

金属卟啉和甲烷氧化菌素-铜过氧化物模拟酶在 食品安全检测中的应用

方祁利¹, 路雪纯¹, 李慧敏¹, 辛嘉英^{1,2*}, 夏春谷²

(1. 哈尔滨商业大学食品科学与工程重点实验室, 哈尔滨 150028; 2. 中国科学院兰州物理化学研究所羰基合成与
选择氧化国家重点实验室, 兰州 730000)

摘 要: 过去, 天然过氧化物酶已被成功应用于食品中过氧化氢、葡萄糖、胆固醇等物质的检测。然而, 其稳定性差、纯化成本高的缺点限制了其大规模应用。如今, 大量过氧化物模拟酶被开发, 金属卟啉复合物是其中重要的一种, 具有催化活性高、稳定强、成本低等优点。甲烷氧化菌素(methanobactin, Mb)是甲烷氧化菌在限铜条件下分泌的一种铜结合小肽, 能够特异性结合铜离子。据报道, 甲烷氧化菌素-铜(methanobactin-Cu, Mb-Cu)具有过氧化物酶活性。本文主要介绍金属卟啉过氧化物模拟酶和 Mb-Cu 过氧化物模拟酶在食品中葡萄糖、胆固醇、多巴胺等生物小分子, 以及 CaO_2 、马拉硫磷、铜离子等有害物质的检测中的应用, 并重点阐述其中的反应机制, 以期为研究人员完善模拟酶设计与合成提供参考。

关键词: 金属卟啉; 甲烷氧化菌素-铜; 过氧化物酶; 模拟酶; 食品检测

Application of metalloporphyrin and methanobactin-Cu peroxidase mimic enzyme in food safety detection

FANG Qi-Li¹, LU Xue-Chun¹, LI Hui-Min¹, XIN Jia-Ying^{1,2*}, XIA Chun-Gu²

(1. Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China; 2. State
Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics,
Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: In the past, natural peroxidase has been successfully used to detect hydrogen peroxide, glucose, cholesterol and other substances in food. However, its large-scale application has been limited due to poor stability and high purification cost. At present, peroxidase mimics have been widely developed, and metalloporphyrin complex is one of the most important ones, which has the advantages of high catalytic activity, strong stability and low cost. Methanobactin (Mb) is a copper-binding small peptide, excreted by methanotrophic bacteria under copper-restricted conditions, which can specifically bind copper ions. It is reported that methanobactin-Cu (Mb-Cu) has peroxidase activity. This paper mainly introduced the application of metalloporphyrin peroxidase mimic enzymes and Mb-Cu peroxidase mimic enzymes in the detection of small biological molecules such as glucose, cholesterol, dopamine and harmful substances such as calcium malathion, phosphorus and copper ions in food, and emphasized their reaction

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2020C063)、中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划项目(高水平人才)(304017)

Fund: Supported by the Heilongjiang Province Natural Science Foundation (LH2020C063), and the Central Support to Local Colleges and Universities Reform and Development Fund Talent Training Support Program (The higher talents) (304017)

***通信作者:** 辛嘉英, 博士, 教授, 主要研究方向为生物催化与生物转化。E-mail: xinjiayingvip@163.com

***Corresponding author:** XIN Jia-Ying, Ph.D, Professor, Harbin University of Commerce, No.1, Xuehai Road, Songbei District, Harbin 150028, China. E-mail: xinjiayingvip@163.com

mechanism, so as to provide some help for researchers to improve the design and synthesis of peroxidase mimic enzymes.

KEY WORDS: metalloporphyrin; methanobactin-Cu; peroxidase; mimetic enzyme; food detection

0 引言

酶分析法具有卓越的灵敏度和优异的选择性,被广泛应用于食品中金属离子、小分子、蛋白质和污染物的检测^[1-4]。过氧化物酶(peroxidase, POD)是一种存在于各种动植物和微生物体内的天然酶,能够将 H_2O_2 分解为无毒物质。POD 因催化效果好、灵敏度高而被广泛应用于食品检测。但 POD 稳定性差、纯化成本高,限制了其实际应用。模拟酶是用人工方法合成的具有酶性质的一类催化剂,具有耐酸碱、耐热、操作稳定性好等优势,已然成为天然酶的一种高效替代品^[5]。

自 2007 年, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒被报道具有过氧化物酶活性以来^[6], 业内专家学者进行积极探索, 随后大量纳米材料也被发现具有 POD 活性^[7-8]。学者们对纳米材料模拟酶取得的科研成果进行了大量专业详尽的论述与分析。但鲜少有关金属卟啉过氧化物模拟酶和甲烷氧化菌素-铜(methanobactin-Cu, Mb-Cu)过氧化物模拟酶在食品安全检测中应用的评述。因此, 本文主要阐述金属卟啉过氧化物模拟酶和 Mb-Cu 过氧化物模拟酶的研究进展, 介绍它们在食品安全检测中的应用, 以期研究人员完善模拟酶设计与合成提供帮助。

1 金属卟啉过氧化物模拟酶在食品安全检测中的应用

卟啉是一类由 4 个吡咯类亚基的 α -碳原子通过次甲基桥($=\text{CH}$ -)互联而形成的大分子杂环化合物^[9](如图 1)。其母体化合物为卟吩, 有取代基的卟吩则称为卟啉^[10]。大多卟啉以与金属离子配合的形式存在于自然界中, 如与镁配位的叶绿素及与铁配位的血红素^[11]。

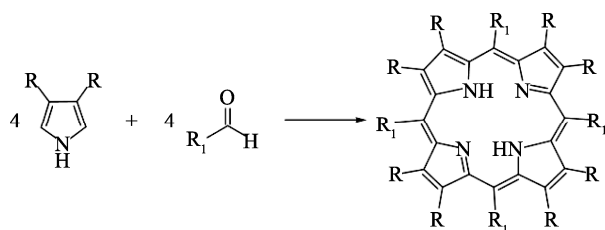
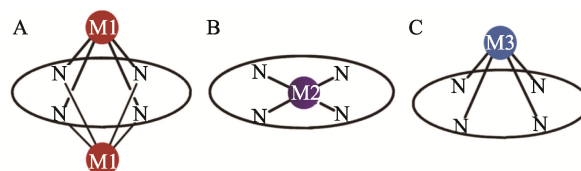


