

用于农残快速检测的离心式微流控芯片研制

叶嘉明^{1,2}, 邵佳美¹, 杨平¹, 范真真¹, 冯何凯¹, 陈波³, 杜汉根⁴

(1.浙江清华长三角研究院萧山生物工程中心, 浙江 杭州 311231; 2.国家食品安全风险评估中心应用技术合作中心, 浙江 嘉兴 314006; 3.深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广州 深圳 518045; 4.浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018)

摘要: 基于酶抑制原理结合光度分析方法, 研制一种预存储生化试剂的离心式微流控芯片。设计制作的一次性微流控CD芯片集成进样、酶抑制反应、显色反应及检测单元, 结合自行研制的便携式分析装置, 可以同时检测12个样品, 能够实现对大批量农产品中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留进行现场、快速、高通量检测。结果表明: 与传统农残快速测定仪比较, 微流控芯片农残速测系统操作单元集成度高, 可以实现农残检测流程的自动化, 样品及试剂消耗量降至传统速测方法的约1/20, 同时检测灵敏度、重复性和准确性整体优于传统农残快速测定仪, 可以满足基层非专业人员针对大批量样品农药残留的筛查需求。

关键词: 微流控芯片; 农药残留; 快速检测; 酶抑制法

Fabrication and Application of Centrifugal Microfluidic Chip for Rapid Detection of Pesticide Residues

YE Jiaming^{1,2}, SHAO Jiamei¹, YANG Ping¹, FAN Zhenzhen¹, FENG Hekai¹, CHEN Bo³, DU Hangen⁴

(1. Biotechnology Center at Xiaoshan, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Hangzhou 311231, China; 2. Cooperation Center for Application Technology, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Jiaxing 314006, China; 3. Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China; 4. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In this paper, a novel disposable centrifugal microfluidic chip with pre-storage biochemical reagents was developed for the rapid detection of pesticide residues in agricultural products, which was based on the principle of enzyme inhibition and photometric analysis. The microfluidic chip was integrated with sampling, enzyme inhibition, color development and detection chamber. By coupling with a portable detection device developed in our laboratory, the microfluidic chip could provide a simple, easy-to-use, low-cost and sensitive approach for rapid detection of organophosphate and carbamate pesticides on site. Results indicated that the microfluidic chip could achieve an automatic detection process with the advantages of less consumption of reagents (reduction by one-twentieth) and satisfied accuracy compared with the traditional pesticide residue detector. Furthermore, the microfluidic chip was proved to be a powerful tool for screening pesticide residues in the case of high-throughput requirement. The microfluidic chip was superior to the traditional pesticide residue detector in term of detection sensitivity, reproducibility and measurement accuracy. The microfluidic chip coupled with self-made detection device is particularly suitable for on-site, rapid and high-throughput screening of pesticide residues by nonprofessionals.

Key words: microfluidic chip; pesticide residues; rapid detection; acetylcholin esterase (Ache) inhibition method

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712045

中图分类号: TS207.3; S481.8

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)12-0292-06

引文格式:

叶嘉明, 邵佳美, 杨平, 等. 用于农残快速检测的离心式微流控芯片研制[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 292-297.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712045. <http://www.spkx.net.cn>

YE Jiaming, SHAO Jiamei, YANG Ping, et al. Fabrication and application of centrifugal microfluidic chip for rapid detection of pesticide residues[J]. Food Science, 2017, 38(12): 292-297. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712045. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-07-15

基金项目: 食品科学与工程浙江省重中之重一级学科开放基金项目(JYTSP20142062);

嘉兴市公益性应用技术研究计划项目(2015AY23006)

作者简介: 叶嘉明(1979—), 男, 高级工程师, 博士, 主要从事微流控芯片即时检测系统研究。E-mail: yejiaming723@126.com

近年来,蔬菜、水果等农产品中的农药残留超标现象严重^[1-3],为确保农产品食用安全,采取及时、有效、快速的检测方法对农产品质量安全进行监管显得尤为重要^[4-5]。目前在水果、蔬菜等农产品中的农药残留以有机磷和氨基甲酸酯类农药残留超标问题最为突出^[6-7],传统的农药残留快速检测方式主要基于酶抑制反应原理^[8-9],结合吸光度分析仪器实现批量样品的农残快速、定性或半定量筛查。对比色谱-质谱联用等精密仪器分析方法^[10-14],酶抑制法由于简便、成本低,成为现阶段基层开展大量农产品的农残初筛首选方法^[15-20],但是仍存在以下不足之处:1)检测步骤繁琐,样品前处理、酶抑制反应、显色反应及检测单独进行;2)多种试剂需要现场配制,并且依靠人工移液完成多步生化反应,操作误差大;3)检测效率低,单个样品检测耗时至少20 min;4)需要专业人员操作。因此,现行的农残速测方法及仪器无法真正实现现场、快速、高效、准确检测,难以满足基层单位包括农贸市场、超市、食堂等亟需大批量样品快速筛查的检测需求,急需发展一种便携、简便、全自动、高通量的农药残留现场快速检测新方法。

