



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104880496 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201510066627. 1

(22) 申请日 2015. 02. 07

(71) 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区学源街

(72) 发明人 潘家荣 陈成益 周聃

(74) 专利代理机构 四川君士达律师事务所

51216

代理人 苟忠义

(51) Int. Cl.

G01N 27/30(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

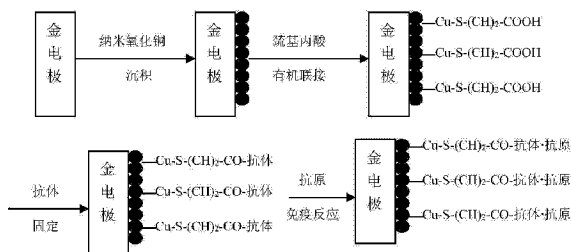
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,本发明利用沉积法将氧化铜纳米固定在金电极表面上,再通过单层分子膜技术,把呋喃唑酮代谢物AOZ抗体固定,制备免疫传感元件,本发明的传感元件可测定1×10⁻³-1×10² μg/mL浓度范围内呋喃唑酮及其代谢物AOZ,其他类似物的交叉反应率均小于1%,标准曲线方程为ΔE = 0.2931lg(c)+1.1079(R2 = 0.9989**),检出限约为0.0005 μg/mL,回收率约90%。同时,该传感元件变异性小,可保持40-50天,稳定性好。由于该方法具有灵敏、方便、检测时间短等优点,非常适用于样品的早期筛选以及现场检测。



1. 一种基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,其特征在于:所述方法的具体步骤如下:

(1) 用 0.1mol/L NaOH 和 0.1mol/L HNO₃ 分别淋洗金电极三次,每次 1min,再置于新鲜配制的 piranha 溶液,浸泡 30min;

(2) 取出金电极,超纯水淋洗 1min,置于超纯水中超声清洗 3min,无水乙醇中超声清洗 3min,重复 3 次;

(3) 依次用 0.3 μm 和 0.05 μm Al₂O₃ 粉末抛光至呈镜面后,金电极置于 piranha 溶液,浸泡 30min,重复步骤 (2),然后用高纯氮吹干金电极表面;

(4) 用无水乙醇溶解氧化铜纳米材料成 0.5mg/mL,滴加氧化铜纳米乙醇溶液于金电极上,用氮气吹干后得到氧化铜纳米 / 金电极;把金电极浸于三巯基丙酸溶液中温育 12h,依次用超纯水、无水乙醇淋洗三次,每次 1min,然后用高纯氮吹干金电极表面,即为 MPA/ 氧化铜纳米 / 金电极,然后将金电极浸于碳二亚胺盐酸盐溶液和 N- 羟基琥珀亚胺溶液的混合液中 12h 后,用超纯水淋洗 3min,再将金电极浸于含有 0.3mg/mL AOZ 抗体的磷酸缓冲液中,4℃ 过夜,最后用超纯水清洗,高纯氮吹干金电极表面,即为 AOZ 抗体 /MPA/ 氧化铜纳米 / 金电极。

2. 如权利要求 1 所述的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (1) 和步骤 (3) 中,所述的 piranha 溶液是由 30wt% 的 H₂O₂ 和浓硫酸组成,两者的体积比为 1:3。

3. 如权利要求 1 所述的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的氧化铜纳米材料的制备方法如下:配制 0.1mol/L 的 Cu(NO₃)₂·H₂O 溶液 50mL,向溶液中加入 0.02mol/L 的十二烷基磺酸钠溶液 5mL,搅拌,然后用 2mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 10,将溶液置于 75℃ 的水浴环境中反应 12h,待反应完成后将溶液离心分离,用蒸馏水和无水乙醇分别洗涤沉淀 3 次,产物在 60℃ 下干燥 4h,即为纳米氧化铜。

4. 如权利要求 1 所述的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的三巯基丙酸溶液的浓度为 0.1mol/L。

5. 如权利要求 1 所述的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的碳二亚胺盐酸盐溶液和 N- 羟基琥珀亚胺溶液的浓度均为 0.1mol/L,混合液中两者的体积比为 1:1。

6. 如权利要求 1 所述的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的 AOZ 抗体的制备方法如下:选取两只新西兰大白兔,背部皮下多点注射 500 μg AOZ-BSA,其中 AOZ-BSA 用生理盐水稀释,加等体积的完全弗氏佐剂充分乳化,在 15d,再次注射相同剂量经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,29d、39d 和 49d,注射 250 μg 经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,59d 后,耳静脉取血,测定抗体效价和特异性,效价合适后,心脏完全取血,分离及纯化抗血清。

7. 如权利要求 1 所述的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的磷酸缓冲液的 pH 为 7.4。

