



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109142703 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201710506200.8

(22)申请日 2017.06.28

(71)申请人 南京理工大学

地址 210094 江苏省南京市孝陵卫200号

(72)发明人 宋继中 董宇辉 唐晓倩 韩博宁

薛洁 曾海波 张兆威

(74)专利代理机构 南京理工大学专利中心

32203

代理人 刘海霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

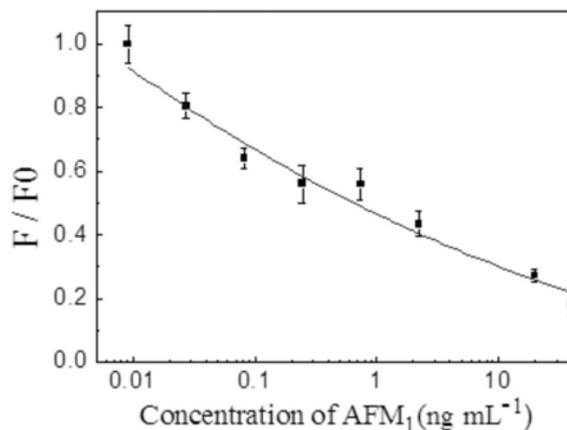
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54)发明名称

基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法。所述方法首先在CsX、PbX<sub>2</sub>的原料中添加少量的表面活性剂油胺,通过球磨得到可在水中分散的水溶性钙钛矿纳米晶,再通过表面进一步修饰阴离子表面活性剂使其表面带负电荷,与黄曲霉素M1的抗体相结合,采用荧光免疫检测方法对黄曲霉素M1进行定量检测。本发明制备钙钛矿纳米晶的工艺简单,成本低廉,荧光效率高,可对黄曲霉素M1进行定量检测,检测灵敏度可达0.01ng/mL,开拓了钙钛矿材料的应用范围,具有良好的应用前景。



1. 基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,其特征在于,具体步骤如下:

步骤1,将油胺加入到CsX和PbX<sub>2</sub>粉末中,以300~500rpm的转速球磨1~7h,其中球料质量比为15:1~30:1,所述的X为Cl、Br、I,CsPbX<sub>3</sub>的摩尔量与油胺的体积比为10~40:1;

步骤2,在球磨粉末中加入水溶性阴离子表面活性剂,加入Tris缓冲液搅拌溶解,调节pH至7~8,得到水溶性钙钛矿溶液;

步骤3,将黄曲霉素M1抗体溶液加入到水溶性钙钛矿溶液中,混匀后室温静置进行吸附,得到抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液;

步骤4,将待检测的黄曲霉素M1溶液与包被液混合,37°C下孵育进行包被,包被结束后,除去液体,清洗,甩干,加入4%牛奶稀释液,在37°C孵育,清洗,甩干;

步骤5,将抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液滴加到步骤4中包被的待检测的黄曲霉素M1中,检测吸光度,得到初始吸光度F<sub>0</sub>,之后37°C下孵育,孵育结束后,清洗,甩干,检测吸光度,得到最终吸光度F,根据黄曲霉素M1的浓度与F/F<sub>0</sub>的标准曲线关系,计算得到待检测的黄曲霉素M1的浓度。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤2中,所述的阴离子表面活性剂为十二烷基硫酸钠,钙钛矿纳米晶与水溶性阴离子表面活性剂的质量比为5:1~10:1。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤3,所述的静置吸附时间为15~30min。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤4,所述的包被孵育时间为1~2h。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤5,所述的孵育时间为20~30min。

## 基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,属于免疫分析领域。

### 背景技术

[0002] 卤化物钙钛矿材料具有出色的光伏性能和较高的能量转化率,在背光荧光粉领域具有巨大潜力。与有机无机杂化钙钛矿( $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbX}_3$ )相比,无机钙钛矿( $\text{CsPbX}_3$ )显示出优异的稳定性,在光电子学具有巨大潜在应用价值。

