



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109490522 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811473855.0

(22)申请日 2018.12.04

(71)申请人 北京倍肯恒业科技发展股份有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区兴昌路1号

(72)发明人 刘光中 姚世平 周轶 关苗
丁绍伟

(74)专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理有限公司 11279

代理人 王芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/559(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种纳米胶体金及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种免疫检测用纳米胶体金,并进一步公开其制备方法与应用。本发明所述纳米胶体金的制备方法,在现有一步还原法制备胶体金颗粒方法的基础上,通过增加稳定剂的方式,以改变氯金酸溶液的离子强度,并对氯金酸离子进行有效的稳定保护,而整个反应体系在高温煮沸条件下进行反应,反应液在高温下以及稳定剂的作用下,会缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金。本发明所述方法制备得到的胶体金,形成的胶体金颗粒尺寸均一、性能稳定,且几乎每批制备的胶体金颗粒大小、均匀度都一致,批间差异小,后续免疫检测的性能更为稳定。



1. 一种纳米胶体金的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 配制质量浓度0.5-1.5w/v%的氯金酸水溶液、质量浓度0.5-1.5w/v%的柠檬酸三钠水溶液、及摩尔浓度40-60mmol/L的稳定剂水溶液,备用;

(2) 将所述氯金酸水溶液、柠檬酸三钠水溶液、以及稳定剂水溶液加入至沸水中,并继续煮沸反应;

(3) 将上述反应液于常温放置,至形成晶核并增长为大粒径的胶体金,即得。

2. 根据权利要求1所述的纳米胶体金的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述稳定剂包括磷酸氢二钠、硼砂和/或碳酸钠。

3. 根据权利要求1或2所述的纳米胶体金的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述氯金酸水溶液的质量浓度为1.0w/v%,所述柠檬酸三钠水溶液的质量浓度为1.0w/v%,所述稳定剂水溶液的摩尔浓度为50mmol/L。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的纳米胶体金的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,以100mL总量计,所述反应体系包括:

氯金酸水溶液	0.8-1.5mL;
柠檬酸三钠水溶液	1-1.5mL;
稳定剂水溶液	2-10 μ L;
沸水余量。	

5. 根据权利要求4所述的纳米胶体金的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,以100mL总量计,所述反应体系包括:

氯金酸水溶液	1mL;
柠檬酸三钠水溶液	1.3mL;
稳定剂水溶液	6 μ L;
沸水余量。	

6. 根据权利要求1-5任一项所述的纳米胶体金的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述煮沸反应的时间为10-20min。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的纳米胶体金的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中,所述常温放置步骤的时间为10-16h。

8. 由权利要求1-7任一项所述方法制备得到的纳米胶体金。

9. 权利要求8所述的纳米胶体金用于制备胶体金免疫检测试剂条或试剂盒的用途。

10. 权利要求8所述的纳米胶体金在胶体金免疫检测领域中的应用。

一种纳米胶体金及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种免疫检测用纳米胶体金,并进一步公开其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 胶体金(colloidal gold),又称金溶胶(gold solution),是金盐被还原成金单质后形成的稳定、均匀、呈单一分散状态悬浮在液体中的金颗粒悬浮液。金溶胶颗粒由一个金原子及包围在外的双离子层构成,分散相粒子直径多在1-150nm之间。胶体金属于多相不均匀体系,颜色呈桔红色到紫红色。胶体金可以作为标记物用于免疫组织化学,近10多年来胶体金标记已经发展为一项重要的免疫标记技术。胶体金免疫分析在药物检测、生物医学等许多领域的研究已经得到发展,并越来越受到相关研究领域的重视。

[0003] 据研究,胶体金的形貌和尺寸会影响纳米粒子的性质,胶体金颗粒的形貌及尺寸的差异、以及电介质和表面吸附情况等不同均会导致粒子表面等离子共振(SPR)吸收峰位置发生改变。根据 Mie理论,由于球形金属纳米粒子只有一个SPR峰,可通过分析紫外-可见光吸收谱(UV-vis)的峰值强度、半波峰宽和吸收峰的位置来判断胶体金的性质,而且最大吸收波长取决于粒子的大小,半波峰的宽窄取决于粒子尺寸分布,半波峰越窄,表明粒子尺寸分布越窄,粒径均一。吸光值较高、峰形尖窄是单分散性纳米胶体金的象征。

[0004] 现有技术中,胶体金的制备多是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂(如白磷、抗坏血酸、乙醇、过氧化氢、枸橼酸钠和鞣酸等)作用下被一步还原成金原子而聚集形成的纳米金颗粒,并且多采用柠檬酸钠进行还原法,这些粒子由于静电排斥作用而在溶液中分散成为一种稳定的胶体状态,用还原法可方便地从氯金酸制备各种不同粒径、不同颜色的胶体金颗粒。这种颗粒对蛋白质有着很强的吸附作用,并已广泛用于医学检验的快速诊断领域。

