

微流控芯片快速检测技术在铁皮石斛农药残留检测中的应用研究

裘一婧, 贾彦博*, 张佳凤, 陈丽芳(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310022)

摘要: 目的 探究微流控芯片快速检测技术在铁皮石斛农药残留检测应用的可行性。方法 采用有机溶剂提取样本, 并用 QuEChERS dispersive SPE 净化, 通过离心式微流控芯片高通量筛选不同厂家的农药残留检测用酶, 考察阴性样品基质干扰的情况, 采用不同水平加标的方式, 考察微流控芯片农药残留检测方法的灵敏度、重复性、准确性, 并和质谱法测定的样品结果进行比较。结果 快速检测方法显著差异率: 0.25; 灵敏度: 99.6%; 特异性: 96.4%; 假阴性率: 0.39%; 假阳性率: 3.57%; 准确度: 98.81%。采用微流控芯片农药残留快速检测方法与质谱法 2 种方法检测 40 批次样品, 测定结果表明, 2 种测定方法结果高度一致, 检测结果符合率均为 100%。结论 开发的微流控农药残留芯片快速检测技术可用于铁皮石斛农药残留的检测, 可以满足基层非专业人员针对大批量农药残留的筛查需求。

关键词: 微流控芯片; 铁皮石斛; 快速检测; 农药残留

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)15-2131-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222735

引用本文: 裘一婧, 贾彦博, 张佳凤, 等. 微流控芯片快速检测技术在铁皮石斛农药残留检测中的应用研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(15): 2131-2139.

Study on Application of Microfluidic Chip Rapid Detection in the Detection of Pesticide Residues in *Dendrobium Officinale*

QIU Yijing, JIA Yanbo*, ZHANG Jiafang, CHEN Lifang(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the feasibility of microfluidic chip in the rapid detection of pesticide residues in *Dendrobium officinale*. **METHODS** The sample was extracted with organic solvent, and purified with QuEChERS dispersive SPE, high throughput screening of enzymes for pesticide residue detection from different manufacturers by centrifugal microfluidic chips. The matrix interference was investigated by negative samples with different horizontal adding methods. The sensitivity, repeatability and accuracy of the microfluidic chip were investigated, and sample results determined by mass spectrometry were compared with them. **RESULTS** The results revealed that the significant difference rate of rapid detection method was 0.25; the sensitivity was 99.6%; the specificity was 96.4%; the false negative rate was 0.39%; the false positive rate was 3.57%; the accuracy was 98.81%. Two methods of rapid detection of pesticide residues by microfluidic chip and mass spectrometry were used to detect 40 batches of samples. The results indicated that the two methods had a high consistency, compliance rate of testing results were 100%. **CONCLUSION** Microfluidic chip rapid detection technology can be used for detecting pesticide residues in *Dendrobium officinale*, which can meet the screening needs of the basic non-professional person to detect the quality of large quantities of pesticide residues.

KEYWORDS: microfluidic chip; *Dendrobium officinale*; rapid detection; pesticide residues

铁皮石斛是药食同源的名贵药材, 随着生活质量的提高, 近年来铁皮枫斗、铁皮鲜条也被大众认可, 有鲜吃、泡茶、入膳, 甚至榨汁的新食用方法。铁皮石斛种植技术趋于成熟, 由于种植户在病虫害防治、施肥管理等方面随意性大, 导致石斛品质参差不齐, 而其中的农药残留问题, 更成为消费者对石斛品质的最大担忧。

中国药典 2020 年版四部在“0212 药材和饮片检定通则”中对植物类中药材和饮片中的 33

种禁用农药做出限量规定^[1]。药典规定测定农药残留的主要方法是气相色谱^[2]、气相色谱质谱串联^[3]和液相色谱质谱串联法^[4], 中药材农药残留快速检测目前报道较少。农药残留快速检测主要运用于水果、蔬菜, 技术主要是 2 类: 一类是基于胶体金免疫层析技术^[5]的胶体金试纸条产品, 一类是基于国家快速检测标准酶抑制率法的相关试剂盒^[6]及微流控芯片技术^[7-11]。前者有文献报道虽然用胶体金免疫层析技术的优势在于定性

基金项目: 浙江省药品监督管理局科技计划项目(YS2020012)

作者简介: 裘一婧, 女, 副主任药师

E-mail: 121158901@qq.com

*通信作者: 贾彦博, 女, 博士, 高级工程师

E-mail:

82998580@qq.com

能力强、检出限更低,但其成本较高且只能做单一农药残留,在基层应用中效率太低从而未被广泛应用^[5];后者酶抑制法由于简便、成本低,成为现阶段基层开展大量农产品的农药残留初筛首选方法,国家快速检测标准酶抑制率法的相关试剂盒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,需要专业人员操作;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 ≥ 20 min;④检测范围窄,现行国家快速检测方法仅规定了蔬菜中 5 种有机磷及氨基甲酸酯的检测方法。因此,基于酶抑制原理的试剂盒农药残留速测方法及仪器无法真正实现现场、快速、高效、准确检测。微流控芯片技术应用于水果、蔬菜的检测已成熟,使用一次性的高聚物芯片,配合自行研制的便携式农药残留速测仪,只需一次加样就能实现对有机磷、氨基甲酸酯类农药的全自动、高通量、低成本的检测。其检测范围由国家快速检测方法规定的 5 种农药检测扩展至 10 余种,但仍存在以下不足之处:①其方法研究未涵盖中国药典 2020 年版四部规定的 33 种禁用农药中的 21 种有机磷和氨基甲酸酯及其代谢物的禁用农药;②中药材成分复杂,含有生物碱、黄酮、油脂、色素等成分,原有的水果、蔬菜农药残留前处理方法不适用于中药材农药残留的快速检测前处理方法,且目前文献未有报道有关中药材酶抑制法农药残留快速检测的研究;③其方法采用水溶液作为样品前处理提取的溶剂,大部分有机磷及氨基甲酸酯水溶性较差,一定程度上抑制了酶抑制法性能的提升。

因此,现行的农药残留速测前处理方法及检测灵敏度无法真正实现现场、快速、高效、准确的检测目标,无法满足药材基层单位包括市场、种植基地等亟需大批量药材快速筛查的检测需求,亟需研发一种便携、简便、全自动、高通量的用于中药材农药残留现场快速检测的新方法。

本研究基于酶抑制原理结合光度分析方法,根据中国药典 2020 年版规定的 21 种有机磷和氨基甲酸酯及其代谢物的禁用农药,通过优化提取溶剂提高样本提取效率,增加净化步骤去除杂质干扰,采用离心式微流控芯片,对检测用酶的进行高通量筛选,最后集成进样、酶抑制反应、显色

反应及检测单元,开发微流控芯片技术应用于铁皮石斛的农药残留检测的方法。微流控芯片农药残留检测技术能够不受场地限制,对中药材农药残留进行实时筛查,以期为流通市场中药材安全性评价方面提供保障,提高整体中药材质量。

1 仪器与试剂

PR120A 微流控芯片农药残留速测仪(杭州霆科生物科技有限公司);TMYQ-132P 农药残留速测仪(杭州天迈生物科技有限公司);7000C 气相色谱联用仪、7890 液相色谱质谱联用均购自 Agilent;3-18KS 冷冻离心机(美国 Sigma 公司);MILLI-Q 超纯水系统(美国 Millipore 仪器公司);QuEChERS 固相萃取净化管 QuEChERS dispersive SPE(无水硫酸镁 900 mg, *N*-丙基乙二胺 300 mg,十八烷基硅烷键合硅胶 300 mg,硅胶 300 mg,石墨化碳黑 90 mg, Agilent, 批号: 5610-2048)。

铁皮石斛(干)、铁皮石斛鲜品(花、茎、叶)药材共 40 批次均来源于国内药材市场及药店,甲胺磷(批号: 2289-2016)、甲基对硫磷(批号: 2285-2016)、对硫磷(批号: 2284-2020)、苯线磷(批号: 384-2021)、苯线磷砒(批号: 384-2021)、地虫硫磷(批号: 2637-2020)、治螟磷(批号: 2321-2019)、硫线磷(批号: 081828-2020)、氯唑磷(批号: 081823-2021)、甲拌磷(批号: 2294-2019)、甲拌磷砒(批号: 294-2019)、甲拌磷亚砒(批号: 295-2019)、硫环磷(批号: 202109)、磷胺(批号: 1866-2019)、久效磷(批号: 2290-2020)、内吸磷(批号: 081357-2019)、灭线磷(批号: 1877-2019)、特丁硫磷(批号: 2641-2020)、特丁硫磷亚砒(批号: 351-2019)、水胺硫磷(批号: 2332-2019)、甲基异柳磷(批号: 2335-2019)、涕灭威(批号: 1859-2019)、涕灭威砒(批号: 1862-2020)、涕灭威亚砒(批号: 037-2019)均购自农业农村部环境保护科研监测所,浓度均为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;苯线磷亚砒(批号: DRE-A13422000AC)、特丁硫磷砒(批号: A17270400AC)、蝇毒磷(批号: A11730000ME)、克百威(呋喃丹)(批号: A11010000ME)均购自 Dr.Ehrenstorfer,浓度均为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;3-羟基克百威(FirstStandard,批号: 1ST20259;浓度: $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2 方法

检测原理:有机磷和氨基甲酸酯类农药对胆碱酯酶正常功能有抑制作用,其抑制率与农药的

浓度呈正相关。正常情况下,酶催化神经传导代谢产物(乙酰胆碱)水解,其水解产物与显色剂反应,产生黄色物质,用分光光度计在 412 nm 处测定吸光度随时间的变化值,计算出抑制率。抑制率(%)=[$(\Delta A_0 - \Delta A_t) / \Delta A_0$] $\times 100$, 式中: ΔA_0 为对照溶液(阴性样本溶液)反应 3 min 吸光度的变化值; ΔA_t 为样品溶液反应 3 min 吸光度的变化值; 当抑制率 $\geq 50\%$ 时,表示样本中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留高于检测限,判定为阳性;反之则判定为阴性样品。