8. 如权利要求 1-7 任一项所述的方法制备的传感元件用于检测食品中呋喃唑酮及其代谢物的用途。

一种基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学技术领域,尤其涉及一种基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法。

背景技术

[0002] 呋喃唑酮(又名痢特灵,Furazolidone,FZ),化学名为N-(5-硝基-2-糠基-3-氨基)-2-噁唑烷酮[N-(5-nitro-furfurylidene-3-amino)-2-oxazolidinone],属于硝基呋喃类抗生素药物,是一种人工合成的具有较广抗菌谱的药物,它能够有效抑制常见的革兰氏阴性菌和阳性菌,以及部分原虫、真菌。二十世纪,呋喃唑酮作为兽药,广泛应用于食用动物预防和治疗胃肠道感染。但是由于呋喃唑酮具有致癌性和致突变性,尤其是其代谢物3-氨基-2-噁唑烷酮(Furazolidone 3-amino-2-oxazolidinone,AOZ),毒性和稳定性比呋喃唑酮更强,世界很多国家就完全禁止在食用动物中使用。在我国,最新的《动物性食品中兽药最高残留限量》,呋喃唑酮被列为“禁止使用的药物,在动物性食品中不得检出”。但因呋喃唑酮的药效性高、价格便宜,其使用却屡见不止,在动物源性食品,尤其是水产品中屡屡发现呋喃唑酮及其代谢物的残留。2003年,欧盟通过食品和饲料快速预警系统告知其成员国在从多国进口的水产品中检测出AOZ。2006年,上海市食品药品监督管理局发布严重消费预警指示,在对多宝鱼的专项抽检中,30多件多宝鱼样品硝基呋喃类药物残留全部超标。

[0003] 呋喃唑酮及其代谢物AOZ的检测,其主要方法是仪器分析方法,诸如HPLC、MS、LC-MS和HPLC-MS/MS等。但其存在耗时长、仪器昂贵、操作专业等,远远不能满足我国市场快速检测的需求。同时AOZ的检测,往往需要对AOZ进行衍生化,使得前处理更为复杂,更难控制。许多学者建立了许多免疫检测技术。

[0004] 近年来,由于免疫传感器技术具有分析速度快、可信度高、适合样品初级筛选检测等优点,许多学者研究纷纷研究农药、兽药和抗生素等小分子的免疫传感器检测方法。而电化学免疫传感器是免疫传感器中最早研究、最多种类、比较成熟的一个分支,具有灵敏度高、检测费用低、灵活快捷等优点,其关键技术是抗体固定,即把抗体固定在电极上制备高灵敏的免疫传感元件。

发明内容

[0005] 本发明的目的是发挥纳米材料表面积大的优势,制备氧化铜纳米-巯基丙酸复合膜,建立一种高灵敏的食品中呋喃唑酮及其代谢物的电化学传感检测技术,将电化学免疫传感器应用于食品中呋喃唑酮及其代谢物的痕量检测,具有较大的现实意义。

[0006] 本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法的具体步骤如下:

[0008] (1)用0.1mol/L NaOH和0.1mol/L HNO₃分别淋洗金电极三次,每次1min,再置于新鲜配制的piranha溶液,浸泡30min;

[0009] (2) 取出金电极,超纯水淋洗 1min,置于超纯水中超声清洗 3min,无水乙醇中超声清洗 3min,重复 3 次;

[0010] (3) 依次用 0.3 μm 和 0.05 μm Al_2O_3 粉末抛光至呈镜面后,金电极置于 piranha 溶液,浸泡 30min,重复步骤 (2),然后用高纯氮吹干金电极表面;

[0011] (4) 用无水乙醇溶解氧化铜纳米材料成 0.5mg/mL,滴加氧化铜纳米乙醇溶液于金电极上,用氮气吹干后得到氧化铜纳米 / 金电极;把金电极浸于三巯基丙酸溶液中温育 12h,依次用超纯水、无水乙醇淋洗三次,每次 1min,然后用高纯氮吹干金电极表面,即为 MPA/氧化铜纳米 / 金电极,然后将金电极浸于碳二亚胺盐酸盐溶液和 N-羧基琥珀亚胺溶液的混合液中 12h 后,用超纯水淋洗 3min,再将金电极浸于含有 0.3mg/mL AOZ 抗体的磷酸缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,最后用超纯水清洗,高纯氮吹干金电极表面,即为 AOZ 抗体 / MPA/氧化铜纳米 / 金电极。