[0003] 钙钛矿发光性能优异,在生物成像、荧光免疫检测探针等都具有应用潜力,然而其水稳性能依然是技术瓶颈,水溶更是难以实现,大大限制了其在生物方面的应用。为实现水溶性能,有研究通过制备油溶性的钙钛矿纳米晶,随后用固体脂质纳米颗粒来包裹钙钛矿纳米晶实现水溶,然而其制备方法复杂,且有机溶剂使用量大,不利于大批量生产与环保要求([1]Gomez L,de Weerd C,Hueso J L,et al.Color-stable water-dispersed cesium lead halide perovskite nanocrystals[J].Nanoscale,2017,9(2):631-636.)。

[0004] 在免疫检测中,荧光免疫检测快捷且操作简易,是一种优异的免疫检测方法。黄曲霉素M1是一种易接触人体的致毒物,且由于大多存在于牛奶等奶制品中,其暴露的对象包含婴幼儿,因此其检测十分必要。目前国内外检测黄曲霉素M1的方法有高效液相法、液质联用、荧光探针法等([2]Wang Y,et al.HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB.Food Control,2012;28(1):131-134.[3]Cavaliere C,Foglia P,et al.Anatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography—tandem mass spectrometry.J Chromatography A,2006;1135(2):135-141.[4]Tayebi M,et al.Determination of total aflatoxin using cysteamine-capped CdS quantum dots as a fluorescence probe[J].Colloid& Polymer Science,2016,294(9):1-10.)。其中荧光探针法快捷便利,无需昂贵的仪器,是非常活跃的研究领域。目前,将钙钛矿应用于黄曲霉素M1的检测中仍未见报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法。

[0006] 实现上述目的的技术方案如下:

[0007] 基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,具体步骤如下:

[0008] 步骤1,将油胺加入到 $\text{CsX}$ 和 $\text{PbX}_2$ 粉末中,以300~500rpm的转速球磨1~7h,其中球料质量比为15:1~30:1,所述的X为Cl、Br、I, $\text{CsPbX}_3$ 的摩尔量与油胺的体积比为10~40:1;

[0009] 步骤2,在球磨粉末中加入水溶性阴离子表面活性剂,加入Tris缓冲液搅拌溶解,调节pH至7~8,得到水溶性钙钛矿溶液;

[0010] 步骤3,将黄曲霉素M1抗体溶液加入到水溶性钙钛矿溶液中,混匀后室温静置进行吸附,得到抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液;

[0011] 步骤4,将待检测的黄曲霉素M1溶液与包被液混合,37℃下孵育进行包被,包被结束后,除去液体,清洗,甩干,加入4%牛奶稀释液,在37℃孵育,清洗,甩干;

[0012] 步骤5,将抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液滴加到步骤4中包被的待检测的黄曲霉素M1中,检测吸光度,得到初始吸光度 $F_0$ ,之后37℃下孵育,孵育结束后,清洗,甩干,检测吸光度,得到最终吸光度 $F$ ,根据黄曲霉素M1的浓度与 $F/F_0$ 的标准曲线关系,计算得到待检测的黄曲霉素M1的浓度。

[0013] 步骤2中,所述的阴离子表面活性剂为十二烷基硫酸钠(SDS),钙钛矿纳米晶与水溶性阴离子表面活性剂的质量比为5:1~10:1。

[0014] 步骤3,所述的静置吸附时间为15~30min。

[0015] 步骤4,所述的包被孵育时间为1~2h。

[0016] 步骤5,所述的孵育时间为20~30min。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有以下显著优点:

[0018] 1) 采用一步球磨法制备水溶性钙钛矿纳米晶,该方法简单,可批量放大生产,成本低,制得的钙钛矿在水中稳定;

