



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104502429 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510034905. 5

审查员 郑瑜

(22) 申请日 2015. 01. 25

(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 张勇 马洪敏 魏琴 李燕 吴丹
庞雪辉

(51) Int. Cl.

G01N 27/26(2006. 01)

G01N 27/48(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101532978 A, 2009. 09. 16, 全文.

CN 102590191 A, 2012. 07. 18, 全文.

CN 102614872 A, 2012. 08. 01, 全文.

CN 102707049 A, 2012. 10. 03, 全文.

CN 103063833 A, 2013. 04. 24, 全文.

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法,属于新型纳米功能材料和生物传感器领域。本发明首先在二氧化钛纳米颗粒基底上,利用光电化学合成方法,制备核壳结构的枝晶纳米棒状的贵金属合金纳米材料,进而制得了成本低、灵敏度高、特异性好、检测快速、制备简单的检测瘦肉精的无标记电致化学发光免疫传感器。

1. 无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法,其特征在于,制备步骤为:

(1) 以直径 4 mm 的玻璃碳电极为工作电极,在电极表面滴涂 5~10 μL 二氧化钛纳米粒子溶胶 TiO_2 NPs,室温下晾干后,滴涂 5~10 μL 的金银纳米棒-壳聚糖复合材料 Au@Ag NRs-CHS 溶液,并在室温下晾干;

(2) 将步骤(1)中得到的电极用超纯水清洗,室温下晾干成膜,表面滴涂 5~10 μL 0.01 mol/L 的氯钯酸溶液 H_2PdCl_4 ,立刻使用高压汞灯照射 30~90 秒,制得 TiO_2 NPs 负载的金银钯合金纳米棒-壳聚糖复合材料 $\text{TiO}_2\text{-Au@Ag-Pd NRs-CHS}$ 修饰的工作电极,室温下晾干;

(3) 将步骤(2)中得到的电极用超纯水清洗,室温下晾干后,将电极浸入到 EDC/NHS 溶液中,1 小时后取出;

(4) 将步骤(3)中得到的电极用超纯水清洗,在电极表面滴涂 5~10 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的瘦肉精抗体溶液,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干;

(5) 将步骤(4)中得到的电极用超纯水清洗,继续在电极表面滴涂 5~10 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 的牛血清白蛋白 BSA 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干,超纯水清洗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干成膜,制得无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器;

所述的 TiO_2 NPs 为 1 mg/mL 的二氧化钛纳米粒子水溶液;

所述的 Au@Ag NRs-CHS 为金@银核壳纳米棒与壳聚糖复合材料的水溶液,所述金@银核壳纳米棒是以棒状金纳米粒子为核、以银纳米粒子为壳层的核壳结构的棒状纳米粒子,所述棒状纳米粒子的长度为 20~50 nm,所述壳聚糖为将壳聚糖纯品加入到体积分数为 1% 的醋酸中制备而成的壳聚糖水溶液;

所述的 H_2PdCl_4 为 pH 值为 1~2 的氯钯酸水溶液;

所述的 Au@Ag-Pd NRs 为金银钯合金纳米棒,所述的金银钯合金纳米棒为金@银钯核壳枝晶状的纳米棒,所述金@银钯核壳枝晶状的纳米棒是以棒状金纳米粒子为核、以枝晶状银钯合金纳米粒子为壳层的核壳结构的纳米粒子,所述纳米棒的长度为 20~50 nm;

所述的 EDC/NHS 为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 EDC 和 N-羟基丁二酰亚胺 NHS 的混合溶液,所述混合溶液中 EDC 的浓度为 0.01 mol/L, NHS 的浓度为 0.002 mol/L。

2. 如权利要求 1 所述的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法,其特征在于所述瘦肉精选自下列之一:莱克多巴胺、克伦特罗、沙丁胺醇、硫酸沙丁胺醇、盐酸多巴胺、西马特罗、硫酸特布他林、苯乙醇胺 A、班布特罗、盐酸齐帕特罗、盐酸氯丙那林、马布特罗、西布特罗、溴布特罗、酒石酸阿福特罗、富马酸福莫特罗。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法所制备的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的应用,其特征在于,包括如下应用步骤:

(1) 标准溶液配制:配制一组包括空白标样在内的不同浓度的瘦肉精标准溶液,底液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液;

(2) 工作电极修饰:将如权利要求 1 所述的制备方法所制备的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器为工作电极,将步骤(1)中配制的不同浓度的瘦肉精标准溶液分别滴涂到工作电极表面,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存;

(3) 工作曲线绘制:将饱和甘汞电极作为参比电极,铂丝电极作为辅助电极,与步骤(2)所修饰好的工作电极组成三电极系统,连接到电致化学发光设备上;在电解槽中先后加

入 15 mL pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液和 1 mL 5 mmol/L 的鲁米诺溶液 luminol ;用循环伏安法对组装的工作电极施加循环电压 ;根据所得的电致化学发光的光信号强度与瘦肉精抗原标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线 ;空白标样的光信号强度记为 D_0 , 含有不同浓度的瘦肉精标准溶液的光信号强度记为 D_1 , 响应光信号强度降低的差值为 $\Delta D = D_0 - D_1$, ΔD 与瘦肉精标准溶液的质量浓度 C 之间成线性关系, 绘制 $\Delta D - C$ 工作曲线 ;

(4) 瘦肉精的检测 :用待测样品代替步骤(1)中的瘦肉精标准溶液, 按照步骤(2)和(3)中的方法进行检测, 根据响应光信号强度降低的差值 ΔD 和工作曲线, 得到待测样品中瘦肉精的含量。

无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及采用一种快速、灵敏检测瘦肉精的无标记电致化学发光免疫传感器的制备方法和应用,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] 瘦肉精是一类叫做 β -兴奋剂的药物,而不是某一种特定的药物。这类药物具有实现促进瘦肉生长、抑制肥肉生长的功能,所以统称为“瘦肉精”。根据国务院食品安全委员会办公室《“瘦肉精”专项整治方案》(食安办〔2011〕14号)规定的“瘦肉精”品种目录为16种,包括:莱克多巴胺 Ractopamine;克伦特罗 Clenbuterol;沙丁胺醇 Salbutamol;硫酸沙丁胺醇 Salbutamol Sulfate;盐酸多巴胺 Dopamine Hydrochloride;西马特罗 Cimiterol;硫酸特布他林 Terbutaline Sulfate;苯乙醇胺 APhenylethanolamine A;班布特罗 Bambuterol;盐酸齐帕特罗 Zilpaterol Hydrochloride;盐酸氯丙那林 Clorprenaline Hydrochloride;马布特罗 Mabuterol;西布特罗 Cimbuterol;溴布特罗 Brombuterol;酒石酸阿福特罗 Arformoterol Tartrate;富马酸福莫特罗 Formoterol Fumatrate。

[0003] 瘦肉精可以提高猪的瘦肉率,但如果人们食用含有大量瘦肉精的猪肉后,会造成心血管系统的损坏,并可能出现严重的神经症状。针对瘦肉精中毒事件频发这一严重现象,2001年12月27日、2002年2月9日、4月9日,农业部分别下发文件禁止食品动物禁止使用 β -兴奋剂类药物作为饲料添加剂(农业部176号、193号公告、1519号条例)。

[0004] 目前,检测瘦肉精的方法有高效液相色谱法 HPLC、气相色谱-质谱法 GC-MS 和酶联免疫法 ELISA。这些方法,虽具有一定的灵敏度,但存在样品处理时间长,检测过程烦琐、难于操作,或者重现性差等缺点,在实际应用中受到一定的限制。

[0005] 电化学发光免疫传感器由于其灵敏度高、特异性好、操作简便等优点被广泛应用于临床诊断、药物分析、环境监测等领域。制备性能优越的电化学发光免疫传感器,其最关键技术就是发光强度及稳定性和免疫分子的有效固定及重现性等性能的提高。

