

基于免疫传感器和激光诱导击穿光谱的痕量农药测量方法

崔友伟^{1,2}, 郑培超¹, 王小发¹, 矫雷子^{2,3}, 董大明^{1,2*}, 吴景^{2*}

1. 重庆邮电大学光电工程学院, 重庆 400065
2. 北京农业智能装备技术研究中心, 北京 100097
3. 广西光电信息处理重点实验室培育基地(桂林电子科技大学), 广西 桂林 541004

摘要 农药在农作物病虫害及农作物高产稳产等方面起到了相当重要的作用,但是农药的长期大量使用,对生态和人类健康造成了极大的危害。根据相关文献查阅,基于免疫传感器和激光诱导击穿光谱的分析方法对农药残留的检测未见相关报道。提出了激光诱导击穿光谱对免疫传感器捕获待测目标物的探针进行检测,从而间接计算出待测目标物的浓度。使用免疫层析试纸条对痕量农药进行检测,虽然免疫层析试纸条可以实现对痕量农药的测量,但是仅能定性且检测的范围很窄,为了拓宽免疫层析试纸条对痕量农药的测量范围,运用激光诱导击穿光谱(laser induced breakdown spectroscopy, LIBS)对免疫层析试纸条上捕获痕量农药的金属纳米颗粒进行光谱测量,构建免疫层析试纸条与 LIBS 的检测方法。以毒死蜱农药为研究对象,因农药残留属于小分子抗原检测,所以免疫层析试纸条运用竞争法对毒死蜱进行检测。滴加了低浓度毒死蜱的免疫层析试纸条上控制线和检测线的颜色差异不明显,难以用人眼分辨出是否检测到了毒死蜱。对添加了毒死蜱的免疫层析试纸条的控制线和检测线分别选取点,测量 Au I 242.733 nm 处的光谱,用控制线的平均光谱强度减去检测线的平均光谱强度即为毒死蜱的信号,此方法可以检测出免疫层析试纸条观察不到的信号,还规避了 LIBS 检测限高的问题。随着毒死蜱浓度从 0 增加到 $10^6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, LIBS 光谱数据差值逐渐增大。为了消除随机误差的影响,使用 ΔLIBS 强度(测量样品强度减去空白样品强度)与毒死蜱浓度取 L_g 绘制校准曲线。 ΔLIBS 强度与毒死蜱浓度在 $10 \sim 10^6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性相关, $Y = 6.14X + 31.85$, $R^2 = 0.969$, 毒死蜱的检测限为 $0.39 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。研究表明,免疫层析试纸条与 LIBS 结合实现了对痕量农药的测量,能有效的扩宽毒死蜱的检测范围。同时,免疫层析试纸条与 LIBS 的结合对其他物质的检测也值得进一步研究。

关键词 免疫层析试纸条; 激光诱导击穿光谱; 农药检测

中图分类号: O433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)07-2275-04

引言

农药在防治农作物病虫害及保证农作物高产稳产起到了相当重要的作用。但是农药的长期大量使用,对生态环境和农作物带来一定程度的污染,而食品质量安全问题特别是农产品中的农药残留问题越来越受到人们的重视,因此对农药检测技术的研究,特别是快速、灵敏准确、简便的检测方法,对保护生态环境、保障人类健康有着重要意义^[1]。

目前农药检测的方法种类繁多,已开展的研究包括气相色谱法、液相色谱、液相色谱-质谱联用法、固相萃取、毛细

管电泳^[2-7]等技术,并取得了一些成果。虽然这些检测结果比较可靠,但是样品前处理繁琐、检测成本高、时间长,需要专门的技术人员,无法满足快速、低成本等实际的需要。

免疫传感器是利用抗原和抗体的特异性反应进而用于检测农药残留,研究工作者构建了大量免疫传感器,如微流控免疫传感器、胶体金免疫分析^[8]等。微流控具有较高的灵敏度,然而由于样品处理、试剂反应等过程复杂,检测周期长,此类传感器在现场检测中的应用较少。胶体金免疫层析试纸条具有时间短、低成本、易于使用,但是免疫层析试纸条的检测限较高,对毒死蜱的检测限为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[8],达不到

收稿日期: 2019-10-21, 修订日期: 2020-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31622040), 广西光电信息处理重点实验室(培育基地)基金项目(GD18204)资助

