



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106841639 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(21)申请号 201710010686.6

G01N 27/48(2006.01)

(22)申请日 2017.01.06

G01N 27/327(2006.01)

(71)申请人 南京师范大学

地址 210097 江苏省南京市鼓楼区宁海路  
122号

(72)发明人 邵科峰 魏梦 赵波 王雅娟  
朱永强

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 楼高潮

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

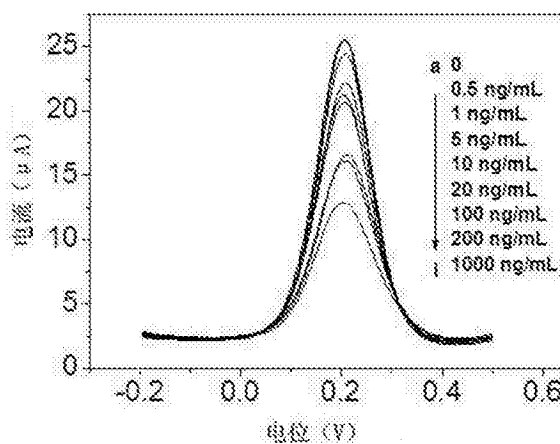
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

### (54)发明名称

一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法

### (57)摘要

本发明公开了一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法。所述的方法为：首先制备表面修饰纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体的电化学免疫传感器，然后采用双抗体夹心法对待测样品中的雌酚或双酚A进行检测，通过相关数据的分析与推导，即可得到雌酚或双酚A的浓度。本发明提供的方法检测己烯雌酚的检测限为0.06ng/mL，线性范围为0.5~1000ng/mL；检测己烷雌酚的检测限为0.052ng/mL，线性范围为0.5~1000ng/mL；检测己二烯雌酚的检测限为0.047ng/mL，线性范围为0.5~500ng/mL；检测双酚A的检测限为0.037ng/mL，线性范围为0.5~500ng/mL。本发明所述的检测方法快速、高效、灵敏度高，具有很低的检测限和较宽的线性范围。



1. 一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法,包括以下步骤:

1) 纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器的制备:先将纳米金颗粒通过电化学还原法沉积到处理好的玻碳电极表面,然后通过自组装法将巯基乙酸修饰到纳米金颗粒表面,最后采用活化羧基法将己烷雌酚单克隆抗体偶联到电极表面修饰的纳米金颗粒上,制得电化学免疫传感器;

2) 标准溶液的配制:配制含有雌酚或双酚A的磷酸缓冲溶液,作为标准溶液,将含有浓度为0的雌酚或双酚A的标准溶液作为空白标样;

3) 工作曲线的建立:首先将步骤1)所述电化学免疫传感器浸入步骤2)所述标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗电化学免疫传感器,然后将其浸入含有0.5mg/L的己烷雌酚单克隆抗体的溶液中进行孵育,之后以磷酸缓冲溶液冲洗,再将其在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安扫描,记录其响应电流;空白标样对应的响应电流记为 $I_0$ ,含有雌酚或双酚A标样的响应电流记为 $I_x$ ,响应电流的变化值 $\Delta I$ 等于 $I_x$ 与 $I_0$ 之差的绝对值;将所述 $\Delta I$ 与标准溶液中雌酚或双酚A浓度的对数值 $IgC$ 绘制成 $\Delta I-IgC$ 工作曲线,采用线性回归法得到 $\Delta I-IgC$ 线性回归方程;

4) 雌酚和双酚A的测定:配置含有待测样品的磷酸缓冲溶液,按照与步骤3)相同的方法对所述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的变化值 $\Delta I$ 和 $\Delta I-IgC$ 线性回归方程,得到雌酚和双酚A的含量。

2. 根据权利要求1所述的一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法,其特征在于,所述纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器采用以下方法制备:首先将清洁干净的玻碳电极浸入质量百分浓度为0.5%的氯金酸溶液中,采用恒电位法将氯金酸还原为纳米金颗粒从而沉积于玻碳电极表面;然后将玻碳电极置于1mmol/L的巯基乙酸水溶液中,通过自组装的方法在纳米金颗粒表面修饰巯基乙酸;再将玻碳电极置于含有0.1mol/L的N-溴代琥珀酰亚胺和0.1mol/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液中,活化羧基;在上述活化羧基后的玻碳电极表面滴涂质量浓度为0.5mg/L的己烷雌酚单克隆抗体,4℃条件下反应,制得所述的纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器。

3. 根据权利要求1所述的一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法,其特征在于,所述雌酚分别为己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚。

4. 根据权利要求1所述的一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法,其特征在于,以所述空白标样的测定值标准偏差的3倍作为样品检测限,重复步骤3)可得出雌酚或双酚A样品的检测限。

5. 一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法在食品、土壤、水质、塑料中的应用。

## 一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法

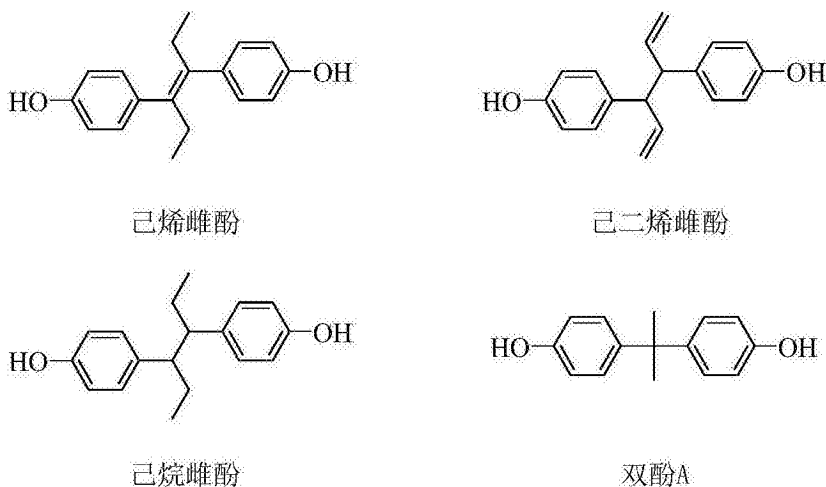
### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测和分析化学技术领域,涉及一种基于双抗体夹心法的电化学免疫检测方法,具体的说是一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法。

