

基于纸质微流控芯片的农药检测系统

毛罕平¹ 左志强¹ 施杰¹ 杨宁^{1,2} HUANG J S³ 严玉婷^{1,4}

(1. 江苏大学现代农业装备与技术教育部重点实验室, 镇江 212013; 2. 江苏大学电气信息工程学院, 镇江 212013; 3. 加州大学圣地亚哥分校信息理论与应用研究中心, 圣地亚哥 CA 92126; 4. 江苏大学化工化学学院, 镇江 212013)

摘要: 针对当前农药检测手段仪器复杂、成本昂贵等问题,提出了一种基于纸质微流控农药检测方法。设计了具有自动进样、混合反应、电化学检测等功能的纸质微流控芯片,采用石墨碳、Ag/AgCl 材料以及结合化学交联法制备了环状结构的丝网印刷酶电极,并利用循环伏安法对制备的酶电极进行了电化学表征,构建了一套基于酶抑制法的集成酶电极纸质微流控农药检测系统。最后建立了酶抑制率与对硫磷浓度的数学模型,并测试了酶电极的性能。实验结果表明,酶电极具有良好的制备重复性、稳定性和线性度。抑制率与对硫磷浓度的负对数在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ g/mL 范围内呈良好的线性关系,线性回归方程为: $I = 158.82 + 21.11\lg C$, R^2 为 0.993,最低检出限为 3.3×10^{-8} g/mL。所制备的酶电极微流控传感器抗干扰性较强,对对硫磷农药具有一定的选择性。加标回收率范围在 95.8% ~ 115.0% 之间。

关键词: 农药检测系统; 酶抑制法; 纸质微流控芯片; 酶电极; 电化学检测

中图分类号: S220.1; TH703 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2017)05-0094-07

Detection System for Pesticides with Paper-based Microfluidic Chip

MAO Hanping¹ ZUO Zhiqiang¹ SHI Jie¹ YANG Ning^{1,2} HUANG J S³ YAN Yuting^{1,4}

(1. Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. School of Electrical and Information Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

3. The Information Theory and Applications Center, University of California San Diego, San Diego CA 92126, USA

4. School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In order to solve the problems relating to pesticides detection with the use of complex instruments in terms of high cost, tedious operation and low degree of automation, a new method for pesticides detection with paper-based microfluidic chip was provided. The paper-based microfluidic chip was designed and developed with automatic sample injection, hybrid reaction and electrochemical detection. Subsequently, the enzyme electrode of ring structure was prepared by chemical crosslinking method using graphite carbon and Ag/AgCl materials and then characterized with electrochemistry cyclic voltammetry (CV). The integrated enzyme electrode of the paper-based microfluidic detection system for pesticides was built based on enzyme inhibition mechanism. Finally, the linear model between inhibition rate and parathion pesticides concentration was set up and the performance of the enzyme electrode was tested. The results showed that the prepared enzyme electrode was of good repeatability, linearity and stability. Furthermore, a linear relationship was displayed between inhibition rate and parathion pesticides, which was represented by the equation $I = 158.82 + 21.11\lg C$ with good linear range of 1.0×10^{-7} g/mL ~ 1.0×10^{-5} g/mL. The determination coefficient obtained was 0.993 and the corresponding limit of detection was 3.3×10^{-8} g/mL. The enzyme electrode integrated on the paper-based microfluidic chip was robust with parathion pesticides which can not be interfered with other pesticides and substance with standard addition recovery rate of 95.8% ~ 115.0%.

Key words: pesticides detection system; enzyme inhibition method; paper-based microfluidic chip; enzyme electrode; electrochemical detection

收稿日期: 2016-08-13 修回日期: 2016-10-19

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2014BAD08B03)、国家自然科学基金重点项目(61233006)、国家自然科学基金项目(31671584)、江苏省农业科技自主创新资金项目(CXC1571033-02)和江苏省高校优势学科建设工程项目(苏财教(2014)37号)

作者简介: 毛罕平(1961—),男,教授,博士生导师,主要从事现代农业装备和设施农业环境控制技术研究,E-mail: maohp@ujs.edu.cn

引言

微流控技术是近年来发展起来的一项以微流体操控为核心的科学技术,它将生化检测所涉及的进样、混合、反应、检测等功能集成到一块微米尺度芯片上构建“芯片实验室”(Lab on a chip),具有集成度高、耗材少、检测速度快、自动化程度高等特点^[1-3],已逐步被应用在农药检测领域。郭红斌等^[4]研制了一种有机磷农药检测微流控芯片,利用甲基对硫磷和水解酶发生水解反应产生有色溶液,用分光光度计检测;DUFORD 等^[5]研制了一种由电动机驱动的阵列化离心式旋转微流控芯片,利用分光光度计对 2 个独立通道内显色区域进行对比检测来实现农药检测;苑宝龙等^[6]研制了一种用于农药残留现场快速检测微流控芯片,以二硫代二硝基苯甲酸和碳酸氢钠为显色剂,结合手持式光度分析装置实现农药检测。以上微流控芯片农药检测存在一些不足,微流控芯片造价高、芯片结构复杂、需要外置驱动来操控流体流动。

