

荧光方法在酶抑制农药残留快速检测中的研究进展

吴正浩¹, 郝振霞^{1,2,3}, 陈红平^{1,2,3}, 鲁成银^{1,2,3*}

[1. 中国农业科学院茶叶研究所, 杭州 310008; 2. 农业农村部茶叶质量安全控制重点实验室, 杭州 310008; 3. 农业农村部茶叶产品质量安全风险评估实验室(杭州), 杭州 310008]

摘 要: 农药残留污染是农产品质量安全的首要关注因子, 基于大型仪器的实验室检测模式难以匹配检测时效性需求。基于乙酰胆碱酯酶活性抑制的农药残留快速检测方法(酶抑制法)具有操作便携、检测速度快等优势, 已成为农产品质量安全的常用筛查手段。囿于常规可见光比色法性能, 传统的酶抑制法在检测灵敏度方面受到制约, 这限制了其进一步的发展。荧光方法利用特征的激发/发射光谱, 可以有效降低非特异性干扰, 因此将荧光信号作为数据采集技术是改善酶抑制法灵敏度缺陷的有效手段。本文重点介绍了荧光方法在酶抑制农药残留快速检测中的信号响应模式, 包括单酶-荧光材料响应、多酶级联响应和酶活性靶向小分子荧光探针响应, 还分别总结了不同方法的目标物响应机制、检测效果及应用现状, 最后对酶抑制农药残留快速检测的发展方向进行了展望。

关键词: 酶抑制法; 乙酰胆碱酯酶; 荧光检测; 农药残留; 快速检测

Research progress on fluorescence methods for rapid detection of pesticide residues via enzyme inhibition

WU Zheng-Hao¹, HAO Zhen-Xia^{1,2,3}, CHEN Hong-Ping^{1,2,3}, LU Cheng-Yin^{1,2,3*}

[1. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China; 2. Key Laboratory of Tea Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hangzhou 310008, China; 3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Tea Products (Hangzhou), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hangzhou 310008, China]

ABSTRACT: Pesticide residue contamination stands as a primary concern for the safety of agricultural products. Conventional laboratory detection methods based on large-scale instruments fail to meet time-effectiveness of detection. The rapid detection method for pesticide residues based on acetylcholinesterase activity inhibition (AChE inhibition assay) possesses advantages such as portability and high detection speed, making it a commonly employed screening tool for ensuring the safety of agricultural products. However, AChE inhibition assays faces limitations in detection sensitivity, primarily attributed to the performance constraints of conventional visible colorimetric,

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1601101)、浙江省基础公益研究计划项目(LTGN23C200018)、中国农业科学院创新团队茶叶质量与风险评估团队项目(CAAS-ASTIP-2016-TRICAAS)、国家现代农业产业技术体系项目(CARS-19)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1601101), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LTGN23C200018), the Tea Quality Risk Assessment Innovative Research Team in Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2016-TRICAAS), and the Modern Agro Industry Technology Research System (CARS-19)

***通信作者:** 鲁成银, 研究员, 主要研究方向为茶叶质量检验与品质管理。E-mail: lchy@tricaas.com

***Corresponding author:** LU Cheng-Yin, Professor, Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, No.9, South Meiling Road, Xihu District, Hangzhou 310008, China. E-mail: lchy@tricaas.com

impeding its further advancement. The fluorescence methods, utilizing distinctive excitation/emission spectra, have demonstrated effectiveness in reducing nonspecific interference and enhancing detection sensitivity. Consequently, using fluorescence signals as the data acquisition serves as an effective approach to address the sensitivity shortcomings of the AChE inhibition assay. This paper focused on the signal response of fluorescence methods in the rapid detection of pesticide residues via AChE-inhibition assays, including single enzyme-fluorescent materials, multi-enzyme cascading reactions and AChE-targeted small-molecule fluorescent probes. In addition, this paper systematically summarized the target response mechanisms, detection performances and the applications of these methods. Finally, we provided the prospective outlook on the development of rapid detection of pesticide residues via AChE inhibition assay.

KEY WORDS: enzyme inhibition method; acetylcholinesterase; fluorescence detection; pesticide residues; rapid detection

0 引言

随着全球人口的不断增长和现代农业的快速拓展,农药在提高作物产量与质量、控制杂草、减少病虫害方面发挥了重要作用。然而,农药的大范围使用可能导致食品和环境中的残留,进而通过食物链威胁人类健康。实验室中建立的农药残留分析方法大多依赖于昂贵的检测仪器,包括液相色谱仪、气相色谱仪、质谱仪等,这些方法具有灵敏度高、选择性好、检测结果准确可靠等优点,但对样品前处理过程、实验场地和操作人员等都提出了较高的要求,难以满足大量样品现场、快速筛查的需要。因此,开发有效的农药残留快速检测方法是契合检测时效性、降低筛查成本、保障农产品质量安全的有力手段。

基于乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性抑制的农药残留快速检测技术(简称“酶抑制法”)是发展最早、应用最为广泛的农药残留快速检测方法之一^[1-2],该方法利用有机磷(organophosphorus pesticide, OPs)和氨基甲酸酯(carbamate pesticide, CMs)类农药对 AChE 活性的抑制作用同时对样品中的这两大类农药进行快速筛查,具有操作简便、检测时间短、成本效益高等优势,与食品和农产品现场快速农药残留筛查的实际需求高度匹配^[3]。然而,受限于普通可见光比色法的灵敏度等性能短板,常规酶抑制法在实际应用中对低浓度目标农药的检测效果较差,以对硫磷为例,现行国家标准农药残留快速检测方法(GB/T 5009.199—2003《蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量的快速检测》)的检出限水平为 1.0 mg/L,远高于常见蔬菜水果中最大残留限量 0.01 mg/L 的规定(GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留量》),酶抑制法的检测灵敏度亟待提高。

使用荧光分析法替代分光光度法是提高检测灵敏度的常用手段。由于荧光报告分子具有独特的激发和发射光谱,可以有效地消除检测中的非特异性干扰和背景噪声,因而荧光检测方法具有显著优于常规比色法和分光光度法

的灵敏度优势,可以降低检出限水平 1~3 个数量级^[4-6]。目前,荧光检测的高灵敏度优势,在食品污染物分析^[7-8]、金属离子检测^[9]、生物成像^[10]等领域得到了充分的发挥。然而,大部分农药分子不具备荧光发射能力,限制了荧光检测技术在农药残留快速检测方面的直接应用。

将酶抑制法与荧光技术有机结合,既可以利用酶抑制法的广谱响应,又可以提高检测灵敏度,是一种具有巨大发展潜力和良好应用前景的农药残留快速检测策略。目前,已经有部分文献报道了相关研究进展^[11-12]。在本课题组的前期研究中,开发了一种靶向响应 AChE 活性的近红外荧光探针,建立了相应的酶抑制农药残留快速检测方法,实现多种有色基质中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的快速、可靠检测^[13]。根据不同的信号响应与检测机制,酶抑制法与荧光技术的结合可以通过单酶-荧光材料响应、多酶级联响应和酶活性靶向小分子荧光探针响应 3 种类型实现,本文重点关注这 3 种方法在农药残留快速检测中的信号产生机理与应用现状,以期酶抑制法在食品安全保障方面的应用提供一定的理论参考。

1 基于单酶-荧光材料响应的检测方法

单酶-荧光材料模式中,荧光材料通过对反应体系中 AChE 水解产物的响应,间接检测 AChE 活性,进而实现对样品中农药残留水平的测定。近年来该领域研究最多的荧光材料主要分为小分子荧光探针和量子点(quantum dots, QDs)两类。

1.1 基于 AChE-小分子荧光探针体系的检测方法

小分子荧光探针是一种利用荧光信号变化响应目标物浓度的有机小分子,可以根据体系微环境的变化而改变其荧光信号,是决定检测体系荧光发射波长、信号强度等光学参数的关键部分^[14]。如表 1 所示,文献报道中常见荧光基团主要有罗丹明(rhodamine)^[24]、四苯乙烯(tetraphenylethylene, TPE)^[15]、氟硼二吡咯(boron dipyrromethene, BODIPY)、萘

酰亚胺^[25]等, 它们可以与不同的识别基团结合, 形成适用于响应目标物的有机荧光探针。此外, 也有研究者将有机荧光探针与贵金属纳米粒子结合, 用于酶抑制法农药残留荧光检测。