图 1 Alder-Longo 法合成卟啉

Fig.1 Synthesis of porphyrin by Alder-Longo reaction

当吡咯氮原子的两个质子被金属离子取代时, 就形成了金属卟啉。根据金属离子粒径的不同, 金属离子与卟啉结合的形式可分为 3 种^[12](如图 2)。以 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 为代表的小粒径碱金属离子形成的是双碱金属卟啉(图 2A); 以 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 为代表的中等粒径金属离子以

1:1 比例与卟啉结合(图 2B); 而 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 等大粒径的金属离子由于不能进入卟啉环, 结合于卟啉环的外部(图 2C)。引入金属离子后, 卟啉的荧光光谱、紫外可见吸收光谱都会发生很大的变化, 因此这两种光谱都可以表征金属离子是否成功引入^[12]。



注: CM1: 小粒径碱金属离子; M2: 中等粒径离子; M3: 大粒径金属离子。

图 2 卟啉与不同粒径金属离子结合示意图

Fig.2 Schematics showing the structure of metalloporphyrin with metal ions of different radii

近年来, 金属卟啉复合物已成为过氧化物模拟酶的重要来源。专家学者积极探索各种基于卟啉的纳米复合材料作为过氧化物模拟酶, 发现金属氧化物—四(对羧基苯基)卟啉纳米复合材料具有高过氧化物酶活性。涉及的金属氧化物有: Fe_3O_4 ^[13]、 NiO ^[14]、 CeO_2 ^[15]、 Co_3O_4 ^[16]、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ^[17]。基于金属卟啉模拟酶的高过氧化物酶活性, 它被广泛应用于食品安全检测中。

1.1 葡萄糖的检测

糖尿病患者为了有效控制血糖需要严格地控制糖分的摄入。市面上常见的果汁饮料含糖量高, 使糖尿病患者望而却步。商家推出了大量以“零糖”为卖点的新型饮料, 针对这些饮料中葡萄糖的检测意义重大。

截至目前, 已经开发了许多葡萄糖生物传感器。其中一种是模仿过氧化物酶活性的葡萄糖生物传感器。在葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)存在时, 葡萄糖被氧化为葡萄糖酸, 同时底物氧气转化为 H_2O_2 。卟啉纳米复合材料被用于催化 H_2O_2 和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)反应, 生成亮蓝色的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺二亚胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diamine, oxTMB), 通过颜色深浅与葡萄糖的对应关系可快速判断葡萄糖浓度(如图 3)。DONG 等^[18]以 Fe^{2+} 和 2-甲基咪唑(2-methylimidazole, 2-MIM)构建 Fe-MIM, 并在其周围形成 ZIF-8 骨架, 构建 Fe-MIM/ZIF-8 过氧化物模拟酶。因具有丰富的仿生结构和较大的 BET 比表面积, Fe-MIM/ZIF-8 表现出比 Fe-MIM 更高的催化活性。另外, 它还表现出对 H_2O_2 较强的亲和力, 这源于其具有较低的米氏常数 K_m 值。将 Fe-MIM/ZIF-8 加入到 GOx 与 TMB 的溶液中, 在 0.05~20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内能较好地实现葡萄糖的检测。

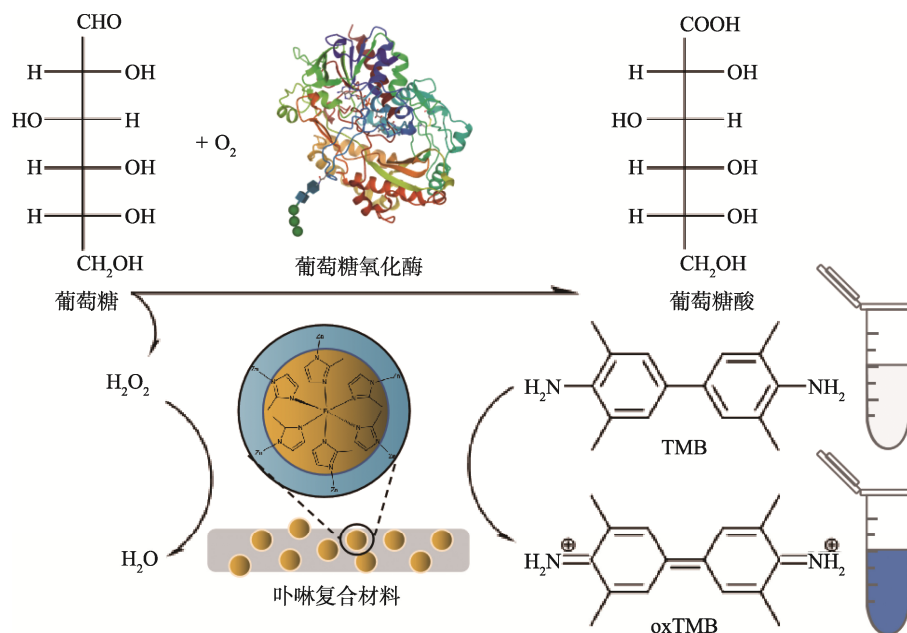


图 3 卟啉纳米复合材料作为葡萄糖检测的过氧化物模拟酶的示意图

Fig.3 Schematic illustration of porphyrin nanocomposites as a peroxidase mimic for glucose detection

荧光内滤效应是指当荧光体浓度较大或与其他吸光物质共存时, 由于荧光体或其他吸光物质对于激发光或发射光的吸收而导致荧光减弱的现象^[19]。基于这种效应也可以实现葡萄糖的检测。ZHANG 等^[20]将 5,10,15,20-四(1-甲基-4-吡啶基)卟啉[Fe 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphine, FeTMPyP]与石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQDs)相结合, 制备 GQDs/FeTMPyP。FeTMPyP 的内滤效应导致 GQDs 的大量荧光猝灭。在 FeTMPyP 与 H_2O_2 反应中, FeTMPyP 破裂, GQDs 荧光重新恢复。通过这种方法可以实现对 H_2O_2 的检测。利用 Gox 氧化葡萄糖成 H_2O_2 的催化特性可以进一步拓展到对葡萄糖的检测。由于金属卟啉设计具有固定的合成方法, 这种基于 GQDs 的光学传感方法有可能对其他目标分析物如胆固醇、肌氨酸等具有高度通用性, 这些物质在相应的氧化酶作用下都能产生 H_2O_2 。