[0005] 但是,由于一步法还原过程中,纳米金成核和连续生长均在一步中同时完成,易导致所得的胶体金颗粒尺寸大小不易控制,且胶体颗粒的粒径分布也不均匀,并且对制备条件要求也比较苛刻,易造成批间差异较大。而在实际应用中,制得胶体金纳米颗粒的形状不规则或粒径不均一,会导致连接待标记抗体或蛋白质后的胶体金很不稳定,标记结合物容易解离和沉淀而导致扩散不完全,使得反应区底色过深和假阳性现象,进而严重影响免疫检测的效果和准确性。

发明内容

[0006] 为此,本发明所要解决的技术问题在于提供一种纳米胶体金的制备方法,以解决现有技术中一步还原法制备纳米胶体金的方法存在制得胶体金颗粒尺寸大小不易控制、且胶体颗粒的粒径分布不均匀的问题;

本发明所要解决的第二个技术问题在于提供上述方法制备的纳米胶体金,所述纳米胶体金颗粒的尺寸大小易控制、且胶体颗粒的粒径分布更为均匀,用于免疫检测应用更为稳定。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明所述的一种纳米胶体金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 配制质量浓度0.5-1.5w/v%的氯金酸水溶液、质量浓度0.5-1.5w/v%的柠檬酸三钠水溶液、及摩尔浓度40-60mmol/L的稳定剂水溶液,备用;

(2) 将所述氯金酸水溶液、柠檬酸三钠水溶液、以及稳定剂水溶液加入至沸水中,并继续煮沸反应;

(3) 将上述反应液于常温放置,至形成晶核并增长为大粒径的胶体金,即得。

[0008] 所述步骤(1)中,所述稳定剂包括磷酸氢二钠、硼砂和/或碳酸钠。

[0009] 所述步骤(1)中,所述氯金酸水溶液的质量浓度为1.0w/v%,所述柠檬酸三钠水溶液的质量浓度为1.0w/v%,所述稳定剂水溶液的摩尔浓度为50mmol/L。

[0010] 具体的,所述步骤(2)中,以100mL总量计,所述反应体系包括:

氯金酸水溶液	0.8-1.5mL;
柠檬酸三钠水溶液	1-1.5mL;
稳定剂水溶液	2-10 μ L;
沸水余量。	

[0011] 有选的,所述步骤(2)中,以100mL总量计,所述反应体系包括:

氯金酸水溶液	1mL;
柠檬酸三钠水溶液	1.3mL;
稳定剂水溶液	6 μ L;
沸水余量。	

[0012] 所述步骤(2)中,所述煮沸反应的时间为10-20min。

[0013] 所述步骤(3)中,所述常温放置步骤的时间为10-16h。

[0014] 本发明还公开了由所述方法制备得到的纳米胶体金。

[0015] 本发明还公开了所述的纳米胶体金用于制备胶体金免疫检测试剂条或试剂盒的用途。

[0016] 本发明还公开了所述的纳米胶体金在胶体金免疫检测领域中的应用。

[0017] 本发明所述纳米胶体金的制备方法,在现有一步还原法制备胶体金颗粒方法的基础上,通过增加稳定剂的方式,以改变氯金酸溶液的离子强度,并对氯金酸离子进行有效的稳定保护,而整个反应体系在高温煮沸条件下进行反应,反应液在高温下以及稳定剂的作用下,会缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金。稳定剂的加入可有效改善柠檬酸钠还原法的反应环境,降低反应的需求条件,并有效降低还原反应的速度,有助于提高形成的纳米胶体金稳定性。

[0018] 本发明所述方法制备得到的胶体金,相比于传统方法所制备的胶体金颗粒,在颗粒球形度、粒径分布、批间差等方面均有较大的改进,形成的胶体金颗粒尺寸均一、性能稳定,且几乎每批制备的胶体金颗粒大小、均匀度都一致,批间差异小,后续免疫检测的性能更为稳定。

附图说明

[0019] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中,

图1为本发明实施例1制备的胶体金溶液的性状；
图2为本发明对比例1制备的胶体金溶液的性状；
图3为本发明应用例中试纸条的显色及特异性结果。

具体实施方式

[0020] 实施例1

本实施例所述纳米胶体金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 溶液配制

准确称取1.0g氯金酸粉末溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为1%(w/v)的 HAuCl_4 水溶液,将已配制好的的氯金酸溶液储存于棕色试剂瓶中,于4℃保存备用;

准确称取1.0g二水合柠檬酸三钠固体粉末,溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为1%(w/v)的 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 水溶液,经0.22 μm 滤膜过滤,于4℃保存备用;