而纸质微流控芯片的出现,解决了传统微流控芯片的诸多弊端,它具有成本低、结构简单、无需外置驱动,依靠自身层析力流动,具有广泛的应用前景,引起了国内外众多研究者的关注^[7-9]。CARRILHO 等^[10]利用喷蜡打印法,在纸上创建了完整的疏水区域、亲水通道、流体液池和反应区,并利用所制作的纸质微流控芯片来检测乳酸;马翠翠等^[11]创建了一种利用紫外光降解自组装单分子层的纸芯片制作方法,并以显色检测的方式对血液中亚硝酸根进行定量分析;WANG 等^[12]利用喷蜡打印机、蜡、聚二甲基硅氧烷(PDMS)等作为疏水性材料结合普通滤纸制备纸芯片,完成了重金属离子的显色分析。到目前为止,纸质微流控技术在农药检测领域鲜有报道,把纸质微流控技术引入农药检测,发挥纸质微流控芯片诸多优势,将有效弥补传统微流控农药检测成本高、结构复杂、需外置驱动等诸多弊端。

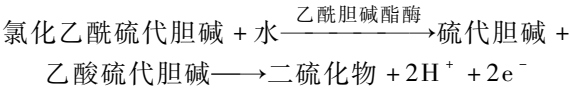
因此,本文基于纸质微流控芯片的廉价、结构简单、自身层析流动等优势,设计纸质微流控芯片和酶电极,构建基于酶抑制法的集成酶电极纸质微流控农药检测系统。测试并验证酶电极的制备重复性、贮藏性和线性度。建立抑制率与对硫磷浓度的负对数线性数学模型。最后,分别针对实际样品河水、黄瓜、番茄中的农药进行加标回收率的计算,为农药检测提供一种低廉、简便的检测手段。

1 纸质微流控农药检测系统

1.1 检测原理

采用乙酰胆碱酯酶抑制法作为纸质微流控系统

检测农药的基本生化检测方法,具体检测原理为:底物氯化乙酰硫代胆碱在乙酰胆碱酯酶(AChE)催化下分解生成硫代胆碱和乙酸产物,而产物硫代胆碱在电极表面的激励电流作用下发生氧化还原反应,最终生成二硫化物、氢离子和电子,从而产生氧化还原电流^[13]。化学反应整个过程为



有机磷农药的磷酰基能与乙酰胆碱酯酶的活性位点紧密结合,导致乙酰胆碱酯酶磷酰化而失活^[14]。在上述化学反应中,当加入有机磷农药后,乙酰胆碱酯酶的活性就会被抑制,催化能力随之降低,致使中间产物硫代胆碱减少,在电极的电流激励下,相应生成的二硫化物、氢离子和电子的量也随之减少,此时氧化还原反应电流降低。通过电极来检测乙酰胆碱酯酶被农药抑制前后氧化还原反应伴随的电流变化,将所检测到的抑制前后 2 个电流代入

$$I = \frac{I_1 - I_2}{I_1} \times 100\%$$

(1)

式中 I ——乙酰胆碱酯酶抑制率
 I_1 ——在乙酰胆碱酯酶未被有机磷农药抑制下底物溶液中所测得的稳定电流
 I_2 ——在乙酰胆碱酯酶被农药抑制下底物溶液中所测得的稳定电流

可以计算出当前农药浓度下对应的酶抑制率。
在一定范围内,有机磷农药浓度越大,乙酰胆碱酯酶的抑制率就越大,两者之间具有正相关关系,为实现农药浓度的定量检测奠定了重要的基础。

1.2 纸质微流控芯片结构

纸质微流控芯片选用英国 Whatman 4 号滤纸,如图 1 所示,芯片由进样池 A 和进样池 B、进样通道 A 和进样通道 B、检测池 A 和检测池 B、方波型被动式微混合器构成^[15],进样池 A 和进样池 B 分别位于进样通道 A 和进样通道 B 的上端部,检测池 A 位于进样通道 A 的中部,检测池 B 位于方波型微混合器混合通道的末端。纸质微流控芯片的微通道横截面尺寸长为 800 μm,宽(即纸厚度)为 100 μm,进样池 A 和 B 的半径均为 2 mm,检测池 A 和 B 的半径是进样池 A 和 B 的 1.5 倍,为 3 mm;进样通道 A 长度为 15 mm,进样通道 B 长度为 20 mm,方波形被动式微混合器有效长度为 22 mm。具体原理为:氯化乙酰硫代胆碱溶液从进样池 A 进入进样通道 A,经过检测池 A 中酶电极检测电流为 I_1 ,之后与从进样池 B 中进入进样通道 B 中的有机磷农药汇合,在方波型混合结构中充分混合,并在有机磷农药抑制后共同进入含有酶电极的检测池 B 中得到检测电流