2.1 快速检测方法

2.1.1 样品前处理 将样品加入剪成 1 cm 长短的碎片,取样品 5.0 g 置于提取瓶中,加入 10 mL 乙腈溶液, QuEChERS dispersive SPE, 涡旋使充分混匀,置振荡器上剧烈震荡 5 min,使完全净化,离心(1 664 $\times g$),取滤液 5 mL,氮吹至近干。加入 0.5 mL 缓冲液,振荡提取 2 min,倒出提取液,静置 3 min,待用。

2.1.2 上机测定 微流控芯片农药残留速测仪操作流程:取 120 μL 阴性样本溶液作为对照和“2.1.1”项下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。示意图见图 1。

传统农药残留速测仪操作流程:①对照测试:在 1 cm 比色皿中,加入酶 100 μL ,加入 0.5 mL 阴性样本溶液,2 mL 缓冲液,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 100 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 0.5 mL,2 mL 缓冲液,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 100 μL ,摇匀后及时放入仪器样品池,按“样品测量”键,进行测试。

3 结果与分析

3.1 前处理溶剂对阳性样本提取率的影响

离心式微流控芯片的酶反应体系与大部分有机溶剂的非兼容性,使得样品前处理过程中通常采用磷酸盐缓冲液等水相溶液作为提取溶剂,以保证酶反应的正常进行、避免对检测结果造成干扰。然而,水作为极性最大的溶剂,其前处理过程对大部分有机磷和氨基甲酸酯类农药水溶性较差,如对硫磷、甲胺磷、克百威、涕灭威等,难以提供高效的提取效率,在一定程度上影响了酶抑制法检测结果的准确性和可靠性。

为获得理想的农药残留提取效率,本研究用质谱法对各种农药的回收率进行考察,最终选用乙腈作为前处理提取溶剂。但是,大量研究表明有机溶剂对芯片包被的胆碱酯酶活性具有抑制作用。故采用乙腈提取后,氮吹至近干,再用磷酸盐缓冲液置换,进行上机检测。最大程度上提高了前处理提取效率,降低了待测液对胆碱酯酶活性的影响。

3.2 不同厂家的农药残留检测用酶的高通量筛选

由于本实验中的微流控芯片速测系统具有通量高、试剂添加灵活方便、试剂转移、加热振荡、检测等功能高度集成化自动化等特点,非常适合用于多种酶试剂-多种农药这种复杂体系的高通量筛选测试。本研究考察了 7 个乙酰胆碱酯酶(不同公司来源,分别标记为 A~G)对 21 种农药标准品(每种农药标准品选取 3 种浓度)进行了抑制率数据的测试,抑制率结果见表 1。筛选出满足药典禁用农药定量限下的酶,即酶抑制率接近 50%。

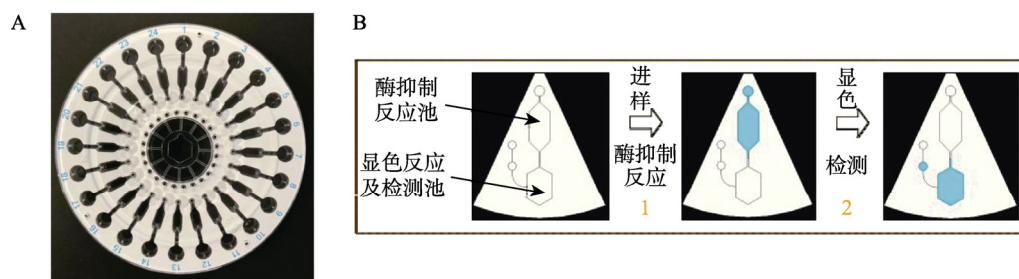


图 1 离心式微流控农药残留检测芯片结构(A)和进样及液体在芯片内各反应池之间的转移(B)示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the structure of a centrifugal microfluidic pesticide residue detection chip(A) and the transfer of samples and liquids between reaction tanks within the chip(B)

表1 微流控酶筛选芯片速测法测定7种来源的酶在21种不同农药存在下的抑制率($n=3$)

Tab. 1 Microfluidic enzyme screening chip rapid assay used to determine the inhibition rate of 7 kinds of enzymes in the presence of 21 different pesticides($n=3$) %