罗丹明是一种以氧杂蒽为母体的荧光染料, 分子中的三环刚性结构赋予其良好的光物理特性, 被广泛用于小分子荧光探针的构建^[26]。它可以通过内酰胺结构开环和闭环两种形式的互变, 实现适当外部刺激下的荧光“off-on”调控。LIU 等^[27]以罗丹明 B 修饰的金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)为探针, 构建了一种 OPs 和 CMs 的检测方法。通过静电吸附将罗丹明 B 修饰到带负电的柠檬酸盐-金纳米粒子上, 导致其荧光猝灭。当体系中加入硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine, ATCh)和 AChE 后, 催化形成的硫代胆碱(thiocholine, TCh)具有对 AuNPs 更强的结合能力, 因此竞争性抢夺 AuNPs 引起罗丹明 B 的游离与荧光恢复。该方法对甲萘威、二嗪农、马拉硫磷和甲拌磷的检出限分别为 0.1、0.1、0.3 和 1 $\mu\text{g/L}$ 。LUO 等^[28]基于类似的检测机制, 利用罗丹明 B 修饰的银纳米粒子开发了一种比色和荧光双信号输出的农药检测方法, 实现了甲萘威的高灵敏检测, 检出限达 0.023 ng/L ; 加标河水样、番茄和苹果样品中甲萘威的回收率为 90%~116%, 相对标准偏差为 1.3%~5.5%, 表明所开发的方法适用于检测实际样品中的目标农药。

四苯乙烯是一种由 sp^2 杂化的碳碳双键和 4 个呈螺旋桨构型排列的苯环构成的有机荧光分子, 因其具有区别于传统荧光分子的聚集诱导发射(aggregation-induced emission, AIE)特征, 在临床研究和荧光传感等领域受到广泛关注^[29-30]。当 TPE 处于低浓度时, 4 个苯环可以围绕双键碳原子自由旋转, 导致受光激发后电子跃迁行为主要表现为非辐射弛豫, 从而抑制荧光发射^[31]。在高浓度条件下,

由于自组装聚集体的形成和苯环间的 π - π 相互作用, TPE 分子中苯环分子内旋转受限, 从而增强激发态电子通过辐射弛豫的能量耗散, 进而促进强烈的荧光发射^[32]。CAI 等^[16]以 TPE 为结构母体, 合成了 pH 敏感型的荧光探针 TPE-1 用于 OPs 检测。具有 AIE 特征的 TPE-1 在纯二甲基甲酰胺溶液中几乎没有荧光, 随着溶液中 H_2O 比例的提高, 探针分子聚集并在 365 nm 紫外光激发下发出橙色荧光。AChE 催化 ATCh 水解产生的乙酸可以降低反应体系 pH, 诱导 TPE-1 分子中的叔胺基团在酸性条件下发生质子化, 引起分子间斥力增加并降低分子聚集程度, 因此荧光探针 TPE-1 可以通过对 pH 变化的荧光响应间接检测乐果, 检出限为 0.008 mg/L 。基于 AIE 原理开发的探针 TPE-1, 可以在 mmol/L 浓度下实现 pH 响应与荧光发射, 有效避免了高浓度下探针的聚集诱导猝灭现象。

小分子荧光探针在 AChE 单酶响应体系中的应用, 提高了酶抑制农药残留快速检测的检测灵敏度。但由于常规荧光团量子产率普遍不高、斯托克斯位移小、激发与发射波长偏低等问题, 需要通过结构的功能化修饰等手段以改善检测效果。此外, 检测结果容易被基质成分干扰也是限制该方法应用的重要原因之一。

1.2 基于 AChE-量子点体系的检测方法

QDs 是一类 II-VI 族和 III-V 族元素组成的零维准纳米材料, 具有独特的光致发光特性^[33]。量子点的能带结构主要包含充满电子的价带和不含电子的“空轨道”导带, 价带顶和导带底之间的宽度即为带隙。价带中的电子吸收光子能量, 可以跃迁到导带并形成自由电子, 同时在价带中留下缺少空穴。电子与空穴携带相反电荷, 进而在库仑力作用下束缚下产生名为“激子”的电子空穴对。当激子寿命结

表 1 AChE-小分子荧光探针体系在酶抑制农药残留快速检测中的应用

Table 1 Application of AChE/small fluorophore system in rapid detection of pesticide residue via AChE inhibition assay

AChE-小分子荧光探针体系	农药名称	检测范围	检出限	应用范围	参考文献
AChE/TPE 衍生物	二嗪磷	0.001~0.1 ng/mL , 0.3~5.0 ng/mL	0.23 ng/L	人血清	[15]
AChE/TPE 衍生物	乐果	0.009~22.5 mg/L	0.008 mg/L		[16]
AChE/尼罗红修饰的 AuNPs	对氧磷	0~100 ng/mL	0.05 ng/mL	/	[17]
AChE/方酸衍生物	对氧磷	0.01~100 ng/mL	5 pg/mL	/	[18]
AChE/ $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$ /TPE 衍生物	对氧磷	1~100 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	自来水, 河水	[19]
AChE/ MnO_2 /东莨菪内酯/荧光红	敌敌畏	5.0 pg/mL ~500 ng/mL	1.6 pg/mL	湖水	[20]
AChE/ Cu^{2+} /茈二酰亚胺衍生物	二嗪磷	0~6.0 mmol/L	0.22 $\mu\text{mol/L}$	/	[21]
AChE/ MnO_2 /4-氨基-3-羟基-1-萘磺酸	甲基对硫磷; 敌敌畏	0.4~40 ng/mL ; 0.5~190 ng/mL	0.18 ng/mL ; 0.24 ng/mL	湖水	[22]
AChE/聚多巴胺/茈二酰亚胺衍生物	二嗪磷	0~5 $\mu\text{mol/L}$	/	/	[23]

注: /表示文中未提及, 下同。

束后,电子和空穴对重新结合,以荧光的形式释放能量^[34-35]。由于特殊的量子约束效应,量子点的电子与空穴被严格限制在有限维度空间内,导致电子能级发生相应分裂与离散化,使 QDs 表现出激发/发射波长与尺寸相关的光学特性^[36]。此外, QDs 还具有可调谐发光、激发光谱较宽、发射光谱尖而窄、光稳定性优秀、背景荧光小、荧光寿命长等优点^[37]。表 2 总结了近年基于 AChE-量子点体系快速检测农药残留的研究进展和应用现状。HU 等^[38]将酶抑制法与微流控技术相结合,在气凝胶中包埋 AChE 与碲化镉量子点(CdTe QDs),设计了一款可视化检测 OPs 的荧光微流控阵列传感器。多孔的气凝胶在改善比表面积的同时,内部富含的谷胱甘肽为 AChE 提供了与生理环境类似的条件,最大限度减少酶变性的几率,提高了传感器稳定性。当体系中引入 ATCh 后, AChE 催化其水解形成 TCh,后者作为光激发时 CdTe QD 价带中空穴的电子供体,有效猝灭红色荧光。利用该传感器对目标农药的相似响应,实现了多种农药混合加标样品中 OPs 总量的分析。HAI 等^[39]通过对比了核型 CdTe QDs、核-壳型 CdSe/ZnS QDs 和核-壳-壳型 CdSe/ZnSe/ZnS QDs,发现通过在荧光内核周围引入外壳结构,可以降低镉基金属外溢带来的潜在毒性。向检测体系中加入 AChE 和 OPs 后,核型 CdTe QDs 在荧光强度变化的同时,还表现出了最大发射波长由 607 nm 向 618 nm 的移动。相比之下, CdSe/ZnS QDs 与 CdSe/ZnSe/ZnS QDs 仅表现出荧光强度变化。然而,大多半导体量子点中含有 Cd、Pb、Hg 等重金属元素,这些元素从量子点核心泄露后会造成一定的生物毒性与潜在的环境安全隐患^[59-60]。例如, CdTe QDs 被细胞摄取后可诱导广泛的线粒体功能障碍,激活线粒体死亡途径,最终发挥细胞毒性^[61];含有 PbSe 的纳米材料可以在模型小鼠器官内蓄积,通过扰乱细胞内环境、诱导内质网应激等方式发挥毒性作用^[62]。因此,寻找低毒或无毒的替代材料,或者引入外壳包裹结构^[63]是 QDs 合成与研究的重要发展方向。