[0006] 鲁米诺-过氧化氢 Luminol- H_2O_2 发光体系由于成本低廉、发光强度高,已被广泛应用到电致化学发光的分析方法中,但由于 Luminol- H_2O_2 发光体系的发光需要借助一定的催化剂,才能有快速、灵敏、高强度的光信号响应,因此一般常加入辣根过氧化物酶 HRP 来进行催化反应。而 HRP 的使用对反应条件要求苛刻,不利于 Luminol- H_2O_2 发光体系的普及使用。因此开发新型纳米材料模拟酶来代替 HRP,会相比于 HRP 具有较宽泛的使用条件。另外,贵金属纳米材料具有比表面积大、易于与多种生物分子(核酸、蛋白质和生物分子等)结合、对人体无害等特点,可被应用于电致化学发光免疫传感器的制备中。

[0007] 为了解决上述问题,本发明采用以光化学合成方法,直接在电极上实现了 TiO_2 NPs 负载的核壳结构的金银钯合金纳米棒-壳聚糖复合材料 TiO_2 -Au@Ag-Pd NDRs-CHS,使之与 TiO_2 NPs 的复合材料共同修饰的电极,一方面增加了电极比表面积,增强电极导电能力和抗体的负载量,提高传感器的检测限,另一方面二者可以产生协同催化作用,可以无需使用 H_2O_2 ,仅利用水溶液中的溶解氧即可使鲁米诺产生电致化学发光,并且该体系具有更好

的催化响应速度和电致化学发光强度。由此,成功的发明了无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于避免现有检测方法中存在的仪器设备复杂、操作过程繁琐及对检验人员的技能要求高等缺点,提供了一种快速、灵敏检测瘦肉精的无标记电致化学发光免疫传感器的制备方法,所制备的传感器具有灵敏度高、特异性强的特点,且制备简单、操作方便,可应用于瘦肉精的快速、灵敏检测。

[0009] 本发明采用的技术方案如下:

[0010] 1. 无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法,其特征在于,制备步骤为:

[0011] (1) 以直径 4 mm 的玻碳电极为工作电极,在电极表面滴涂 5~10 μL 二氧化钛纳米粒子溶胶 TiO_2 NPs,室温下晾干后,滴涂 5~10 μL 的金银纳米棒-壳聚糖复合材料 Au@Ag NRs-CHS 溶液,并在室温下晾干;

[0012] (2) 将步骤(1)中得到的电极超纯水清洗,室温下晾干成膜,表面滴涂 5~10 μL 0.01 mol/L 的氯钯酸溶液 H_2PdCl_4 ,立刻使用高压汞灯照射 30~90 秒,制得 TiO_2 NPs 负载的金银钯合金纳米棒-壳聚糖复合材料 $\text{TiO}_2\text{-Au@Ag-Pd NRs-CHS}$ 修饰的工作电极,室温下晾干;

[0013] (3) 将步骤(2)中得到的电极用超纯水清洗,室温下晾干后,将电极浸入到 EDC/NHS 溶液中,1 小时后取出;

[0014] (4) 将步骤(3)中得到的电极用超纯水清洗,在电极表面滴涂 5~10 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的瘦肉精抗体溶液,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干;

[0015] (5) 将步骤(4)中得到的电极用超纯水清洗,继续在电极表面滴涂 5~10 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 的牛血清白蛋白 BSA 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干,超纯水清洗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干成膜,制得无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器;

[0016] 所述的 TiO_2 NPs 为 1mg/mL 的二氧化钛纳米粒子水溶液;

[0017] 所述的 Au@Ag NRs-CHS 为金@银核壳纳米棒与壳聚糖复合材料的水溶液,所述金@银核壳纳米棒是以棒状金纳米粒子为核、以银纳米粒子为壳层的核壳结构的棒状纳米粒子,所述棒状纳米粒子的长度为 20~50nm,所述壳聚糖为将壳聚糖纯品加入到体积分数为 1% 的醋酸中制备而成的壳聚糖水溶液;