### 背景技术

[0002] 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)、己烷雌酚(hexestrol, HEX)和己二烯雌酚(dienestrol, DIEN)(结构见式1)属于人工合成的雌激素类物质(以下简称雌酚),具有促进动物生长、提高饲料转化率和减少脂肪合成等作用,20世纪60年代曾广泛应用于畜牧业生产。这类人工激素可通过食物链干扰人体正常的激素平衡,危害人类健康,如导致机体代谢紊乱、发育异常、乳腺癌和胎儿畸形等严重的问题,在我国和欧美等国家都明令禁止在动物养殖过程中使用。

[0003] 双酚A(bisphenol A, BPA)(结构见式1)从60年代以来就被广泛应用于制造塑料(奶)瓶、幼儿用的吸口杯、食品和饮料(奶粉)罐内侧涂层,从矿泉水瓶、医疗器械到食品包装的内里,都有它的身影,可说是无处不在。双酚A的结构和性质与雌酚类似,能导致内分泌失调,此外癌症和新陈代谢紊乱导致的肥胖也被认为与其有关。欧盟认为含双酚A的奶瓶会诱发性早熟,从2011年3月2日起,禁止生产含双酚A的婴儿奶瓶。



式1 三种雌酚和双酚A的结构式

[0005] 目前用于雌酚和双酚A的检测的方法主要有高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、毛细管电泳法等。但是这些分析方法需要大型分析仪器,检测时间长、成本高,因此有必要建立更加高效、快速、灵敏的分析测试方法。

[0006] 双抗体夹心法通常被用于大分子抗原(如蛋白质、病毒、肿瘤标志物等)的分析检测,而小分子化合物由于体积较小,通常无法同时结合两个抗体,因此小分子化合物一般难以用双抗体夹心法进行检测。雌酚及双酚A皆为具有对称结构的双官能团线型分子,从理论上讲可以和两个抗体同时结合,是本发明采用双抗体夹心法检测雌酚及双酚A的基础。

## 发明内容

[0007] 本发明提供了一种基于双抗体夹心法的检测雌酚和双酚A的方法,所述的方法快速、高效、灵敏度高,具有很低的检测限(0.037~0.060ng/mL)和较宽的线性范围(0.5~1000ng/mL或0.5~500ng/mL)。

[0008] 本发明所采用的技术方案包括如下步骤:

[0009] 1) 纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器的制备:先将纳米金颗粒通过电化学还原法沉积到处理好的玻碳电极表面,然后通过自组装法将巯基乙酸修饰到纳米金颗粒表面,最后采用活化羧基法将己烷雌酚单克隆抗体偶联到电极表面修饰的纳米金颗粒上,制得电化学免疫传感器;

[0010] 2) 标准溶液的配制:配制含有雌酚或双酚A的磷酸缓冲溶液,作为标准溶液,将含有浓度为0的雌酚或双酚A的标准溶液作为空白标样;

[0011] 3) 工作曲线的建立:首先将步骤1)所述电化学免疫传感器浸入步骤2)所述标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗电化学免疫传感器,然后将其浸入含有0.5mg/L的己烷雌酚单克隆抗体的溶液中进行孵育,之后以磷酸缓冲溶液冲洗,再将其在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安扫描,记录其响应电流;空白标样对应的响应电流记为 $I_0$ ,含有雌酚或双酚A标样的响应电流记为 $I_x$ ,响应电流的变化值 $\Delta I$ 等于 $I_x$ 与 $I_0$ 之差的绝对值;将所述 $\Delta I$ 与标准溶液中雌酚或双酚A浓度的对数值 $IgC$ 绘制成 $\Delta I-IgC$ 工作曲线,采用线性回归法得到 $\Delta I-IgC$ 线性回归方程;

[0012] 4) 雌酚和双酚A的测定:配置含有待测样品的磷酸缓冲溶液,按照与步骤3)相同的方法对所述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的变化值 $\Delta I$ 和 $\Delta I-IgC$ 线性回归方程,得到雌酚和双酚A的含量。

[0013] 所述纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器采用以下方法制备:首先将清洁干净的玻碳电极浸入质量百分浓度为0.5%的氯金酸溶液中,采用恒电位法将氯金酸还原为纳米金颗粒从而沉积于玻碳电极表面;然后将玻碳电极置于1mmol/L的巯基乙酸水溶液中,通过自组装的方法在纳米金颗粒表面修饰巯基乙酸;再将玻碳电极置于含有0.1mol/L的N-溴代琥珀酰亚胺和0.1mol/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液中,活化羧基;在上述活化羧基后的玻碳电极表面滴涂质量浓度为0.5mg/L的己烷雌酚单克隆抗体,4℃条件下反应,制得所述的纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器。

[0014] 所述雌酚分别为己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚。

[0015] 以所述空白标样的测定值标准偏差的3倍作为样品检测限,重复步骤3)可得出雌酚或双酚A样品的检测限。

[0016] 本发明的方法可用于多种实际样品中雌酚和双酚A的检测,所述实际样品包括但不限于食品、土壤、水质、塑料等。

[0017] 本发明提供的方法用于雌酚和双酚A的检测,其检测限分别为己烯雌酚0.060ng/mL、己烷雌酚0.052ng/mL、己二烯雌酚0.047ng/mL、双酚A 0.037ng/mL;线性范围为己烯雌酚和己烷雌酚0.5~1000ng/mL、己二烯雌酚和双酚A 0.5~500ng/mL。

