



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103472118 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 25

(21) 申请号 201310444291. 9

(22) 申请日 2013. 09. 26

(71) 申请人 南京师范大学

地址 210097 江苏省南京市鼓楼区宁海路
122 号

(72) 发明人 邵科峰 王传现 赵波 张芹
吴珺

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
代理人 韩朝晖

(51) Int. Cl.

G01N 27/416(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

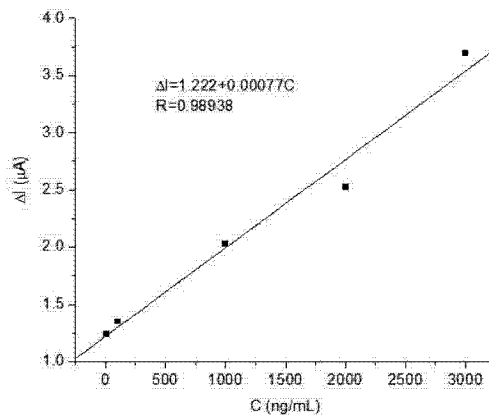
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测雌酚的电化学免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种能检测雌酚,包括三种人工合成的具有类似雌性激素作用的化合物,即己烯雌酚、己烷雌酚和双酚 A 的电化学免疫检测方法。所述的检测方法为:首先制备纳米金沉积并采用石墨烯/雌酚/壳聚糖复合物修饰的电化学传感器,然后以 $K_3[Fe(CN)_6]$ 为探针,基于己烯雌酚抗体对己烯雌酚、己烷雌酚和双酚 A 的交叉免疫反应,实现对这三种雌酚的检测。本发明提供的方法检测己烯雌酚的检测限为 0. 1ng/mL,线性范围为 1~2500ng/mL;检测己烷雌酚的检测限为 0. 3ng/mL,线性范围为 1~3000ng/mL;检测双酚 A 的检测限为 0. 2ng/mL,线性范围为 1~3000ng/mL。



1. 一种检测雌酚的电化学免疫检测方法,包括以下步骤:

1) 电化学免疫传感器的制备:首先在经过打磨、抛光和清洗的玻碳电极表面沉积金纳米粒子;然后将石墨烯/雌酚/壳聚糖混合液滴涂于纳米金沉积的玻碳电极表面,制得所述的电化学免疫传感器;

2) 标准溶液的配制:配制一组包括空白标样在内的含有不同已知浓度的待测雌酚、pH为7.4的磷酸缓冲溶液为标准溶液,且其中含有相同浓度的己烯雌酚抗体;

3) 工作曲线的建立:将所述免疫传感器分别浸入雌酚标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗免疫传感器,在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,记录响应电流;空白标样的响应电流为 I_0 ,含有待测雌酚的标样的响应电流为 I_x ,响应电流的增加值 ΔI 等于 I_x 与 I_0 的差值;将所述 ΔI 与标准溶液中雌酚的浓度 C 绘制成 $\Delta I-C$ 工作曲线,采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程;

4) 雌酚的测定:将待测样品配制为含有与步骤2)相同浓度的己烯雌酚抗体的磷酸缓冲溶液,按照与步骤3)相同的方法对所述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的增加值 ΔI 和 $\Delta I-C$ 线性回归方程,得到雌酚的含量。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述的雌酚为己烯雌酚、己烷雌酚和双酚A。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述的方法中,步骤4)采用标准加入法测定。

一种检测雌酚的电化学免疫检测方法

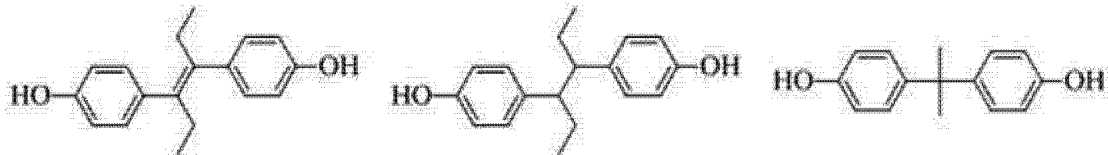
技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测和分析化学技术领域,涉及一种能检测三种人工合成的具有类似雌性激素作用的化合物,即己烯雌酚、己烷雌酚和双酚 A (以下简称雌酚)的检测方法,具体的说是一种基于抗体交叉反应的电化学免疫检测方法。