[0012] 步骤 (1) 和步骤 (3) 中,所述的 piranha 溶液是由 30wt% 的 H_2O_2 和浓硫酸组成,两者的体积比为 1:3。

[0013] 步骤 (4) 中,所述的氧化铜纳米材料的制备方法如下:配制 0.1mol/L 的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液 50mL,向溶液中加入 0.02mol/L 的十二烷基磺酸钠溶液 5mL,搅拌,然后用 2mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 10,将溶液置于 75 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴环境中反应 12h,待反应完成后将溶液离心分离,用蒸馏水和无水乙醇分别洗涤沉淀 3 次,产物在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥 4h,即为纳米氧化铜。

[0014] 步骤 (4) 中,所述的三巯基丙酸 (MPA) 溶液的浓度为 0.1mol/L。

[0015] 步骤 (4) 中,所述的碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 溶液和 N-羧基琥珀亚胺 (NHS) 溶液的浓度均为 0.1mol/L,混合液中两者的体积比为 1:1。

[0016] 步骤 (4) 中,所述的 AOZ 抗体的制备方法如下:选取两只新西兰大白兔,背部皮下多点注射 500 μg AOZ-BSA,其中 AOZ-BSA 用生理盐水稀释,加等体积的完全弗氏佐剂充分乳化,在 15d,再次注射相同剂量经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,29d、39d 和 49d,注射 250 μg 经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,59d 后,耳静脉取血,测定抗体效价和特异性,效价合适后,心脏完全取血,分离及纯化抗血清。

[0017] 步骤 (4) 中,所述的磷酸缓冲液的 pH 为 7.4。

[0018] 本发明的方法制备的传感元件可以用于检测食品中呋喃唑酮及其代谢物。

[0019] 本发明的积极效果如下:

[0020] 本发明的方法制备的传感元件可测定 1×10^{-3} – 1×10^2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呋喃唑酮及其代谢物 AOZ,其他类似物的交叉反应率均小于 1%,标准曲线方程为 $\Delta E = 0.29311g(c) + 1.1079$ ($R^2 = 0.9989^{**}$),检出限约为 0.0005 $\mu\text{g}/\text{ml}$,回收率约 90%。同时,该传感元件变异性小,可保持 40–50 天,稳定性好。由于该方法具有灵敏、方便、检测时间短等优点,非常适用于样品的早期筛选以及现场检测。

附图说明

[0021] 图 1 是本发明的基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件检测的原理的示意图。

[0022] 图 2 是各种修饰电极的循环伏安图;

[0023] a. 裸金电极;b. 氧化铜纳米 / 金电极;c. MPA 氧化铜纳米 // 金电极;d. AOZ 抗体 /

MPA 氧化铜纳米 // 金电极。

[0024] 图 3 是不同 CPAOZ 浓度下响应值 ΔE 的变化图。

[0025] 图 4 是 CPAOZ 电化学免疫传感测定标准曲线图。

具体实施方式

[0026] 下面的实施例是对本发明的进一步详细描述。

[0027] 实施例 1

[0028] 1 材料与amp;方法

[0029] 1.1 仪器与试剂

[0030] CHI400 系列电化学石英晶体微天平 (上海辰华仪器有限公司), $0.3 \mu\text{m}$ 和 $0.05 \mu\text{m}$ Al_2O_3 抛光打磨仪 (上海辰华仪器有限公司), 氮气吹扫仪 (杭州奥盛仪器有限公司), Z50 达尔文纳米粒度仪。AOZ 多克隆抗体 (本实验室制备)。硝酸铜、三巯基丙酸 (MPA)、碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀亚胺 (NHS)、AOZ (AOZ, 标准品), AOZ、CPAOZ、呋喃妥因、呋喃它酮、呋喃西林、2-硝基苯甲醛、对醛基苯甲酸等标准品, 均购自阿拉丁公司。磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 等其余试剂均为分析纯, 购自杭州高晶精细化工有限公司。虾仁购自杭州下沙物美超市。

[0031] 1.2 试验方法

[0032] 1.2.1 基于纳米氧化铜 - 巯基丙醇复合膜的传感元件制备

[0033] (1) 氧化铜纳米材料的制备

[0034] 配制 0.1mol/L 的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液 50mL , 向溶液中加入 0.02mol/L 的十二烷基磺酸钠溶液 5mL , 搅拌, 然后用 2mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 10, 将溶液置于 75°C 的水浴环境中反应 12h , 待反应完成后将溶液离心分离, 用蒸馏水和无水乙醇分别洗涤沉淀 3 次, 产物在 60°C 下干燥 4h , 即为纳米氧化铜。用 Z50 达尔文纳米粒度仪测定粒子的直径分布。