[0018] 本发明具有如下的有益效果:由于采用了双抗体夹心法,提高了检测灵敏度,检测

限很低(0.037~0.060ng/mL),同时具有较宽的线性范围(0.5~1000ng/mL或0.5~500ng/mL)。

[0019] 本发明的保护范围并不以具体实施方式为限,而是由权利要求加以限定。

## 附图说明

[0020] 图1为电化学免疫传感器对己烯雌酚进行检测的DPV曲线图。

[0021] 图2为响应电流的变化值 $\Delta I$ 与己烯雌酚浓度对数值 $IgC$ 的工作曲线图。

[0022] 图3为电化学免疫传感器对己烷雌酚进行检测的DPV曲线图。

[0023] 图4为响应电流的变化值 $\Delta I$ 与己烷雌酚浓度对数值 $IgC$ 的工作曲线图。

[0024] 图5为电化学免疫传感器对己二烯雌酚进行检测的DPV曲线图。

[0025] 图6为响应电流的变化值 $\Delta I$ 与己二烯雌酚浓度对数值 $IgC$ 的工作曲线图。

[0026] 图7为电化学免疫传感器对双酚A进行检测的DPV曲线图。

[0027] 图8为响应电流的变化值 $\Delta I$ 与双酚A浓度对数值 $IgC$ 的工作曲线图。

## 具体实施方式

[0028] 下面通过具体实施例结合附图对本发明所述的技术方案给予进一步详细的说明,但有必要指出以下实施例只用于对发明内容的描述,并不构成对本发明保护范围的限制。

[0029] 实施例1对己烯雌酚标准样品的检测

[0030] 1) 电化学免疫传感器的制备:

[0031] 将直径为3mm的玻碳电极依次用0.3 $\mu$ m和0.05 $\mu$ m的氧化铝粉末在抛光绒布上打磨,依次用无水乙醇-蒸馏水(V/V=1/1)、蒸馏水超声清洗30s,再用蒸馏水冲洗干净。将上述电极插入0.5%的氯金酸溶液中进行恒电位电化学沉积(电压为-0.2V,沉积时间60s),用去离子水冲洗干净后浸入1mmol/L的巯基乙酸溶液中,置于37℃下反应8小时。将上述电极用蒸馏水冲洗干净后置于含0.1mol/L的N-溴代琥珀酰亚胺(NHS)和0.1mol/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲溶液中,活化羧基40分钟。在上述活化羧基后的电极表面滴涂50 $\mu$ L己烷雌酚单克隆抗体(0.5mg/L),置于冰箱中4℃过夜后,用去离子水冲洗干净并浸泡在5%的牛血清白蛋白(BSA)溶液中,在37℃烘箱中孵育30分钟,以封闭剩余的活性位点,即可得到纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器。

[0032] 2) 己烯雌酚标准样品的检测

[0033] 将步骤1)中所述的电化学免疫传感器浸入含有一系列不同浓度(包括浓度为零)的己烯雌酚标准溶液中,在37℃孵育30分钟,用磷酸缓冲溶液冲洗干净,然后浸入己烷雌酚单克隆抗体(0.5mg/L)溶液中在37℃孵育30分钟,用磷酸缓冲溶液冲洗干净后置于2mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,记录相对应的响应电流。DPV曲线图如图1所示,图中曲线从上到下浓度依次为0ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、100ng/mL、200ng/mL和1000ng/mL。

[0034] 将己烯雌酚浓度为零时所对应的响应电流记为 $I_0$ ,与不同浓度己烯雌酚所对应的响应电流记为 $I_x$ ,计算响应电流变化值 $\Delta I = |I_x - I_0|$ ,以 $\Delta I$ 对己烯雌酚浓度对数值 $Ig C$ (ng/mL)作图可得 $\Delta I-IgC$ 工作曲线。工作曲线图如图2所示,采用线性回归法得到其 $\Delta I-$

IgC线性回归方程为  $\Delta I (\mu A) = 0.90073 + 3.91741 IgC (ng/mL)$  , 己烯雌酚的浓度在0.5~1000ng/mL范围内IgC与  $\Delta I$ 成正比, 线性相关系数为0.99467。以空白标样测定值标准偏差的3倍 ( $3\sigma$ ) 作为样品检测限, 重复10次实验得出, 以上述方法检测己烯雌酚的样品检测限为0.060ng/mL。

[0035] 实施例2对己烷雌酚标准样品的检测

[0036] 以与实施例1步骤1) 完全相同的方法制备纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器, 将其浸入含有一系列不同浓度(包括浓度为零)的己烷雌酚标准溶液中, 再用与实施例1步骤2) 相同的方法进行DPV扫描和数据记录并进行处理。DPV曲线图如图3所示, 图中曲线从上到下浓度依次为0ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL和1000ng/mL。得到响应电流变化值  $\Delta I$ 与己烷雌酚浓度对数值IgC在己烷雌酚浓度在0.5~1000ng/mL之间时成线性关系, 工作曲线图如图4所示, 其线性回归方程为  $\Delta I (\mu A) = 2.94885 + 4.53102 IgC (ng/mL)$  , 线性相关系数为0.99420。以空白标样测定值标准偏差的3倍 ( $3\sigma$ ) 作为样品检测限, 重复10次实验得出, 以上述方法检测己烷雌酚的样品检测限为0.052ng/mL。