1.2 胆固醇的检测

胆固醇是动物细胞膜的重要组成部分, 对细胞生长增殖至关重要。但是, 胆固醇水平异常可导致肥胖, 并引发一系列代谢综合征, 危及人类的身体健康^[21]。因此, 对胆固醇的快速检测具有重要临床意义。

到目前为止, 已经构建了各种测定胆固醇的方法, 如电化学非酶法^[22], 液相色谱法^[23]和荧光法^[24]等。虽然这些方法已经显示出检测胆固醇的可行性, 但检测过程涉及到复杂的仪器。相比之下, 比色法因其便捷直观的特点而备受关注。基于辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的比色法已应用于临床实践, 具有方便简单、检测速度快、背景干扰低、灵敏度高等优点。然而, 它作为一种天然酶,

也兼具了天然酶的两大大特征: 纯化成本高、稳定性差。因此, 将具有过氧化物酶活性的模拟酶代替 HRP 应用于胆固醇检测中具有重要意义。HE 等^[25]以 5,10,15,20-四(4-羧基苯基)卟啉[5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyl phenyl) porphyrin, Por]修饰蛋黄-壳纳米球($NiCo_2S_4$), 制备 Por- $NiCo_2S_4$ 过氧化物模拟酶。基于卟啉与 $NiCo_2S_4$ 的相互协同作用及活性位点的增加, Por- $NiCo_2S_4$ 表现出比 $NiCo_2S_4$ 更高的过氧化物酶活性。将 Por- $NiCo_2S_4$ 与胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase, ChOx)相结合, 可应用于血清中总胆固醇的检测。该检测体系在 0.1~9.0 mmol/L 具有良好的线性关系, 检出限为 19.36 $\mu\text{mol/L}$ 。这种方便快捷且经济的比色传感平台在检测生物小分子方面具有巨大的应用潜力。ZHU 等^[26]以 Por 功能化修饰 NiS_2 纳米颗粒, 并锚定在石墨烯表面, 制备 Por- NiS_2/GO 过氧化物模拟酶。由于卟啉的引入, Por- NiS_2/GO 表现出优异的过氧化物酶活性。结合 ChOx, 可以实现痕量胆固醇的快速检测。这类基于卟啉纳米材料的传感器凭借优异的过氧化物酶活性, 还可以拓展到食品中谷胱甘肽和半胱氨酸等物质的检测。尽管如此, 纳米材料的毒性不应被忽视, 如何有效解决这一问题有待进一步研究。

1.3 兽药成分多巴胺的检测

多巴胺是一种儿茶酚胺神经递质, 存在于神经组织和体液中^[27]。人脑中多巴胺含量异常可引起精神分裂症和帕金森病^[28-29]。此外, 作为一种肾上腺素能神经兴奋剂, 多巴胺也被当作瘦肉精添加到动物饲料中使用^[30]。当人们食用多巴胺残留的肉类时会引起食物中毒。因此, 建立一种针对动物源性食品中多巴胺含量检测的方法具有重要意义。

传统的多巴胺检测手段有:液相色谱法、化学发光法和电化学法等^[31]。近期,张杉等^[32]通过高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)检测动物源性食品中多巴胺,样品经三氯乙酸的磷酸盐缓冲液提取、WCX 弱阳离子交换固相萃取柱净化等前处理后进样分析。这种方法在 10~500 ng/mL 具有很好的线性关系,已应用于畜肉蛋奶等制品中多巴胺的检测。虽然这种方法应用范围广、检测精度高,但离不开精密的高端设备,成本高、前处理复杂,在实际应用中受到极大的限制。ZHAO 等^[33]开发了一种快速检测多巴胺的手段,通过水热法对负载在氧化石墨烯表面的 CoO 纳米管进行 Por 修饰,制备 Por/CoO/GO 过氧化物模拟酶。在 H₂O₂ 存在下, Por/CoO/GO 过氧化物模拟酶能迅速催化无色 TMB 氧化成蓝色 oxTMB,而添加不同浓度的多巴胺能够使蓝色 oxTMB 逐渐褪色。此传感器能在 0.2~10 μmol/L 范围内监测多巴胺,检出限为 0.1391 μmol/L。HE 等^[34]将 Por 修饰在 CuCo₂O₄ 纳米球上,制备出 Por-CuCo₂O₄ 过氧化物模拟酶,基于同样的原理,可以实现多巴胺的检测,检测限为 0.94 μmol/L。LU 等^[35]通过将 Por 加载到 MoS₂ 上来制备过氧化物模拟酶,其在检测多巴胺方面表现出优异的灵敏度和选择性。目前将传感器应用于动物源性食品中多巴胺检测的研究较少,以血清或尿液的为主。若是结合上述色谱法中的前处理,这些传感器或许也可以拓展到动物源性食品中。

1.4 农药成分马拉硫磷的检测

随着对于农产品需求的不断增加,农民对于农药使用的依赖程度越来越大,导致农药使用量急剧加大,甚至存在过量使用或违规使用剧毒农药的情况^[36]。因此,农药残留问题一直受到大家的热切关注。

俞所银等^[37]运用超高效液相色谱-串联四极杆质谱法对 14 种市售蔬菜进行灭蝇胺的检测。朱颖洁等^[38]通过超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测了 30 种茶叶中的农药残留,其中 6 种茶叶检测到目标农药,但其含量低于国家规定值。这些方法均采用高端精密仪器,具有较好的灵敏度和准确性,但高度依赖农药对照品,不适用现场的快速检测。随后,电化学法因其简单、快速、成本低等优点进入大家的视野。CHEN^[39]构建了一款基于多壁碳纳米管/金纳米复合材料的高效电化学传感器,已应用于生菜中敌敌畏的检测。构建快速的农药污染检测方法已成为一种趋势。

比色法因其检测速度快、易于制造、易于检测、检测效率高而最有潜力用于农药残留现场检测。众所周知,农药存在大量的 P-O 键,其与催化剂中金属原子之间的不同相互作用会抑制催化剂的活性^[40]。马拉硫磷是农药的一种重要组成成分。基于这种活性抑制作用,GUO 等^[41]设计了