[0035] (2) 传感元件制备

[0036] 依靠自组装单层膜 (SAMs) 技术, 利用巯基丙酸的巯基与沉积在金电极上的氧化铜纳米形成 Cu-S 键, 其羧基与抗体偶联, 从而将抗体固定在金电极表面。具体方法如下: ①用 0.1mol/L NaOH 和 0.1mol/L HNO_3 分别淋洗金电极三次, 每次 1min , 再置于新鲜配制的 piranha 溶液 ($30\% \text{H}_2\text{O}_2$: 浓硫酸 = 1:3), 浸泡 30min 。②取出金电极, 超纯水淋洗 1min , 置于超纯水中超声清洗 3min , 无水乙醇中超声清洗 3min 。重复 3 次。③依次用 $0.3 \mu\text{m}$ 和 $0.05 \mu\text{m}$ Al_2O_3 粉末抛光至呈镜面后, 金电极置于 piranha 溶液, 浸泡 30min 。重复步骤②, 高纯氮吹干金电极表面。④用无水乙醇溶解氧化铜纳米成 0.5mg/mL 。滴加适量氧化铜纳米乙醇溶液于金电极上, 用氮气吹干后得到氧化铜纳米 / 金电极; 把金电极浸于 MPA 溶液 (0.1mol/L) 中温育 12h , 依次用超纯水、无水乙醇淋洗三次, 每次 1min 。高纯氮吹干金电极表面, 即为 MPA / 氧化铜纳米 / 金电极。然后将金电极浸于 0.1mol/L NHS 和 0.1mol/L EDC 的 1:1 混合液中 12h 后, 用超纯水淋洗 3min 。再将金电极浸于 0.3mg/mL AOZ 抗体溶液 (PBS, pH7.4), 4°C 过夜。最后用超纯水小心清洗, 高纯氮吹干金电极表面, 即为 AOZ 抗体 / MPA / 氧化铜纳米 / 金电极。

[0037] 1.2.2 电化学表征

[0038] 以 CHI400 传感器, 分别以裸金电极、氧化铜纳米 / 金电极、MPA / 氧化铜纳米 / 金

电极和 AOX 抗体 /MPA/ 氧化铜纳米 / 金电极为工作电极, 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 以铂丝电极为辅助电极, 在 $0.001\text{mol/L Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ 的 PBS (pH7.4) 溶液中, 进行电位扫描, 扫描速度为 10mV/s , 电位范围为 $-0.2 \sim 0.6\text{V}$ 。获得各种金电极的循环伏安曲线。

[0039] 1.2.3 电位响应

[0040] 电化学免疫传感器测定方法: 以修饰有 AOX 抗体的金电极为工作电极, 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 三种电极均插入含 $0.001\text{mol/L Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ 的 PBS (pH7.4) 溶液中, 测出稳态时的空白电位, 记为 E_0 。然后将工作电极分别插入 100 、 10 、 1 、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 和 $1 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL CPAOX}$ 标准溶液, 待其充分反应后, 用超纯水小心清洗, 高纯氮吹干金电极表面, 再与参比电极和辅助电极插入 $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ 溶液中, 分别记录下稳态时的电位, 记为 $E_n (N = 1, 2, 3 \dots)$ 。电位差 $\Delta E (\Delta E = E_n - E_0)$, 作为对不同浓度 AOX 标准溶液的响应值。以 AOX 标准溶液浓度的对数值为横坐标, 以响应值 ΔE 为纵坐标, 建立 AOX 对数标准曲线。

[0041] 1.2.4 免疫传感器的电位响应性能以及检出限的确定

[0042] 修饰有 AOX 抗体的金电极对不含 AOX 的 PBS 溶液 ($1\text{mmol/L K}_3[\text{Fe(CN)}_6]$) 重复测试 20 次。按下式计算检测限^[22]:

$$[0043] \text{LOD} = \sigma / D$$

[0044] 其中 σ 为空白测定响应值 ΔE 的标准偏差 σ , 即为噪音值; D 为标准曲线的斜率。

[0045] 1.2.5 免疫传感器回收率的确定

[0046] 取市售活虾去皮去头去脚, 捣碎, 称取 50g , 加入 200mL 蒸馏水用匀浆机匀浆, 在 8000r/min 转速下离心 15min , 过滤得虾浆液。

[0047] 用固定有 AOX 抗体的电极对含有已知浓度的 CPAOX (根据标准曲线选取低中高 3 个浓度) 的虾浆液进行测量, 将得到的电极电位响应值代入拟合曲线中得出对应的呋喃唑酮、AOZ 浓度, 为呋喃唑酮、AOZ 浓度的测量值, 再根据公式: 加标回收率 = 测量值 / 真实值 $\times 100\%$ 计算出回收率。