I_2 , 根据式(1)计算农药浓度。

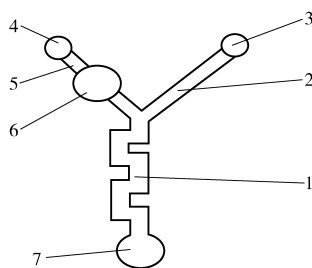


图1 纸质微流控芯片原理图

Fig. 1 Schematic of designed paper-based microfluidic chip

1. 方波型被动式微混合器 2. 进样通道 B 3. 进样池 B 4. 进样池 A 5. 进样通道 A 6. 检测池 A 7. 检测池 B

1.3 酶电极设计及制作

1.3.1 丝网印刷三电极设计

碳具有良好的稳定性和导电性,且具有成本低等优点,故选用石墨碳为工作电极和对电极的材料。丝网印刷三电极中的参比电极材料一般选用 Ag/AgCl ^[16-17],故选用 Ag/AgCl 作为参比电极制作材料。

据文献[18]可知,电极尺寸对扩散传质速率和电流具有较大的影响。如果电极尺寸半径越小,那么扩散传质速率就越大,反应越快。电流与电极表面积成正比,而电极尺寸又不能无限制地缩小,否则会导致电流太小,不利于正常检测。因此,设计工作电极直径为 3 mm。此外,三电极环状结构对去离子水具有较好的电流响应特性^[19],本文设计的三电极结构如图2所示,参比电极和对电极呈环形,并分别位于工作电极的两侧,构成丝网印刷三电极,电极采用聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)作为基底。

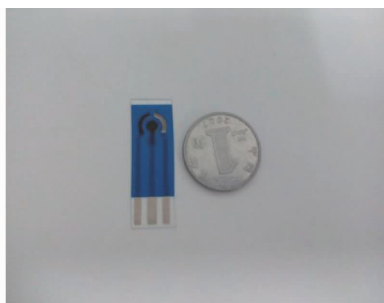


图2 丝网印刷三电极

Fig. 2 Three screen-printed electrodes

1.3.2 乙酰胆碱酯酶的固定

酶固定所用的试剂与仪器有:亚甲基蓝(MB,西陇化工)、曲拉通 X-100 (Triton X-100, 西陇化工)、乙酰胆碱酯酶(AchE, 上海金穗生物科技有限公司)、戊二醛(C5H8O2, 西陇化工)、牛血清白蛋白(BSA, 上海金穗生物科技有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS, 自行配制)、微量移液枪(艾本德)。

酶一般有固态和溶液态,溶液态的酶通常不稳

定、易失活且耗量大成本高,因此需要将酶固定化。目前酶的固定方法分为:吸附法、交联法、包埋法、共价键合法^[20-23]。其中,交联法结合力强且稳定性好、能保持较好的酶活性,故采用交联法作为固定酶的方法,并选用牛血清白蛋白-戊二醛作为交联剂。

在乙酰胆碱酯酶固定前,必须首先采用文献[24]中的方法先对裸电极进行修饰。修饰的目的是提高电极的物化性能,加快电子的传递,具体修饰过程如下:把 0.128 g 亚甲基蓝粉末加入到 10 mL 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液中(pH 值为 7.4),不断搅拌均匀,配置成 40 mol/L 的亚甲基蓝溶液;再向刚配好的亚甲基蓝溶液中加入 10 μL 的 Triton X-100 溶液(确保亚甲基蓝更好地吸附在电极表面),搅拌使之充分混合,用微型移液枪抽取 5 μL 的修饰溶液滴至工作电极表面,在 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温的室内放置 12 h。电极修饰完毕后,取 1 g 牛血清白蛋白加入 10 mL 磷酸盐缓冲液中,配置成 10% 的牛血清白蛋白溶液;取 2 mL 25% 的戊二醛溶液加入 8 mL 磷酸盐缓冲液中,配置成 5% 的戊二醛溶液;分别取 40 μL 乙酰胆碱酯酶溶液(500 U/mL),5 μL 10% 的牛血清白蛋白溶液,5 μL 5% 的戊二醛溶液,三者充分混合后,用移液枪将 5 μL 的混合酶液滴涂在工作电极表面,室温下晾干后并放置在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内保存。

