



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105651989 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201610061432. 2

(22) 申请日 2016. 01. 28

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市河西区大沽南路 1038 号

(72) 发明人 王硕 生威 胡高爽 张燕
王俊平

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401

代理人 李明卓

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

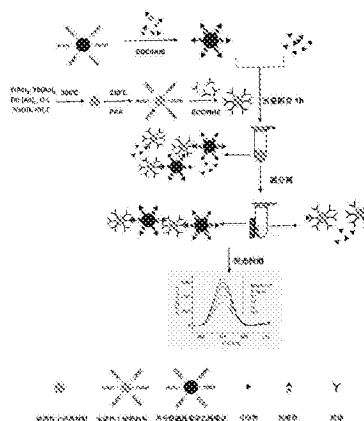
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种蓝色发光上转换材料及其制备和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种蓝色发光上转换材料,使用醋酸钪 $C_6H_{17}O_{10}Y$, 醋酸镱 $C_6H_9O_6Yb \cdot 4H_2O$ 和醋酸铥 $C_6H_9Tm \cdot xH_2O$ 为主要原料制备,其主要技术要点为上转换荧光纳米颗粒 $NaYF_4:Yb, Tm$ (激发波长为 980nm, 发射波长为 477nm) 标记磺胺喹噁啉单克隆抗体作为信号探针,磺胺喹噁啉包被原连接的聚苯乙烯磁性微球作为感应探针,由此构建了一种基于上转换颗粒标记和磁性纳米颗粒快速分离的竞争免疫法检测食品中的磺胺喹噁啉,检测限为 $0.1ng mL^{-1}$ 。其具有以下突出的优点:1、检测步骤简单,通过外加磁场的作用分离,大大简化了操作步骤,缩短了检测时间;2、灵敏度好;3、样品前处理简单快速且绿色环保。



1. 一种蓝色发光上转换材料,其特征在于,使用醋酸钇 $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_{10}\text{Y}$,醋酸镱 $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Yb} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和醋酸铥 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Tm} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 为主要原料制备,得到的上转换材料发射波长为477nm。

2. 一种制备权利要求1所述蓝色发光上转换材料的方法,其特征在于,包括如下步骤:醋酸钇 $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_{10}\text{Y}$,醋酸镱 $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Yb} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和醋酸铥 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Tm} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 按照79:19:2的摩尔比例溶解在含有6ml油酸和17ml十八烯的三颈烧瓶中,加热到100℃抽真空反应10min,之后再加热到160℃并保持温度反应30min,冷却至室温;加入含有0.1g NaOH和0.148g NH_4F 的甲醇溶液,并加热到80℃,真空干燥30min,在氮气的保护下继续加热到300℃,冷凝回流1h,冷却至室温;最后用乙醇-环己烷将混合液离心清洗三次,即可得到蓝色发光油溶性上转换材料OA-UCNPs。

3. 一种制备权利要求1所述蓝色发光上转换材料的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)醋酸钇 $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_{10}\text{Y}$,醋酸镱 $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Yb} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和醋酸铥 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Tm} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 按照70~90:15~25:1~2的摩尔比例与3~8ml油酸和10~20ml十八烯充分混合,先将混合液加热到80~100℃,抽真空反应10min以上,再将溶液加热到120~200℃,并保持温度反应20min以上,冷却至室温;加入含有0.1g NaOH和0.148g NH_4F 的甲醇溶液,充分搅拌均匀,除去甲醇溶液再将混合液在惰性气体保护下加热到280~320℃,反应1~3h,冷却至室温;最后用有机溶剂清洗三次,即可得到蓝色发光油溶性上转换纳米材料。

(2)0.2~0.5g聚丙烯酸溶解在5~35ml乙二醇中,在氮气保护下加热到110℃,之后注入步骤(1)制得的10~200mg油溶性上转换材料与1~20ml甲苯的混合液,保持反应0.5~2h;继续加热到200~300℃,反应0.5~2h;反应结束加入过量的稀盐酸,得到白色粉末,再用超纯水清洗,即可获得水溶性的上转换材料PAA-UCNPs。

