(19) 中华人民共和国国家知识产权局

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101710116 A
(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200910114541.6

(22) 申请日 2009.11.10

(71) 申请人 桂林理工大学
地址 541004 广西壮族自治区桂林市建干路12号

(72) 发明人 李建平　蒋复阳　魏小平

(51) Int.Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 27/27 (2006.01)
G01N 27/48 (2006.01)

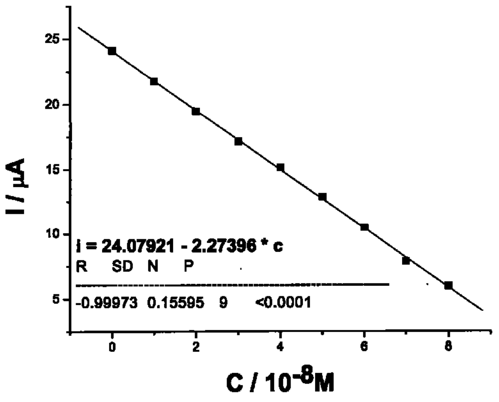
权利要求书 1 页　说明书 3 页　附图 1 页

(54) 发明名称

一种利用分子印迹免疫传感器测定微量土霉素的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用分子印迹免疫传感器测定微量土霉素的方法。当土霉素分子印迹膜在金电极表面形成、和土霉素分子作用的时候，对苯二酚在金电极上的电化学信号发生变化，当检测体系里面存在双氧水的和辣根过氧化酶的时候，电化学信号变化更加显著。利用待测溶液中的土霉素竞争取代分子印迹膜上原有的辣根过氧化酶标记的土霉素的时候，电化学信号会随着未标记的土霉素浓度增加而线性减小，据此建立了一种测定痕量土霉素的电化学分析方法。差分脉冲伏安法法对待测液进行扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V，土霉素在 0mol/L ～ 8×10^{-8}mol/L 浓度范围内与峰电流值 i 呈良好的线性关系。本发明克服了现有技术存在过于复杂等诸多缺点，土霉素的检测限达到 10^{-9}mol/L。



CN 101710116 A

1. 一种利用分子印迹免疫传感器测定微量土霉素的方法，其特征在于具体步骤为：

一、金电极的处理：

将金电极依次用 1.0μm、0.3μm 和 0.05μm 的氧化铝粉抛光，依次在体积比为 1 ∶ 1 的硝酸、无水乙醇和纯水泡洗，取出后超声洗涤 5min；

二、土霉素分子印迹免疫传感器的制备：

分别量取 0.5mL 2×10^{-4}mol/L ～ 8×10^{-4}mol/L 的邻苯二酚和 2.5mL 8×10^{-5}mol/L ～ 3.5×10^{-4}mol/L 的土霉素溶液加入到 7mL pH = 5.2 浓度为 0.1mol/L 的醋酸－醋酸钠缓冲溶液中，充分搅拌混匀后在 0 到 0.8V 之间以 50mV/s 的速度用循环伏安法连续扫描 30 到 60 圈，即可制得土霉素分子印迹免疫传感器；

三、检测方法：

取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含有 3×10^{-6}mo 1/L ～ 8×10^{-6}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液；将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器浸入 10mL1×10^{-5}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的土霉素溶液中竞争吸附 3 到 10 分钟，接入检测体系，滴加 20μL 5×10^{-4}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的双氧水；用电化学工作站中的差分脉冲伏安法对待测液进行扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V；

四、标准工作曲线的绘制：

取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含有 3×10^{-6}mol/L ～到 8×10^{-6}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液；将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器逐次浸入 10mL 1×10^{-5}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 土霉素溶液中竞争吸附 3 到 10 分钟，滴加 20μL 5×10^{-4}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的双氧水，差分脉冲伏安法扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V；土霉素在 0mol/L ～ 8×10^{-8}mol/L 浓度范围内与峰电流值 i 呈良好的线性关系，线性方程：$i = 24.07921-2.27396\times C$，相关系数 R 为 0.99973；

五、待测土霉素含量的测定：

取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含有 3×10^{-6}mol/L ～到 8×10^{-6}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液；将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器逐次浸入 10mL 1×10^{-5}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 土霉素溶液中竞争吸附 3 到 10 分钟，滴加 20μL 5×10^{-4}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的双氧水，差分脉冲伏安法扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V；读出峰电流值 i；根据校正曲线计算出 C；即可知此 10mL 待测溶液中所含土霉素的量。