[0018] 所述的 H_2PdCl_4 为 pH 值为 1~2 的氯钯酸水溶液;

[0019] 所述的 Au@Ag-Pd NRs 为金银钯合金纳米棒,所述的金银钯合金纳米棒为金@银钯核壳枝晶状的纳米棒,所述金@银钯核壳枝晶状的纳米棒是以棒状金纳米粒子为核、以枝晶状银钯合金纳米粒子为壳层的核壳结构的纳米粒子,所述纳米棒的长度为 20~50nm;

[0020] 所述的 EDC/NHS 为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 EDC 和 N-羧基丁二酰亚胺 NHS 的混合溶液,所述混合溶液中 EDC 的浓度为 0.01mol/L, NHS 的浓度为 0.002mol/L。

[0021] 2. 一种如本发明所述的制备方法所制备的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器,所述的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器应用于瘦肉精的检测,其特征在于,检测步骤为:

[0022] (1) 标准溶液配制：配制一组包括空白标样在内的不同浓度的瘦肉精标准溶液，底液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液；

[0023] (2) 工作电极修饰：将本发明所述的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器为工作电极，将步骤(1)中配制的不同浓度的瘦肉精标准溶液分别滴涂到工作电极表面，4℃冰箱中保存；

[0024] (3) 工作曲线绘制：将饱和甘汞电极作为参比电极，铂丝电极作为辅助电极，与步骤(2)所修饰好的工作电极组成三电极系统，连接到电致化学发光设备上；在电解槽中先后加入 15mL pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液和 1mL 5 mmol/L 的鲁米诺溶液 luminol；用循环伏安法对组装的工作电极施加循环电压；根据所得的电致化学发光的光信号强度与瘦肉精抗原标准溶液浓度之间的关系，绘制工作曲线；空白标样的光信号强度记为 D_0 ，含有不同浓度的瘦肉精标准溶液的光信号强度记为 D_1 ，响应光信号强度降低的差值为 $\Delta D = D_0 - D_1$ ， ΔD 与瘦肉精标准溶液的质量浓度 C 之间成线性关系，绘制 $\Delta D - C$ 工作曲线；

[0025] (4) 瘦肉精的检测：用待测样品代替步骤(1)中的瘦肉精标准溶液，按照步骤(2)和(3)中的方法进行检测，根据响应光信号强度降低的差值 ΔD 和工作曲线，得到待测样品中瘦肉精的含量。

[0026] 3. 本发明所述的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法和应用，其特征在于所述瘦肉精选自下列之一：莱克多巴胺、克伦特罗、沙丁胺醇、硫酸沙丁胺醇、盐酸多巴胺、西马特罗、硫酸特布他林、苯乙醇胺 A、班布特罗、盐酸齐帕特罗、盐酸氯丙那林、马布特罗、西布特罗、溴布特罗、酒石酸阿福特罗、富马酸福莫特罗。

[0027] 本发明的有益成果

[0028] (1) 本发明所述的无标记电致化学发光免疫传感器制备简单，操作方便，并通过纳米材料的增效和增敏作用，可实现对实际样品的快速、灵敏、高选择性检测，具有市场发展前景；

[0029] (2) 本发明首次将光化学合成方法制备 $\text{TiO}_2\text{-Au@Ag-Pd NDRs-CHS}$ 复合材料，并应用于电致化学发光免疫传感器的制备，所制备的传感器无需使用 H_2O_2 便可实现对 luminol 电致化学发光的增敏、增效，极大地提高了检测灵敏度和重现性，获得了较低的检出限，具有重要的科学意义。

具体实施方式

[0030] 实施例 1 无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备

[0031] (1) 以直径 4 mm 的玻璃碳电极为工作电极，在电极表面滴涂 5 μL TiO_2 NPs，室温下晾干后，滴涂 5 μL 的 Au@Ag NRs-CHS 溶液，并在室温下晾干；

