



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108918859 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201810741812.X

CN 102520152 A, 2012.06.27

(22) 申请日 2018.07.09

CN 107085096 A, 2017.08.22

CN 1598586 A, 2005.03.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108918859 A

(43) 申请公布日 2018.11.30

(73) 专利权人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街61号

(72) 发明人 徐志祥 高绘菊 姜名获 徐龙华
孙玉奉

(74) 专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所
(普通合伙企业) 37240

代理人 李茜

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102698723 A, 2012.10.03

史修娟. 基于磁性石墨烯和分子印迹构建对多种有机磷农药痕量检测的仿生电化学传感器方法研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》.2017, (第2017/03期),

Qiurui Liu等. Direct competitive biomimetic immunoassay based on quantum dot label for simultaneous determination of two pesticide residues in fruit and vegetable samples.《Food Analytical Methods》.2018, 第11卷

刘贤进 等. 有机磷杀虫剂通用结构半抗原的设计及广谱特异性抗体的制备.《中国农业科学》.2008, 第41卷(第3期),

审查员 毕秀华

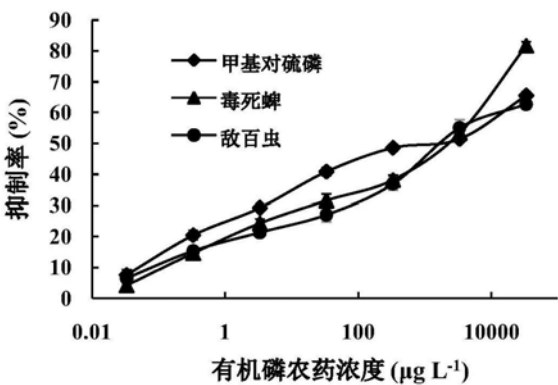
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的方法, 本发明是以多识别位点 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 为公共仿生抗体, 用三种同一激发波长下的不同发射波长的量子点分别标记甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫三种有机磷农药半抗原, 建立简便、快速的仿生荧光免疫分析方法同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫三种有机磷农药。本发明成本低廉, 实验操作简单, 结果测定准确, 检测限低, 适用于各种食品中多种有机磷农药的同时检测。



1. 以二乙基膦酰基乙酸为模板分子合成的多识别位点 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 作为仿生抗体在同时检测多种有机磷农药残留中的应用;

所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 由如下方法制备而成:

将1mmol二乙基膦酰基乙酸溶解在四氢呋喃中,加入1~3mmol 3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌反应;再加入40.00~80.00 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 和4~8 mmol正硅酸乙酯,搅拌反应;当0.2~0.5mL氢氧化铵加入后,将混合液在50~70℃下放置8~12 h,用甲醇过滤和洗涤,除去未反应试剂和模板分子,干燥,用120~150 mL甲醇-乙酸混合溶剂处理12~24 h,再用120~150 mL甲醇处理,干燥,即得;

所述多种有机磷农药为甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫。

2. 一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测多种有机磷农药的方法,其特征在于,包括以下步骤:

以含有有机磷农药公共基团的二乙基膦酰基乙酸为模板分子合成的多识别位点 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 作为仿生抗体;以同一激发波长下的不同发射波长的量子点作为标记物,对所检测的有机磷农药的半抗原进行标记;

将不同发射波长量子点标记的半抗原和所检测的有机磷农药混合标准品混合,加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$,反应,离心,测定上清液的荧光值,根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率,建立所检测的多种有机磷农药的标准曲线,利用标准曲线对待测物中有机磷农药的含量进行测定;

所述多种有机磷农药为甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫。

3. 一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 以二乙基膦酰基乙酸作为模板分子,制备得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$;

(2) 以三种具有不同发射波长的CdSe/ZnS量子点分别对甲基对硫磷半抗原、毒死蜱半抗原和敌百虫半抗原进行标记,得到三种量子点标记半抗原;

(3) 将步骤(2)制备的三种量子点标记半抗原和系列浓度的甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液混合,然后加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$,反应,离心,测定上清液的荧光值,根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率,建立甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫三种农药的标准曲线,利用标准曲线对待测物中甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的含量进行测定;

步骤(2)中,对甲基对硫磷半抗原、毒死蜱半抗原和敌百虫半抗原进行量子点标记的具体方法为:

