中国科学: 化学 2020 年 第 50 卷 第 3 期: 393 ~ 405
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

论 文

环境友好型比率荧光微流控纸芯片快速检测苯醚甲环唑

马昕[1], 郝惘英[1], 张忠[1,2*], 李金花[2,3], 杨兴斌[1], 陈令新[2,3*]

1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西省食品绿色加工与安全控制工程实验室, 西安 710062
2. 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003
3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 青岛 266071
*通讯作者, E-mail: zzhang@snnu.edu.cn; lxchen@yic.ac.cn

收稿日期: 2019-10-30; 接受日期: 2019-12-24; 网络版发表日期: 2020-03-04
国家自然科学基金(编号: 31701705, 21876199)、香江学者计划(编号: XJ2017060)、中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室开放基金(编号: 2018KFJJ01)和泰山学者工程专项经费(编号: ts20190962)资助项目

摘要 本文构建了一种新型比率荧光印迹微流控纸芯片, 将绿色荧光(NBD-APTES)作为对照荧光源, 以半胱氨酸修饰后的碳量子点(CDs-Cys)的荧光变化来实现苯醚甲环唑的快速可视化检测. 采用扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜等详细研究纸基芯片的检测性能. 在优化条件下, 该荧光传感器的线性范围为0.3~60 μmol/L, 检测限为75 nmol/L, 样品回收率为102.1%~111.2%, 准确度在3.1%~4.2%. 与传统液相荧光传感材料相比, 固相基质的比率荧光传感器具备更好的携带性和储存性, 表现出令人满意的荧光检测特性. 此外, 该传感器用于分离和检测苯醚甲环唑时具有高度的特异性, 已成功地应用于实际样品的检测, 为新型比率荧光技术与微流控纸基芯片结合开辟了新途径, 并为未来提供了潜在的即时医疗应用前景.

关键词 分子印迹, 碳量子点, 比率荧光, 苯醚甲环唑, 微流控纸芯片

1 引言

苯醚甲环唑(difenoconazole)是一种全身性甾醇去甲基化抑制剂, 可以通过抑制病原菌孢子的萌发, 最终抑制真菌的增长, 作为农业生产中的常用农药, 目前已广泛用于各种蔬菜、粮食及水果种植中[1,2]. 苯醚甲环唑具有生物降解性低、化学稳定性好、易于在环境中运输等特点[3]. 然而随着苯醚甲环唑的大量施用, 水环境中的浓度监测超过了农作物中发现的浓度. 例如, 在水稻中检测到的噁咪唑的残留量为1.98 mg/L, 在农业水域中为0.028 mg/L[4]. 水中苯醚甲环唑的残留量不断增高, 以水灌溉的农作物及果蔬产品也成为了当前的监测重点[2,5]. 在作物生长期及储存期, 苯醚甲环唑会富集并大量残留于果蔬表皮中, 其浓度过大会对人类健康及环境造成严重影响[3,6].

纳米荧光材料由于其独特的物理化学性质, 如比表面积大、表面能量高以及荧光强度大等优点, 逐渐成为检测环境[7,8]和食品中有害微生物方面的高效探

引用格式: Ma X, Hao G, Zhang Z, Li J, Yang X, Chen L. Environmentally friendly ratiometric fluorescent microfluidic paper chip for rapid detection of difenoconazole. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 393–405, doi: 10.1360/SSC-2019-0140

© 2020 《中国科学》杂志社

针[9,10]. 常用的纳米量子点材料有CdTe量子点[11]、CdSe量子点[12]、ZnSe量子点[13]等. 然而, 大多数量子点由有毒重金属元素合成, 很难应用于活体成像且会对使用者造成潜在的毒性伤害, 极大地限制其使用. 因此, 有必要开发更多毒性更小的荧光纳米材料作为半导体量子点的替代品, 由此催生了碳量子点的研究热潮[14,15].

碳量子点具有化学稳定性好、在水中分散性良好、生物相容性高、不含有毒元素等优点, 使其成为当前最新颖的发光材料[16,17]. Li等[18]发现, L-半胱氨酸表面的极性羧基使新型水溶性CdSe/CdS/Cys纳米晶具有更好的水溶性及生物相容性, 并可与各种生物大分子发生作用, 与表面修饰剂巯基乙酸相比, L-半胱氨酸更加稳定、无毒且廉价. 因此, 表面修饰既能显著提高荧光材料的稳定性, 又能增加荧光强度, 成为荧光检测领域的新进展.

分子印迹技术是一种制备含有模板分子高度特异性识别位点的聚合物材料的技术[19~21]. 传统方法制备的分子印迹聚合物(MIP)位点相对较少, 传质速率较慢, 模板分子不易与识别位点结合. 为了克服这些缺点, 表面分子印迹技术应运而生[9,22]. 表面分子印迹聚合物不仅对目标污染物具有较强的亲和力, 而且由于其易于接近识别位点, 避免了传质较慢的问题[23,24]. Yang等[25]采用表面分子印迹技术结合原子转移自由基聚合物制备了具有良好特异性吸附效果的新型二苯并噻吩MIPs, 表明该吸附剂具有良好的吸附特征. Deng等[26]采用表面分子印迹技术成功制备了导电聚吡咯/TiO_2纳米复合材料MIP-PPy/TiO_2, 其光催化活性是对照组的2倍. Gao等[27]制备了一种识别氨基甲酸酯类农药抗蚜威的分子印迹材料, MIP-PMAA/SiO_2对模板分子抗蚜威的选择性系数由1.52增加至12.20, 并具有良好的洗脱和重复利用性能.

目前, 分子印迹荧光传感器的现场检测多是基于一种荧光信号的变化, 与单一的传感器相比, 比率型荧光内在的自我矫正可以降低甚至消除非目标因素的影响, 使其结果更加准确, 且可通过肉眼识别两种荧光的变化[24]. 因此, 将比率型荧光与分子印迹技术相结合, 可有效拓宽分子印迹荧光传感器的颜色变化范围, 使其应用更稳定、方便, 同时利于实现可视化快速检测, 有效解决食品样品基质复杂、现场检测难的问题. Ma等[28]将硅胶纳米球作为载体, 结合咪唑基荧光团(PIPT)与量子点两种荧光材料实现了水样中的汞离子的可视化检测. Li等[29]使用共聚反应合成了具有特异性检测的新型藻蓝蛋白比率荧光纳米传感器, 取得了令人满意的检测效果. 微流控纸芯片分析技术是指将繁复的、庞大的分析过程浓缩在一张具有集成化、微型化、自动化的方寸大小的纸上. 该技术降低了试剂的消耗及成本, 可以实现多通量的同时检测. 微流控纸芯片是当前分析化学中最活跃的发展领域, 在生物医学、环境监测、致病微生物检测等众多领域得到了广泛的应用.

本文采用纤维素纸作为基底材料, 将表面分子印迹技术和比率荧光技术相结合, 制备出具有蓝色荧光(CDs-Cys)和绿色荧光(NBD-APTES)的两种荧光材料的印迹微流控纸芯片, 用来简便、快速、可视化地检测抑菌剂苯醚甲环唑. 荧光传感器设计基于CDs-Cys的荧光强度变化通过系统研究传感器的特性、结合时间、响应时间、稳定性、灵敏度及选择性, 结果表明, 该传感器在复杂的实际样品中具有令人满意的检测效果, 为纸芯片作为一种新型的快速检测平台奠定了基础.

2 实验部分

2.1 试剂

所有试剂均为分析纯. 苯醚甲环唑、叶酸、L-半胱氨酸、谷胱甘肽(GSH)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)、2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(MES)、3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、4-氯-7-硝基-1,2,3-苯并噁二唑(NBD)采购于Sigma-Aldrich (上海), 纤维素纸采购于GE公司(上海), HMC细胞株受赠于西安交通大学医学部肿瘤研究所(西安).