准确称取710mg磷酸氢二钠固体粉末,溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为50mmol/L的稳定剂水溶液,经0.22 μm 滤膜过滤,于4℃保存备用;

(2) 准确移取 HAuCl_4 (1%) 水溶液1mL,并加入稳定剂水溶液6 μL ,以此改变氯金酸溶液的离子强度,并对氯金酸离子进行稳定保护;再加入 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (1%) 水溶液1.3mL,混合均匀,因有还原保护液且温度较低,短时间内不会产生还原反应,把混合液注入97.7ml沸水中,并继续沸腾反应15min;

(3) 将上述反应液于常温放置10-16小时,混合液在高温下以及还原保护液的作用下,缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金,即得。制得的胶体金溶液的性状见图1所示,目测可见,本发明方法烧制的胶体金溶液为透明的亮红色液体,且长期放置无凝结颗粒产生。

[0021] 实施例2

本实施例所述纳米胶体金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 溶液配制

准确称取1.0g氯金酸粉末溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为1%(w/v)的 HAuCl_4 水溶液,将已配制好的的氯金酸溶液储存于棕色试剂瓶中,于4℃保存备用;

准确称取1.0g二水合柠檬酸三钠固体粉末,溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为1%(w/v)的 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 水溶液,经0.22 μm 滤膜过滤,于4℃保存备用;

准确称取1.9g硼砂固体粉末,溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为50mmol/L的稳定剂水溶液,经0.22 μm 滤膜过滤,于4℃保存备用;

(2) 准确移取 HAuCl_4 (1%) 水溶液1mL,并加入稳定剂水溶液6 μL ,以此改变氯金酸溶液的离子强度,并对氯金酸离子进行稳定保护;再加入 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (1%) 水溶液1.3mL,混合均匀,因有还原保护液且温度较低,短时间内不会产生还原反应,把混合液注入97.7ml沸水中,并继续沸腾反应15min;

(3) 将上述反应液于常温放置10-16小时,混合液在高温下以及还原保护液的作用下,缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金,即得。

[0022] 实施例3

本实施例所述纳米胶体金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 溶液配制

准确称取1.0g氯金酸粉末溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为1%(w/v)的 HAuCl_4 水溶液,将已配制好的的氯金酸溶液储存于棕色试剂瓶中,于4℃保存备用;

准确称取1.0g二水合柠檬酸三钠固体粉末,溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为1%(w/v)的 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 水溶液,经0.22 μm 滤膜过滤,于4℃保存备用;

准确称取530mg碳酸钠固体粉末,溶于超纯水中,待完全溶解后加超纯水定容至100mL,配成终浓度为50mmol/L的稳定剂水溶液,经0.22 μm 滤膜过滤,于4℃保存备用;

(2) 准确移取 HAuCl_4 (1%) 水溶液1mL,并加入稳定剂水溶液6 μL ,以此改变氯金酸溶液的离子强度,并对氯金酸离子进行稳定保护;再加入 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (1%) 水溶液1.3mL,混合均匀,因有还原保护液且温度较低,短时间内不会产生还原反应,把混合液注入97.7ml沸水中,并继续沸腾反应15min;

(3) 将上述反应液于常温放置10-16小时,混合液在高温下以及还原保护液的作用下,缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金,即得。

[0023] 实施例4

本实施例所述的纳米胶体金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 按照实施例1中方法配制质量浓度0.5w/v%的氯金酸水溶液、质量浓度1.5w/v%的柠檬酸三钠水溶液、及摩尔浓度40mmol/L的磷酸氢二钠水溶液,备用;

(2) 将所述氯金酸水溶液0.8mL、柠檬酸三钠水溶液1mL、以及磷酸氢二钠水溶液2 μL 加入至沸水中(控制体系总量为100mL),并继续煮沸反应10min;

(3) 将上述反应液于常温放置10-16h,至缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金,即得。

[0024] 实施例5

本实施例所述的纳米胶体金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 按照实施例1中方法配制质量浓度1.5w/v%的氯金酸水溶液、质量浓度0.5w/v%的柠檬酸三钠水溶液、及摩尔浓度60mmol/L的硼砂水溶液,备用;

(2) 将所述氯金酸水溶液1.5mL、柠檬酸三钠水溶液1.5mL、以及磷酸氢二钠水溶液10 μL 加入至沸水中(控制体系总量为100mL),并继续煮沸反应20min;

(3) 将上述反应液于常温放置10-16h,至缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金,即得。

[0025] 实施例6

本实施例所述的纳米胶体金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 按照实施例1中方法配制质量浓度1.2w/v%的氯金酸水溶液、质量浓度0.8w/v%的柠檬酸三钠水溶液、及摩尔浓度50mmol/L的碳酸钠水溶液,备用;

