



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101718742 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910199159.X

(22) 申请日 2009.11.20

(71) 申请人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

(72) 发明人 黄杉生 赵国庆 岳增连 彭斌

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 吴瑾瑜

(51) Int. Cl.

G01N 27/40 (2006.01)

G01N 27/403 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

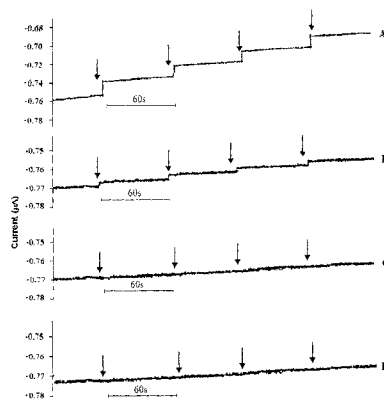
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种用于检测阿特拉津的金纳米通道膜及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测阿特拉津的氯修饰的金纳米通道膜, 及利用该金纳米通道膜检测阿特拉津的方法。以聚碳酸酯膜为基膜, 采用化学沉积法制备直径 20 ~ 50nm 的 Au 纳米通道膜, 氯离子通过金 - 氯共价键自组装至金纳米通道孔壁上。检测方法为, 将上述氯修饰的金纳米通道膜置于进样池和透过池之间, 进样池中加入含阿特拉津抗体的缓冲液, 透过池中加入缓冲液, 维持两池液面平行, 施加电压, 测定基底电流; 向进样池中加入含待测样品的缓冲液, 通过电化学工作站进行电流信号测试; 发生电流突降则说明待测样品中含有阿特拉津。本发明检测效率高, 特异性强, 可测定浓度下限为 $1.7 \times 10^{-10} \text{M}$ 的阿特拉津, 具有较好的应用前景。



1. 一种用于检测阿特拉津的氯修饰的金纳米通道膜,其特征在于,制备方法如下:

(a) 以多孔聚碳酸酯膜为基膜,采用化学沉积法在孔径为 80nm ~ 150nm 的多孔聚碳酸酯膜上沉积金:将多孔聚碳酸酯膜洗涤后在 0.01M ~ 0.05M SnCl_2 溶液浸泡 30 ~ 120min,使 Sn^{2+} 均匀地吸附在基膜及膜孔表面;取出清洗后在 N_2 气保护下将膜在 0.01M ~ 0.04M $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ 溶液中浸没 5 ~ 30min,洗涤后浸入 $\text{pH} = 9.5 \sim 10.5$ 的 $6 \times 10^{-3}\text{M} \sim 9 \times 10^{-3}\text{M}$ 亚硫酸金钠沉积溶液中,在 $0 \sim 10^\circ\text{C}$ 下化学镀金 4 ~ 10h;洗涤并用 HNO_3 除去未反应的 Ag,即得到金纳米通道阵列膜;

(b) 氯离子的修饰:将所制得的金纳米通道阵列膜活化清洗后在含 0.005M ~ 0.02M Cl^- 的溶液中浸泡 10 ~ 16h,通过金-氯键使氯离子共价键单层自组装在金纳米通道阵列膜上,得到氯修饰的金纳米通道膜。

2. 权利要求 1 所述的一种用于检测阿特拉津的氯修饰的金纳米通道膜,其特征在于,其孔径为 20 ~ 50nm。

3. 权利要求 1 所述的一种用于检测阿特拉津的氯修饰的金纳米通道膜,其特征在于,步骤 (b) 中,利用体积浓度为 60% ~ 80% 的硫酸双氧水混合液浸泡 2 ~ 20min 对金纳米通道阵列膜进行活化。

4. 一种检测阿特拉津的方法,其特征在于,将权利要求 1 ~ 3 任一项所述氯修饰的金纳米通道膜置于 U 形池的进样池和透过池之间,工作电极插入进样池,参比电极插入透过池;

在进样池中加入含阿特拉津抗体的缓冲液,在透过池中加入不含有阿特拉津抗体的缓冲液,维持两池中的液面平行,在参比电极和工作电极两端施加电压,测定基底电流;

随后向进样池中加入含有待测样品的缓冲液,通过电化学工作站进行电流信号测试;发生电流突降则说明待测样品中含有阿特拉津。

5. 权利要求 4 所述一种检测阿特拉津的方法,其特征在于,所述的缓冲液为 pH 为 7 ~ 8、浓度为 0.005M ~ 0.02M 的 PBS 溶液。

6. 权利要求 4 所述一种检测阿特拉津的方法,其特征在于,所述将待测样品与 BSA 键合得到阿特拉津免疫原。

一种用于检测阿特拉津的金纳米通道膜及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及材料领域和传感技术领域,具体地说,是一种基于纳米通道膜材料上的分子水平膜检测技术。