背景技术

[0002] 己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES) 和己烷雌酚 (hexestrol, HEX) (结构见式 1)属于 1, 2- 二苯乙烯类药物,它们是人工合成的雌激素类物质。二苯乙烯类激素具有促进动物生长、提高饲料转化率和减少脂肪合成等作用,20 世纪 60 年代曾为各国官方批准使用的促生长剂,用于畜牧业生产。但是滥用 1, 2- 二苯乙烯类药物会导致动物生理系统功能失调,甚至不可逆的病变,并通过食物链最终危害人类健康,长期摄入会干扰人体正常的激素平衡,导致机体代谢紊乱、发育异常肿瘤、女性乳腺癌和子宫内膜异位、胎儿畸形等严重的问题,在我国和欧美等国家都禁止在动物养殖过程中使用。

[0003] 双酚 A (bisphenol A, BPA) (结构见式 1) 在工业上被用来合成聚碳酸酯(PC) 和环氧树脂等材料。60 年代以来就被用于制造塑料(奶)瓶、幼儿用的吸口杯、食品和饮料(奶粉)罐内侧涂层。BPA 无处不在,从矿泉水瓶、医疗器械到食品包装的内里,都有它的身影。每年,全世界生产 2700 万吨含有 BPA 的塑料。BPA 能导致内分泌失调,威胁着胎儿和儿童的健康。癌症和新陈代谢紊乱导致的肥胖也被认为与此有关。欧盟认为含双酚 A 的奶瓶会诱发早熟,从 2011 年 3 月 2 日起,禁止生产含双酚 A 的婴儿奶瓶。



[0004] 式 1 三种雌酚的结构式,(a) 己烯雌酚(b) 己烷雌酚(c) 双酚 A。

[0005] 目前用于 DES、HEX 和 BPA 残留检测的方法主要有气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法、高效液相色谱法、毛细管电泳法等。但是这些分析方法需要大型分析仪器,过程操作繁琐,不能实现现场检测,有必要研究建立更加高效、快速、灵敏的分析测试方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种能检测三种人工合成、具有类似雌性激素作用的化合物,即己烯雌酚、己烷雌酚和双酚 A 的电化学免疫检测方法,所述的方法快速、高效、灵敏度高,具有较低的检出限,且可应用于现场检测食品中雌酚的残留量。

[0007] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案如下:

一种检测雌酚的电化学免疫检测方法,包括以下步骤:

1) 电化学免疫传感器的制备:首先在经过打磨、抛光和清洗的玻碳电极表面沉积金纳

米粒子；然后将石墨烯/雌酚/壳聚糖混合液滴涂于纳米金沉积的玻碳电极表面，制得所述的电化学免疫传感器；

2) 标准溶液的配制：配制一组包括空白标样在内的含有不同已知浓度的待测雌酚、pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液为标准溶液，且其中含有相同浓度的己烯雌酚抗体；

3) 工作曲线的建立：将所述免疫传感器分别浸入雌酚标准溶液中孵育，孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗免疫传感器，在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描，记录响应电流；空白标样的响应电流为 I_0 ，含有待测雌酚的标样的响应电流为 I_x ，响应电流的增加值 ΔI 等于 I_x 与 I_0 的差值；将所述 ΔI 与标准溶液中雌酚的浓度 C 绘制成 $\Delta I-C$ 工作曲线，采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程；

4) 雌酚的测定：将待测样品配制为含有与步骤 2) 相同浓度的己烯雌酚抗体的磷酸缓冲溶液，按照与步骤 3) 相同的方法对所述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描，记录响应电流；根据响应电流的增加值 ΔI 和 $\Delta I-C$ 线性回归方程，得到雌酚的含量。

[0008] 所述的雌酚为己烯雌酚、己烷雌酚和双酚 A。

[0009] 所述的方法中，步骤 4) 优选地采用标准加入法测定。

[0010] 本发明方法能够实现三种雌酚的共同检测。进行三种雌酚的检测时，所采用的电化学免疫传感修饰有相对应的石墨烯/雌酚/壳聚糖复合物，所采用的抗体均为己烯雌酚抗体。

