

毒死蜱等 10 种农药多残留快速检测芯片研究

赵颖 王双节 柳颖 焦沙沙 邹茹冰 方一画 郭逸蓉* 朱国念

(浙江大学农药与环境毒理研究所, 农业部作物病虫害分子生物学重点实验室, 杭州 310029)

摘 要 以醛基修饰的载玻片为固相载体, 农药竞争抗原为包被抗原, 胶体金为标记材料, 抗农药单克隆抗体为识别元件, 银增强试剂用于放大信号, 建立了一种含有 10 对包被抗原与农药抗体组合的免疫芯片, 可同时检测农产品中毒死蜱、三唑磷、克百威、噻虫啉、吡虫啉、多菌灵、异菌脲、涕灭威、甲氰菊酯和百菌清共 10 种农药。对胶体金标记探针、包被抗原与农药抗体组合等免疫芯片反应条件进行了优化。本方法对 10 种农药的检出限(IC_{20})达到 1.49 ~ 15.72 $\mu\text{g/L}$, 检测仅需 1.5 h。将此芯片方法应用于水果(苹果)、蔬菜(黄瓜)以及茶叶(红茶)中的 10 种农药残留检测, 其最低检出量可满足相应作物中的农药最大残留限量(MRL)检测要求, 且此芯片检测方法具有较高的准确度和精密度, 农药的添加回收率为 82.1% ~ 120.8%, 批内相对标准偏差 $RSD \leq 10.4\%$, 批间 $RSD \leq 12.1\%$, 与质谱仪检测结果的相关系数大于 0.9591。本研究为农药多残留快速检测分析提供了技术支持, 具有良好的实用价值。

关键词 农药多残留; 快速检测; 免疫芯片; 胶体金; 竞争反应

1 引言

发展食品中农药残留的检测技术, 对保障食品安全和消费者健康、保护生态环境具有非常重要的意义。常用的农药残留检测技术为色谱法、质谱法等仪器方法^[1~6], 准确率高, 可实现定性定量分析, 但其耗时长、检测成本高, 对检测人员技能要求高, 而农药残留快速检测技术可以弥补这些不足。常见农药残留快速检测方法包括酶抑制法和免疫分析方法。其中, 酶抑制法已列入国家标准, 但其检测对象仅限于有机磷及氨基甲酸酯类杀虫剂, 这两类农药在农业生产中已较少使用, 因而存在一定的局限性。免疫分析方法主要基于抗原抗体反应, 其检测的农药范围比酶抑制法更宽, 检测快速, 特异性强, 灵敏度高。

常见的免疫分析方法主要包括酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫侧流层析试纸法。Liu 等^[7]建立了间接竞争性 ELISA 定量检测果蔬中苯醚甲环唑的方法, 最低检出量达 229 $\mu\text{g/kg}$; Ma 等^[8]建立了 ELISA 法检测蜂蜜样品中的吡虫啉和噻虫嗪残留, 最低检出量为 20 $\mu\text{g/kg}$ 和 5 $\mu\text{g/kg}$; Chen 等^[9]建立了量子点-链霉亲和素偶联物快速灵敏竞争荧光 ELISA 方法, 用于饮用水中毒死蜱检测, 灵敏度较常规 ELISA 提高了 5.5 倍。对于 ELISA 法, 一种试剂盒通常只能检测一种或两种农药。随着胶体金、量子点、荧光微球等多种纳米材料被适为标记物, 试纸免疫侧流层析法在农药残留检测中的应用研究日益增多^[10]。Liu 等^[11]将胶体金试纸技术, 用于三唑磷和对硫磷农药检测, 检测灵敏度分别为 50 和 100 $\mu\text{g/L}$; Wang 等^[12]将量子点试纸技术应用于吡虫啉、氯噻啉、噻虫胺农药检测, 检出限为 0.10 ~ 0.33 $\mu\text{g/L}$; Zhang 等^[13]将时间分辨免疫层析技术用于检测克百威, 检出限达 0.04 ~ 0.76 $\mu\text{g/L}$ 。虽然免疫层析试纸的制备成本低, 便于携带, 现场检测方便, 但由于其空间局限性, 一条试纸不易设置 5 条以上的测试线^[14], 故一般检测农药的种类小于 5 种^[15]。因此, 亟需研发能实现更多种农药残留同时快速定性定量检测的分析方法。

免疫芯片是以抗原-抗体特异性结合反应为基础的蛋白芯片, 是将几个、几十个甚至更高通量的抗原或抗体微量化, 以点阵式高密度排列于载体芯片, 通过特异性免疫反应捕获待测样品中的靶分子, 检测靶分子的含量^[16]。免疫芯片技术已应用于生物医学的疾病诊断、蛋白质功能鉴定、微生物致病菌鉴定方面, 并逐渐拓展到环境监测、食品卫生与质量安全控制等方面^[17]。近年来, 免疫芯片技术已被用于