背景技术

[0002] 近年来,随着纳米技术的飞速发展,纳米技术与当前很多技术相互碰撞与结合,产生了许多新兴的课题与方向。纳米通道膜技术将膜检测的低能耗、操作简单、灵敏度高、无污染并可回收再利用的优点与纳米技术的纳米尺度操控相结合,能够对目标物质进行分子水平上的检测。

[0003] 在农业的发展中,农药和除草剂发挥着重要的作用,据估计,全世界农业由于病、虫、草害每年粮食损失占产量的一半左右,使用农药和除草剂大概可以夺回其中的 30%,而农药和除草剂所带来的收益大体为其费用的 4 倍。但是,由于长期使用农药和除草剂,给环境带来严重污染。

[0004] 阿特拉津 (Atrazine, 缩写为 ATR, 又名莠去津, 2- 氯 -4- 乙胺 -6- 异丙胺 -1, 3, 5- 三嗪, $C_8H_{14}ClN_5$) 属均三氮苯类化合物, 为三嗪类除草剂, 水溶性适中 ($33 \mu\text{g/L}$, 22°C), 对大部分一年生双子叶杂草具有很好的防治作用, 是近 50 年来世界上最为广泛使用的除草剂。其主要问题是具有淋溶性, 易被雨水、灌溉水淋溶至较深土层, 或是随地表径流进入河流、湖泊和水库, 对地下水和地表水造成污染, 大量污染物将由颗粒物吸附而蓄存在沉积物中, 在适当条件下重新释放而成为二次污染源。它在土壤中残留期长, 易对后茬敏感作物如小麦、大豆、水稻等产生药害。ATR 生态毒性表明, $0.1 \mu\text{g/L}$ 的 ATR 水溶液就能导致青蛙产生雌雄同体现象; 浓度为 $25 \mu\text{g/L}$ 的 ATR 水中观察, 雄性青蛙体内睾丸激素的浓度显著下降。长期接触 ATR 会导乳腺癌和卵巢癌的发生, ATR 已被美国环保局列为致癌物。ATR 会影响人体的内分泌系统以及动物的生殖繁衍, 美国环保局的初步评价认为, ATR 属于环境内分泌干扰物。德、法和比利时等国家已禁止使用 ATR, 美国限定一级饮用水中最大标准含量为 $3.0 \mu\text{g/L}$ 。加拿大饮用水中规定 ATR 及其代谢产物的最大浓度为 $5.0 \mu\text{g/L}$ 。我国 ATR 最大残留标准 (GB16323-1996) 中规定其在玉米、甘蔗中的含量 $\leq 0.05\text{mg/kg}$, 在地表水 I、II、III 类水域中的特定项目标准值 $\leq 3.0 \mu\text{g/L}$ (GHZBI-999)。但地下水中 ATR 残留标准及地表水 / 地下水中降解物残留标准至今仍未制定。

[0005] 由于 ATR 长期使用残留, 及其它的有毒代谢物、降解物、转化物的存在对人体的危害是难以估量的。国际上对农药最大残留量要求越来越严格, 这些都给农药残留检测技术提出了更高的要求。

[0006] 为了控制和遏制这种危险污染物, 迫切需要一种快速检测这种有机毒素的方法。一些既定的分析法, 如薄层色谱法, 气相色谱, 高效液相色谱法, 气质联用, 被广泛用于在痕量水平上检测和定量分析农药。然而, 这些方法检测农药复杂、费时, 仪器不易携带, 需要试样量较多, 在连续监测及现场测定中受到限制。因此, 发展高灵敏、对 ATR 及其代谢物、降解物、转化物有特异性响应的检测技术对国民健康和经济发展无疑具有重要意义。

[0007] 本专利尝试基于金纳米通道膜技术,实现阿特拉津的检测,为分析检测三嗪类除草剂提出了一个新的途径,也为检测其他类除草剂提供一个新思路。

发明内容

[0008] 本发明旨在提供一种用于检测阿特拉津的金纳米通道膜。

[0009] 本方法的目的在于,将上述金纳米通道膜技术用于分离检测阿特拉津,可以更好的应用于农药的分析检测中。

[0010] 技术方案为,一种用于检测阿特拉津的氯修饰的金纳米通道膜,其特征在于,制备方法如下:

