



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105158453 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201510399876. 2

(22) 申请日 2015. 07. 09

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 李娇娇 魏琴 张勇 任祥
马洪敏 庞雪辉 闫涛 胡丽华
范大伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 27/26(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法,属于新型纳米功能材料和环境检测技术领域。本发明首先采用一锅法制备了二硫化钼/金钯合金纳米复合材料 MoS₂/AuPd,进而利用其优异的吸附和电化学催化性能制得了简单、快速、灵敏的可用于实际样品中壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器。

1. 一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,制备步骤为:

(1) 取 35 mL 的十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 溶液,加入 2~6 mL 的氯金酸 HAuCl_4 溶液和 2~6 mL 的氯钯酸 H_2PdCl_4 溶液,搅拌 15 分钟后,继续搅拌并相继加入 2~6 mL 的抗坏血酸溶液,0.5~1.5 mL 的钼酸钠 Na_2MoO_4 溶液和 0.01~0.03 g 硫化钠 Na_2S ,搅拌 15 分钟后,放入反应釜中,在 150~220 $^\circ\text{C}$ 下,反应 12~16 小时;冷却至室温后,使用去离子水离心洗涤,在 40 $^\circ\text{C}$ 下进行真空干燥,即制得二硫化钼 / 金钯合金纳米复合材料 MoS_2/AuPd ,将其溶于去离子水制得 MoS_2/AuPd 溶液;

(2) 以直径 4 mm 的玻璃碳电极为工作电极,在电极表面滴涂 5~12 μL 的 MoS_2/AuPd 溶液,室温下晾干;

(3) 将步骤(2)中得到的电极用去离子水清洗,室温下晾干成膜,在电极表面滴涂 5~12 μL 的壬基酚抗体溶液,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干;

(4) 将步骤(3)中得到的电极用去离子水清洗,继续在电极表面滴涂 5~10 μL 的牛血清白蛋白 BSA 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干,用去离子水清洗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干成膜,制得无标记电化学免疫传感器;

所述的 CTAB 溶液的浓度为 0.1 mol/L,所述的 HAuCl_4 浓度为 0.06 mol/L,所述的 H_2PdCl_4 浓度为 0.03 mol/L,所述的抗坏血酸溶液浓度为 0.3 mol/L,所述的 Na_2MoO_4 溶液浓度为 0.1 mol/L;

所述的 MoS_2/AuPd 溶液浓度为 1 mg/mL;

所述的壬基酚抗体溶液浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

所述的 BSA 溶液浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2. 如权利要求 1 所述的一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述的无标记电化学免疫传感器的用途为可用于实际样品中壬基酚的快速、灵敏检测。

一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于无机纳米复合材料构建的无标记电化学免疫传感器的制备方法,所制备的传感器可用于壬基酚的检测。属于新型纳米功能材料与环境检测技术领域。

背景技术

[0002] 壬基酚是一种重要的精细化工原料和中间体,而被广泛应用于主要用于生产纺织印染助剂、润滑油添加剂、农药乳化剂、树脂改性剂、树脂及橡胶稳定剂等领域。但由于其具有内分泌干扰效应,可促进乳腺癌细胞增殖,而属于有机污染物,是一种干扰内分泌的致癌物,并有“精子杀手”之称。环境标准以及美国国家环保局推荐标准中,壬基酚在淡水中的含量不应高于 6.6 ng/mL,在咸水中不应高于 1.7 ng/mL。因此,快速、灵敏的定性、定量检测实际样品中的壬基酚对于人们的生产和生活具有重要的意义。

[0003] 电化学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分析和环境检测领域,其中,无标记电化学免疫传感器因其制备相对简单、受环境影响小等优点,具有更广阔的应用前景。构建无标记的电化学免疫传感器,关键的技术是提高修饰电极对抗体的固定量和对测试底液的信号响应速度和大小。

[0004] 二硫化钼,化学式为 MoS_2 ,英文名称为 molybdenum disulfide,是辉钼矿的主要成分,是应用最广泛的固体润滑剂之一。其纳米二维结构,是性能优异的半导体纳米材料,除了具有大的比表面积,可以作为催化剂和生物抗体的载体,提高负载量,同时作为助催化剂也具有优良的电子传递性能。