4. 一种权利要求3所述方法制备得到的水溶性的上转换材料的应用,其特征在于,

采用活化酯的方法将磺胺喹噁啉单克隆抗体连接到水溶性上转换材料上以制备免疫荧光信号探针,具体方法如下:(1)免疫荧光信号探针:称取5mg PAA-UCNPs超声分散在2ml 0.01mol L^{-1} , pH 5.5的一水吗啉乙磺酸溶液,按照摩尔比例1:1.2加入EDC和NHS,30℃下反应2h;用0.01mol L^{-1} , pH 7.2的4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶液清洗三次,加入磺胺喹噁啉单克隆抗体反应2h,再用BSA溶液封闭2h,即可获得免疫荧光信号探针;

(2)免疫感应探针制备:向含有5mg核壳式单分散聚苯乙烯磁性微球的PBS溶液中加入EDC和NHS,室温下活化2h,PBS清洗三次,加入25 μg 磺胺喹噁啉包被原,室温下反应4h。用2%BSA封闭,PBS磁分离清洗三次,得到的复合物即为免疫感应探针;

(3)免疫荧光信号探针和免疫感应探针,建立荧光免疫竞争体系:

取1.5ml的小试管若干个,分别加入100 μL 的免疫感应探针和100 μL 免疫荧光信号探针,配制浓度梯度0、0.1、0.5、1、5、10、50、100ng mL^{-1} 的磺胺喹噁啉标准品溶液,然后依次向每个小试管中加入游离的磺胺喹噁啉标准品溶液,室温下反应1h;反应结束后,在外加磁场作用下分离结合产物,并用PBS清洗3次;用600 μL PBS复溶后,放入到F-4500荧光分光光度计上进行荧光测定。

一种蓝色发光上转换材料及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明创造属于免疫学、物理学、材料化学与分析化学领域,尤其是涉及一种蓝色发光上转换材料及其制备和应用。

背景技术

[0002] 磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)是一类广谱抗菌药物,其具有价廉、使用方便等特点,在人类疾病治疗,兽医临床及动物饲料添加剂等研究领域中被广泛应用。但是近些年来,由于磺胺类药物的乱用和滥用,其在动物性食品中残留量超标现象越来越严重,食用这些食品后,人体可产生各种毒副作用,甚至造成器质性损伤。其毒性作用主要表现在致癌作用,引起过敏反应,抑制造血系统、使细菌产生耐药性,最终失去治疗人类疾病的作用等。

[0003] 目前,磺胺类兽药残留检测方法主要有微生物抑菌法、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法(CE)和酶联免疫方法(ELISA)等。其中高效液相色谱法是国际上通用的国标方法,具有灵活、通用、选择性强、检出限低等特点。但是其前处理方法繁琐,需要特定的仪器以及专业的人员操作,检测费用昂贵,不适合进行现场快速检测。因此,积极发展一种灵敏度高、快速、简便的药物残留检测手段势在必行。ELISA可有效避免仪器等因素的制约,但也存在一些缺点和不足,如干扰多、灵敏度不够等。为了解决这些问题,近年来,基于荧光的免疫方法受到了越来越多的关注。上转换材料有量子产率高、发射峰窄、较大的Stokes位移、化学稳定性好、毒性低的优点。由于没有自发荧光,信噪比和灵敏度大大提高,其在生物领域和临床应用上都具有诱人的前景。但还没有广泛用于检测食品中的磺胺喹噁啉。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明创造旨在提出一种可以定量的检测食品中的磺胺喹噁啉的简单、快速、灵敏的新型荧光免疫分析方法,通过荧光信号强弱的变化达到检测食品样品中的磺胺喹噁啉的目的。

[0005] 本发明建立了一种以上转换荧光材料 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Tm}$ (激发波长为980nm,发射波长为477nm)标记磺胺喹噁啉单克隆抗体作为信号探针,磺胺喹噁啉包被原连接的聚苯乙烯磁性微球作为感应探针的竞争免疫法来检测食品中的磺胺喹噁啉的残留,为食品安全的有力监管提供可靠的技术保障。

[0006] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0007] 一种蓝色发光上转换材料,使用醋酸钪 $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_{10}\text{Y}$,醋酸镱 $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Yb} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和醋酸铥 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Tm} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 为主要原料制备,得到的上转换材料发射波长为477nm。