[0011] (a) 以多孔聚碳酸酯膜为基膜,采用化学沉积法在孔径为 80nm ~ 150nm 的多孔聚碳酸酯膜(PC膜)上沉积金;将PC膜洗涤后在 0.01M ~ 0.05M SnCl_2 溶液浸泡 30 ~ 120min,使 Sn^{2+} 均匀地吸附在基膜及膜孔表面;取出清洗后在 N_2 气保护下将膜在 0.01M ~ 0.04M $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ 溶液中浸没 5 ~ 30min,洗涤后浸入 pH = 9.5 ~ 10.5 的 $6 \times 10^{-3}\text{M} \sim 9 \times 10^{-3}\text{M}$ 亚硫酸金钠沉积溶液中,在 0 ~ 10°C 下化学镀金 4 ~ 10h;洗涤并用 HNO_3 除去未反应的 Ag,即得到金纳米通道阵列膜;

[0012] (b) 氯离子的修饰:将所制得的金纳米通道膜活化清洗后在含 0.005M ~ 0.02M Cl^- 的溶液中浸泡 10 ~ 16h,通过金-氯键使氯离子共价键单层自组装在金纳米通道膜上。

[0013] 步骤 (b) 中,利用体积浓度为 60% ~ 80% 的硫酸双氧水混合液浸泡 5min 对金纳米通道膜进行活化。

[0014] 上述方法所制备的氯修饰的金纳米通道膜,孔径为 20 ~ 50nm。

[0015] 一种检测阿特拉津的方法,将上述所制备的氯修饰的金纳米通道膜置于 U 形池的进样池和透过池之间,工作电极插入进样池,参比电极插入透过池;在进样池中加入含阿特拉津抗体的缓冲液,在透过池中加入不含有阿特拉津抗体的缓冲液,维持两池中的液面平行,在参比电极和工作电极两端施加电压(一般为 0.8 ~ 1.5V),测定基底电流;随后向进样池中加入含有待测样品的缓冲液,通过电化学工作站进行电流信号测试;发生电流突降则说明待测样品中含有阿特拉津。

[0016] 所述的缓冲液为 pH 为 7 ~ 8、浓度为 0.005M ~ 0.02M 的 PBS 溶液。

[0017] 在一定电场下,电解质离子通过纳米通道时,产生稳定的电流。阿特拉津加入后,与进样池中的抗体形成复合物,从而对电解质的流动产生一定的阻碍作用,引起相应的电流降。而其他除草剂,如百草枯、敌草隆等,不与抗体结合,不会形成比抗体更大的分子,无电流降的产生。

[0018] 为提高灵敏度,可将待测样品与 BSA 键合,使阿特拉津与 BSA 键合制成阿特拉津免疫原;制备方法为如下步骤:

[0019] 将阿特拉津与 3-巯基丙酸在碱性条件下加热回流,除去溶剂后酸化得到的沉淀为阿特拉津-巯基丙酸衍生物;再用双环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺将阿特拉津-巯基丙酸衍生物连接到牛血清白蛋白,得到阿特拉津免疫原。

[0020] 当阿特拉津免疫原加入后,与进样池中的抗体形成 MPAD-BSA\ 抗体复合体,它较单独的抗体在体积上要大,从而对电解质的流动产生一定的阻碍作用,引起相应的电流降。而其他除草剂,如百草枯、敌草隆等,不与抗体结合,不会形成比抗体更大的分子,无电流降

的产生。这样可以检测阿特拉津含量较低的样品。

[0021] 本发明的方法检测阿特拉津,检测效率高,特异性强,可测定浓度下限为 1.7×10^{-10} M 的阿特拉津,具有较好的应用前景。

附图说明

[0022] 图 1 为阿特拉津免疫原制备路线图

[0023] 图 2 为检测装置简图,修饰了氯离子的 Au 纳米通道膜置于 U 形池中间,阿特拉津免疫原或阿特拉津与抗体结合后,形成更大体积的大分子,对电解质的流动产生阻碍作用,引起电流的降低。其他除草剂如百草枯、敌草隆不与抗体结合,不会形成比抗体更大的分子,无电流降的产生。

[0024] 图 3 为实施例 1 产品场发射扫描电子显微镜图;(a) 为聚碳酸酯膜化学镀金 7h 后的场发射扫描电子显微镜图;(b) 为将膜用二氯甲烷溶解后的透射电子显微镜图。

[0025] 图 4 为含有阿特拉津抗体的进样池中逐次加入阿特拉津免疫原后测得电流-时间图。插图阿特拉津免疫原加入前电流响应,加入前电流可达到稳定态,免疫原加入后引起明显的电流降低。