[0005] 目前,大多数的合成手段都是分开合成后,再将催化剂与载体进行复合,过程繁琐,产率不高。因此,对于一锅法制备具有优良催化性能的催化剂具有广泛的应用前景和重要的科学意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种制备简单、灵敏度高、特异性强的可用于壬基酚检测的电化学免疫传感器的制备方法,所制备的传感器,可用于壬基酚的灵敏、快速检测。基于此目的,本发明先采用一锅法制备出二硫化钼 / 金钯合金纳米复合材料 MoS_2/FePd ,并利用其对电极进行修饰,有效提高了电极的比表面积,增大了抗体的吸附量;并且极大增强了电极的电子响应速度和对测试底液的电催化信号强度等性能;然后通过吸附作用,固定壬基酚抗体。在进行检测时,利用抗体与抗原的特异性定量结合,使得电极对 H_2O_2 的电流响应信号相应降低,从而实现了采用无标记的电化学方法检测壬基酚的免疫传感器的构建。

[0007] 本发明采用的技术方案如下:

1. 一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,制备步骤为:

(1) 取 35 mL 的十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 溶液,加入 2~6 mL 的氯金酸 HAuCl_4 溶液

和 2~6 mL 的氯钯酸 H_2PdCl_4 溶液, 搅拌 15 分钟后, 继续搅拌并相继加入 2~6 mL 的抗坏血酸溶液, 0.5~1.5 mL 的钼酸钠 Na_2MoO_4 溶液和 0.01~0.03 g 硫化钠 Na_2S , 搅拌 15 分钟后, 放入反应釜中, 在 150~220 $^\circ\text{C}$ 下, 反应 12~16 小时; 冷却至室温后, 使用去离子水离心洗涤, 在 40 $^\circ\text{C}$ 下进行真空干燥, 即制得二硫化钼 / 金钯合金纳米复合材料 MoS_2/AuPd , 将其溶于去离子水制得 MoS_2/AuPd 溶液;

(2) 以直径 4 mm 的玻璃碳电极为工作电极, 在电极表面滴涂 5~12 μL 的 MoS_2/AuPd 溶液, 室温下晾干;

(3) 将步骤(2)中得到的电极用去离子水清洗, 室温下晾干成膜, 在电极表面滴涂 5~12 μL 的壬基酚抗体溶液, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干;

(4) 将步骤(3)中得到的电极用去离子水清洗, 继续在电极表面滴涂 5~10 μL 的牛血清白蛋白 BSA 溶液, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存晾干, 用去离子水清洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干成膜, 制得无标记电化学免疫传感器;

所述的 CTAB 溶液的浓度为 0.1 mol/L, 所述的 HAuCl_4 浓度为 0.06 mol/L, 所述的 H_2PdCl_4 浓度为 0.03 mol/L, 所述的抗坏血酸溶液浓度为 0.3 mol/L, 所述的 Na_2MoO_4 溶液浓度为 0.1 mol/L;

所述的 MoS_2/AuPd 溶液浓度为 1 mg/mL;

所述的壬基酚抗体溶液浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

所述的 BSA 溶液浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0008] 2. 本发明所述的制备方法所制备的无标记电化学免疫传感器, 其特征在于, 所述的无标记电化学免疫传感器的用途为可用于实际样品中壬基酚的快速、灵敏检测。

[0009] 3. 本发明所述的无标记电化学免疫传感器的用途, 其特征在于, 检测壬基酚的检测步骤为:

(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壬基酚标准溶液, 底液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液;