微流控芯片又称为芯片实验室,是把生化实验室分析过程的样品制备、反应、分离、检测等操作单元微缩、集成到一张几平方厘米的芯片上,通过对微通道网络内流体的操纵和控制,自动完成分析检测过程^[21]。微流控技术和常规的实验技术相比,极大降低了试剂的消耗量,同时分析产生的废液极少;在微小范围内的能量传递、物质分散更快更均匀,热能传导快,也更易实现各种操控,因此反应快、效率高、污染少、成本低^[22]。近年来,微流控芯片作为一种微型化、集成化、高通量、低成本的分析技术平台^[23],已被广泛应用于化学、生物、医学、食品分析领域^[24-29]。特别是离心式光盘(compact disk, CD)状微流控芯片,以其高通量、多重平行分析、易操作、高集成化等优点,在食品安全快速检测领域具有广阔的应用前景^[30]。

本实验研制了一种用于农药残留现场、快速、全自动、高通量检测的离心式微流控芯片。农残生化反应试剂(包括酶、底物和显色剂)预先存储于CD状微流控芯片中,避免现场配制试剂溶液;配合自行研制的便携式离心检测系统,实现酶抑制反应、显色反应及检测的全集成和自动化,操作简便;并且一张芯片可同时检测多个样品,特别适用于基层非专业人员开展大批量样品的农药残留现场、快速筛查。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

芥兰、小白菜、生菜、娃娃菜、卷心菜、上海青上海市购。

芯片材料:光学级聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)板材,0.5、3.0 mm两种厚度规格,均购于上海佰芯生物科技有限公司。

氨基甲酸酯类:克百威、灭多威、甲萘威、抗蚜威;有机磷类:甲胺磷、敌敌畏、毒死蜱、三唑磷,均购自上海市农药研究所。

乙酰胆碱酯酶(EC 3.1.1.7,来自电鳗,217 U/mg)、碘化硫代乙酰胆碱和5,5-二硫二硝基苯甲酸 美国Sigma公司;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和碳酸氢钠 国药集团化学试剂有限公司。

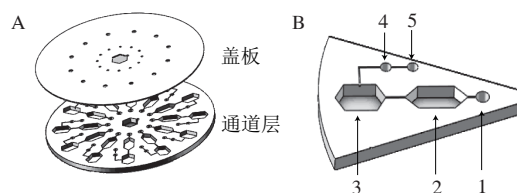
pH 8.0磷酸盐缓冲溶液:分别称取11.9 g无水磷酸氢二钾与3.2 g磷酸二氢钾,去离子水定溶于1 000 mL容量瓶;显色剂:分别称取160.0 mg二硫代二硝基苯甲酸和15.6 mg碳酸氢钠,用20 mL缓冲溶液溶解;底物:称取25.0 mg硫代乙酰胆碱,加3.0 mL蒸馏水溶解;乙酰胆碱酯酶液:根据酶的活性情况,用缓冲溶液溶解, ΔA_{405} 值应控制在0.3以上。

1.2 仪器与设备

离心式微流控芯片农残速测仪(搭配离心式农残速测芯片)由实验室自主研制;5通道农药残留快速测定仪(搭配农药残留检测试剂盒);YoungLaser-V12型二氧化碳激光芯片雕刻机 苏州扬清芯片科技有限公司;DW系列超低温保存箱(-86 °C) 海尔生物医疗公司;Scientz-N型真空冷冻干燥机 宁波新芝生物技术股份有限公司;HH-4数显恒温水浴锅 常州智博瑞仪器制造有限公司;FA1604电子天平 上海精科实业有限公司;Milli-Q超纯水系统(18 M Ω) 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 芯片的设计与制作