作者简介: 崔友伟, 1994年生, 重庆邮电大学光电工程学院硕士研究生 e-mail: 13340247074@163.com

* 通讯作者 e-mail: wuj@necita.org.cn; damingdong@hotmail.com

《食品安全国家标准—食品中农药最大残留限量》(GB 2763—2019)中对谷物、油料、蔬菜、水果中毒死蜱的最大残留量 $0.01\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的要求。

为了提高免疫层析试纸条对农药的检测灵敏度,本工作开发了带有 Au 纳米探针的免疫层析试纸条用于检测农药残留,并以毒死蜱为例进行研究。用带有金属纳米探针的免疫层析试纸条与激光诱导击穿光谱技术相结合,构建免疫层析试纸条与激光诱导击穿光谱的新型检测方法。

1 实验部分

1.1 材料

毒死蜱(P-094N 10 mg)、毒死蜱抗体(DSP-Ab(10C6) $7.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、纯度 99.5% 柠檬酸三钠、纯度 99.99% 氯金酸、 $0.2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{K}_2\text{CO}_3$ 购于北京试剂公司,免疫层析试纸条购买于华中农业大学,质量分数为 20% 的 BSA、展开剂受赠于北京师范大学,Au 纳米颗粒实验中制备。

1.2 仪器及参数

使用镭宝公司生产的调 Q Nd:YAG 激光器,型号为 Dawa-2000。基频光波长为 $1\ 064\ \text{nm}$,脉冲激光输出的最大能量为 200 mJ,激光器的脉冲最高重复频率为 20 Hz,脉冲宽度为 $3\sim 5\ \text{ns}$ 。使用美国海洋光学光谱仪 HR2000+,光谱范围为 $200\sim 1\ 100\ \text{nm}$,分辨率为 $0.2\ \text{nm}$,信噪比为 250:1。

实验设置:激光器输出功率 200 mJ,光谱范围 $200\sim 1\ 000\ \text{nm}$,积分时间 2 ms,延迟时间为 $0\ \mu\text{s}$ 。

1.3 方法

制备 Au 纳米溶胶:先在锥形瓶中加入 80 mL 纯净水,再加入质量分数为 1% 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 过滤网过滤的柠檬酸三钠溶液 1.12 mL,放到 MYP11-2A 的磁力搅拌器上搅拌,转速设置为 $1\ 200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,加热至沸腾,加入 $0.8\ \text{mL}\ 99.99\%$ 的稀释 5 倍的氯金酸溶液,继续加热 15 min 后至稳定。

Au 纳米溶胶连接抗体:待 Au 纳米溶胶冷却至室温后,取 1 mL Au 纳米颗粒于试管中,滴加 $14\ \mu\text{L}\ 0.2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{K}_2\text{CO}_3$,调节 pH 为 8.5,此时抗体的活性最高,然后加 $8\ \mu\text{g}$ 的毒死蜱抗体(DSP-Ab(10C6))放到振荡器上震荡 15 min,再加入 $52.5\ \mu\text{L}\ 20\%$ 的 BSA 溶液封闭,减少抗体与纳米颗粒的非特异性结合;放到振荡器上震荡 5 min。把 Au 纳米溶胶连接好的的抗体配平好后放到离心机里,设置转速为 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,时间为 30 min 进行离心;离心后去除上清液,把试管下面的络合物用展开剂溶解并定容至 $300\ \mu\text{L}$,混合均匀待用。

配置毒死蜱溶液与滴加样品:用 PBS 缓冲液配置好 $0\sim 10^6\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的毒死蜱溶液,分别取出 $50\ \mu\text{L}$ 的 Au 纳米溶胶与毒死蜱抗体的络合物和 $50\ \mu\text{L}$ 不同浓度的毒死蜱溶液,滴加到试管里,混合均匀后滴加到免疫层析试纸条的样品垫处,滴加 PBS/PBST 清洗剂到样品垫处清洗直到样品垫处无毒死蜱残留。在室温环境里自然风干,然后把免疫层析试纸条粘贴好待测。