分别将甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫半抗原与1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和三种不同发射波长的CdSe/ZnS量子点按照200:4000:1~5的摩尔比例加入到反应容器中,充分混匀;加入50~100 μL pH 7.4的硼酸盐缓冲液,避光室温反应2~10 h;反应结束后,离心除团聚,并将反应物超滤浓缩进行分离纯化;

步骤(3)中,三种不同发射波长量子点标记的半抗原、甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 加入量的比为(1~5)mL:(3~15)mL:(5.00~15.00)mg。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述CdSe/ZnS量子点的发射波长分别为525 nm、585 nm和625 nm。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述反应的条件为:室温下振

荡30-180 min。

6. 根据权利要求3所述的方法, 其特征在于, 步骤(3)中, 离心的转速为8000r/min, 离心时间为15min。

7. 根据权利要求3所述的方法, 其特征在于, 步骤(3)中, 还包括: 对待测物进行提取的步骤; 所述对待测物进行提取包括: 将待测物用甲醇-水溶液进行超声提取, 过滤; 待测物与甲醇-水溶液加入量的比为5 g: (5~15)mL, 所述甲醇-水溶液中甲醇与水的体积比为3:17。

基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种仿生荧光免疫分析方法,特别是涉及一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的方法,属于食品安全检测技术领域。

背景技术

[0002] 有机磷农药具有杀虫效率高、防治病虫害范围广、成本低、选择性高等优点,在农业生产中具有广泛的应用前景,但是不合理的使用农药会导致农药残留,威胁人们的食品安全。

[0003] 随着人们对食品安全的日益重视,越来越多的人开始关注农药残留。目前国内外用于食品中多种有机磷农药同时检测的方法大多都是气相色谱与质谱联用;高效液相色谱与质谱联用,但上述检测方法均需要昂贵的仪器和冗长的分析时间。而酶联免疫法虽然具有高灵敏度和低检出限,但是其存在生物抗体制备周期长,保存不当易失活等问题。分子印迹聚合物作为仿生抗体,不但具有高选择性,而且印迹聚合物制备周期短,不存在失活问题,作为人工抗体应用于免疫分析,建立仿生免疫吸附检测技术,用于检测农产品及食品中的农药残留检测,是国内外研究的热点。但农产品中的农药残留往往是多种,大多数仿生免疫分析方法通常用于单一的农药检测。如果要实现全面检测,则需要使用多种的仿生抗体,这将极大的增加农药残留的检测成本。因此,建立用于同时检测农产品及食品中的多种有机磷农药残留的仿生免疫分析方法,对于保障食品安全具有重要意义。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术,本发明的目的是提供一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的方法,以实现同时对多种有机磷农药残留的同时、快速、灵敏检测。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 本发明的第一方面,提供以二乙基膦酰基乙酸(DPA)为模板分子合成的多识别位点 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 作为仿生抗体在同时检测多种有机磷农药残留中的应用;

[0007] 所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 由如下方法制备而成:

[0008] 将1mmol二乙基膦酰基乙酸溶解在四氢呋喃中,加入1~3mmol 3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌反应;再加入40.00~80.00mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 和4~8mmol正硅酸乙酯,搅拌反应。当0.2~0.5mL氢氧化铵加入后,将混合液在50~70℃下放置8~12h,用甲醇过滤和洗涤,除去未反应试剂和模板分子,干燥,用120~150mL甲醇-乙酸混合溶剂处理12~24h,再用120~150mL甲醇处理,干燥,即得。

[0009] 上述应用中,优选的,所述多种有机磷农药为甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫。

[0010] 本发明的第二方面,提供一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测多种有机磷农药的方法,包括以下步骤:

[0011] 以含有有机磷农药公共基团的二乙基膦酰基乙酸(DPA)为模板分子合成的多识别位点 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 作为仿生抗体;以同一激发波长下的不同发射波长的量子点作为标记物,对所检测的有机磷农药的半抗原进行标记;

[0012] 将不同发射波长量子点标记的半抗原和所检测的有机磷农药混合标准品混合,加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$,反应,离心,测定上清液的荧光值,根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率,建立所检测的多种有机磷农药的标准曲线,利用标准曲线对待测物中的多种有机磷农药的含量进行测定。