[0008] 一种制备上述蓝色发光上转换材料的方法,包括如下步骤:醋酸钪 $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_{10}\text{Y}$,醋酸镱 $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Yb} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和醋酸铥 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Tm} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 按照79:19:2的摩尔比例溶解在含有6ml油酸和17ml十八烯的三颈烧瓶中,加热到100℃抽真空反应10min,之后再加热到160℃并保持温度反应30min,冷却至室温;加入含有0.1g NaOH和0.148g NH_4F 的甲醇溶液,并加热到80℃,真空干燥30min,在氮气的保护下继续加热到300℃,冷凝回流1h,冷却至室温;最后用乙醇-环

己烷将混合液离心清洗三次,即可得到蓝色发光油溶性上转换材料OA-UCNPs。

[0009] 一种制备上述蓝色发光上转换材料的方法,包括如下步骤:(1)醋酸钆 $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_{10}\text{Y}$,醋酸铽 $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Yb} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和醋酸铟 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Tm} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 按照70~90:15~25:1~2的摩尔比例与3~8ml油酸和10~20ml十八烯充分混合,先将混合液加热到80~100℃,抽真空反应10min以上,再将溶液加热到120~200℃,并保持温度反应20min以上,冷却至室温;加入含有0.1g NaOH和0.148g NH_4F 的甲醇溶液,充分搅拌均匀,除去甲醇溶液再将混合液在惰性气体保护下加热到280~320℃,反应1~3h,冷却至室温;最后用有机溶剂清洗三次,即可得到蓝色发光油溶性上转换纳米材料。

[0010] (2)0.2~0.5g聚丙烯酸溶解在5~35ml乙二醇中,在氮气保护下加热到110℃,之后注入步骤(1)制得的10~200mg油溶性上转换材料与1~20ml甲苯的混合液,保持反应0.5~2h;继续加热到200~300℃,反应0.5~2h;反应结束加入过量的稀盐酸,得到白色粉末,再用超纯水清洗,即可获得水溶性的上转换材料PAA-UCNPs。

[0011] 一种制备得到的水溶性的上转换材料的应用:

[0012] 采用活化酯的方法将磺胺喹噁啉单克隆抗体连接到水溶性上转换材料上以制备免疫荧光信号探针,具体方法如下:(1)免疫荧光信号探针:称取5mg PAA-UCNPs超声分散在2ml 0.01mol L^{-1} , pH 5.5的一水吗啉乙磺酸(MES)溶液,按照摩尔比例1:1.2加入EDC和NHS,30℃下反应2h;用 0.01mol L^{-1} , pH 7.2的4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)溶液清洗三次,加入磺胺喹噁啉单克隆抗体反应2h,再用BSA溶液封闭2h,即可获得免疫荧光信号探针;

[0013] (2)免疫感应探针制备:向含有5mg核壳式单分散聚苯乙烯磁性微球(MPPMs)的PBS溶液中加入EDC和NHS,室温下活化2h,PBS清洗三次,加入25 μg 磺胺喹噁啉包被原,室温下反应4h。用2%BSA封闭,PBS磁分离清洗三次,得到的复合物即为免疫感应探针;

[0014] (3)免疫荧光信号探针和免疫感应探针,建立荧光免疫竞争体系:

[0015] 取1.5ml的小试管若干个,分别加入100 μL 的免疫感应探针和100 μL 免疫荧光信号探针,配制浓度梯度0、0.1、0.5、1、5、10、50、100 ng mL^{-1} 的磺胺喹噁啉标准品溶液,然后依次向每个小试管中加入游离的磺胺喹噁啉标准品溶液,室温下反应1h;反应结束后,在外加磁场作用下分离结合产物,并用PBS清洗3次;用600 μL PBS复溶后,放入到F-4500荧光分光光度计上进行荧光测定。

[0016] 本发明的优点和积极效果是:

[0017] (1)本发明提供的发射蓝色荧光上转换材料合成方法简便易行,合成的材料有荧光强度高、量子产率高、生物相容性好、毒性低和没有自发荧光的优点。该材料用化学合成方法制备,有较高的稳定性、较长的使用寿命。

[0018] (2)本发明提供的快速检测方法结合磁分离技术的应用,操作简便快速。

[0019] (3)本发明提供的快速检测方法具有较好的灵敏度,样品检测限可达到0.5 ng mL^{-1} ,特别是牛奶样品比市售商业化试剂盒(5 ng mL^{-1})的检测限低10倍。