(2) 工作电极修饰: 将本发明所述的无标记电化学免疫传感器作为工作电极, 将步骤(1)中配制的不同浓度的壬基酚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, 连接电化学工作站, 在电解槽中先后加入 10~25 mL pH=7.0~8.0 的 PBS 缓冲溶液和 20 μL 浓度为 3~6 mol/L 的 H_2O_2 ; 通过计时电流法检测组装的工作电极对 H_2O_2 的响应; 空白标样的响应电流记为 I_0 , 含有不同浓度的壬基酚标准溶液的响应电流记作 I_1 , 响应电流降低的差值为 $\Delta I = I_0 - I_1$, ΔI 与壬基酚标准溶液的质量浓度 C 之间成线性关系, 绘制 $\Delta I - C$ 工作曲线;

(4) 壬基酚的检测: 用待测样品代替步骤(1)中的壬基酚标准溶液, 按照步骤(2)和(3)中的方法进行检测, 根据响应电流降低的差值 ΔI 和工作曲线, 得到待测样品中壬基酚的含量。

[0010] 本发明的有益成果

(1) 本发明所述的无标记电化学免疫传感器的制备方法, 制备过程简单、操作方便, 所制备的传感器可以实现对实际样品中壬基酚的快速、灵敏、高选择性检测, 具有市场发展前景。

[0011] (2) 本发明首次采用一锅法制备了 MoS_2/AuPd , 并将其应用于无标记电化学免疫传感器的制备中, 利用 MoS_2/AuPd 的大比表面积以增大抗体的吸附量、高催化活性以提高电化学响应信号强度及其高电子传递速率以提高电化学响应信号速度, 显著增强了电极对 H_2O_2 的响应速度和强度, 大大提高了电化学传感器的检测灵敏度, 具有重要的科学意义和应用价值。

具体实施方式

[0012] 实施例 1 MoS_2/AuPd 的制备方法

取 35 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 CTAB 溶液, 加入 2 mL 浓度为 0.06 mol/L 的 HAuCl_4 溶液和 2 mL 浓度为 0.03 mol/L 的 H_2PdCl_4 溶液, 搅拌 15 分钟后, 继续搅拌并相继加入 2 mL 浓度为 0.3 mol/L 的抗坏血酸溶液, 0.5 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 Na_2MoO_4 溶液和 0.01 g 的 Na_2S , 搅拌 15 分钟后, 放入反应釜中, 在 180 °C 下, 反应 14 小时; 冷却至室温后, 使用去离子水离心洗涤, 在 40 °C 下进行真空干燥, 即制得 MoS_2/AuPd , 将其溶于去离子水制得浓度为 1 mg/mL 的 MoS_2/AuPd 溶液。

[0013] 实施例 2 MoS_2/AuPd 的制备方法

取 35 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 CTAB 溶液, 加入 4 mL 浓度为 0.06 mol/L 的 HAuCl_4 溶液和 4 mL 浓度为 0.03 mol/L 的 H_2PdCl_4 溶液, 搅拌 15 分钟后, 继续搅拌并相继加入 4 mL 浓度为 0.3 mol/L 的抗坏血酸溶液, 1.0 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 Na_2MoO_4 溶液和 0.02 g 的 Na_2S , 搅拌 15 分钟后, 放入反应釜中, 在 150 °C 下, 反应 16 小时; 冷却至室温后, 使用去离子水离心洗涤, 在 40 °C 下进行真空干燥, 即制得 MoS_2/AuPd , 将其溶于去离子水制得浓度为 1 mg/mL 的 MoS_2/AuPd 溶液。

[0014] 实施例 3 MoS_2/AuPd 的制备方法

取 35 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 CTAB 溶液, 加入 6 mL 浓度为 0.06 mol/L 的 HAuCl_4 溶液和 6 mL 浓度为 0.03 mol/L 的 H_2PdCl_4 溶液, 搅拌 15 分钟后, 继续搅拌并相继加入 6 mL 浓度为 0.3 mol/L 的抗坏血酸溶液, 1.5 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 Na_2MoO_4 溶液和 0.03 g 的 Na_2S , 搅拌 15 分钟后, 放入反应釜中, 在 220 °C 下, 反应 12 小时; 冷却至室温后, 使用去离子水离心洗涤, 在 40 °C 下进行真空干燥, 即制得 MoS_2/AuPd , 将其溶于去离子水制得浓度为 1 mg/mL 的 MoS_2/AuPd 溶液。