(2) 将所述氯金酸水溶液1.5mL、柠檬酸三钠水溶液1mL、以及碳酸钠水溶液8 μL 加入至沸水中(控制体系总量为100mL),并继续煮沸反应15min;

(3) 将上述反应液于常温放置10-16h,至缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的

胶体金,即得。

[0026] 对比例1

本对比例所述胶体金的制备方法采用现有技术中一步还原法进行制备,其制备过程与实施例1相同,其区别仅在于不加入所述稳定剂水溶液。制得的胶体金溶液的性状见附图2所示。目测可见,图1中所示的由本发明方法烧制的胶体金溶液较图2所示的传统方法烧制的胶体金溶液澄清度更高,更透亮且均一性更好。

[0027] 对比例2

本对比例所述胶体金的制备方法采用现有技术中一步还原法进行制备,其制备过程与实施例2相同,其区别仅在于不加入所述稳定剂水溶液。

[0028] 对比例3

本对比例所述胶体金的制备方法采用现有技术中一步还原法进行制备,其制备过程与实施例3相同,其区别仅在于不加入所述稳定剂水溶液。

[0029] 实验例

分别对上述实施例1-3及对比例1-3中制备得到的胶体金颗粒进行常规的性能检测。

[0030] 经400-600nm下分光光度扫描可以得到胶体金的最大吸收峰波长,由最大吸收峰波长与粒径存在的线性关系 $Y=0.4271X+514.56$ (Y为最大吸收峰波长,X为平均粒径)可得到平均粒径,由相对峰宽峰宽/峰高可知道胶体金粒径大小的均一度。

[0031] 具体检测结果见下表1所示。

[0032] 表1胶体金颗粒的性能检测结果

编号	MAX	OD1	MAX+60	OD2	OD1/OD2
实施例1	520.6	0.993	580.6	0.286	3.42
实施例2	520.2	0.976	580.2	0.277	3.52
实施例3	520.6	0.943	580.6	0.239	3.95
对比例1	523	1.007	583	0.384	2.6
对比例2	520.6	0.952	580.6	0.344	2.78
对比例3	518.5	0.874	578.5	0.292	2.99

从上表数据可见,本发明所述方法制备得到的胶体金,相比于传统方法所制备的胶体金颗粒,在颗粒球形度、粒径分布、批间差等方面均有较大的改进,形成的胶体金颗粒尺寸均一、性能稳定,且几乎每批制备的胶体金颗粒大小、均匀度都一致,批间差异小,后续免疫检测的性能更为稳定。

[0033] 应用例

本应用例中使用实施例1中方法烧制的胶体金溶液进行标记实验,制备伏马毒素快速检测试纸条。

[0034] K 吸取1ml本发明方法制备的胶体金溶液于离心管中,根据标记蛋白的要求,以0.1Mol/L Na_2CO_3 调节胶体金溶液至标记所用的pH值,将标记蛋白加入到胶体金溶液中,颠倒混匀2h,后加入一定量的封闭剂进行封闭,继续反应30min;将标记好的胶体金-蛋白溶液于4℃、14000g离心20min,将上清液吸出,剩余沉淀用复溶液重悬为原体积的1/20后备用;将重悬液按照适宜的使用比例进行稀释,准确加样于制备好的测试条金垫位置,进行实验,观察显色情况及特异性,实验结果如图3所示。

[0035] 上述实验结果表明,使用该本发明方法烧制的胶体金溶液,烧制过程中加入的稳定剂成分,在后续的使用过程中,对标记效果没有影响,且最终制得的产品性能良好且稳定。

[0036] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。



图1



图2



图3

专利名称(译)	一种纳米胶体金及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109490522A	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN201811473855.0	申请日	2018-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	北京倍肯恒业科技发展股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京倍肯恒业科技发展股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京倍肯恒业科技发展股份有限公司		
[标]发明人	刘光中 姚世平 周轶 丁绍伟		
发明人	刘光中 姚世平 周轶 关苗 丁绍伟		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/559 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/553 G01N33/559		
代理人(译)	王芳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫检测技术领域，具体涉及一种免疫检测用纳米胶体金，并进一步公开其制备方法与应用。本发明所述纳米胶体金的制备方法，在现有一步还原法制备胶体金颗粒方法的基础上，通过增加稳定剂的方式，以改变氯金酸溶液的离子强度，并对氯金酸离子进行有效的稳定保护，而整个反应体系在高温煮沸条件下进行反应，反应液在高温下以及稳定剂的作用下，会缓慢稳定的形成晶核并慢慢增长为大粒径的胶体金。本发明所述方法制备得到的胶体金，形成的胶体金颗粒尺寸均一、性能稳定，且几乎每批制备的胶体金颗粒大小、均匀度都一致，批间差异小，后续免疫检测的性能更为稳定。