1.4 实验平台

如图3所示为搭建的纸质微流控农药检测实验平台,平台包括纸质微流控系统(由纸质微流控芯片和集成酶电极构成)、微量注射泵(LSP04-1A,保定兰格)、电化学工作站(CHI660C,上海辰华)。另外,电化学工作站与电极连接线末端的3个金属夹头太大,无法夹紧酶电极的三电极,又为了便于酶电极与纸芯片的集成,因此采用了转换接头,转换接头右边类似 USB 插口,便于酶电极平行插入,转换接头左边引出凸出的3根金属棒,分别对应三电极,便于电化学工作站连线上的3个鳄鱼夹夹紧。

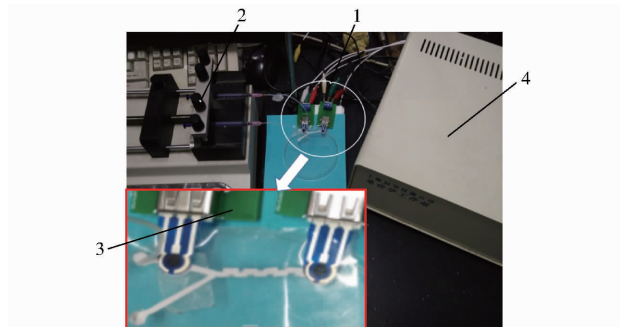


图3 纸质微流控农药检测实验平台

Fig. 3 Experiment platform of paper-based microfluidic for pesticides detection

1. 纸质微流控系统 2. 微量注射泵 3. 转换接头 4. 电化学工作站

2 实验方案与设计

2.1 试剂材料

表征溶液所采用的试剂材料有: 亚铁氰化钾($K_4Fe(CN)_6$, 成都科龙化工)、铁氰化钾($K_3Fe(CN)_6$, 成都科龙化工)、氯化钾(KCl, 成都科龙化工)。所需要的表征溶液为 5 mmol/L 铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液 + 0.1 mol/L 氯化钾溶液, 其中, 铁氰化钾-亚铁氰化钾溶液为氧化还原探针, 氯化钾溶液为电解质溶液。配制方法为: 称取 0.164 6 g 铁氰化钾、0.211 2 g 亚铁氰化钾、0.745 5 g 氯化钾, 并用去离子水定容到 100 mL 即可。

农药检测所需试剂材料有: 氯化钠(NaCl, 上海国药试剂)、磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 上海国药试剂)、磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 上海国药试剂)、氯化乙酰胆碱即底物(ACH, 上海金穗生物科技有限公司)、乙酰胆碱酯酶(AChE, 上海金穗生物科技有限公司)、对硫磷溶液(北京世纪奥科生物技术有限公司)。

2.2 实验方法

采用 1.3 节中酶电极制备方法重复制作 6 只酶电极, 将它们分别置于底物溶液中, 用差分脉冲伏安法分别测得它们的峰电流, 根据峰电流的稳定性来测试酶电极的制备重复性。

将制备好的酶电极保存在 4℃ 冰箱中, 保持其他环境相同, 每隔 5 d 测一次峰电流值, 以此来考察其稳定性。

将 10^{-4} g/mL 的对硫磷溶液稀释成不同浓度梯度的农药溶液, 并将稀释的农药和底物溶液同时注入纸质微流控系统, 通过电化学工作站采集 2 个检测池中集成的酶电极上的电流信号, 代入式(1)后可得到当前农药浓度所对应的抑制率, 以此来建立相应的数学模型。通过这种模型来求得所构建系统对有机磷的检测线性度及最低检测限。

传感检测系统的准确度常选择用回收率指标来表示^[25]。回收率的计算方法为: 加标后的实际测量值除以加入的标准浓度值。为考察该检测系统的实用性能, 通过加标回收的方法测算检测系统的回收率。采用标准加入法, 分别用江苏大学玉带河水、新鲜黄瓜和番茄汁配置成 10^{-5} g/mL、 10^{-6} g/mL、 10^{-7} g/mL 3 种浓度的对硫磷溶液作为标本, 利用该纸质微流控农药检测系统测出当前农药浓度值, 继而求得回收率。