一款检测马拉硫磷的比色传感器。将 5,10,15,20-四(4-硝基苯基)铁卟啉 [Fe(III) 5,10,15,20-tetrakis (4-nitrophenyl) porphyrin, Fe-TPP(NO₂)₄] 与八(氨基苯基)倍半硅氧烷[octa (amino-phenyl) silsesquioxane, OAPS] 通过偶联反应制备一种偶氮基多孔有机聚合物 Azo(Fe)PPOP。该聚合物在 H₂O₂ 与 TMB 显色反应中表现出优异的过氧化物酶活性。将马拉硫磷添加到显色反应中,马拉硫磷与 Azo(Fe)PPOP 通过 Fe-O 或 Fe-S 键结合,抑制 Azo(Fe)PPOP 催化活性,阻止反应液颜色向亮蓝色转变,从而达到间接检测马拉硫磷的目的。相较于传统的农药残留检测技术需要高精尖设备,这种方法方便快捷、更具直观性,能够很好地应用于现场的快速检测。同时,这种方法也为能与卟啉纳米材料发生特异性结合的其他物质的快速检测提供新思路。

2 Mb-Cu 过氧化物模拟酶在食品安全检测中的应用

甲烷氧化菌是能够代谢甲烷作为其唯一碳源和能量来源的原核生物。它们在限铜条件下会分泌一种多肽——甲烷氧化菌素。Mb 是核糖体产生的翻译后修饰肽天然产物。1998 年,科学家首次从甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium* OB3b)的生长培养基中分离出 Mb^[42-43]。Mb 可通过其含氮杂环和硫酰胺基团与铜结合(如图 4)。Mb 对铜具有高度亲和力,可以从矿物质和腐殖质中获取铜^[44],甚至可以从硼硅酸盐玻璃中捕捉铜^[45]。这种螯合作用可以有效减少对细菌细胞有毒的 Cu²⁺ 含量。此外, Mb 还可以与其他金属离子结合,如 Au³⁺、Hg²⁺、Ag⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Ni²⁺等^[46]。当 Mb 与 Hg²⁺ 结合时,能够显著降低 Hg²⁺ 的毒性,保护微生物免受 Hg²⁺ 毒害作用。此外, Mb 已被用于介导纳米金粒子的合成,可以通过结合 Au³⁺, 并将其还原为 Au⁰^[47]。

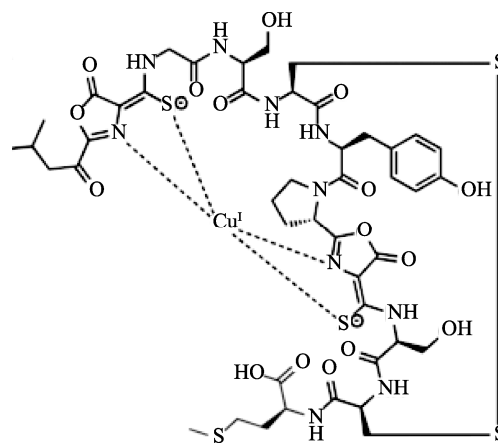


图 4 Mb-Cu 结构

Fig.4 Structure of Mb-Cu

Mb-Cu 已被证明具有多种功能,如氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性等。辛嘉英等^[48]将 Mb-Cu 应用于 H₂O₂

与对苯二酚的反应中, 发现 Mb-Cu 具有过氧化物酶活性。李春雨^[49]进一步比较了不同 Mb-Cu 配合物(Mb-Cu、Mb₂-Cu、Mb₄-Cu)的过氧化物酶活性, 结果显示 Mb₂-Cu 更有利于电子的传递和转移, 表现出最高的催化活性。因此, 可以将 Mb-Cu 作为 HRP 的替代物应用于各项食品安全检测中。

2.1 CaO₂ 的检测

CaO₂ 是一种无机过氧化物, 以往常用作面粉的增白剂。但是, 面粉中 CaO₂ 的过度使用会导致食用者患肠胃炎, 甚至诱发肿瘤。2011 年 5 月起, 我国全面禁止将 CaO₂ 作为食品添加剂加入到食品中^[50]。但仍有不法商家为追求利益, 在面粉中肆意添加 CaO₂。因此, 针对面粉中 CaO₂ 的检测显得尤为重要。

目前, 针对 CaO₂ 的检测有热分解法、高锰酸钾滴定法、间接碘量法和 EDTA 法等^[51]。热分解法是通过加热分解 CaO₂ 产生 O₂, 通过 O₂ 的生成量来反推 CaO₂ 含量。这种测量方法要求量气筒内外压一致, 且热分解前后温度也保持相同。高锰酸钾滴定法常因操作者无法控制滴定速度一致而导致实验结果出现偏差。相比较而言, 间接碘量法和 EDTA 法能够克服上述两者的弊端, 实现 CaO₂ 的检测。但值得强调的是, 这些方法都只适用于纯 CaO₂ 的检测, 而不适合于面粉中 CaO₂ 的检测。张嘉钰等^[52]利用酸与 CaO₂ 反应生成 H₂O₂, 然后以 Mb-Cu 作为 POD 模拟酶催化 H₂O₂ 与对苯二酚生成对苯二醌, 通过观察不同含量 CaO₂ 的紫外-可见吸收光谱图实现 CaO₂ 的检测。这种方法在 0~8 mg/L 具有很好的线性关系, 检出限为 1.82×10⁻² mg/L。这种检测方法方便快捷, 解决了传统方法只适用于纯品 CaO₂ 检测的难题, 更具实际应用价值。XIN 等^[53]建立了一套 Mb-Cu—4-氨基安替比林—苯酚可视化检测面粉中 CaO₂ 体系, 即在 H₂O₂ 存在下, 4-氨基安替比林和苯酚经 Mb-Cu 过氧化物模拟酶作用缩合形成红色的安替比林醌亚胺, 其在 λ = 505 nm 处有最大吸收。这个检测体系在 0~10 mg/L 具有良好的线性关系, 检出限为 3.34 μg/g。而宋桂雪等^[54]基于 HRP—4-氨基安替比林—苯酚反应体系, 首次报道了面粉中 CaO₂ 的检测。但其必须在 HRP 催化检测反应前将小麦粉酸化液的 pH 调至中性, 这势必会增加检测时长。Mb-Cu 模拟酶相较于天然酶 HRP 具有更好的稳定性, 对反应环境的 pH 无要求, 因此可直接加入到酸化液中反应。这种检测方法简化了检测流程, 解决了天然酶在恶劣环境中易失活的难题, 在未来的检测中更具优势, 具有很大开发前景。以上报道关于面粉中 CaO₂ 检测参数如表 1 所示。