[0026] 图 5 为实施例 4 中阿特拉津免疫原 (A)、阿特拉津 (B)、百草枯 (C)、敌草隆 (D) 分别加入时电流-时间的比较。加入阿特拉津免疫原及阿特拉津时电流即出现突然降低,并且,加入阿特拉津免疫原时产生比加入单独的阿特拉津大的电流降;而加入的百草枯、敌草隆不与阿特拉津抗体结合,无更大体积分子形成,故不会出现电流的突降。

具体实施方式

[0027] 下面结合具体实例,进一步阐述本发明。应该指出的是,这些实例仅用于说明本发明而不限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明描述的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0028] 下列实例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如操作手册,或按照制造厂商所建议的条件。

[0029] 实施例 1 金纳米通道膜的制备

[0030] 以多孔聚碳酸酯膜为基膜,采用化学沉积法在 100nm 的多孔聚碳酸酯 (PC) 膜上沉积金。将 PC 膜浸入无水甲醇中,超声震荡 5min,洗去基膜上吸附的杂质;然后将清洗后的 PC 膜浸入 0.025M SnCl_2 溶液 45min,不断轻微摇动溶液使 Sn^{2+} 均匀地吸附在基膜及膜孔表面,取出用甲醇漂洗 2 次;在 N_2 气保护下将膜浸入 0.029M $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ 溶液中 15min,取出用甲醇洗 3 次,然后再水洗 3 次,浸入浓度为 7.9×10^{-3} M 亚硫酸金钠沉积溶液 ($\text{pH} = 10.00$) 中。在 4°C 下化学镀金 7h 后取出用水洗 4 次,再用 25% HNO_3 浸 12h 除去未反应的 Ag,即得到 Au 纳米通道阵列膜。

[0031] 图 3(a) 为化学镀金 7h 后的场发射扫描电子显微镜图,可见其内径约为 35nm;图 3(b) 为将膜 Au 纳米通道阵列用二氯甲烷溶解后的透射电子显微镜图,表明化学镀金 7h 后,可以得到形状良好的金纳米通道。

[0032] 实施例 2 氯离子的修饰

[0033] 将所制得的 Au 纳米通道膜利用 piranha 溶液 ($V_{H_2O_2}:V_{H_2SO_4} = 3:7$) 浸泡 5min 活化,取出用水冲洗三次,浸入 0.01M 的 KCl 水溶液中 12h,氯离子即通过金-氯键自组装在 Au 纳米通道膜上,修饰完毕后将膜取出用甲醇清洗三次, N_2 吹干,得到氯修饰的金纳米通道。

[0034] 实施例 3 阿特拉津免疫原的制备

[0035] 首先制备阿特拉津-巯基丙酸衍生物 (MPAD),再进一步制备阿特拉津免疫原,途径见图 1。

[0036] 将含有 5.0mM 阿特拉津的 50ml 乙醇在搅拌条件下慢慢加入含 0.48M 3-巯基丙酸和 10.8mM KOH 的 10mL 乙醇中,110°C 下加热回流 6h。溶剂进行减压蒸发,剩余物加入 25mL 含 5% (质量分数) $NaHCO_3$ 的水溶液,用 10mL $CHCl_3$ 清洗三次,然后用 6M 盐酸酸化至 pH 为 2,以促使得到的衍生物立即沉淀。

[0037] 倾出上清液,将经真空干燥后的沉淀用 1mL 乙醇再次溶解,进一步提纯,然后 37°C 下真空干燥,得到 MPAD 晶体。将 50 μ mol MPAD、125 μ mol 二环己基碳二亚胺 (DCC)、125 μ mol N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 1mL 二甲基亚砜 (DMF) 混合,室温下反应 4h,然后 10000r/pm 离心 5min。取 150 μ L 上清液加入到 850 μ L 含 1.47×10^{-4} M 牛血清白蛋白 (BSA) 硼酸液 (pH = 9.00) 中,4°C 下反应 22h。然后将上述混合物装入透析袋内用 PBS (pH = 7.40) 透析。

[0038] 实施例 4 电流信号的测定

[0039] 采用 U 形池作为阿特拉津分离测定的装置,U 形池分进样池、透过池两部分,将 Au 纳米通道膜置于进样池和透过池中间,膜的有效透过面积为 $1.96cm^2$,进样池和透过池容积分别为 6mL。以铂丝电极作为工作电极和参比电极,工作电极插入进样池,参比电极插入透过池,工作电极和参比电极连接到电化学工作站,并通过电化学工作站进行电流信号测试。如图 2 所示。