[0032] (2) 将步骤(1)中得到的电极超纯水清洗，室温下晾干成膜，表面滴涂 5 μL 0.01 mol/L 的 H_2PdCl_4 ，立刻使用高压汞灯照射 30 秒，制得 $\text{TiO}_2\text{-Au@Ag-Pd NDRs-CHS}$ 修饰的工作电极，室温下晾干；

[0033] (3) 将步骤(2)中得到的电极用超纯水清洗，室温下晾干后，将电极浸入到 EDC/NHS 溶液中，1 小时后取出；

[0034] (4) 将步骤(3)中得到的电极用超纯水清洗，在电极表面滴涂 5 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的瘦肉精抗体溶液，4℃冰箱中保存晾干；

[0035] (5) 将步骤(4)中得到的电极用超纯水清洗,继续在电极表面滴涂 5 μ L 100 μ g/mL 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存晾干,超纯水清洗,4 $^{\circ}$ C 冰箱中晾干成膜,制得无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器;

[0036] 所述的 TiO₂ NPs 为 1mg/mL 的二氧化钛纳米粒子水溶液;

[0037] 所述的 Au@Ag NRs-CHS 为金@银核壳纳米棒与壳聚糖复合材料的水溶液,所述金@银核壳纳米棒是以棒状金纳米粒子为核、以银纳米粒子为壳层的核壳结构的棒状纳米粒子,所述棒状纳米粒子的长度为 20nm,所述壳聚糖为将壳聚糖纯品加入到体积分数为 1% 的醋酸中制备而成的壳聚糖水溶液;

[0038] 所述的 H₂PdCl₄ 为 pH 值为 1 的氯钯酸水溶液;

[0039] 所述的 Au@Ag-Pd NDRs 为金银钯合金纳米棒,所述的金银钯合金纳米棒为金@银钯核壳枝晶状的纳米棒,所述金@银钯核壳枝晶状的纳米棒是以棒状金纳米粒子为核、以枝晶状银钯合金纳米粒子为壳层的核壳结构的纳米粒子,所述纳米棒的长度为 20nm;

[0040] 所述的 EDC/NHS 为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 EDC 和 N-羟基丁二酰亚胺 NHS 的混合溶液,所述混合溶液中 EDC 的浓度为 0.01mol/L, NHS 的浓度为 0.002mol/L。

[0041] 实施例 2 无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备

[0042] (1) 以直径 4 mm 的玻碳电极为工作电极,在电极表面滴涂 8 μ L TiO₂ NPs,室温下晾干后,滴涂 8 μ L 的 Au@Ag NRs-CHS 溶液,并在室温下晾干;

[0043] (2) 将步骤(1)中得到的电极超纯水清洗,室温下晾干成膜,表面滴涂 8 μ L 0.01 mol/L 的 H₂PdCl₄,立刻使用高压汞灯照射 60 秒,制得 TiO₂-Au@Ag-Pd NDRs-CHS 修饰的工作电极,室温下晾干;

[0044] (3) 同实施例 1;

[0045] (4) 将步骤(3)中得到的电极用超纯水清洗,在电极表面滴涂 8 μ L 10 μ g/mL 的瘦肉精抗体溶液,4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存晾干;

[0046] (5) 将步骤(4)中得到的电极用超纯水清洗,继续在电极表面滴涂 8 μ L 100 μ g/mL 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存晾干,超纯水清洗,4 $^{\circ}$ C 冰箱中晾干成膜,制得无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器;

[0047] 所述的 Au@Ag NRs-CHS 中金纳米棒的长度为 40nm;

[0048] 所述的 H₂PdCl₄ 的 pH 值为 1.5;

[0049] 所述的 Au@Ag-Pd NDRs 的长度为 40nm;

[0050] 其余同实施例 1。

[0051] 实施例 3 无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备

[0052] (1) 以直径 4 mm 的玻碳电极为工作电极,在电极表面滴涂 10 μ L TiO₂ NPs,室温下晾干后,滴涂 10 μ L 的 Au@Ag NRs-CHS 溶液,并在室温下晾干;