[0013] 作为一种优选的方案,本发明的第三方面,提供一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的方法,包括以下步骤:

[0014] (1) 以二乙基膦酰基乙酸(DPA)作为模板分子,制备得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$;

[0015] (2) 以三种具有不同发射波长的CdSe/ZnS量子点分别对甲基对硫磷半抗原、毒死蜱半抗原和敌百虫半抗原进行标记,得到三种量子点标记半抗原;

[0016] (3) 将步骤(2)制备的三种量子点标记半抗原和系列浓度的甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液混合,然后加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$,反应,离心,测定上清液的荧光值,根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率,建立甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫三种农药的标准曲线,利用标准曲线对待测物中甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的含量进行测定。

[0017] 优选的,步骤(2)中,对甲基对硫磷半抗原、毒死蜱半抗原和敌百虫半抗原进行量子点标记的具体方法为:

[0018] 分别将甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫半抗原与1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和三种不同发射波长的CdSe/ZnS量子点按照200:4000:1~5的摩尔比例加入到反应容器中,充分混匀;加入50~100 μL 硼酸盐缓冲液(pH 7.4),避光室温反应2~10h;反应结束后,离心除团聚,并将反应物超滤浓缩进行分离纯化。

[0019] 优选的,步骤(2)中,所述CdSe/ZnS量子点的发射波长分别为525nm、585nm和625nm。

[0020] 优选的,步骤(3)中,三种不同发射波长量子点标记的半抗原、甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 加入量的比为(1~5)mL:(3~15)mL:(5.00~15.00)mg。

[0021] 优选的,步骤(3)中,所述反应的条件为:室温下振荡30~180min。

[0022] 优选的,步骤(3)中,离心的转速为8000r/min,离心时间为15min。

[0023] 优选的,步骤(3)中,还包括:对待测物进行提取的步骤;所述对待测物进行提取包括:将待测物用甲醇-水溶液进行超声提取,过滤;待测物与甲醇-水溶液加入量的比为5g:(5~15)mL,所述甲醇-水溶液中甲醇与水的体积比为3:17。

[0024] 本发明的有益效果:

[0025] (1) 本发明以含有有机磷农药公共基团的DPA作为模板分子合成分子印迹聚合物,使该聚合物对大多数有机磷农药均具有选择吸附性能,可实现多种有机磷农药的同时检测。

[0026] (2) 本发明提供的标记物量子点,由于其结构较小,能够促进竞争反应,进而提高检测方法的灵敏度。

[0027] (3) 本发明实验操作简单,分析流程短,灵敏度高且检测限低,甲基对硫磷、毒死蜱

和敌百虫的检测限 (IC_{15}) 分别为 $0.21 \pm 0.021 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $0.44 \pm 0.069 \mu\text{g L}^{-1}$ 和 $0.32 \pm 0.033 \mu\text{g L}^{-1}$ 。适用于各种食品中多种有机磷农药的快速同时检测。

附图说明

[0028] 图1: 甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫三种农药的仿生荧光免疫分析方法的标准曲线。

具体实施方式

[0029] 应该指出, 以下详细说明都是例示性的, 旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明, 本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0030] 本发明中所提及的“室温”是指温度为15-30℃。

[0031] 正如背景技术部分所介绍的, 现有的仿生免疫分析方法通常用于单一的农药检测, 如果要想实现全面检测, 则需要使用多种的仿生抗体, 这将极大的增加农药残留的检测成本。基于此, 本发明的目的是提供一种基于量子点标记仿生荧光免疫分析同时检测多种有机磷农药的方法。

[0032] 为实现同时检测多种有机磷农药, 本发明是以含有有机磷农药公共基团的DPA作为模板分子合成的分子印迹聚合物作为仿生抗体, 用同一激发波长下的不同发射波长的量子点作为标记物, 对所检测的有机磷农药的半抗原进行标记。然后将不同发射波长量子点标记的半抗原和所检测的有机磷农药混合标准品混合, 再加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$, 反应, 离心, 测定上清液的荧光值, 根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率, 建立所检测的多种有机磷农药的标准曲线, 利用标准曲线对待测物中的多种有机磷农药的含量进行测定。