[0040] 在 U 形连通池的进样池中加入 0.01M、pH 为 7.40 的 PBS 溶液 4.0mL、1.0mL 含阿特拉津抗体的 PBS (0.585mg/L),同时透过池中加入 PBS 溶液 5mL,维持两池中的液面平行,在参比电极和工作电极两端施加 1.0V 电压,室温下测定基底电流。随后加入阿特拉津免疫原,每 60s 向进样池中加入 2.5×10^{-8} mol 阿特拉津免疫原 (以阿特拉津含量计),测定电流-时间曲线;然后分别用除草剂阿特拉津、百草枯、敌草隆依次代替阿特拉津免疫原进行试验,每次都加入量也是 2.5×10^{-8} mol,测定相应的电流响应情况。结果如图 4、5 所示。

[0041] 在一定电场下,电解质离子通过纳米通道时,产生稳定的电流。逐步加入阿特拉津免疫原及阿特拉津时电流即出现突然降低,并且加入阿特拉津免疫原时产生比加入单独的阿特拉津更大的电流降。

[0042] 由图 4 可见,加入阿特拉津免疫原后,由于阿特拉津免疫原-抗体复合体的形成,产生更大体积的分子,对电解质的流动产生阻碍作用,与单独加入阿特拉津相比,电流出现明显的降低。图 4 中的插图为阿特拉津免疫原加入前电流响应,由此可见,阿特拉津免疫原加入前电流可达到稳定态,阿特拉津免疫原加入后引起明显的电流降低。

[0043] 由图 5 可见,加入阿特拉津免疫原 (A) 和阿特拉津 (B) 引起明显电流降,而加入的百草枯 (C)、敌草隆 (D) 因为不与阿特拉津抗体结合,无更大体积分子形成,故不会出现电流的突降。