[0011] 本发明的方法可用于各种动物源性食品包括猪、牛、羊等常用动物的肉制品、内脏以及乳制品等中含有的雌酚的检测。

[0012] 本发明所述的方法用于雌酚的检测，其最低检测限分别是己烯雌酚为 0.1 ng/mL，己烷雌酚为 0.3 ng/mL，双酚 A 为 0.2 ng/mL；线性范围为己烯雌酚为 1~2500 ng/mL，己烷雌酚和双酚 A 为 1~3000 ng/mL。

[0013] 本发明有如下的有益效果：由于采用了对三种具有类似雌性激素作用的化合物，即己烯雌酚、己烷雌酚和双酚 A 都具有较高交叉反应率的己烯雌酚抗体，因而能实现对上述三种雌酚的共同检测。并且所述的方法具有较低的检出限(0.1 ng/mL~0.3 ng/mL)和较宽的线性范围(1~2500 ng/mL 或 1~3000 ng/mL)。

[0014] 下面结合具体实施例对本发明进行详细描述。本发明的保护范围并不以具体实施方式为限，而是由权利要求加以限定。

附图说明

[0015] 图 1 为(a)纳米金/己烯雌酚/石墨烯/壳聚糖复合物修饰的电化学免疫传感器的 DPV 曲线；以及在含有效价浓度为 1:6400 的己烯雌酚抗体和不同浓度的己烯雌酚(b) 2500 ng/mL, (c) 1500 ng/mL, (d) 1000 ng/mL, (e) 500 ng/mL, (f) 100 ng/mL, (g) 1 ng/mL, (h) 0 ng/mL 的孵育液中孵育后，在 2 mmol/L 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的 PBS 溶液中的 DPV 曲线图。

[0016] 图 2 为响应电流的变化 ΔI 与己烯雌酚浓度的工作曲线图。

[0017] 图 3 为(a)纳米金/己烷雌酚/石墨烯/壳聚糖复合物修饰的电化学免疫传感器的 DPV 曲线；以及在含有效价浓度为 1:6400 的己烯雌酚抗体和不同浓度的己烷雌酚(b) 3000 ng/mL, (c) 2000 ng/mL, (d) 1000 ng/mL, (e) 100 ng/mL, (f) 10 ng/mL, (g) 1 ng/mL, (h)

0 的孵育液中孵育后,在 2 mmol/L 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的 PBS 溶液中的 DPV 曲线图。

[0018] 图 4 为响应电流的变化 ΔI 与己烷雌酚浓度的工作曲线图。

具体实施方式

[0019] 下面通过具体实施例对本发明所述的技术方案给予进一步详细的说明,但有必要指出以下实施例只用于对发明内容的描述,并不构成对本发明保护范围的限制。

[0020] 实施例 1 电化学免疫检测方法对己烯雌酚的检测

电化学免疫传感器的制备:

将直径为 3mm 的玻璃碳电极依次用直径为 0.3 μm 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉打磨,依次用无水乙醇-蒸馏水、蒸馏水超声清洗 5min,再用蒸馏水冲洗干净。先通过电化学沉积法在清洗干净的电极上沉积纳米金,再在电极上将滴涂 4 μL 石墨烯-壳聚糖分散液,然后将 2 μL 0.2mg/mL 的己烯雌酚溶液滴涂于电极表面,40 $^{\circ}C$ 下烘干。修饰过的电极浸泡在 5% 的 BSA 溶液中,在 37 $^{\circ}C$ 烘箱中孵育 30min,以封闭剩余的活性位点。

[0021] 将纳米金/己烯雌酚/石墨烯/壳聚糖复合物修饰的电化学免疫传感器浸入总体积为 50 μL 的含有效价浓度为 1:6400 的己二烯雌酚抗体和不同浓度的己烯雌酚的磷酸缓冲溶液中,在 37 $^{\circ}C$ 孵育 30 分钟,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2 mmol/L 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。

