

牛奶中痕量氯霉素快速检测的纳米修饰一次性安培免疫传感器研究^{*}

杨欣¹, 谢东华², 闻伟刚², 罗乃兴¹, 干宁^{1**}

(1. 新型功能材料及其制备科学国家重点实验室, 宁波大学材化学院, 宁波 315211;

2 宁波出入境检验检疫局技术中心, 宁波 315200)

摘要 目的: 构建基于 Nafion/纳米金 (AuNPs) 包被牛血清蛋白-氯霉素载体抗原 (CAP-BSA) 丝网印刷碳电极 (SPCEs) 的一次性安培免疫传感器 (SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA), 并用于牛奶中氯霉素 (CAP) 含量测定。方法: 采用循环伏安法 (CV) 和示差脉冲伏安法 (DPV) 研究 CAP 在该免疫传感器上的电化学行为, 并通过竞争性免疫分析法测定 CAP 含量。结果: 该免疫传感器在含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铁氰化钾和 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CAP 抗体 (anti-CAP) 的 $25\text{ }\mu\text{L}$ $\text{pH}=6.0$ 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中加入不同浓度的 CAP, 并在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下温育 6 min DPV 还原峰电流上升百分比 (CI%) 与 CAP 浓度分别在 $0.2\sim 10.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R^2=0.9946$) 和 $10.0\sim 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R^2=0.9647$) 范围内呈线性关系, 检测限为 $0.11\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (3σ 法)。应用于牛奶中 CAP 检测并与传统的高效液相色谱法 (HPLC) 比较, 结果一致, 其添加回收率在 $88\%\sim 102\%$ 之间。结论: 该免疫传感器灵敏快速 (10 min)、制备容易 (碳浆印刷)、样品用量少 ($2\text{ }\mu\text{L}$)、可抛弃, 有望用于食品中痕量 CAP 快速筛选。

关键词: 纳米金; Nafion 一次性安培免疫传感器; 氯霉素; 牛奶

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1636-07

A novel disposable amperometric immunosensor modified by nanoparticles for the rapid detection of trace chloramphenicol in milk^{*}

YANG Xin¹, XIE Dong-hua², WEN Wei-gang², LUO Nai-xing¹, GAN Ning^{1**}

(1. The State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science, Faculty of Material Science and Chemical

Engineering of Ningbo University, Ningbo 315211, China

2. Ningbo Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau Creature Technical Center of China, Ningbo 315200, China)

Abstract Objective A disposable amperometric immunosensor was fabricated by Nafion membrane and gold nanoparticles coated chloramphenicol-bovine serum albumin (CAP-BSA) modified on screen-printed carbon electrodes (SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA) which was employed to determine CAP in milk. **Method** The electrochemical behavior of the immunosensor was studied by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The content of CAP was determined with competitive immunoassay. **Result** When different concentration of CAP were added in $25\text{ }\mu\text{L}$ $\text{pH}=6.0$ phosphate buffer solution (PBS) containing $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ and $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ anti-CAP, the percentage of cathodic peak DPV current increase ratio (CI%) was proportional to the concentration of CAP over the range of $0.2\sim 10.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R^2=0.9946$) and $10.0\sim 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R^2=0.9647$) after incubation for 6 min at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The detection limit was $0.11\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (on a 3σ basis). The immunosensor was employed to determine CAP in real milk samples and the recovery rates exhibited a range of $88\%\sim 102\%$. The results were consistent to the traditional HPLC method. **Conclusion** The amperometric immunosensor was sensitive, quickly (10 min), disposable with low cost, fewer sample volume ($2\text{ }\mu\text{L}$) and easy preparation, which is suitable for screen-determination of trace chloramphenicol in food.

Key words gold nanoparticles; nafion; disposable amperometric immunosensor; chloramphenicol; milk

^{*} 国家自然科学基金 (20805024); 浙江省自然科学基金 (Y106725, Y4080023, Y3090068); 宁波市自然科学基金 (No. 2008A610048, 2008A610072, 2008A610043, 2008C50014, Y3090068); 宁波市 4321 人才工程资助项目

