



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102749442 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 09

(21) 申请号 201210261179. 7

(22) 申请日 2012. 07. 26

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 魏琴 杜斌 于淑君 张勇

于海琴 闫良国 李贺 王志玲

吴丹 罗川南 马洪敏 李玉阳

朱宝存 孙蒙 曹伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

审查员 毕秀华

权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法及应用。电化学免疫传感器制备方法是在玻碳电极表面修饰硫堇-石墨烯混合溶液,通过戊二醛交联 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>介孔纳米粒子孵化的抗生素抗体,并以牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点,制备成一种抗生素电化学免疫传感器。抗生素的检测方法是将参比电极-饱和甘汞电极、对电极-铂丝电极及工作电极正确连接在电化学工作站上,通过方波伏安法进行免疫检测。本发明的抗生素电化学免疫传感器具有较高的灵敏度和专一性,检测方法简单,完成一个检测过程需要 2-3 分钟,具有快速高效、特异性好、成本低、操作简便等特点。

1. 银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法,其特征是包括以下步骤:

(1) 硫堇-石墨烯混合溶液的制备;

1) 壳聚糖溶液的配制:将壳聚糖加入到体积分数为 1% 的醋酸中搅拌 2 h,制得质量分数 0.3 ~ 0.7% 的壳聚糖溶液;

2) 硫堇-壳聚糖溶液的配制:将硫堇加入到质量分数为 0.3 ~ 0.7% 的壳聚糖溶液中,超声 30 min 得到 3 ~ 5 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液 I;

3) 石墨烯-壳聚糖溶液的配制:将石墨烯加入到质量分数为 0.3 ~ 0.7% 的壳聚糖溶液中,超声 30 min 得到 3 ~ 5 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液 II;

4) 硫堇-石墨烯混合溶液的配制:将溶液 II 和溶液 I 按体积比 1 : 1 ~ 5 混合并超声 30 min;

(2) Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体的制备;

1) 介孔 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的制备:将 1 g FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 溶解在 18 mL 乙二醇溶液中形成透明溶液,然后加入 3 g NaAc 和 10 mL 丁二胺,超声混合 3 ~ 5 min,然后 190 °C 条件下在聚四氟乙烯的反应釜中加热 6 ~ 8 h,冷却到室温,黑色的固体用超纯水洗涤数次直到上清液澄清,得到介孔 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>;

2) Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料的制备:介孔 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 和 AgNO<sub>3</sub> 按质量比 1 : 0.5 ~ 1.5 加入到超纯水中,震荡 20 ~ 30 h,然后加入新配制的 50 mmol · L<sup>-1</sup> NaBH<sub>4</sub> 溶液,磁力分离去除上清液,用超纯水重新稀释,用稀 HCl 调节 pH 小于 2,震荡 20 ~ 40 min,用超纯水洗至 pH 等于 7,磁力分离得到 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料;

3) 孵化溶液的配制:将适量 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料加入到超纯水中,超声 20 ~ 40 min,得到 1 ~ 3 mg · mL<sup>-1</sup> 孵化溶液;

4) Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体的制备:在 4 °C 条件下,将 1 mL 孵化溶液加入到 400 μL 体积分数 2.5% 的戊二醛中,震荡 1 ~ 2 h,磁力分离去除上清液,加入 10 μL 10 μg · mL<sup>-1</sup> 抗生素抗体,再加入 1 mL pH 为 7.4 磷酸缓冲液,震荡 20 ~ 30 h,然后磁力分离去除上清液,再加入 1 mL pH 为 7.4 磷酸缓冲液,最后得到 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体;

(3) 电化学免疫传感器的制备。

2. 根据权利要求 1 所述的银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法,其特征是所述的电化学免疫传感器的制备,包括以下步骤:

(1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 μm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 5 mmol · L<sup>-1</sup> 铁氰化钾溶液中,在 -0.2 ~ 0.6 V 扫描,峰电位差小于 110 mV;

(2) 将 6 ~ 8 μL 硫堇-石墨烯混合溶液滴到玻碳电极表面,室温干燥;

(3) 滴涂 6 μL 体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液,4 °C 冰箱中润湿条件下保存 2 h,超纯水清洗,晾干成膜;

(4) 滴涂 6 μL Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体,4 °C 冰箱中保存至干燥;

(5) 滴涂 3 μL 100 μg · mL<sup>-1</sup> 牛血清白蛋白,4 °C 冰箱中保存至干燥,超纯水清洗,晾干成膜,制得抗生素电化学免疫传感器。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法,其特征是所述的抗生素是 β-内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类或大环内酯类;