[0033] 由于本发明以含有有机磷农药公共基团的DPA作为模板分子合成分子印迹聚合物, 使该聚合物对大多数有机磷农药均具有选择吸附性能, 因此, 只要量子点波长选择合适并且能够合成相应的有机磷农药半抗原, 本发明可以实现同时检测多种有机磷农药。

[0034] 在本发明的一种实施方案中, 给出了甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的仿生荧光免疫同时检测方法, 是按以下步骤完成的:

[0035] 1. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 颗粒的制备:

[0036] 将1mmol二乙基膦酰基乙酸 (DPA) 溶解在5mL四氢呋喃中, 随后加入1~3mmol 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES)。搅拌20min后, 加入40.00~80.00mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 和4~8mmol正硅酸乙酯 (TEOS), 搅拌30min。当0.2~0.5mL氢氧化铵加入后将混合液在50~70℃下放置8~12h, 用甲醇过滤和洗涤, 除去未反应试剂和模板分子, 然后在60℃真空烘箱中干燥。用120~150mL甲醇/乙酸 (3/1~4/1, V/V) 处理12~24h, 再用120~150mL甲醇处理12h。然后真空干燥得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 。

[0037] 上述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 颗粒中, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 使MIP成为超顺磁核/壳型MIP, 结合了超顺磁粒子和MIP的优点, 只需要磁力就可以轻松实现分离, 并继承了传统MIP的优势, 如高识别性、选择性和稳定性; 此外, 还可以通过磁场的热作用和简单的超声波作用, 使超磁颗粒易于再分散。

[0038] 2. 量子点标记半抗原的合成:

[0039] 分别将甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫半抗原与1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和三种不同发射波长的CdSe/ZnS量子点(525nm、585nm、625nm)按照200:4000:1~5的摩尔比例加入到反应容器中,充分混匀;加入50~100 μ L硼酸盐缓冲液(pH 7.4),避光室温反应2~10h。反应结束后,离心除团聚,并将反应物超滤浓缩进行分离纯化;终产物在2~8 $^{\circ}$ C下保存。

[0040] (1) 甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫半抗原的合成

[0041] ①甲基对硫磷半抗原的合成:称4g甲基对硫磷溶于40mL乙醚中,用20mL的0.1mol/L冷 Na_2CO_3 溶液洗涤,共3次,洗水为黄色,弃去。在上述乙醚相中加入40mL乙酸-浓盐酸(9:1, V/V),分次加入锌粉8g,加毕升温搅拌50min。冷却乙醚层,用25mL蒸馏水洗2次,无水硫酸钠干燥,过夜回收乙醚,得棕黄色油状物。将此油状物溶于0.5mol/L盐酸至pH为1~2,滤去不溶物,该溶液用正己烷萃取,弃去己烷层,水层用2.5mol/L NaOH溶液碱化,调pH至10~11时,有橙黄色油状物析出,再用 CHCl_3 萃取3次,合并,用无水硫酸钠干燥过夜,减压蒸馏,得到棕色油状物。

[0042] ②毒死蜱半抗原的合成:称取3-巯基丙酸1.06g(10mmol)溶于50mL无水乙醇中,再加入1.42g KOH溶解,然后加入含有3.51g(10mmol)毒死蜱的50mL无水乙醇,加热回流1h,反应混合物过滤,滤液减压蒸馏得到淡黄色液体。加50mL5%的 NaHCO_3 ,以正己烷去杂3次,每次50mL,取下层水层,以1:1HCl调pH至4.0,出现大量白色絮状沉淀,以二氯甲烷80、50、50mL提取3次,合并二氯甲烷过无水硫酸钠柱脱水,25 $^{\circ}$ C真空浓缩至干呈黄色油状物,过200~300目硅胶层析柱,以正己烷:四氢呋喃:乙酸(75:25:1)洗脱,收集流动相,旋转蒸发减压浓缩至干。然后加入少量无水乙醇溶解产物,重结晶后得到淡黄色晶体。

[0043] ③敌百虫半抗原的合成:5.664g敌百虫(22mmol)和2g琥珀酸酐(20mmol)溶于5mL无水吡啶,磁力搅拌10min后,置于黑暗处避光反应18h,得到黄褐色的粘稠物。氮吹除去吡啶,向其中加入50mL超纯水(DDW),用饱和的 NaHCO_3 溶液调节pH到8-9之间,再用乙酸乙酯萃取(3 $\times$ 30mL),经过减压蒸馏后,得到敌百虫的半抗原粗产品。按照以上萃取步骤将粗产品重复2次,提高半抗原的纯度。