[0037] 实施例3对己二烯雌酚标准样品的检测

[0038] 以与实施例1步骤1) 完全相同的方法制备纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器, 将其浸入含有一系列不同浓度(包括浓度为零)的己二烯雌酚标准溶液中, 再用与实施例1步骤2) 相同的方法进行DPV扫描和数据记录并进行处理。DPV曲线图如图5所示, 图中曲线从上到下浓度依次为0ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL和500ng/mL。得到响应电流变化值  $\Delta I$ 与己二烯雌酚浓度对数值IgC在己二烯雌酚浓度在0.5~500ng/mL之间时成线性关系, 工作曲线图如图6所示, 其线性回归方程为  $\Delta I (\mu A) = 3.58971 + 4.99674 IgC (ng/mL)$  , 线性相关系数为0.99713。以空白标样测定值标准偏差的3倍 ( $3\sigma$ ) 作为样品检测限, 重复10次实验得出, 以上述方法检测己二烯雌酚的样品检测限为0.047ng/mL。

[0039] 实施例4对双酚A标准样品的检测

[0040] 以与实施例1步骤1) 完全相同的方法制备纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器, 将其浸入含有一系列不同浓度(包括浓度为零)的双酚A标准溶液中, 再用与实施例1步骤2) 相同的方法进行DPV扫描和数据记录并进行处理。DPV曲线图如图7所示, 图中曲线从上到下浓度依次为0ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL和500ng/mL。得到响应电流变化值  $\Delta I$ 与双酚A浓度对数值IgC在双酚A浓度在0.5~500ng/mL之间时成线性关系, 工作曲线图如图8所示, 其线性回归方程为  $\Delta I (\mu A) = 6.10178 + 6.4287 IgC (ng/mL)$  , 线性相关系数为0.99314。以空白标样测定值标准偏差的3倍 ( $3\sigma$ ) 作为样品检测限, 重复10次实验得出, 以上述方法检测双酚A的样品检测限为0.037ng/mL。

[0041] 实施例5奶粉中标己烯雌酚的测定

[0042] 1) 奶粉样品的处理: 称取  $1 \pm 0.0050g$  奶粉于到10mL的样品管中, 加入己烯雌酚标准溶液和6mL正己烷, 混合物超声分散30分钟, 于2000r/m下离心10分钟, 将上清液转移至氮吹管中, 残渣用3mL的相同提取液重复提取1次, 上清液合并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于50℃温度下浓缩蒸发, 浓缩物加入1mL的pH为7.4磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分

析。

[0043] 2) 奶粉样品中加标己烯雌酚的测定: 分别取不同体积的奶粉提取液样品, 加入到磷酸缓冲溶液中配制成一系列含有不同浓度己烯雌酚且总体积均为200 $\mu$ L的孵育液。将纳米金/巯基乙酸/己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器浸入上述孵育液中, 在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟, 用磷酸缓冲溶液冲洗干净, 然后浸入己烷雌酚单克隆抗体 (0.5mg/L) 溶液中在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟, 用磷酸缓冲溶液冲洗干净后置于2mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描, 记录相对应的响应电流。通过采用与实施例1中步骤2) 相同的方法得到的响应电流变化值  $\Delta I$  与己烯雌酚浓度对数值 IgC 的  $\Delta I$ -IgC 工作曲线, 计算出己烯雌酚的浓度, 检测回收率结果如表1。

[0044] 表1为免疫传感器检测加标奶粉中的己烯雌酚浓度的回收率

[0045]	己烯雌酚添加量 (ng/mL)	己烯雌酚测定量 (ng/mL)	回收率(%)
	5.0	5.75, 4.53, 5.98	115.0, 90.6, 119.6
	50.0	40.73, 52.56, 46.82	81.5, 105.1, 93.6,
	200.0	209.64, 231.92, 216.36	104.8, 116.0, 108.2

[0046] 实施例6猪肉中加标己烷雌酚的测定

[0047] 1) 猪肉样品的处理: 称取  $1 \pm 0.0050$ g 猪肉于到10mL的样品管中, 加入己烷雌酚标准溶液和3mL乙腈-丙酮提取液 (V:V=4:1), 混合物超声分散30分钟, 于2000r/m下离心10分钟, 将上清液转移至氮吹管中, 残渣用3mL的相同提取液重复提取1次, 上清液合并并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于50 $^{\circ}$ C温度下浓缩蒸发, 浓缩物加入1mL的pH为7.4磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0048] 2) 猪肉样品中加标己烷雌酚的测定: 分别取不同体积的猪肉提取液样品, 加入到磷酸缓冲溶液中配制成一系列含有不同浓度己烷雌酚且总体积均为200 $\mu$ L的孵育液。将纳米金/巯基乙酸/己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器浸入上述孵育液中, 以与实施例1中步骤2) 相同的方法得到的响应电流变化值  $\Delta I$  与己烷雌酚浓度对数值 IgC 的  $\Delta I$ -IgC 工作曲线, 计算出己烷雌酚的浓度, 检测回收率结果如表2。

[0049] 表2为免疫传感器检测加标猪肉中的己烷雌酚浓度的回收率

[0050]	己烷雌酚添加量 (ng/mL)	己烷雌酚测定量 (ng/mL)	回收率(%)
	5.0	5.47, 5.30, 4.16	109.4, 106.0, 83.2
	50.0	52.73, 41.58, 47.33	105.5, 83.2, 94.7
	200.0	237.24, 172.38, 205.44	118.6, 86.2, 102.7