所述  $\beta$ -内酰胺类选自下列之一：青霉素、阿莫西林、邻氯青霉素、氨苄西林、双氯青霉素；

所述氨基糖苷类选自下列之一：链霉素、庆大霉素、卡那霉素、壮观霉素、丁胺卡那霉素、双氢链霉素、妥布霉素；

所述四环素类选自下列之一：四环素、土霉素、金霉素、强力霉素、二甲胺四环素、甲烯土霉素；

所述大环内酯类选自下列之一：红霉素、螺旋霉素、林可霉素、克林霉素、竹桃霉素、吉它霉素、泰乐霉素。

## 银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法及应用。具体是基于  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  纳米复合材料构建的检测多种抗生素的无标记型电化学免疫传感器,属于新型纳米功能材料与生物传感器技术领域。

### 背景技术

[0002] 抗生素是抵抗致病微生物的药物,是由微生物(包括细菌、真菌、放线菌属)或高等动植物在生活过程中所产生的具有抗病原体或其它活性的一类次级代谢产物,能干扰其它生活细胞发育功能的化学物质。

[0003] 常用的抗生素有微生物培养液中提取物以及用化学方法合成或半合成的化合物,分为以下几类: $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、大环内酯类、抗真菌抗生素等。

[0004] 抗生素可作为促进畜禽生长的饲料添加剂,或作为预防和治疗畜禽疾病的兽药,在乳业中用于提高奶牛产奶量;在水产养殖业用于治疗多种鱼类疾病;在养蜂业用于预防蜜蜂的感染性疾病。但过量使用不可避免使母体、代谢产物等相关抗生素残留于食源性动物的肌肉、奶、蛋、脏器组织中,通过食物链影响人类健康。鉴于抗生素的作用与危害并存,抗生素的残留问题格外受到关注。

[0005] 目前对抗生素残留量的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)及微生物法(MA)等,但是这些检测方法存在如下不足。

[0006] 1. 高效液相色谱法:包括液-液分配色谱法、液-固色谱法以及离子交换色谱法等,此类检测方法虽然分析效率高,灵敏度高,但液相色谱仪价格及日常维护费用贵,分析时间长。

[0007] 2. 液相色谱-串联质谱法:检测限低,定性定量准确,重现性好,但是仪器设备复杂、操作过程繁琐,对检验人员的操作技能要求很高,且不适于现场检测和快速检测。

[0008] 3. 微生物法:手续繁多,分析速度慢且结果误差较大。

[0009] 为了解决上述问题,本发明采用电化学免疫传感器检测抗生素,在传感器的制备过程中材料的选择极其重要。

[0010] 介孔材料作为一种功能材料,由于其独特的物理化学性质,使其在物理、化学等方面表现出特殊用途。其中四氧化三铁作为介孔材料的一种,由于其制备工艺简单、价格低、性能稳定、比表面积大等,成为组装电化学免疫传感器的良好材料。

[0011] 银纳米粒子具有比表面积大、表面反应活性高、催化效率高、吸附能力强以及良好的生物相容性和稳定性等优点,可用于固载和标记生物分子。

[0012] 将四氧化三铁介孔材料和银纳米粒子合成得到  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料,既保留了两者的优点,又体现出优异的协同增敏效果,同时提高了其电极表面的电子传递效率,从而增强了电化学免疫传感器的检测灵敏度。

[0013] 经对现有专利技术的检索发现,CN201010210144.1公开了一种用于检测食品中青

霉菌的电化学免疫传感器,该发明线性范围宽,检测限为  $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  (即 1 ppb)。

[0014] CN200410013741. X 公开了一种用 pH 计检测牛奶中青霉素的方法,该发明是依据溶液的酸度变化来检测牛奶中是否含有抗生素,方法简便快速,其检测限为 6 ppb。

[0015] 本发明对多种抗生素的检测限在  $0.015 \sim 0.017 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (即  $0.015 \sim 0.017$  ppb) 范围。

[0016] 由此看出,将  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料引入传感器的制备中,显著降低了传感器的检测限,对抗生素检测的灵敏度均优于以上两种方法。

[0017] CN200610130646. 7 和 CN200810052119. 8 公开了两种基于表面等离子体共振检测抗生素的方法,该方法具有测定时间短、精密度高、特异性好等优点,但仪器设备昂贵。

[0018] 本发明采用  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料制备了一种无标记型免疫传感器,是一种低成本、高灵敏、特异性好、快速检测多种抗生素的技术,且制备过程简单,完成一个检测过程需要 2-3 分钟,有效克服了目前抗生素检测方法的不足。

## 发明内容

[0019] 本发明的目的之一是避免传统检测方法的仪器设备复杂、操作过程繁琐及对检验人员的高技能要求的缺点,提供一种低成本的抗生素电化学免疫传感器的制备方法。

[0020] 本发明的目的之二是将该抗生素电化学免疫传感器应用于抗生素的检测。

[0021] 本发明的技术方案如下:

[0022] 1. 本发明的银杂化介孔三氧化二铁抗生素免疫传感器制备方法,其特征是包括以下步骤:

[0023] (1) 硫堇 - 石墨烯混合溶液的制备;

[0024] (2)  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体的制备;

[0025] (3) 电化学免疫传感器的制备。

[0026] (1) 中所述的硫堇 - 石墨烯混合溶液的制备,步骤如下:

[0027] 1) 壳聚糖溶液的配制:将壳聚糖加入到体积分数为 1% 的醋酸中搅拌 2 h,制得质量分数  $0.3 \sim 0.7\%$  的壳聚糖溶液;

[0028] 2) 硫堇 - 壳聚糖溶液(溶液 I)的配制:将硫堇加入到质量分数为  $0.3 \sim 0.7\%$  的壳聚糖溶液中,超声 30 min 得到  $3 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 I;

[0029] 3) 石墨烯 - 壳聚糖溶液(溶液 II)的配制:将石墨烯加入到质量分数为  $0.3 \sim 0.7\%$  的壳聚糖溶液中,超声 30 min 得到  $3 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 II;

[0030] 4) 硫堇 - 石墨烯混合溶液(溶液 III)的配制:将溶液 II 和溶液 I 按体积比 1 : 1 ~ 5 混合并超声 30 min。

[0031] (2) 中所述的  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体的制备,步骤如下:

[0032] 1) 介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的制备:将 1 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶解在 18 mL 乙二醇溶液中形成透明溶液,然后加入 3 g NaAc 和 10 mL 丁二胺,超声混合  $3 \sim 5$  min,然后  $190^\circ\text{C}$  条件下在聚四氟乙烯的反应釜中加热  $6 \sim 8$  h,冷却到室温,黑色的固体用超纯水洗涤数次直到上清液澄清,得到介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ;

[0033] 2)  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料的制备:介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和  $\text{AgNO}_3$  按质量比 1 :  $0.5 \sim 1.5$  加入到超纯水中,震荡  $20 \sim 30$  h,然后加入新配制的  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaBH}_4$  溶液,磁力分离去除上清

液,用超纯水重新稀释,用稀 HCl 调节 pH 小于 2,震荡 20 ~ 40 min,用超纯水洗至 pH 等于 7,磁力分离得到 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料;

[0034] 3) 孵化溶液的配制:将适量 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料加入到超纯水中,超声 20 ~ 40 min,得到 1 ~ 3 mg · mL<sup>-1</sup> 孵化溶液;

[0035] 4) Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体的制备:在 4 °C 条件下,将 1 mL 孵化溶液加入到 400 μL 体积分数 2.5% 的戊二醛中,震荡 1 ~ 2 h,磁力分离去除上清液,加入 10 μL 10 μg · mL<sup>-1</sup> 抗生素抗体,再加入 1 mL pH 为 7.4 磷酸缓冲液,震荡 20 ~ 30 h。然后磁力分离去除上清液,再加入 1 mL pH 为 7.4 磷酸缓冲液,最后得到 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体。

[0036] (3) 中所述的电化学免疫传感器的制备,步骤如下:

[0037] 1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 μm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 5 mmol · L<sup>-1</sup> 铁氰化钾溶液中,在

[0038] - 0.2 ~ 0.6 V 扫描,峰电位差小于 110 mV;

[0039] 2) 将 6 ~ 8 μL 硫堇-石墨烯混合溶液滴到玻碳电极表面,室温干燥;

[0040] 3) 滴涂 6 μL 体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液,4 °C 冰箱中湿润条件下保存 2 h,超纯水清洗,晾干成膜;

[0041] 4) 滴涂 6 μL Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体,4 °C 冰箱中保存至干燥;

[0042] 5) 滴涂 3 μL 100 μg · mL<sup>-1</sup> 牛血清白蛋白,4 °C 冰箱中保存至干燥,超纯水清洗,晾干成膜,制得抗生素电化学免疫传感器。

[0043] 2. 本发明所述的制备的银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器,用于抗生素检测,其特征是包括以下步骤:

[0044] (1) 工作曲线的绘制;

[0045] (2) 抗生素的检测。

[0046] (1) 中所述的工作曲线的绘制,步骤如下:

[0047] 1) 将制备好的抗生素电化学免疫传感器作为工作电极、饱和甘汞电极作为参比电极、铂丝电极作为辅助电极,组成三电极系统,结合电化学工作站,在 pH 为 6.5 ~ 8.5 磷酸缓冲液中,用方波伏安法(SWV)在 - 0.6 ~ 0.6 V 电压范围内测定,记录响应电流  $I_0$ ;

[0048] 2) 用水冲洗步骤 1) 中的工作电极,将配制好的不同浓度的抗生素标准溶液分别滴涂到不同工作电极表面,4 °C 冰箱中保存至干燥;

[0049] 3) 分别将步骤 2) 修饰的工作电极执行步骤 1) 所述的测定过程,此时的响应电流记为  $I_i$ ;