[0053] (2) 将步骤(1)中得到的电极超纯水清洗,室温下晾干成膜,表面滴涂 10 μ L 0.01 mol/L 的 H₂PdCl₄,立刻使用高压汞灯照射 90 秒,制得 TiO₂-Au@Ag-Pd NDRs-CHS 修饰的工作电极,室温下晾干;

[0054] (3) 同实施例 1;

[0055] (4) 将步骤(3)中得到的电极用超纯水清洗,在电极表面滴涂 10 μ L 10 μ g/mL 的

瘦肉精抗体溶液,4 °C 冰箱中保存晾干;

[0056] (5) 将步骤(4)中得到的电极用超纯水清洗,继续在电极表面滴涂 10 μ L 100 μ g/mL 的 BSA 溶液,4 °C 冰箱中保存晾干,超纯水清洗,4 °C 冰箱中晾干成膜,制得无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器;

[0057] 所述的 Au@Ag NRs-CHS 中金纳米棒的长度为 50nm;

[0058] 所述的 H₂PdCl₄ 的 pH 值为 2;

[0059] 所述的 Au@Ag-Pd NDRs 的长度为 50nm;

[0060] 其余同实施例 1。

[0061] 实施例 4 上述实施例 1—3 所制备的无标记电致化学发光免疫传感器,应用于瘦肉精的检测,步骤如下:

[0062] (1) 标准溶液配制:配制一组包括空白标样在内的不同浓度的瘦肉精标准溶液,底液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液;

[0063] (2) 工作电极修饰:将本发明所述的无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器为工作电极,将步骤(1)中配制的不同浓度的瘦肉精标准溶液分别滴涂到工作电极表面,4 °C 冰箱中保存;

[0064] (3) 工作曲线绘制:将饱和甘汞电极作为参比电极,铂丝电极作为辅助电极,与步骤(2)所修饰好的工作电极组成三电极系统,连接到电致化学发光设备上;在电解槽中先后加入 15mL pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液和 1mL 5 mmol/L 的鲁米诺溶液 luminol;用循环伏安法对组装的工作电极施加循环电压;根据所得的电致化学发光的光信号强度与瘦肉精抗原标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;空白标样的光信号强度记为 D_0 ,含有不同浓度的瘦肉精标准溶液的光信号强度记为 D_1 ,响应光信号强度降低的差值为 $\Delta D = D_0 - D_1$, ΔD 与瘦肉精标准溶液的质量浓度 C 之间成线性关系,绘制 $\Delta D - C$ 工作曲线;

[0065] (4) 瘦肉精的检测:用待测样品代替步骤(1)中的瘦肉精标准溶液,按照步骤(2)和(3)中的方法进行检测,根据响应光信号强度降低的差值 ΔD 和工作曲线,得到待测样品中瘦肉精的含量;

[0066] 所述瘦肉精选自下列之一:莱克多巴胺、克伦特罗、沙丁胺醇、硫酸沙丁胺醇、盐酸多巴胺、西马特罗、硫酸特布他林、苯乙醇胺 A、班布特罗、盐酸齐帕特罗、盐酸氯丙那林、马布特罗、西布特罗、溴布特罗、酒石酸阿福特罗、富马酸福莫特罗。