^{**} 通讯作者: Tel: (0574) 87609983, 13486485114; E-mail: ganning@nbu.edu.cn

氯霉素 (chloramphenicol CAP) 是对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌均有抑制作用的广谱抗生素, 因其对人体有严重的毒副作用, 故包括中国在内的许多国家相继禁止或严格限制其使用^[1]。但由于 CAP 低廉的价格和稳定的抗菌性, 在畜牧业及水产养殖业中违法使用的现象仍屡见不鲜, 因此检测食品中 CAP 残留对保护人民身心健康十分必要。目前 CAP 残留的主要分析方法有: 酶联免疫吸附反应 (ELISA)^[2]、高效液相色谱 (HPLC)^[3]、色谱-质谱联用^[4,5]、免疫试纸条^[6]等。前 3 种方法虽然结果准确, 但往往样品需求量大、前处理步骤烦琐且设备昂贵, 需将样品积攒到一定量后才能上机检测; 免疫性试纸条虽然简单快速, 但仅能做到定性和半定量检测。随着人们对食品安全的日益重视, 迫切需要发展样品需求小、灵敏、廉价且结果可靠的痕量 CAP 分析方法和传感器件。

电化学免疫传感器结合了电化学检测的高灵敏度和免疫分析的高特异性, 具有样品需求小、检测快速、结果准确等突出优点, 已开始被用于药残检测^[7,8]。但目前报道的该类传感器在药残检测中也存在不足: 一是抗体/抗原在固定于电极过程中易失活; 二是常见的电极材料 (如金、铂、玻碳等) 价格昂贵且一旦损坏很难再生, 生产成本高; 三是尽管安培免疫传感器有诸多优点, 但是面对基体非常复杂的具体检测对象 (如血清等样品), 往往需通过样品提纯处理后再进行检测, 影响了其易用性。如何克服这些缺点已成为该类传感器能否成功走向应用的关键。近年来, 基于碳基丝网印刷电极 (SPCEs) 的一次性安培免疫电极得到了迅速发展^[9], 为推动安培免疫传感器走向廉价、大规模应用提供了一种具有前景的途径。其最大优点是能够实现批量生产, 成本低且一次使用可抛弃, 避免了共用同一电极检测多个样本时的交叉干扰问题。目前, 纳米修饰电化学传感器由于其卓越的灵敏度引起人们的广泛关注。其中纳米金 (AuNPs) 可作为抗原/抗体的载体并长久保持其生物活性^[10], Nafion 是一种全氟化高分子聚合物阳离子交换剂, 由于其优良的成膜、溶解分散、抗干扰能力及离子交换等特性, 已广泛用于生物传感器研究中^[11]。综上所述, 基于商业化成本和大规模开发应用考虑, 以 SPCEs 为基材, 通过在其表面修饰 AuNPs 制备一次性免疫传感电极, 是实现 CAP 现场快速检测可选用的最佳途径之一。本文首先将 CAP 与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联合成 CAP-BSA, 并包被于化学镀的 AuNPs 表面, 进而将其通

过 Nafion 膜固定到 SPCEs 上, 由此制作了适合于 CAP 检测的一次性免疫电极 (SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA), 并用于牛奶样品中 CAP 测定。

1 仪器与试剂

CH 160B 电化学工作站 (上海辰华仪器有限公司); 三电极集成的 SPCEs (西班牙 DropSens 公司, 其中: 工作电极为自制 SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA 电极, 参比电极为印刷 Ag/AgCl 电极, 对电极为印刷碳电极); SC-15 数控超级恒温槽 (宁波天恒仪器厂, 中国); Hitachi S-3400N 型能谱扫描电镜 (Hitachi 公司, 日本); S2 RANGER X 射线荧光光谱仪 (Bruker 公司, 德国)。

CAP 试剂盒 (荷兰 EURO-DIAGNOSTICA 公司, 包括 $0.1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CAP 质控品, $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CAP 抗体 (anti-CAP, Lot JN5751); $100 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CAP 标准品 (杭州微生物试剂有限公司, 批号: 422), 根据浓度要求对其进行稀释; BSA (Sigma 公司); PBS ($0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 KH_2PO_4 和 KCl 配制), 戊二醛、铁氰化钾、化学镀金溶液及其他试剂均为分析纯 (上海国药集团); 4 个品牌的 10 个液态牛奶样品 (宁波家家乐超市, 生产日期: 2009 年 2 月); 实验用水均为二次蒸馏水。

2 CAP-BSA 的制备

由于 CAP 属于半抗原, 本身不能被直接固定到 AuNPs 表面^[7], 参考文献 [12] 的方法, 采用 BSA 偶联 CAP 合成了 CAP-BSA 复合物, 作为载体抗原吸附到电极表面的 AuNPs 上。