[0050] 4) 根据步骤 1) 和步骤 3) 所得的电流差值  $\Delta I = I_0 - I_i$  与抗生素标准溶液浓度之间的线性关系,绘制工作曲线。

[0051] 3. 本发明所述的银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器,其特征是所述的抗生素是  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类或大环内酯类;

[0052] 所述的  $\beta$ -内酰胺类选自下列之一:青霉素、阿莫西林、邻氯青霉素、氨苄西林、双氯青霉素;

[0053] 所述的氨基糖苷类选自下列之一:链霉素、庆大霉素、卡那霉素、壮观霉素、丁胺卡那霉素、双氢链霉素、妥布霉素;

[0054] 所述的四环素类选自下列之一：四环素、土霉素、金霉素、强力霉素、二甲胺四环素、甲烯土霉素；

[0055] 所述的大环内酯类选自下列之一：红霉素、螺旋霉素、林可霉素、克林霉素、竹桃霉素、吉它霉素、泰乐霉素。

[0056] 本发明的有益成果

[0057] (1) 电化学免疫传感器制备方法, 利用纳米材料的增效作用和两种纳米材料的协同增敏作用, 使制得的传感器具有更高的灵敏度；

[0058] (2) 介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  制备工艺简单, 价格低, 导电性好, 高的磁饱和度可以放大信号, 使制得的传感器易于推广；

[0059] (3) 将表面层层修饰技术应用到电化学免疫传感器的制备中, 使纳米介孔材料增效的抗生素电化学免疫传感器的制备具有可控性, 显著提高了电化学免疫传感器的灵敏度、稳定性和准确性；

[0060] (4) 电化学免疫传感器检测抗生素的方法, 可以实现特异性、高灵敏和快速检测。

## 附图说明

[0061] 图 1 为银杂化介孔四氧化三铁抗生素电化学免疫传感器的制备过程。

## 具体实施方式

[0062] 实施例 1

[0063] 银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法, 包括以下步骤。

[0064] (1) 硫堇 - 石墨烯混合溶液的制备, 步骤如下：

[0065] 1) 壳聚糖溶液的配制：将 0.15 g 壳聚糖加入到 50 mL 体积分数为 1% 的醋酸中搅拌 2 h, 制得质量分数 0.3% 的壳聚糖溶液；

[0066] 2) 硫堇 - 壳聚糖溶液(溶液 I) 的配制：将 12 mg 硫堇加入到 4 mL 质量分数为 0.3% 的壳聚糖溶液中, 超声 30 min 得到  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 I；

[0067] 3) 石墨烯 - 壳聚糖溶液(溶液 II) 的配制：将 12 mg 石墨烯加入到 4 mL 质量分数为 0.3% 的壳聚糖溶液中, 超声 30 min 得到  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 II；

[0068] 4) 硫堇 - 石墨烯混合溶液(溶液 III) 的配制：将溶液 I 和溶液 II 按体积比 2 : 1 混合并超声 30 min。

[0069] (2)  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体的制备, 步骤如下：

[0070] 1) 介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的制备：将 1 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶解在 18 mL 乙二醇溶液中形成透明溶液, 然后加入 3 g NaAc 和 10 mL 丁二胺, 超声混合 3 min, 然后  $190^\circ\text{C}$  条件下在聚四氟乙烯的反应釜中加热 6 h, 冷却到室温, 黑色的固体用超纯水洗涤数次直到上清液澄清, 得到介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ；

[0071] 2)  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料的制备：20 mg 介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和 10 mg  $\text{AgNO}_3$  加入到 20 mL 超纯水中, 震荡 20 h, 然后加入新配制的  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaBH}_4$  溶液, 磁力分离去除上清液, 用超纯水重新稀释, 用稀 HCl 调节 pH 小于 2, 震荡 20 min, 用超纯水洗至 pH 为 7, 磁力分离得到  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料；

[0072] 3) 孵化溶液的配制：将 4 mg  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料加入到 4 mL 超纯水中, 超声 20

min, 得到  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  孵化溶液;

[0073] 4)  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体的制备: 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下, 将  $1 \text{ mL } 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  孵化溶液加入到

[0074]  $400 \text{ } \mu\text{L}$  体积分数 2.5% 的戊二醛中, 震荡 1 h, 磁力分离去除上清液, 加入  $10 \text{ } \mu\text{L}$   $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  抗生素抗体, 再加入  $1 \text{ mL}$  pH 为 7.4 磷酸缓冲液, 震荡 20 h。然后磁力分离去除上清液, 再加入  $1 \text{ mL}$  pH 为 7.4 磷酸缓冲液, 最后得到  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体。

[0075] (3) 根据图 1 进行抗生素电化学免疫传感器的制备, 步骤如下:

[0076] 1) 将直径 4 mm 的玻璃碳电极依次用 1.0、0.3 和  $0.05 \text{ } \mu\text{m}$  的三氧化二铝抛光粉抛光处理, 乙醇超声清洗, 再用超纯水冲洗干净, 然后将电极置于  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  铁氰化钾溶液中, 在  $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$  扫描, 峰电位差小于  $110 \text{ mV}$ ;

[0077] 2) 将  $6 \text{ } \mu\text{L}$  硫堇-石墨烯混合溶液滴到玻璃碳电极表面, 室温干燥, 得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯;

[0078] 3) 将  $6 \text{ } \mu\text{L}$  体积分数 2.5% 的戊二醛滴在玻璃碳电极/硫堇-石墨烯上,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中湿润状态下保存 2 h 之后再在室温下干燥, 得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛;

[0079] 4) 将  $6 \text{ } \mu\text{L}$   $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体滴在玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛上,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存至干燥得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛/ $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体;

[0080] 5) 将  $3 \text{ } \mu\text{L}$   $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  牛血清白蛋白滴在玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛/ $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体上,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存至干燥, 用超纯水清洗, 晾干成膜得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛/ $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体/牛血清白蛋白, 制得抗生素电化学免疫传感器。

[0081] 实施例 2

[0082] 银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法, 包括以下步骤。

[0083] (1) 硫堇-石墨烯混合溶液的制备, 步骤如下:

[0084] 1) 壳聚糖溶液的配制: 将  $0.25 \text{ g}$  壳聚糖加入到  $50 \text{ mL}$  体积分数为 1% 的醋酸中搅拌 2 h, 制得质量分数 0.5% 的壳聚糖溶液;

[0085] 2) 硫堇-壳聚糖溶液(溶液 I) 的配制: 将  $8 \text{ mg}$  硫堇加入到  $2 \text{ mL}$  质量分数为 0.5% 的壳聚糖溶液中, 超声 30 min 得到  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 I;

[0086] 3) 石墨烯-壳聚糖溶液(溶液 II) 的配制: 将  $8 \text{ mg}$  石墨烯加入到  $2 \text{ mL}$  质量分数为 0.5% 的壳聚糖溶液中, 超声 30 min 得到  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 II;

[0087] 4) 硫堇-石墨烯混合溶液(溶液 III) 的配制: 将溶液 I 和溶液 II 按体积比 3 : 1 混合并超声 30 min。

[0088] (2)  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体的制备, 步骤如下:

[0089] 1) 介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的制备: 将  $1 \text{ g}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶解在  $18 \text{ mL}$  乙二醇溶液中形成透明溶液, 然后加入  $3 \text{ g}$  NaAc 和  $10 \text{ mL}$  丁二胺, 超声混合 4 min, 然后  $190 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下在聚四氟乙烯的反应釜中加热 7 h, 冷却到室温, 黑色的固体用超纯水洗涤数次直到上清液澄清, 得到介孔  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ;

[0090] 2)  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$  复合材料的制备:  $30 \text{ mg}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和  $30 \text{ mg}$   $\text{AgNO}_3$  加入到  $30 \text{ mL}$  超纯水中, 震荡 24 h, 然后加入新配制的  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaBH}_4$  溶液, 磁力分离去除上清液, 用超纯水重新稀释, 用稀 HCl 调节 pH 小于 2, 震荡 30 min, 用超纯水洗至 pH 等于 7, 磁力分离得到

Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料；

[0091] 3) 孵化溶液的配制：将 4 mg Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料加入到 2 mL 超纯水中，超声 30 min，得到 2 mg · mL<sup>-1</sup> 孵化溶液；

[0092] 4) Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体的制备：在 4 °C 条件下，将 1 mL 2 mg · mL<sup>-1</sup> 孵化溶液加入

[0093] 到 400 μL 体积分数 2.5% 的戊二醛中，震荡 1.5 h，磁力分离去除上清液，加入 10 μL 10 μg · mL<sup>-1</sup> 抗生素抗体，再加入 1 mL pH=7.4 磷酸缓冲液，震荡 24 h。然后磁力分离去除上清液，再加入 1 mL pH=7.4 磷酸缓冲液，最后得到 Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体。

[0094] (3) 根据图 1 进行抗生素电化学免疫传感器的制备，步骤如下：

[0095] 1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 μm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理，乙醇超声清洗，再用超纯水冲洗干净，然后将电极置于 5 mmol · L<sup>-1</sup> 铁氰化钾溶液中，在 -0.2 ~ 0.6 V 扫描，峰电位差小于 110 mV；

[0096] 2) 将 7 μL 硫堇 - 石墨烯混合溶液滴到玻碳电极表面，室温干燥，得到玻碳电极 / 硫堇 - 石墨烯；

[0097] 3) 将 6 μL 体积分数 2.5% 的戊二醛滴在玻碳电极 / 硫堇 - 石墨烯上，4 °C 冰箱中湿润状态下保存 2 h 之后再在室温下干燥，得到玻碳电极 / 硫堇 - 石墨烯 / 戊二醛；