2.2 实验方法

2.2.1 碳量子点的合成及修饰

称取0.15 g叶酸粉末加入50 mL二次水中, 充分搅拌, 将溶液放入反应釜中加热, 180℃反应2 h. 待反应完成后自然冷却[30]. 将合成的碳量子点通过0.22 μm水系滤膜, 再将碳量子点过G-25葡萄糖凝胶柱后, 包裹锡箔纸放置在黑暗处备用. 实验采用三种不同的蛋白质对碳量子点进行修饰, 分别为牛血清白蛋白(BSA)、L-Cys以及谷胱甘肽(GSH). 配置方法: 取5支10 mL刻度试管, 分别加入0.5 mL的CDs, 再分别加入0、0.5、

1、2、5 mL 0.33 g/L的Cys溶液, 用去离子水稀释至刻度线, 37℃恒温培育40 min, 之后使用荧光分光光度计测定溶液荧光强度变化[31].

2.2.2　NBD-APTES偶联物的合成及优化

NBD-APTES偶联物通过亲核取代反应合成: 0.97 mg的NBD-Cl溶解于9.7 mL含40 μL的APTES乙醇溶液中(NBD/APTES的摩尔比为1:40), 在磁力搅拌器的作用下避光反应10 h, 得到绿色荧光的NBD-APTES偶联物. 优化分为两个步骤进行. APTES使用量优化: 称取0.97 mg NBD, 加入9.7 mL乙醇溶液中, 分别加入0.05、0.5、5、50、500 μL APTES, 测定其荧光强度. 确定合适范围后, 再添加20、40、50、60、80 μL的APTES, NBD不加入APTES时没有荧光. 时间优化: 称取0.97 mg NBD, 加入9.7 mL乙醇溶液中, 再加入40 μL APTES, 分别在磁力搅拌器上反应1、2、4、6、8、10、12、14和16 h, 用来确定偶联物NBD-APTES的最佳反应时间.

2.2.3　印迹纸芯片的合成

将剪裁好的12张1 cm×1 cm的纤维素纸放入培养皿中, 加入40 mL 0.2% HCl酸化20 min后, 用去离子水冲洗3遍以除去残留的HCl溶液, 再加入40 mL 50%的乙醇和400 μL APTES, 混合避光振荡2.5 h后, 用去离子水冲洗3次. 此后, 将CDs与半胱氨酸的混合液加入溶解有MES缓冲液(pH=5.2, 0.1 mM)的12 mL 20 mg/mL EDC中, 覆盖锡箔纸振荡10 min, 然后将混合溶液倒入装有化学修饰纤维素纸的培养皿中, 再加入溶解有MES缓冲液(pH=5.2, 0.1 mM)的12 mL 10 mg/L NHS溶液, 浸泡1 h, 在室温下避光振荡12 h. 反应完成后, 将荧光传感纤维素纸基材用去离子水冲洗3次, 除去多余的反应溶液. 在合成过程中, 为了使纸芯片具有较好的稳定性和荧光表现, 注意保持每片纤维素纸始终维持一面向上. 然后, 将制备好的荧光传感纤维纸芯片各取3张加入两个小培养皿中, 倒入20 mL乙醇, 在室温下加入50 μL四乙氧基硅烷(TEOS), 避光振荡5 h. 待反应完成后, 分别向两个培养皿中加入1 mL NBD-APTES偶联物混合液, 接入第二种荧光物质, 在其中一个培养皿中加入9.4 mg苯醚甲环唑与40 μL APTES组成的预聚合混合液, 记为MIPs, 另一个记为NIPs, 避光振荡30 min后, 分别加入100 μL NH_3•H_2O和50 μL TEOS, 避光振荡5 h. 最后, 用甲醇/HAc (8:2, *v*/*v*)的混合液对MIPs与NIPs同时进行洗脱以除去模板物质苯醚甲环唑, 然后用甲醇洗涤.

2.2.4　细胞毒性评价

将冻存的HMC细胞株放入37℃水浴锅中加热溶解, 然后迅速以1000 r/min离心5 min. 去除冻存液后放入CO_2培养箱中培育. 将生长好的细胞进行铺板, 每孔加入100 μL细胞悬液和100 μL的培养液, 放入培养箱培养12 h. 在阳性对照组中分别加入50 μL的CDs及CDs-Cys溶液, 阴性对照组中加入50 μL磷酸盐缓冲溶液, 作用12 h. 在培养好的细胞悬液内分别加入10 μL的MTT染液, 培养箱内反应4 h, 之后分别加入100 μL甲瓒溶解液, 放入培养箱反应15 min, 用酶标仪于570 nm处测量吸光度.

将生长好的HMC细胞进行铺板, 每孔加入500 μL的细胞悬液和1.5 mL细胞培养液放入培养箱中培育12 h. 在生长好的板孔内分别加入200 μL的CDs溶液及CDs-Cys溶液, 孵育12 h. 作用后, 使用流式细胞仪检测. 其中阳性对照组分别加入细胞液、CDs溶液或CDs-Cys溶液, 阴性对照组加入细胞悬液及相应体积的PBS[32].

2.2.5　纸芯片的表征

采用傅里叶变换红外光谱仪(FTIR, Tensor 27, Bruker, 德国)对纸芯片进行官能团分析, 以确定合成过程中的化学基团变化. 使用热分析系统(Q1000DSC+LNCS+FACS Q600SDT)评估纸芯片中主要成分的热稳定性. 通过扫描电子显微镜(SEM, HT-7700, 80 kV)观察表面形态. 通过能谱仪(EDAX Genesis 2000)对材料表面元素种类与含量进行分析. 使用荧光分光光度计(Thermo, 美国)获得荧光光谱: 激发光设定为350 nm, 发射光谱设定为400~650 nm. 激发和发射光狭缝宽度分别设定为5 nm和5 nm. 使用配备有CCD照相机的荧光共聚焦显微镜(FV1200, Olympus, 日本)观察微流控纸芯片在紫外灯下的荧光图像变化.

2.2.6　纸芯片的选择性与抗干扰性检测

分别配制浓度为40 μM的丙环唑、氧环唑和已环唑三种具有类似结构的农药进行选择性考察. 分别吸取25 μL类似物溶液滴加于印迹纸芯片及非印迹纸芯

片上，以40 μM浓度的苯醚甲环唑溶液作为对照参比，在350 nm的激发波长下，反应10 min后在荧光分光光度计上测量荧光强度的变化.

配制含有浓度为40 μM的苯醚甲环唑的Na^+、Ca^{2+}、K^+、Mg^{2+}和Hg^{2+}离子的混合溶液，将相同浓度的苯醚甲环唑溶液与离子混合溶液各取25 μL滴加于印迹纸芯片及非印迹纸芯片上，在350 nm的激发波长下测量荧光强度的变化.

2.2.7 实际样品检测

实验采用西红柿作为印迹微流控纸芯片的实际样品检测物. 提取方法根据国标方法稍加改进[33]. 西红柿样品采购于华润万家超市(西安). 准确称取1 g西红柿样品，置于50 mL锥形瓶中，加入5 mL乙酸乙酯，再加入1.5 g无水硫酸钠，于振荡器中反应20 min，将混合液过滤于50 mL浓缩瓶中. 之后加入2 mL乙酸乙酯重复提取一次，合并提取液，40℃下减压浓缩至干. 用0.5 mL乙醇溶解后待测，在提取原始样品中分别加入0、5、10和20 μmol/L的苯醚甲环唑混合溶液即为模拟样品. 分别滴加25 μL不同浓度的模拟样品于印迹微流控纸芯片上，同时用已知浓度的苯醚甲环唑溶液验证印迹微流控纸芯片的准确性和精密度，并且使用高效液相色谱法(HPLC)作为对照实验检测相同的实际样品. 高效液相色谱仪(LC-20AT)的检测条件如下: 色谱柱为250×4.6 (i.d) mm不锈钢柱，内填C18的填充物，流动相为甲醇:乙腈:水＝35:35:30 (*V*:*V*:*V*)，流速为1.0 mL/min，柱温为25℃，检测波长为235 nm，定量体积为20 μL.