2 结果与讨论

2.1 新型传感器的构建

图 1 为检测原理,图中虚线以上为检测装置,虚线以下为 Au 光谱信号强度、免疫层析纸结构及免疫层析可视化图。检测装置包括 Nd:YAG 激光器、信号延迟发生器、光谱仪、3D 样品台;免疫层析纸条由样品垫、NC 膜、控制线、吸收垫组成。农药残留检测属于小分子抗原检测,待测小分子抗原与金标抗体(Ab1)结合后,由于空间位阻作用,捕获抗体(Ab2)很难再与小分子抗原结合,因此,具有单一抗原表位的小分子抗原检测多采用竞争法免疫层析法检测^[9]。将定量的包被抗原固定在免疫层析试纸条的检测线(T 线)上,受检农药作为半抗原与包被抗原相互竞争金标抗体。将待测液与金标抗体混合均匀后滴加到免疫层析试纸条的样品垫处,通过免疫层析试纸条的层析作用液体向上移动。如果样品中没有待测农药,金标抗体与固定在 T 线上的抗原结合,聚集并在此处呈现一条红线。若样品中有待检农药,待检农药与包被抗原竞争金标抗体,当样品中所含的农药超过一定量时,金标抗体不与包被抗原结合或者很少结合而在检测线处不出现红线。过量的金标抗体继续随着层析作用不断向前移动,到达控制线(C 线)处,与在这里的羊抗鼠 IgG 结合,聚集产生另一条红色的控制线,此处是用来检测金标抗体是否具有活性^[10]。待其干燥后,粘贴好放入 3D 样品台上。通过调节 3D 样品台,在免疫层析试纸条的检测线和控制线上选取合适的位点,随后用激光诱导击穿光谱进行光谱测量,用测得的控制线的平均光谱强度减去检测线的平均光谱强度,得到的差值即为待测物的浓度。

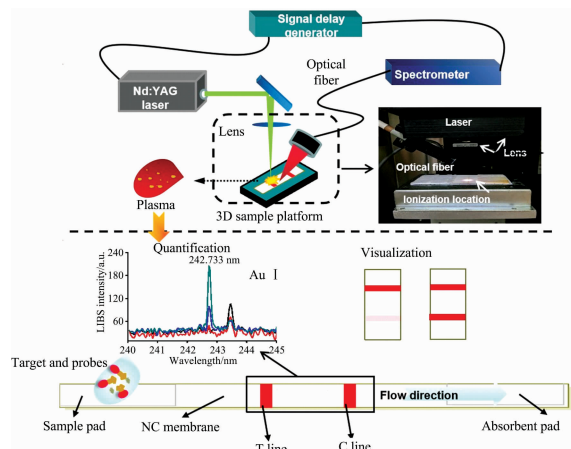


图 1 检测原理图

Fig. 1 Detection schematic diagram

2.2 对毒死蜱的检测效果分析

图 2(a) 所示为滴加了 $10\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 毒死蜱的免疫层析试纸条,C 为控制线,T 为检测线。观察免疫层析试纸条的检测线与控制线的颜色差异,颜色差别很小,目视检测不能观察是否检测到毒死蜱。图 2(b) 所示为 $10\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 毒死蜱的 LBS 检测光谱图,观察 Au I $242.733\ \text{nm}$ 处控制线和检

测线的光谱可以看出,控制线和检测线的光谱差值比较明显,计算出的光谱差值为 41 a. u.。

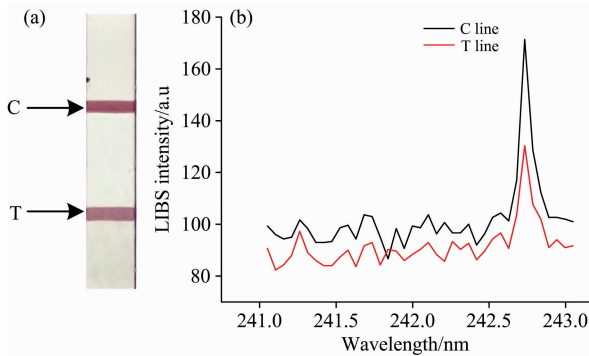


图 2 (a): $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 毒死蜱的免疫层析试纸条;
(b): $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 毒死蜱的 LIBS 检测光谱图

Fig. 2 (a): Immunochromatographic strip of $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Chlorpyrifos; (b): LIBS detection spectrum of $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ chlorpyrifos