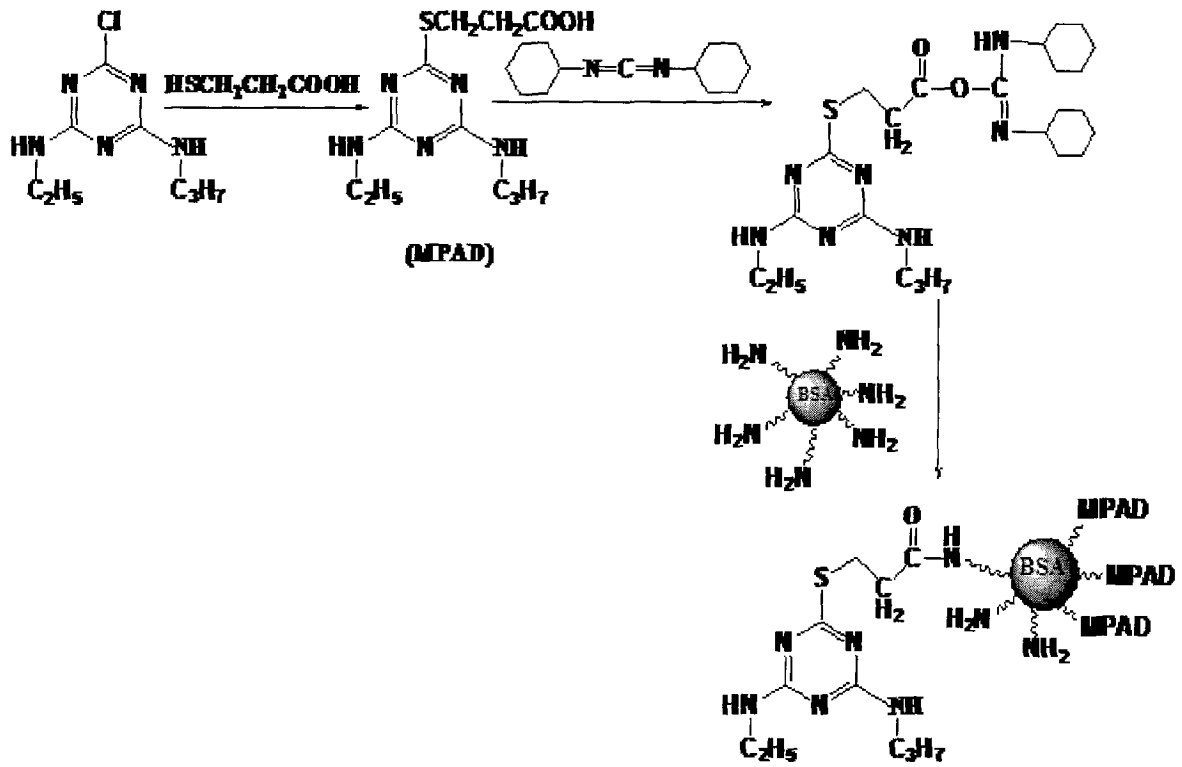


图 1

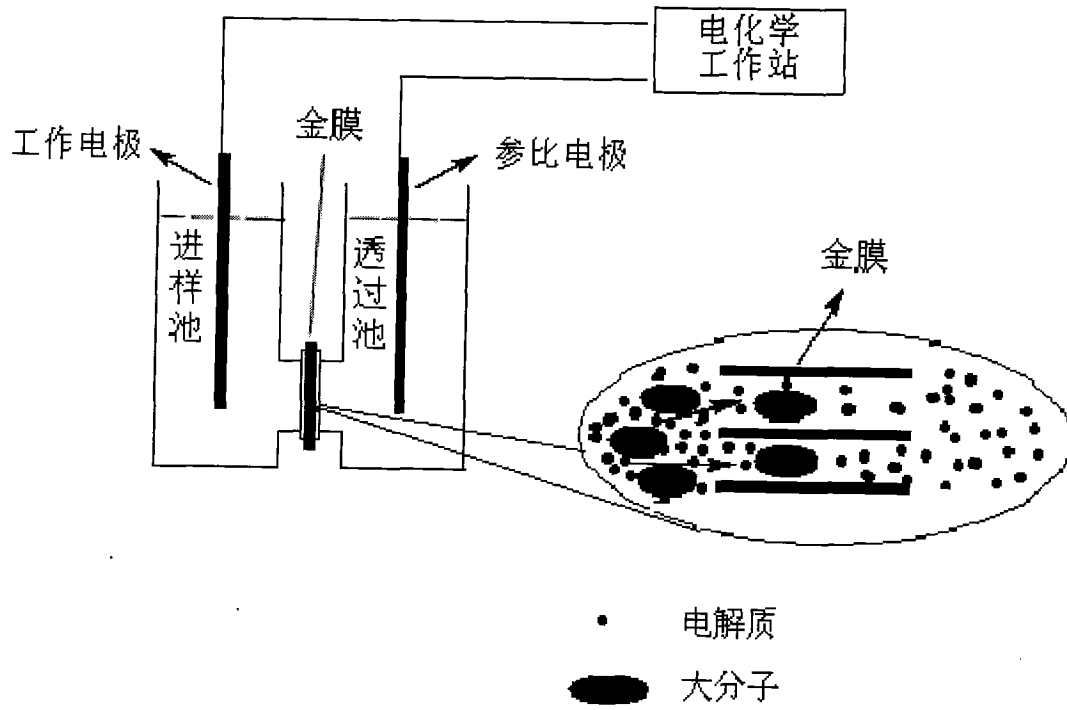


图 2

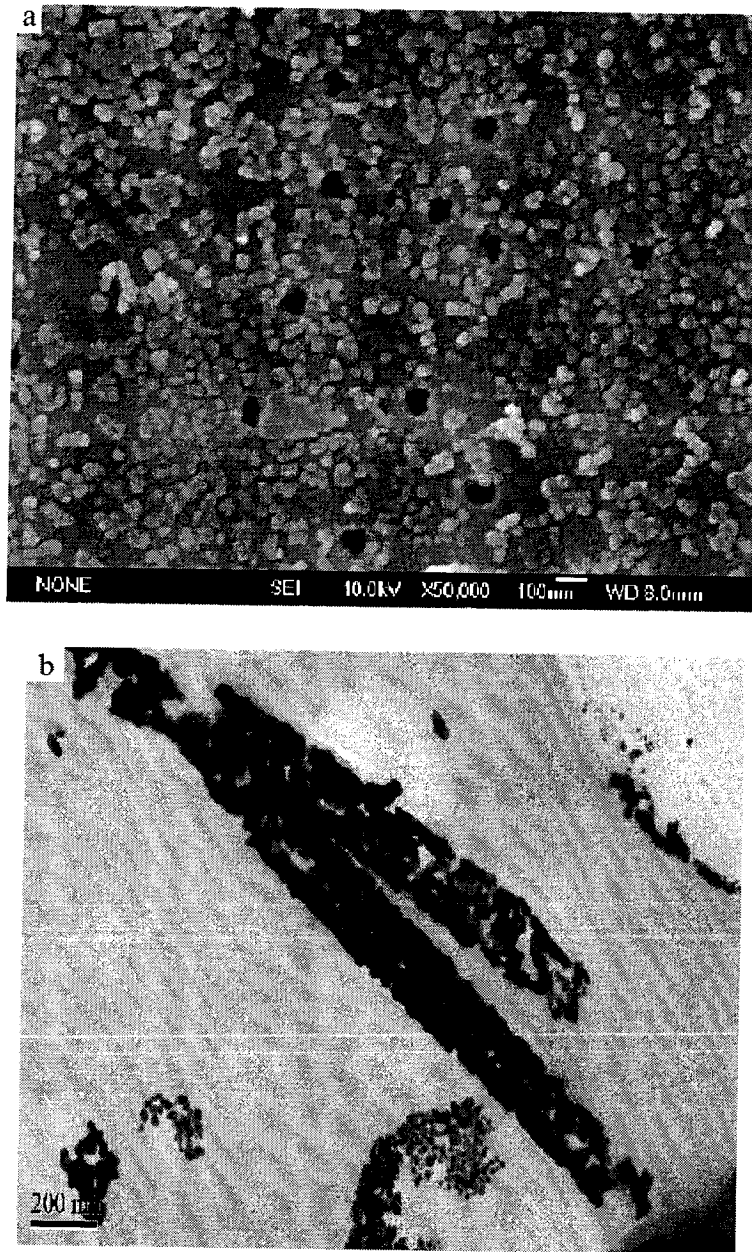


图 3

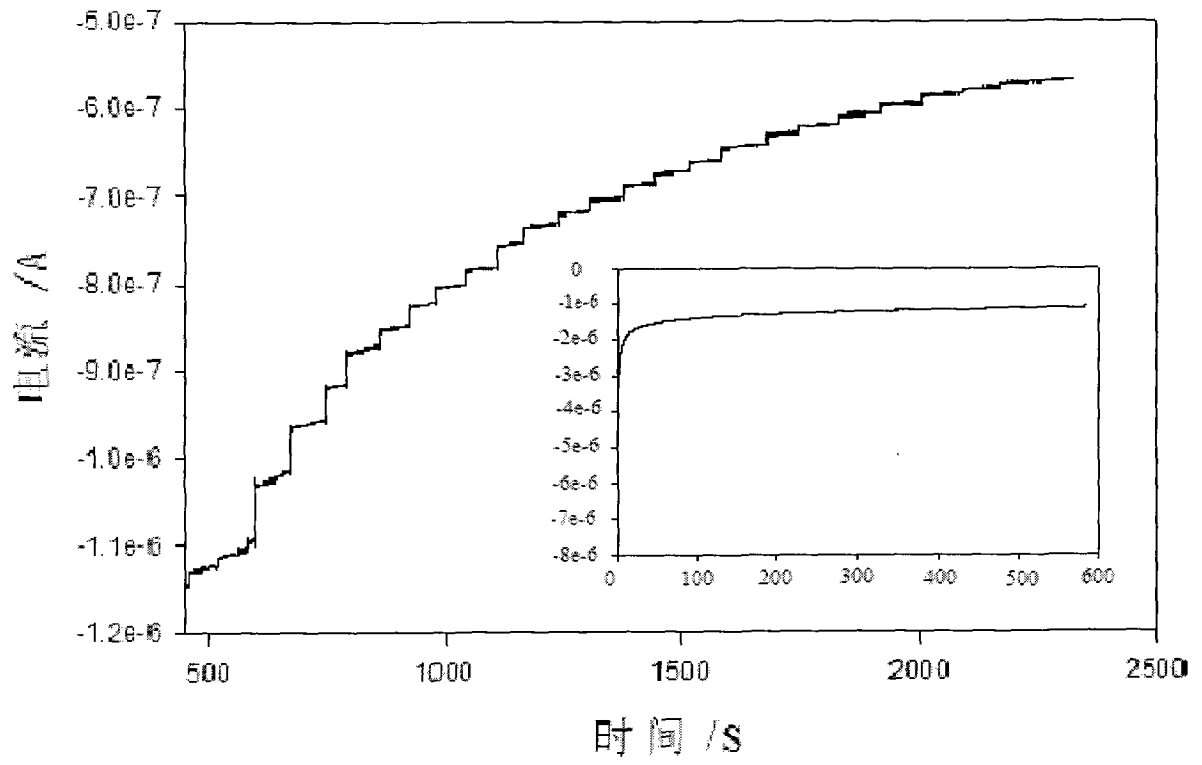


图 4

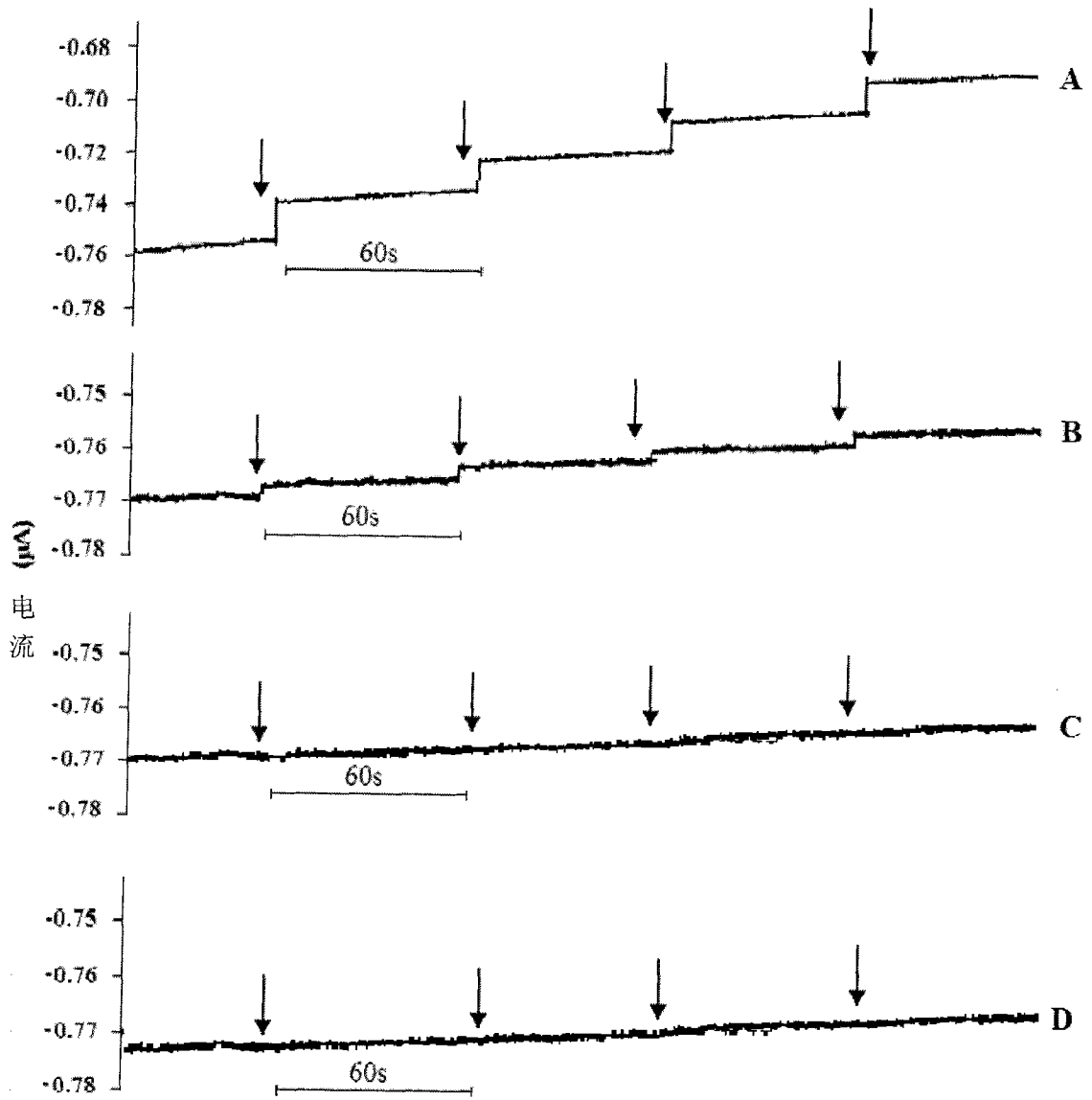


图 5

专利名称(译)	一种用于检测阿特拉津的金纳米通道膜及其应用		
公开(公告)号	CN101718742A	公开(公告)日	2010-06-02
申请号	CN200910199159.X	申请日	2009-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	黄杉生 赵国庆 岳增连 彭斌		
发明人	黄杉生 赵国庆 岳增连 彭斌		
IPC分类号	G01N27/40 G01N27/403 G01N33/531		
其他公开文献	CN101718742B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测阿特拉津的氯修饰的金纳米通道膜，及利用该金纳米通道膜检测阿特拉津的方法。以聚碳酸酯膜为基膜，采用化学沉积法制备直径20~50nm的Au纳米通道膜，氯离子通过金-氯共价键自组装至金纳米通道孔壁上。检测方法为，将上述氯修饰的金纳米通道膜置于进样池和透过池之间，进样池中加入含阿特拉津抗体的缓冲液，透过池中加入缓冲液，维持两池液面平行，施加电压，测定基底电流；向进样池中加入含待测样品的缓冲液，通过电化学工作站进行电流信号测试；发生电流突降则说明待测样品中含有阿特拉津。本发明检测效率高，特异性强，可测定浓度下限为 $1.7 \times 10^{-10} \text{M}$ 的阿特拉津，具有较好的应用前景。

