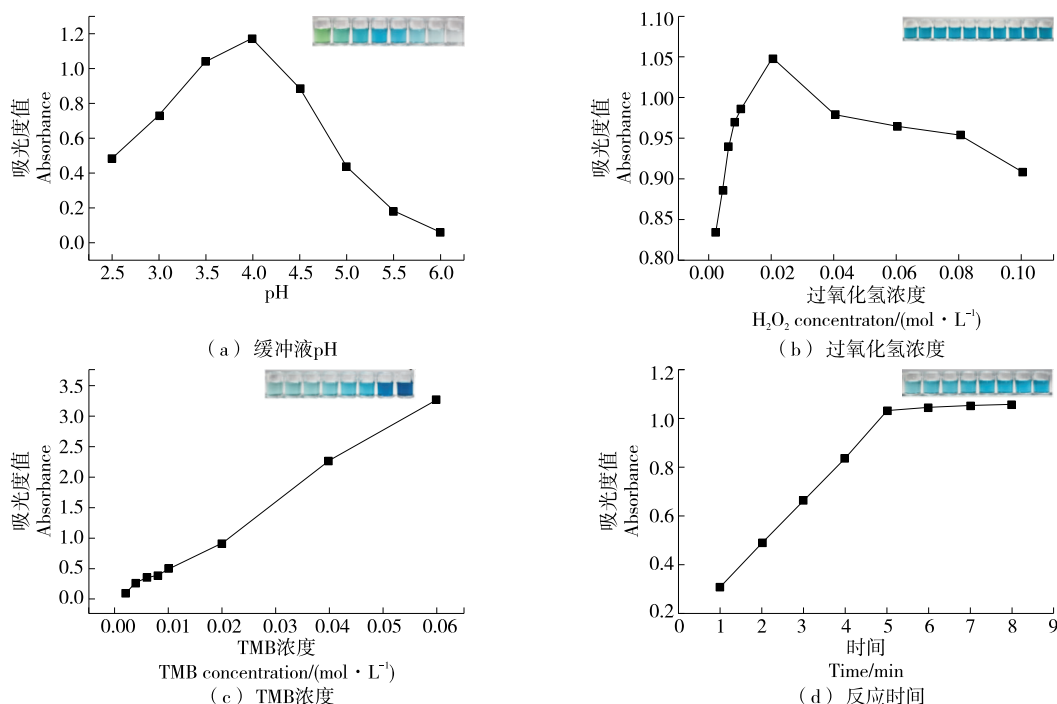


图 3 检测条件对显色效果的影响

Figure 3 Effects of detection conditions on color rendering

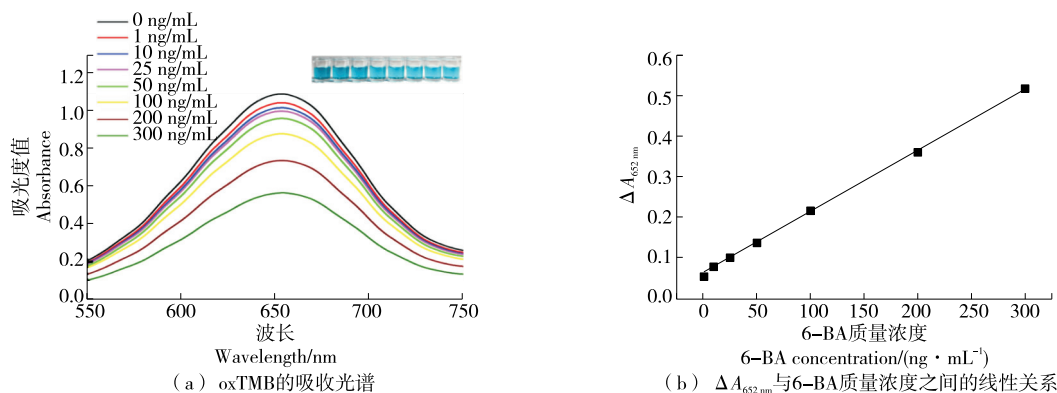


图 4 6-BA 的比色检测结果
Figure 4 Colorimetric assay results of 6-BA

验方法的检测限(LOD)为 0.697 ng/mL。

为评估所建立的 Fe_3O_4 MMIP NPs 比色法检测 6-BA 的选择性,选择 6-KT、2-IP、2,4-D、NAA 作为干扰物进行试验。如图 5 所示,相同条件下, Fe_3O_4 MMIP NPs 对 6-BA 的吸附效率达 100%,对结构类似物 6-KT、2-IP 和非结构类似物 2,4-D、NAA 的吸附效率分别为 25.18%,18.24%,13.68%,3.36%;同时, Fe_3O_4 MMIP NPs 吸附 6-BA 的反应体系在 652 nm 处所引起的吸光度值差最大,分别为 6-KT、2-IP、2,4-D、NAA 的 2.49,3.72,3.20,10.57 倍。