2.3 定量分析效果

图 3(a)所示的是不同浓度毒死蜱的免疫层析试纸条,随着毒死蜱浓度从 0 增加到 $10^6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测线的颜色随着加入的毒死蜱浓度增高,检测线的颜色逐渐变浅。图 3(b)所示的是 Au I 242.733 nm 处的 LIBS 光谱数据差值,随着毒死蜱浓度从 0 增加到 $10^6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,LIBS 光谱数据差值逐渐增大。为了消除随机误差的影响,使用 Δ LIBS 强度(测量样品强度减去空白样品强度)与毒死蜱浓度取对数绘制校准曲线,如图 3(c)所示。 Δ LIBS 强度与毒死蜱浓度在 $10 \sim 10^6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性相关, $Y = 6.14X + 31.85$, $R^2 = 0.969$,毒死蜱的检测限为 $0.39 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,达到了国家检测标准的要求。

影响免疫层析试纸条与激光诱导击穿光谱检测方法检测限可能有如下原因:(1)胶体金粒子的大小,20 nm 左右的胶体金粒子可以保证在硝酸纤维素上的展开速度,也可以使免疫试纸条呈现肉眼观察最敏感的颜色;(2)试纸条层析膜的质量影响胶体金粒子的展开速度。

3 结 论

进行了免疫层析试纸条与 LIBS 联用检测毒死蜱农药残留的检测方法的研究。通过免疫层析试纸条与 LIBS 联合的检测方法对农药残留的检测和分析,结果显示:免疫层析试

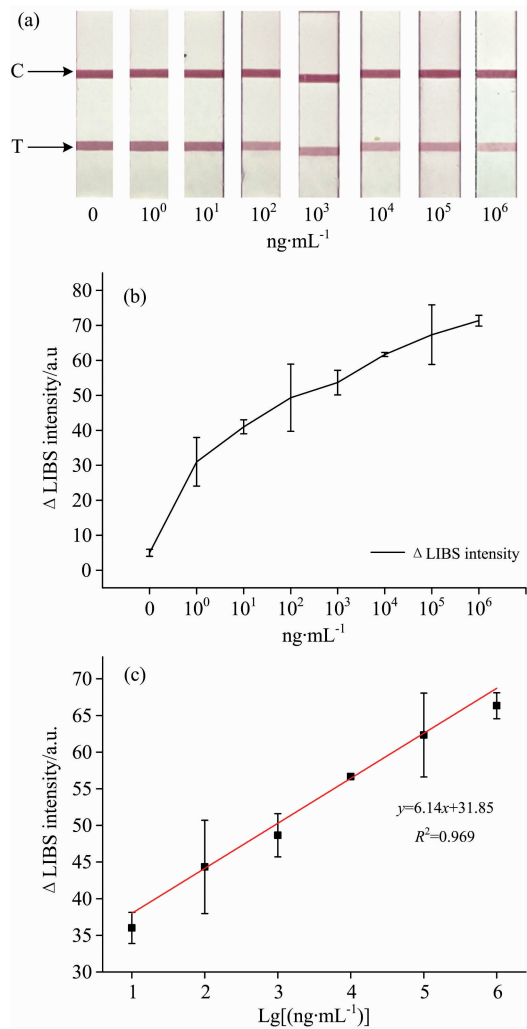


图 3 (a): 滴加不同浓度的毒死蜱溶液的免疫层析试纸条;
(b): 滴加不同浓度的毒死蜱 LIBS 光谱数据;(c) 毒死蜱浓度在 $10 \sim 10^6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 检测范围的回归曲线图

Fig. 3 (a): Immunochromatographic test strips with different concentrations of chlorpyrifos; (b): LIBS spectral data of chlorpyrifos at different concentrations; (c) Regression curve of chlorpyrifos concentration in the detection range of $10 \sim 10^6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

纸条与 LIBS 结合比免疫层析试纸条对农药的检测限提高了三个数量级,且操作简单、快速、灵敏度高。本研究将免疫层析试纸条与 LIBS 进行了有效的结合,对痕量农药的检测能力有所提高,在农药残留检测领域有进一步的研究意义。

References

- [1] LIU Xiao-qiong, WANG Xiao-yuan, LI Qing-cong, et al(刘小琼, 王晓媛, 李庆聪, 等). Anhui Agricultural Science(安徽农业科学), 2019, 47(1): 25.
- [2] M Tibor C, Maira S. Biomedical Chromatography, 2012, 26(3): 276.
- [3] Shamsipur M, Yazdanfar N, Ghambarian M. Food Chemistry, 2016, 204: 289.
- [4] LI Ling-yun, XU Xiao-min, LIN Huan, et al(李凌云, 许晓敏, 林 桓, 等). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 2016, 34(9): 835.