1.进样口;2.酶抑制反应池;3.显色反应与检测池;4.废液池;5.通气孔。

图1 离心式微流控农残检测芯片结构(A)和结构单元(B)示意图

Fig. 1 Schematic presentation of the centrifugal microfluidic chip for detection of pesticide residues (A) and construction unit (B)

如图1所示,本实验所设计的微流控芯片由两层PMMA基片组成(直径80 mm):顶层为厚度0.5 mm PMMA基片,底层为厚度3 mm的通道层。单张芯片集成12个农残检测单元(可用于同时检测12个样品),每个检测单元由进样口、酶抑制反应池、显色反应与检测池、废液池和通气孔构成,其中2个反应池

的体积均为120 μL 。芯片的制作过程如下：首先，用CorelDRAW软件设计芯片各层的结构图案；其次，通过二氧化碳激光雕刻机直接在PMMA基材上加工反应池和微通道，同时切割获得0.5 mm PMMA基片；最后，将空白盖板和刻有通道图案的基片键合，制得一次性的农残快速检测芯片。

1.3.2 试剂预存储

芯片键合前，采用真空冷冻干燥法将所需试剂预先固定在检测芯片中^[29]，具体操作方法如下：如图1B所示，芯片的酶抑制反应池中加入5 μL 酶溶液，在显色反应与检测池中依次加入5 μL 显色剂和5 μL 底物混合溶液，超低温冰箱-80 $^{\circ}\text{C}$ 预冻20 min后，置于真空冷冻干燥机内冷冻干燥2 h制备获得预存储生化试剂的检测芯片。所制备的芯片可低温条件下长期保存，方便运输，便于复活利用^[31]。

1.3.3 流体的操控

微流控芯片的基本特征和最大优势是多种操作单元在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成。为满足农药残留全自动、高通量、快速检测，本实验通过离心式微流控芯片平台，实现了农残检测过程涉及的多个操作单元，包括酶抑制反应、显色反应和检测的全集成，其技术核心是微量液体在芯片内部的精密、可控转移。如图2所示，使用移液枪将120 μL 待测液加至酶抑制反应池（步骤1）；通过调节离心模块旋转的方向及转速，可以精密操控待测液体转移至显色反应与检测池（步骤2），从而全自动完成样品的检测流程。

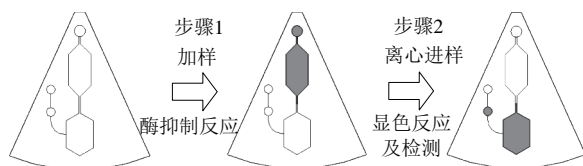


图2 进样及液体在芯片内各反应池之间的转移
Fig. 2 Solution aspiration and transportation in microchip

1.3.4 实验室自制便携式检测装置

为了配合离心式微流控芯片进行农药残留的现场快速检测，本实验搭建了一套便携式检测装置，即离心式微流控芯片农残速测仪（图3），其基本组成包括光电检测、流体控制（离心模块）、度控制和数据处理等模块。

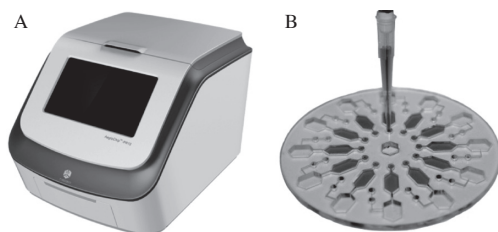


图3 离心式微流控芯片农残速测仪外观 (A) 及芯片实物照片 (B)
Fig. 3 Schematic illustration of the centrifugal microfluidic chip-based pesticide residue detector (A) and the microfluidic chip (B)

1.3.5 农残速测芯片的验证

1.3.5.1 检测原理

本实验采用的是酶抑制率法，以硫代乙酰胆碱为底物，在乙酰胆碱酯酶的作用下硫代乙酰胆碱水解成硫代胆碱，硫代胆碱可与显色剂作用生成5-巯基-2-硝基苯甲酸，使反应液呈黄色，用分光光度计在410 nm波长处测定吸光度随时间的变化值，计算出抑制率，通过抑制率可以判断是否有高剂量有机磷和氨基甲酸酯类农药的存在^[32-33]。依据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》，当乙酰胆碱酯酶抑制率不低于50%，蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留超标，结果为阳性样品；当抑制率不高于50%，蔬菜中农药残留合格，结果为阴性样品。