[0067] 本发明所制备的免疫传感器检测 16 种瘦肉精的技术指标见表 1。

[0068] 表 1 本发明所制备的免疫传感器检测 16 种瘦肉精的技术指标

[0069]

| 瘦肉精 | 线性范围 ng·mL ⁻¹ | 检出限 ng·mL ⁻¹ |
|---------|-----------------------------|----------------------------|
| 莱克多巴胺 | 0.02-80 | 8×10 ⁻³ |
| 克伦特罗 | 0.04-80 | 11×10 ⁻³ |
| 沙丁胺醇 | 0.02-85 | 8×10 ⁻³ |
| 硫酸沙丁胺醇 | 0.04-80 | 12×10 ⁻³ |
| 盐酸多巴胺 | 0.03-85 | 10×10 ⁻³ |
| 西马特罗 | 0.03-85 | 10×10 ⁻³ |
| 硫酸特布他林 | 0.02-85 | 8×10 ⁻³ |
| 苯乙醇胺 A | 0.045-80 | 14×10 ⁻³ |
| 班布特罗 | 0.04-80 | 11×10 ⁻³ |
| 盐酸齐帕特罗 | 0.04-85 | 11×10 ⁻³ |
| 盐酸氯丙那林 | 0.03-80 | 10×10 ⁻³ |
| 马布特罗 | 0.02-80 | 8×10 ⁻³ |
| 西布特罗 | 0.04-80 | 12×10 ⁻³ |
| 溴布特罗 | 0.02-80 | 9×10 ⁻³ |
| 酒石酸阿福特罗 | 0.03-80 | 10×10 ⁻³ |
| 富马酸福莫特罗 | 0.03-80 | 10×10 ⁻³ |

[0070] 实施例 5 猪尿样品中瘦肉精的检测

[0071] 准确称取猪尿样品,采用常规方法进行样品处理,加入一定质量浓度的瘦肉精标准溶液,以未加入瘦肉精的样品为空白,进行加标回收实验,按照实施例 4 所述的步骤检测,检测结果见表 2。

[0072] 表 2 猪尿样品中瘦肉精的检测结果

[0073]

| 瘦肉精 | 加入量 ng·g ⁻¹ | 猪尿 | | |
|--------|---------------------------|---------------------------|--------------|----------|
| | | 回收值 ng·g ⁻¹ | RSD % n=5 | 回收率 % |
| 莱克多巴胺 | 20.0 | 19.7 | 2.9 | 98.5 |
| 克伦特罗 | 20.0 | 19.5 | 2.8 | 97.5 |
| 沙丁胺醇 | 20.0 | 20.2 | 1.9 | 101 |
| 硫酸沙丁胺醇 | 20.0 | 20.8 | 3.1 | 104 |
| 盐酸多巴胺 | 20.0 | 19.7 | 2.9 | 98.5 |
| 西马特罗 | 20.0 | 19.3 | 3.3 | 96.5 |
| 硫酸特布他林 | 20.0 | 20.5 | 2.7 | 102.5 |
| 苯乙醇胺 A | 20.0 | 19.8 | 2.8 | 99 |

[0074] 表 2 检测结果可知,结果的相对标准偏差(RSD)小于 3.3%,平均回收率为 96.5 ~ 104%,表明本发明可用于猪尿样品中瘦肉精的检测,方法的灵敏度高、特异性强,结果准确可靠。

[0075] 实施例 6 牛尿样品中瘦肉精的检测

[0076] 准确称取牛尿样品,采用常规方法进行样品处理,加入一定质量浓度的瘦肉精标准溶液,以未加入瘦肉精的样品为空白,进行加标回收实验,按照实施例 4 所述的步骤检测,检测结果见表 3。

[0077] 表 3 牛尿样品中瘦肉精的检测结果

[0078]

| 瘦肉精 | 加入量 ng·g ⁻¹ | 牛尿 | | |
|--------|---------------------------|---------------------------|--------------|----------|
| | | 回收值 ng·g ⁻¹ | RSD % n=5 | 回收率 % |
| 莱克多巴胺 | 20.0 | 19.8 | 2.9 | 99 |
| 克伦特罗 | 20.0 | 20.5 | 3.4 | 102.5 |
| 沙丁胺醇 | 20.0 | 19.7 | 2.8 | 98.5 |
| 班布特罗 | 20.0 | 19.4 | 3.2 | 97 |
| 盐酸齐帕特罗 | 20.0 | 20.8 | 1.9 | 104 |
| 盐酸氟丙那林 | 20.0 | 20.3 | 2.5 | 101.5 |
| 马布特罗 | 20.0 | 20.1 | 2.1 | 100.5 |