甲胺磷药典定量限: 0.05 mg·kg ⁻¹				氯唑磷药典定量限: 0.01 mg·kg ⁻¹				内吸磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹			
厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹		
	0.5	0.25	0.125		0.1	0.05	0.025		0.2	0.1	0.05
A	81.81	87.34	65.12	A	65.96	36.42	17.56	A	66.15	59.12	42.25
B	95.02	90.39	94.13	B	88.56	86.60	43.78	B	65.28	51.24	40.13
C	90.84	75.51	24.60	C	84.17	68.80	27.96	C	39.57	25.34	11.15
D	69.45	6.50	0.44	D	69.94	0.81	-25.43	D	32.14	11.13	0.24
E	91.95	63.38	60.23	E	80.96	66.66	24.81	E	12.32	-1.46	-4.25
F	43.43	-4.34	-7.71	F	44.62	-6.70	-10.38	F	32.94	33.71	11.60
G	63.38	47.07	22.30	G	51.06	38.01	15.21	G	49.66	39.97	25.76
甲基对硫磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹				甲拌磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹				灭线磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹			
厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹		
	0.2	0.1	0.05		0.2	0.1	0.05		0.2	0.1	0.05
A	58.50	51.15	35.14	A	61.45	52.90	46.76	A	74.59	67.47	53.18
B	53.93	46.42	33.13	B	89.19	66.24	31.95	B	85.99	69.43	43.13
C	12.26	5.38	0.22	C	0.36	-10.78	-13.32	C	85.88	48.98	3.15
D	-6.91	-1.44	-7.11	D	45.75	28.92	22.97	D	55.15	39.52	28.62
E	6.10	-4.26	-7.54	E	11.88	-2.15	-5.13	E	99.85	67.90	48.91
F	58.97	44.76	13.92	F	32.47	30.31	10.51	F	93.42	72.80	51.72
G	55.64	43.63	26.40	G	49.45	40.80	21.74	G	91.47	68.12	55.02
对硫磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹				蝇毒磷药典定量限: 0.05 mg·kg ⁻¹				特丁硫磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹			
厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹		
	0.2	0.1	0.05		0.5	0.25	0.125		0.2	0.1	0.05
A	96.24	82.15	69.13	A	64.82	65.31	56.03	A	74.59	67.47	53.18
B	86.35	69.67	48.23	B	98.13	82.10	78.23	B	85.99	69.43	43.13
C	54.25	24.65	0.08	C	23.85	17.57	24.15	C	85.88	48.98	3.15
D	96.46	73.34	50.35	D	39.60	36.35	16.84	D	55.15	39.52	28.62
E	14.35	4.36	-0.34	E	53.79	30.18	12.59	E	99.85	67.90	48.91
F	78.86	53.89	36.78	F	49.03	42.07	29.92	F	93.42	72.80	51.72
G	67.35	45.76	12.43	G	59.43	40.73	19.84	G	91.47	68.12	55.02
苯线磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹				硫环磷药典定量限: 0.03mg·kg ⁻¹				水胺硫磷药典定量限: 0.05 mg·kg ⁻¹			
厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹		
	0.2	0.1	0.05		0.3	0.15	0.075		0.5	0.25	0.125
A	83.69	49.40	23.56	A	86.18	50.87	31.67	A	68.61	48.22	27.23
B	97.21	92.47	49.13	B	100.00	95.22	50.59	B	79.58	55.55	7.64
C	92.93	77.25	25.17	C	95.69	79.54	25.91	C	10.25	2.25	-10.29
D	71.05	6.65	0.45	D	73.16	6.85	0.46	D	41.33	16.44	-24.48
E	96.36	67.14	23.00	E	96.86	66.76	21.31	E	10.33	-2.75	-4.49
F	44.43	-4.44	-7.89	F	45.75	-4.57	-8.12	F	46.80	37.88	10.27
G	64.84	48.15	22.81	G	66.76	49.58	23.49	G	48.17	35.50	6.36
地虫硫磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹				甲基硫环磷药典定量限: 0.03 mg·kg ⁻¹				甲基异柳磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹			
厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹		
	0.2	0.1	0.05		0.3	0.15	0.075		0.2	0.1	0.05
A	91.71	83.34	78.83	A	69.25	48.58	27.31	A	74.34	707.25	63.90
B	98.25	87.67	82.31	B	80.37	56.02	13.90	B	79.64	71.06	66.72
C	21.48	3.76	-0.72	C	10.09	1.99	-10.73	C	17.41	3.04	-0.58
D	99.18	98.30	84.63	D	41.60	16.37	-25.11	D	98.27	97.40	83.86
E	12.84	3.22	-0.16	E	10.18	-3.08	-4.84	E	12.72	3.19	-0.15
F	52.52	44.86	34.81	F	47.14	38.10	10.11	F	52.04	44.44	34.49
G	69.20	55.25	52.23	G	48.54	35.69	6.15	G	68.56	54.75	51.75

续表 1

治螟磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹				磷胺药典定量限: 0.05 mg·kg ⁻¹				克百威药典定量限: 0.05 mg·kg ⁻¹			
厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹		
	0.2	0.1	0.05		0.5	0.25	0.125		0.5	0.25	0.125
A	98.24	86.32	75.24	A	66.08	30.79	-2.47	A	93.048 9	89	68
B	90.34	64.24	41.15	B	70.61	69.21	50.28	B	99.411 9	97.452 5	70.859 2
C	9.71	1.91	-10.32	C	64.81	49.05	41.77	C	91.271 3	69.132 1	58.900 8
D	40.02	15.75	-24.16	D	45.58	27.06	-10.41	D	64.253 8	38.246 3	-14.374 7
E	9.79	-2.96	-4.66	E	65.04	52.37	44.12	E	91.584 4	73.798 3	62.203 5
F	45.36	36.66	9.73	F	34.61	-18.37	-39.63	F	48.851 3	-25.555 4	-55.421 1
G	46.70	34.34	5.92	G	42.87	22.98	12.74	G	60.446 1	32.509 5	18.137 2