1.3.5.2 样品的前处理及测定

样品提取：蔬菜样品剪成1 cm左右见方碎片，取样品1 g置于提取瓶中，加入5 mL缓冲液，振荡提取2 min，倒出提取液，静置3 min，待用。

微流控芯片农残速测仪操作流程：取120 μL 对照缓冲液和上述样品提取液分别由芯片进样口加入，将芯片放入仪器，设置对应样品信息，按“检测”键，仪器开始工作，5 min后自动获得抑制率结果。

传统农残速测仪操作流程：1) 对照测试：在1 cm比色皿中，加入酶100 μL ，加入缓冲液2.5 mL，混匀，于37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中静置10 min，再加显色剂100 μL ，加入底物20 μL ，摇匀后及时放入仪器样品池，按“对照检测”键，进行测试；2) 样品测试：在1 cm比色皿中，加入酶100 μL ，加入待测试液2.5 mL，混匀，于37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中静置10 min，再加显色剂100 μL ，加入底物20 μL ，摇匀后及时放入仪器样品池，按“样品测量”键，进行测试。

1.3.5.3 灵敏度和重复性考察

将各种农药标准溶液用缓冲液稀释成5个质量浓度梯度，分别用离心式微流控芯片速测仪和传统农药残留快速测定仪进行测定，根据抑制率值判定其检测灵敏度，每种质量浓度重复3次实验考察重复性。

1.3.5.4 准确度考察

以假阳性和假阴性结果进行判定。

假阳性：用色谱定量法（依据NY/T 761—2008《蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留检测方法》进行测定）检测市场采购的蔬菜样品，对于检测结果为阴性的15份样品，其提取液分别用离心式微流控芯片农残速测仪和传统农药残留快速测定仪检测，与色谱法检测结果的一致性进行比较，分析假阳性结果。

假阴性：采用阴性样品加标法，以未喷洒农药的白菜和卷心菜为加标对象，按国标法操作提取待测液，选择蔬菜中常检出的克百威（氨基甲酸酯类）和敌敌畏

(有机磷类)加标,加标量均在GB 2763—2014规定的最大残留限量以上(加标方法如表1所示),分别用离心式微流控芯片农残速测仪和传统农药残留快速测定仪检测,判定结果一致性,分析假阴性结果。

表1 假阴性实验加标方法

Table 1 Standard addition method for false negative test

基质	克百威			敌敌畏		
	加标体积/ μL	标准品质量浓度/(mg/L)	加标量/(mg/kg)	加标体积/ μL	标准品质量浓度/(mg/L)	加标量/(mg/kg)
5 mL 待测试液	50	0.4	0.02	50	4	0.2
	50	1	0.05	50	10	0.5
	50	2	0.1	50	20	1
	50	4	0.2	50	40	2

2 结果与分析

2.1 芯片的结构设计

根据酶抑制法快速检测农残的原理,在芯片上设计了二级串联反应池,其中酶抑制反应池底部固定酶,显色反应与检测池底部固定底物和显色剂,反应池间以短通道连接,该通道起到“毛细管阀”的作用。更具体地,在离心模块低速(不高于1 000 r/min)运行状态下,溶液被限定于酶抑制反应池中;当离心模块高速(高于1 000 r/min)运行时,溶液将突破“毛细管阀”进入下一级反应池;当离心模块高速(不低于1 500 r/min)运行时,溶液将完全通过“毛细管阀”进入下一级反应池。检测时待测液首先进入酶抑制反应池,速测仪离心模块顺时针、逆时针低速往复旋转,在37 °C恒温下农药组分与酶发生酶抑制反应;随后逆时针高速离心(1 500 r/min)驱动混合液进入显色反应与检测池发生水解反应并显色。

2.2 芯片中酶抑制反应时间的确定

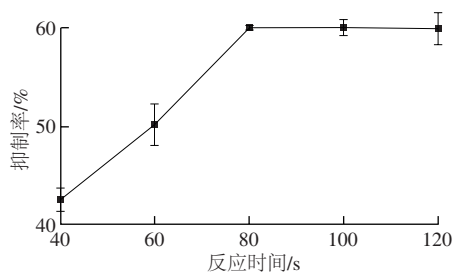


图4 芯片中酶抑制反应时间对农残抑制率的影响

Fig. 4 Effect of reaction time in the chip on inhibition of the enzyme

根据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》的规定,酶抑制反应溶液需在37 °C水浴锅中恒温反应10~15 min。针对本实验芯片中的微反应体系,将质量浓度为0.1 mg/L的克百威标准液加入预恒温37 °C的芯片中,考察了不同反应时间对农残抑制率的影响。如图4所示,当反应时间超过80 s后,农残抑制率达到一稳定平台。考虑到快速检测需求,本实验采用80 s作为芯片中酶抑制反应时间。