一种利用分子印迹免疫传感器测定微量土霉素的方法

技术领域

[0001]　本发明涉及一种利用分子印迹技术与免疫技术联用的电化学免疫传感器快速测定微量土霉素的方法。

背景技术

[0002]　土霉素为四环素类抗生素类药，是生产和临床应用最久的抗生素之一，其化学结构属氢化并四苯环衍生物，口服吸收良好，在体内分布广泛，可在肝组织中富集，造成肝损伤。土霉素常被添加到动物饲料中，以促进动物的生长以及防治各种疾病，如果不能严格控制停药期，很容易造成在动物肉和组织中残留，给人体健康带来危害，因此世界各国对畜禽肉中的四环素族残留都有严格的限量要求，因此研究对土霉素具有高选择性的检测方法很有意义。分子印迹是近年来发展起来的一种对印迹分子具有选择性的聚合物合成方法。已报道的印迹传感器用于莠去津、敌草净、草甘膦、对硫磷、氯霉素等十几种农药的检测，但利用免疫技术与分子印迹结合的土霉素分子印迹免疫传感器检测微量土霉素的研究未见报道。

发明内容

[0003]　本发明的目的在于提供一种利用分子印迹技术与免疫技术联用的电化学免疫传感器快速测定微量土霉素的方法。

[0004]　构思如下：我们发现对苯二酚可以作为离子探针，当土霉素分子印迹膜在金电极表面形成、和土霉素分子作用的时候，它在金电极上的电化学信号发生变化，当检测体系里面存在双氧水的和辣根过氧化酶的时候，电化学信号变化更加显著。利用待测溶液中的土霉素竞争取代分子印迹膜上原有的辣根过氧化酶标记的土霉素的时候，电化学信号会随着未标记的土霉素浓度增加而线性减小，故可以用来检测土霉素的含量。

[0005]　本发明涉及分子印迹技术免疫酶标增敏技术。当待测分子土霉素与土霉素分子印迹膜上辣根过氧化酶标记的土霉素发生竞争取代时，对苯二酚金电极上的电化学信号发生变化，峰电流与待测土霉素的浓度在 0mol/L ～ 8×10^{-8}mol/L 范围内呈线性关系。

[0006]　具体步骤为：

[0007]　一、金电极的处理：

[0008]　将金电极依次用 1.0μm、0.3μm 和 0.05μm 的氧化铝粉抛光，依次在体积比为 1 ∶ 1 的硝酸、无水乙醇和纯水泡洗，取出后超声洗涤 5min；

[0009]　二、土霉素分子印迹免疫传感器的制备：

[0010]　分别量取 0.5mL 2×10^{-4}mol/L ～ 8×10^{-4}mol/L 的邻苯二酚和 2.5mL 8×10^{-5}mol/L ～ 3.5×10^{-4}mol/L 的土霉素溶液加入到 7mL pH ＝ 5.2 浓度为 0.1mol/L 的醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液中，充分搅拌混匀后在 0 到 0.8V 之间以 50mV/s 的速度用循环伏安法连续扫描 30 到 60 圈，即可制得土霉素分子印迹免疫传感器；

[0011]　三、检测方法：

[0012] 取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含有 3×10^{-6}mol/L ～ 8×10^{-6}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液；将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器浸入 10mL 1×10^{-5}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的土霉素溶液中竞争吸附 3 到 10 分钟，接入检测体系，滴加 20μL 5×10^{-4}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的双氧水；用电化学工作站中的差分脉冲伏安法对待测液进行扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V；

[0013] 四、标准工作曲线的绘制：

[0014] 取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含有 3×10^{-6}mol/L ～到 8×10^{-6}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液；将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器逐次浸入 10mL 1×10^{-5}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 土霉素溶液中竞争吸附 3 到 10 分钟，滴加 20μL 5×10^{-4}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的双氧水，差分脉冲伏安法扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V；土霉素在 0mol/L ～ 8×10^{-8}mol/L 浓度范围内与峰电流值 i 呈良好的线性关系，线性方程：$i = 24.07921-2.27396\times C$，相关系数 R 为 0.99973；

[0015] 五、待测土霉素含量的测定：

[0016] 取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含有 3×10^{-6}mol/L ～到 8×10^{-6}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液；将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器逐次浸入 10mL 1×10^{-5}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 土霉素溶液中竞争吸附 3 到 10 分钟，滴加 20μL 5×10^{-4}mol/L ～ 3×10^{-3}mol/L 的双氧水，差分脉冲伏安法扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V；读出峰电流值 i；根据校正曲线计算出 C；即可知此 10mL 待测溶液中所含土霉素的量。

[0017] 本发明克服了现有技术存在过于复杂等诸多缺点，灵敏度高，对于浓度 10^{-8}mol/L 以上的土霉素的检测易于自动化。

附图说明

[0018] 图 1 为本发明实施例金电极上土霉素分子印迹膜在 5×10^{-3}mol/L 铁氰化钾溶液中的循环伏安图。

[0019] 图中标记：a- 裸金电极的循环伏安图；b- 聚合后未洗脱的分子印迹免疫传感器的循环伏安图；c- 洗脱后的分子印迹免疫传感器的循环伏安图。

[0020] 图 2 为本发明实施例土霉素含量与差分脉冲伏安法峰电流的关系图。

具体实施方式

[0021] 实施例：

[0022] 一、金电极的处理：

[0023] 将金电极依次用 1.0μm、0.3μm 和 0.05μm 的氧化铝粉抛光，依次在体积比为 1 ：1 的硝酸、无水乙醇、纯水泡洗，取出后超声洗涤 5min。