这主要是由于各物质化学结构存在差异,对于两种非结构类似物也存在少量吸附,则归因于 Fe_3O_4 MMIP NPs 表面存在的非特异性吸附现象。综上,试验建立的比色检测 6-BA 的方法具有良好的选择性。

2.5 Fe_3O_4 MMIP NPs 的重用性和稳定性

由图 6(a)可知,经 6 次循环后, Fe_3O_4 MMIP NPs 的相对吸附能力和过氧化物酶活性仍保持在 85% 以上,说明 Fe_3O_4 MMIP NPs 具有较好的重复使用性。吸附效率有所降低可能是经过多次循环使得 Fe_3O_4 MMIP NPs 表面的分子印迹层受到一定程度的破坏;催化活性的下降或许是受洗脱液的影响, Fe_3O_4 @COOH 纳米酶中 Fe^{2+}

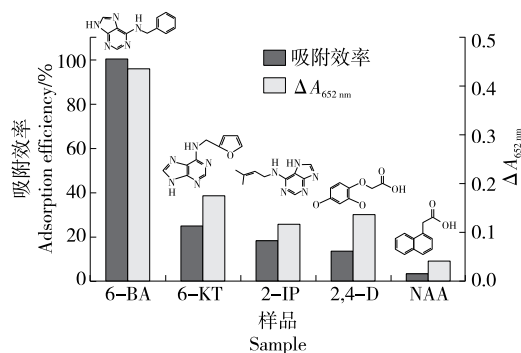
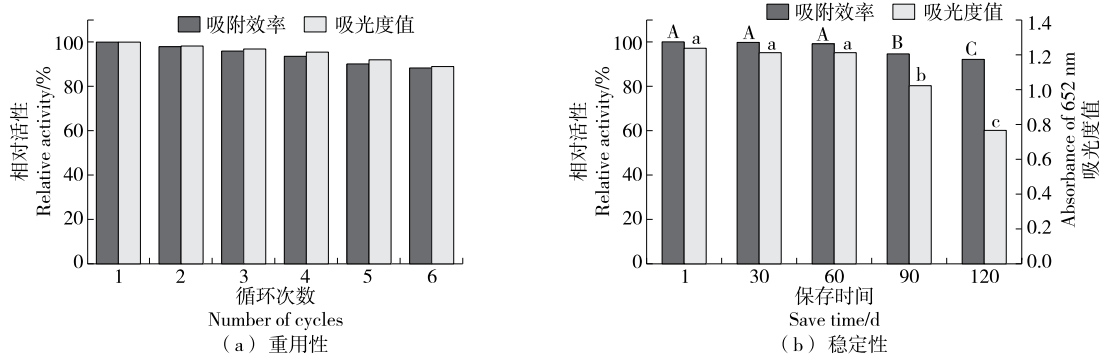


图 5 Fe_3O_4 MMIP NPs 比色检测 6-BA 的选择性
Figure 5 Selectivity of Fe_3O_4 MMIP NPs colorimetric detection of 6-BA