[0015] 实施例 4 无标记电化学免疫传感器的制备方法

(1) 以直径 4 mm 的玻碳电极为工作电极, 在电极表面滴涂 5 μL 实施例 1 中制得的 MoS_2/AuPd 溶液, 室温下晾干;

(2) 将步骤(1)中得到的电极用去离子水清洗, 室温下晾干成膜, 在电极表面滴涂 5 μL 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的壬基酚抗体溶液, 4 °C 冰箱中保存晾干;

(3) 将步骤(2)中得到的电极用去离子水清洗, 继续在电极表面滴涂 5 μL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 溶液, 4 °C 冰箱中保存晾干, 用去离子水清洗, 4 °C 冰箱中晾干成膜, 制得无标记电化学免疫传感器。

[0016] 实施例 5 无标记电化学免疫传感器的制备方法

(1) 以直径 4 mm 的玻碳电极为工作电极, 在电极表面滴涂 8 μL 实施例 2 中制得的 MoS_2/AuPd 溶液, 室温下晾干;

(2) 将步骤(1)中得到的电极用去离子水清洗,室温下晾干成膜,在电极表面滴涂 8 μL 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的壬基酚抗体溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存晾干;

(3) 将步骤(2)中得到的电极用去离子水清洗,继续在电极表面滴涂 7 μL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存晾干,用去离子水清洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干成膜,制得无标记电化学免疫传感器。

[0017] 实施例 6 无标记电化学免疫传感器的制备方法

(1) 以直径 4 mm 的玻璃碳电极为工作电极,在电极表面滴涂 12 μL 实施例 3 中制得的 MoS_2/AuPd 溶液,室温下晾干;

(2) 将步骤(1)中得到的电极用去离子水清洗,室温下晾干成膜,在电极表面滴涂 12 μL 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的壬基酚抗体溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存晾干;

(3) 将步骤(2)中得到的电极用去离子水清洗,继续在电极表面滴涂 10 μL 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存晾干,用去离子水清洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干成膜,制得无标记电化学免疫传感器。

[0018] 实施例 7 实施例 4 制备无标记电化学免疫传感器用于壬基酚的检测,步骤如下:

(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壬基酚标准溶液,底液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液;

(2) 工作电极修饰:将实施例 4 所制备无标记电化学免疫传感器作为工作电极,将步骤(1)中配制的不同浓度的壬基酚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,连接电化学工作站,在电解槽中先后加入 10 mL pH=7.0 的 PBS 缓冲溶液和 20 μL 浓度为 3 mol/L 的 H_2O_2 ;通过计时电流法检测组装的工作电极对 H_2O_2 的响应;空白标样的响应电流记为 I_0 ,含有不同浓度的壬基酚标准溶液的响应电流记作 I_i ,响应电流降低的差值为 $\Delta I = I_0 - I_i$, ΔI 与壬基酚标准溶液的质量浓度 C 之间成线性关系,绘制 $\Delta I - C$ 工作曲线;

(4) 壬基酚的检测:用待测样品代替步骤(1)中的壬基酚标准溶液,按照步骤(2)和(3)中的方法进行检测,根据响应电流降低的差值 ΔI 和工作曲线,得到待测样品中壬基酚的含量;

所述的壬基酚电化学免疫传感器用于壬基酚的检测,其线性检测范围为:0.02~80 ng/mL ,检出限为:7 pg/mL 。

[0019] 实施例 8 实施例 5 制备无标记电化学免疫传感器用于壬基酚的检测,步骤如下:

(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壬基酚标准溶液,底液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液;

(2) 工作电极修饰:将实施例 5 所制备无标记电化学免疫传感器作为工作电极,将步骤(1)中配制的不同浓度的壬基酚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,连接电化学工作站,在电解槽中先后加入 15 mL pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液和 20 μL 浓度为 4 mol/L 的 H_2O_2 ;通过计时电流法检测组装的工作电极对 H_2O_2 的响应;空白标样的响应电流记为 I_0 ,含有不同浓度的壬基酚标准溶液的响应电流记作 I_i ,响应电流降低的差值为 $\Delta I = I_0 - I_i$, ΔI 与壬基酚标准溶液的质量浓度 C 之间