表 1 面粉中 CaO₂ 检测参数
Table 1 Parameters of CaO₂ in flours

检测物质	过氧化物酶	线性范围	检出限	参考文献
CaO ₂	Mb-Cu	0~8 mg/L	1.82×10 ⁻² mg/L	[52]
CaO ₂	Mb-Cu	0.4~10 mg/L	3.34 mg/kg	[53]
CaO ₂	HRP	0.4×10 ⁻³ ~1×10 ⁻² mg/L	7.4 mg/kg	[54]

2.2 铜离子的检测

近年来, 部分不良商家为追求蔬菜视觉吸引力或补偿自然颜色变化, 而非法添加硫酸铜对其染色。过量食用这些染色蔬菜将引起严重的疾病, 如癌症。快速准确地检测 Cu²⁺对于确保食品不含有害色素非常重要。因此, 实现水和食品样品中 Cu²⁺的准确快速检测具有重要意义。

针对重金属离子检测的方法可分为 3 大类: 光谱检测技术、电化学法和光学检测法^[55-57]。光谱法敏感精确, 但依赖高端设备, 并且需要复杂的前处理。相比较下, 电化学法成本低、检测速度快、选择性好, 成为重金属离子快检方法之一。薛也等^[58]制备 Mb-AuNPs 修饰金电极, 通过溶出伏安法检测 Cu²⁺。这种方法主要基于 Mb 对 Cu²⁺的特异性捕捉, 具有较好的灵敏性和稳定性。

比色法是另一种重金属离子快检方法, 不仅方便快捷、成本低, 而且能够实现裸眼观测。Mb 修饰后的纳米金 (gold nanoparticles, GNPs) 在 Cu²⁺的作用下会发生聚集, 这种聚集现象在紫外可见光下可被观察。刘丰源等^[59]基于这个原理, 添加 Mb-GNPs 到不同浓度 Cu²⁺溶液中, Mb-GNPs 发生不同程度聚集, 从而实现 Cu²⁺的可视化检测。但在后续专一性研究中发现, Co²⁺会对检测结果产生一定的干扰。刘丰源^[60]改进实验方案, 构建了 GNPs-Mb-Cu 过氧化物模拟酶催化对苯二酚检测体系。研究表明, Cu²⁺能够显著增强 GNPs-Mb 模拟酶活性, 酶活与 Cu²⁺浓度在 10~600 nmol/L 具有良好的线性关系, 检出限为 57.9 nmol/L。专一性研究表明该体系对 Cu²⁺有较好的专一性。目前, 这种方法已应用于市售蕨菜和山芹中铜离子检测, 具有较好的可行性和精密度, 有望推广到更多蔬菜中进行 Cu²⁺检测。

2.3 葡萄糖的检测

近期, 基于电化学的生物传感器被广泛研究以用于葡萄糖浓度检测。但是酶修饰电极存在一定的不足, 如固定程序复杂、成本高、不稳定等。因此, 开发一种价格低廉、方便快捷的检测体系至关重要。目前, 基于 GOx 和 POD 或其模拟酶检测葡萄糖主要是通过两步法进行, 首先 GOx 氧化葡萄糖产生 H₂O₂, 然后 POD 或其模拟酶催化 H₂O₂ 产生羟基使底物氧化。张帅等^[61]通过 Mb-Cu、纳米金 (AuNPs) 和 GOx 构建 Mb-Cu@AuNPs—GOx 检测体系。该体系通过 GOx 催化葡萄糖产生 H₂O₂, 然后 Mb-Cu@AuNPs 模拟酶催化 H₂O₂ 与对苯二酚反应。该体系在 1×10⁻³~5×10⁻² mol/L 范围内具有较高的灵敏性和选择性。相比于常规快速血糖仪检测, 该法将检测时间缩短了 75%。WANG 等^[62]在张帅的基础上, 构建一种双功能模拟酶 FAD-Mb/Cu-Mb@AuNPs, 实现一步法检测葡萄糖。FAD-Mb/Cu-Mb@AuNPs 的构建主要分为以下几步: (1) 通过 Au-S 键或 Au-NH 键, 将 Mb 固定在 AuNPs 表面, 制备 Mb-AuNPs 结构体; (2) 借助 Mb 中-COOH 与黄素腺嘌呤二核

苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)结合, 增强模拟酶的 GOx 活性; (3)借助 Mb 特异性捕捉 Cu^{2+} , 形成 Mb-Cu, 增强模拟酶的 POD 活性。通过上述方法构建的模拟酶兼具葡萄糖氧化酶和过氧化物酶活性。含葡萄糖和 TMB 的混合溶液中经过模拟酶的催化氧化会生成亮蓝色的 oxTMB, 从而实现葡萄糖的检测。这种检测方法成本低、方便快捷、肉眼可见, 解决了利用昂贵稀缺的天然酶检测葡萄糖的难题。以上报道中关于食品中生物小分子和有害物质检测的参数如表 2 所示。

3 结束语

基于过氧化物模拟酶的比色法在食品安全检测中具有重要地位, 它具有方便快捷、背景干扰低、灵敏度高

优点。相比于天然酶, 模拟酶即使在恶劣的化学检测环境中也能保持较高催化活性。这也是模拟酶在实际应用中的一大亮点。

虽然在过氧化物模拟酶的构建方面已经取得瞩目的研究成果, 但其仍处于开发阶段, 仍有部分问题急需解决。其中最突出的问题就是模拟酶的毒性。含金属卟啉结构的模拟酶多与纳米材料复合, 存在毒性大的缺陷, 难以应用于人体。纳米酶亦是如此。后续研究可着重合成无毒且生物相容的模拟酶。与目前已开发的过氧化物模拟酶相比, Mb-Cu 过氧化物模拟酶在这一点上更具优势。

总而言之, 过氧化物模拟酶在食品安全检测中的应用既有机遇也有挑战, 在未来具有很大的开发前景。

表 2 食品中生物小分子和有害物质的检测参数
Table 2 Parameters for the detection of small biological molecules and harmful substances in food