[0098] 4) 将 6 μL Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体滴在玻碳电极 / 硫堇 - 石墨烯 / 戊二醛上，4 °C 冰箱中保存至干燥得到玻碳电极 / 硫堇 - 石墨烯 / 戊二醛 / Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体；

[0099] 5) 将 3 μL 100 μg · mL<sup>-1</sup> 牛血清白蛋白滴在玻碳电极 / 硫堇 - 石墨烯 / 戊二醛 / Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体上，4 °C 冰箱中保存至干燥，用超纯水清洗，晾干成膜得到玻碳电极 / 硫堇 - 石墨烯 / 戊二醛 / Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体 / 牛血清白蛋白，制得抗生素电化学免疫传感器。

[0100] 实施例 3

[0101] 银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法，包括以下步骤。

[0102] (1) 硫堇 - 石墨烯混合溶液的制备，步骤如下：

[0103] 1) 壳聚糖溶液的配制：将 0.35 g 壳聚糖加入到 50 mL 体积分数为 1% 的醋酸中搅拌 2 h，制得质量分数 0.7% 的壳聚糖溶液；

[0104] 2) 硫堇 - 壳聚糖溶液(溶液 I) 的配制：取 15 mg 硫堇加入到 3 mL 质量分数为 0.7% 的壳聚糖溶液中，超声 30 min 得到 5 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液 I；

[0105] 3) 石墨烯 - 壳聚糖溶液(溶液 II) 的配制：取 15 mg 石墨烯加入到 3 mL 质量分数为 0.7% 的壳聚糖溶液中，超声 30 min 得到 5 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液 II；

[0106] 4) 硫堇 - 石墨烯混合溶液(溶液 III) 的配制：将溶液 I 和溶液 II 按体积比 5 : 1 混合并超声 30 min。

[0107] (2) Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- 抗生素抗体的制备，步骤如下：

[0108] 1) 介孔 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的制备：将 1 g FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 溶解在 18 mL 乙二醇溶液中形成透明溶液，然后加入 3 g NaAc 和 10 mL 丁二胺，超声混合 5 min，然后 190 °C 条件下在聚四氟乙烯的反应釜中加热 8 h，冷却到室温，黑色的固体用超纯水洗涤数次直到上清液澄清，得到介孔 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>；

[0109] 2) Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料的制备：20 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 和 30 mg AgNO<sub>3</sub> 加入到 30 mL 超纯水

中,震荡 30 h,然后加入新配制的  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaBH}_4$  溶液,磁力分离去除上清液,用超纯水重新稀释,用稀 HCl 调节 pH 小于 2,震荡 40 min,用超纯水洗至 pH 等于 7,磁力分离得到 Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  复合材料;

[0110] 3) 孵化溶液的配制:将 6 mg Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  复合材料加入到 2 mL 超纯水中,超声 40 min,得到  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  孵化溶液;

[0111] 4) Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体的制备:在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下,将  $1 \text{ mL}$   $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  孵化溶液加入

[0112] 到  $400 \text{ } \mu\text{L}$  体积分数 2.5% 的戊二醛中,震荡 2 h,磁力分离去除上清液,加入  $10 \text{ } \mu\text{L}$   $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  抗生素抗体,再加入  $1 \text{ mL}$  pH 为 7.4 磷酸缓冲液,震荡 30 h。然后磁力分离去除上清液,再加入  $1 \text{ mL}$  pH 为 7.4 磷酸缓冲液,最后得到 Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体。

[0113] (3) 根据图 1 进行抗生素电化学免疫传感器的制备,步骤如下:

[0114] 1) 将直径 4 mm 的玻璃碳电极依次用 1.0、0.3 和  $0.05 \text{ } \mu\text{m}$  的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  铁氰化钾溶液中,在  $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$  扫描,峰电位差小于  $110 \text{ mV}$ ;

[0115] 2) 将  $8 \text{ } \mu\text{L}$  硫堇-石墨烯混合溶液滴到玻璃碳电极表面,室温干燥,得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯;

[0116] 3) 将  $6 \text{ } \mu\text{L}$  体积分数 2.5% 的戊二醛滴在玻璃碳电极/硫堇-石墨烯上, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中湿润状态下保存 2 h 之后再在室温下干燥,得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛;

[0117] 4) 将  $6 \text{ } \mu\text{L}$  Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体滴在玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛上, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存至干燥得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛/Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体;

[0118] 5) 将  $3 \text{ } \mu\text{L}$   $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  牛血清白蛋白滴在玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛/Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体上, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存至干燥,用超纯水清洗,晾干成膜得到玻璃碳电极/硫堇-石墨烯/戊二醛/Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - 抗生素抗体/牛血清白蛋白,制得抗生素电化学免疫传感器。

[0119] 实施例 4

[0120] 实施例 1 ~ 3 制备的银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器,分别用于抗生素检测,步骤如下。