3 结果与讨论

3.1 微流控纸芯片合成过程

纸质材料在微流控装置中可以起到分离和支撑的作用, 具有独特且极具吸引力的品质. 其成分是惰性的纤维素，来源丰富、价格低廉、可再生、易处理、易于化学修饰，有着较好的稳定性和生物相容性. 图1概括性地介绍了纸芯片传感器的制备过程. 第一步, 采用水相制备法合成L-半胱氨酸修饰的CDs，在室温下通过酰胺键将其大量接枝在氨基官能化的纤维素纸表面, CDs-Cys的荧光峰值在440 nm左右达到最大值，在紫外灯下显示为明亮的蓝光, 形成信号识别单元. 第二步, 使用APTES作为功能单体, TEOS作为交联剂, 加入第二种荧光偶联物NBD-APTES, 并在基底纤维纸上制备苯醚甲环唑的空穴. 除去模板分子与表面活性剂以及多余的作用混合液后，可得到特定的比率荧光印迹纸芯片. 最后, 采用微流控传感器技术, 制备具有比率荧光的微流控印迹纸芯片. 与单纯印迹纸芯片相比, 微流控纸芯片技术可以使分析物在毛细管力的作用下自由移动, 并且可以除去待测样品中的大分子杂质, 便于现场快速检测. 而与一般的基底材料相比, 纤维素纸具有的特殊纤维结构可加速结合位点的传质效率，毛细作用力也可以加速模板分子的转移.

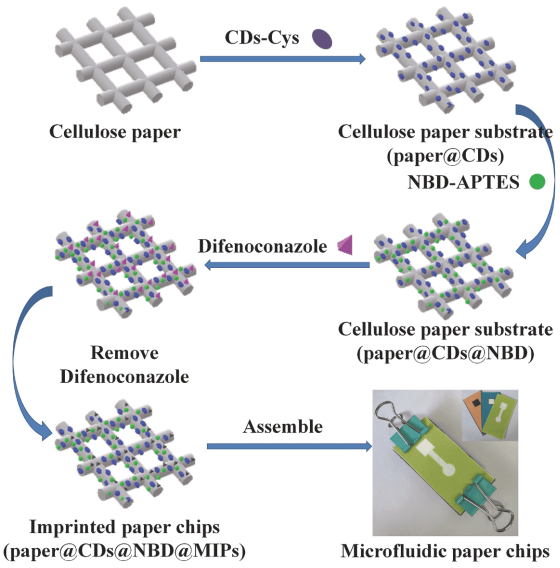


图 1 比率荧光印迹微流控纸芯片的合成示意图(网络版彩图)

Figure 1 Synthesis of ratiometric fluorescent microfluidic paper chip (color online).

3.2 CDs及NBD-APTES的优化及安全性检测

氨基酸可以提高CDs的荧光强度以及稳定性，实验选用了三种不同的修饰物，分别为BSA、GSH以及Cys. 由图2(a)可以看出，L-半胱氨酸的修饰会使得CDs荧光强度明显增加, 当CDs:Cys混合液的比例超过5:20时，荧光强度降低到原始荧光值以下，这是因为Cys溶液增加过多导致荧光值下降. 因此，实验选取5:5~5:10的比例范围进行更准确地比例测定，由图2(b)可得知，当CDs:Cys为5:7时，荧光值强度达到最大，较原始荧光强度提高了29.9%，即为最佳优化比率. 而图

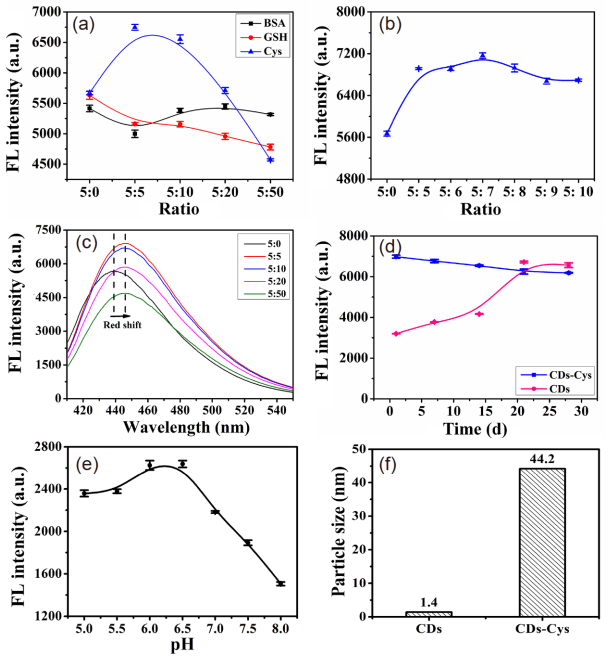


图 2　(a) BSA、GSH以及L-半胱氨酸3种不同物质对CDs修饰后的荧光强度变化; (b) 不同比例的L-半胱氨酸与CDs结合后的荧光强度变化; (c) 不同比例的L-半胱氨酸与CDs结合后荧光发射光谱及最大发射峰位移变化; (d) CDs和CDs-Cys室温避光存放四周的荧光强度变化; (e) 不同pH下CDs的荧光强度变化; (f) CDs及CDs-Cys的粒径变化(网络版彩图)

Figure 2　(a) Changes in fluorescence intensity of CDs modified by three different substances: BSA, glutathione, and L-cysteine; (b) changes in fluorescence intensity of L-cysteine combined with CDs in different proportions; (c) changes in fluorescence emission spectra and maximum emission peak shifts after different proportions of L-cysteine combined with CDs; (d) changes in fluorescence intensity of CDs and CDs-Cys stored at room temperature and protected from light; (e) changes in fluorescence intensity of CDs at different pH; (f) changes in particle size of CDs and CDs-Cys (color online).

2(a)中其他两种修饰物BSA与GSH并未对CDs的荧光强度起到明显增强作用，其中CDs的荧光强度几乎不受BSA的影响，GSH反而会对CDs的荧光起到抑制作用，使得荧光强度不断降低. Cys的修饰不仅使CDs的荧光强度增加，并且使最大发射峰发生了轻微的红移，由图2(c)的荧光光谱可看出, 随着Cys的加入, CDs-Cys的最大发射峰由440 nm红移至446 nm处，荧光发射峰的红移是因为CDs-Cys的发光中心发生改变，Cys的表面修饰并不引入发光中心, 而是起到了钝化作用, 促使新的发光中心结构产生，钝化的表面结构捕获了CDs内部辐射复合的能量使其发出波长更长的光，造成发射峰的红移[20]. 将合成的CDs以及CDs-Cys溶液避光室温下储存4周，以观察其储存过程的稳定性. 通过图2(d)可知，CDs在储存时荧光值为3373，随着时间的延长，CDs的荧光强度呈现上升趋势，于第3周左右时达到最大值6807，较初始荧光值提高了101.8%. 这是因为碳量子点的荧光来源于表面氧化产生的表面缺陷，可作为激子的俘获中心，从而产生与表面缺陷态相关的荧光[34]. 碳量子点在合成过程中，系统环境处于缺氧还原状态，表面基团尚未完全氧化形成缺陷态. 在储存的过程中，随着与空气中的氧气接触，氧化程度进一步加深，造成缺陷态进一步形成，使得碳量子点的荧光进一步增强. 到第3周时，荧光基本保持稳定，达到最大值. 而经Cys修饰后的CDs已达到最大荧光强度且具有还原性氛围保护, CDs不会进一步氧化. 随着时间的增加，CDs-Cys荧光值由最初的7073逐渐降低，在第4周时降低为6188，较初始荧光值降低了12.51%，这可能是由于经Cys修饰后的CDs随着时间的增长发生了氧分子缓慢地淬灭，使得CDs的荧光值略微降低，但荧光强度基本保持稳定，证明CDs具有较好的稳定性. 图2(e)为pH在5~8的条件下CDs的荧光强度变化. pH在5.0~6.5的范围内, 荧光强度逐渐增大, 在pH为6.5时荧光强度最大，pH在6.5~8.0的范围内，荧光强度持续性下降, 所以本文将6.5作为最适pH. 为了了解荧光纳米材料的直径大小，对CDs及CDs-Cys进行粒径检测，图2(f)显示CDs的粒径为1.4 nm，而CDs被Cys包裹后的粒径在44.2 nm左右，CDs-Cys的粒径大小显著大于单独碳量子点的粒径，这是因为不加入Cys时，碳量子点具有强烈的负电荷，粒子之间可以因为同种电荷互相排斥，形成稳定的单粒子形态而不团聚. 加入Cys之后，Cys作为正电荷中心，可以吸引多个碳量子点在其周围形成稳定的双电子层结构，使得检测粒子的粒径大大增大，测定得到的粒径是一个纳米团簇. 经Cys修饰后的CDs的Zeta电位为−7.76 mV，相比较于未经修饰的CDs的电位−18.3 mV来说，修饰后的CDs负电位值明显降低, 这是因为受到Cys的影响, 负电荷下降，但总体还是保持负电位，修饰对CDs的接枝不产生影响. 水热法合成CDs的量子产率为23.0%，经Cys修饰的CDs的量子产率为22.8%，CDs的量子产率在水相量子点中合成度较高，Cys的修饰对CDs的量子产率不造成影响，0.2%的偏差可能是由吸光度的偏差导致，因此没有显著影响[35].