检测物质	过氧化物酶	线性范围/($\mu\text{mol/L}$)	检出限/($\mu\text{mol/L}$)	参考文献
葡萄糖	Fe-MIN/ZIF-8	0.05~20	0.05	[18]
葡萄糖	FeTMPyP	3~100	0.5	[20]
葡萄糖	Mb-Cu@AuNPs	$1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$	—	[61]
葡萄糖	FAD-Mb/Cu-Mb@AuNPs	$2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$	0.314	[62]
胆固醇	Por-NiCo ₂ S ₄	$1 \times 10^2 \sim 9 \times 10^3$	19.36	[25]
胆固醇	Por-NiS ₂ /GO	100-600	34.9	[26]
多巴胺	Por/CoO/GO	0.2~10	0.1391	[33]
多巴胺	Por-CuCo ₂ O ₄	10~100	0.94	[34]
多巴胺	Por/MoS ₂	1~60	0.33	[35]
马拉硫磷	Azo(Fe)PPOP	0.01~0.1	0.0085	[41]
Cu^{2+}	GNPs-Mb	$1 \times 10^{-2} \sim 6 \times 10^{-1}$	0.0579	[60]

注: —表示文献未给出数据。

参考文献

- [1] CAPOBIANCO JA, ARMSTRONG CM, LEE J, *et al.* Detection of pathogenic bacteria in large volume food samples using an enzyme-linked immunoelectrochemical biosensor [J]. Food Control, 2021, 119: 107456.

[2] KARADURMUS L, KAYA S, OZKAN SA. Recent advances of enzyme biosensors for pesticide detection in foods [J]. J Food Meas Charact, 2021, 15(5): 4582–4595.

[3] GUO X, LIN L, SONG S, *et al.* Development of enzyme linked immunosorbent assay and lateral flow immunoassay for the rapid detection of dapsone in milk [J]. New J Chem, 2021, 45(40): 19097–19104.

[4] 徐阳, 辛嘉英, 王雨晴, 等. 过氧化物酶及其模拟物在食品分析中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(21): 8494–8500.
XU Y, XIN JY, WANG YQ, *et al.* Research progress on the application of peroxidase and its mimetic enzyme in food analysis [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(21): 8494–8500.

[5] LIANG M, YAN X. Nanozymes: From new concepts, mechanisms, and standards to applications [J]. Acc Chem Res, 2019, 52(8): 2190–2200.
- [6] GAO L, ZHANG J, NIE L, *et al.* Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles [J]. Nat Nanotechnol, 2007, 2(9): 577–583.

[7] THANGUDU S, SU CH. Peroxidase mimetic nanozymes in cancer phototherapy: Progress and perspectives [J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 1015.

[8] LIU W, CHU L, ZHANG C, *et al.* Hemin-assisted synthesis of peroxidase-like Fe-N-C nanozymes for detection of ascorbic acid-generating bio-enzymes [J]. Chem Eng J, 2021, 415(50): 128876.

[9] NORVAISA K, KIELMANN M, SENGE MO. Porphyrins as colorimetric and photometric biosensors in modern bioanalytical systems [J]. ChemBioChem, 2020, 21(13): 1793–807.

[10] 刘育, 尤长城, 张衡益. 超分子化学[M]. 天津: 南开大学出版社, 2001.
LIU Y, YOU CC, ZHANG HY. Supramolecular chemistry [M]. Tianjin: Nankai University Press, 2001.

[11] BORAH KD, BHUYAN J. Magnesium porphyrins with relevance to chlorophylls [J]. Dalton Trans, 2017, 46(20): 6497–6509.

[12] YANG H, ZHOU Y, LIU J. Porphyrin metalation catalyzed by DNazymes and nanozymes [J]. Inorg Chem Front, 2021, 8(9): 2183–2199.