[0020] (4)本发明提供的快速检测方法不适用有机提取剂,绿色环保。

[0021] (5)本发明使用上转换材料建立荧光免疫分析方法,可是降低背景机制的影响,使得样品前处理简单,简化操作步骤。

附图说明

[0022] 图1为本发明的荧光免疫方法检测磺胺喹噁啉的示意图；

[0023] 图2为本发明的荧光免疫检测标准曲线；

具体实施方式

[0024] 下面结合实施例,对本发明进一步说明;下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施来限定本发明的保护范围。

[0025] 本发明是使用热分解的方法,合成发射蓝色荧光的上转换纳米材料(激发波长980nm,发射波长477nm),将制备的材料用于标记磺胺喹噁啉单克隆抗体作为荧光信号探针,磺胺喹噁啉包被原修饰的聚苯乙烯磁性微球制备的免疫感应探针,与反应系统中游离的磺胺喹噁啉形成荧光免疫竞争体系用于检测食品样品中残留的磺胺喹噁啉。

[0026] 其具体实施例为:

[0027] 实施例1水溶性上转换荧光标记材料的制备

[0028] 通过热分解的方法制备上转换纳米材料,具体方法如下醋酸钇 $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_{10}\text{Y}$,醋酸镱 $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Yb} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,醋酸铥 $\text{C}_6\text{H}_9\text{Tm} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 按照79:19:2的比例溶解在含有6ml油酸(OA)和17ml十八烯的100ml的三颈烧瓶中,加热到100℃真空干燥10分钟,之后加热到160℃,反应30分钟,冷却到室温。含有NaOH(0.1g)和 NH_4F (0.148g)的甲醇溶液被加入三颈瓶中,混合溶液加热到80℃真空干燥半个小时。在氮气的保护下,混合溶液被加热到300℃冷凝回流保持一个小时,冷却到室温。有机相溶液用乙醇离心洗三次,即可得到蓝色发光的油溶性上转换纳米粒子OA-UCNPs。

[0029] 利用聚丙烯酸(PAA)对OA-UCNPs表面进行羧基改性,属于配体交换法。将OA-UCNPs表面的油酸配体交换成聚丙烯酸配体,从而得到水溶性PAA-UCNPs。具体方法如下:准确称取0.5g PAA,加入10mL二甘醇(DEG)混合均匀,在氮气保护条件下加热至110℃后剧烈搅拌。准确称取30mg OA-UCNPs,加入2mL甲苯溶液混合均匀。将上述溶液混合,加热至230℃并保持1h。冷却至室温,加入pH为4~5的过量稀盐酸水溶液,离心,弃掉上清液。用纯水洗涤离心三次,烘干,放入干燥器内保存备用。实施例2免疫感应探针和荧光信号探针的制备

[0030] 采用活化酯的方法将磺胺喹噁啉单克隆抗体连接到水溶性上转换材料上以制备免疫荧光信号探针。具体方法如下:称取5mg PAA-UCNPs超声分散在2mL 0.01mol L^{-1} MES(pH 5.5,过滤除菌)缓冲溶液中,加入EDC和NHS,30℃下反应2h。用 0.01mol L^{-1} HEPES溶液(pH 7.2,过滤除菌)清洗三次,加入磺胺喹噁啉单克隆抗体,室温下反应2h。HEPES溶液清洗三次后再用BSA溶液封闭2h,即可获得免疫荧光信号探针。

[0031] 免疫感应探针的制备方法如下:向含有5mg MMPMs的PBS溶液中加入EDC和NHS,室温下活化2h。PBS清洗三次,加入25 μg 磺胺喹噁啉包被原,室温下反应4h。用2%BSA封闭,PBS磁分离清洗三次,得到的复合物即为免疫感应探针。

[0032] 实施例3荧光免疫分析方法的建立

[0033] 本发明通过优化免疫感应探针和荧光信号探针的添加量,建立了基于抗原抗体免疫反应,结合上转换荧光标记和聚苯乙烯磁性微球分离作用的竞争免疫分析方法,检测限为 0.1ng mL^{-1} ,如图2所示。具体方法:取1.5ml的小试管若干个,分别加入100 μL 的免疫磁性感应探针和100 μL 免疫荧光信号探针。配制一系列浓度梯度的磺胺喹噁啉标准品(0、0.1、1、10、100 ng mL^{-1})溶液,然后依次向每个小试管中加入游离的磺胺喹噁啉标准品溶液。室温下