和 Fe^{3+} 的稳定性被破坏。

由图 6(b)可知,在冷藏条件下保存 0~60 d 时, Fe_3O_4 MMIP NPs 的吸附效率和催化活性均无显著性差异;贮藏第 90 天, Fe_3O_4 MMIP NPs 的吸附效率和催化活性均显著下降($P < 0.05$),但总体仍表现出良好的吸附性能和催化活性,说明其能够稳定保存 60 d,即具有良好的稳定性。



大写字母表示不同贮藏时间的吸附效率差异显著($P < 0.05$);小写字母表示不同贮藏时间的吸光度值差异显著($P < 0.05$)

图 6 Fe_3O_4 MMIP NPs 的重用性和稳定性
Figure 6 Reusability and stability of Fe_3O_4 MMIP NPs

2.6 实际样品中 6-BA 的检测

采用 GB/T 23381—2009 对黄瓜、西红柿、黄豆芽、绿豆芽进行 6-BA 检测,结果表明均不含有 6-BA。由表 1 可知,试验建立的比色法检测蔬菜中 6-BA 的回收率为 83.47%~106.76%,相对标准偏差(RSD)为 0.37%~5.66%。ELISA 试剂盒的加标浓度为 10,25,45 ng/L,回收率为 84.36%~108.50%,RSD 为 0.33%~8.11%。说明试验建立的 Fe₃O₄ MMIP NPs 比色检测 6-BA 具有一定的可靠性,且线性范围较宽(1~300 ng/mL),其检测过程时间短,成本低廉,且具有较高的准确度,可用于蔬菜中 6-BA 残留的快速测定。

2.7 Fe₃O₄ MMIP NPs 的酶促动力学分析

为了更深入探究 Fe₃O₄ MMIP NPs 的类过氧化物酶活性,对其进行酶促动力学分析。根据米氏方程[式(1)]计算反应初速度。

$$v=V_{\max}[S]/(K_m+[S]), \tag{1}$$

式中:

v ——反应初速度, mol/(L·s);

$V_{\max}$ ——最大反应速率, mol/(L·s);

$[S]$ ——底物浓度, mmol/L;

K_m ——米氏常数。

以底物 H₂O₂ 浓度或 TMB 浓度为横坐标, v 为纵坐标,绘制出 Michaelis-Menten 曲线(图 7),再使用双倒数作图法(Lineweaver-Burk),分别得到 H₂O₂/TMB 浓度倒数对反应速率倒数的关系图,并计算得到 K_m 和 $V_{\max}$ 。 K_m 值越小代表酶与底物的亲和力越强。

由表 2 可知,Fe₃O₄ MMIP NPs 对 H₂O₂ 和 TMB 的

K_m 值分别为 0.85,0.69 mmol/L,表明 Fe₃O₄ MMIP NPs 对 TMB 具有较高的亲和力,对 H₂O₂ 的亲和力相对较低。这可能与纳米材料表面的物理化学性质有关,由于其粒径小,比表面积大,表面电荷丰富,容易吸附带正电荷的 TMB^[32],对其具有较高亲和力。Fe₃O₄ MMIP NPs 对 H₂O₂ 和 TMB 的 K_m 值比辣根过氧化物酶(HRP)^[26] 的小,说明 Fe₃O₄ MMIP NPs 对 H₂O₂ 和 TMB 的亲和力比天然酶的高,可以催化 H₂O₂ 更快地氧化 TMB。与其他具有过氧化物酶活性的纳米材料相比^[12,26-31],试验中的 Fe₃O₄ MMIP NPs 对 TMB 和 H₂O₂ 表现出相对较高的亲和力和最大反应速率,进一步证实了 Fe₃O₄ MMIP NPs 与底物 TMB 和 H₂O₂ 具有较好的亲和力。