成线性关系,绘制 $\Delta I-C$ 工作曲线;

(4) 壬基酚的检测:用待测样品代替步骤(1)中的壬基酚标准溶液,按照步骤(2)和(3)中的方法进行检测,根据响应电流降低的差值 ΔI 和工作曲线,得到待测样品中壬基酚的含量;

所述的无标记电化学免疫传感器用于壬基酚的检测,其线性检测范围为:0.02~85 ng/mL,检出限为:7 pg/mL。

[0020] 实施例 9 实施例 6 制备无标记电化学免疫传感器用于壬基酚的检测,步骤如下:

(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壬基酚标准溶液,底液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液;

(2) 工作电极修饰:将实施例 6 所制备壬基酚电化学免疫传感器作为工作电极,将步骤(1)中配制的不同浓度的壬基酚标准溶液分别滴涂到工作电极表面,4 °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,连接电化学工作站,在电解槽中先后加入 25 mL pH=8.0 的 PBS 缓冲溶液和 20 μ L 浓度为 6 mol/L 的 H_2O_2 ;通过计时电流法检测组装的工作电极对 H_2O_2 的响应;空白标样的响应电流记为 I_0 ,含有不同浓度的壬基酚标准溶液的响应电流记作 I_i ,响应电流降低的差值为 $\Delta I = I_0 - I_i$, ΔI 与壬基酚标准溶液的质量浓度 C 之间成线性关系,绘制 $\Delta I-C$ 工作曲线;

(4) 壬基酚的检测:用待测样品代替步骤(1)中的壬基酚标准溶液,按照步骤(2)和(3)中的方法进行检测,根据响应电流降低的差值 ΔI 和工作曲线,得到待测样品中壬基酚的含量;

所述的无标记电化学免疫传感器用于壬基酚的检测,其线性检测范围为:0.02~75 ng/mL,检出限为:7 pg/mL。

[0021] 实施例 10 实际样品中壬基酚的检测

准确移取不同环境水样,加入一定质量浓度的壬基酚标准溶液,以未加入壬基酚的相同样品为空白,进行加标回收实验,按照实施例 7~9 的步骤进行检测,测定样品中壬基酚的回收率,检测结果见表 1;

表 1 实际样品中壬基酚的检测结果

环境水样	壬基酚 加入量 ng/mL	回收值 ng/mL	RSD % n=5	回收率 %
自来水	3.00	3.02	2.4	101
河水	3.00	3.05	2.3	102
矿泉水	3.00	2.95	1.8	98.3

表 1 检测结果可知,结果的相对标准偏差 RSD 小于 3.0 %,回收率为 98.3~102%,表明本发明所制备的无标记电化学免疫传感器可用于实际样品中壬基酚的检测,方法的灵敏度高、特异性强,结果准确可靠。

专利名称(译)	一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN105158453A	公开(公告)日	2015-12-16
申请号	CN201510399876.2	申请日	2015-07-09
[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	李娇娇 魏琴 张勇 任祥 马洪敏 庞雪辉 闫涛 胡丽华 范大伟		
发明人	李娇娇 魏琴 张勇 任祥 马洪敏 庞雪辉 闫涛 胡丽华 范大伟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N27/26		
CPC分类号	G01N27/26 G01N33/5306 G01N33/531		
其他公开文献	CN105158453B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器的制备方法，属于新型纳米功能材料和环境检测技术领域。本发明首先采用一锅法制备了二硫化钼/金钯合金纳米复合材料MoS₂/AuPd，进而利用其优异的吸附和电化学催化性能制得了简单、快速、灵敏的可用于实际样品中壬基酚检测的无标记电化学免疫传感器。

环境水样	壬基酚 加入量 ng/mL	回收值 ng/mL	RSD % n=5	回收率 %
自来水	3.00	3.02	2.4	101
河水	3.00	3.05	2.3	102
矿泉水	3.00	2.95	1.8	98.3