反应1h。反应结束后,在外加磁场作用下分离结合产物,并用PBS清洗3次。用600 μ L PBS复溶后,放入到F-4500荧光分光光度计上进行荧光测定。

[0034] 实施例4方法的特异性评价

[0035] 是指建立的方法与抗原结构类似物的交叉反应程度。交叉反应越小,特异性越高,反之,交叉反应越大,特异性越低。本实验中磺胺氯哒嗪,磺胺甲噁唑,磺胺甲氧嗪引起的荧光信号变化大,交叉反应大。表明使用该方法也可应用于检测食品中的磺胺氯哒嗪,磺胺甲噁唑,磺胺甲氧嗪。

[0036] 实施例5方法实用性评价

[0037] 添加不同含量的磺胺喹噁啉标准品到牛奶、牛肉、猪肉、鸡肉、鲈鱼、虾样品(经验证均为阴性样品)中。向空白样品中分别添加500ng/mL、50ng/mL、5ng/mL、0.5ng/mL四个浓度,每个水平作三次平行实验,对于牛奶样品,不需要进行样品提取只需要用PBS稀释5倍;对于组织样品,1g组织切碎置于50mL离心管中,加入2mL碳酸盐/碳酸氢提取液(pH 10(0.2M Na_2CO_3 , 0.2M NaHCO_3 , 去离子水, 1.22:1:6.62;v/v/v)),高速漩涡混匀5min,离心取上清,并调节PH至中性,用PBS溶液稀释2.5倍。计算得到的批内批间回收率69.80%到133.00%,变异系数0.49%到24.40%。这表明该方法可应用于实际样品中磺胺喹噁啉的检测。