3 结果与讨论

3.1 酶电极电化学表征

在酶电极电化学表征前, 必须对电化学工作站

进行参数设置, 具体参数设置如下: 扫描范围 $-0.2 \sim 0.6$ V, 扫描速度 0.1 V/s, 采样间隔 0.001 V, 静止时间 2 s, 灵敏度 10^{-5} A/V。图 4 中曲线 a 为修饰亚甲基蓝的电极, 曲线 b 为修饰亚甲基蓝并固定酶的电极, 曲线 c 为裸电极。由图 4 可知, 修饰亚甲基蓝的电极在氧化过程中, 当工作电压为 -0.026 V 时取得峰电流 I_1 ; 固定酶的电极在氧化过程中, 当工作电压为 -0.034 V 时取得峰电流 I_2 ; 裸电极在氧化过程中, 当工作电压为 -0.015 V 时取得峰电流 I_3 , 电流 $I_1 > I_2 > I_3$ 。与裸电极相比, 修饰了亚甲基蓝的电极测得的峰电流明显增大, 极大地改善了电极导电性能, 表明亚甲基蓝的修饰提高了电极的导电性; 而把胆碱酯酶固定到电极上时, 峰电流反而有所减小, 原因是酶分子没有导电性, 阻碍了电子的传递, 也说明酶固定成功。

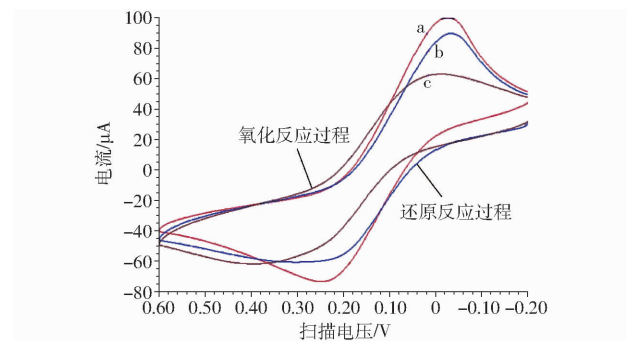


图 4 循环伏安表征图

Fig.4 Cyclic voltammetry characterization

最后利用电化学工作站探究扫描速度 v 与峰电流 I 之间的关系。设置扫描速度为 6 个不同的值, 分别为 50、75、100、125、150、200 mV/s, 在不同的扫描速度下测取峰电流。如图 5 所示, 随着扫描速度的增加, 峰电流也相应地增加, 实验数据显示, 峰电流与扫描速度的平方根之间呈现出良好的线性关系, 氧化反应和还原反应过程的相关性方程分别为: $I = -14.48v^{1/2} + 41.53$ (决定系数 $R^2 = 0.993$)、 $I = 19.15v^{1/2} - 59.84$ (决定系数 $R^2 = 0.996$), 实验结果说明在氧化还原反应过程中, 电极表面表现出扩散电流的特征。

3.2 酶电极性能测试与分析

3.2.1 重复性

制作出来的不同电极之间物理化学性质相差太大, 会给检测结果造成较大的误差, 所以需要验证以相同的工艺重复制备多只电极时的制备重复性是否满足要求。

采用相同的制作工艺制备出 6 只酶电极, 并放置在相同的底物溶液中测试, 以电极对底物的电流响应值来测试酶电极的制备重复性。所测得 6 只酶电极峰电流的方差 S^2 为 0.16, 相对标准偏差 (RSD)

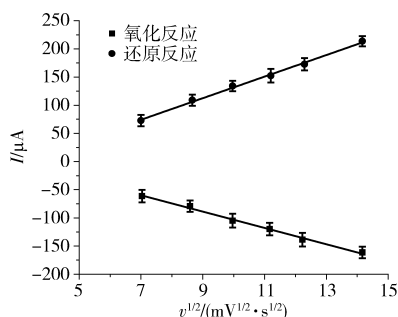


图5 扫速平方根与峰电流关系曲线

Fig. 5 Relationship between square root of sweep speed and peak current

为 5.04%。实验结果表明,当制作 6 只酶电极时,峰电流的离散度较低,说明相同工艺制作出的多只电极之间的物化性能相差不大,检测效果相似,因此,酶电极有良好的制备重复性,可批量制备。

3.2.2 稳定性

把制备完成的酶电极保存在温度为 4℃ 的冰箱中,保持其他环境相同,每隔 5 d 测量一次。过 15 d 后,在底物溶液中测得的峰电流仍然保持在初始电流的 90% 以上,30 d 后测得的峰电流值保持在初始电流的 80% 左右,实验数据说明酶电极在保持良好的性能之下存放时间较长,稳定性好,且保持良好稳定性最佳时间范围在 15 d 以内。主要原因是电极表面被修饰了亚甲基蓝,亚甲基蓝表现出了两大优势,第一提高了电极的电导性,能够促进电子转移,第二使电极具有更好的生物兼容性,保持其表面所固定酶的活性,也能使固定在电极表面的酶更加牢固,提高了酶的有效固定量。