- [13] LIU Q, LI H, ZHAO Q, *et al.* Glucose-sensitive colorimetric sensor based on peroxidase mimics activity of porphyrin-Fe₃O₄ nanocomposites [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 41: 142–151.
- [14] LIU Q, YANG Y, LI H, *et al.* NiO nanoparticles modified with 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyl phenyl)-porphyrin: Promising peroxidase mimetics for H₂O₂ and glucose detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 147–153.
- [15] LIU Q, DING Y, YANG Y, *et al.* Enhanced peroxidase-like activity of porphyrin functionalized ceria nanorods for sensitive and selective colorimetric detection of glucose [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 59: 445–453.
- [16] LIU Q, ZHU R, DU H, *et al.* Higher catalytic activity of porphyrin functionalized Co₃O₄ nanostructures for visual and colorimetric detection of H₂O₂ and glucose [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 43: 321–329.
- [17] LIU Q, ZHANG L, LI H, *et al.* One-pot synthesis of porphyrin functionalized gamma-Fe₂O₃ nanocomposites as peroxidase mimics for H₂O₂ and glucose detection [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 55: 193–200.
- [18] DONG W, CHEN G, ZHANG L, *et al.* Biomimetic iron-imidazole sites into metal organic framework nanoflowers as high-affinity peroxidase mimic for colorimetric biosensing [J]. *Microchem J*, 2022, 175: 107064.
- [19] WANG JL, WU YG, ZHOU P, *et al.* A novel fluorescent aptasensor for ultrasensitive and selective detection of acetamiprid pesticide based on the inner filter effect between gold nanoparticles and carbon dots [J]. *Analyst*, 2018, 143(21): 5151–5160.
- [20] ZHANG L, PENG D, LIANG RP, *et al.* Graphene quantum dots assembled with metalloporphyrins for “Turn on” sensing of hydrogen peroxide and glucose [J]. *Chemistry*, 2015, 21(26): 9343–9348.
- [21] PACKARD C, CHAPMAN MJ, SIBARTIE M, *et al.* Intensive low-density lipoprotein cholesterol lowering in cardiovascular disease prevention: Opportunities and challenges [J]. *Heart*, 2021, 107(17): 1369–1375.
- [22] AGNIHOTRI N, CHOWDHURY A, DE A. Non-enzymatic electrochemical detection of cholesterol using β -cyclodextrin functionalized graphene [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 212–217.
- [23] HOJO K, HAKAMATA H, KUSU F. Simultaneous determination of serum lathosterol and cholesterol by semi-micro high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(11–12): 751–755.
- [24] AVIJIT M, NIKHIL RJ. Fluorescent detection of cholesterol using β -cyclodextrin functionalized graphene [J]. *Chem Commun*, 2012, 48(58): 7316–7318.
- [25] HE Y, LI N, LI W, *et al.* 5,10,15,20-tetrakis (4-carboxylphenyl) porphyrin functionalized NiCo₂S₄ yolk-shell nanospheres: Excellent peroxidase-like activity, catalytic mechanism and fast cascade colorimetric biosensor for cholesterol [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2021, 326: 128850.
- [26] ZHU X, XUE Y, LI H, *et al.* Porphyrin-modified NiS₂ nanoparticles anchored on graphene for the specific determination of cholesterol [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2021, 4(11): 11960–11968.
- [27] YANG ZZ, MA FQ, ZHU Y, *et al.* A facile synthesis of CuFe₂O₄/Cu₉S₈/PPy ternary nanotubes as peroxidase mimics for the sensitive colorimetric detection of H₂O₂ and dopamine [J]. *Dalton Trans*, 2017, 46(34): 11171–11179.
- [28] WEI X, ZHANG Z, WANG Z. A simple dopamine detection method based on fluorescence analysis and dopamine polymerization [J]. *Microchem J*, 2019, 145: 55–58.
- [29] SIDDIQUI S, SHAWUTI S, UDDIN S, *et al.* L-cysteine mediated self-assembled Ag-Au nanoparticles as fractal patterns with bowl alley-like-hollow arrays for electrochemical sensing of dopamine [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2019, 58(19): 8035–8043.
- [30] 许景月. 非标记核酸适配体传感器检测动物源性食品中四环素和多巴胺残留[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- XU JY. Development of label-free aptasensors for the rapid detection of tetracycline and dopamine residues in animal derived food [D]. Changchun: Jilin University, 2016.
- [31] 陈少华, 陈文良, 丁益, 等. 纳米材料及其三维结构修饰电极检测多巴胺的研究进展[J]. *化工进展*, 2021, 40(11): 6135–6144.
- CHEN SH, CHEN WQ, DING Y, *et al.* Study on the structure and adsorption mechanism of three dimensional electrochemical modified electrode for dopamine response [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2021, 40(11): 6135–6144.
- [32] 张杉, 周瑞泽, 张文超, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测动物源性食品中肾上腺素和多巴胺残留[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(13): 151–158.
- ZHANG S, ZHOU RZ, ZHANG WC, *et al.* Determination of epinephrine and dopamine in animal-derived food by HPLC-MS/MS [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(13): 151–158.
- [33] ZHAO X, ZHAO S, LI S, *et al.* CoO nanotubes loaded on graphene and modified with porphyrin moieties for colorimetric sensing of dopamine [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2021, 4(9): 8706–8715.
- [34] HE YL, LI N, LIU XW, *et al.* 5,10,15,20-tetrakis (4-carboxyl phenyl) porphyrin-functionalized urchin-like CuCo₂O₄ as an excellent artificial nanozyme for determination of dopamine [J]. *Microchim Acta*, 2021, 188(5): 1–11.
- [35] LU G, YU G, KONG X, *et al.* Porphyrin/MoS₂ film for ultrasensitive dopamine detection [J]. *Inorg Chem Commun*, 2019, 110: 107591.
- [36] LI C, ZHU H, LI C, *et al.* The present situation of pesticide residues in China and their removal and transformation during food processing [J]. *Food Chem*, 2021, 354: 129552.
- [37] 俞所根, 闫晴, 梁佳. 超高效液相-串联四极杆质谱联用法测定 14 种蔬菜中灭蝇胺的残留[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1-8. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029826
- YU SY, YAN Q, LIANG J. Determination of cyromazine residues in 14 kinds of vegetables by ultra performance liquid chromatography- tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QQQMS) [J/OL]. *Food Ferment Ind*: 1-8. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029826
- [38] 朱颖洁, 曹燕卿, 毛劼, 等. QuEChERS 前处理结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测茶叶中 14 种农药残留[J/OL]. *食品工业科技*: 1-12. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090215
- ZHU YJ, CAO YQ, MAO J, *et al.* Determination of 14 pesticide residues in tea by QuEChERS combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J/OL]. *Sci Technol Food Ind*: 1-12. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090215
- [39] CHEN Y. Efficient electrochemical sensor based on multi-walled carbon nanotubes/gold nanocomposite for detection of dichlorvos pesticide in agricultural food [J]. *Int J Electrochem Sci*, 2021, 16: 210321.
- [40] BISWAS S, TRIPATHI P, KUMAR N, *et al.* Gold nanorods as peroxidase mimetics and its application for colorimetric biosensing of malathion [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2016, 231: 584–592.
- [41] GUO X, CHEN M, JING L, *et al.* Porous polymers from octa (amino-phenyl) silsesquioxane and metalloporphyrin as peroxidase-mimicking enzyme for malathion colorimetric sensor [J]. *Colloid Surf B*, 2021, 207: 112010.
- [42] DISPIRITO AA, ZAHN JA, GRAHAM DW, *et al.* Copper-binding compounds from methylosinus trichosporium OB3b [J]. *J Bacteriol*, 1998,