为了得到最佳比例的NBD-APTES偶联物, 实验中对APTES的添加量及反应时间进行了优化. 从图3(a, b)

可以看出加入不同浓度的APTES后，NBD的荧光强度有明显变化，具体的荧光强度与图3(c)对照，在加入0和0.05 μL的APTES时，荧光强度值几乎为零，添加量由0.5 μL增加到50 μL时，偶联物的荧光强度快速上升，证明NBD本身荧光很弱，由于与APTES形成偶联物后才发出了绿色的荧光. 随着APTES的添加量继续增大，偶联物的荧光强度呈现下降趋势. 因此实验再次选取20~80 μL的APTES添加量的范围进行精确的优化条件确定. 由图3(d)可以看出，当APTES添加量为40 μL时，可得到最佳荧光强度，因此将40 μL的APTES添加量(NBD/APTES的摩尔比为1:40)作为实验用量. 调整好最佳使用量后，对偶联物的反应时间进行确定，实验选取0~16 h等9个不同的时间段进行测量，由图3(e)可看出，在0 h时没有荧光，在2 h时有略微的增强，随着时间的增加，偶联物的荧光强度值在10 h时达到最大，随后荧光强度逐渐下降，这可能是由于反应时间过长导致APTES水解造成的. 因此，将10 h作为偶联物NBD-APTES的反应时间. 为了探究CDs与NBD-APTES在水溶液中的相互作用，将NBD-APTES的浓度固定，添加不同比例的CDs混合液进行检测. 由图3(f)可看出，当CDs:NBD-APTES为1:1时，发射峰红移至515 nm处左右，荧光强度值降低，但随着CDs比例的加大，荧光发射峰逐渐向CDs-Cys发射峰位置蓝移，荧光强度值逐渐增大，由此可为实验中NBD-APTES偶联物的添加量提供考虑范围基础，也证明CDs与NBD-APTES之间可发生荧光转换作用，为比率荧光的荧光转移实现奠定基础.

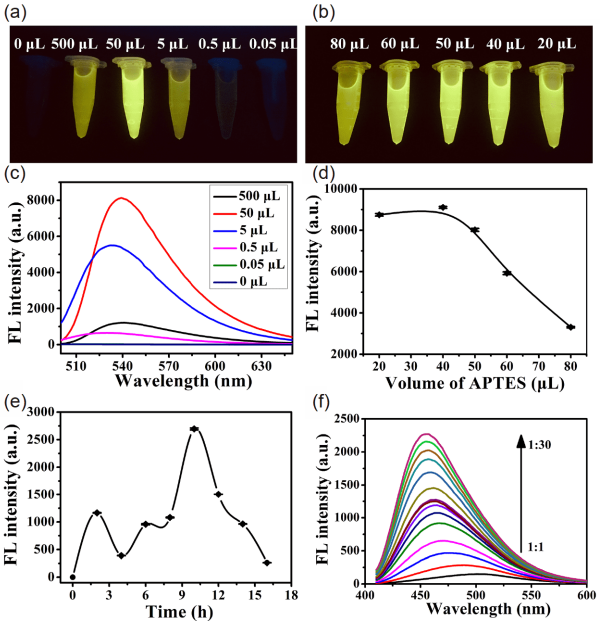


图 3 优化条件的考察. 0~500 μL APTES (a)和20~80 μL APTES (b)的添加量对于NBD-APTES偶联物在紫外灯下的荧光照片. 0~500 μL APTES (c)和20~80 μL APTES (d)的添加量对NBD-APTES偶联物荧光强度的影响. (e) NBD-APTES偶联物随着反应时间荧光强度的变化; (f) NBD-APTES与CDs混合液的比例范围由1:1~1:30时荧光强度的变化(网络版彩图)

Figure 3 Investigation of optimized conditions. Photographs of (a) 0~500 μL and (b) 20~80 μLof APTES added to NBD-APTES conjugate under UV light; (c) the effect of the APTES addition at 0 to 500 μL on the fluorescence intensity of NBD-APTES conjugate; (d) influence of the fluorescence intensity of the APTES addition to the NBD-APTES coupling from 20 to 80 μL; (e) changes in the fluorescence intensity of the NBD-APTES conjugate with the reaction time; (f) changes in fluorescence intensity of the ratio of NBD-APTES and CDs varies from 1:1 to 1:30 (color online).

所制备的印迹纸芯片经检测具有良好的应用效果, 但对于现场快速检测来说, 便携式的配带及人为的使用对安全性的要求极高, 因此, 实验对所用材料CDs以及CDs-Cys进行了毒性检测，如图S1(a)所示(网络版补充材料)，未经修饰的CDs溶液作用于HMC细胞12 h后，细胞存活率由原始浓度的81.1%到稀释10^6倍后的95.9%，证明CDs对细胞没有毒性，安全性高. 图S1(b)中经过Cys修饰后的CDs，作用于HMC细胞12 h后，细胞存活率为89.0%到99.2%，证明CDs-Cys安全性很高，几乎对细胞没有毒性作用. 通过两组数据的对比可看到，经Cys修饰后的CDs作用于细胞后，细胞存活率由81.1%增加至89.0%，稀释10^6倍后由95.9%增加至99.2%，Cys修饰CDs可降低其量子点的毒性，这是由于Cys对CDs进行了表面包裹覆盖，降低了其可能造成细胞损害的因素. 但对于几乎无毒的CDs来说，经过Cys修饰后其安全性变得更高，这也为量子点的安全性修饰提供了基础性研究[36] .

为了进一步探索CDs及CDs-Cys的安全性能, 实验中使用流式细胞仪对细胞凋亡和CDs及CDs-Cys的入胞量进行了测定. 将CDs与CDs-Cys作用下的HMC细胞株用FITC和PI进行标记后通过流式细胞仪进行检测. 如图S2所示，未处理的对照组92.33%的细胞处于正常状态，有5.93%的细胞转化为凋亡状态，当CDs与CDs-Cys分别处理细胞12 h时，分别有7.93%和8.06%的细胞转化为凋亡状态，这些结果与对照组无显著性差异(p>0.05)，因此CDs与CDs-Cys不会引起HMC细胞株凋亡.

重复测定三次入胞量实验如图S3所示，实验组中的入胞量分别为0.67%±0.08%和0.65%±0.11%, 较阴性对照组无显著性差异(p>0.05). 因此, CDs与CDs-Cys的安全性很高，不会对细胞造成损伤，与MTT实验结论一致.