[0044] (2) 甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫半抗原的紫外扫描

[0045] 用紫外分光光度计在190~400nm处对甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫及其半抗原进行了研究。甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫的特征吸收峰分别在275、230和189nm处,而其半抗原分别在234、258和257nm处有特征吸收峰,表明这三种农药半抗原成功合成。

[0046] 本发明所使用的三种不同发射波长的CdSe/ZnS量子点从武汉嘉源量子点有限公司购得。本发明中所使用的发射波长为525nm、585nm、625nm的三种CdSe/ZnS量子点,可以使不同量子点标记的农药半抗原的峰能够分开并且最大荧光值不会相互影响。其他发射波长的量子点只要峰能够相互分开并且荧光值不受干扰也可用于半抗原的标记。

[0047] 另外,每种发射波长的CdSe/ZnS量子点均可用于各种农药半抗原的标记。

[0048] 3.以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 作为仿生抗体,将所述的三种量子点标记半抗原用甲醇/水溶液(3/17, V/V)稀释500~2000倍作为量子点标记半抗原稀释液用于竞争反应,具体步骤如下:

[0049] 1~5mL三种不同发射波长量子点标记的半抗原稀释液(注:此处每一种发射波长的量子点标记的半抗原稀释液均加入1-5mL)和3~15mL甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合

标准溶液 ($0.000033-333.33\text{mg L}^{-1}$) 混合, 然后加入 $5.00\sim 15.00\text{mg}$ 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 。室温下振荡 $30\sim 180\text{min}$; 8000r/min 离心 15min 。用荧光光谱仪测定上清液的荧光值, 根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率, 绘制三种农药的标准曲线。

[0050] 4. 将样品分别加入 $5\sim 15\text{mL}$ 甲醇/水溶液 ($3/17, \text{V/V}$) 超声提取 3 次, $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤得样品提取液; 将样品提取液代替步骤 3) 中所述三种农药的混合标准溶液, 重复步骤 3 操作, 计算出待测物中甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的含量。

[0051] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案, 以下将结合具体的实施例详细说明本申请的技术方案。

[0052] 本发明实施例中所用的未进行具体说明试验材料均为本领域常规的试验材料, 均可通过商业渠道购买得到。

[0053] 实施例 1: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 的制备:

[0054] 将 1mmol DPA 溶解在 5mL 四氢呋喃中, 随后加入 2mmol APTES。搅拌 20min 后, 加入 60.00mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 和 6mmol TEOS, 搅拌 30min 。当 0.3mL (0.1mol L^{-1}) 氢氧化铵加入后将混合液在 60°C 下放置 10h , 用甲醇过滤和洗涤, 除去未反应试剂和模板分子, 然后在 60°C 真空烘箱中干燥。用 150mL 甲醇/乙酸 ($4/1, \text{V/V}$) 处理 24h , 用 150mL 甲醇处理 12h , 去除 DPA。然后印迹聚合物在 60°C 真空干燥 12h , 制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 。

[0055] 实施例 2: 量子点标记半抗原的合成:

[0056] 分别用不同发射波长 (525nm 、 585nm 和 625nm) 的 CdSe/ZnS 量子点标记甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫半抗原。标记步骤如下:

[0057] 分别将甲基对硫磷、毒死蜱、敌百虫半抗原与 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺和三种不同发射波长的 CdSe/ZnS 量子点 (525nm 、 585nm 、 625nm) 按照 $200:4000:1$ 的摩尔比例加入到反应容器中, 充分混匀; 加入 $80\mu\text{L}$ 硼酸盐缓冲液 ($\text{pH } 7.4$), 避光室温反应 2h 。反应结束后, 离心除团聚, 并将反应物超滤浓缩进行分离纯化; 终产物在 4°C 下保存。

[0058] 实施例 3: 标准曲线的绘制

[0059] 以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 作为公共仿生抗体, 甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液和三种农药的量子点标记半抗原 (用甲醇/水溶液 ($3/17, \text{V/V}$) 稀释 500 倍) 竞争结合一定量的聚合物, 反应过程如下:

[0060] 1mL 不同发射波长量子点标记的半抗原和 3mL 甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液 ($0.000033-333.33\text{mg L}^{-1}$) 混合。然后加入 5.00mg 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 。在室温下振荡 120min ; 8000r/min 离心 15min 后, 用荧光光谱仪测定上清液的荧光值。根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率。

$$[0061] \quad \text{IC}\% = \left[1 - \frac{F_{\text{样品总}} - F_{\text{样品未反应}}}{F_{\text{对照总}} - F_{\text{对照未反应}}} \right] \times 100$$

[0062] 式中:

[0063] $\text{IC}\%$: 抗原抗体结合反应的抑制率;

[0064] $F_{\text{样品总}}$: 1mL 不同发射波长量子点标记的半抗原和 3mL 甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液 ($0.000033-333.33\text{mg L}^{-1}$) 混合后, 量子点标记半抗原溶液的平均荧光值;

[0065] $F_{\text{样品未反应}}$: 1mL 不同发射波长量子点标记的半抗原与 3mL 甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫混合标准溶液 ($0.000033-333.33\text{mg L}^{-1}$) 和 5.00mg 的仿生抗体竞争反应后, 量子点标记半

抗原溶液的平均荧光值；

[0066] $F_{\text{对照总}}$: 1mL不同发射波长量子点标记的半抗原和3mL缓冲溶液混合后,量子点标记半抗原溶液的平均荧光值；

[0067] $F_{\text{对照未反应}}$: 1mL不同发射波长量子点标记的半抗原与3mL缓冲溶液和5.00mg的仿生抗体竞争反应后,量子点标记半抗原溶液的平均荧光值。

[0068] 以标准溶液浓度对数值为横坐标,抑制率为纵坐标,分别绘制三种农药的标准曲线,结果见图1,由图1可知,甲基对硫磷、毒死蜱和敌百虫的检测限(IC_{15})分别为 $0.21 \pm 0.021 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $0.44 \pm 0.069 \mu\text{g L}^{-1}$ 和 $0.32 \pm 0.033 \mu\text{g L}^{-1}$ 。

[0069] 实施例4:实际样品检测

[0070] 别称取50.00g的梨、胡萝卜、猕猴桃和香蕉,切碎并制成匀浆。分别称重5.00g,在室温下用15mL甲醇/水溶液(3/17,V/V)超声处理30min,提取三次。提取液用甲醇/水溶液(3/17,V/V)定容至50mL,经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,得样品提取液。

[0071] 将1mL不同发射波长量子点标记的半抗原和3mL样品提取液混合。然后加入5.00mg的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MIP}$ 。在室温下振荡120min;8000r/min离心15min后,用荧光光谱仪测定上清液的荧光值。根据荧光值计算不同发射波长下的抑制率。

[0072] 根据抑制率计算出所测梨中敌百虫含量为 0.119mg kg^{-1} ;胡萝卜中甲基对硫磷含量为 0.035mg kg^{-1} ,敌百虫含量为 0.015mg/kg ;猕猴桃中毒死蜱含量为 0.027mg kg^{-1} ;香蕉中甲基对硫磷含量为 0.231mg kg^{-1} ,毒死蜱含量为 0.116mg kg^{-1} ,敌百虫含量为 0.307mg kg^{-1} 。

[0073] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

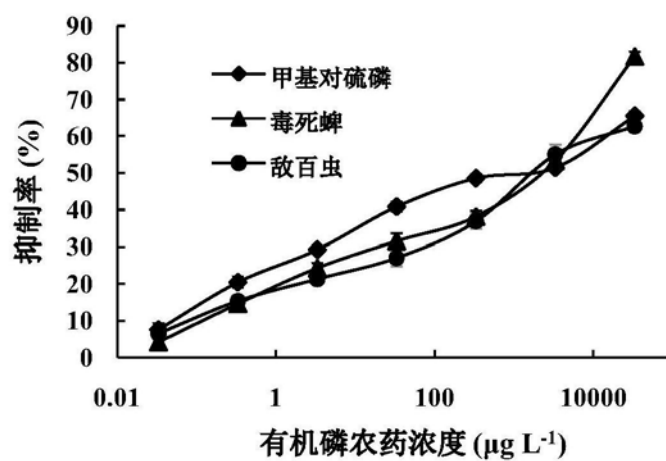


图1