碳点(carbon dots, CDs)是一种新型碳基材料,包括碳量子点(carbon quantum dots, CQDs)、石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQDs)、聚合物点(polymer dots, PDs)等^[64],由于其良好的生物相容性、强烈的光致发光等优点,近年来在酶抑制农药残留快速检测领域受到了广泛的研究^[65]。QIAN 等^[66]基于活性炭氧化制备的绿色荧光 CQDs,实现了 AChE 活性的荧光开启响应。由于 CQDs 表面大量的功能性羧基可以作为 Cu^{2+} 的良好配体,加入 Cu^{2+} 后引起 CQDs 的聚集与初始荧光猝灭,随后利用 AChE 酶解产物 TCh 对 Cu^{2+} 的强亲和力,诱导 CQDs 的再分散与荧光信号恢复。运用该方法,实现了 14.2~121.8 U/L 范围内 AChE 活性的精确检测与典型 AChE 抑制剂的筛选。陈羽焯^[40]以 CQDs 为荧光报告基团,建立了一种荧光与比色双信号检测甲萘威的分析方法。检测机制源于 CQDs 与

AuNPs 之间荧光内滤效应(inner filter effect, IFE)引起的荧光猝灭,由于 CQDs 荧光发射光谱与 AuNPs 吸收光谱高度重叠, AChE 活性被甲萘威抑制时 CQDs 荧光信号大多被游离的 AuNPs 猝灭,而不含农药时 AChE 将发挥催化活性,利用产物 TCh 对 AuNPs 诱导聚集作用,在改变溶液吸光度的同时显著恢复 CQDs 荧光。该双信号分析方法对甲萘威标准溶液的检出限为 0.15 $\mu\text{g/L}$ (比色法)和 0.06 $\mu\text{g/L}$ (荧光法),并在水样的加标实验中展现出可靠的分析能力。

除了直接采用无修饰量子点作为检测工具外,还可以利用表面改性、杂原子掺杂等手段调节发光特性以构建性能更优的量子点材料^[67-68]。量子点表面改性一般借助化学附着或分子间作用,将巯基琥珀酸、巯基乙酸、壳聚糖等有机分子或肽段、抗体等生物分子引入 QDs 表面,改善其水溶性、表面形貌、细胞毒性、光学特性等理化性质,进而实现 QDs 的标记与功能化^[69-72]。BUI CULESCU 等^[73]在核-壳型 CdSe/ZnS QDs 基础上,依次通过巯基乙酸功能化、聚-L-赖氨酸封端、二氧化硅薄层包覆等手段,制备了一款用于 AChE 活性检测的纳米复合材料 QD/AChE/聚-L-赖氨酸/二氧化硅。结果表明,该复合材料将 AChE 固定在荧光核心周围,有效防止酶的游离与变性。同时,在不影响 QDs 光学性能的前提下,多孔的二氧化硅外壳有效提高了复合材料在储存时的稳定性。杂原子掺杂是一种在 QDs 骨架中引入不同类型的金属或非金属元素,通过增加表面缺陷、调节电荷分布、促进激子对辐射复合等方式改善 QDs 荧光性能的方法^[74-75]。根据数量与种类的不同,目前文献报道中常见的掺杂方式包括引入 N、P、S、Cl、Zn 等单原子掺杂和 N 和 S、N 和 B、N 和 P 等在内的多原子共掺杂^[76-77]。YANG 等^[41]合成了 N、Cl-共掺杂 CDs,将量子产率提高至 15%,该碳点可在 420 nm 激发下发射 570 nm 的橙色荧光。在该检测方案中,对氧磷对 AChE 活性的抑制、AChE 对 ATCh 的催化水解、TCh 与 Ellman 试剂的反应以及产物 2-硝基-5-巯苯甲酸(5-thio-2-nitrobenzoic acid, TNB)对 N、Cl-共掺杂 CDs 的 IFE 被整合到传感过程中,以保证检测体系对 AChE 活性和对氧磷浓度的荧光响应。由于 TNB 在 420 nm 具有的特征吸收光谱,该范围与 N、Cl-共掺杂 CDs 激发光谱之间具有明显重叠,因此 TNB 可以通过 IFE 引起 CDs 荧光猝灭,而添加的对氧磷抑制 AChE 活性并相应恢复荧光。在最佳条件下,该检测体系的荧光信号与 0.017~5.0 U/L 范围内的 AChE 浓度之间表现出良好的线性关系($R^2=0.994$),进而计算该方法对 AChE 和对氧磷的检出限分别为 2 mU/L 和 30 ng/L。

作为一种新兴的纳米材料, QDs 尽管理论上在光稳定性、抗光漂白、窄激发光谱、可调谐的光致发光等方面都表现出了优异的性能,然而,在文献报道中,基于量子点的酶抑制法大多仅进行了湖水样、自来水样等简单基质的模型验证,较少涉及对常见的蔬菜、水果等植物性样品的直接分析,

表 2 AChE-量子点体系在酶抑制农药残留快速检测中的应用
Table 2 Application of AChE/quantum dots fluorescence system in rapid detection of pesticide residue via AChE inhibition assay

AChE-小分子荧光探针体系	农药名称	检测范围	检出限	应用范围	参考文献
AChE/CdTe QD	对氧磷;	$10^{-5}\sim 10^{-12}$ mol/L	1.2 pmol/L;	苹果	[38]
	对硫磷;		0.94 pmol/L;		
	敌敌畏		11.7 pmol/L		
AChE/CdSe 核壳型 QD	甲基对硫磷	0.05~8 ng/mL	0.05 ng/mL	/	[39]
AChE/AuNPs/CQDs	甲萘威	0.2~150 μ g/L	0.06 μ g/L	自来水, 湖水	[40]
AChE/DTNB/N, Cl 共掺杂 CD	对氧磷	0.3~1000 μ g/L	30 ng/L	土壤	[41]
AChE/DTNB/季铵化 CD	敌敌畏;	$5.0\times 10^{-11}\sim 1.0\times 10^{-7}$ mol/L;	1.9×10^{-11} mol/L;	/	[42]
	马拉硫磷;	$1.0\times 10^{-10}\sim 1.0\times 10^{-7}$ mol/L;	4.8×10^{-11} mol/L;		
	对氧磷	$1.0\times 10^{-11}\sim 1.0\times 10^{-8}$ mol/L	3.5×10^{-12} mol/L		
AChE/CdTe QD	对硫磷;	5~100 μ g/L;	10 μ g/L;	苹果,	[43]
	对氧磷	5~100 μ g/L	10 μ g/L	自来水	
AChE/DTNB/CD	对氧磷	0.001~1.0 mg/L	0.4 μ g/L	/	[44]
AChE/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ 核壳型分子 印迹聚合物/CQD	甲基对硫磷;	0.000033~33.33 mg/L	(0.21 $\pm$ 0.021) μ g/L;	苹果, 橘子,	[45]
	毒死蜱;		(0.44 $\pm$ 0.069) μ g/L;	梨, 胡萝卜,	
	敌百虫		(0.32 $\pm$ 0.033) μ g/L	猕猴桃, 香蕉	
AChE/AuNPs/CQD	对氧磷;	0~5.0 nmol/L;	0.05 nmol/L;	自来水, 河水, 苹果汁	[46]
	马拉硫磷;	10~500 nmol/L;	0.10 nmol/L;		
	甲胺磷;	10~500 nmol/L;	0.12 nmol/L;		
	甲萘威	10~666 nmol/L	0.13 nmol/L		
AChE/Cu ²⁺ /B, N 共掺杂 CD	水胺硫磷	$1.0\times 10^{-9}\sim 1.0\times 10^{-4}$ mol/L	3.0×10^{-10} mol/L	西兰花	[47]
AChE/AuNPs/BNQD	对氧磷	0.05~3.0 μ g/L	0.0331 μ g/L	/	[48]
AChE/邻苯二胺/SiQD	对氧磷	0.125~12.5 μ g/L	0.05 μ g/L	梨汁	[49]
AChE/AgNPs/GQD	甲基对硫磷	0.1~6 μ g/L	0.017 μ g/L	湖水, 苹果, 胡萝卜	[50]
AChE/AuNCs/CQD	二嗪磷	1~50 μ g/L	0.81 μ g/L	/	[51]
AChE/MnO ₂ /BCNO QD	对氧磷	0.1~250 μ g/L	0.03 μ g/L	自来水, 河水, 土壤	[52]
AChE/MnO ₂ /N 掺杂 CQD	毒死蜱	1~30 μ mol/L	0.01 μ mol/L	河水, 池水	[53]
AChE/CdTe QD	杀扑磷	0.1~50 μ g/L	0.027 μ g/L	大白菜叶, 大 白菜根, 土壤	[54]
AChE/氧化石墨烯/CD	毒死蜱	2.5 μ g/L~0.1 mg/L	0.14 μ g/L	/	[55]
AChE/CQD	灭多威	0.01~5 mg/kg	0.003 mg/kg	小米、大米、小 麦、大麦	[56]
AChE/DTNB/CQD	毒死蜱	0.02~0.18 mg/L	2.7 μ g/L	河水, 苹果汁	[57]
AChE/S 掺杂 CQD	马拉硫磷	5~300 μ g/L	0.170 μ g/L;	/	[58]
	毒死蜱		1.50 μ g/L		