硫线磷药典定量限: 0.02 mg·kg ⁻¹				久效磷药典定量限: 0.03 mg·kg ⁻¹				涕灭威药典定量限: 0.1 mg·kg ⁻¹			
厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹			厂家	浓度/mg·L ⁻¹		
	0.2	0.1	0.05		0.3	0.15	0.075		1	0.5	0.25
A	67.14	58.19	46.24	A	85.27	50.33	1.57	A	83.12	49.54	13.49
B	65.28	51.24	40.13	B	99.04	94.21	48.34	B	96.33	91.7	49.34
C	39.58	25.39	11.12	C	94.68	78.70	25.64	C	92.15	76.82	25.91
D	32.14	11.13	0.24	D	72.39	6.77	0.46	D	70.76	7.81	1.75
E	12.32	1.48	-5.21	E	95.84	66.06	21.09	E	93.26	64.69	21.54
F	49.16	39.57	25.16	F	66.06	49.06	23.24	F	61.34	39.67	13.12
G	32.94	33.91	13.42	G	45.27	-4.52	-8.04	G	64.69	48.38	23.61

从以上数据可以看出,对于选定的 21 种农药及其浓度,厂家 B 的酶具有最高的灵敏度,厂家 A 的酶在农药药典规定的检量限下更接近 50% 的抑制率。而本实验考察的 7 种酶均无法满足药典规定的检出限,说明在农药残留检测用酶研发方面,还具有广阔的空间。

3.3 基质效应考察

在实验过程中发现,假阳性率和假阴性率较易在检出限附近出现,说明在低浓度加标时,产生的基质效应普遍大于高浓度加标,这也提示了样品中农药残留含量较小时,基质干扰带来的误差相对较大。可能是因为本法是基于分光光度法,样本本底颜色的干扰对实验影响较大,用以下 2 种方案进行优化。

3.3.1 优化前处理方法 本方法用乙腈作为提取液,样品本底的颜色极易造成假阴性,故增加了样品液净化步骤,以降低基质干扰,增加检测灵敏度。本实验考察了 4 种不同配比的 Quenchers 净化包: Mgso4-psa-C₁₈、Mgso4-psa-gc、Mgso4-psa-C₁₈-gc、Mgso4-psa-C₁₈-gc-SiO₂ 对样品进行净化,考察不同净化方案对组分回收率的影响。对于流出续滤液进行浓缩、溶剂置换,上机分析,结果表明,QuEChERS dispersive SPE 净化包在最大程

度保证回收率的同时,能很好地去除生物碱、黄酮、油脂、色素等杂质干扰。

3.3.2 消除本底空白 优化离心式微流控芯片的方法,原有的仪器方法使用缓冲液作为对照实验,本实验改用经质谱确认的阴性样本提取液作为对照实验即 ΔA_0 ,最大程度上消除了样本本底的干扰。

3.4 质谱法和微流控农药残留芯片快速检测方法一致性比较

本研究采用 2 种方法检测 40 批次样品,测定结果表明,微流控农药残留芯片快速检测方法与质谱法(依据中国药典 2020 年版 2341 农药残留量测定法进行测定)检测结果符合率为 100 %,2 种测定方法结果一致性较高。

3.5 准确度考察

以假阳性和假阴性结果进行判定。采用阴性样品加标法,选择复杂的基质,经 LC-MSMS/GC-MSMS 验证为阴性样本的铁皮石斛干品(标号 1)、铁皮石斛花(标号 2)、铁皮石斛叶(标号 3)、铁皮石斛茎(标号 4)为加标对象,按快速检测法操作提取待测液,加标量均在本方法的 0.5 倍定量限(limit of quantitation, LQD)、1 倍 LQD、2 倍 LQD,分别用离心式微流控芯片农药残留速测仪和传统农药残留快速测定仪检测,数据见表 2。

表2 2种农药残留快速检测仪对21种农药检测结果的重复性考察

Tab. 2 Repetitive inspection of twenty-one pesticides detection results by two rapid pesticide residue detectors