- 180(14): 3606–3613.
- [43] TÉLLEZ CM, GAUS KP, GRAHAM DW, *et al.* Isolation of copper biochelates from methylorus trichosporium OB3b and soluble methane monooxygenase mutants [J]. *Appl Environ Microb*, 1998, 64(3): 1115–1122.
- [44] PESCH M L, CHRISTL I, KRETZSCHMAR R, *et al.* Competitive ligand exchange between Cu-humic acid complexes and methanobactin [J]. *Geobiology*, 2013, 11(1): 44–54.
- [45] KULCZYCKI E, FOWLE DA, KNAPP C, *et al.* Methanobactin-promoted dissolution of Cu-substituted borosilicate glass [J]. *Geobiology*, 2007, 5(3): 251–263.
- [46] DASSAMA LM, KENNEY GE, ROSENZWEIG AC. Methanobactins: From genome to function [J]. *Metallomics*, 2017, 9(1): 7–20.
- [47] XIN JY, LIN K, WANG Y, *et al.* Methanobactin-mediated synthesis of gold nanoparticles supported over Al_2O_3 toward an efficient catalyst for glucose oxidation [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 21603–21620.
- [48] 辛嘉英, 姜加良, 张帅, 等. 甲烷氧化菌素-铜配合物催化过氧化氢氧化对苯二酚[J]. *高等学校化学学报*, 2013, 34(5): 1233–1239.
- XIN JY, JIANG JL, ZHANG S, *et al.* Oxidation of hydroquinone catalyzed by methanobactin-Cu with hydrogen peroxide [J]. *Chem J Chin Univ*, 2013, 34(5): 1233–1239.
- [49] 李春雨. 甲烷氧化菌素功能化纳米金的铜配位组装及拟酶活性[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2018.
- LI CY. Cu-induced assembly of methanobactin-functionalized gold nanoparticles and its mimic enzyme activity [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2018.
- [50] 卫生部等 7 部门. 卫生部等 7 部门关于撤销食品添加剂过氧化苯甲酰、过氧化钙的公告(2011 年第 4 号) [EB/OL]. [2011-03-01]. <http://www.nhc.gov.cn/sp/s7891/201103/b24445ba709848e8b98d3871d66507ab.shtm> [2021-12-25].
- Ministry of Health and other seven departments. Ministry of Health Announcement of the Ministry of Health and other seven departments on the withdrawal of food additive benzoyl peroxide and calcium peroxide (No.4 of 2011) [EB/OL]. [2011-03-01]. <http://www.nhc.gov.cn/sp/s7891/201103/b24445ba709848e8b98d3871d66507ab.shtm> [2021-12-25].
- [51] 高誉, 马兵, 潘易, 等. 过氧化钙含量分析方法的比较研究[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(17): 3625–3627.
- GAO Y, MA B, PAN Y, *et al.* Comparative study on calcium peroxide content by different determination methods [J]. *Hubei Agric Sci*, 2011, 50(17): 3625–3627.
- [52] 张嘉钰, 辛嘉英, 刘丰源, 等. 甲烷氧化菌素-铜配合物模拟过氧化物酶检测面粉中的过氧化钙[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(9): 257–262.
- ZHANG JY, XIN JY, LIU FY, *et al.* The detection of calcium peroxide in flour by methanobactin-Cu simulated peroxidase method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(9): 257–262.
- [53] XIN JY, LUN XC, SUN LR, *et al.* Simple and rapid detection of calcium peroxide in flour based on methanobactin peroxidase-like activity [J]. *Food Chem*, 2022, 378: 132041. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132041
- [54] 宋桂雪, 刘宁, 张溪, 等. 过氧化物酶—分光光度法测定小麦粉中的过氧化钙[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(8): 3376–3381.
- SONG GX, LIU N, ZHANG X, *et al.* Determination of calcium peroxide in wheat flour by peroxidase-spectrophotometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(8): 3376–3381.
- [55] 张楠, 胡佩文, 郭双铭, 等. 铜离子的光电化学可视化检测新方法[J/OL]. *南京农业大学学报*: 1–11. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.S.20211221.1713.006.html>
- ZHANG N, HU PW, GUO SM, *et al.* Simultaneous photoelectrochemical and visualized detection of copper ions [J/OL]. *J Nanjing Agric Univ*: 1–11. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.S.20211221.1713.006.html>
- [56] 齐海燕, 张琛琪, 李金龙, 等. 氮硫掺杂碳点的制备及检测铜离子[J/OL]. *应用化学*: 1–14. DOI: 10.19894/j.issn.1000-0518.210263
- QI HY, ZHANG SQ, LI JL, *et al.* Synthesis of sulfur and nitrogen doped carbon dots for Cu(II) detection [J/OL]. *Chin J Appl Chem*: 1–14. DOI: 10.19894/j.issn.1000-0518.210263
- [57] 钟世龙, 张玲玲, 刘静, 等. 基于碳量子点的新型介孔纳米荧光探针的合成及用于铜离子的检测[J]. *分析化学*, 2022, 50(1): 47–53.
- ZHONG SL, ZHANG LL, LIU J, *et al.* Carbon quantum dots-based mesoporous nanomaterials for detection of copper on [J]. *Chin J Anal Chem*, 2022, 50(1): 47–53.
- [58] 薛也, 王艳, 赵宁, 等. 甲烷氧化菌素-纳米金修饰金电极溶出伏安法对 Cu^{2+} 的检测[J]. *食品科学*, 2021, 42(14): 328–332.
- XUE Y, WANG Y, ZHAO N, *et al.* Determination of Cu^{2+} by stripping voltammetry with electrode modified with methanobactin-functionalized gold nanoparticles [J]. *Food Sci*, 2021, 42(14): 328–332.
- [59] 刘丰源, 辛嘉英, 孙立瑞, 等. 甲烷氧化菌素功能化纳米金可视化检测微量铜[J]. *分析试验室*, 2019, 38(12): 1495–1498.
- LIU FY, XIN JY, SUN LR, *et al.* Visual detection of trace copper ions by methanobactin functionalized gold nanoparticles [J]. *Chin J Anal Lab*, 2019, 38(12): 1495–1498.
- [60] 刘丰源. 微量铜的甲烷氧化菌素功能化纳米金检测研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
- LIU FY. Detection of trace copper with methanobactin functionalized gold nanoparticles [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2020.
- [61] 张帅, 郝雪, 张娜, 等. 基于纳米酶技术检测柑桔果实中葡萄糖[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(5): 1899–1905.
- ZHANG S, HAO X, ZHANG N, *et al.* Detection of glucose in citrus fruit based on nanometer enzyme technology [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(5): 1899–1905.
- [62] WANG Y, WANF Y, ZHANG S, *et al.* Cu^{2+} Induced regulation and construction of FAD-Mb/Cu-Mb/AuNps bifunctional mimetic enzyme and application in glucose visualization detection [J]. *Microchem J*, 2022, 175: 107207.

(责任编辑: 郑 丽 韩晓红)

作者简介



方祁利, 硕士研究生, 主要研究方向为生物催化。
E-mail: fangqil5257@163.com



辛嘉英, 博士, 教授, 主要研究方向为生物催化与生物转化。
E-mail: xinjiayingvip@163.com