注: DTNB 表示 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid)]。

主要可能是(类)纳米材料结构和性质本身极易受检测微环境干扰所致。因此, QDs 在实际应用中仍面临着诸多挑战和困难, 需要进一步研究以提高其对复杂基质样品的检测能力。

2 基于多酶级联反应的检测方法

多酶级联体系中, 前一步酶促反应的产物可被后续酶识别形成串联反应, 通过在同一反应体系中顺序引入不同的酶试剂, 使原料分子经连续的酶促反应后生成可供收集与检测的终产物, 因此该方法具有转化效率高、选择性好、可信号放大等特点^[78]。同时相较于分步反应, 无需分

离中间体和副产物的特点也为多酶级联反应带来了经济、环境友好等优势, 使其在电化学生物传感器、有机合成、生物制药等领域得到了广泛的关注^[79-80]。

如图 1 所示, 在基于酶抑制的农药残留荧光检测中, 多酶体系以 AChE 和胆碱氧化酶(choline oxidase, ChOx)的双酶级联为主^[81]: AChE 催化乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)形成乙酸与胆碱, 后者作为 ChOx 的底物再次被特异性识别, 进一步被分解成甜菜碱和 H₂O₂^[82]。通过对 H₂O₂ 的量化分析可实现对体系中 AChE 活性的检测, 进而实现对样品中农药残留的定性或定量分析。

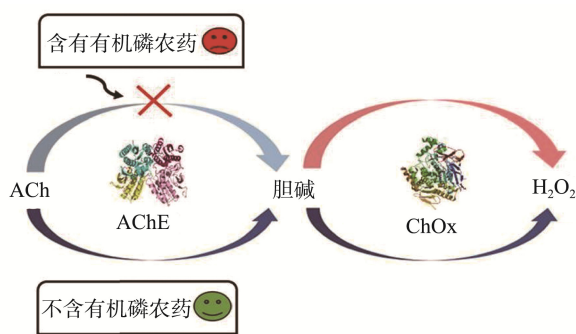


图 1 双酶级联反应的化学机制

Fig.1 Chemical mechanism of double-enzyme-cascade reaction

双酶级联反应体系中产生的 H_2O_2 可以高效猝灭 QDs 荧光。虽然 H_2O_2 与 QDs 的相互作用与导致荧光猝灭的机制仍存在争议,但通常认为这与光诱导电子转移和量子点/配体层的修饰有关^[83]。LI 等^[84]基于这一原理,制备了 N、S 共掺杂 CQDs 用于监测 AChE/ChOx 级联反应产物 H_2O_2 与分析痕量水平的甲萘威。通过杂原子掺杂改变 GQDs 表面结构,实现了检出限低至 5.4×10^{-6} mg/L 的灵敏响应,线性范围为 $6.3 \times 10^{-6} \sim 6.3 \times 10^{-1}$ mg/L。结果表明,高灵敏响应源于 N、S 共掺杂提供了对 H_2O_2 的强吸附能力及捕获光生电子的局域态,进而利于级联反应产物 H_2O_2 与 GQDs 之间的电子转移。SAHUB 等^[85]根据 GQDs 表面羧基易于产生氢键和静电相互作用的特点,制备表面涂覆活性蛋白的 GQDs/AChE/ChOx,并基于此提出了一种检测 OPs 农药的方案。酶促反应产物 H_2O_2 诱导量子点表面电荷转移,关断 GQDs 在 467 nm 处的荧光发射,实现了荧光“开-关”响应。当 OPs 被引入体系并抑制 AChE 后, H_2O_2 生成量下降, GQDs/AChE/ChOx 相应地表现出荧光强度显著恢复。该传感器对 0.1~10 mg/L 浓度范围的敌敌畏具有线性响应,检出限为 0.172 mg/L。结果表明,该传感器可以耐受 Hg^{2+} 以外的大多数金属离子,有望以低成本快速分析水、食品等实际样品。在双酶级联体系的基础上, HUANG 等^[86]引入辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)构建了检测敌敌畏和甲基对硫磷的 AChE/ChOx/HRP 三酶响应体系。在 HRP 催化下, H_2O_2 与邻苯二胺反应生成 2,3-二氨基吩嗪。利用后者吸收光谱与氮掺杂碳点发射光谱之间的光谱重叠,建立了依赖于 IFE 的双发射比率荧光检测方案。将其应用于敌敌畏和甲基对硫磷检测中,检出限分别为 2.14 μ g/L 和 47 μ g/L。实验结果进一步证实, AChE/ChOx/HRP 三酶响应体系对水、生菜等样品基质中敌敌畏和甲基对硫磷的分析效果良好,检测结果与气相色谱-质谱法一致。虽然多酶级联体系具有高选择性和信号放大的优势,但多种酶之间最适条件的不同使检测系统面临 pH、温度等条件的严格限制。目前文献中报道的多酶体系以 AChE/ChOx 组合及 H_2O_2 响应为主,化学性质活跃的 H_2O_2 容易受到外部环境

干扰,样品基质中的抗氧化成分也是影响结果准确性的潜在因素。

3 基于生物酶靶向小分子荧光探针的检测方法

小分子荧光探针是一种将分子水平的特定化学刺激转化为荧光信号的有机化合物,其与目标酶结合并发生特异性催化后,能够导致荧光光谱或量子产率明显变化,通过监测荧光信号强度可以实现高信噪比和高灵敏度的分析^[87-88]。从结构组成与作用功能角度分析,小分子荧光探针一般由识别基团、荧光基团和桥联基团 3 部分组成(图 2)^[89-90]。其中,识别基团是决定荧光探针特异性和亲和力的关键部位,往往需要基于检测目标活性位点的空间结构设计而获得,此外,还可以在识别基团附近引入不同取代基或电荷增加荧光探针对于细胞器或生物组织的特异性。荧光基团一般由含有共轭 π 键的刚性平面组成,可以在特定的激发光作用下产生荧光发射,此外荧光基团还与激发和发射波长、光稳定性、量子产率、抗光漂白能力等光学性质有关^[91]。桥联基团是用于连接荧光基团与识别基团的支架结构,部分探针中通过引入自焚支架以分隔荧光基团与识别基团,防止较大的空间位阻干扰识别基团与酶活性口袋的特异性结合,进而提高催化效果^[92]。



图 2 荧光探针的一般结构

Fig.2 General structure of fluorescent probes

小分子荧光探针的使用,实现了细胞水平生物酶活性可视化和动态生物过程监测,显著提高了细胞、组织甚至动物活体中生物酶活性分析和监测的灵敏度^[93-94]。目前,小分子荧光探针主要应用于组织成像、疾病诊断、生命医学等领域^[95-97]。本小节主要对近期用于农药残留快速检测的 AChE 靶向小分子荧光探针的研究进展进行介绍,主要关注探针的结构设计、检测性能等方面内容。

由于 AChE 在毒物检测、医疗健康、药物开发等领域的重要作用,尤其可以利用对 AChE 的活性抑制实现目标化合物的量化评估,因此研究者们已经开发了多种用于生物成像与活性分析的 AChE 靶向荧光探针(表 3)。WU 等^[98]在深入研究 AChE 及常见干扰酶对底物识别的特点下,选择 N,N-二甲基氨基甲酸酯结构作为特异响应基团,构建了一种高选择性靶向 AChE 的荧光探针。通过在响应基团邻位引入甲基化铵基,荧光探针 P10 表现出对 AChE 的高选择性 with 高灵敏度,其催化水解不受丁酰胆碱酯酶和羧酸酯酶(carboxylesterase, CES)的干扰,其与 AChE 反应后触发自焚支架的 1,6-重排消除,从而释放苝灵荧光团。P10