农药	药典定量限/ mg·kg ⁻¹	加标量/ mg·kg ⁻¹	抑制率/%							
			离心式微流控芯片农药残留速测仪				传统农药残留快速测定仪			
			1	2	3	4	1	2	3	4
甲胺磷	0.05	0.005	39.76	39.88	40.23	39.96	43.22	45.82	48.31	45.78
		0.01★	59.76	59.88	60.23	59.96	53.22	55.82	54.31	52.14
		0.02	75.35	77.33	70.54	74.41	79.12	82.53	85.24	82.30
		0.04	90.38	90.75	90.96	90.70	89.94	95.93	92.89	92.92
甲基对硫磷	0.02	0.01	38.16	40.13	36.35	38.21	53.22※	49.02	55.53※	48.23
		0.02★	58.63	49.42□	57.14	57.89	64.12	65.31	65.25	64.89
		0.04	75.35	77.33	70.54	74.41	89.12	82.53	88.24	86.63
		0.08	90.38	90.75	90.96	90.70	89.94	90.93	91.89	90.92
对硫磷	0.02	0.005	35.45	38.25	41.57	38.42	25.12	36.18	27.58	29.63
		0.01★	55.12	54.23	57.39	55.58	50.24	45.24□	49.57□	50.24
		0.02	68.48	70.14	72.12	70.25	62.15	65.78	66.41	64.78
		0.04	82.82	81.24	80.56	81.54	75.19	77.84	79.15	77.39
苯线磷	0.02	0.005	44.12	45.87	50.75※	45.00	51.81※	47.25	50.85※	47.25
		0.01★	58.12	56.48	57.81	57.47	56.12	55.74	55.12	55.66
		0.02	75.42	76.12	71.45	74.33	80.1	79.45	72.48	77.34
		0.04	89.56	88.15	83.15	86.95	85.25	88.16	87.12	86.84
地虫硫磷	0.02	0.005	34.12	37.24	36.45	35.94	23.45	22.11	24.13	23.23
		0.01★	50.16	52.18	55.17	52.50	47.09□	42.66□	45.24□	45.12□
		0.02	69.15	70.45	62.88	67.49	52.18	55.1	58.42	55.23
		0.04	78.15	80.17	79.86	79.39	72.45	77.12	75.48	75.02
治螟磷	0.02	0.005	40.24	45.79	45.12	43.72	48.12	44.79	46.57	46.49
		0.01★	52.42	55.12	57.41	54.98	58.12	55.48	55.97	56.52
		0.02	64.25	68.45	66.54	66.41	64.79	65.78	70.12	66.90
		0.04	75.48	77.12	74.18	75.59	78.45	77.14	76.12	77.24
硫线磷	0.02	0.0075	42.15	44.18	45.74	44.02	49.12	51.25	52.18	50.85
		0.015★	55.03	59.12	57.14	57.10	55.12	53.16	53.71	54.00
		0.03	65.18	66.14	67.54	66.29	66.97	65.18	67.12	66.42
		0.06	78.16	80.75	86.19	81.70	76.08	77.02	76.14	76.41
氯唑磷	0.01	0.005	34.15	33.14	30.75	32.68	23.15	22.18	27.49	24.27
		0.01★	50.16	52.47	53.89	52.17	40.78□	42.15□	47.16□	43.54□
		0.02	65.12	68.19	67.45	66.92	50.46	57.01	52.19	53.22
		0.04	75.16	77.04	75.41	75.87	60.62	60.87	59.79	60.43
甲拌磷	0.02	0.01	42.75	40.24	45.17	42.72	43.12	44.18	46.12	44.47
		0.02★	50.16	55.74	56.14	54.01	50.12	49.53□	52.57	51.35
		0.04	65.17	66.82	67.15	66.38	65.12	60.18	66.75	64.02
		0.08	75.12	78.06	76.18	76.45	70.12	69.12	75.34	71.53
蝇毒磷	0.05	0.025	36.84	43.79	34.85	38.49	45.18	44.12	46.87	45.39
		0.05★	51.48	55.78	50.14	52.47	54.16	58.72	55.74	56.21
		0.1	68.15	66.97	65.48	66.87	68.92	65.17	66.53	66.87
		0.2	75.12	78.15	80.57	77.95	78.46	77.85	82.19	79.50
硫环磷	0.03	0.005	42.1	49.15	40.24	43.83	46.12	44.19	43.79	44.70
		0.01★	52.18	53.47	53.19	52.95	55.19	56.91	57.84	56.65
		0.02	68.19	64.91	66.75	66.62	68.12	65.47	63.49	65.69
		0.04	80.16	86.17	85.14	83.82	80.45	80.19	80.24	80.29