3.3　比率荧光印迹纸芯片表征

扫描电子显微镜可直接观测到所用材料能否对纤维素纸进行修饰，用扫描电子显微镜对纤维素裸纸(paper)、接枝了蓝色CDs-Cys的纤维素纸(paper@CDs)以及同时接枝蓝色CDs-Cys和绿色NBD-APTES的印迹纸芯片(paper@CDs@NBD@MIPs)以及非印迹纸芯片(paper@CDs@NBD@NIPs)进行表征. 图4(a)显示了纤维素裸纸的扫描电子显微镜图，从图中可以观察到明显的纤维束状物结构，纤维束表面光滑并且无杂质. 图4(b)为paper@CDs的扫描电子显微镜图，可以观察到纤维束表面有部分的小球，说明在接枝CDs-Cys后，大量的CDs-Cys及硅烷化材料被接枝在纤维束表面，图中宏观可观测到的接枝物应为硅烷化材料的修饰[21]. CDs-Cys可以通过酰胺键稳定地接枝到纤维表面上. 插图为紫外灯下发射明亮蓝色荧光的接枝CDs-Cys的单荧光纸芯片，说明纸与CDs-Cys的结合对其整体荧光没有显著影响[37]. 图4(c)是paper@CDs@NBD@MIPs的扫描电子显微镜图，可以看到纤维表面有大量的絮状物，纤维束变得十分粗糙，说明通过反应已将印迹材料接枝在纤维束表面. 在聚合过程之后，纸片仍保持良好的多孔结构，这有利于进一步的分析应用. 插图为接枝两种荧光材料后的纸芯片在紫外灯照射下的荧光变化，由明亮的蓝色荧光变为明亮的青色荧光，证明绿色荧光材料NBD-APTES已成功接枝. 图4(d)为非印迹纸芯片的扫描电子显微镜图，由于制备条件与印迹纸芯片相一致，因此也可观察到大量的印迹材料接枝在纤维素的表面且纸片仍然保持良好的多孔结构.

为了研究合成纸芯片的过程是否每步都成功，我们对每步合成过程进行了红外光谱扫描，并且对各个红外吸收峰进行了分析，如图S4所示. 位于3439和1609 cm^{-1}的峰分别是N–H的伸缩振动峰和弯曲振动峰, 证明大量氨基被修饰在纸芯片表面. 位于3114 cm^{-1}的峰为C=C–H的伸缩振动峰. 位于2956 cm^{-1}的峰为C–C–H的伸缩振动峰，证明CDs-Cys成功接枝. 位于

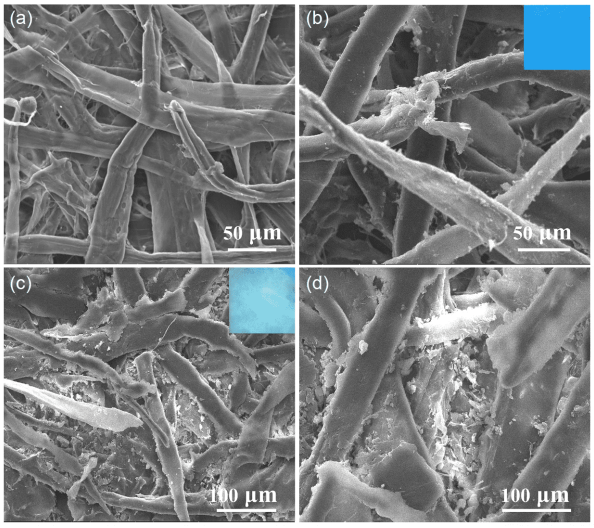


图 4　扫描电子显微镜下不同纸的图片. (a) 纤维素裸纸(paper); (b) 接枝CDs-Cys荧光材料的纤维素纸(paper@CDs); (c) 接枝CDs-Cys以及NBD-APTES两种荧光材料的印迹纸芯片(paper@CDs@NBD@MIPs); (d) 接枝CDs-Cys以及NBD-APTES两种荧光材料的非印迹纸芯片(paper@CDs@NBD@-NIPs) (网络版彩图)

Figure 4　SEM photos of different papers. (a) Cellulose bare paper (paper); (b) cellulose paper grafted with CDs-Cys fluorescent material (paper@CDs); (c) imprinted paper chips (paper@CDs@NBD@MIPs) grafted with CDs-Cys and NBD-APTES; (d) non-imprinted paper chips (paper@CDs@NBD@NIPs) grafted with CDs-Cys and NBD-APTES (color online).

1363 cm^{-1}的峰为C=C的弯曲振动峰，位于1278 cm^{-1}的峰为C–C的弯曲振动峰，该峰存在于b、c、d三条曲线上，可证明在CDs-Cys接枝后的后续合成过程中仍稳定地存在于纤维素纸上，这可能是由于硅烷化材料对CDs-Cys进行了包裹，使得其稳定地接枝在纤维纸表面. 位于1116 cm^{-1}的峰为C–H的弯曲振动峰，位于1430 cm^{-1}附近的振动吸收峰是羧基和氨基形成的酰胺键产生的. 438和667 cm^{-1}附近的振动峰是由Si–O的伸缩振动产生的，而1077 cm^{-1}附近宽且强的吸收峰是Si–O–Si的振动所产生的，Si–O的特征峰值增强，证明NBD成功接枝在纸芯片上[9,38]. 通过红外光谱结果，我们可以发现，纸芯片中含有羧基和氨基等含氮和含氧的官能团，这些丰富的官能团的存在是CDs-Cys以及NBD-APTES能大量且稳定接枝在纸芯片上的关键.

另外，我们对不同阶段的纤维素纸进行了能谱(EDS)检测. 由表S1(网络版补充材料)可得，未经修饰的纤维素纸C含量为53.79%，O含量为46.21%，接枝CDs-Cys后，纸上的C含量增加为54.11%，O含量减少

为45.54%, Si含量从0增加到0.35%, C含量的增加证明了CDs-Cys成功地接枝在了纤维素纸上, Si含量的增加显示了硅烷化材料通过合成成功地裹覆在纸表面. 接枝第二种荧光染料NBD-APTES后, C元素含量增加为61.40%, O元素含量继续减少为34.91%, Si元素含量增加为3.68%. 证明第二种荧光物质成功地接枝在了纤维素纸上. 由元素分析可知, paper@CDs的C含量明显高于未修饰的纤维素纸, 证明CDs被成功接枝, 而NBD中C元素的含量高达36.08%, 印迹纸芯片中的C元素含量由荧光纸芯片中的54.11%增加为61.40%, 证明NBD-APTES被成功地接枝在纤维素纸上, 因此, 目前的接枝方法可以成功地将纤维素纸进行改性修饰, 也直观地证明了在合成印迹纸芯片的每个阶段均获得成功.

印迹纸芯片在实际运用中需要长时间的稳定存放. 因此, 热稳定性是未来实际应用中一个十分重要的因素. 我们通过热重分析仪研究了不同合成阶段的纤维素纸的热稳定性. 结果显示如图S5所示, 其中分别为纤维裸纸、单荧光纸芯片、印迹纸芯片以及非印迹纸芯片4个反应阶段的TG和DTG曲线. 由图S5可以看出, 4种不同阶段的纤维素纸均具有类似的质量变化, 第一部分的温度变化从20℃上升到100℃, 其中热量的损失主要是由于吸湿的水分挥发所造成, 质量损失分别为3.25%、3.05%、3.91%以及4.34%. 在100~300℃的范围内几乎没有质量损失, 这可以说明在300℃以下4种不同性质的纤维素纸均具有很好的热稳定性. 随着温度的持续上升, 4种纤维素纸在300~386℃范围内质量迅速下降. 由于纤维素裸纸没有进行改性, 因此只能是因为纤维素纸中的有机纤维的分解所引起的, 纤维素裸纸的最快降解温度为356.9 ℃, 降解过程在385.5℃完成, 其残留量为11.93%, 而其余三种改性纤维素纸的最快降解速度分别为352.3、356.8以及366.1℃, 残留量分别为15.86%、19.31%以及27.79%, 具体的温度也可从DTG曲线中得出. 对于改性纸来说, 降解过程中质量的迅速减少可能是由于纤维素中的有机纤维以及合成有机物共同作用造成的. 非印迹纸芯片的最大降解温度高于印迹纸芯片, 可能是因为印迹纸芯片中的模板空隙加速了其降解速度, 而非印迹纸芯片连接紧密结构使得降解速度减慢, 也由此得到了最大纸屑残留量. 因此可以得出结论, 在300℃以下我们所制作的印迹纸芯片具有优异的热稳定性, 且制作过程中也不会对纸的热稳定性造成影响.