[0022] 将在己烯雌酚浓度为 0 的孵育液中孵育后的修饰电极的 DPV 峰电流定义为 I_0 ,在含有不同浓度己烯雌酚的孵育液孵育后的修饰电极的 DPV 峰电流定义为 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$,以 ΔI 对己烯雌酚浓度(C)作图可得 $\Delta I-C$ 工作曲线。采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程,己烯雌酚的浓度在 1~2500 ng/mL 范围内与 ΔI 成正比,线性相关系数为 0.99294。以大于噪音信号 3 倍的电流信号对应的浓度为最低检出限,重复 5 次以上实验得出,上述方法的最低检测限为 0.1 ng/mL。

[0023] 实施例 2 电化学免疫检测方法对己烷雌酚的检测

电化学免疫传感器的制备:

将直径为 3mm 的玻璃碳电极依次用直径为 0.3 μm 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉打磨,依次用无水乙醇-蒸馏水、蒸馏水超声清洗 5min,再用蒸馏水冲洗干净。先通过电化学沉积法在清洗干净的电极上沉积纳米金,再在电极上将滴涂 4 μL 石墨烯-壳聚糖分散液,然后将 2 μL 0.2mg/mL 的己烷雌酚溶液滴涂于电极表面,40 $^{\circ}C$ 下烘干。修饰过的电极浸泡在 5% 的 BSA 溶液中,在 37 $^{\circ}C$ 烘箱中孵育 30min,以封闭剩余的活性位点。

[0024] 将纳米金/己烷雌酚/石墨烯/壳聚糖复合物修饰的电化学免疫传感器浸入总体积为 50 μL 的含有效价浓度为 1:6400 的己二烯雌酚抗体和不同浓度的己烷雌酚的磷酸缓冲溶液中,在 37 $^{\circ}C$ 孵育 30 分钟,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2 mmol/L 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。

[0025] 将在己烷雌酚浓度为 0 的孵育液中孵育后的修饰电极的 DPV 峰电流定义为 I_0 ,在含有不同浓度己烷雌酚的孵育液孵育后的修饰电极的 DPV 峰电流定义为 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$,以 ΔI 对己烷雌酚浓度(C)作图可得 $\Delta I-C$ 工作曲线。采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程,己烷雌酚的浓度在 1~3000 ng/mL 范围内与 ΔI 成正比,线性相关系数为 0.98938。以大于噪音信号 3 倍的电流信号对应的浓度为最低检出限,重复 5 次以上实验得

出,上述方法的最低检测限为 0.3 ng/mL。

[0026] 实施例 3 电化学免疫检测方法对双酚 A 的检测

电化学免疫传感器的制备:

将直径为 3mm 的玻璃碳电极依次用直径为 0.3 μm 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉打磨,依次用无水乙醇-蒸馏水、蒸馏水超声清洗 5min,再用蒸馏水冲洗干净。先通过电化学沉积法在清洗干净的电极上沉积纳米金,再在电极上将滴涂 4 μL 石墨烯-壳聚糖分散液,然后将 2 μL 0.2mg/mL 的双酚 A 溶液滴涂于电极表面,40 $^\circ\text{C}$ 下烘干。修饰过的电极浸泡在 5% 的 BSA 溶液中,在 37 $^\circ\text{C}$ 烘箱中孵育 30min,以封闭剩余的活性位点。

[0027] 将纳米金/双酚 A/石墨烯/壳聚糖复合物修饰的电化学免疫传感器浸入总体积为 50 μL 的含有效价浓度为 1:6400 的己烯雌酚抗体和不同浓度的双酚 A 的磷酸缓冲溶液中,在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 分钟,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2 mmol/L 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。

[0028] 将在双酚 A 浓度为 0 的孵育液中孵育后的修饰电极的 DPV 峰电流定义为 I_0 ,在含有不同浓度双酚 A 的孵育液孵育后的修饰电极的 DPV 峰电流定义为 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$,以 ΔI 对双酚 A 浓度(C)作图可得 ΔI -C 工作曲线。采用线性回归法得到 ΔI -C 线性回归方程,双酚 A 的浓度在 1~3000 ng/mL 范围内与 ΔI 成正比,线性相关系数为 0.98272。以大于噪音信号 3 倍的电流信号对应的浓度为最低检出限,重复 5 次以上实验得出,上述方法的最低检测限为 0.2 ng/mL。