在人原代胶质母细胞瘤的模型细胞实验中表现出良好的细胞通透性, 将其应用于小鼠离体器官还实现了不同大脑皮层间 AChE 表达量差异的可视化标记。YAO 等^[99]使用相同的识别策略, 基于靶向探针 BDFA 建立了用于血液样本 AChE 活性的分析方法, 可有效区分 OPs 和 CMs 引入前后不同 AChE 活性的血液, 且分析结果与 Ellman 法结果相一致。该探针合成简单、无需复杂的纯化步骤, 对 AChE 的检测范围和检出限分别为 0.0045~1.0 U/mL 和 4.5 mU/mL。GUO 等^[11]认为单一酶靶向的农药残留检测方法容易受到靶标结构多样性的限制。为了解决这一问题, 他们创新性地通过分子模拟技术确定了丝氨酸水解酶识别空腔的重叠

区域, 并据此开发了一款多酶靶向荧光探针 3CP 用于农药残留的原位实时分析。3CP 可以同时 对 6 种酶产生响应, 包括 AChE、CES1、CES2、丁酰胆碱酯酶、糜蛋白酶和猪肝酯酶, 探针分子中的丙酸酯基团被水解后释放出具有 AIE 发光特性的荧光团, 导致 510 nm 处显著的荧光增强。在最适条件下, 基于 3CP 的响应体系可检测到 1.14 pg/L 的敌敌畏和 0.24 μg/L 的甲萘威, 并在生菜样品加标实验中具有满意的回收率。同时, 作者基于农药对电压和配体门控离子通道的抑制原理, 利用 3CP 首次实现了拟除虫菊酯类农药的快速检测, 该研究为多酶响应探针构建与菊酯类农药农药残留检测领域开辟了新的思路。

表 3 已发表的 AChE 靶向小分子荧光探针及其应用
Table 3 Overview of published AChE-targeted fluorescent probes and their applications

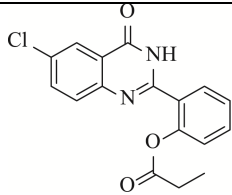
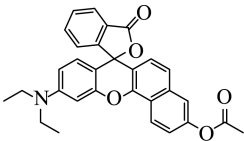
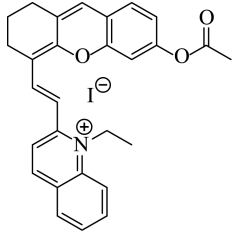
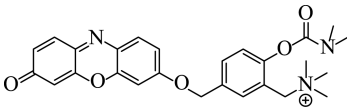
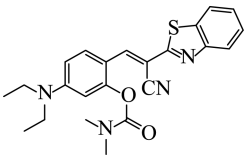
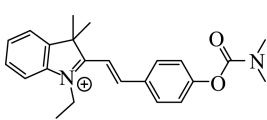
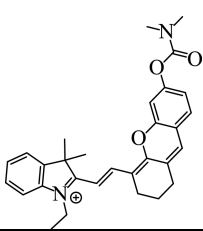
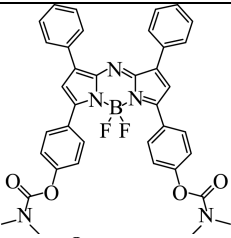
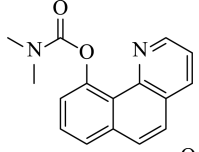
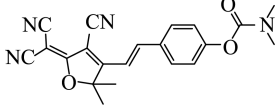
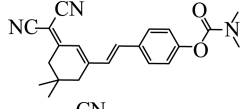
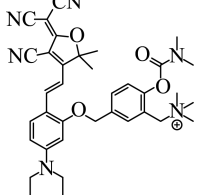
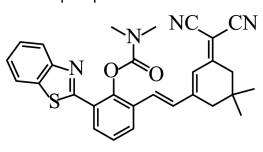
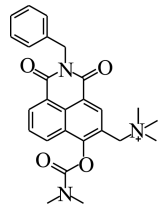
探针结构	检测 AChE 活性的检出限	K_m	应用领域	农药名称	检出限	参考文献
	11.48 μg/mL	51 μmol/L	细胞成像; 斑马鱼成像; 农药分析(生菜)	敌敌畏; 甲萘威	5.61 μg/L; 3.46 μg/L	[11]
	0.32 μg/mL	6.40 μmol/L	农药分析(青椒、 樱桃番茄)	甲胺磷; 敌敌畏; 克百威; 灭多威	30 μg/L; 0.2 μg/L; 20 μg/L; 50 μg/L	[12]
	0.00147 U/mL	4.28 μmol/L	农药分析(甜菜、 生菜、胡萝卜)	敌敌畏; 克百威; 毒死蜱; 甲胺磷	0.0186 μg/L; 2.20 μg/L; 12.3 μg/L; 13.6 μg/L	[13]
	0.017 U/mL	4.87 μmol/L	细胞成像; 小鼠成像; 组织成像	/	/	[98]
	0.0045 U/mL	/	血液中 AChE 活性检测	/	/	[99]
	0.36 U/mL	141 μmol/L	细胞成像; 小鼠成像	/	/	[100]
	0.1173 U/mL	25.36 μmol/L	细胞成像; 斑马鱼成像	/	/	[101]

表 3(续)

探针结构	检测 AChE 活性的 检出限	K_m	应用领域	农药名称	检出限	参考文献
	0.21 U/mL	85 $\mu\text{mol/L}$	细胞成像; 小鼠成像	/	/	[102]
	0.2 U/mL	/	细胞成像; 血液分析	/	/	[103]
	0.17 U/mL	/	细胞成像; 斑马鱼成像	/	/	[104]
	0.127 U/mL	/	细胞成像; 组织成像; 斑马鱼成像	/	/	[105]
	0.009355 U/mL	/	细胞成像; 小鼠成像; 组织成像	/	/	[106]
	0.13 U/mL	20.26 $\mu\text{mol/L}$	细胞成像; 斑马鱼成像	/	/	[107]
	0.1 U/mL	69 $\mu\text{mol/L}$	细胞成像	/	/	[108]

注: K_m 为米氏常数。

在酶抑制荧光检测中引入生物酶靶向小分子荧光探针,实现了 AChE 活性的直接荧光响应,有效避免前述响应方式中环境因素干扰荧光材料对酶解产物的识别过程,提高了检测的准确性和可靠性。然而,部分实际样品基质成分的存在可能降低生物酶靶向小分子荧光探针的稳定性,导致探针提前水解并引起相应荧光信号的变化,产生假阴性检测结果。因此在推进酶抑制荧光检测方法的实际应用中,需通过结构修饰或降低干扰位点等方法降低基质成分对检测结果的影响。

4 结束语

基于 AChE 活性抑制的农药残留快速检测方法,是保

证农产品质量安全的重要筛查手段。荧光检测方法的引入,是解决常规酶抑制法灵敏度缺陷的可靠途径。现有文献大多依赖有机荧光团或纳米材料响应 AChE 酶解产物的方式产生信号,额外引入的生物酶和化学材料削弱体系的稳定性和抗干扰能力。生物酶靶向荧光探针为酶抑制荧光检测发展提供了新思路,可大幅提升其检测性能。虽然已经有文献报道了部分关于酶抑制荧光检测在农药残留分析中的方法设计和研究进展,但仍有一些问题阻碍其进一步的商品化应用。

目前,农药残留的酶抑制荧光检测只能在自来水等相对简单的样品基质中实现目标物的准确分析,基质成分不仅影响酶活性,还通过影响荧光信号分子的稳定性产生

干扰, 因此需要优化信号发生系统, 降低样品基质成分对荧光信号分子或信号产生过程的影响, 提高检测方法的可靠性。酶抑制法可以同时对于有机磷、氨基甲酸酯类农药产生响应, 满足广泛的农药筛查需求同时, 但面临着目标物分辨能力不足的缺点, 将其与分子逻辑门、智能算法、机器学习等技术深度融合, 在保证酶抑制法高通量检测能力的同时, 提高对不同农药的智能化分辨水平。现有文献报道的方法大多依托实验室展开, 通过开发自动化一体式分析设备, 能够提高酶抑制法检测效率、降低实验人员之间的操作误差。发展绿色化学是大势所趋, 目前的酶抑制法对检测样品仍具有 μL 或 mL 级的体积要求, 在方法设计中引入微流控芯片为主的多功能检测平台, 可以降低检测成本和操作难度, 减少对化学试剂和样品量的使用需求, 进一步挖掘酶抑制法的检测性能和应用潜力, 为农产品质量安全提供技术支撑。