[0052] 按照与实施例6基本相同的方法, 也可进行各种动物源性食品, 包括猪、牛、羊等常

用动物的肉制品、内脏等中含有的己烯雌酚、己二烯雌酚的检测。

[0053] 实施例7土壤样品中加标己二烯雌酚的测定

[0054] 1) 土壤样品的处理:称取 $1 \pm 0.0050$ g土壤,研磨粉碎后加入到10mL的样品管中,加入己二烯雌酚标准溶液和3mL乙腈-丙酮提取液( $V:V=4:1$ ),混合物超声分散30分钟,于2000r/m下离心10分钟,将上清液转移至氮吹管中,残渣用3mL的相同提取液重复提取1次,上清液合并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于50℃温度下浓缩蒸发,浓缩物加入1mL的pH为7.4磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0055] 2) 土壤样品中加标己二烯雌酚的测定:分别取不同体积的土壤提取液样品,加入到磷酸缓冲溶液中配制成一系列含有不同浓度己二烯雌酚且总体积均为200 $\mu$ L的孵育液。将纳米金/巯基乙酸/己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器浸入上述孵育液中,以与实施例1中步骤2)相同的方法得到的响应电流变化值 $\Delta I$ 与己二烯雌酚浓度对数值IgC的 $\Delta I$ -IgC工作曲线,计算出己二烯雌酚的浓度,检测回收率结果如表3。

[0056] 表3为免疫传感器检测加标土壤中的己二烯雌酚浓度的回收率

[0057]	己二烯雌酚添加量 (ng/mL)	己二烯雌酚测定量 (ng/mL)	回收率(%)
	5.0	4.42, 4.08, 4.34	88.4, 81.6, 86.8
	50.0	42.65, 40.68, 45.16	85.3, 81.4, 90.3
	200.0	183.46, 166.52, 165.01	91.7, 83.3, 82.5

[0058] 实施例8水中加标双酚A的测定

[0059] 量取1.0mL水样,加入不同浓度的双酚A标准溶液,再用磷酸缓冲溶液配制成一系列含有不同浓度双酚A且总体积均为2.0mL的孵育液。将纳米金/巯基乙酸/己烷雌酚单克隆抗体修饰的电化学免疫传感器浸入上述孵育液(200 $\mu$ L)中,以与实施例1中步骤2)相同的方法得到的响应电流变化值 $\Delta I$ 与双酚A浓度对数值IgC的 $\Delta I$ -IgC工作曲线,计算出双酚A的浓度,检测回收率结果如表4。

[0060] 表4为免疫传感器检测加标水样中的双酚A浓度的回收率

[0061]	双酚 A 添加量 (ng/mL)	双酚 A 测定量 (ng/mL)	回收率(%)
	5.0	4.56, 4.17, 5.31	91.2, 83.4, 106.2
	50.0	56.25, 46.30, 47.55	112.5, 92.6, 95.1
	200.0	174.69, 219.42, 167.87	87.3, 109.7, 83.9