2019-01-30 收稿; 2019-09-24 接受

本文系国家重点研发计划项目 (Nos. 2017YFF0210200, 2016YFD0201302)、浙江省公益技术应用研究项目 (No. 2016C32004) 和国家自然科学基金项目 (No. 31871994) 资助

* E-mail: yirongguo@zju.edu.cn

小分子污染物的检测中,主要采用固定包被抗原的竞争免疫反应模式,使用的芯片载体有琼脂糖玻片、醋酸纤维膜和 CD 光盘,检测对象有兽药^[18]、真菌毒素^[19]、农药^[20,21]等,但目标测试物通常不超过 10 种,且大都局限于环境水样的检测,尚未将免疫芯片技术应用于畜产品、农产品等复杂基质样本。这可能是由于复杂样品基质对不同抗原-抗体反应的干扰程度不同,当多个免疫反应同时在均相统一的体系条件下进行,会影响个别反应的灵敏度,或者部分抗原-抗体有交叉识别现象。因此,目前关于农产品基质中农药多残留检测免疫芯片技术的报道较少。本课题组前期建立的基于金增强的间接竞争免疫芯片技术用于检测蔬果中呋喃丹等 7 种农药^[22],采用 QuEChERS 方法进行样品提取与净化,从而降低基质干扰,但该研究采用硝酸纤维膜为非共价结合吸附载体,包被抗原固定程度易受反应体系(如 pH 值、盐离子强度)的影响,且漂洗过程存在膜易破损、不便操作等缺点。

本研究选择玻片为载体,在其表面进行醛基修饰,将包被抗原以共价键结合固定于载体上,更加稳定,并建立了毒死蜱等 10 种常见农药多残留的免疫芯片检测方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司); PHS-3C pH 计(上海雷磁环保工程公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); Allegra 64R 台式高速离心机(美国 Beckman 公司); GB500-X 芯片点样仪(爱尔兰 PolyPico Technologies 公司); 图像扫描仪(日本 EPSON 公司); Analysis Only 4100 芯片数据分析软件(美国 GenePix Pro 公司); Agilent 7000C 气相色谱串联质谱仪(GC-MS/MS,美国 Agilent 公司); 超高效液相色谱串联质谱仪(UPLC-MS/MS,美国 Waters 公司)。

氯金酸、柠檬酸三钠、*N*-羟基丁二酰亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)、银增强液 A 和银增强液 B、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇(PEG)、邻苯二胺(OPD)、*N*-丙基乙二胺(PSA)(美国 Sigma-Aldrich 公司),其它试剂均为分析纯(国药集团化学试剂公司)。脱脂奶粉(上海光明乳业公司); 8 mg/mL 羊抗鼠 IgG(二抗,上海捷宁生物公司); 琼脂糖(北京 Solarbio 公司); 芯片围栏(北京博奥生物公司); 载玻片(浙江同力信息科技公司)。实验用水为超纯水(18.2 MΩ cm)。

毒死蜱、三唑磷、甲氰菊酯、克百威、噻虫啉、吡虫啉、百菌清、多菌灵、涕灭威、异菌脲标准品(100 μg/mL,中国农业科学院天津环境保护科研监测所); 百菌清、多菌灵、涕灭威、异菌脲的包被抗原和农药相应的抗体购于无锡杰圣杰康生物科技有限公司,其它包被抗原和农药相应的抗体由本实验室制备。

苹果、黄瓜、红茶样品购于本地超市。

2.2 醛基玻片制备

载玻片先用超纯水清洗,再将其完全浸没于食人鱼刻蚀液(98% H₂SO₄-30% H₂O₂ = 3:1, V/V), 80℃处理 40 min,然后用超纯水清洗 3 次,氮气吹干。

将氨基硅烷化后的玻片放入含 3% ~ 4% (V/V) 戊二醛的磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)中,室温下浸泡 2 h,取出后先用 PBS 清洗 3 次,然后用超纯水漂清洗 3 次,氮气吹干,于 4℃干燥保存,备用。

2.3 胶体金及金标二抗探针的制备

以金标二抗为信号探针,采用经典的柠檬酸三钠还原法制备 20 nm 胶体金^[23]用于标记二抗。采用盐沉淀法和吸光度法,进行胶体金标记体系 pH 值和最适标记量优化^[24]。在二抗标记浓度为 80 mg/L 条件下,用 0.1 mol/L K₂CO₃调节胶体金溶液 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 和 9.5,筛选最适标记 pH 值;在最适 pH 条件下,进行胶体金最适标记量优化,分别设置 10、20、40、80 和 100 mg/L 的二抗标记浓度,筛选最适标记量。按照文献[24]的方法,在最适条件下,制备金标二抗探针。