[0029] 实施例 4 猪肉样品中加标双酚 A 的测定

1) 猪肉样品的处理:称取 1 ± 0.0050 g 猪肉于到 10 mL 的样品管中,加入双酚 A 标准液,和 3 mL 乙腈-丙酮提取液(V:V=4:1),混合物超声振荡 30 分钟,于 2000 r/m 下离心 10 分钟,将上清液转移至氮吹管中,残渣用 3 mL 的相同提取液重复提取 1 次,上清液合并并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于 50 $^\circ\text{C}$ 温度下浓缩蒸发,浓缩物加入 1 mL 的 pH 为 7.4 磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0030] 2) 猪肉样品中加标双酚 A 的测定:分别取等量的不同猪肉提取液样品,和己烯雌酚抗体溶液及磷酸缓冲溶液混合配成孵育液,使得总体积为 50 μL ,且己烯雌酚抗体浓度均相等。将纳米金/双酚 A/石墨烯/壳聚糖复合物修饰的电化学免疫传感器浸入孵育液中,在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 25 分钟,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2 mmol/L 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。定义空白样品的峰电流为 I_0 ,其他样品的峰电流 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$ 。通过采用与实施例 1 中相同的方法得到的 DPV 峰电流差值 ΔI 与双酚 A 的浓度 C 的 ΔI -C 工作曲线,得到双酚 A 的浓度,检测回收率结果如表 1。

[0031] 表 1 为免疫传感器检测加标猪肉中的双酚 A 浓度的回收率

| 双酚 A 添加量 (ng/mL) | 双酚 A 测定量 (ng/mL) | 回收率 (%) |
|------------------|------------------------|---------|
| 400.0 | 363.0, 314.8, 354.8 | 86.1 |
| 1000.0 | 1158.5, 1148.9, 853.4 | 105.4 |
| 2000.0 | 2382.4, 2001.8, 1808.2 | 103.2 |