[0121] 1) 将制备好的抗生素电化学免疫传感器作为工作电极、饱和甘汞电极作为参比电极、铂丝电极作为辅助电极,组成三电极系统,结合电化学工作站,在 pH 为  $6.5 \sim 8.5$  磷酸缓冲液中,用方波伏安法(SWV)在  $-0.6 \sim 0.6 \text{ V}$  电压范围内测定,记录响应电流  $I_0$ 。

[0122] 2) 用水冲洗步骤 1) 中的工作电极,将配制好的不同浓度的抗生素标准溶液分别滴涂到不同工作电极表面, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中保存至干燥。

[0123] 3) 分别将步骤 2) 修饰的工作电极执行步骤 1) 所述的测定过程,此时的响应电流记为  $I_i$ 。

[0124] 4) 根据步骤 1) 和步骤 3) 所得的电流差值  $\Delta I = I_0 - I_i$  与抗生素标准溶液浓度之间的线性关系,绘制工作曲线。

[0125] 5) 将步骤 2) 中的标准溶液更换为被检测的样品溶液,重复步骤 2) 和步骤 3),根据滴涂样品溶液前后响应电流的变化值  $\Delta I$  和工作曲线,得到样品溶液中某种抗生素的含量。

[0126] 实施例 5 ( $\beta$ -内酰胺类:青霉素、阿莫西林、邻氯青霉素、氨苄西林或双氯青霉素)

[0127] 一种  $\beta$ -内酰胺类抗生素电化学免疫传感器的制备方法及应用,包括以下步骤。

[0128] (1)选择能特异性识别  $\beta$ -内酰胺类抗生素的抗体,按照实施例 1 所述的步骤制备电化学免疫传感器。

[0129] (2)按照实施例 4 所述的步骤进行检测。 $\beta$ -内酰胺类抗生素的检测技术指标对比结果见表 1。

[0130] 表 1  $\beta$ -内酰胺类抗生素的检测技术指标对比结果

[0131]

样品名称	本发明		GB/T 21174—2007
	线性范围, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
$\beta$ -内酰胺类抗生素	0.052 ~ 16	0.016	25

[0132] 表 1 对比结果表明,本发明与 GB/T 21174—2007 采用的放射受体分析法检测动物源性食品中  $\beta$ -内酰胺类药物残留相比,具有较低的检测限,更高的灵敏度。

[0133] 实施例 6 (氨基糖苷类:链霉素、庆大霉素、卡那霉素、壮观霉素、丁胺卡那霉素、双氢链霉素或妥布霉素)

[0134] 一种氨基糖苷类抗生素电化学免疫传感器的制备方法及应用,包括以下步骤。

[0135] (1)选择能特异性识别氨基糖苷类抗生素的抗体,按照实施例 2 所述的步骤制备电化学免疫传感器。

[0136] (2)按照实施例 4 所述的步骤进行检测,氨基糖苷类抗生素的检测技术指标对比结果见表 2。

[0137] 表 2 氨基糖苷类抗生素的检测技术指标对比结果

[0138]

样品名称	本发明		GB/T 21323—2007
	线性范围, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
氨基糖苷类抗生素	0.050 ~ 16	0.015	20

[0139] 表 2 对比结果表明,本发明与 GB/T 21323—2007 采用的高效液相色谱-质谱/质谱法检测动物组织中氨基糖苷类药物残留相比,具有较低的检测限,更高的灵敏度。

[0140] 实施例 7 (四环素类:四环素、土霉素、金霉素、强力霉素、二甲胺四环素或甲烯土霉素)

[0141] 一种四环素类抗生素电化学免疫传感器的制备方法及应用,包括以下步骤。

[0142] (1)选择能特异性识别四环素类抗生素的抗体,按照实施例 3 所述的步骤制备电化学免疫传感器。

[0143] (2)按照实施例 4 所述的步骤进行检测,四环素类抗生素的检测技术指标对比结果见表 3。

[0144] 表 3 四环素类抗生素的检测技术指标对比结果

[0145]

样品名称	本发明		GB/T 21317—2007
	线性范围, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
四环素类抗生素	0.054 ~ 18	0.017	50

[0146] 表 3 对比结果表明,本发明与 GB/T 21317—2007 采用的高效液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法检测动物源性食品中四环素类兽药残留相比,具有较低的检测限,更高的灵敏度。

[0147] 实施例 8 (大环内酯类:红霉素、螺旋霉素、林可霉素、克林霉素、竹桃霉素、吉它霉素或泰乐霉素)

[0148] 一种大环内酯类抗生素电化学免疫传感器的制备方法及应用,包括以下步骤。

[0149] (1) 选择能特异性识别大环内酯类抗生素的抗体,按照实施例 1 所述的步骤制备电化学免疫传感器。

[0150] (2) 按照实施例 4 所述的步骤进行检测。大环内酯类抗生素的检测技术指标对比结果见表 4。

[0151] 表 4 大环内酯类抗生素的检测技术指标对比结果

[0152]