续表 2

农药	药典定量限/ mg·kg ⁻¹	加标量/ mg·kg ⁻¹	抑制率/%							
			离心式微流控芯片农药残留速测仪				传统农药残留快速测定仪			
			1	2	3	4	1	2	3	4
甲基硫环磷	0.03	0.015	35.12	33.48	37.97	35.52	32.18	25.75	28.96	28.96
		0.03★	50.63	52.17	53.07	52.62	49.95□	50.48	51.36	52.92
		0.06	65.18	66.87	69.12	67.06	59.18	55.18	56.99	57.12
		0.12	80.12	85.14	88.17	84.48	65.75	68.91	66.49	67.05
磷胺(小)	0.05	0.025	42.18	44.97	44.65	43.93	41.87	38.46	42.98	41.10
		0.05★	52.49	57.73	60.15	56.79	48.02□	50.12	54.19	52.16
		0.1	75.12	77.19	76.23	76.18	61.89	62.84	63.11	62.61
		0.2	80.57	82.67	84.75	82.66	75.12	77.12	79.12	77.12
久效磷	0.03	0.005	42.18	40.4	41.36	41.31	45.19	50.13※	50.74※	47.32
		0.01★	51.15	52.45	55.74	53.11	57.24	60.12	59.11	58.82
		0.02	68.15	66.96	67.94	67.68	75.12	70.84	73.19	73.05
		0.04	86.17	82.18	80.85	87.32	88.19	83.62	84.88	85.56
内吸磷	0.02	0.0075	46.17	42.18	50.85※	44.18	38.19	33.62	34.88	35.56
		0.015★	52.97	55.87	53.64	54.16	50.17	55.12	54.16	53.15
		0.03	60.18	66.14	64.56	63.63	64.27	62.87	61.63	62.92
		0.06	75.24	80.94	77.64	77.94	70.86	77.84	75.49	74.73
灭线磷	0.02	0.005	35.12	33.49	38.87	35.83	45.12	48.97	46.74	46.94
		0.01★	51.04	50.89	53.49	51.81	56.12	55.74	59.63	57.16
		0.02	65.17	68.75	67.98	67.30	68.16	65.34	63.18	65.56
		0.04	80.16	78.46	76.34	78.32	88.24	86.14	80.17	84.85
特丁硫磷	0.02	0.0075	36.17	35.17	34.93	35.42	34.97	33.87	33.17	34.00
		0.015★	50.17	52.75	53.67	52.20	48.11□	45.17□	50.08	51.09
		0.03	65.76	68.71	69.91	68.13	58.97	55.16	60.17	58.10
		0.06	82.17	80.75	85.14	82.69	68.16	70.19	66.44	68.26
水胺硫磷	0.05	0.025	44.12	42.71	46.89	44.57	42.57	44.85	50.54※	43.71
		0.05★	52.17	56.29	55.68	54.71	60.18	58.17	61.25	59.87
		0.1	68.04	64.19	65.87	66.03	70.18	72.64	71.08	71.30
		0.2	85.17	80.27	83.64	83.03	90.86	92.15	89.52	90.84
甲基异柳磷	0.02	0.005	38.27	40.75	37.18	38.73	32.18	33.48	38.64	34.77
		0.01★	51.07	50.73	50.17	50.66	45.01□	46.88□	42.18□	47.14□
		0.02	59.64	66.18	53.64	59.82	53.46	55.72	50.67	53.28
		0.04	75.98	80.15	79.34	78.49	68.75	69.86	70.84	69.82
克百威 (呋喃丹)	0.05	0.005	40.72	33.86	35.96	36.85	35.48	40.61	43.17	39.75
		0.01★	55.17	56.17	53.09	54.81	50.17	56.49	57.12	54.59
		0.02	70.24	68.16	69.14	69.18	65.19	66.24	64.18	65.20
		0.04	85.20	92.41	90.48	89.36	75.94	76.87	82.57	78.46
涕灭威	0.1	0.005	52.49※	33.17	44.86	39.02	50.87※	42.19	43.66	42.93
		0.01★	50.17	55.67	53.19	53.01	55.59	57.98	60.15	57.91
		0.02	65.93	64.92	63.82	64.89	65.18	72.18	71.99	69.78
		0.04	92.76	93.64	96.49	94.30	90.12	90.48	92.74	91.11

注：★为本方法检出限；※为假阴性样品；□为假阳性样品。

Note: ★ was limit of detection this method; ※ was false negative sample; □ was false positive sample.

本研究分别从显著差异、灵敏度、特异性、假阴性、假阳性、相对准确度方面进行综合评价,结果表明方法准确性良好。且离心式微流控芯片农药残留速测仪的准确度优于传统农药残留快速测定仪,对比结果见表3。

表3 2种农药残留快速检测仪准确度综合评价
Tab. 3 Comprehensive evaluation of accuracy by two rapid pesticide residue detectors

检测仪	显著性差异	灵敏度/%	特异性/%	假阴性率/%	假阳性率/%	准确度/%
离心式微流控芯片农药残留速测仪	0.25	99.6	96.4	0.39	3.57	98.81
传统农药残留快速测定仪	3.70	92.46	90.48	7.54	9.52	91.96

3.6 重复性考察

采用阴性样品加标法,以未喷洒农药的铁皮石斛(干品)为加标对象,按快速检测法操作提取待测液,选择药材中常检出的克百威(氨基甲酸酯类)和甲胺磷(有机磷类)加标,加标量均在本方法的0.5, 1, 2, 4倍LQD,分别用离心式微流控芯片农药残留速测仪和传统农药残留快速测定仪检测,每种质量浓度重复4次试验考察重复性,结果表明,离心式微流控芯片农药残留速测仪和传统农药残留快速测定仪结果一致,方法重复性良好。结果见表4。

3.7 时效性考察

本研究对比了离心式微流控芯片农药残留速测仪、传统农药残留快速测定仪及目前药典使用

的农药残留质谱检测仪,3种仪器检测的时效性及性能见表5。结果表明,离心式微流控芯片检测仪直接将农药残留检测试剂预存储于芯片内部,无需现场配制溶液;一次性可检测24个样品,检测样本量为传统农药残留快速测定仪的2倍;检测时间仅为传统农药残留快速测定仪的一半,更是比药典质谱方法耗时缩短至1/5,显著提高检测效率;极大降低了试剂的消耗量,同时分析产生的废液极少;操作简便、高效,能够满足农药残留现场快速检测需求。