2.3 两种测定方法的对比

2.3.1 农药残留检测重复稳定性和灵敏度

便携式农药残留速测仪可以通过检测酶反应过程中显色的深浅,转换成相应的抑制率,在仪器上以读数形式出现,可以通过抑制率大小估算残留农药的浓度,因此速测仪检测结果的重复稳定性是考察仪器性能的重要指标之一。两种农药残留快速检测仪对8种农药检测结果的重复性考察见表2。

表2 两种农药残留快速检测仪对8种农药检测结果的重复性考察

Table 2 Repeatability of detection of eight pesticides by two rapid pesticide residue detectors

农药	质量浓度/(mg/L)	抑制率/%							
		离心式微流控芯片农残速测仪				传统农药残留快速测定仪			
		1	2	3	平均值	1	2	3	平均值
克百威	0.01	59.76	59.88	60.23	59.96	63.22	65.82	64.31	64.45
	0.02	64.29	65.18	65.37	64.95	69.01	70.91	71.22	70.38
	0.05	78.44	78.29	79.31	78.68	80.23	80.41	83.22	81.29
	0.1	82.53	83.16	83.99	83.23	87.54	87.23	87.93	87.57
	0.2	90.38	90.75	90.96	90.70	89.94	90.93	91.89	90.92
灭多威	0.02	60.77	61.18	60.92	60.96	56.32	54.48	54.71	55.17
	0.05	73.19	73.08	72.99	73.09	68.51	68.93	69.22	68.89
	0.1	82.34	82.67	81.78	82.26	77.62	76.79	77.43	77.28
	0.5	94.24	94.98	92.89	94.04	90.71	90.78	91.32	90.94
	1	96.62	96.41	97.29	96.77	93.91	93.41	92.62	93.31
甲萘威	0.2	56.71	56.49	57.22	56.81	51.22	50.63	49.78	50.54
	0.5	72.13	71.99	73.32	72.48	68.88	67.41	66.22	67.50
	1	80.98	80.94	79.69	80.54	77.21	75.13	75.29	75.88
	2	85.22	86.37	86.64	86.08	81.47	81.79	80.21	81.16
	4	91.17	92.22	92.57	91.99	85.18	85.69	86.61	85.83
抗蚜威	0.1	49.99	50.22	50.39	50.20	45.88	45.81	44.92	45.54
	0.5	59.89	60.22	60.84	60.32	57.91	55.27	54.83	56.00
	1	64.01	65.35	66.85	65.40	58.17	57.72	56.51	57.47
	5	81.47	79.98	79.64	80.36	71.52	71.13	70.32	70.99
	10	90.08	91.54	92.48	91.37	77.81	78.25	77.55	77.87
甲胺磷	0.2	52.45	52.73	52.29	52.49	47.62	47.58	46.71	47.30
	0.4	64.59	64.89	63.17	64.22	61.11	60.93	60.13	60.72
	1	73.19	74.26	74.63	74.03	69.61	69.19	69.53	69.44
	2	82.4	83.97	83.66	83.34	74.77	76.42	76.27	75.82
	5	86.66	88.19	88.65	87.83	85.22	84.78	84.19	84.73
敌敌畏	0.02	66.37	66.78	67.58	66.91	62.61	63.61	61.84	62.69
	0.05	77.87	78.12	78.42	78.14	68.67	70.55	68.43	69.22
	0.1	82.65	84.66	83.29	83.53	74.29	73.63	73.87	73.93
	0.2	90.54	90.67	90.52	90.58	82.42	81.66	81.95	82.01
	0.4	95.76	95.97	95.78	95.84	87.33	87.47	88.93	87.91
毒死蜱	0.05	39.21	39.65	37.22	38.69	10.57	6.92	8.25	8.58
	0.1	49.22	51.49	51.13	50.61	22.11	23.55	24.93	23.53
	0.5	57.39	57.95	55.69	57.01	27.22	25.01	25.23	25.82
	1	60.24	61.22	60.37	60.61	52.11	49.87	50.93	50.97
	2	65.75	67.88	69.39	67.67	56.67	55.82	55.44	55.98
三唑磷	0.02	48.72	49.57	50.69	49.66	36.33	33.02	33.75	34.37
	0.05	64.65	64.33	66.37	65.12	53.11	54.97	53.33	53.80
	0.1	69.18	69.69	71.68	70.18	57.52	57.96	55.22	56.90
	0.2	79.21	78.77	77.12	78.37	60.33	60.54	59.47	60.11
	0.4	87.57	85.33	88.89	87.26	63.17	63.57	62.65	63.13