3.4 比率荧光印迹纸芯片荧光性能

印迹纸芯片的合成过程中, CDs-Cys首先被接枝在纤维素纸上, 发出明亮的蓝色荧光, 随后通过亲核取代作用生成的NBD-APTES接枝在纸纤维的周围, 两种荧光的接枝是否能继续在印迹表层发出两种荧光, 对于后续实验具有至关重要的意义. 本实验首先对印迹纸芯片进行了荧光光谱的测定. 从图5(a)中可以看出, 当激发波长为350 nm时, 两种荧光材料的荧光强度均比较大, 两峰之间干扰较小且峰型完整, 另外分别对NBD-APTES及CDs-Cys进行荧光光谱扫描, 可以看出当两种荧光同时接枝于印迹纸芯片上时, 荧光强度略有下降. 印迹纸芯片中CDs-Cys的发射峰相较于CDs-Cys的荧光发射峰来说没有偏移, 而NBD-APTES的荧光峰由540.0 nm处稍稍偏移至537.5 nm处. 实验采用每5 min重复测量印迹纸芯片的最大发射峰来检测其60 min内的荧光稳定性, 如图5(b)所示, 两种荧光材料的发射峰均具有轻微的波动, 但在一定范围内属于正常波动, CDs-Cys及NBD-APTES的相对偏差分别为3.7%和2.9%, 表明印迹纸芯片具有良好的稳定性. 为了确定同一张纸芯片的稳定性, 我们同时测定纸芯片中间6个不同位置点的荧光, 对同一张纸的稳定性进行了考察. 如图5(c)所示, 相关区域的荧光相对偏差分别为0.77%和0.83%, 证明纸芯片在中心区域具有较好的稳定性.

为了检测模板分子, 我们对印迹纸芯片的响应时间进行了测定. 将25 μL的苯醚甲环唑溶液滴加到印迹纸芯片上, 2 min时首次测量, 之后每隔5 min对其最大发射峰进行检测. 如图5(d)所示, 0~2 min, CDs-Cys及NBD-APTES的荧光强度明显下降, 这是由于刚加入苯醚甲环唑溶液, 纸芯片在湿润的情况下会有轻微光的折射, 使得两种荧光物质的强度均下降, 5 min后, CDs-Cys的荧光继续下降, NBD-APTES的荧光强度下降到最低值. 随着时间的增加, CDs-Cys的荧光值持续下降, 在10 min后保持相对平稳, 而对于NBD-APTES, 其荧光值在5 min后上升, 在10 min后略有上升, 随后较水平线波动达到稳定, 因此将10 min作为进一步研究的响应时间. 本课题组[38]之前制备的CdTe QDs印迹纸芯片, 响应时间为15 min. 本研究中芯片响应时间明

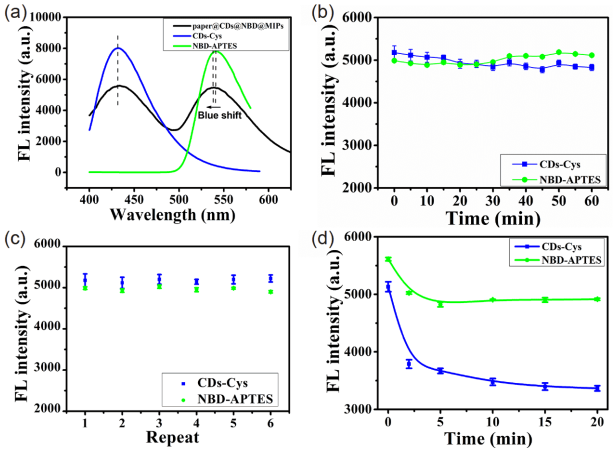


图 5　(a) 印迹纸芯片、CDs-Cys以及NBD-APTES的荧光谱图; (b) 印迹纸芯片60 min内的荧光稳定谱图; (c) 同一张纸芯片中间6个不同位置点的荧光强度变化; (d) 50 μM的苯醚甲环唑溶液作用下的印迹纸芯片淬灭时间荧光谱图(网络版彩图)

Figure 5　(a) Fluorescence spectra of imprinted paper chips, CDs-Cys and NBD-APTES; (b) fluorescence spectra of imprinted paper chips within 60 min; (c) fluorescence intensity changes at six different positions in the same imprinted paper chip; (d) fluorescence spectrum of quenched time of imprinted paper chip under 50 μM difenoconazole solution (color online).

显缩短, 可能有两点原因: (1) 印迹壳层变薄, 印迹材料用量一样但之前只有一种荧光材料的修饰[38], 而本研究对两种荧光材料进行固定和修饰使得每一种荧光材料分配的印迹壳层更少, 造成厚度降低; (2) 经过Cys修饰的半胱氨酸水溶性更好, 荧光灵敏度增强, 使得响应加速, 可以满足现场快速检测的要求.

3.5　荧光机理研究

在双荧光体系中, 荧光强度的变化涉及的机理主要有两种: 第一种是两种荧光发生联动的荧光共振能量转移(FRET)机理; 第二种是一种荧光不发生改变去作为参照, 另一种荧光根据电子或电荷转移发生荧光淬灭以实现检测的双荧光系统. 在FRET中两个荧光基团分别作为能量供体以及能量受体, 该体系发生的必要条件是荧光供体的发射光谱在一定程度上与受体的可见吸收光谱重叠[39]. Xu等[40]将长波长量子点作为基础荧光包埋进介孔硅材料, 荧光强度不随待测物浓度的变化而改变, 短波长量子点的荧光会随着目标分子浓度变化而变化, 制备得到比率型荧光传感器, 使得检测更加灵敏, 并可以实现肉眼可视化检测.

为了验证该体系是否为FRET体系, 本文测定了荧光供体CDs-Cys的荧光峰和荧光受体NBD-APTES的紫外吸收峰. 如图6所示, CDs-Cys的荧光发射峰在441 nm处, NBD-APTES的紫外吸收峰在462 nm处, 两峰相互重叠面积达到80%以上, 这表明两种荧光基团可以实现能量上的传递. 当蓝色CDs-Cys作为荧光供体时, 可将能量转移至绿色的NBD-APTES上, 使得CDs-Cys的荧光发生淬灭而NBD-APTES荧光增强.

但在实际测定过程中发现随着苯醚甲环唑浓度的增加, 只有CDs-Cys荧光强度发生下降, 而NBD-APTES的荧光强度不发生变化, 说明NBD-APTES并未与CDs-Cys的荧光强度发生联动, 这可能是因为两种荧光量子点在空间上存在一定的距离, 要发生FRET作用, 必须要求两种荧光材料在空间上相距5~10 nm的距离[28,40]. 目前两种荧光材料在固体材料上, 空间位阻大, 分子距离较远, 只有CDs-Cys的荧光强度会受到苯醚甲环唑的浓度影响, 这是因为在苯醚甲环唑的芳香环和CDs-Cys之间发生强电荷转移相互作用, 导致CDs-Cys发生荧光淬灭现象. 而实验中NBD-APTES不与苯醚甲环唑发生作用. 因此, 通过CDs-Cys的荧光传感所制备的纸芯片应为基于荧光电子转移机制以实现对苯醚甲环唑的识别和检测. 其影响因素可参考下式:

$$F_0 / F = 1 + K_{SV} C_q \tag{1}$$

其中F_0和F分别是不存在和存在苯醚甲环唑时的荧光强度值, K_{SV}是淬灭剂的淬灭常数, C_q是苯醚甲环唑的浓度.

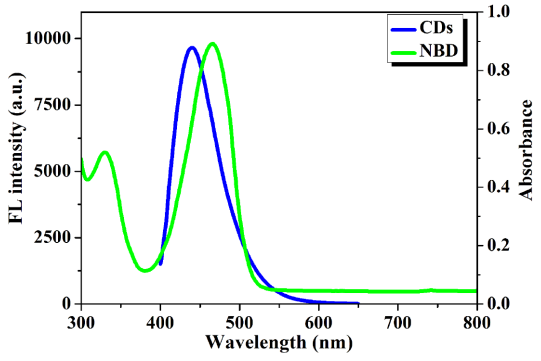


图 6　CDs-Cys的荧光图谱与NBD-APTES的紫外吸收谱图(网络版彩图)

Figure 6　The fluorescence spectrum of CDs-Cys and the ultraviolet absorption spectrum of NBD-APTES (color online).