3 结论

基于制备的兼具超顺磁性、特异性吸附和类过氧化物酶催化活性的 Fe₃O₄ 磁分子印迹纳米粒子,建立了一种简单、快速、灵敏的蔬菜中 6-苄氨基腺嘌呤残留的比色检测方法。结果表明,试验制备的 Fe₃O₄ 磁分子印迹纳米粒子对 H₂O₂ 和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺具有较强的亲和力,在 4℃ 冷藏 60 d 仍表现出较强的吸附性能和催化活性,具有良好贮存特性;通过外部磁力易于分离且可多次重复使用。最佳检测条件下,6-苄氨基腺嘌呤在 1~300 ng/mL 质量浓度范围内与 $\Delta A_{652\text{ nm}}$ 具有良好的线性关系,相关系数为 0.998 4,检测限为 0.697 ng/mL,且该方法能应用于实际蔬菜中 6-苄氨基腺嘌呤的残留检测。试验方法的检测成本低、操作简单、反应时间短且现象明显,无需大型仪器设备即可快速检测,具有较大的应用前

表 1 实际样品加标回收试验结果

Table 1 Results of recovery experiments for real samples ($n=3$)

样品	比色法检测				ELISA 试剂盒			
	加标质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	检出质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	平均回收 率/%	RSD/ %	加标质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	检出质量浓度/ (ng·L ⁻¹)	平均回收 率/%	RSD/ %
黄瓜	50	53.38	106.76	5.66	10	10.85	108.50	4.21
	150	127.32	84.88	0.37	25	25.18	100.72	0.65
	250	227.31	90.92	2.58	45	46.59	103.54	2.39
西红柿	50	51.62	103.23	5.40	10	10.62	106.16	8.09
	150	130.24	86.83	3.09	25	25.38	101.59	1.05
	250	228.17	91.27	0.40	45	41.64	92.54	0.33
黄豆芽	50	47.49	94.98	3.71	10	9.22	92.22	5.27
	150	147.24	98.16	2.23	25	24.43	97.72	2.01
	250	250.51	100.20	2.53	45	37.96	84.36	0.69
绿豆芽	50	51.04	102.09	1.76	10	10.59	105.92	8.11
	150	154.89	103.26	2.47	25	25.32	101.27	4.05
	250	208.67	83.47	2.32	45	45.86	101.91	1.11