参考文献

- [1] KAUR S, CHOWDHARY S, KUMAR D, *et al.* Organophosphorus and carbamate pesticides: Molecular toxicology and laboratory testing [J]. *Clin Chim Acta*, 2023, 551: 117584.
- [2] TSAI YH, LEIN PJ. Mechanisms of organophosphate neurotoxicity [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2021, 26: 49–60.
- [3] PUNDIR CS, CHAUHAN N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review [J]. *Anal Biochem*, 2012, 429(1): 19–31.
- [4] DONG JJ, YANG HT, LI Y, *et al.* Fluorescence sensor for organophosphorus pesticide detection based on the alkaline phosphatase-triggered reaction [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1131: 102–108.
- [5] ZHOU YF, HUANG XL, XIONG SC, *et al.* Dual-mode fluorescent and colorimetric immunoassay for the ultrasensitive detection of alpha-fetoprotein in serum samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1038: 112–119.
- [6] LI HQ, WEI ZN, ZUO XW, *et al.* Carbon dots for real-time colorimetric/fluorescent dual-mode sensing CIO⁻/GSH [J]. *Dyes Pigm*, 2022, 206: 110614.
- [7] SUN YH, ZHANG Y, WANG ZP. A “turn-on” FRET aptasensor based on the metal-organic framework-derived porous carbon and silver nanoclusters for zearalenone determination [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2021, 347: 130661.
- [8] 陈珏, 李佳琮, 刘翠玲, 等. 荧光光谱技术结合机器学习算法检测大白菜中吡虫啉含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(13): 134–140.
CHEN J, LI JC, LIU CL, *et al.* Determination of imidacloprid in cabbage by fluorescence spectroscopy combined with machine learning algorithms [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(13): 134–140.
- [9] LU XL, HE W. Research advances in excited state intramolecular proton transfer fluorescent probes based on combined fluorescence mechanism [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(2): 184–196.
- [10] LUO HQ, GAO S. Recent advances in fluorescence imaging-guided photothermal therapy and photodynamic therapy for cancer: From near-infrared-I to near-infrared-II [J]. *J Control Release*, 2023, 362: 425–445.
- [11] GUO WYZ, FU YX, LIU SY, *et al.* Multienzyme-targeted fluorescent probe as a biosensing platform for broad detection of pesticide residues [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(18): 7079–7085.
- [12] HE SG, ZHANG SF, ZHAO X, *et al.* Highly selective NIR fluorescent probe for acetylcholinesterase and its application in pesticide residues detection [J]. *Chin Chem Lett*, 2022, 33(9): 4233–4237.
- [13] WU ZH, HAO ZX, CHAI YF, *et al.* Near-infrared-excitable acetylcholinesterase-activated fluorescent probe for sensitive and anti-interference detection of pesticides in colored food [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 233: 115341.
- [14] FINNEY NS. Combinatorial discovery of fluorophores and fluorescent probes [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(3): 238–245.
- [15] CHANG JF, LI HY, HOU T, *et al.* Paper-based fluorescent sensor for rapid naked-eye detection of acetylcholinesterase activity and organophosphorus pesticides with high sensitivity and selectivity [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 971–977.
- [16] CAI Y, FANG JK, WANG BF, *et al.* A signal-on detection of organophosphorus pesticides by fluorescent probe based on aggregation-induced emission [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2019, 292: 156–163.
- [17] HAN WT, LIAO SZ, ZHANG CH, *et al.* Highly sensitive fluorometric assay method for acetylcholinesterase inhibitor based on Nile Red-adsorbed gold nanoparticles [J]. *Chin J Chem*, 2013, 31(8): 1072–1078.
- [18] LIAO SZ, HAN WT, DING HZ, *et al.* Modulated dye retention for the signal-on fluorometric determination of acetylcholinesterase inhibitor [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(10): 4968–4973.
- [19] WU XL, WANG PS, HOU SY, *et al.* Fluorescence sensor for facile and visual detection of organophosphorus pesticides using AIE fluorogens-SiO₂-MnO₂ sandwich nanocomposites [J]. *Talanta*, 2019, 198: 8–14.
- [20] YAO TT, LIU AR, LIU Y, *et al.* Ratiometric fluorescence sensor for organophosphorus pesticide detection based on opposite responses of two fluorescence reagents to MnO₂ nanosheets [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 145: 111705.
- [21] CHEN YY, LIU WX, ZHANG BB, *et al.* Sensitive and reversible perylene derivative-based fluorescent probe for acetylcholinesterase activity monitoring and its inhibitor [J]. *Anal Biochem*, 2020, 607: 113835.
- [22] LIU BC, PENG ZJ, WU SH, *et al.* A sensitive fluorescent assay for the determination of parathion-methyl using AHNSA probe with MnO₂ nanosheets [J]. *Spectrochim Acta A*, 2021, 247: 119146.
- [23] CHEN YY, LIU WX, ZHANG BB, *et al.* A new strategy using a fluorescent probe combined with polydopamine for detecting the activity of acetylcholinesterase [J]. *Aust J Chem*, 2021, 74(8): 307–612.
- [24] LV J, HE BN, WANG N, *et al.* A gold nanoparticle based colorimetric and fluorescent dual-channel probe for acetylcholinesterase detection and inhibitor screening [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(57): 32893–32898.
- [25] ZHANG YD, HEI TT, CAI YA, *et al.* Affinity binding-guided fluorescent nanobiosensor for acetylcholinesterase inhibitors via distance modulation between the fluorophore and metallic nanoparticle [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(6): 2830–2836.
- [26] 宋府璐. 新型羧酰胺类衍生物和罗丹明 B 类小分子荧光探针的合成及荧光性能研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2021.
SONG FL. Synthesis and fluorescence properties study of novel naphthylimide derivatives and rhodamine B-based small molecular fluorescent probes [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2021.
- [27] LIU DB, CHEN WW, WEI JH, *et al.* A highly sensitive, dual-readout

- assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(9): 4185–4191.
- [28] LUO QJ, LI YX, ZHANG MQ, *et al.* A highly sensitive, dual-signal assay based on rhodamine B covered silver nanoparticles for carbamate pesticides [J]. *Chin Chem Lett*, 2017, 28(2): 345–349.
- [29] CHEN YT, ZHANG XY, WANG MZ, *et al.* Mechano-fluorochromism, polymorphism and thermochromism of novel D- π -A piperidin-1-yl-substituted isoquinoline derivatives [J]. *J Mater Chem C*, 2019, 7(40): 12580–12587.
- [30] CHEN Y. Recent advances in AIEgens for three-photon fluorescence bioimaging [J]. *Mater Today Chem*, 2022, 25: 100975.
- [31] KUMAR KSS, GIRISH YR, ASHRAFIZADEH M, *et al.* AIE-featured tetraphenylethylene nanoarchitectures in biomedical application: Bioimaging, drug delivery and disease treatment [J]. *Coordin Chem Rev*, 2021, 447: 214135.
- [32] MALEGAONKAR JN, AL KOBALSI M, SINGH PK, *et al.* Sensitive turn-off detection of nitroaromatics using fluorescent tetraphenylethylene phosphonate derivative [J]. *J Photoch Photobio A*, 2023, 438: 114530.
- [33] SUN P, XING Z, LI Z, *et al.* Recent advances in quantum dots photocatalysts [J]. *Chem Eng J*, 2023, 458: 141399.
- [34] TIAN XT, YIN XB. Carbon dots, unconventional preparation strategies, and applications beyond photoluminescence [J]. *Small*, 2019, 15(48): 1901803.
- [35] GHIMIRE S, BIJU V. Relations of exciton dynamics in quantum dots to photoluminescence, lasing, and energy harvesting [J]. *J Photoch Photobio C*, 2018, 34: 137–151.
- [36] ZHU SJ, SONG YB, WANG J, *et al.* Photoluminescence mechanism in graphene quantum dots: Quantum confinement effect and surface/edge state [J]. *Nano Today*, 2017, 13: 10–14.
- [37] 王琼, 张伊, 唐浩, 等. 量子点在光电化学传感器中的研究进展[J]. *材料导报*, 2022, 36(18): 20–27.
- WANG Q, ZHANG Y, TANG H, *et al.* Recent progress of quantum dots in photoelectrochemical sensors [J]. *Mater Rep*, 2022, 36(18): 20–27.
- [38] HU T, XU J, YE Y, *et al.* Visual detection of mixed organophosphorous pesticide using QD-AChE aerogel based microfluidic arrays sensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 136: 112–117.
- [39] HAI NN, CHINH VD, THUY UTD, *et al.* Detection of the pesticide by functionalized quantum dots as fluorescence-based biosensor [J]. *Int J Nanotechnol*, 2013, 10: 137–145.
- [40] 陈羽焯. 碳量子点荧光探针的制备及其应用[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- CHEN YH. Preparation and application of carbon quantum dot fluorescent probe [D]. Nanning: Guangxi University, 2020.
- [41] YANG ML, LIU MW, WU ZP, *et al.* Carbon dots co-doped with nitrogen and chlorine for “off-on” fluorometric determination of the activity of acetylcholinesterase and for quantification of organophosphate pesticides [J]. *Microchim Acta*, 2019, 186(8): 585.
- [42] HOU JY, TIAN ZB, XIE HZ, *et al.* A fluorescence resonance energy transfer sensor based on quaternized carbon dots and Ellman’s test for ultrasensitive detection of dichlorvos [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2016, 232: 477–483.
- [43] LUAN EX, ZHENG ZZ, LI XY, *et al.* Inkjet-assisted layer-by-layer printing of quantum dot/enzyme microarrays for highly sensitive detection of organophosphorous pesticides [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 916: 77–83.
- [44] LI HX, YAN X, LU GY, *et al.* Carbon dot-based bioplatfor for dual colorimetric and fluorometric sensing of organophosphate pesticides [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, 260: 569–570.
- [45] JIANG MD, HE JB, GONG JJ, *et al.* Development of a quantum dot-labelled biomimetic fluorescence immunoassay for the simultaneous determination of three organophosphorus pesticide residues in agricultural products [J]. *Food Agric Immunol*, 2019, 30: 248–261.
- [46] RESHM A, GUPTA B, SHARMA R, *et al.* Facile and visual detection of acetylcholinesterase inhibitors by carbon quantum dots [J]. *New J Chem* 2019, 43(25): 9924–9933.
- [47] HU YF, CHEN ZM, LAI FY, *et al.* Biomass-codoped carbon dots: Efficient fluorescent probes for isocarbophos ultrasensitive detection and for living cells dual-color imaging [J]. *J Mater Sci*, 2019, 54: 8627–8639.
- [48] ZHAN YJ, YANG J, GUO LH, *et al.* Targets regulated formation of boron nitride quantum dots-gold nanoparticles nanocomposites for ultrasensitive detection of acetylcholinesterase activity and its inhibitors [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2019, 279: 61–68.
- [49] JIN R, KONG DS, YAN X, *et al.* Integrating target-responsive hydrogels with smartphone for on-site ppb-level quantitation of organophosphate pesticides [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2019, 11(31): 27605–27614.
- [50] LI Y, CHEN SJ, LIN DQ, *et al.* A dual-mode nanoprobe for the determination of parathion methyl based on graphene quantum dots modified silver nanoparticles [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412: 5583–5591.
- [51] SUO ZG, LIU XW, HOU XL, *et al.* Ratiometric assays for acetylcholinesterase activity and organo-phosphorous pesticide based on superior carbon quantum dots and BLGF-protected gold nanoclusters FRET process [J]. *Chemistryselect*, 2020, 5(29): 9254–9260.
- [52] LIU F, LEI TT, ZHANG YL, *et al.* A BCNO QDs-MnO₂ nanosheets based fluorescence “off-on-off” and colorimetric sensor with smartphone detector for the detection of organophosphorus pesticides [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1184: 339026.
- [53] DEWANGAN L, KORRAM J, KARBHAL I, *et al.* N-doped carbon quantum dot-MnO₂ nanowire FRET pairs: Detection of cholesterol, glutathione, acetylcholinesterase, and chlorpyrifos [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2021, 4(12): 13612–13624.
- [54] YANG QT, LI Q, LI HY, *et al.* pH-response quantum dots with orange-red emission for monitoring the residue, distribution, and variation of an organophosphorus pesticide in an agricultural crop [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(9): 2689–2696.
- [55] GAVIRIA MI, BARRIENTOS K, ARANGO JP, *et al.* Highly sensitive fluorescent biosensor based on acetylcholinesterase and carbon dots-graphene oxide quenching test for analytical and commercial organophosphate pesticide detection [J]. *Front Env Sci*, 2022, 14: 825112.
- [56] GUO Y, WANG HH, CHEN ZJ, *et al.* Determination of methomyl in grain using deep eutectic solvent-based extraction combined with fluorescence-based enzyme inhibition assays [J]. *Spectrochim Acta A*, 2022, 266: 120412.
- [57] CHANDRA S, BANO D, SAHOO K, *et al.* Synthesis of fluorescent carbon quantum dots from *Jatropha* fruits and their application in fluorometric sensor for the detection of chlorpyrifos [J]. *Microchem J*, 2022, 172: 106953.