- [5] Stachniuk A, Fornal E. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(6): 1654.
- [6] WU Neng, LI Xiao-qing, LI Xiu-juan, et al(吴 能, 李晓庆, 李秀娟, 等). *Journal of Huazhong Agricultural University(华中农业大学学报)*, 2019, (4): 103.
- [7] Elbashir A A, Aboul-Enein H Y. *Biomedical Chromatography*, 2015, 29(6): 835.
- [8] WANG Han, LI Gao-hua, ZHANG Yang, et al(王 茜, 李高华, 张 阳, 等). *Journal of Food Safety and Quality(食品安全质量检测学报)*, 2015, (11): 4409.
- [9] LI Huai-ming, XU Heng-yi, XIONG Yong-hua(李怀明, 许恒毅, 熊勇华). *Food Science(食品科学)*, 2011, (17): 380.
- [10] Watanabe E, Miyake S, Yogo Y. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(51): 12459.

Trace Pesticide Measurement Method Based on Immunosensor and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy

CUI You-wei^{1,2}, ZHENG Pei-chao¹, WANG Xiao-fa¹, JIAO Lei-zi^{2,3}, DONG Da-ming^{1,2*}, WU Jing^{2*}

1. Institute of Optoelectronic Engineering, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China

2. National Engineering Research Center for Information Technology in Agriculture, Beijing 100097, China

3. Cultivaton Base of Guangxi Key Laboratory of Optoelectronic Information Processing (Guilin University of Electronic Technology), Guilin 541004, China

Abstract Pesticides have played a significant role in crop diseases and insect pests, as well as high and stable yields of crops, but the long-term large-scale use of pesticides has caused great harm to ecology and human health. According to the relevant literature review, there are no related reports on the detection of pesticide residues based on the analysis methods of immunosensors and laser-induced breakdown spectroscopy. In this method, a laser-induced breakdown spectrum is proposed to detect the probe of the immunosensor capturing the target to be detected, there by indirectly calculating the concentration of the target to be measured. This article uses immunochromatographic test strips to detect trace pesticides. Although immunochromatographic test strips can measure trace pesticides, they can only be qualitative, and the detection range is narrow. In order to broaden the measurement range of trace pesticides by immunochromatographic test strips, laser-induced breakdown spectroscopy (Laser-induced Breakdown Spectroscopy, LIBS) was used to perform spectroscopic measurements on metal nanoparticles captured trace pesticides on immunochromatographic test strips. Construction of detection methods for immunochromatographic test strips and LIBS. In this paper, chlorpyrifos pesticides are used as the research object. Because pesticide residues are small molecule antigen detection, the immunochromatographic test strips use the competition method to detect chlorpyrifos. The color difference between the control line and the detection line of the immunochromatographic test strip with a low concentration of chlorpyrifos dripped is not obvious, and human eyes cannot distinguish whether chlorpyrifos is detected. The control line and detection line of the immunochromatographic test strip added with chlorpyrifos were selected respectively, and the spectrum at Au I 242.733 nm was measured. The average spectral intensity of the control line minus the average spectral intensity of the detection line is the signal of chlorpyrifos. This method can detect signals not observed by immunochromatographic test strips, and avoid the problem of high detection limit of LIBS. As the chlorpyrifos concentration increased from 0 to 10^6 ng · mL⁻¹, the difference in LIBS spectral data gradually increased. In order to eliminate the effect of random errors, a calibration curve was constructed using Δ LIBS intensity (measurement sample intensity minus blank sample intensity) and chlorpyrifos concentration to obtain Lg. Δ LIBS intensity was linearly correlated with chlorpyrifos concentration in the range of $10 \sim 10^6$ ng · mL⁻¹, $Y = 6.14X + 31.85$, $R^2 = 0.969$, and the detection limit of chlorpyrifos was 0.39 ng · mL⁻¹. The results showed that the immunochromatographic strip combined with LIBS could effectively expand the detection range of chlorpyrifos. At the same time, the combination of immunochromatographic test strips and LIBS for the detection of other substances is also worthy of further research.

Keywords Immunochromatographic test strip; Laser-induced breakdown spectroscopy; Pesticide detection

* Corresponding authors

(Received Oct. 21, 2019; accepted May 15, 2020)