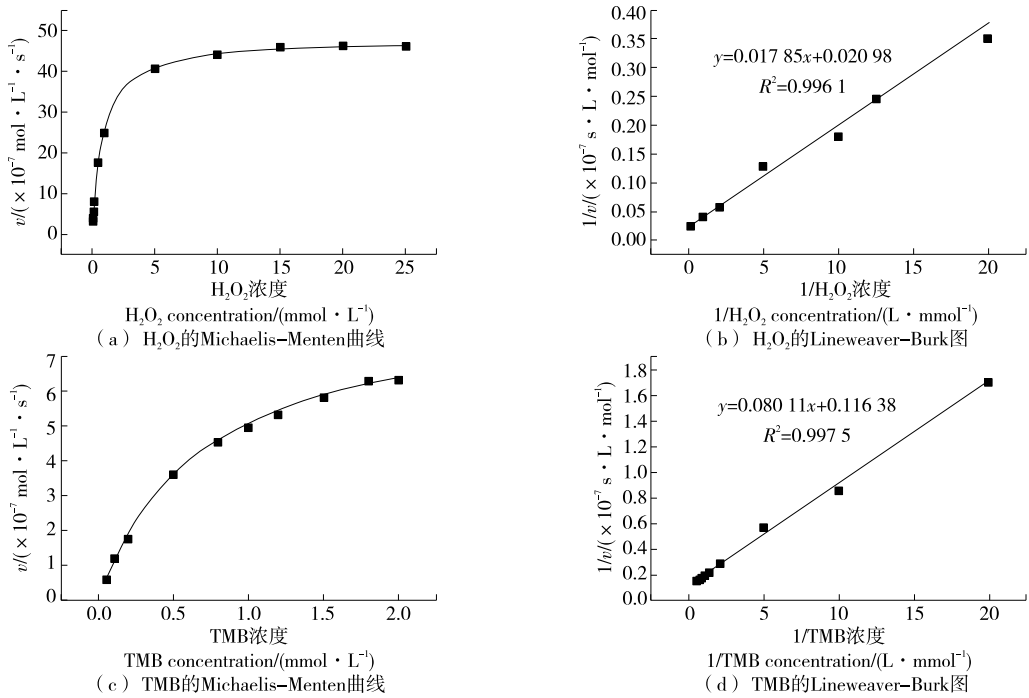


图 7 Fe_3O_4 MMIP NPs 的酶促动力学分析

Figure 7 Enzymatic kinetic analysis of Fe_3O_4 MMIP NPs

表 2 HRP 与各种纳米酶的 K_m 和 $V_{\max}$

Table 2 K_m and $V_{\max}$ value of HRP and nanomaterials

材料	$K_m/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$		$V_{\max}/(\times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$		文献
	H_2O_2	TMB	H_2O_2	TMB	
HRP	2.345	5.560	2.380	0.503	[26]
Fe_3O_4	154.000	0.098	9.780	3.440	[12]
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{IL}$	0.245	0.107	0.465	0.174	[27]
$\text{AgPt-Fe}_3\text{O}_4$	3.463	0.442	2.076	4.763	[28]
$\text{Pd-Fe}_3\text{O}_4$	177.240	0.031	74.630	68.210	[29]
$\text{Cu-CuFe}_2\text{O}_4$	0.087	0.690	16.870	32.180	[30]
$\text{FeS}_2/\text{SiO}_2$	0.013	0.948	18.100	31.000	[31]
Fe_3O_4 MMIP NPs	0.850	0.690	4.766	0.859	

景。但对低浓度样本的覆盖范围尚存在局限性,需进一步优化以扩大其线性检测范围,提升试验方法的全面性。

参考文献

[1] LIU Q Q, XING Y R, PANG X H, et al. Electrochemical immunosensor based on MOF for rapid detection of 6-benzyladenine in bean sprouts[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2023, 115: 105003.

[2] ZHANG Y X, GAO Z Y, HU M J, et al. Delay of ripening and senescence in mango fruit by 6-benzyladenine is associated with inhibition of ethylene biosynthesis and membrane lipid catabolism[J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 185: 111797.

[3] GAN T, LU Z, SUN Y Y, et al. Highly sensitive and molecular

selective electrochemical sensing of 6-benzyladenine with multiwall carbon nanotube@ SnS_2 -assisted signal amplification[J]. Journal of Applied Electrochemistry, 2016, 46(3): 389-401.

[4] WANG W X, WANG B R, LIU Z H, et al. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryo exposed to 6-benzyladenine[J]. Chemosphere, 2019, 233: 336-346.

[5] 刘飞波, 王希, 刘水平. QuEChERS-HPLC 法快速测定黄豆芽中 6-苄基腺嘌呤含量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 67-71, 91.

LIU F B, WANG X, LIU S P. Evaluation of the uncertainty for determination of 6-benzyladenine in soybean sprouts by QuEChERS high-performance liquid chromatography[J]. Food & Machinery, 2021, 37(11): 67-71, 91.