2.4 芯片点样与检测方法

(1)点样 将各农药包被原用 30% 甘油-0.05 mol/L CBS (pH 9.6)缓冲液稀释后,用微量点样仪点

样包被于醛基化玻片上(3 nL/点,冷冻干燥 2 h),10 种农药包被抗原在醛基玻片上的排布阵列如图 1 所示;(2)芯片围栏分区 将芯片围栏黏贴在相应的区域,0.05% Tween-20-0.01 mol/L PBS (PBST)洗涤 2 次;(3)封闭 5%脱脂奶粉-PBS,100 μL/孔,37℃ 孵育 30 min,PBST 洗涤 2 次;(4)一抗反应 加入抗体和待测样品(农药标准品或水果、蔬菜、茶叶等提取液),10 种抗体稀释液和待测样品各 25 μL/孔,振荡混匀后,37℃ 孵育 30 min, PBST 洗涤 2 次;(5)金标二抗反应 加入金标二抗 20 倍稀释液(100 μL/孔),37℃ 孵育 30 min,用 PBST 和超纯水各洗涤 1 次;(6)银增强反应 加入银增强 A 液和 B 液等体积混合液,100 μL/孔,室温孵育 15 min,超纯水洗涤 2 次;(7)芯片扫描 将芯片置于图像扫描仪进行扫描成像,用 Adobe photoshop 7.0.1 生成 16 位灰度图,将所得图片置于芯片数据分析软件中获得每个检测区域的信号值,用于定量计算;(8)数据分析 采用芯片数据分析软件计算每个检测点的信号值和背景值,扣除背景值后得到相对信号值。抑制率(Inhisation rate (%))的计算见公式(1):

$$I(\%) = \frac{S_b - S_s}{S_b} \times 100\%$$

(1)

其中, I 为抑制率, S_b 为空白样品的信号值; S_s 为检测样品的信号值。以抑制率为纵坐标,农药浓度对数为横坐标绘制标准曲线,并计算抑制率 IC_{50} 。

2.5 实际样品分析

用甲醇将毒死蜱等 10 种农药标准品进行梯度稀释,将农药混合标样分别添加于黄瓜、苹果、红茶空白样品(经质谱仪检测,毒死蜱等 10 种农药的初始残留量均小于仪器检测限)中。

芯片检测:采用简化的 QuEChERS 法^[21]对待测样品进行快速前处理。称取水果、蔬菜样品 10 g(茶叶样品 1 g,加入 10 mL 超纯水浸泡 10 min),加入 10 mL 乙腈,振荡提取 3 min,加入 1 g NaCl 和 5 g 无水 $MgSO_4$,振荡提取 3 min,4000 r/min 离心 5 min。取 5 mL 上清液,加入 0.1 g PSA,静置 30 min 后,吸取 2 mL 上清液,氮气吹干,用反应缓冲液(20% 甲醇-PBS)定容,过 0.22 μm 有机滤膜后待测。采用 2.4 节的方法进行测定。

仪器检测:黄瓜、苹果和红茶样品中 10 种农药残留的前处理与检测方法参照中华人民共和国农业行业标准 NY/T761-2008^[25],其中噻虫啉、多菌灵、吡虫啉和涕灭威 4 种农药用 UPLC-MS/MS 检测,其余 6 种农药用 GC-MS/MS 检测。

3 结果与讨论

3.1 芯片的包被抗原与农药抗体工作浓度优化

采用 10 组包被抗原-农药抗体组合,分别为毒死蜱-OVA,三唑磷-OVA,克百威-OVA,噻虫啉-OVA,吡虫啉-HRP,多菌灵-BSA,异菌脲-BSA,涕灭威-BSA,甲氧菊酯-BSA,百菌清-BSA 和相应的农药抗体组合,一个阵列组合中包含以上 10 种包被抗原,一张玻片包含 7 个阵列组合。免疫芯片反应过程如图 2 所示。

为实现各组包被原-抗体反应均获得较高的信号响应、灵敏度和特异性,根据芯片检测点的扫描分析数据,最终确定芯片中包被抗原-农药抗体工作浓度。其中,包被抗原在免疫芯片上的点样浓度为 0.02 ~ 1.00 g/L,一抗浓度为 0.20 ~ 5.00 mg/L;将 50 mg/L 二抗用于胶体金标记,反应时金标探针稀释 20 倍。优化得到包被抗原-农药抗体组合浓度见表 1。