[0048] 1.2.6 免疫传感器的稳定性测定

[0049] 将修饰有抗体的电极置于 37°C 温度下 (所用试剂在 37°C 存放 24h 相当于在 4°C 存放 45d) 每隔 24h 进行电化学传感测定。阳性样品为虾浆液中加入 $10 \mu\text{g/mL CPAOX}$, 阴性样品为虾浆液。测定电势响应值, 计算 ΔE , 以 $\Delta E_{\text{阴}} / \Delta E_{\text{阳}} \geq 2.1$ 为有效; $1.5 < \Delta E_{\text{阴}} / \Delta E < 2.1$ 为可疑; $\Delta E_{\text{阴}} / \Delta E < 1.5$ 为失效^[19]。

[0050] 1.2.7 免疫传感器特异性的测定

[0051] 选用与呋喃唑酮具有类似结构的 CPAOX、AOZ、呋喃妥因、呋喃它酮、呋喃西林、2-硝基苯甲醛、对醛基苯甲酸等作为研究对象, 以确定所制备的呋喃唑酮电化学免疫传感器是否具有特异性。用修饰有 AOX 抗体的电极分别对含有已知浓度 (100 、 10 、 1 、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 和 $1 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$) 的 AOX 结构类似物进行检测, 计算交叉反应率。计算方法为:

[0052]

1/2 ΔE_{max} 的类似物浓度

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{类似物浓度}}{\text{AOZ 浓度}} \times 100\%$$

1/2 ΔE_{max} 的 AOZ 浓度

[0053] 2 结果与讨论

[0054] 2.1 氧化铜纳米的粒径分布

[0055] 采用 Z20 马尔文纳米粒度仪测定了氧化铜纳米粒径分布,氧化铜纳米粒径符合正态分布,约 85% 分布于 50-100 μm ,95% 分布于

[0056] 25-120 μm 。

[0057] 2.2 电化学表征

[0058] 利用循环伏安法分别对 4 种电极 (金电极、氧化铜纳米 / 金电极、MPA / 氧化铜纳米 / 金电极和 AOZ 抗体 / MPA / 氧化铜纳米 / 金电极) 进行扫描,结果如图 2 所示。从图中可以看出,曲线 a 是裸金电极循环伏安图,峰电流为 5.53 μA 。曲线 b 是氧化铜纳米 / 金电极循环伏安图,峰电流明显升高,达到 6.66 μA ,说明氧化铜纳米沉积在金电极表明后,金属表面积增大,有效截面积增大,电荷交换增多。曲线 c 是 MPA / 氧化铜纳米 / 金电极循环伏安图,峰电流约为 5.25 μA ,明显低于曲线 b,说明裸金电极沉淀氧化铜纳米后虽然电流增强,但由于共价结合了 MPA,在表面形成单分子层,妨碍了氧化铜纳米表面与的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ 溶液电荷交换,峰电流明显减小。曲线 d 是 AOZ 抗体 / MPA / 氧化铜纳米 / 金电极循环伏安图,峰电流为 4.75 μA ,又明显低于曲线 c,说明抗体固定成功,因为裸金电极表面覆盖了一层 MPA 单分子层后,有效截面积减小,导致电流减小。而偶联上 AOZ 抗体后,金电极表面就覆盖了一层大分子物质,更进一步阻止金电极与 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ 溶液电荷交换,导致电流进一步减小。

[0059] 2.3 免疫传感器对游离抗原的电位响应

[0060] 分别把工作电极依次插入浓度在 1000、100、10、1、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 和 1×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ 浓度 CPAOZ 标准溶液的梯度溶液,分别测定其电位,与空白对照电位之差记为响应值 ΔE 。 ΔE 对浓度对数作图见图 3。从结果看出,在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,免疫传感器对呋喃唑酮均有电位相应,响应值 ΔE 与 CPAOZ 浓度之间显“S”型关系。但在 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^2$ $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,响应值 ΔE 与 CPAOZ 浓度之间显线性关系,可作标准曲线图,如图 4,标准曲线方程为

$$[0061] \quad \Delta E = 0.29311g(c) + 1.1079 (R^2 = 0.9989)**$$

[0062] 2.4 免疫传感器检出限

[0063] 修饰有 AOZ 抗体的金电极对不含 AOZ 的 PBS 溶液 (1mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 重复测试 20 次,计算出响应值 ΔE 的标准偏差为 0.0006V,即为噪音值。以三倍噪音值作为信号响应^[24],即 0.0018V。将其代入标准曲线方程,计算出检测限约为 0.0005 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0064] 2.5 回收率

[0065] 从表 1 可知,在添加 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ CPAOZ 条件下,虾仁的加标平均回收率分别为 89.62%、91.33% 和 90.16%,符合检测技术要求 (75 ~ 120%),在理想回收率 (90 ~ 105%) 范围之内。

[0066] 表 1 样品的回收率测定

[0067]