样品名称	本发明		GB/T 20762—2006
	线性范围, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测限, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
大环内酯类抗生素	0.050 ~ 18	0.015	1.0

[0153] 表 4 对比结果表明,本发明与 GB/T 20762—2006 采用的液相色谱-串联质谱法检测畜禽肉中大环内酯类抗生素残留相比,具有较低的检测限,更高的灵敏度。

[0154] 实施例 9

[0155] 猪肉和牛奶等样品中抗生素的检测

[0156] 准确称取猪肉和牛奶等实际样品,采用常规方法进行样品处理,按照实施例 4 所述的步骤进行检测。检测结果见表 5。

[0157] 表 5 样品中抗生素的检测结果

[0158]

抗生素	加入量 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	样品					
		猪肉			牛奶		
		回收值 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	RSD % n=5	回收率 %	回收值 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	RSD % n=5	回收率 %
青霉素	2.00	1.90	2.3	95.0	1.89	3.0	94.7
阿莫西林	4.00	3.87	1.8	96.8	3.70	2.7	92.5
邻氯青霉素	6.00	6.12	2.8	102	5.92	1.4	98.7
双氯青霉素	8.00	8.08	2.6	101	8.08	3.0	101
链霉素	10.00	9.60	2.1	96.0	9.73	1.7	97.3
庆大霉素	2.00	2.06	2.4	103	2.02	1.5	101
卡那霉素	4.00	3.98	3.0	99.6	4.12	2.8	103
壮观霉素	3.00	2.96	2.7	98.7	2.98	2.5	99.3
妥布霉素	5.00	5.05	1.4	101	5.15	1.9	103
四环素	7.00	6.88	3.0	98.3	6.91	2.8	98.7
土霉素	9.00	8.94	1.7	99.3	8.96	2.3	99.6
金霉素	11.00	10.7	1.5	97.4	10.8	1.8	98.2
强力霉素	8.00	7.50	2.3	93.7	7.56	2.5	94.5
红霉素	12.00	11.8	2.8	98.5	11.9	2.8	99.3
螺旋霉素	6.00	6.06	2.5	101	6.12	2.6	102
林可霉素	8.00	8.24	1.9	103	7.91	2.1	98.9
泰乐霉素	10.00	9.76	2.8	97.6	9.67	2.4	96.7

[0159] 表5检测结果可知,检测结果的相对标准偏差(RSD)小于3.0%,平均回收率为92.5~103%,表明本发明用于猪肉和牛奶等实际样品中抗生素的检测,方法的精密度高,结果准确可靠。

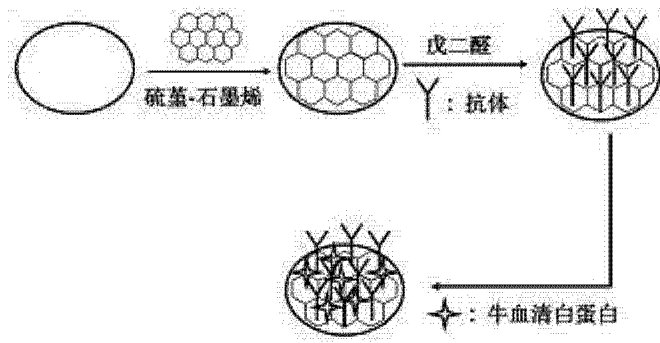


图 1

专利名称(译)	银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102749442B</a>	公开(公告)日	2013-10-09
申请号	CN201210261179.7	申请日	2012-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	魏琴 杜斌 于淑君 张勇 于海琴 闫良国 李贺 王志玲 吴丹 罗川南 马洪敏 李玉阳 朱宝存 孙蒙 曹伟		
发明人	魏琴 杜斌 于淑君 张勇 于海琴 闫良国 李贺 王志玲 吴丹 罗川南 马洪敏 李玉阳 朱宝存 孙蒙 曹伟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/327		
其他公开文献	CN102749442A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了银杂化介孔四氧化三铁抗生素免疫传感器制备方法及应用。电化学免疫传感器制备方法是在玻碳电极表面修饰硫堇-石墨烯混合溶液，通过戊二醛交联Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>介孔纳米粒子孵化的抗生素抗体，并以牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点，制备成一种抗生素电化学免疫传感器。抗生素的检测方法是将参比电极—饱和甘汞电极、对电极—铂丝电极及工作电极正确连接在电化学工作站上，通过方波伏安法进行免疫检测。本发明的抗生素电化学免疫传感器具有较高的灵敏度和专一性，检测方法简单，完成一

个检测过程需要2-3分钟，具有快速高效、特异性好、成本低、操作简便等特点。