3.2.3 线性度

线性度是衡量纸质微流控农药检测系统特性的一个重要指标,表征了平均校准曲线与拟合直线之间的偏离程度。只有系统保持较高的线性度,才能建立更准确的数学模型,达到精准检测农药的目的。因此,需要测量线性度来考察检测系统的性能。

实验结果如图 6 所示,抑制率与对硫磷浓度的负对数在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ g/mL 的浓度范围内呈现出良好的线性关系,线性回归方程为: $I = 158.82 + 21.11 \lg C$,其中 C 表示对硫磷浓度,决定系数 R^2 为 0.993,按抑制率为 10% 确定检出限,则检出限为 3.3×10^{-8} g/mL,该检测方法检出限低于对硫磷国家检出限标准 5.0×10^{-7} g/mL。

3.2.4 抗干扰选择性测试

分别加入可能干扰性的物质,考察其它农药及常见的离子对该传感器的干扰,突出该传感器对对硫磷农药的选择性检测。图 7 为传感器在含有 0.4 μ g/mL 对硫磷农药溶液中的峰值电流,以及在

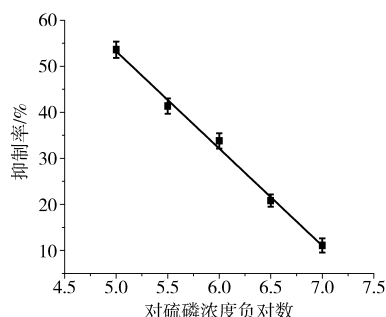
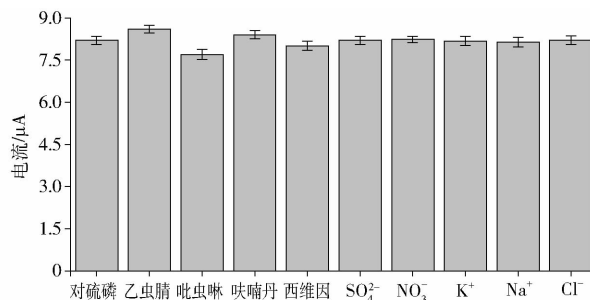


图6 对硫磷浓度负对数与抑制率关系

Fig. 6 Relationship between negative logarithm of parathion concentration and inhibition rate

该溶液中分别加入 0.4 μ g/mL 乙虫腈、0.4 μ g/mL 吡虫啉、0.4 μ g/mL 呋喃丹、0.4 μ g/mL 西维因、0.1 mol/L SO_4^{2-} 、0.1 mol/L NO_3^- 、0.1 mol/L K^+ 、0.1 mol/L Na^+ 、0.1 mol/L Cl^- 后电化学响应值。由图 7 可见,无机含氧阴离子及其他离子对传感器检测对硫磷基本无影响,而其他农药对传感器检测略有影响,但影响都不大。该传感器抗干扰性好,对对硫磷农药具有一定的选择性检测。

图7 不同干扰物质加入后酶电极对 0.4 μ g/mL 对硫磷溶液的电化学响应Fig. 7 Amperometric response of sensor to 0.4 μ g/mL parathion in absence and presence of different interference substances

3.3 实际样品检测

采用江苏大学玉带河水、新鲜黄瓜和番茄捣碎萃取汁液作为实际样本。通过标准加入法,把 10^{-4} g/mL 的对硫磷溶液加入到不等量的河水、新鲜黄瓜汁和番茄汁中,稀释配置成 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} g/mL 3 种浓度的对硫磷溶液,利用加标回收的方法测取系统的回收率,回收率的计算方法为:加标后的实际检测浓度除以加入的标准浓度(加标回收率在 90% ~ 120% 之间视为正常)。

通过测试得出,使用该农药检测系统检测河水中对硫磷的加标回收率时,检测浓度分别取 3 次测量的平均值(表 1),回收率的范围在 95.8% ~ 115.0% 之间且回收率平均值 $\bar{x}$ 为 107.6%,方差 S^2 为 0.72,相对标准偏差(RSD)为 9.60%(表 2);检测黄瓜汁中对硫磷的加标回收率时,检测浓度分别

取 3 次测量的平均值 (表 3), 回收率的范围在 96.2% ~ 111.0% 之间且回收率平均值 $\bar{x}$ 为 103.4%, 方差 S^2 为 0.37, 相对标准偏差 (RSD) 为 7.16% (表 4); 检测番茄汁中对硫磷的加标回收率时, 检测浓度分别取 3 次测量的平均值 (表 5), 回收率的范围在 99.1% ~ 110.0% 之间且回收率平均值 $\bar{x}$ 为 105.37%, 方差 S^2 为 0.21, 相对标准偏差 (RSD) 为 5.34% (表 6)。