[0079] 表 3 检测结果可知,结果的相对标准偏差(RSD)小于 3.4 %,平均回收率为 98.5 ~ 102.5%,表明本发明可用于牛尿样品中瘦肉精的检测,方法的灵敏度高、特异性强,结果准确可靠。

[0080] 实施例 7 羊尿样品中瘦肉精的检测

[0081] 准确称取羊尿样品,采用常规方法进行样品处理,加入一定质量浓度的瘦肉精标准溶液,以未加入瘦肉精的样品为空白,进行加标回收实验,按照实施例 4 所述的步骤检测,检测结果见表 4。

[0082] 表 4 羊尿样品中瘦肉精的检测结果

[0083]

| 瘦肉精 | 加入量 ng·g ⁻¹ | 羊尿 | | |
|---------|---------------------------|---------------------------|--------------|----------|
| | | 回收值 ng·g ⁻¹ | RSD % n=5 | 回收率 % |
| 莱克多巴胺 | 20.0 | 20.4 | 3.5 | 102 |
| 克伦特罗 | 20.0 | 21.1 | 2.8 | 105.5 |
| 沙丁胺醇 | 20.0 | 19.1 | 3.3 | 95.5 |
| 西布特罗 | 20.0 | 18.9 | 2.9 | 94.5 |
| 溴布特罗 | 20.0 | 18.7 | 3.5 | 93.5 |
| 酒石酸阿福特罗 | 20.0 | 19.8 | 3.5 | 99 |
| 富马酸福莫特罗 | 20.0 | 20.7 | 2.8 | 103.5 |

[0084] 表 4 检测结果可知,结果的相对标准偏差(RSD)小于 3.5 %,平均回收率为 93.5 ~ 105.5%,表明本发明可用于羊尿样品中瘦肉精的检测,方法的灵敏度高、特异性强,结果准确可靠。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法和应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN104502429B | 公开(公告)日 | 2015-10-21 |
| 申请号 | CN201510034905.5 | 申请日 | 2015-01-25 |
| [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 | 张勇 马洪敏 魏琴 李燕 吴丹 庞雪辉 | | |
| 发明人 | 张勇 马洪敏 魏琴 李燕 吴丹 庞雪辉 | | |
| IPC分类号 | G01N27/26 G01N27/48 G01N21/76 G01N33/53 | | |
| 审查员(译) | 郑瑜 | | |
| 其他公开文献 | CN104502429A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种无标记电致化学发光瘦肉精免疫传感器的制备方法，属于新型纳米功能材料和生物传感器领域。本发明首先在二氧化钛纳米颗粒基底上，利用光电化学合成方法，制备核壳结构的枝晶纳米棒状的贵金属合金纳米材料，进而制得了成本低、灵敏度高、特异性好、检测快速、制备简单的检测瘦肉精的无标记电致化学发光免疫传感器。

| 瘦肉精 | 加入量 ng·g ⁻¹ | 猪尿 | | |
|--------|---------------------------|---------------------------|--------------|----------|
| | | 回收值 ng·g ⁻¹ | RSD % n=5 | 回收率 % |
| 莱克多巴胺 | 20.0 | 19.7 | 2.9 | 98.5 |
| 克伦特罗 | 20.0 | 19.5 | 2.8 | 97.5 |
| 沙丁胺醇 | 20.0 | 20.2 | 1.9 | 101 |
| 硫酸沙丁胺醇 | 20.0 | 20.8 | 3.1 | 104 |
| 盐酸多巴胺 | 20.0 | 19.7 | 2.9 | 98.5 |
| 西马特罗 | 20.0 | 19.3 | 3.3 | 96.5 |
| 硫酸特布他林 | 20.0 | 20.5 | 2.7 | 102.5 |
| 苯乙醇胺 A | 20.0 | 19.8 | 2.8 | 99 |