加标水平 ($\mu\text{g/mL}$)	虾仁 平均回收率 (%)
0.05	89.62
1	91.33
10	90.16

[0068] 2.6 重复性

[0069] 配制浓度为 0.1、1 和 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 CPAOZ 标准液进行酶联免疫测定, 每个浓度做 6 个平行组, 计算其变异系数。结果见表 2, 得出该试剂和变异系数小, 精确度较高, 适合检测。

[0070] 表 2 变异系数测定

[0071]

加标水平 ($\mu\text{g/mL}$)	变异系数 (%)
0.1	3.21
1	4.72
2	3.84
平均值 CV	3.92

[0072] 2.7 免疫传感器稳定性

[0073] 电化学传感器作为一种快速检测方法, 其稳定性是方法评估的重要指标之一, 更是影响应用的重要因素。本方法中金电极表面的单分子层和抗体活性能否长时间保持, 极大影响了稳定性。将修饰了 AOZ 抗体的金电极密封后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 每隔 10 天对 0.10 $\mu\text{g/mL}$ AOZ 标准溶液进行检测。在第 40 天时, 响应值 ΔE 为最初的 90.7%; 第 50 天时, 响应值 ΔE 为最初的 88.5%。因此, 40 天以内该电极仍保持良好性能。

2.8 免疫传感器特异性

[0074] 用修饰有 AOZ 抗体的金电极分别测试了 CPAOZ、AOZ、呋喃唑酮、呋喃妥因、呋喃它酮、呋喃西林、2-硝基苯甲醛、对醛基苯甲酸等药物的交叉反应率, 结果表 3 所示。结果表明, 除 AOZ、CPAOZ 和呋喃唑酮外, 其他类似物的交叉反应率均小于 1%, 说明该抗体特异性强。

[0075] 表 3 各类分析物的交叉反应率

[0076]

分析物	交叉反应率 (%)	分析物	交叉反应率 (%)
AOZ	100	呋喃唑酮	<87
CPAOZ	100	对醛基苯甲酸	<0.01
AHD	<0.1	呋喃妥因	<0.2
SEM	<0.01	呋喃西林	<0.05
AMAZ	<1	呋喃它酮	<0.1
2-硝基苯甲醛	<0.01		

[0077] 2.9 传感器再生

[0078] 利用抗原与抗体的结合具有可逆性,即在一定条件(低 pH、高浓度盐)下可以实现抗原抗原解离,实现免疫电极再生。将测试后的电极分别在甘氨酸-HCl 缓冲溶液 (pH2.4) 和 7mol/L 尿素溶液这两种解离剂中,浸浴 30min。取出,用超纯水清洗,高纯氮吹干金电极表面。结果表明,甘氨酸-HCl 缓冲溶液 (pH2.4) 可以再生使用 6~8 次,7mol/L 尿素溶液可以再生使用 10~12 次。再生后的免疫电极测试时电位仍然较低,可用 piranha 溶液清洗金电极,重新偶联抗体,实现免疫电极再生。

[0079] 3 结论

[0080] 近年来,凭借自身优势,免疫传感器广泛应用于农药残留检测是一大趋势。所研制的 AOZ 电化学免疫传感器,检测范围:

[0081] 0.05~5 $\mu\text{g/mL}$, 检测限:0.042 $\mu\text{g/mL}$ 。虽然我国暂无 AOZ 残留限量要求,但是本方法的检测限远远低于欧美等国最低限量要求 (100 $\mu\text{g/kg}$),与日本要求相当。此外,本方法重现性好、稳定性高、回收率高,适用于 AOZ 残留的检测。我国暂时缺少 AOZ 限量要求的立法,但是加强 AOZ 的监管势在必行。本发明所研制的 AOZ 电化学传感元件具有灵敏、方便、检测时间短等优点,非常适用于样品的早期筛选以及现场检测。这不仅弥补了现有 AOZ 检测方法的不足之处,更有利于我国加强对 AOZ 残留监测的监管。