3.6 印迹纸芯片选择性与干扰性

将苯醚甲环唑与类似物(包括丙环唑、氧环唑和已环唑)分别作用于印迹纸芯片, 根据荧光强度的变化情况来检测印迹纸芯片的选择性, 如图S6所示, 滴加苯醚甲环唑时, 印迹纸芯片有着明显的荧光淬灭变化, 该变化显著大于类似物的变化, 这种差异是由于类似物的空间结构与苯醚甲环唑不同, 从而与APTES之间的相互作用不同所导致的. 因此该传感器具有良好的选择性, 可用于检测食品样品中的苯醚甲环唑. 为了进一步评估印迹纸芯片对苯醚甲环唑的抗干扰能力, 实验测量了含有苯醚甲环唑和10倍浓度的可能干扰离子的混合溶液的荧光强度变化. 如图S7所示, 在进行苯醚甲环唑测定时, 这些离子不会引起明显的干扰. 因此, 该印迹纸芯片具有良好的选择性和高灵敏度, 可用于确定食品样品中的苯醚甲环唑的残留量.

3.7 印迹纸芯片灵敏度及实际样品检测

为了进一步评估纸芯片的荧光特性, 我们通过利用荧光分光光度计检测不同浓度苯醚甲环唑作用下的纸芯片的荧光强度变化来确定纸芯片的灵敏度. 荧光变化如图7所示, 随着苯醚甲环唑浓度的增加, 蓝色的CDs-Cys荧光值逐渐下降, 而绿色的NBD-APTES荧光值几乎不变, 作为一种对照和参比荧光的存在. 如图7(a)中的插图所示, 印迹纸芯片的荧光值与苯醚甲环唑的浓度呈良好的线性关系. 线性范围为0.3~60 μmol/L, 检测限为75 nmol/L, 表明印迹纸芯片灵敏度良好, 完全满足国标对于果蔬中苯醚甲环唑的含量低于5 μmol/L的要求. 此外, 从图7(b)中可以看出, 相应的非印迹纸芯片对苯醚甲环唑的检测灵敏度较低, 由此可以看出印迹纸芯片对苯醚甲环唑的灵敏度明显高于非印迹纸芯片. 这是因为在非印迹纸芯片中没有苯醚甲环唑的特定识别位点, 苯醚甲环唑只能淬灭非印迹纸芯片表面的荧光, 而不能进入内部, 因此大多数的CDs-Cys保持稳定, NBD-APTES的荧光稳定性依旧很好, 印迹因子可高达5.1, 因为这种吸附仅仅是非特异性吸附, 使得苯醚甲环唑无法被特异性识别, 使得纸芯片荧光强度非常高.

激光共聚焦显微镜成像可以进一步验证印迹纸芯片荧光照片的变化. 从图8可以看出(我们将短波长CDs-Cys设置为绿色荧光, 长波长NBD-APTES设置为红色荧光), 在纤维素表面出现了大量的绿色荧光和红色荧光, 整体显示为黄绿色. 当模板分子苯醚甲环唑不存在时, 纸芯片显示出最大的黄绿色荧光, 随着苯醚甲环唑浓度的增加, 印迹纸芯片显示出越来越强的红色荧光. 激光共聚焦成像图进一步直观地展示了荧光变化, 也更进一步地证明了苯醚甲环唑对于CDs-Cys的

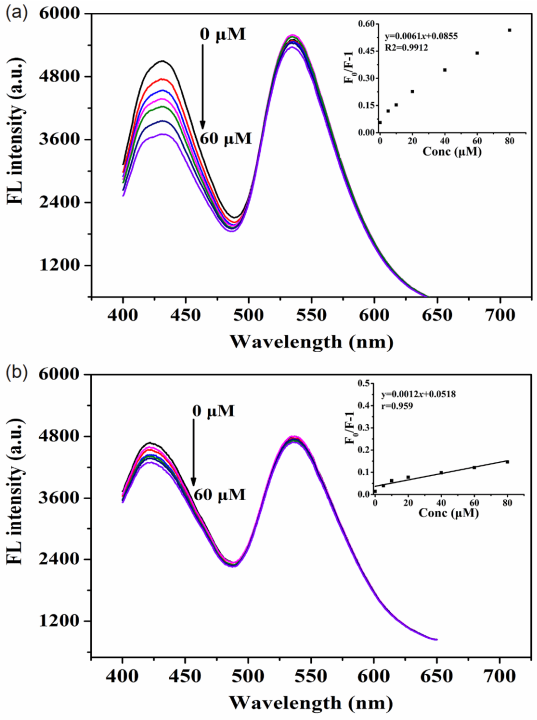


图 7 不同浓度的苯醚甲环唑作用下纸芯片荧光随着浓度的变化. (a) MIPs, (b) NIPs (网络版彩图)

Figure 7 Fluorescence spectra of imprinted paper chip at the different concentration of difenoconazole. (a) MIPs, (b) NIPs (color online).

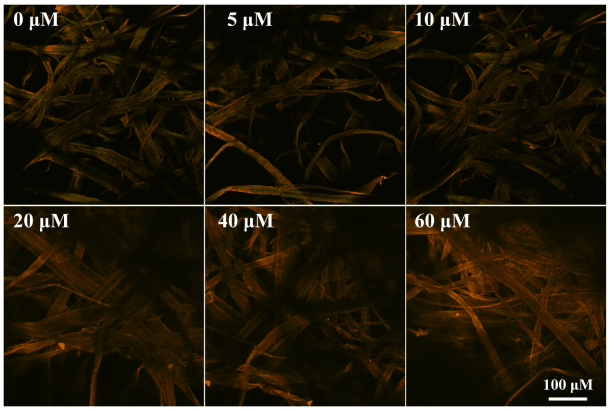


图 8 不同浓度的苯醚甲环唑作用下的纸芯片在激光共聚焦显微镜下的荧光照片成像(网络版彩图)

Figure 8 Fluorescence images of imprinted paper chips at different concentrations of difenoconazole under laser confocal microscopy (color online).

表 1　西红柿样品通过本方法和HPLC法的测定结果比较

Table 1　Comparison of tomato samples by this method and HPLC

样品	模拟 (μmol/L)	Paper@CDs@NBD@MIPs		HPLC
		测定值 (μmol/L)	回收率±RSD (%)	测定值 (μmol/L)
西红柿	0	ND	–	ND
	5.00	5.56	111.2±3.1	4.75
	10.00	10.21	102.1±3.9	10.26
	20.00	20.85	104.3±4.2	21.17

荧光淬灭过程.

为了评估印迹纸芯片的实际应用，我们使用印迹纸芯片检测样品西红柿. 具有3D结构的微流纸芯片可以通过流通通道实现预过滤功能，起到预处理的效果. 实验结果如表1所示，将不同浓度的苯醚甲环唑(0、5、10和20 μmol/L)添加到西红柿样品中. 回收率在统计学上接近模拟值的回收率，这表明实际食品样品中没有严重的正或负干扰. 此外，西红柿的回收率为102.1%~111.2%，RSD为3.1%~4.2%. 结果表明，新开发的纸基荧光传感器可以快速检测出西红柿样品中的苯醚甲环唑分子.