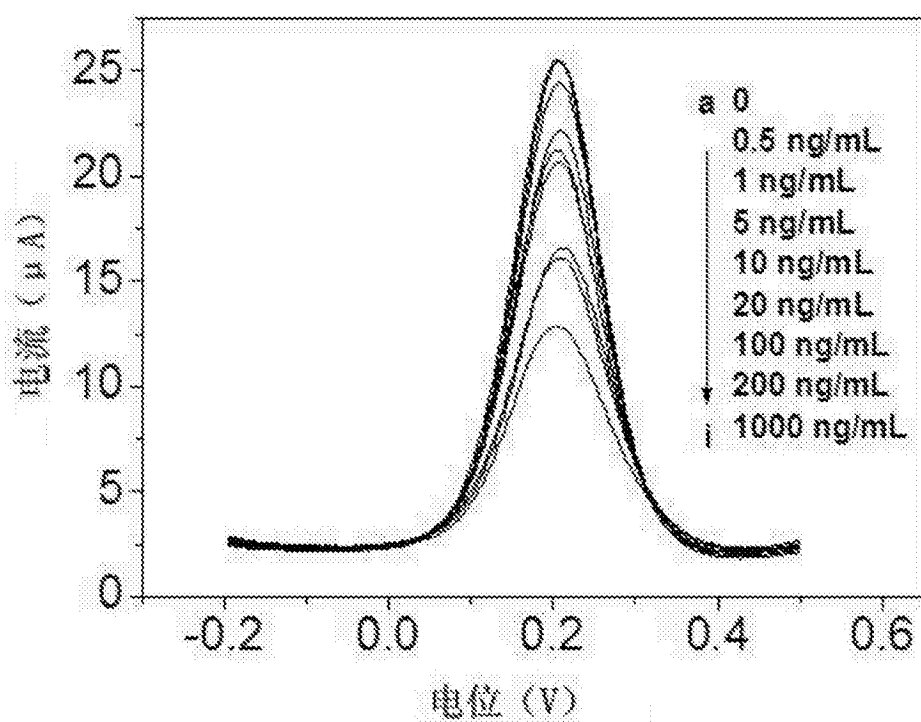


图1

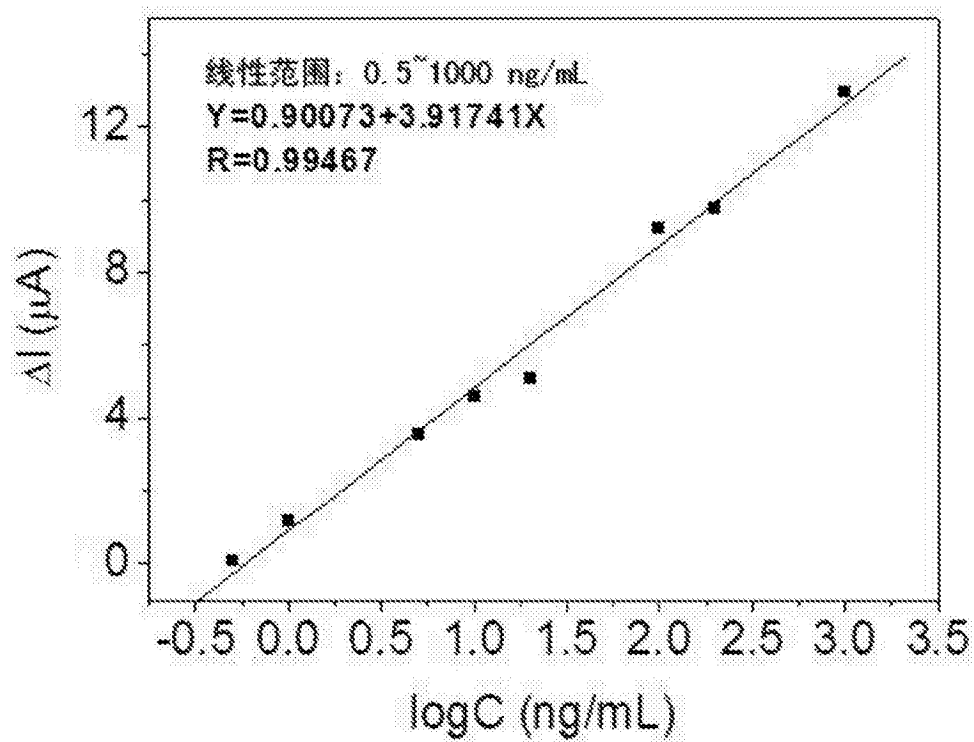


图2

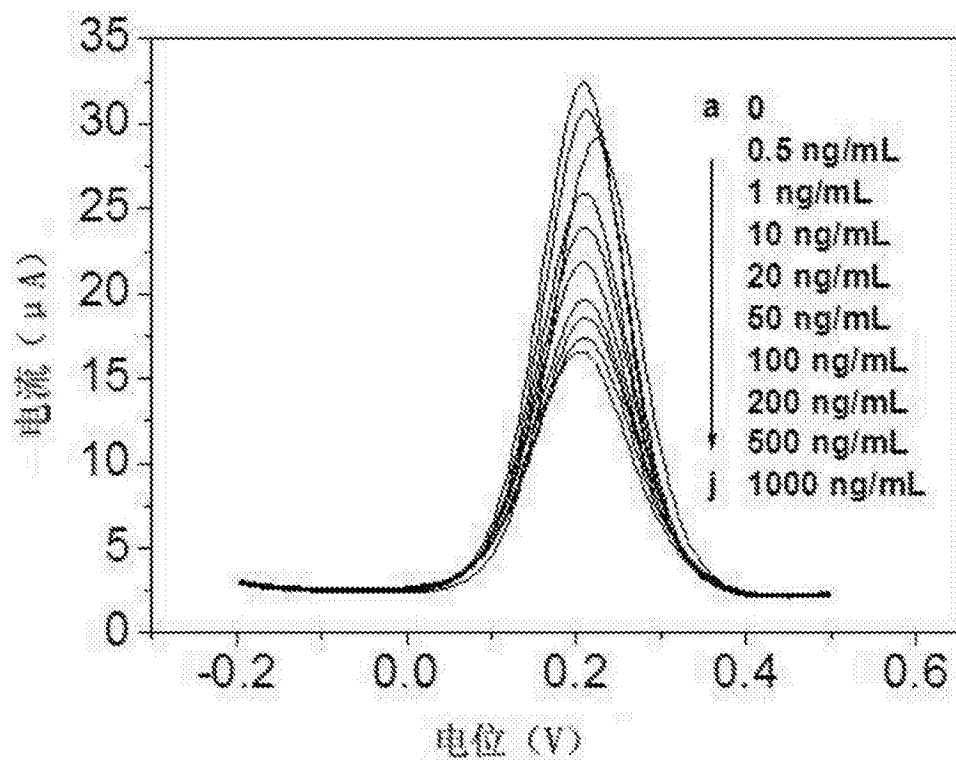


图3

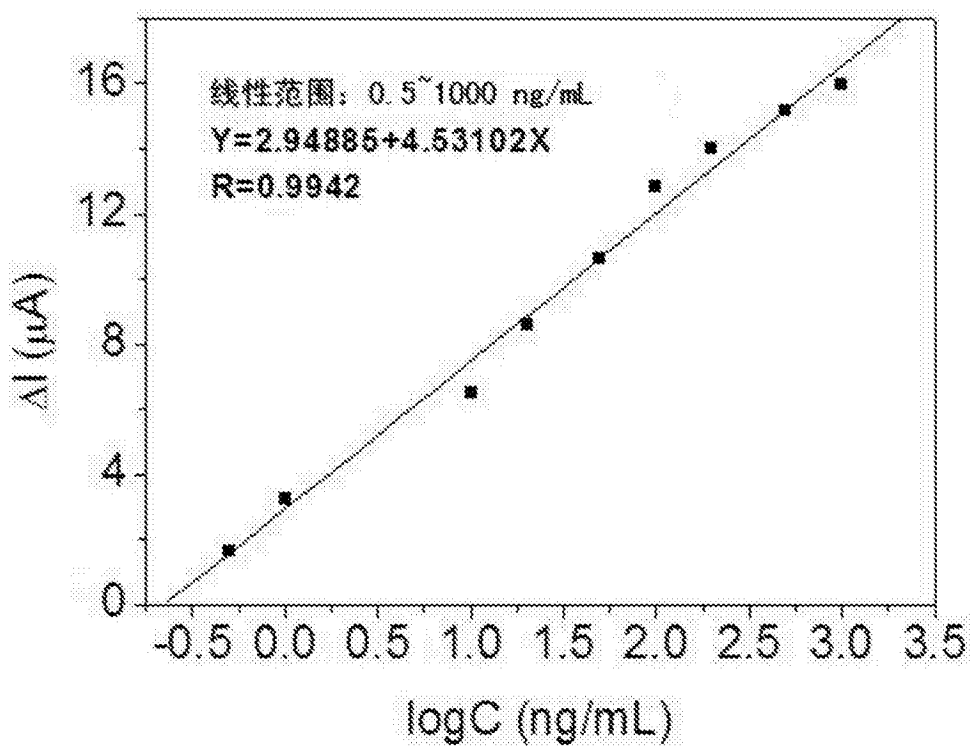


图4

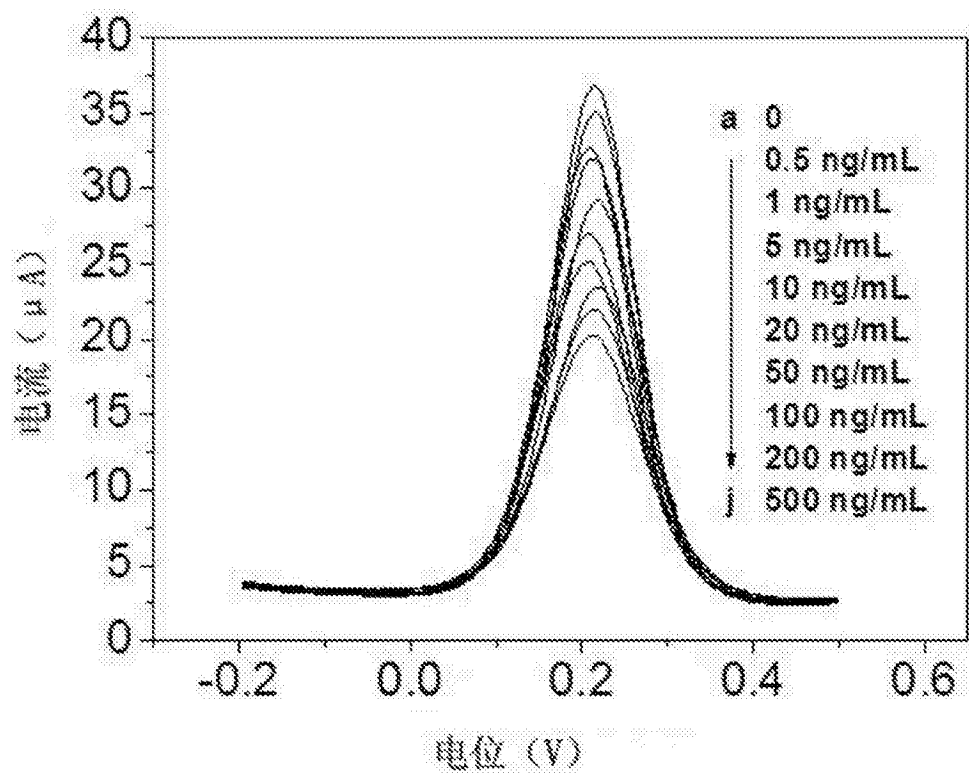


图5

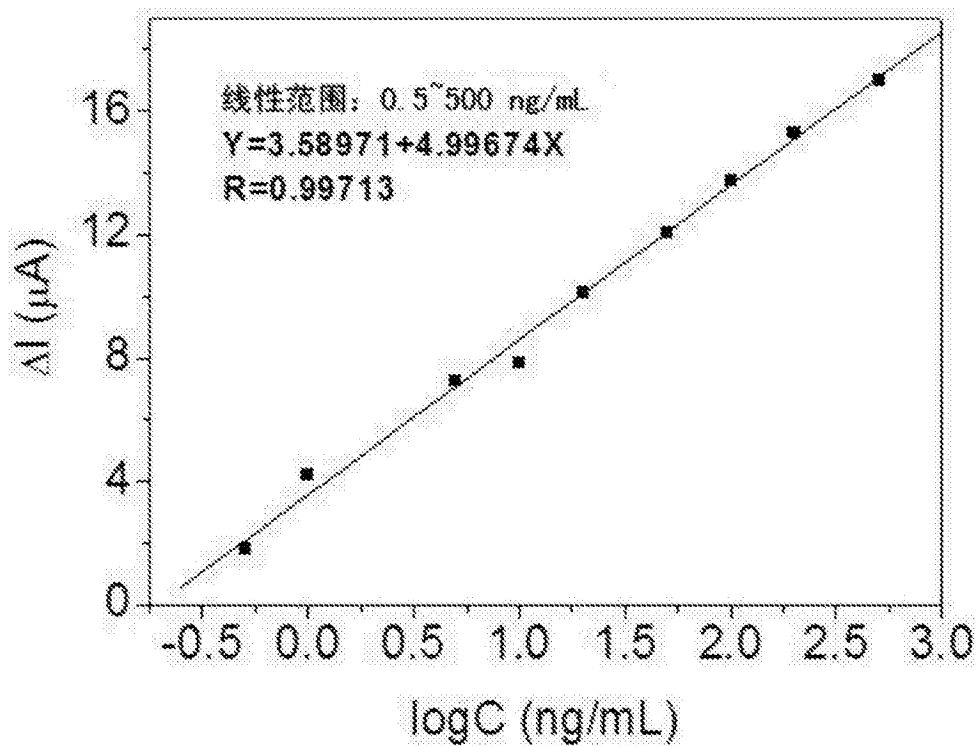


图6

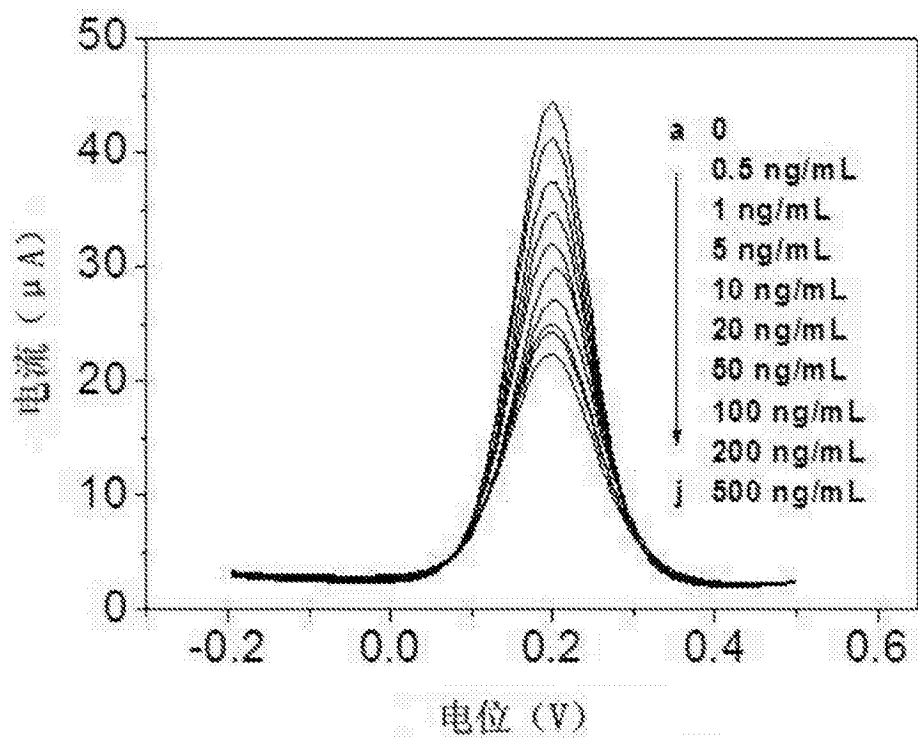


图7

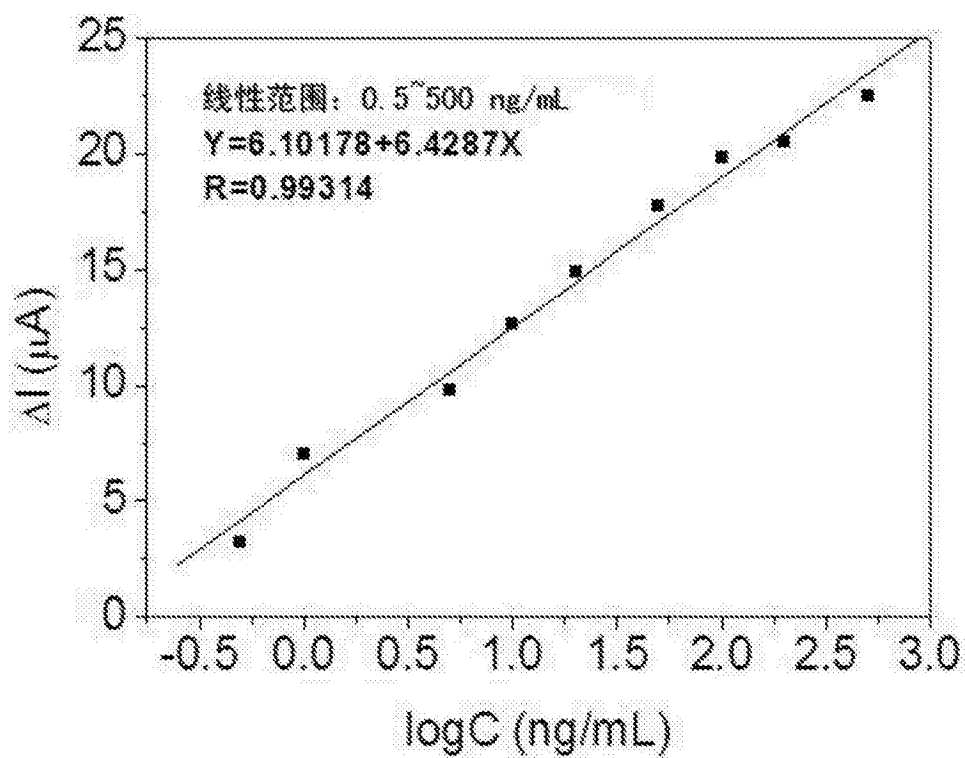


图8