表 1 河水中对硫磷检测浓度

Tab.1 Detectable concentrations of parathion in river water					g/mL
农药种类	加标浓度	检测浓度 1	检测浓度 2	检测浓度 3	平均检测浓度
对硫磷	10^{-5}	1.06×10^{-5}	1.13×10^{-5}	1.17×10^{-5}	1.12×10^{-5}
	10^{-6}	1.17×10^{-6}	1.04×10^{-6}	1.24×10^{-6}	1.15×10^{-6}
	10^{-7}	9.54×10^{-8}	9.61×10^{-8}	9.59×10^{-8}	9.58×10^{-8}

表 2 河水中对硫磷的加标回收率

Tab.2 Recovery rates of parathion in river water						
农药种类	加标浓度/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测浓度/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	回收率平均值/%	方差	相对标准 偏差/%
对硫磷	10^{-5}	1.12×10^{-5}	112.0	107.6	0.72	9.60
	10^{-6}	1.15×10^{-6}	115.0			
	10^{-7}	9.58×10^{-8}	95.8			

表 3 黄瓜汁中对硫磷的检测浓度

Tab.3 Detectable concentrations of parathion in cucumber juice					g/mL
农药种类	加标浓度	检测浓度 1	检测浓度 2	检测浓度 3	平均检测浓度
对硫磷	10^{-5}	1.22×10^{-5}	1.10×10^{-5}	1.01×10^{-5}	1.11×10^{-5}
	10^{-6}	9.70×10^{-7}	1.05×10^{-6}	1.07×10^{-6}	1.03×10^{-6}
	10^{-7}	9.65×10^{-8}	9.60×10^{-8}	9.61×10^{-8}	9.62×10^{-8}

表 4 黄瓜汁中对硫磷的加标回收率

Tab.4 Recovery rates of parathion in cucumber juice						
农药种类	加标浓度/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测浓度/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	回收率平均值/%	方差	相对标准 偏差/%
对硫磷	10^{-5}	1.11×10^{-5}	111.0	103.4	0.37	7.16
	10^{-6}	1.03×10^{-6}	103.0			
	10^{-7}	9.62×10^{-8}	96.2			

表 5 番茄汁中对硫磷的检测浓度

Tab.5 Detectable concentrations of parathion in tomato juice					g/mL
农药种类	加标浓度	检测浓度 1	检测浓度 2	检测浓度 3	平均检测浓度
对硫磷	10^{-5}	9.88×10^{-6}	9.96×10^{-6}	9.89×10^{-6}	9.91×10^{-6}
	10^{-6}	1.12×10^{-6}	1.08×10^{-6}	1.10×10^{-6}	1.10×10^{-6}
	10^{-7}	9.90×10^{-8}	1.09×10^{-7}	1.13×10^{-7}	1.07×10^{-7}

所制备酶电极传感器分别对河水、新鲜黄瓜汁和番茄汁的回收率范围都处在正常回收率范围 90% ~ 120% 内, 方差 S^2 都小于 1, 相对标准偏差都小于 10%, 结果表明所制备的酶电极抗干扰性较强。其中, 加标回收率在以 100% 为基准上下微小浮动, 原因是实际样品中存在各种不明的杂质等干扰物质, 对制备的酶电极传感器有一定程度上微小的干扰, 河水的水质环境最为复杂, 不明干扰物质较多, 其回收率的范围、方差、相对标准偏差相比新鲜黄瓜汁和番茄汁较大。

表 6 番茄汁中对硫磷的加标回收率

Tab.6 Recovery rates of parathion in tomato juice						
农药种类	加标浓度/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测浓度/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	回收率平均值/%	方差	相对标准 偏差/%
对硫磷	10^{-5}	9.91×10^{-6}	99.1	105.37	0.21	5.34
	10^{-6}	1.10×10^{-6}	110.0			
	10^{-7}	1.07×10^{-7}	107.0			

由此可知,所设计的纸质微流控农药检测系统检测农药的加标回收率在正常范围内,抗干扰能力较强,准确度较高,可用于实际样品的检测。

4 结束语

设计了纸质微流控芯片和酶电极,构建了纸质微流控农药检测系统并测试了酶电极的检测性能。测试结果说明酶电极具有良好的制备重复性、稳定性;建立了抑制率和对硫磷农药的数学模型,即抑制率与对硫

磷浓度的负对数在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ g/mL 范围内呈现出良好的线性关系,线性回归方程为: $I = 158.82 + 21.11 \lg C$, R^2 为 0.993,检出限为 3.3×10^{-8} g/mL;检测河水中的农药时,加标回收率的范围在 95.8% ~ 115.0% 之间;检测黄瓜汁中的农药时,加标回收率的范围在 96.2% ~ 111.0% 之间;检测番茄汁中的农药时,加标回收率的范围在 99.1% ~ 110.0% 之间;实验结果表明所设计的纸质微流控农药检测系统的准确度较高、可靠性强,可用于实际样品的检测。