- [6] 王丽荣, 贾文君, 陈明敏, 等. 高效液相色谱法(HPLC)测定芒果多种植物生长调节剂含量[J]. 植物生理学报, 2022, 58(5): 981-988.
- WANG L R, JIA W J, CHEN M M, et al. Determination of contents of several plant growth regulators in mango by high performance liquid chromatography (HPLC)[J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(5): 981-988.
- [7] GONG T X, LI H N, WANG G L, et al. An anti-scratch flexible SERS substrate for pesticide residue detection on the surface of fruits and vegetables[J]. Nanotechnology, 2022, 33(40): 5 501-5 510.
- [8] 王德响, 段禹, 孔大彬, 等. 硫化铋/石墨烯修饰电极检测豆芽中的 6-苄氨基嘌呤[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(2): 170-176.
- WANG D X, DUAN Y, KONG D B, et al. Detection of 6-benzylaminopurine in bean sprouts by bismuth sulfide/graphene-modified electrode[J]. Food Research and Development, 2024, 45(2): 170-176.
- [9] QUAN Q Q, LIU Z W, LI Z D, et al. Authenticating emergent adulterant 6-benzylaminopurine in bean sprouts: virtual hapten similarity enhanced immunoassay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(21): 8 203-8 210.
- [10] 王义平, 苏淑芳, 袁亚兰, 等. 纳米材料在食品重金属离子快速检测中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(4): 233-240.
- WANG Y P, SU S F, YUAN Y L, et al. Research progress of nanomaterials in the rapid detection of heavy metal ions in food[J]. Food & Machinery, 2024, 40(4): 233-240.
- [11] 邱星晨, 范存霞, 白瑞, 等. 纳米酶在抗生素检测中的应用进展[J]. 科学通报, 2024, 69(增刊): 553-564.
- QIU X C, FAN C X, BAI R, et al. Advances in applications of nanoenzymes in antibiotic detection[J]. Chinese Science Bulletin, 2024, 69(Z1): 553-564.
- [12] GAO L Z, ZHUANG J, NIE L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. Nature Nanotechnology, 2007, 2(9): 577-583.
- [13] 范克龙, 高利增, 魏辉, 等. 纳米酶[J]. 化学进展, 2023, 35(1): 1-87.
- FAN K L, GAO L Z, WEI H, et al. Nanozymes[J]. Progress in Chemistry, 2023, 35(1): 1-87.
- [14] 周鸿燕, 宋望. 基于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TiO}_2@\text{Au}$ 的电化学传感器用于芦丁检测[J]. 食品与机械, 2023, 39(6): 81-87.
- ZHOU H Y, SONG Y. Rutin detection by electrochemical sensor based on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TiO}_2@\text{Au}$ [J]. Food & Machinery, 2023, 39(6): 81-87.
- [15] TANG G H, HE J Y, LIU J W, et al. Nanozyme for tumor therapy: surface modification matters[J]. Exploration, 2021, 1(1): 75-89.
- [16] WANG Y C, DAI X Y, WU L N, et al. Atomic vacancies-engineered ultrathin trimetallic nanozyme with anti-inflammation and antitumor performances for intestinal disease treatment[J]. Biomaterials, 2023, 299: 122178.
- [17] 黄桂珍, 汪庆祥, 陈金美, 等. 灵芝酸 A 分子印迹聚合物电化学传感器的制备及应用[J]. 食品与机械, 2023, 39(1): 24-30.