专利名称(译)	一种基于双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106841639A</a>	公开(公告)日	2017-06-13
申请号	CN201710010686.6	申请日	2017-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	邵科峰 魏梦 赵波 王雅娟 朱永强		
发明人	邵科峰 魏梦 赵波 王雅娟 朱永强		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531 G01N27/48 G01N27/327		
CPC分类号	G01N33/74 G01N27/327 G01N27/48 G01N33/531 G01N33/54346 G01N33/577		
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双抗体夹心法检测雌酚和双酚A的方法。所述的方法为：首先制备表面修饰纳米金-巯基乙酸-己烷雌酚单克隆抗体的电化学免疫传感器，然后采用双抗体夹心法对待测样品中的雌酚或双酚A进行检测，通过相关数据的分析与推导，即可得到雌酚或双酚A的浓度。本发明提供的方法检测己烯雌酚的检测限为0.06ng/mL，线性范围为0.5~1000ng/mL；检测己烷雌酚的检测限为0.052ng/mL，线性范围为0.5~1000ng/mL；检测己二烯雌酚的检测限为0.047ng/mL，线性范围为0.5~500ng/mL；检测双酚A的检测限为0.037ng/mL，线性范围为0.5~500ng/mL。本发明所述的检测方法快速、高效、灵敏度高，具有很低的检测限和较宽的线性范围。