- [58] MAHMOUDI N, FATEMI F, RAHMANDOUST M, *et al.* Development of a carbon quantum dot-based sensor for the detection of acetylcholinesterase and the organophosphate pesticide [J]. *Heliyon*, 2023, 9(9): e19551.
- [59] MANSUR AAP, MANSUR HS, CARVALHO SM, *et al.* Surface biofunctionalized CdS and ZnS quantum dot nanoconjugates for nanomedicine and oncology: To be or not to be nanotoxic? [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 4669–4690.
- [60] ZHANG YJ, LIU B, LIU ZM, *et al.* Research progress in the synthesis and biological application of quantum dots [J]. *New J Chem*, 2022, 46(43): 20515–20539.
- [61] YAN M, ZHANG Y, XU K, *et al.* An *in vitro* study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots [J]. *Toxicology*, 2011, 282(3): 94–103.
- [62] ZHAI WL, WEI DZ, CAO MS, *et al.* Biosensors based on core-shell nanoparticles for detecting mycotoxins in food: A review [J]. *Food Chem*, 2023, 429: 136944.
- [63] ZHOU QX, YUE ZK, LI QZ, *et al.* Exposure to PbSe nanoparticles and male reproductive damage in a rat model [J]. *Environ Sci Technol*, 2019, 53(22): 13408–13416.
- [64] YU ZH, LI F, XIANG QJ. Carbon dots-based nanocomposites for heterogeneous photocatalysis [J]. *J Mater Sci Technol*, 2024, 175: 244–257.
- [65] LI XC, ZHAO SJ, LI BL, *et al.* Advances and perspectives in carbon dot-based fluorescent probes: Mechanism, and application [J]. *Coord Chem Rev*, 2021, 431: 213686.
- [66] QIAN ZS, CHAI LJ, TANG C, *et al.* A fluorometric assay for acetylcholinesterase activity and inhibitor screening with carbon quantum dots [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2016, 222: 879–886.
- [67] BILAN R, FLEURY F, NABIEY I, *et al.* Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging [J]. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26(4): 609–624.
- [68] DHAS N, PASTAGIA M, SHARMA A, *et al.* Organic quantum dots: An ultrasmall nanoplatfor for cancer theranostics [J]. *J Control Release*, 2022, 348: 798–824.
- [69] CHEN ST, ZHANG XL, ZHANG QH, *et al.* CdSe quantum dots decorated by mercaptosuccinic acid as fluorescence probe for Cu²⁺ [J]. *J Lumin*, 2011, 131(5): 947–951.
- [70] ZVYAGIN AI, CHEVYCHELOVA TA, CHIRKOV KS, *et al.* Size dependence of nonlinear optical properties of PbS QDs, passivated with thioglycolic acid [J]. *Optik*, 2023, 272: 170276.
- [71] HAIDER M, CAGLIANI R, JAGAL J, *et al.* Peptide-functionalized graphene oxide quantum dots as colorectal cancer theranostics [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2023, 630: 698–713.
- [72] NAMBOOTHIRI PK, GOVINDAN S, RAJITHA KV, *et al.* Dengue NS1 antigen detection using photoluminescence of solution phase biotinylated anti-NS1 antibody conjugated ZnO quantum dots [J]. *Mater Chem Phys*, 2022, 279: 125778.
- [73] BUICULESCU R, HATZIMARINAKI M, CHANIOTAKIS NA, *et al.* Biosilicated CdSe/ZnS quantum dots as photoluminescent transducers for acetylcholinesterase-based biosensors [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398: 3015–3021.
- [74] GAO X, TANG GC, SU XG. Optical detection of organophosphorus compounds based on Mn-doped ZnSe d-dot enzymatic catalytic sensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 36(1): 75–80.
- [75] ZHENG YF, CHEN KM, JIANG KP, *et al.* Progress of synthetic strategies and properties of heteroatoms-doped (N, P, S, O) carbon materials for supercapacitors [J]. *J Energy Storage*, 2022, 56: 105995.
- [76] ANSARI L, HALLAJ S, HALLAJ T, *et al.* Doped-carbon dots: Recent advances in their biosensing, bioimaging and therapy applications [J]. *Colloid Surf B*, 2021, 203: 111743.
- [77] XU Q, KUANG TR, LIU Y, *et al.* Heteroatom-doped carbon dots: Synthesis, characterization, properties, photoluminescence mechanism and biological applications [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(45): 7204–7219.
- [78] 刘博凯. 水解酶催化多功能性与串联反应及其调控研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- LIU BK. Study on the catalytic promiscuity, tandem reaction and modulation of hydrolase [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009.
- [79] CASTILLO J, GÁSPÁR S, SAKHAROV I, *et al.* Bienzyme biosensors for glucose, ethanol and putrescine built on oxidase and sweet potato peroxidase [J]. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18(5–6): 705–714.
- [80] KUCHERENKO IS, SOLDATKIN OO, DZYADEVYCH SV, *et al.* Electrochemical biosensors based on multienzyme systems: Main groups, advantages and limitations-A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1111: 114–131.
- [81] YANG HY, SUN ZP, QIN XG, *et al.* Ultrasmall Au nanoparticles modified 2D metalloporphyrinic metal-organic framework nanosheets with high peroxidase-like activity for colorimetric detection of organophosphorus pesticides [J]. *Food Chem*, 2022, 376: 131906.
- [82] HOU SH, OU ZM, CHEN Q, *et al.* Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol-gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 33(1): 44–49.
- [83] MENG XW, WEI JF, REN XL, *et al.* A simple and sensitive fluorescence biosensor for detection of organophosphorus pesticides using H₂O₂-sensitive quantum dots/bi-enzyme [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 47: 402–407.
- [84] LI HT, SUN CH, VIJAYARAGHAVAN R, *et al.* Long lifetime photoluminescence in N, S co-doped carbon quantum dots from an ionic liquid and their applications in ultrasensitive detection of pesticides [J]. *Carbon*, 2016, 104: 33–39.
- [85] SAHUB C, TUNTULANI T, NHUJAK T, *et al.* Effective biosensor based on graphene quantum dots via enzymatic reaction for directly photoluminescence detection of organophosphate pesticide [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, 258: 88–97.
- [86] HUANG S, YAO JD, CHU X, *et al.* One-step facile synthesis of nitrogen-doped carbon dots: A ratiometric fluorescent probe for evaluation of acetylcholinesterase activity and detection of organophosphorus pesticides in tap water and food [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(40): 11244–11255.
- [87] FAN YF, WU Y, HOU J, *et al.* Coumarin-based near-infrared fluorogenic probes: Recent advances, challenges and future perspectives [J]. *Coord Chem Rev*, 2023, 480: 215020.
- [88] ZHAO JT, MA T, CHANG BB, *et al.* Recent progress on NIR fluorescent probes for enzymes [J]. *Molecules*, 2022, 27(18): 5922.
- [89] CHEN Y. Recent progress in natural product-based inhibitor screening with enzymatic fluorescent probes [J]. *Anal Method*, 2021, 13(15): 1778–1787.
- [90] NING J, LIU T, DONG PP, *et al.* Molecular design strategy to construct

- the near-infrared fluorescent probe for selectively sensing human cytochrome P450 2J2 [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(2): 1126–1134.
- [91] 王娅娅. 基于氧杂蒽化合物设计双修饰荧光骨架及其生物成像应用[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- WANG YY. Design of dual-modified fluorescent skeletons based on xanthene compound and bioimaging [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.
- [92] WU XF, SHI W, LI XH, *et al.* Recognition moieties of small molecular fluorescent probes for bioimaging of enzymes [J]. *ACC Chem Res*, 2019, 52(7): 1892–1904.
- [93] YAO YK, ZHANG YT, YAN CX, *et al.* Enzyme-activatable fluorescent probes for beta-galactosidase: From design to biological applications [J]. *Chem Sci*, 2021, 12(29): 9885–9894.
- [94] LI ZR, LIN H, WANG L, *et al.* Optical sensing techniques for rapid detection of agrochemicals: Strategies, challenges, and perspectives [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 838: 156515.
- [95] LIU HW, CHEN LL, XU CY, *et al.* Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging [J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(18): 7140–7180.
- [96] WANG WX, JIANG WL, GUO H, *et al.* Real-time imaging of alkaline phosphatase activity of diabetes in mice via a near-infrared fluorescent probe [J]. *Chem Commun*, 2021, 57(4): 480–483.
- [97] SHEN S, XU W, LU J, *et al.* Recent progress on fluorescent probes for viruses [J]. *Chin Chem Lett*, 2023, 35(1): 108360.
- [98] WU XF, AN JM, SHANG J, *et al.* A molecular approach to rationally constructing specific fluorogenic substrates for the detection of acetylcholinesterase activity in live cells, mice brains and tissues [J]. *Chem Sci*, 2020, 11(41): 11285–11292.
- [99] YAO M, NIE HL, YAO WX, *et al.* A sensitive and selective fluorescent probe for acetylcholinesterase: Synthesis, performance, mechanism and application [J]. *Arab J Chem*, 2022, 15(7): 103929.
- [100] WANG X, LI P, DING Q, *et al.* Observation of acetylcholinesterase in stress-induced depression phenotypes by two-photon fluorescence imaging in the mouse brain [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(5): 2061–2068.
- [101] MA J, SI T, YAN C, *et al.* Near-infrared fluorescence probe for evaluating acetylcholinesterase activity in PC12 cells and in situ tracing AChE distribution in zebrafish [J]. *ACS Sens*, 2020, 5(1): 83–92.
- [102] HE N, YU L, XU MH, *et al.* Near-infrared fluorescent probe for evaluating the acetylcholinesterase effect in the aging process and dietary restriction via fluorescence imaging [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(11): 2623–2630.
- [103] MENG WQ, PEI ZP, WANG YR, *et al.* Two birds with one stone: The detection of nerve agents and AChE activity with an ICT-ESIPT-based fluorescence sensor [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 410: 124811.
- [104] FORTIBUI MM, JANG M, LEE S, *et al.* Near-infrared fluorescence probe for specific detection of acetylcholinesterase and imaging in live cells and zebrafish [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, 5(5): 2232–2239.
- [105] MA YY, GAO WJ, MA SH, *et al.* Observation of the elevation of cholinesterase activity in brain glioma by a near-infrared emission chemsensor [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(19): 13405–13410.
- [106] XIANG CB, DIRAK M, LUO Y, *et al.* A responsive AIE-active fluorescent probe for visualization of acetylcholinesterase activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mater Chem Front*, 2022, 6(11): 1515–1521.
- [107] WEI XZ, ZHU T, MA YS, *et al.* Monitoring acetylcholinesterase level changes under oxidative stress through ESIPT-ICT-based near-infrared fluorescent probe [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2023, 380: 133392.
- [108] SIDHU JS, RAJENDRAN K, MATHEW AB, *et al.* Acetylcholine structure-based small activatable fluorogenic probe for specific detection of acetylcholinesterase [J]. *Anal Chem*, 2023, 95(19): 7594–7602.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



吴正浩, 硕士研究生, 主要研究方向为茶叶加工与质量控制。
E-mail: wuzhenghao@tricaas.com



鲁成银, 研究员, 主要研究方向为茶叶质量检验与品质管理。
E-mail: lchy@tricaas.com