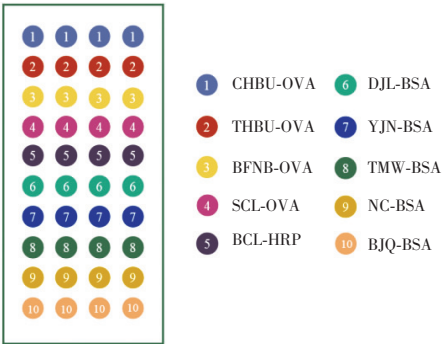


图 1 免疫芯片上 10 种包被原分布

Fig. 1 Distribution of 10 kinds of coating antigens on the immunochip

注:1~10 包被原分别为毒死蜱、三唑磷、克百威、噻虫啉、吡虫啉、多菌灵、异菌脲、涕灭威、甲氧菊酯和百菌清的包被原 1~10, Coating antigen of chlorpyrifos (CHBU-OVA), triazophos (THBU-OVA), carbofuran (BFNB-OVA), thiacloprid (SCL-OVA), imidacloprid (BCL-HRP), carbendazol (DJL-BSA), iprodione (YJN-BSA), aldicard (TMW-BSA), fenpropathrin (NC-BSA) and chlorothalonil (BJQ-BSA); BSA, bovine serum albumin; OVA, ovalbumin

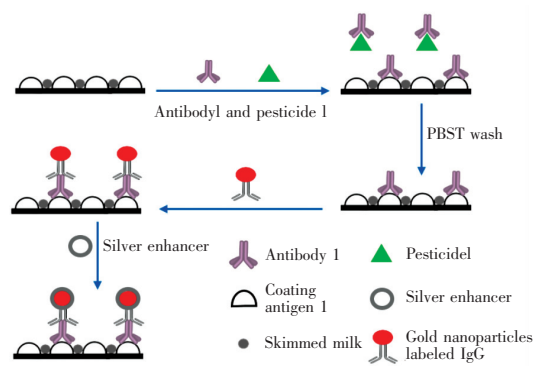


图 2 免疫芯片反应步骤

Fig. 2 Steps of reaction of immunochip

表 1 包被抗原和农药抗体工作浓度优化结果

Table 1 Optimized working concentrations of coating antigens and antibodies against corresponding pesticides			
农药 Pesticide	包被原 Coating antigen	包被抗原点样浓度 Coating antigen concentration (g/L)	农药抗体浓度 Antibody concentration (mg/L)
毒死蜱 Chlorpyrifos	CHBU-OVA	0.10	0.31
三唑磷 Triazophos	THBU-OVA	0.10	0.62
克百威 Carbofuran	BFNB-OVA	0.10	2.00
噻虫啉 Thiacloprid	SCL-OVA	0.02	0.62
吡虫啉 Imidacloprid	BCL-HRP	0.25	1.00
多菌灵 Carbendazol	DJL-BSA	0.10	0.20
异菌脲 Iprodione	YJN-BSA	0.50	0.62
涕灭威 Aldicard	TMW-BSA	1.00	5.00
甲氧菊酯 Fenpropathrin	NC-BSA	0.08	0.30
百菌清 Chlorothalonil	BJQ-BSA	0.10	0.50

3.2 免疫芯片方法的分析性能

采用 10 种农药的系列标准溶液进行测试,通过芯片扫描仪成图并获取信号值进行定量分析,得出 10 种农药的抑制中浓度(IC_{50})、标准曲线方程($R^2>0.96$)和线性范围见表 2,芯片测试扫描图见图 3。

表 2 免疫芯片检测 10 种农药的标准曲线及灵敏度

Table 2 Standard curve and sensitivity of immunochip detection for 10 kinds of pesticides				
农药 Pesticide	回归方程 Regression equation	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	线性范围 Linear range (IC_{20} - IC_{80}) ($\mu\text{g/L}$)	ELISA IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)
毒死蜱 Chlorpyrifos	$y=12.820\ln(x)+16.497$	13.64	1.31~141.66	7.99
三唑磷 Triazophos	$y=10.378\ln(x)+45.883$	1.49	0.08~26.77	0.85
克百威 Carbofuran	$y=12.881\ln(x)+27.349$	5.80	0.57~59.59	5.57
噻虫啉 Thiacloprid	$y=10.064\ln(x)+22.277$	15.72	0.80~309.70	13.29
吡虫啉 Imidacloprid	$y=12.148\ln(x)+37.210$	3.16	0.28~36.40	2.34
多菌灵 Carbendazol	$y=12.042\ln(x)+30.379$	5.10	0.42~61.60	2.95
异菌脲 Iprodione	$y=13.608\ln(x)+24.309$	6.97	0.70~68.81	10.37
涕灭威 Aldicard	$y=16.222\ln(x)+27.739$	3.94	0.62~25.07	3.11
甲氧菊酯 Fenpropathrin	$y=15.129\ln(x)+14.194$	10.66	1.47~77.45	5.33
百菌清 Chlorothalonil	$y=10.961\ln(x)+36.420$	3.45	0.22~53.30	3.60