按照与实施例 4 基本相同的方法,可应用于各种动物源性食品,包括猪、牛、羊等常用动物的肉制品、内脏以及乳制品等中含有的己烯雌酚、己烷雌酚的检测。

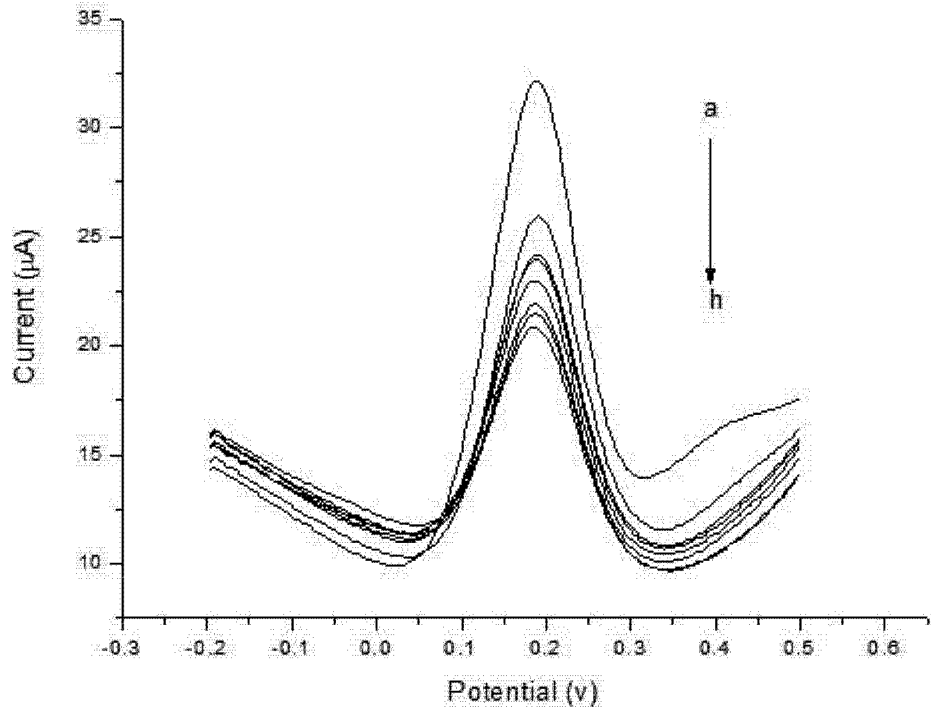


图 1

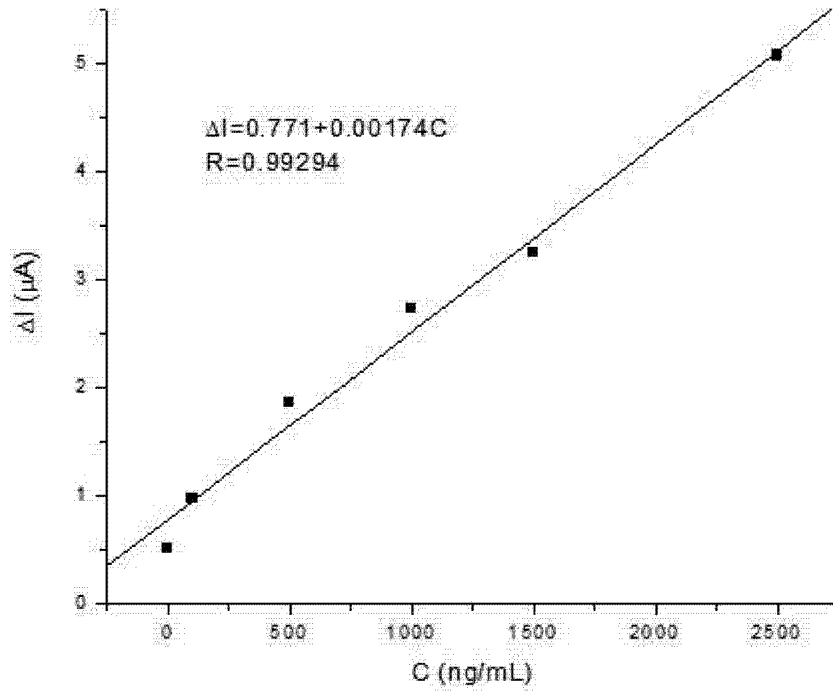


图 2

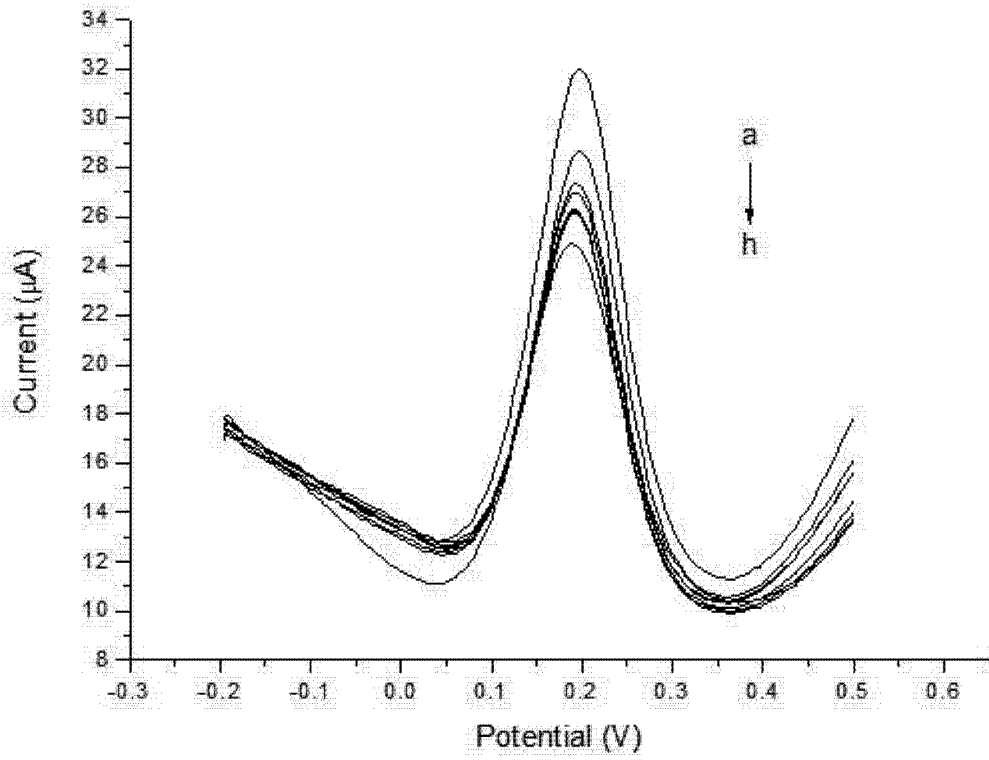


图 3

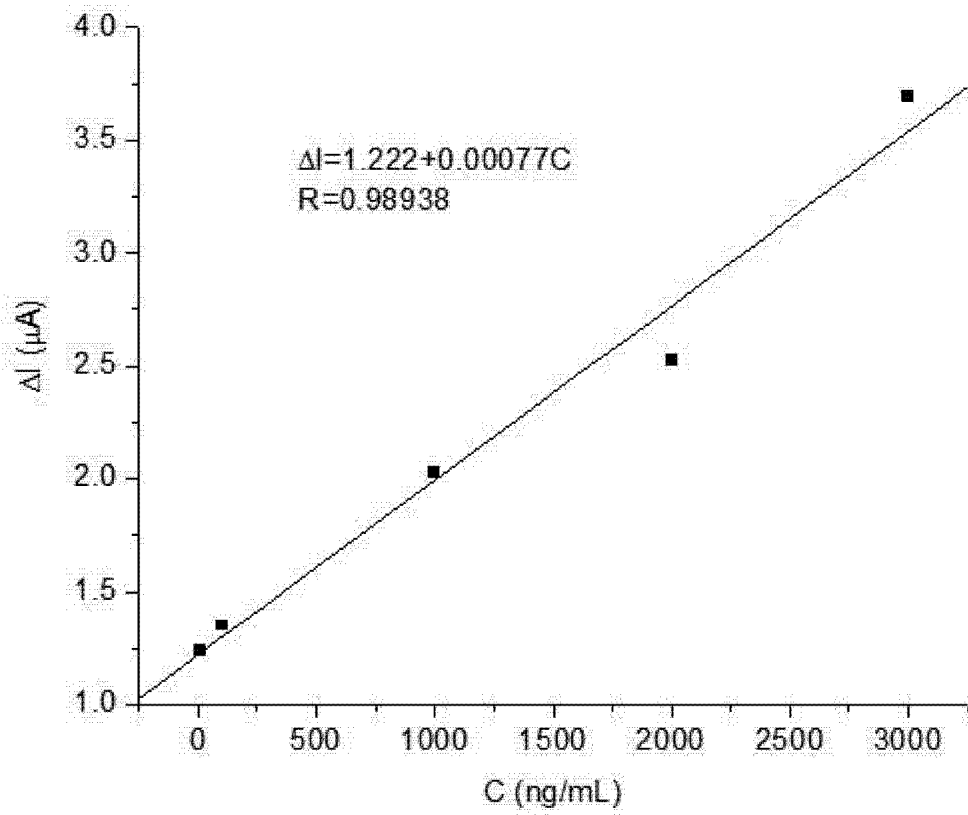


图 4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测雌酚的电化学免疫检测方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103472118A | 公开(公告)日 | 2013-12-25 |
| 申请号 | CN201310444291.9 | 申请日 | 2013-09-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 南京师范大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 南京师范大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 南京师范大学 | | |
| [标]发明人 | 邵科峰 王传现 赵波 张芹 吴璐 | | |
| 发明人 | 邵科峰 王传现 赵波 张芹 吴璐 | | |
| IPC分类号 | G01N27/416 G01N33/53 | | |
| 代理人(译) | 韩朝晖 | | |
| 其他公开文献 | CN103472118B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种能检测雌酚，包括三种人工合成的具有类似雌性激素作用的化合物，即己烯雌酚、己烷雌酚和双酚A的电化学免疫检测方法。所述的检测方法为：首先制备纳米金沉积并采用石墨烯/雌酚/壳聚糖复合物修饰的电化学传感器，然后以K₃[Fe(CN)₆]为探针，基于己烯雌酚抗体对己烯雌酚、己烷雌酚和双酚A的交叉免疫反应，实现对这三种雌酚的检测。本发明提供的方法检测己烯雌酚的检测限为0.1ng/mL，线性范围为1~2500ng/mL；检测己烷雌酚的检测限为0.3ng/mL，线性范围为1~3000ng/mL；检测双酚A的检测限为0.2ng/mL，线性范围为1~3000ng/mL。