[0024] 二、土霉素分子印迹免疫传感器的制备

[0025] 分别量取 0.5mL 7×10^{-4}mol/L 的邻苯二酚、2.5mL 3×10^{-4}mol/L 的土霉素溶液和 7mL pH ＝ 5.2 浓度为 0.1mol/L 的醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液，充分搅拌混匀后在 0 到 0.8V 之间以 50mV/s 的速度用循环伏安法连续扫描 30 圈，即可制得土霉素分子印迹免疫传感器。

[0026] 三、检测方法

[0027]　取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含 5×10^{-4}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液。将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器浸入 10mL 3×10^{-5}mol/L 的土霉素溶液中竞争吸附 5 分钟，接入检测体系，滴加 20μL 1×10^{-3}mol/L 的双氧水。选用 CHI660 型电化学工作站中的差分脉冲伏安法对待测液进行扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V。

[0028]　四、标准工作曲线的绘制：

[0029]　取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含 5×10^{-4}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液。将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器逐次浸入 10mL 3×10^{-5}mol/L 土霉素溶液中竞争吸附 5 分钟，接入检测体系，滴加 20μL 1×10^{-3}mol/L 的双氧水。选用 CHI660 型电化学工作站中的差分脉冲伏安法对待测液进行扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V。土霉素含量与峰电流关系如图 2，土霉素在 0mol/L ～ 8×10^{-8}mol/L 浓度范围内与峰电流值 i 呈良好的线性关系，线性方程：$i = 24.07921-2.27396\times C$，相关系数 R 为 0.99973。

[0030]　五、样品中土霉素含量的测定

[0031]　取牛奶样品进行了测定，但是未检出土霉素，故采用标准曲线法进行加标回收实验。取 15mL 小烧杯，加入 10mL 0.1mol/L 含 5×10^{-4}mol/L 对苯二酚的磷酸盐缓冲溶液。将已在辣根过氧化酶标记土霉素溶液中充分吸附后的土霉素分子印迹免疫传感器浸入 10mL 土霉素溶液中竞争吸附 5 分钟，接入检测体系，滴加 20μL 1×10^{-3}mol/L 的双氧水。选用 CHI660 型电化学工作站中的差分脉冲伏安法对待测液进行扫描，扫描电压 -0.6V 到 0.8V。读出峰电流值 i。根据校正曲线计算出 C。平行测定三次，计算回收率，结果如表 1 所示。

[0032]　表 1 加标回收试验数据

[0033]

样品 n	测得量 mol/L	加入土霉素量 mol/L	测出土霉素总量 mol/L	回收率 %
1	未检出	3.00×10^{-8}	3.04×10^{-7}	101.3
2	未检出	5.00×10^{-8}	4.93×10^{-6}	98.6
3	未检出	7.00×10^{-8}	7.16×10^{-6}	102.3