结果表明,以醛基玻片为固相载体构建的免疫芯片方法,对各农药的 IC_{50} 与采用同样包被抗原和农药抗体建立的间接竞争 ELISA 方法对各农药的 IC_{50} 相当,且接近于本研究组前期建立的膜芯片法^[22]。本方法以 IC_{20} 为检出限,以黄瓜中毒死蜱农药残留为例,其 $IC_{20}=1.31\text{ }\mu\text{g/L}$,黄瓜样品提取需要 10 倍稀释,则理论最低检出量为 $13.1\text{ }\mu\text{g/kg}$,可满足黄瓜中毒死蜱最大残留限量 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的检测要求^[26,27];同理,其它 9 种农药的最低检出量也可满足黄瓜中 MRL 检测要求。

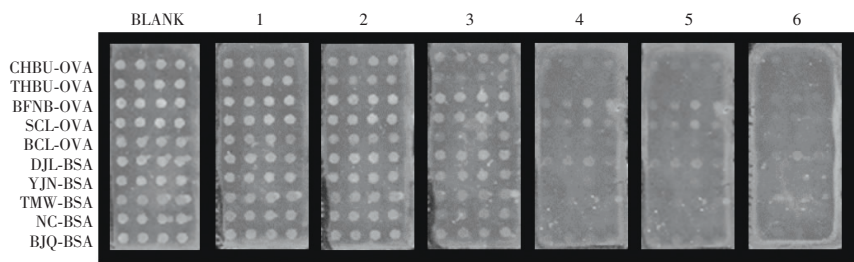


图 3 免疫芯片对 10 种农药的检测结果

Fig. 3 Immunochip detection results of 10 kinds of pesticides

自左向右依次为空白参照、农药低浓度到高浓度处理组，三唑磷、克百威、噻虫啉、吡虫啉、多菌灵、异菌脲、涕灭威、百菌清的农药浓度为 0、0.21、0.83、3.32、13.28、53.16 和 212.5 μg/L；毒死蜱和甲氰菊酯的农药浓度为 0、0.83、3.32、13.28、53.16、212.5 和 847.5 μg/L。各包被原对应农药见表 1

The test samples from left to right were blank reference, low concentration of pesticides to high concentration. Pesticide concentrations of triazophos, carbofuran, thiabendaline, imidacloprid, carbendazim, isomyzuron, aldicarb and chlorothalonil were 0, 0.21, 0.83, 3.32, 13.28, 53.16 and 212.5 μg/L. Pesticide concentrations of chlorpyrifos and fenpropathrin were 0, 0.83, 3.32, 13.28, 53.16, 212.5 and 847.5 μg/L. The corresponding pesticides of antigens are the same as in Table 1

3.3 样品的基质效应

免疫芯片用于检测苹果、黄瓜、红茶样品中的 10 种农药,需首先考察样品基质对检测结果的干扰程度,通常采用样品稀释法降低基质效应。本研究采用简化的 QuEChERS 法对待测样品进行提取、净化、浓缩和定容,根据最终定容体积可计算出样品基质的稀释倍数。设置样品稀释系列梯度(1、10、20 和 40 倍),进行各基质不同稀释倍数下的 10 种农药的芯片法检测,实验结果表明,黄瓜样品稀释 10 倍,苹果和茶叶样品稀释 20 倍,其基质干扰可忽略,不影响方法的检出限。因而,样品提取净化后取 2 mL 上清液,氮气吹干,黄瓜样品采用 20 mL 的反应缓冲液定容(10 倍稀释),苹果和茶叶样品采用 40 mL 的反应缓冲液定容(20 倍稀释)。以蔬菜样品(黄瓜)为例,其添加回收率及批内批间差异见表3。苹果、黄瓜、