- HUANG G Z, WANG Q X, CHEN J M, et al. Preparation and analytical application of molecularly imprinted polymer electrochemical sensor for ganoderic acid A[J]. Food & Machinery, 2023, 39(1): 24-30.
- [18] PEYMAN A, SAJJAD J, SOMAYEH F, et al. Highly selective molecularly imprinted polymer nanoparticles (MIP NPs)-based microfluidic gas sensor for tetrahydrocannabinol (THC) detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1 278: 341749.
- [19] TORRES E S, LÓPEZ R, SOTOMAYOR T P D M, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of a novel molecularly imprinted polymer (MIP) for selective quantification of curcumin in real food sample by UV-Vis spectrophotometry[J]. Polymers, 2023, 15(16): 3 332-3 346.
- [20] 杨帆, 付东, 李鹏, 等. 磁性分子印迹聚合物中磁核的制备和表征[J]. 黑龙江大学工程学报, 2022, 13(4): 42-47.
- YANG F, FU D, LI P, et al. Preparation and characterization of magnetic cores in magnetic molecularly imprinted polymers[J]. Journal of Engineering of Heilongjiang University, 2022, 13(4): 42-47.
- [21] LI M Q, LUO L L, LI J Y, et al. Colorimetric chemosensor based on Fe_3O_4 magnetic molecularly imprinted nanoparticles for highly selective and sensitive detection of norfloxacin in milk[J]. Foods, 2023, 12(2): 285-285.
- [22] GUO X X, YAO S, LI H, et al. Multi-functional magnetic molecular imprinting probe for visual detection of IgY antibodies[J]. Microchimica Acta, 2021, 188(11): 378.
- [23] ZHOU Y, LIU A, LI Y, et al. Magnetic molecular imprinted polymers-based nanozyme for specific colorimetric detection of protocatechuic acid[J]. Coatings, 2023, 13(8): 1 374.
- [24] 高婉茹, 李跑, 黄昭, 等. 磁性分子印迹纳米粒子对四环素的富集分离[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(4): 173-182.
- GAO W R, LI P, HUANG Z, et al. Enrichment and separation of tetracycline by magnetic molecularly imprinted polymers nanoparticles[J]. Food Research and Development, 2019, 40(4): 173-182.
- [25] XIONG Y Z, CAO Y N, LUO L, et al. Synthesis, characterization and absorption evaluation of bifunctional monomer magnetic molecularly imprinted polymers nanoparticles for the extraction of 6-benzylaminopurine from vegetables[J]. Food Chemistry, 2022, 386: 132792.
- [26] ZHANG X, YANG Q, LANG Y H, et al. The rationale of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as the chromogenic substrate in colorimetric analysis [J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(18): 12 400-12 406.
- [27] 栗鑫, 罗磊, 熊莹姿, 等. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ 纳米酶比色检测食用纯植物油的过氧化值[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 352-359.
- LI X, LUO L, XIONG Y Z, et al. The colorimetric detection of peroxidation values for edible pure vegetable oils by the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$ nanozyme[J]. Food Science, 2023, 44(24): 352-359.