两种农药残留快速检测仪对8种农药检测的灵敏度见表3。两种农药残留快速检测仪对所有有机磷和氨基甲酸酯类农药都能灵敏反应,离心式微流控芯片农残速测仪明显优于传统农药残留快速测定仪。其中,离心式微流控芯片农残速测仪检测结果显示,农药抗蚜威检测灵敏度为0.1 mg/L、甲胺磷检测灵敏度为0.2 mg/L、毒死蜱检测灵敏度为0.1 mg/L和三唑磷检测灵敏度在0.02 mg/L,灵敏度均明显高于传统农药残留快速测定仪;而高毒农药克百威检测灵敏度范围在0~0.01 mg/L之间、灭多威检测灵敏度范围在0~0.02 mg/L之间、敌敌畏检测灵敏度范围在0~0.02 mg/L之间,两种仪器检测结果相当,且均低于国家标准检测限值。可见,离心式微流控芯片农残速测仪符合国家检测标准,可以用来进行农残检测。

表3 两种农药残留快速检测仪对8种农药检测的灵敏度

Table 3 Sensitivity of two rapid pesticide residue detectors for 8 pesticides

农药	检测灵敏度/(mg/L)	
	离心式微流控芯片农残速测仪	传统农药残留快速测定仪
克百威	<0.01	<0.01
灭多威	<0.02	<0.02
甲萘威	<0.2	0.2
抗蚜威	0.1	0.1~0.5
甲胺磷	0.2	0.2~0.4
敌敌畏	<0.02	<0.02
毒死蜱	0.1	1
三唑磷	0.02	0.02~0.05

2.3.2 农药残留检测准确性

2.3.2.1 假阳性测定结果

表4 蔬菜有机磷和氨基甲酸酯类农药残留检测色谱法和速测法对比假阳性结果

Table 4 False positive results for organophosphorus and carbamate pesticide residues in vegetables detected by two rapid detectors

序号	蔬菜	检测结果/(mg/kg)	离心式微流控芯片农残速测仪		传统农残速测仪	
			抑制率/%	检测结果	抑制率/%	检测结果
1	芥兰	ND	3.70	—	0.00	—
2	小白菜	ND	7.74	—	0.00	—
3	生菜	ND	5.91	—	10.70	—
4	娃娃菜	ND	3.70	—	0.00	—
5	卷心菜	ND	3.70	—	0.00	—
6	生菜	ND	3.70	—	0.00	—
7	生菜	ND	3.70	—	0.00	—
8	生菜	ND	3.70	—	0.00	—
9	生菜	ND	10.94	—	0.00	—
10	上海青	ND	4.86	—	0.00	—
11	上海青	ND	3.70	—	0.00	—
12	上海青	ND	3.70	—	0.00	—
13	上海青	ND	22.52	—	0.00	—
14	娃娃菜	ND	3.90	—	0.00	—
15	娃娃菜	ND	3.70	—	0.00	—

注:—,阴性;+,阳性;ND,未检出。表5同。

表4表明,针对15个色谱法检测结果为阴性的蔬菜样品,离心式微流控芯片农残速测仪和传统农药残留快速测定仪的检测结果均为阴性,未出现假阳性。

2.3.2.2 假阴性测定结果

针对克百威和敌敌畏两种农药用色谱法检测结果为阴性的白菜和卷心菜中加标测定,16个加标样品,离心式微流控芯片农残速测仪和传统农药残留快速测定仪的结果判断一致,见表5。

表5 蔬菜克百威和敌敌畏农药残留速测法对比假阴性结果

Table 5 False negative results for organophosphorus and carbamate pesticide residues in vegetables detected by two rapid detectors