表 3 10 种农药在黄瓜中的添加回收率

Table 3 Recoveries of 10 kinds of pesticides in cucumber samples

农药种类 Pesticide	添加浓度 Added (μg/kg)	检测浓度 Found (μg/kg)	回收率 Recovery (%, n=3)	批内相对标准偏差 Intra-batch RSD (%, n=3)	批间相对标准偏差 Inter-batch RSD (%, n=3)
毒死蜱 Chlorpyrifos	15	12.93	86.2±3.0	3.5	4.4
	50	47.59	95.2±9.2	9.7	6.3
	250	243.90	97.6±12.5	12.8	4.5
三唑磷 Triazophos	15	16.64	110.9±5.8	5.2	7.4
	50	49.26	98.5±5.5	5.6	11.4
	500 *	435.63	87.1±7.3	8.4	8.9
克百威 Carbofuran	15	12.66	84.4±3.4	4.0	5.1
	50	48.16	96.3±8.8	9.2	6.9
	500	461.32	92.3±5.2	5.7	12.1
噻虫啉 Thiacloprid	15	16.41	109.4±4.2	3.8	7.3
	50	46.15	92.3±4.6	5.0	11.3
	500	439.35	87.9±4.2	4.8	5.5
吡虫啉 Imidacloprid	15	16.89	112.6±4.8	4.3	6.4
	50	49.13	98.3±5.1	5.2	10.1
	250	231.14	92.5±3.0	3.3	5.1
多菌灵 Carbendazol	15	15.81	105.4±15.6	14.8	8.1
	50	51.39	102.8±9.0	8.8	10.0
	500	488.68	97.7±5.6	5.7	10.4
异菌脲 Iprodione	15	16.49	109.9±6.0	5.5	5.4
	50	44.06	88.1±5.2	5.9	6.5
	500	456.73	91.4±4.6	5.0	7.4

续表 3(Continued to Table 3)

农药种类 Pesticide	添加浓度 Added (μg/kg)	检测浓度 Found (μg/kg)	回收率 Recovery (%, n=3)	批内相对标准偏差 Intra-batch RSD (%, n=3)	批间相对标准偏差 Inter-batch RSD (%, n=3)
涕灭威 Aldicard	15	14.70	98.0±6.3	6.5	5.7
	50	44.73	89.5±5.3	5.9	5.0
	250	233.97	93.6±10.0	10.7	8.3
甲氰菊酯 Fenpropathrin	15	15.62	104.2±8.6	8.3	6.2
	50	47.17	94.3±4.4	4.6	10.3
	500	438.87	87.8±6.1	7.0	7.2
百菌清 Chlorothalonil	15	16.41	109.4±11.6	10.6	5.8
	50	46.52	93.0±9.7	10.4	6.3
	500	495.89	99.2±4.6	4.7	9.6

注：“*”表示三唑磷 500 ng/g 添加浓度档超出了三唑磷的芯片检测线性范围,因而检测分析时需将待测液再稀释 2 倍。
Note: “*” means that the concentration range of triazophos 500 ng/g is beyond the linear range of triazophos detection, so it is necessary to dilute the test solution twice.

红茶样品的添加回收率为 82.1% ~ 120.8%,批内相对标准偏差(RSD)为 2.1% ~ 14.8%,批间 RSD 为 3.6% ~ 12.1%,表明基于醛基玻片的农药多残留检测方法具备良好的准确度和精确度,符合农药残留分析的要求,且检测灵敏度符合 3 种农产品的 MRL 要求(MRL 数值见电子版文后支持信息中附表)。

3.4 芯片法与仪器法检测结果的相关性

分别使用免疫芯片方法和液(气)相色谱-质谱联用仪器方法检测苹果、黄瓜、红茶样品上 10 种农药添加回收量(表 3),将两种检测结果进行相关性分析,得到线性回归方程,苹果: $y = 1.0419x - 0.9035$, $R^2 = 0.9730$; 黄瓜: $y = 1.0037x + 2.4689$, $R^2 = 0.9741$; 红茶: $y = 1.0046x + 7.2808$, $R^2 = 0.9591$ 。结果表明,免疫芯片分析方法和质谱分析方法对 10 种农药的检测结果具有良好的相关性,两种检测方法对黄瓜样品检测的相关性曲线见图 4。

4 结论

建立了农药多残留免疫芯片检测体系,并应用于三类农作物和水果(苹果)、蔬菜(黄瓜)、茶叶(红茶)中毒死蜥等 10 种常见农药残留的快速筛查,而且有望应用于其它农产品的农药残留检测。与传统农药残留仪器检测方法相比,此芯片方法具有成本低、前处理方法简单、检测快速、检测农药种类相对较多等优势。

References

1 ZHOU Li, LUO Fen-Jian, ZHANG Xin-Zhong, JIANG Ya-Ping, LUO Zheng-Yun, LIU Guang-Ming, CHEN Zong-Mao. *Journal of Instrumental Analysis*, **2014**, 33(6): 642-647
周利, 罗逢健, 张新忠, 姜亚萍, 楼正云, 刘光明, 陈宗懋. *分析测试学报*, **2014**, 33(6): 642-647