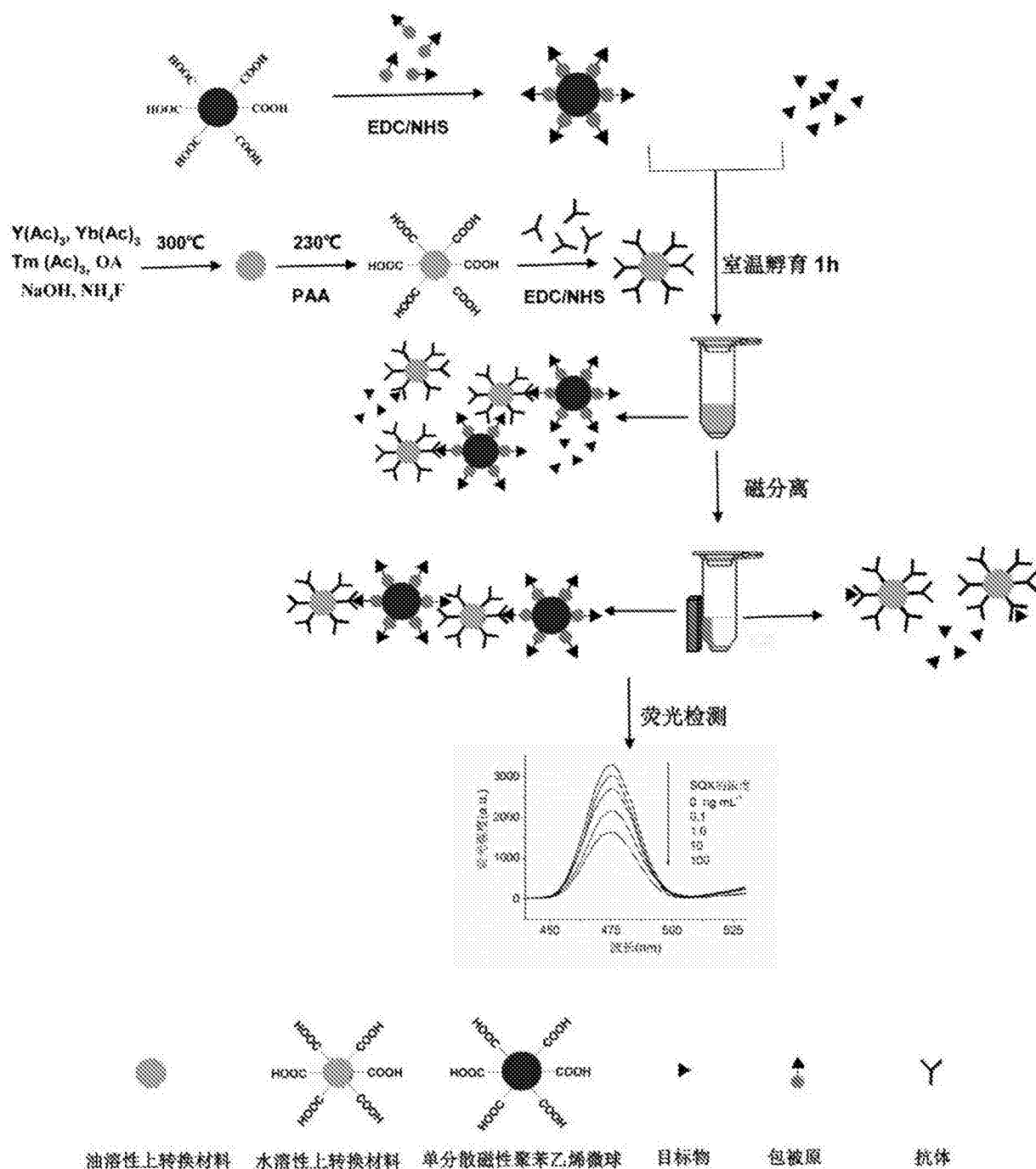


图1

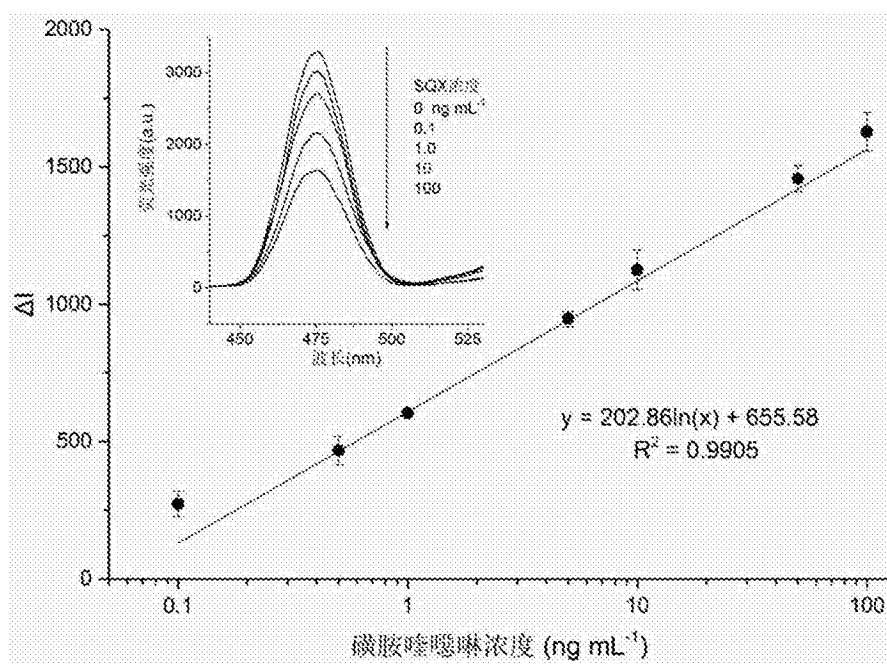


图2

专利名称(译)	一种蓝色发光上转换材料及其制备和应用		
公开(公告)号	CN105651989A	公开(公告)日	2016-06-08
申请号	CN201610061432.2	申请日	2016-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	王硕 生威 胡高爽 张燕 王俊平		
发明人	王硕 生威 胡高爽 张燕 王俊平		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种蓝色发光上转换材料，使用醋酸钇 $C_6H_{17}O_{10}Y$ ，醋酸镱 $C_6H_9O_6Yb \cdot 4H_2O$ 和醋酸铥 $C_6H_9Tm \cdot xH_2O$ 为主要原料制备，其主要技术要点为上转换荧光纳米颗粒 $NaYF_4:Yb,Tm$ (激发波长为980nm，发射波长为477nm)标记磺胺喹噁啉单克隆抗体作为信号探针，磺胺喹噁啉包被原连接的聚苯乙烯磁性微球作为感应探针，由此构建了一种基于上转换颗粒标记和磁性纳米颗粒快速分离的竞争免疫法检测食品中的磺胺喹噁啉，检测限为 $0.1ng \cdot mL^{-1}$ 。其具有以下突出的优点：1、检测步骤简单，通过外加磁场的作用分离，大大简化了操作步骤，缩短了检测时间；2、灵敏度好；3、样品前处理简单快速且绿色环保。