[0019] 2) 将水溶性钙钛矿纳米晶用于黄曲霉素M1的检测,检测灵敏度可达0.01ng/mL,达到实际应用的要求,拓宽了黄曲霉素M1荧光检测范围。

[0020] 本发明首次将钙钛矿应用于检测黄曲霉素M1的检测中,拓宽了钙钛矿的应用范围。

## 附图说明

[0021] 图1为实施例1和实施例3制备的钙钛矿纳米晶的XRD图。

[0022] 图2为实施例1制备的钙钛矿纳米晶的TEM图。

[0023] 图3为实施例1制备的钙钛矿纳米晶的PL图。

[0024] 图4为实施例1制备的钙钛矿纳米晶的紫外吸收图谱随水溶浓度的变化图。

[0025] 图5为实施例1制备的钙钛矿纳米晶与抗体偶联的TEM图。

[0026] 图6为实施例1制备的钙钛矿纳米晶与抗体偶联不同pH下的荧光检测变化图。

[0027] 图7为实施例2钙钛矿纳米晶检测黄曲霉素M1的标准曲线。

[0028] 图8为实施例4制备的钙钛矿纳米晶水溶液照片。

[0029] 图9为实施例5制备的钙钛矿纳米晶的PL图。

[0030] 图10为实施例1和对比例1制备的钙钛矿纳米晶与抗体结合后静置后的图。

[0031] 图11为对比例2制得的钙钛矿纳米晶在水中的分散情况图。

## 具体实施方式

[0032] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步详述。

[0033] 本发明在 $CsX$ 、 $PbX_2$ 的原料中添加少量的表面活性剂,通过球磨的方法得到可在水中分散的发光纳米晶,通过表面进一步修饰阴离子表面活性剂使得表面带负电荷,与黄曲霉素M1的抗体相结合,通过荧光免疫检测方法可针对黄曲霉素M1进行定量检测。

[0034] 实施例1

[0035] 基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,具体包括如下步骤:

[0036] 1) 将100 $\mu$ L油胺加入到2mmol的CsBr与PbBr<sub>2</sub>粉末中,充入氩气进行保护,密封球磨罐,以400rpm的转速球磨2h,其中球料质量比为30:1;

[0037] 2) 在80mg球磨粉末中加入10mg的SDS粉末,加入2mL Tris缓冲液,搅拌溶解,调节pH至7.4,得到水溶性钙钛矿溶液;

[0038] 3) 将步骤2)的溶液取8份75 $\mu$ L,分别加425 $\mu$ L纯水稀释,用0.1M的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液对溶液pH进行调节,分别滴加1~8 $\mu$ L并用混匀器进行混匀;

[0039] 4) 取10 $\mu$ L黄曲霉素M1抗体溶液分别加到步骤3)的混合溶液中,混匀并室温静置半小时进行吸附;

[0040] 5) 配制黄曲霉素M1抗原溶液浓度为0.25 $\mu$ g/mL,包被液(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>)每个孔滴加100 $\mu$ L,抗原溶液滴加100 $\mu$ L,在酶标仪中晃板多次混合均匀,37 $^{\circ}$ C孵育2h进行包被,之后倒掉孔中溶液进行自动洗板,并摔干;在孔中加入牛奶稀释液(4%的浓度),在37 $^{\circ}$ C培养1h,之后进行自动洗板三次,留待备用;

[0041] 6) 将100 $\mu$ L不同pH梯度的步骤4)溶液分别加入到孔板中,晃匀,并用酶标仪进行初始值测量;

[0042] 7) 将步骤6)溶液在37 $^{\circ}$ C下培养半小时,自动洗板三次,摔干,用酶标仪测量荧光最终值。

[0043] 本实施例制得的CsPbBr<sub>3</sub>钙钛矿纳米晶其结晶性表征XRD见图1的1,其晶相的峰位和强度与钙钛矿的标准卡片相吻合,说明其良好的结晶性。其相貌TEM图见图2,晶粒尺寸分布为50~100nm。其水溶液的PL发光谱图见图3,发光峰中心波长为522nm,半峰宽仅为18nm。其紫外吸收图谱随水溶浓度的变化见图4,在水中的溶解度可达3.4mg/mL。与抗体偶联的TEM图见图5,从a到c依次为CsPbBr<sub>3</sub>钙钛矿纳米晶、抗体以及偶联后的荧光探针。不同pH下荧光检测变化图见图6,当pH较大时,其检测效果好。