2 ZHU Pan, MIAO Hong, DU Juan, ZHAO Yun-Feng, WU Yong-Ning. *Journal of Food Safety and Quality*, **2013**, 4(1): 3-10
朱盼, 苗虹, 杜娟, 赵云峰, 吴永宁. *食品安全质量检测学报*, **2013**, 4(1): 3-10

3 LIU Yong-Qiang, LIU Sheng, XU Wen-Juan, TIAN Guo-Ning, ZHANG Jin-Ling. *Chinese Journal of Chromatography*, **2017**, 35(9): 941-948
刘永强, 刘胜, 许文娟, 田国宁, 张金玲. *色谱*, **2017**, 35(9): 941-948

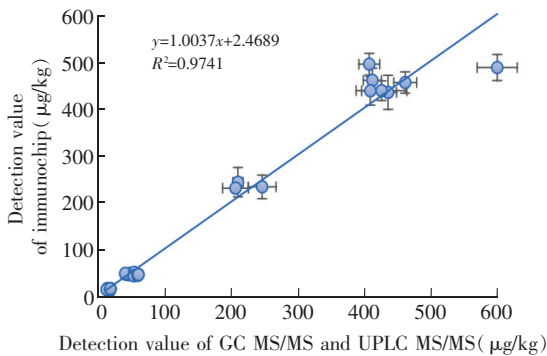


图 4 免疫芯片和质谱仪测定结果的相关性分析(黄瓜样品)
Fig. 4 Correlation of detection results between immunochip assay and MS method (cucumber samples)

- 4 LIANG Xiu-Mei, WANG Xiang-Yun, XUE Xiao-Feng, QI Pei-Pei, LIU Zhen-Zhen, LIU Zhi-Wei, ZHOU Li, WANG Xin-Quan, WANG Qiang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, 45(4): 553–559
梁秀美, 王祥云, 薛晓锋, 齐沛沛, 刘真真, 刘之炜, 周 莉, 王新全, 王 强. 分析化学, **2017**, 45(4): 553–559
- 5 QU Li, LI You, ZENG Jing, SHENG Yong-Gang, YI Xiong-Hai, CHENG Jia. *Chinese Journal of Chromatography*, **2017**, 35(7): 778–784
曲 栗, 李 优, 曾 静, 盛永刚, 伊雄海, 程 甲. 色谱, **2017**, 35(7): 778–784
- 6 GAO Yang, XU Ying-Ming, SUN Yang, QIN Xu. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, **2014**, 31(2): 110–117
高 阳, 徐应明, 孙 扬, 秦 旭. 农业资源与环境学报, **2014**, 31(2): 110–117
- 7 Liu B, Feng J H, Sun X, Sheng W, Zhang Y, Wang S. *Food Anal. Method*, **2018**, 11(1): 119–127
- 8 Ma H X, Xu Y J, Li Q X, Xu T, Wang X T, Li J. *Food Addit. Contam. A*, **2009**, 26: 713–718
- 9 Chen Y P, Ren H L, Liu N, Sai N, Liu X Y, Liu Z, Gao Z X, Ning B A. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58(16): 8895–8903
- 10 SI Fang-Fang, GUO Yi-Rong, ZHAO Ying, GUI Wen-Jun, WANG Meng-Cen, ZHU Guo-Nian. *Chinese Journal of Pesticide Science*, **2017**, 19(4): 409–417
司芳芳, 郭逸蓉, 赵 颖, 桂文君, 王蒙岑, 朱国念. 农药学学报, **2017**, 19(4): 409–417
- 11 Liu B B, Gong H, Wang Y L, Zhang X S, Li P, Qiu Y L, Wang L M, Hua X D, Guo Y R, Wang M H, Liu F Q, Liu X J, Zhang C Z. *Anal. Methods*, **2018**, 10(4): 422–428
- 12 Wang S J, Liu Y, Jiao SS, Zhao Y, Guo Y R, Wang M C, Zhu G N. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65(46): 10107–10114
- 13 Zhang Q, Qu Q Y, Chen S S, Liu X W, Li P W. *Food Chem.*, **2017**, 231: 295–300
- 14 Dzantiev B B, Byzova N A, Urusov A E, Zherdev A V. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2014**, 55: 81–93
- 15 LIU Fu-Xin, DOU Xiao-Wen, YANG Zhi-Xin, LI Qian, LUO Jiao-Yang, FAN Zhuo-Wen, YANG Mei-Hua. *China Journal of Chinese Materia Medica*, **2017**, 42(16): 3056–3064
刘复新, 豆小文, 杨志欣, 李 倩, 骆骄阳, 范卓文, 杨美华. 中国中药杂志, **2017**, 42(16): 3056–3064
- 16 KANG Xi-Xiong. *Qilu Medical Examination*, **2005**, (06): 1–3
康熙雄. 齐鲁医学检验, **2005**, (06): 1–3
- 17 HUANG Qiang-Li, MIN Cheng-Jun, FAN Qiang-Sheng, WEI Xing-Hua. *Meat Industry*, **2013**, (02): 46–48
黄强力, 闵成军, 凡强胜, 魏星华. 肉类工业, **2013**, (02): 46–48
- 18 Gao Z X, Liu N, Cao Q L, Zhang L, Wang S Q, Yao W, Chao F H. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(5): 1445–1450
- 19 Wang Y, Liu N, Ning B A, Liu M, Lv Z Q, Sun Z Y, Peng Y, Chen C C, Li J W, Gao Z X. *Biosens. Bioelectron*, **2012**, 34(1): 44–50
- 20 Dobosz P, Morais S, Bonet E, Puchades R, Maquieira A. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(19): 9817–9824
- 21 Desmet C, Blum L J, Marquette C A. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(23): 10267–10276
- 22 Lan M J, Guo Y R, Zhao Y, Liu Y, Gui W J, Zhu G N. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 938: 146–155
- 23 ZHAO Ying, YANG Bin, LIU Ying, FANG Yi-Hua, SI Fang-Fang, GUO Yi-Rong, CHENG Jing-Li, ZHU Guo-Nian. *Chinese Journal of Pesticide Scienc*, **2016**, 18(3): 337–343
赵 颖, 杨 斌, 柳 颖, 方一画, 司芳芳, 郭逸蓉, 程敬丽, 朱国念. 农药学学报, **2016**, 18(3): 337–343
- 24 Dobosz P, Morais S, Puchades R, Maquieira A. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 69: 294–300
- 25 NY/T761-2008. *Determination of Multi-residues of Organophosphorus, Organochlorine, Pyrethroid and Carbamate Pesticides in Vegetables and Fruits*. Agricultural Industry Standard of the People's Republic of China
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的测定. 中华人民共和国农业行业标准. NY/T761-2008
- 26 GB 2763-2016, *National Food Safety Standard Maximum Residue Limits for Pesticides in Food*. National Standards of the People's Republic of China
食品安全国家标准食品中农药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准. GB 2763-2016