(下转第 103 页)

5 结论

为解决传统谷糙分离存在的检测精度低且再加工问题,设计了基于机器视觉的谷糙分离检测方法。重点研究了图像处理算法,完成对谷糙分离特征坐标位置的智能检测,并在目标运动中减少不利因素的干扰,顺利地提取定位特征点。根据谷糙筛面试验结果表明:该方法具有较高的检测精度,提高了检测效率,并具有一定的实时性,可有效区分完好稻谷与糙米。

参考文献

- [1] 万国韬, 秦彦霞. 一种谷糙分离的新思路[J]. 现代食品, 2019(14): 8-9.
WAN G T, QIN Y X. A new idea for separation of rice roughness[J]. Modern Food, 2019(14): 8-9.
- [2] FOUDA T. Engineering studies on the performance of paddy and rice separator[J]. Misr Journal of Agricultural Engineering, 2009, 26(2): 935-952.
- [3] 徐兵, 晁东, 崔清亮. 6NG-16型重力式谷糙分离机的设计与研究[J]. 农业装备与车辆工程, 2021, 59(9): 20-22.
XU B, CHAO D, CUI Q L. Design and research of 6NG-16 gravity paddy separator[J]. Agricultural Equipment & Vehicle Engineering, 2021, 59(9): 20-22.
- [4] 王煜. 双筛体重力谷糙分离机的动力学分析与改进设计[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2020: 32.
WANG Y. Kinetic analysis and improved design of double sieve gravity paddy rice separator[D]. Wuhan: Wuhan Light Industry University, 2020: 32.
- [5] 宋春华, 彭泓知. 机器视觉研究与发展综述[J]. 装备制造技术, 2019(6): 213-216.
SONG C H, PENG X Z. Research and development of machine vision[J]. Equipment Manufacturing Technology, 2019(6): 213-216.
- [6] TOMASEVIC I, TOMOVIC V, MILOVANOVIC B, et al. Comparison of a computer vision system vs. traditional colorimeter for color evaluation of meat products with various physical properties[J]. Meat Sci, 2019, 148: 5-12.
- [7] 刘一鸿. 基于机器视觉技术的白酒杂质检测系统研究[D]. 西安: 西安工业大学, 2021: 7.
- [8] 李张威. 基于机器视觉的鲜香菇分级系统构建及分级研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2021: 21.
LI Z W. Construction and grading system and study on classification of fresh Lentinula edodes based on machine vision[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2021: 21.
- [9] 陈心雨. 基于Retinex的低光照图像增强的算法研究[D]. 烟台: 山东工商学院, 2022: 14.
CHEN X Y. Research on algorithm of low-light image enhancement based on Retinex[D]. Yantai: Shandong University of Business and Technology, 2022: 14.
- [10] 张晴晴, 张云龙, 齐国红. 基于最大类间方差法的黄瓜病害叶片分割[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(12): 193-195, 234.
ZHANG Q Q, ZHANG Y L, QI G H. Segmentation of cucumber diseases based on otsu method[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(12): 193-195, 234.
- [11] 刘丽霞, 李宝文, 王阳萍, 等. 改进Canny边缘检测的遥感影像分割[J]. 计算机工程与应用, 2019, 55(12): 54-58, 180.
LIU L X, LI B W, WANG Y P, et al. Remote sensing image segmentation based on improved canny edge detection[J]. Computer Engineering and Applications, 2019, 55(12): 54-58, 180.
- [12] 周其洪, 彭轶, 岑均豪, 等. 基于机器视觉的细纱接头机器人纱线断头定位方法[J]. 纺织学报, 2022, 43(5): 163-169.
ZHOU Q H, PENG Y, CEN J H, et al. Yarn breakage location for yarn joining robot based on machine vision[J]. Journal of Textile Research, 2022, 43(5): 163-169.
- [13] 高向东, 吴嘉杰, 萧振林, 等. 磁光成像自适应卡尔曼滤波焊缝跟踪算法[J]. 焊接学报, 2016, 37(3): 9-12, 129.
GAO X D, WU J J, XIAO Z L, et al. Adaptive Kalman filter seam tracking algorithm for magneto-optical imaging[J]. Transactions of the China Welding Institution, 2016, 37(3): 9-12, 129.
- [14] 徐子恒, 夏仁波, 赵吉宾, 等. 基于RANSAC和卡尔曼滤波的窄焊缝识别[J]. 组合机床与自动化加工技术, 2022(2): 50-53, 58.
XU Z H, XIA R B, ZHAO J B, et al. Narrow weld spot recognition based on RANSAC and kalman filtering[J]. Modular Machine Tool & Automatic Manufacturing Technique, 2022(2): 50-53, 58.
- [30] DUAN W, QIU Z W, CAO S F, et al. Pd-Fe₃O₄ Janus nanozyme with rational design for ultrasensitive colorimetric detection of biothiols[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 196: 113724.
- [31] XIA F, SHI Q F, NAN Z D. Facile synthesis of Cu-CuFe₂O₄ nanozymes for sensitive assay of H₂O₂ and GSH[J]. Dalton Transactions, 2020, 49(36): 12 780-12 792.
- [32] HUANG X, XIA F, NAN Z D. Fabrication of FeS₂/SiO₂ DMHSs and rapid determination of H₂O₂ and GSH as an artificial peroxidase[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(41): 46 539-46 548.

(上接第76页)

- [28] 杨培昕, 喻昌木, 杨敏, 等. 固载离子液体修饰Fe₃O₄纳米酶用于H₂O₂和葡萄糖的检测[J]. 食品科学, 2021, 42(20): 252-259.
YANG P X, YU C M, YANG M, et al. Immobilized ionic liquid modified Fe₃O₄ nanozyme for the detection of hydrogen peroxide and glucose in foods[J]. Food Science, 2021, 42(20): 252-259.
- [29] DUAN W, WANG J L, PENG X M, et al. Rational design of trimetallic AgPt-Fe₃O₄ nanozyme for catalyst poisoning-mediated CO colorimetric detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 223: 115022.