[0044] 实施例2

[0045] 1) 将100 $\mu$ L油胺加入到2mmol的CsBr与PbBr<sub>2</sub>粉末中,充入氩气进行保护,密封球磨罐,以400rpm的转速球磨2h,其中球料质量比为30:1;

[0046] 2) 在80mg球磨粉末中加入10mg的SDS粉末,加入2mL Tris缓冲液,搅拌溶解,调节pH至7.4,得到水溶性钙钛矿溶液;

[0047] 3) 将步骤2)的溶液取75 $\mu$ L,加425 $\mu$ L纯水稀释,用0.1M的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液对溶液pH进行调节,滴加8 $\mu$ L并用混匀器进行混匀;

[0048] 4) 取10 $\mu$ L黄曲霉素M1抗体溶液分别加到步骤3)的混合溶液中,混匀并室温静置半小时进行吸附;

[0049] 5) 配制不同浓度的黄曲霉素M1抗原溶液,包被液(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>)每个孔滴加100 $\mu$ L,抗原溶液滴加100 $\mu$ L,在酶标仪中晃板多次混合均匀,37 $^{\circ}$ C孵育2h进行包被,之后倒掉孔中溶液进行自动洗板,并摔干;在孔中加入牛奶稀释液(4%的浓度),在37 $^{\circ}$ C培养1h,之后进行自动洗板三次,留待备用;

[0050] 6) 将100 $\mu$ L步骤4)溶液加入到孔板中,晃匀,并用酶标仪进行初始值测量;

[0051] 7) 将步骤6)溶液在37 $^{\circ}$ C下培养半小时,自动洗板三次,摔干,用酶标仪测量荧光最终值。

[0052] 钙钛矿纳米晶检测黄曲霉素M1的标准曲线见图7。在0.02to 10.1ng/mL的黄曲霉

素M1浓度范围内呈现线性变化,其检测灵敏度可达0.01ng/mL,可满足实际应用的要求。

[0053] 实施例3

[0054] 1) 将50 $\mu$ L油胺加入到2mmol的CsBr与PbBr<sub>2</sub>粉末中,充入氩气进行保护,密封球磨罐,以400rpm的转速球磨2h,其中球料质量比为30:1;

[0055] 2) 在50mg球磨粉末中加入10mg的SDS粉末,加入2mL Tris缓冲液,搅拌溶解,调节pH至7.4,得到水溶性钙钛矿溶液;

[0056] 3) 将步骤2)的溶液取8份75 $\mu$ L,加425 $\mu$ L纯水稀释,用0.1M的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液对溶液pH进行调节,用混匀器进行混匀;

[0057] 4) 取10 $\mu$ L黄曲霉素M1抗体溶液分别加到步骤3)的混合溶液中,混匀并室温静置半小时进行吸附;

[0058] 5) 配制黄曲霉素M1抗原溶液浓度为0.25ug/mL,包被液(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>)每个孔滴加100 $\mu$ L,抗原溶液滴加100 $\mu$ L,在酶标仪中晃板多次混合均匀,37 $^{\circ}$ C孵育2h进行包被,之后倒掉孔中溶液进行自动洗板,并摔干;在孔中加入牛奶稀释液(4%的浓度),在37 $^{\circ}$ C培养1h,之后进行自动洗板三次,留待备用;

[0059] 6) 将步骤4)溶液分别加入100 $\mu$ L到孔板中,晃匀,并用酶标仪进行初始值测量;

[0060] 7) 将步骤6)溶液在37 $^{\circ}$ C下培养半小时,自动洗板三次,摔干,用酶标仪测量荧光最终值。

[0061] 本实施例制得的CsPbBr<sub>3</sub>钙钛矿纳米晶其XRD见图1的2,其结晶性依然良好。

[0062] 实施例4

[0063] 本实施例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤1)中油胺体积改为200 $\mu$ L,其他条件保持一致。本实施例制得的钙钛矿纳米晶水溶液照片见图8,水溶性良好。