- 27 ZHUANG Wu-Ji. *International Regulations on Pesticide Residues in Food and Feed*. Beijing: Chemical Industry Press, **2010**: 150–867

庄无忌. 国际食品饲料中农药残留限量法规(第三卷). 北京: 化学工业出版社, **2010**: 150–867

Immunochip Assay for Multi-residue Rapid Detection of Ten Kinds of Common Pesticides

ZHAO Ying, WANG Shuang-Jie, LIU Ying, JIAO Sha-Sha, ZOU Ru-Bing,

FANG Yi-Hua, GUO Yi-Rong*, ZHU Guo-Nian

(*Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Molecular Biology
of Crop Pathogens and Insects, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract With aldehyde-modified glass slide as solid phase, pesticide competitive antigens as coating antigens, gold nanoparticles as labeling material, anti-pesticide monoclonal antibodies as recognition elements and silver-enhance reagent as signal amplification, an immuno chip containing 10 combinations of coating antigens and antibodies against corresponding pesticides was developed, which could be used for simultaneous detection of 10 kinds of pesticide residues in agricultural products, including chlorpyrifos, triazophos, carbofuran, thiazoline, imidacloprid, carbendazim, iprodione, aldicarb, fenpropathrin and chlorothalonil. The limits of detection (IC_{20}) of 10 kinds of pesticides were 1.49–15.72 $\mu\text{g/L}$ under the optimized reaction conditions of immuno chip. Moreover, the detection process took only 1.5 h. The chip method was applied to the detection of 10 kinds of pesticide residues in fruits (apples), vegetables (cucumbers) and tea (black tea). The sensitivity of the chip met the national Maximum Residue Limit (MRL) standard of pesticides on corresponding crops. Furthermore, the immuno chip assay had high accuracy and precision, with recoveries of pesticides from 82.1% to 120.8%, and intra-day and inter-day coefficient of variation less than 10.4% and 12.1%, respectively. The results from the immuno chip assay had good correlation with those from mass spectrometer, with R^2 of over 0.9591. This immuno chip assay provided technical support for rapid detection of pesticide residues, and had practical significance for guaranteeing the quality and safety of agricultural products.

Keywords Multiple pesticide residues; Rapid detection; Immuno chip; Gold nanoparticles; Competitive immunoreaction

(Received 30 January 2019; accepted 24 September 2019)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Nos. 2017YFF0210200, 2016YFD0201302), the Zhejiang Public Welfare Technology Application Research Project (No. 2016C32004), and the National Natural Science Foundation of China (No. 31871994).