4　结论

本文详细介绍了通过溶胶-凝胶法制备的比率荧光印迹微流控纸芯片成功地应用于食品样品中对苯醚甲环唑的检测. 此方法通过将纤维素纸作为基底物质，将荧光检测的基质从传统的液相溶液转移到固相基质，而且纤维素纸价格便宜、处理方便、绿色环保，极大地降低了生产成本并增加了现场检测的便携度. 结合比率荧光和表面分子印迹技术，通过高选择性与高灵敏度的协同效应，实现了基于视觉识别苯醚甲环唑的效果. 结果表明，该技术在当地蔬菜样品的实际分析检测中表现出快速的响应效应以及高准确性，具有良好的实用性和重现性. 因此，该传感器可作为苯醚甲环唑的分析工具，方便实现对果蔬里的残留苯醚甲环唑的监测，也为日后不同农药残留的现场快速检测提供了研究基础. 相较于目前的单一荧光传感器，比率荧光的结合极大地提高了纸基传感器的可视化检测性能，实现了由荧光淬灭到荧光转换的视觉检测.

补充材料

本文的补充材料见网络版http://chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

1　Mu X, Pang S, Sun X, Gao J, Chen J, Chen X, Li X, Wang C. *Environ Pollut*, 2013, 175: 147–157

2　Kong Z, Dong F, Xu J, Liu X, Li J, Li Y, Tian Y, Guo L, Shan W, Zheng Y. *Food Control*, 2012, 23: 149–153

3　Wang ZH, Yang T, Qin DM, Gong Y, Ji Y. *Chin Chem Lett*, 2008, 19: 969–972

4　Teng M, Zhu W, Wang D, Qi S, Wang Y, Yan J, Dong K, Zheng M, Wang C. *Aquat Toxicol*, 2018, 194: 112–120

5　Wang K, Wu JX, Zhang HY. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012, 86: 111–115

6　Kesavachandran CN, Fareed M, Pathak MK, Bihari V, Mathur N, Srivastava *AK. Rev Environ Contam T,* 2009, 200: 33–52

7　Yu QY, Zhai GY, Cui TL, Su H, Xue ZH, Zhang JJ, Pauzauskie PJ, Hirano S, Li XH, Chen JS. *Sci China Chem*, 2019, 62: 434–439

8　Wu SM, Zhao X, Zhang ZL, Xie HY, Tian ZQ, Peng J, Lu ZX, Pang DW, Xie ZX. *ChemPhysChem*, 2006, 7: 1062–1067

9　Jia M, Zhang Z, Li J, Shao H, Chen L, Yang X. *Sens Actuat B-Chem*, 2017, 252: 934–943

10　Teng M, Qi S, Zhu W, Wang Y, Wang D, Dong K, Wang C. *Environ Pollut*, 2018, 233: 208–217

11　Wang X, Sheng P, Zhou L, Tong X, Shi L, Cai Q. *Biosens Bioelectron*, 2014, 60: 52–56

12　Li LB, Wu WQ, Rao HS, Chen HY, Feng HL, Kuang DB, Su CY. *Sci China Mater*, 2016, 59: 807–816

13 Ding L, Zhou PJ, Zhan HJ, Chen C, Hu W, Zhou TF, Lin CW. *J Lumin*, 2013, 142: 167–172
14 Lai T, Zheng E, Chen L, Wang X, Kong L, You C, Ruan Y, Weng X. *Nanoscale*, 2013, 5: 8015
15 da Silva JCGE, Gonçalves HMR. *TrAC Trends Anal Chem*, 2011, 30: 1327–1336
16 Li X, Zhang S, Kulinich SA, Liu Y, Zeng H. *Sci Rep*, 2015, 4: 4976
17 Sun YP, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, Meziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang H, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie SY. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 7756–7757
18 Wang T, Yang J, Li H, Wang Y. *J Rare Earths*, 2019, 37: 995–1001
19 Yoshida M, Hatate Y, Uezu K, Goto M, Furusaki S. *Colloids Surfs A*, 2000, 169: 259–269
20 Wang H, Liu Y, Yao S, Zhu P. *Food Chem*, 2018, 240: 1262–1267
21 Zhang Z, Li J, Wang X, Shen D, Chen L. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 9118–9127
22 Gao B, An F, Zhu Y. *Polymer*, 2007, 48: 2288–2297
23 Chen L, Wang X, Lu W, Wu X, Li J. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2137–2211
24 Jia M F, Zhang Z, Yang XB Li JH, Chen LX. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 300–314 (in Chinese) [贾梦凡, 张忠, 杨兴斌, 李金花, 陈令新. 中国科学: 化学, 2017, 47: 300–314]
25 Yang W, Liu L, Zhou Z, Liu H, Xie B, Xu W. *Appl Surf Sci*, 2013, 282: 809–819
26 Deng F, Li Y, Luo X, Yang L, Tu X. *Colloids Surfs A*, 2012, 395: 183–189
27 Gao B, Wang J, An F, Liu Q. *Polymer*, 2008, 49: 1230–1238
28 Ma F, Sun M, Zhang K, Wang S. *Sens Actuat B-Chem*, 2015, 209: 377–383
29 Li J, Fu J, Yang Q, Wang L, Wang X, Chen L. *Analyst*, 2018, 143: 3570–3578
30 Wang L, Yin Y, Jain A, Zhou HS. *Langmuir*, 2014, 30: 14270–14275
31 Devi S, Tyagi S. *Instrum Sci Technol*, 2018, 46: 1–20
32 Wu L, Wang S, Song Y, Wang X, Yan X. *Sci China Chem*, 2016, 59: 30–39
33 Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/23200.49-2016. Beijing: China Standards Press, 2017(in Chinese) [中华人民共和国卫生部. GB/23200.49-2016. 北京: 中国标准出版社, 2017]
34 Hu SL, Niu KY, Sun J, Yang J, Zhao NQ, Du XW. *J Mater Chem*, 2009, 19: 484–488
35 Copur F, Bekar N, Zor E, Alpaydin S, Bingol H. *Sens Actuat B-Chem*, 2019, 279: 305–312
36 Jhonsi MA, Ananth DA, Nambirajan G, Sivasudha T, Yamini R, Bera S, Kathiravan A. *Spectrochim Acta Part A*, 2018, 196: 295–302
37 Gutierrez FA, Gonzalez-Dominguez JM, Ansón-Casaos A, Hernández-Ferrer J, Rubianes MD, Martínez MT, Rivas G. *Sens Actuat B-Chem*, 2017, 249: 506–514
38 Zhang Z, Ma X, Jia M, Li B, Rong J, Yang X. *Analyst*, 2019, 144: 1282–1291
39 Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, Goldman ER, Fisher B, Mauro JM. *Nat Mater*, 2003, 2: 630–638
40 Xu S, Lu H. *Chem Commun*, 2015, 51: 3200–3203

Environmentally friendly ratiometric fluorescent microfluidic paper chip for rapid detection of difenoconazole

Xin Ma[1], Guoying Hao[1], Zhong Zhang[1,2*], Jinhua Li[2,3], Xingbin Yang[1], Lingxin Chen[2,3*]

[1] *Shaanxi Engineering Laboratory for Food Green Processing and Sefaty Control, College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China*
[2] *Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China*
[3] *Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*
**Corresponding authors (email: zzhang@snnu.edu.cn; lxchen@yic.ac.cn)*

Abstract: A novel ratiometric fluorescent imprinted microfluidic device was constructed to rapidly detect trace pesticide residues. NBD-APTES was used as control fluorescence, and the fluorescence of carbon quantum dots modified with cysteine (CDs-Cys) was constructed to achieve rapid visual detection of the bacteriostatic agent difenoconazole. The analytical performance of paper-based chips was studied in detail using scanning electron microscopy and laser confocal microscopy. Under optimized conditions, the linear range of the fluorescence sensor is 0.3–60 μmol/L, the LOD is 75 nmol/L, the recoveries are 102.1%–111.2%, and the accuracy is 3.1%–4.2%. Compared with the traditional liquid phase fluorescence sensing materials, the ratiometric fluorescence sensor under the solid phase matrix has better portability and storability, showing satisfactory fluorescence characteristics. In addition, the sensor was highly specific for separating and detecting difenoconazole and was successfully applied to actual sample. It opens up new ways for the combination of ratiometric fluorescence technology and paper-based microfluidic chip, and provides potential point-of-care applications.

Keywords: molecular imprinting, carbon quantum dot, ratiometric fluorescence, difenoconazole, paper-based microfluidic chip

doi: 10.1360/SSC-2019-0140