4 讨论

本实验开发的微流控农药残留芯片快速检测方法操作简便,不受场地限制,且准确度高、重复性好,该方法检测范围涵盖了中国药典2020年版33种禁用农药残留中所有的有机磷、氨基甲酸酯类农药及其代谢物残留筛查,能够在基层监测站、种植基地和流通市场使用微流控农药残留速测方法并对铁皮石斛农药残留进行实时测量,不仅对种植区减少农药的使用量及合理使用农药进行病虫害的防治起到监督作用,还为基层药材的监督管理工作提供技术支撑,为流通市场中药材安全性评价方面提供保障。此实验样品选用了经济价值高且药用部位较多铁皮石斛,并对其干品、鲜品(茎、叶、花)农药残留进行了综合研究,为该快速检测技术运用到其他方面的中药材检测指标奠定基础,从而实现中药材农药残留的全自动、高通量以及现场、快速、准确检测。

表4 2种农药残留快速检测仪对2种农药检测结果的重复性考察
Tab. 4 Repetitive inspection of detection of two pesticides detection results by two rapid pesticide residue detectors

农药	加标量/ mg·kg ⁻¹	离心式微流控芯片农药残留速测仪					传统农药残留快速检测测定仪				
		抑制率/%				RSD/%	抑制率/%				RSD/%
		1	2	3	4		1	2	3	4	
甲胺磷	0.05	42.14	40.15	38.97	36.12	6.40	45.92	38.56	37.16	36.64	11.61
	0.01	60.23	59.88	59.76	59.76	0.37	53.14	51.82	50.64	50.45	2.41
	0.02	77.31	75.35	70.37	71.12	4.54	85.11	82.34	85.24	79.12	3.48
	0.04	92.15	91.23	90.12	90.44	1.00	95.12	94.32	90.02	92.94	2.41
克百威	0.05	40.04	39.22	38.53	36.72	3.66	45.92	42.56	35.16	32.56	15.98
	0.01	56.39	56.17	53.09	53.83	3.02	57.62	56.29	51.62	52.34	5.39
	0.02	70.24	68.16	69.14	67.21	1.89	65.19	61.24	64.18	63.12	2.66
	0.04	92.41	91.45	90.68	85.02	3.70	82.57	76.87	81.57	83.57	3.65

表5 3种农药残留检测方法时效性及性能考察
Tab. 5 Study on the timeliness and performance of three pesticide residue detection methods

方法	试剂	操作步骤	检测效率/次	检测时间/min	待测液用量/ μ L
离心式微流控芯片法	预存储	进样后自动完成	24个样本	10	120
传统农药残留快速测定法	现配	需在烘箱温浴10 min,加3次反应试剂	6~12个样本	20~30	2 800
气质液质法	/	质谱调谐后进行	1个样本	60	10

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 239-279.
- [2] GAI Y H. Experimental study on the detection of pesticide residues in vegetables by gas chromatography[J]. Mod Food(现代食品), 2022, 28(3): 130-132, 137.
- [3] XU H, LIN A Q, GU L, et al. A multiresidue method for the determination of 107 Pesticides residues in fruits and vegetables by GC-MS[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2004, 23(3): 34-38, 42.
- [4] LI D X, ZHOU J, YAO H, et al. Determination of 327 pesticide residues in vegetables by HPLC-MS/MS with dynamic multi-reaction monitoring[J]. China Fruit & Veg(中国果菜), 2022, 42(6): 36-51.
- [5] LUO J X, ZHANG G, SHEN Z B, et al. Research progress of the application of colloidal gold immunochromatography in the detection of pesticide residues[J]. Qual Saf Agro Prod(农产品质量与安全), 2022(1): 41-49.
- [6] 易幸. 农药残留快速检测酶抑制法局限性探讨[J]. 中国蔬菜, 2021(2): 10-12.
- [7] 吕朝妮. 一种基于微流控芯片的农药残留检测方法: 中国, CN109270280A[P]. 2020-12-22.
- [8] YE J M, SHAO J M, YANG P, et al. Fabrication and application of centrifugal microfluidic chip for rapid detection of pesticide residues[J]. Food Sci(食品科学), 2017, 38(12): 292-297.
- [9] XU J B, CAI L L. Development status of rapid detection of pesticide residues and application prospect of microfluidic technology in rapid detection of pesticide residues[J]. J Agric Catastrophology(农业灾害研究), 2022, 12(3): 161-163, 166.
- [10] YUAN B L, WANG X D, YANG P, et al. Fabrication and analytical application of microfluidic chip for rapid on-site detection of pesticide residues[J]. Food Sci(食品科学), 2016, 37(2): 198-203.
- [11] WANG X D, QIAO Q W, SONG Z Q, et al. Design of fully-integrated centrifugal microfluidic chip for rapid detection of pesticide residues[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2021, 47(15): 276-279.

收稿日期: 2022-08-02
(本文责编: 陈怡心)