[0064] 实施例5

[0065] 本实施例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤1)中CsBr与PbBr<sub>2</sub>粉末改为CsI与PbI<sub>2</sub>,其他条件保持一致。本实施例制得的钙钛矿纳米晶其发光图谱见图9,发光性能依然良好。

[0066] 对比例1

[0067] 本对比例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤2)中Tris改为PBS,其他条件保持一致。本对比例制得的CsPbBr<sub>3</sub>钙钛矿纳米晶用于黄曲霉素M1的荧光免疫检测。其检测效果稍差,抗体与纳米晶结合后放置有沉淀,见图10。

[0068] 对比例2

[0069] 本对比例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤1)中油胺改为250 $\mu$ L,其他条件保持一致,本对比例制得的钙钛矿纳米晶在水中的溶解性变差,见图11,绝大部分钙钛矿纳米晶沉淀,不能在水中分散。

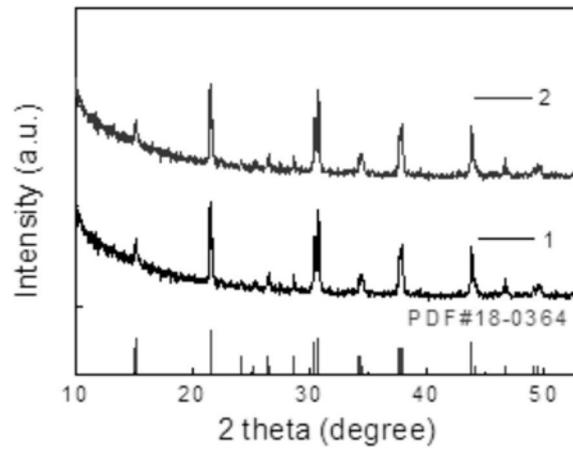