参 考 文 献

- 1 FOUDEH A M, DIDAR T F, VERES T, et al. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(18): 3249 – 3266.
- 2 ZHENG G, WANG Y, WANG Z, et al. An integrated microfluidic device in marine microalgae culture for toxicity screening application[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 72(1): 231 – 243.
- 3 GRACIOSO MARTINS A M, GLASS N R, HARRISON S, et al. Toward complete miniaturisation of flow injection analysis systems; microfluidic enhancement of chemiluminescent detection[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(21): 10812 – 10819.
- 4 郭红斌,陈国平,兰文升,等. 一种用于有机磷农药检测的微流控传感器[J]. 传感器与微系统, 2011, 30(6): 84 – 86.
GUO Hongbin, CHEN Guoping, LAN Wensheng, et al. A microfluidic sensor for detection of organophosphorus compounds[J]. Transducer and Microsystem Technologies, 2011, 30(6): 84 – 86. (in Chinese)
- 5 DUFORD D A, XI Y, 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.
- 6 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.
YUAN Baolong, WANG Xiaodong, YANG Ping, et al. Fabrication and analytical application of microfluidic chip for rapid on-site detection of pesticide residues [J]. Food Science, 2016, 37(2): 198 – 203. (in Chinese)
- 7 PAROLO C, MERKO I A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics[J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(2): 450 – 457.
- 8 SHAH P, ZHU X, LI C Z. Development of paper-based analytical kit for point-of-care testing[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2013, 13(1): 83 – 91.
- 9 BHAKTA S A, BORBA R, JR M T, et al. Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 809: 117 – 122.
- 10 CARRILHO E, MARTINEZ A W, WHITESIDES G M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(16): 7091 – 7095.
- 11 马翠翠,何巧红. 基于无光胶紫外光刻技术制作纸芯片的研究[C]//2012年第三届国际微流控分析学术论坛会议, 2012.
- 12 WANG S, GE L, LI L, et al. Molecularly imprinted polymer grafted paper-based multi-disk micro-disk plate for chemiluminescence detection of pesticide[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 50: 262 – 268.
- 13 孙霞,王相友,王小俞. 用于农药残留快速检测的生物传感器灵敏度筛选试验[J]. 农业工程学报, 2009, 25(3): 295 – 297.
- 14 廖淑珍. 新型乙酰胆碱酯酶生物传感技术研究及有机磷检测应用[D]. 长沙: 湖南大学, 2013.
- 15 毛罕平,施杰,杨宁,等. 纸质被动式农药微混合器混合特性试验[J/OL]. 农业机械学报, 2016, 47(7): 73 – 79. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20160711&flag=1. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2016.07.011.
- MAO Hanping, SHI Jie, YANG Ning, et al. Mixing characteristics experiment of paper-based passive micro-mixer for mixing pesticide[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(7): 73 – 79. (in Chinese)
- 16 RENEDO O D, ALONSO-LOMILLO M A, MARTINEZ M J. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications[J]. Talanta, 2007, 73(2): 202 – 219.
- 17 TUDORACHE M, BALA C. Biosensors based on screen-printing technology and their applications in environmental and food analysis[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 388(3): 565 – 578.
- 18 张祖训. 超微电极电化学[M]. 1版. 北京: 科学出版社, 1998: 10 – 11.
- 19 RICCI F, AMINE A, PALLESCH G, et al. Prussian blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003, 18(2): 165 – 174.
- 20 SOFIA S, VICKY V, NIKOS A C. Stabilization of enzymes in nanoporous materials for biosensor applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20: 1674 – 1679.
- 21 KOK F N, HASIRVI V. Determination of binary pesticide mixtures by an acetyl cholinesterase-choline oxidase biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 19: 661 – 665.
- 22 李元光,周永新,冯建林,等. 丝网印刷胆碱酯酶电极测定神经性毒剂沙林、梭曼[J]. 分析化学, 2000, 28(1): 95 – 98.
- 23 高慧丽,康天放,王小庆,等. 溶胶-凝胶法固定乙酰胆碱酯酶生物传感器测定有机磷农药[J]. 环境化学, 2005, 24(6): 707 – 710.
- 24 李敏. 基于丝网印刷碳糊电极的血红蛋白电化学生物传感器研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- 25 CHAI Y, NIU X H, CHEN C, et al. Carbamate insecticide sensing based on acetylcholinesterase/prussian blue-multi-walled carbon nanotubes/screen-printed electrodes[J]. Analytical Letters, 2013, 46(5): 803 – 817.