序号	蔬菜	加标农药	加标量/(mg/kg)	离心式微流控芯片快速检测仪		传统农药残留快速检测仪	
				抑制率/%	检测结果	抑制率/%	检测结果
1	白菜		0.02	36.15	—	38.53	—
2	白菜		0.05	62.17	+	66.93	+
3	白菜		0.1	69.28	+	74.67	+
4	白菜	克百威	0.2	79.95	+	81.66	+
5	卷心菜		0.02	33.07	—	37.12	—
6	卷心菜		0.05	59.31	+	62.11	+
7	卷心菜		0.1	66.35	+	72.37	+
8	卷心菜		0.2	75.29	+	78.90	+
9	白菜		0.2	73.03	+	63.47	+
10	白菜		0.5	80.21	+	71.60	+
11	白菜		1	88.28	+	78.57	+
12	白菜	敌敌畏	2	96.60	+	86.03	+
13	卷心菜		0.2	71.05	+	61.90	+
14	卷心菜		0.5	78.29	+	69.63	+
15	卷心菜		1	85.80	+	76.93	+
16	卷心菜		2	93.00	+	85.61	+

2.3.3 仪器操作对比结果

表6 离心式微流控芯片农残速测仪和传统农残速测仪方法对比

Table 6 Comparison of the developed method with traditional rapid pesticide residue analyzer

检测方法	试剂	样品用量/mL	试剂消耗量/ μ L	操作步骤	检测效率
离心式微流控芯片农残速测仪	预存于芯片	0.12	10	简便:加样后一键搞定,全自动完成检测流程	每次可检测12个样品,全程需10 min
传统农药残留速测仪	现配	2.5	220	繁琐:加样后需添加酶、显色剂和底物,需做对照测试,另需烘箱	每次可检测5个样品,全程需30 min

从表6可以看出,对比传统的农残速测方法,本实验提出的微流控芯片直接将农药残留检测试剂预存于芯片内部,无需现场配制溶液;一次性可检测12个样品,检测时间仅为10 min,显著提高检测效率;样品及试剂消耗量降至常规检测的约1/20;操作简便,检测精度、重复性与准确性能够满足农药残留的现场快速检测需求。

3 结论

本实验研制了一种用于农药残留现场、快速检测的离心式微流控芯片。旨在使用一次性的高聚合物芯片,配合自行研制的便携式农残速测仪,实现对有机磷、氨基甲酸酯类农药的全自动、高通量、低成本的检测。所

研制的微流控芯片直接将农药残留检测所需试剂预存储于芯片内部,无需现场配制溶液;可在芯片内部自动进样、生化反应及检测,实现检测流程自动化;样品及试剂消耗量少;可同时检测12~24个样品,能够满足农药残留的大批量样品筛查需求。微流控芯片检测方法操作简便,检测灵敏度、重复稳定性与准确性均能够满足农药残留的现场快速检测需求。此外,本实验研制的芯片以高聚物为基材,成本低、易批量化生产,适合一次性农药残留检测需求。

综上所述,离心式微流控芯片可实现全自动检测流程,灵敏度高、准确性高、操作简便,特别适合于农贸市场、超市、农产品种植基地、机关食堂等基层单位的非专业人员开展现场、快速、高通量的农药残留筛查。

参考文献:

- [1] 吴春红, 聂继云, 徐国锋, 等. 果蔬中农药残留检测技术研究进展[J]. 植物保护, 2009, 35(3): 23-26. DOI:10.3969/j.issn.0529-1542.2009.03.006.
- [2] 朱松明, 周晨楠, 和劲松, 等. 基于酶抑制法的农药残留快速比色检测[J]. 农业工程学报, 2014, 30(6): 242-248. DOI:10.3969/j.issn.1002-6819.2014.06.029.
- [3] 吕建华, 安红周, 郭天松. 农药残留对我国食品安全的影响及相应对策[J]. 食品科技, 2006, 31(11): 16-20. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2006.11.005.
- [4] 于娜, 邹琳, 孟红英. 蔬菜农药残留超标对人体健康的危害及预防[J]. 现代农业科技, 2010(4): 381-381. DOI:10.3969/j.issn.1007-5739.2010.04.251.
- [5] 徐溢, 张玉志, 范伟, 等. 环境和食品中农药残留快速检测技术研究进展[J]. 化学通报, 2006, 69(9): 718-719. DOI:10.3969/j.issn.0441-3776.2006.09.004.
- [6] 蔡建荣, 张东升, 赵晓联. 食品中有机磷农药残留的几种检测方法比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(6): 750-752. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2002.06.082.
- [7] 王连珠, 周昱, 黄小燕, 等. 基于QuEChERS提取方法优化的液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中51种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 色谱, 2013, 31(12): 1167-1175.
- [8] 邱静. 我国主要农药残留快速检测方法及产品现状分析[J]. 农产品质量与安全, 2011(5): 41-46. DOI:10.3969/j.issn.1674-8255.2011.05.014.
- [9] DUFORD D A, XI Y Q, SALIN E D. Enzyme inhibition-based determination of pesticide residues in vegetable and soil in centrifugal microfluidic devices[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(16): 7834-7841.
- [10] 刘建慧, 孙鑫, 刘希光, 等. 果蔬中农药残留现状及检测技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(15): 119-122. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2014.15.034.
- [11] 何佩雯, 赵海誉, 杜钢, 等. 气相色谱技术在中药农药残留检测中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 126-134. DOI:10.3969/j.issn.1005-9903.2010.02.042.
- [12] 刘宝峰, 刘罡一, 马又娥, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测蔬菜水果中65种农药残留方法研究[J]. 科技通报, 2010, 26(1): 93-99.
- [13] O'MAHONY J, CLARKE L, WHELAN M, et al. The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food challenges and applications [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1292: 83-95.
- [14] 贺筱蓉, 周华英. 农残速测卡与气相色谱在检测蔬菜有机磷农药残留中的对比试验[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(6): 678-679. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2003.06.002.
- [15] 张文成, 宫洪景. 果蔬中农药残留快速检测法研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 752-755. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.12.176.
- [16] 林春绵, 胡晓燕. 酶抑制法快速检测有机磷农药残留的研究进展[J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(4): 386-391. DOI:10.3969/j.issn.1006-4303.2009.04.007.
- [17] 谢婷婷, 戚爱棣, 杨美华. 有害残留物快速检测技术研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 936-938.
- [18] 杜美红, 孙永军, 汪雨, 等. 酶抑制-比色法在农药残留快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 462-466.
- [19] 栾云霞, 李杨, 平华, 等. 基于酶抑制法的农药残留快速检测仪器现状及评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(6): 690-694.
- [20] 苏展, 董庆利, 徐斐, 等. 应用全自动农残速测仪检测蔬菜中甲胺磷残留的参数优化研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 352-354.
- [21] DANIEL F, DEVANAND P. Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences[J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(9): 330-335. DOI:10.1021/ac002800y.
- [22] WHITESIDES G M. The origins and the future of microfluidics[J]. Nature, 2006, 442: 368-373.
- [23] ZHUANG Q C, NING R Z, YUAN M A, et al. recent developments in microfluidic chip for *in vitro* cell-based research[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(4): 522-532. DOI:10.1016/S1872-2040(16)60919-2.
- [24] WU J, WANG X, LIN Y T, et al. Peroxynitrous-acid-induced chemiluminescence detection of nitrite based on Microfluidic chip[J]. Talanta, 2016, 154: 73-79. DOI:10.1016/j.talanta.2016.03.062.
- [25] SACKMANN E K, FULTON A L, BEEBE D J. The present and future role of microfluidics in biomedical research[J]. Nature, 2014, 507: 181-189. DOI:10.1038/nature13118.
- [26] GUO L J, FENG J S, FANG Z C, et al. Application of microfluidic "lab-on-a-chip" for the detection of mycotoxins in foods[J]. Trends in Food Science and Technology, 2015, 46(2): 252-263. DOI:10.1016/j.tifs.2015.09.005.
- [27] SCOGNAMIGLIO V, ARDUINI F, PALLESCHI G, et al. Biosensing technology for sustainable food safety[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014, 62: 1-10. DOI:10.1016/j.trac.2014.07.007.
- [28] JIANG H, JIANG D L, ZHU P, et al. A novel mast cell co-culture microfluidic chip for the electrochemical evaluation of food allergen[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 83(15): 126-133. DOI:10.1016/j.bios.2016.04.028.
- [29] 苑宝龙, 王晓东, 杨平, 等. 用于农药残留现场快速检测的微流控芯片研制[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 198-203. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201602035.
- [30] ABKAR A S, FATIMAH I, SHAH M U, et al. A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2016, 227: 600-609. DOI:10.1016/j.snb.2015.10.116.
- [31] 徐成海. 真空科学技术丛书: 真空干燥技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- [32] 卫生部. 蔬菜上有机磷和氨基甲酸酯类农药残毒快速检测方法: NY/T 448—2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [33] 卫生部. 蔬菜中有机磷与氨基甲酸酯类农药残留量的快速检测: GB/T 5009.199—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.