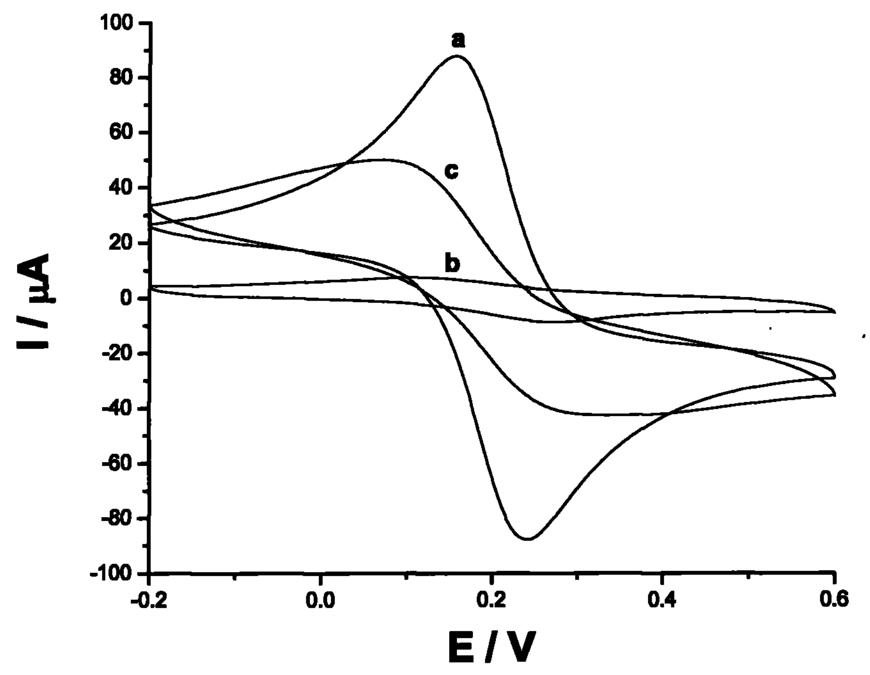

a
c
b
I / μA
E / V
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6

图 1

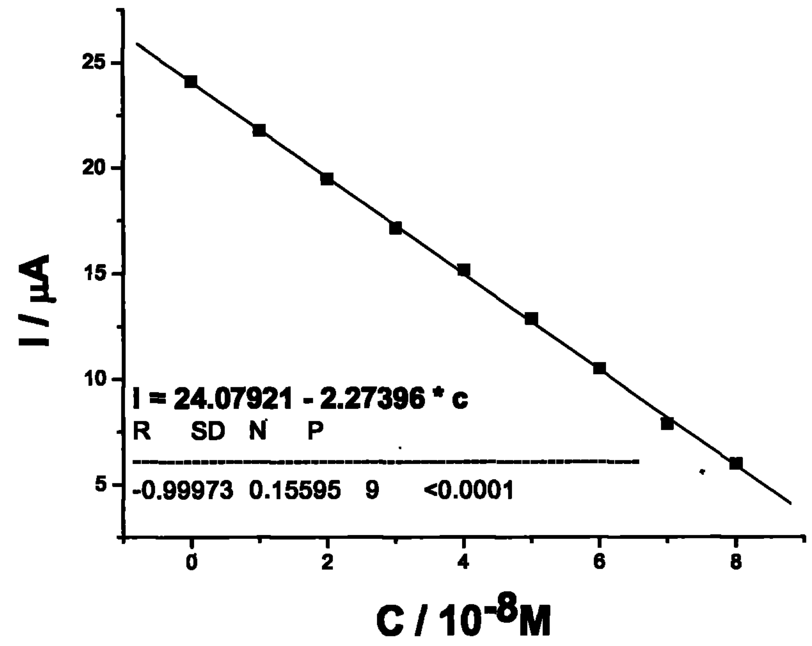
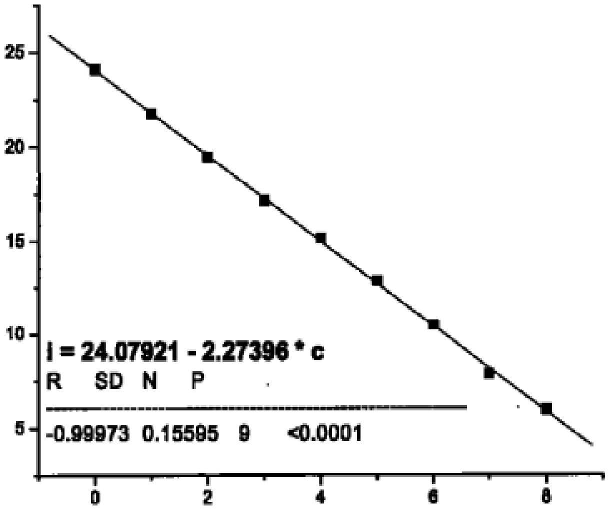

I / μA
C / 10-8M
I = 24.07921 - 2.27396 * c
R SD N P
-0.99973 0.15595 9 <0.0001
25
20
15
10
5
0
2
4
6
8

图 2

专利名称(译)	一种利用分子印迹免疫传感器测定微量土霉素的方法		
公开(公告)号	CN101710116A	公开(公告)日	2010-05-19
申请号	CN200910114541.6	申请日	2009-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
[标]发明人	李建平 蒋复阳 魏小平		
发明人	李建平 蒋复阳 魏小平		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/27 G01N27/48		
其他公开文献	CN101710116B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用分子印迹免疫传感器测定微量土霉素的方法。当土霉素分子印迹膜在金电极表面形成、和土霉素分子作用的时候，对苯二酚在金电极上的电化学信号发生变化，当检测体系里面存在双氧水的和辣根过氧化酶的时候，电化学信号变化更加显著。利用待测溶液中的土霉素竞争取代分子印迹膜上原有的辣根过氧化酶标记的土霉素的时候，电化学信号会随着未标记的土霉素浓度增加而线性减小，据此建立了一种测定痕量土霉素的电化学分析方法。差分脉冲伏安法法对待测液进行扫描，扫描电压-0.6V到0.8V，土霉素在0mol/L～8×10-8mol/L浓度范围内与峰电流值i呈良好的线性关系。本发明克服了现有技术存在过于复杂等诸多缺点，土霉素的检测限达到10-9mol/L。