[0082] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

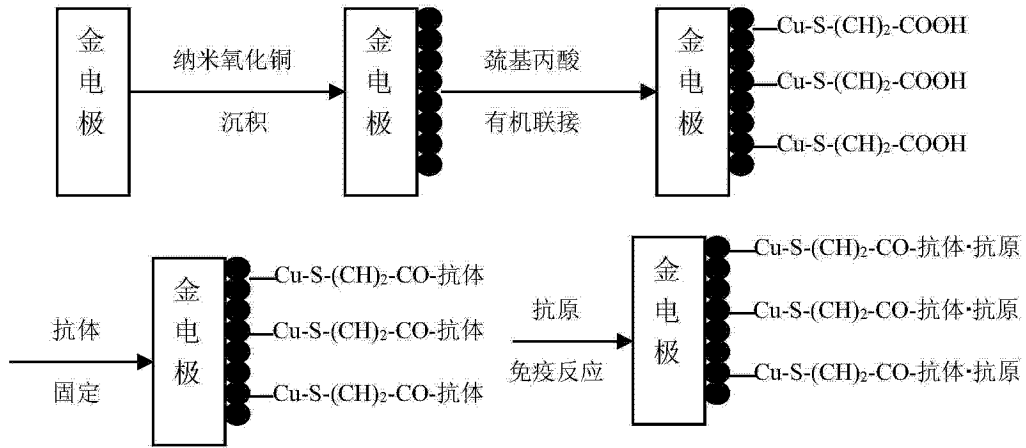


图 1

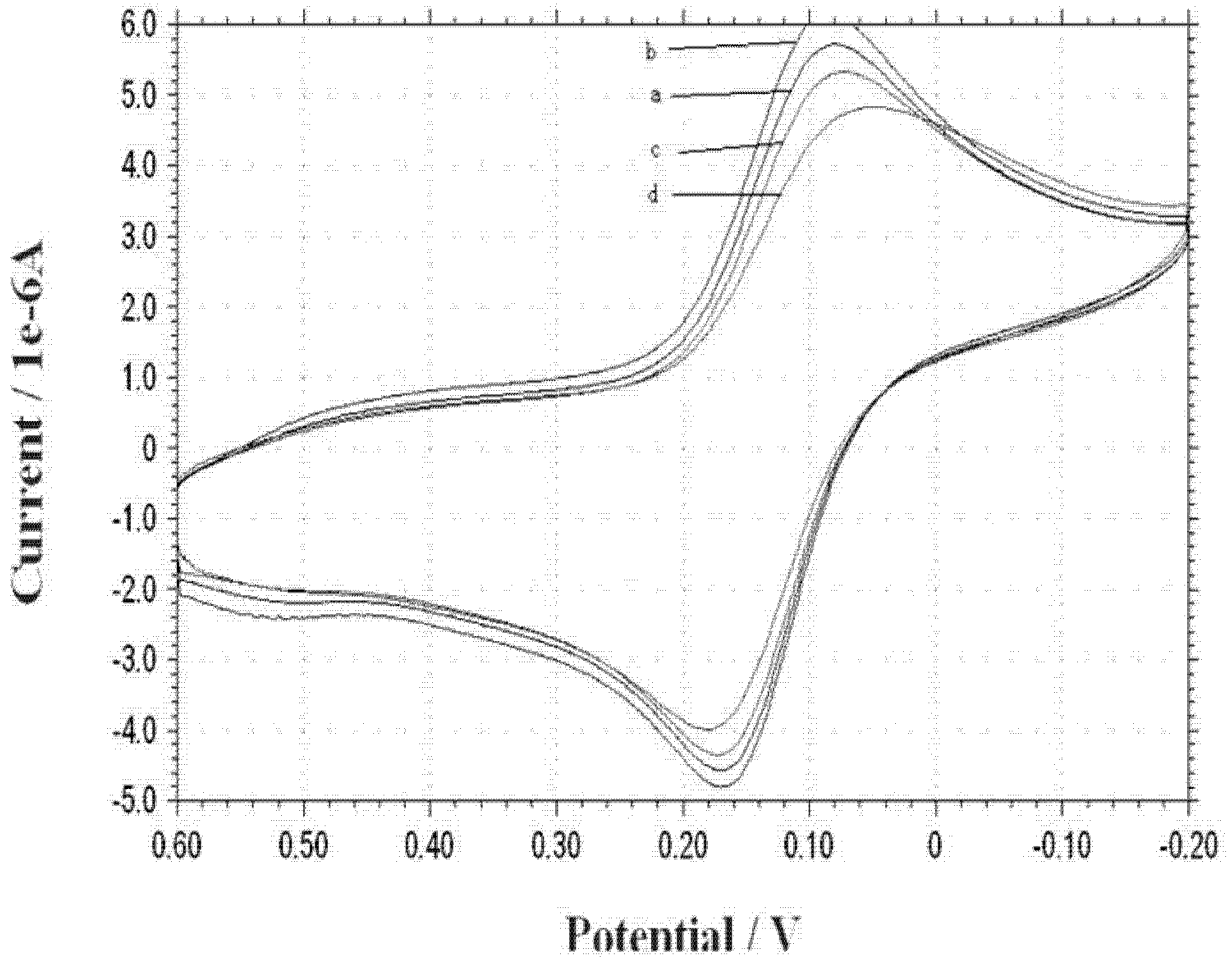


图 2

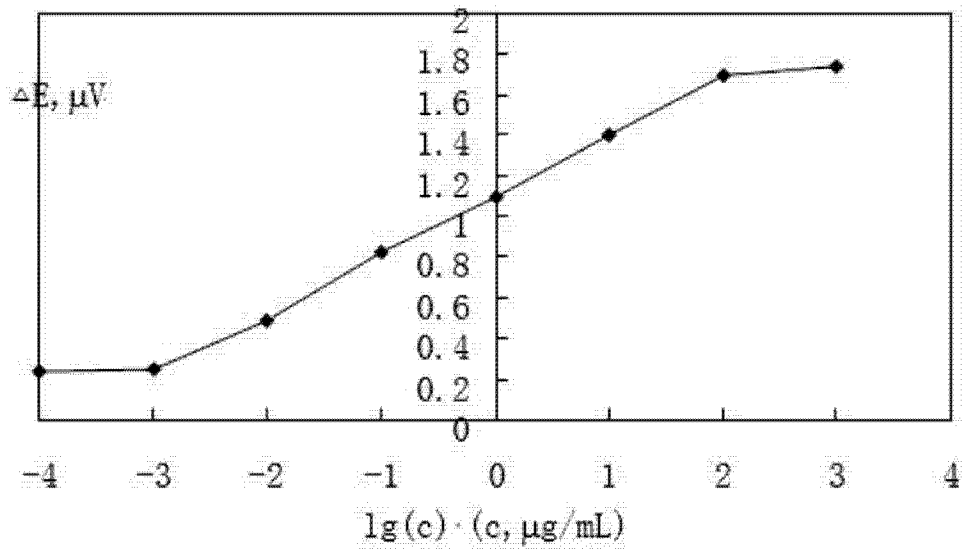


图 3

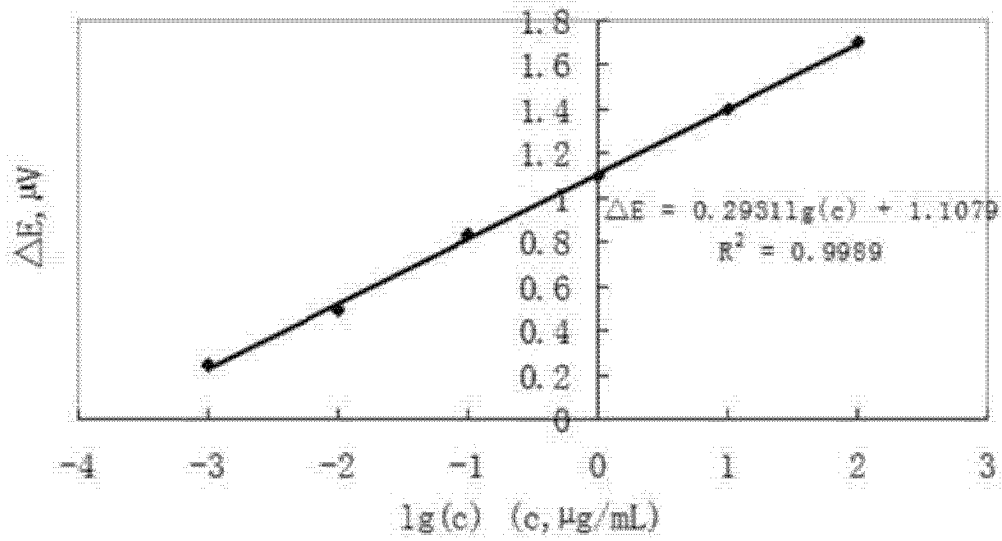


图 4

专利名称(译)	一种基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法		
公开(公告)号	CN104880496A	公开(公告)日	2015-09-02
申请号	CN20151006627.1	申请日	2015-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
[标]发明人	潘家荣 陈成益 周聃		
发明人	潘家荣 陈成益 周聃		
IPC分类号	G01N27/30 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于纳米氧化铜和单层分子膜的传感元件的制备方法，本发明利用沉积法将氧化铜纳米固定在金电极表面上，再通过单层分子膜技术，把咪唑啉酮代谢物AOZ抗体固定，制备免疫传感元件，本发明的传感元件可测定 1×10^{-3} - $1 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内咪唑啉酮及其代谢物AOZ，其他类似物的交叉反应率均小于1%，标准曲线方程为 $\Delta E = 0.2931 \lg(c) + 1.1079$ ($R^2 = 0.9989^{**}$)，检出限约为 $0.0005 \mu\text{g/ml}$ ，回收率约90%。同时，该传感元件变异性小，可保持40-50天，稳定性好。由于该方法具有灵敏、方便、检测时间短等优点，非常适用于样品的早期筛选以及现场检测。