图1

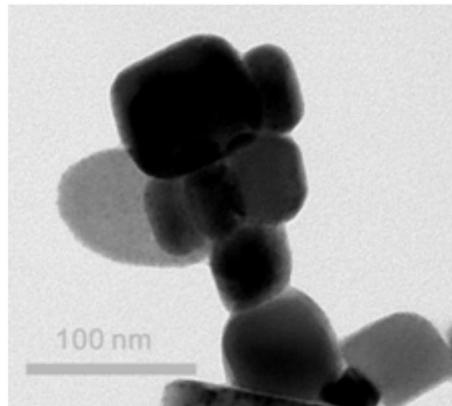


图2

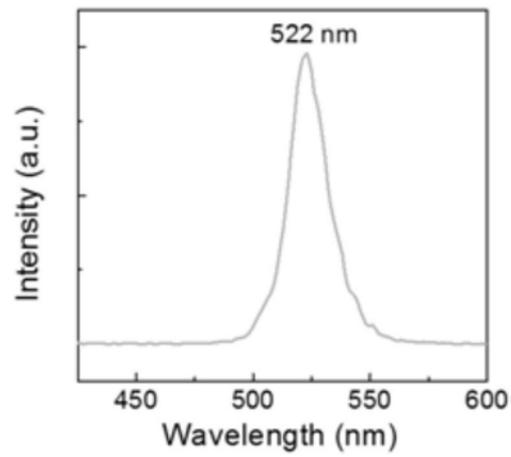


图3

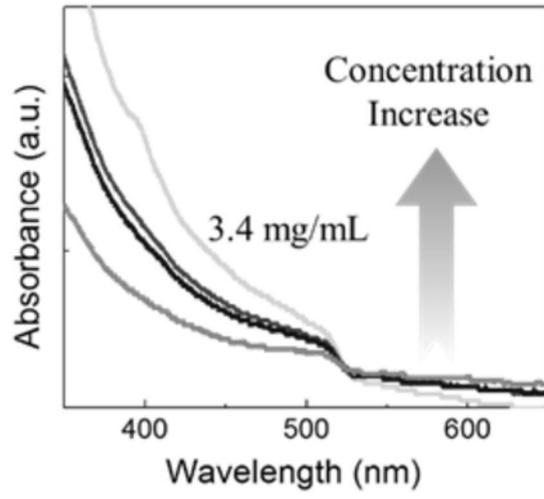


图4

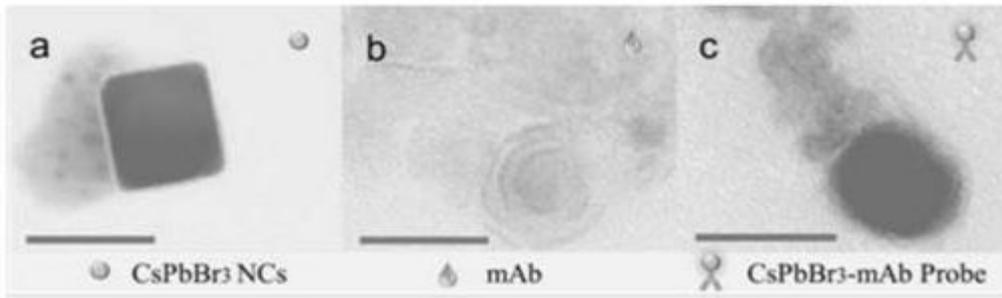


图5

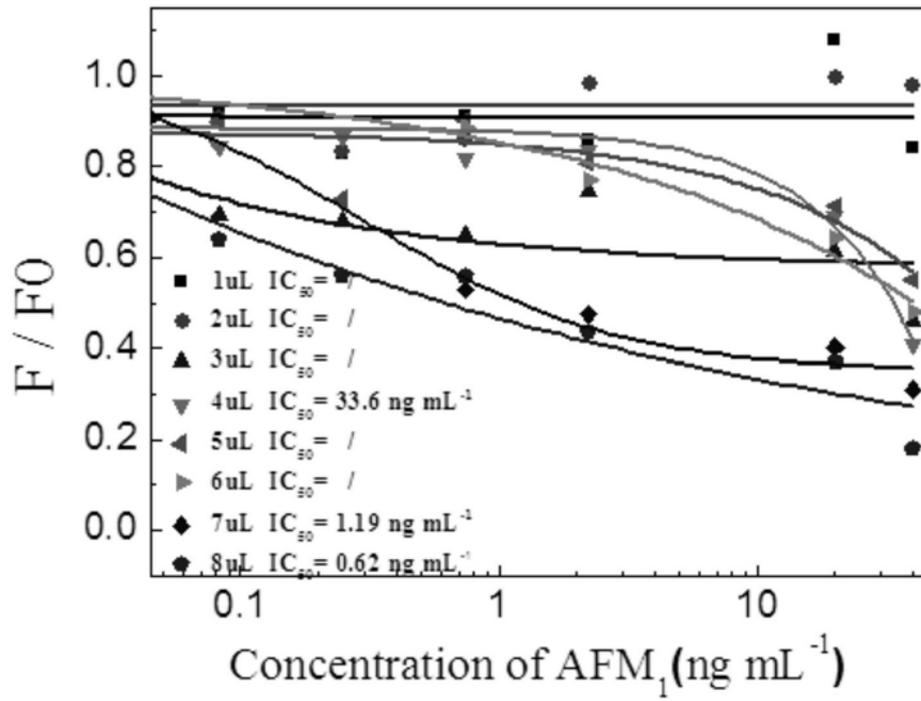


图6

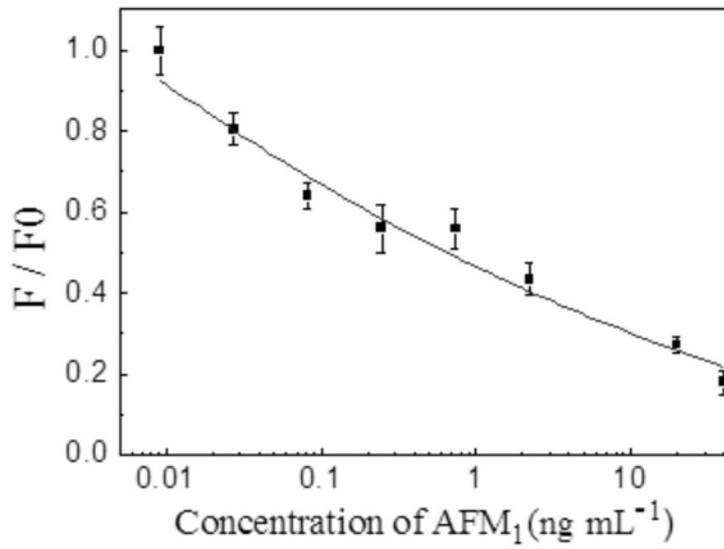


图7



图8

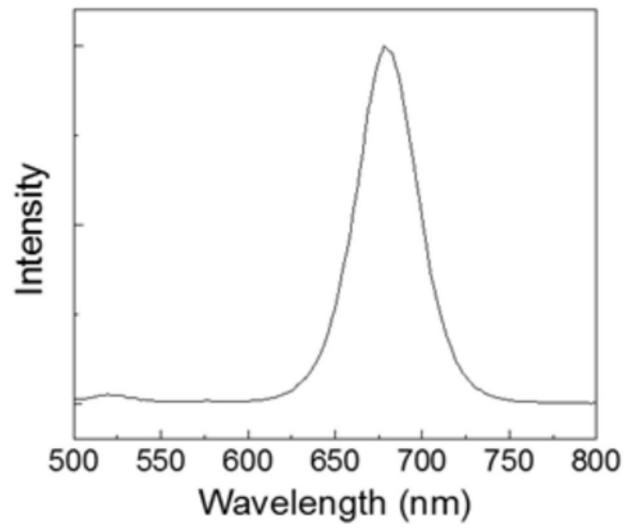


图9

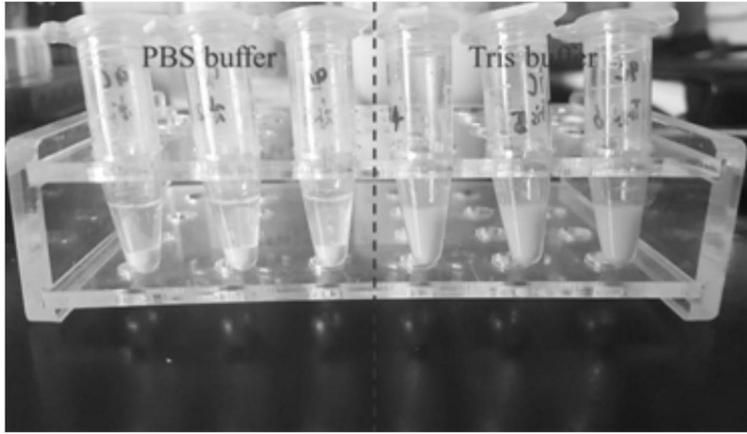


图10



图11

专利名称(译)	基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109142703A</a>	公开(公告)日	2019-01-04
申请号	CN2017110506200.8	申请日	2017-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	南京理工大学		
申请(专利权)人(译)	南京理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京理工大学		
[标]发明人	宋继中 董宇辉 唐晓倩 韩博宁 薛洁 曾海波 张兆威		
发明人	宋继中 董宇辉 唐晓倩 韩博宁 薛洁 曾海波 张兆威		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	刘海霞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法。所述方法首先在CsX、PbX<sub>2</sub>的原料中添加少量的表面活性剂油胺，通过球磨得到可在水中分散的水溶性钙钛矿纳米晶，再通过表面进一步修饰阴离子表面活性剂使其表面带负电荷，与黄曲霉素M1的抗体相结合，采用荧光免疫检测方法对黄曲霉素M1进行定量检测。本发明制备钙钛矿纳米晶的工艺简单，成本低廉，荧光效率高，可对黄曲霉素M1进行定量检测，检测灵敏度可达0.01ng/mL，开拓了钙钛矿材料的应用范围，具有良好的应用前景。