3 SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA 电极的构建

参照文献 [11] 滴加 0.5% (w/w) 的 Nafion 溶液 $5 \mu\text{L}$ 均匀涂覆于 SPCEs 电极表面, 得到 SPCEs|Nafion 电极; 待其自然干燥后进行化学镀金^[13], 步骤如下: 首先, 将 SPCEs|Nafion 浸入 $0.36 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺溶液中, 室温反应 3 h 取出, 然后浸入 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯金酸溶液反应 2.5 h, Au^{3+} 络合于 $-\text{NH}_2$ 表面, 最后, 浸入 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼氢化钠溶液还原 15 min 得到 AuNPs 颗粒大小为 30 nm 的 SPCEs|Nafion/AuNPs 电极; 再将该电极浸入以 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{CO}_3$ 调节至 $\text{pH} = 6.0$ 的 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CAP-BSA 溶液中 2 h 将 CAP-BSA 包被于 AuNPs 表面, 即得 SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA 电极; 最后, 将其浸入 1% BSA 溶液中封闭 1 h。

4 免疫电极对 CAP 的检测

参考文献 [14] 采用竞争免疫分析法测定 PBS

中 CAP。步骤如下: (1) 在电极表面反应腔(图 1-B, 容量为 30 μL)内滴加含 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ anti-CAP 的 $\text{pH} = 6.0$ PBS 25 μL , 并在 25 $^\circ\text{C}$ 下温育 6 min, 采用示差脉冲伏安法(DPV)检测其还原峰电流(I_0); (2) 在上述电极反应腔中再加入不同浓度的 CAP 溶液 1 μL , 并在 25 $^\circ\text{C}$ 下温育 6 min, DPV 测定还原峰电流(I)。由于溶液中 CAP 与电极表面 CAP 同时竞争溶液中的 Anti-CAP 发生免疫反应, 当被测 CAP 含量越高时 DPV

响应电流也越大。这是因为 CAP 浓度提高后, 溶液中恒量的 Anti-CAP 与电极表面 CAP 结合形成免疫复合物机会减小, 对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 电子传递阻碍越小, 因此 DPV 还原峰电流不断上升; (3) DPV 还原峰电流上升百分比 $\text{CI}\% = \frac{I - I_0}{I_0} \times 100\%$ 与被测 CAP 在一定浓度范围内呈线性关系, 故采用标准曲线法进行 CAP 定量, 传感器检测系统及竞争性免疫原理见图 1。

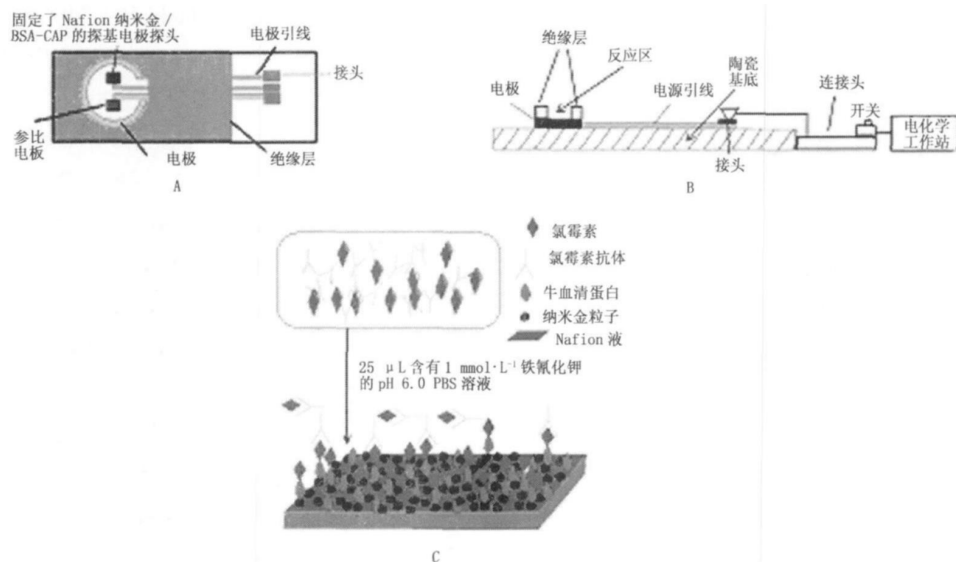


图 1 检测系统中免疫传感器对 CAP 竞争性反应原理图

Fig 1 The detection principle of CAP by the immunosensor with competitive immunoassay

A 平面图 (the plane direction) B 纵面图 (the vertical direction) C. 免疫电极 (immunosensor apparatus)

牛奶样品的处理和 CAP 检测: 本实验中, 随机选择 4 个品牌的液态牛奶 10 份, 按照文献 [7] 的方法进行样品前处理, 取新鲜牛奶样品 5 mL 置入 10 mL 离心管中, 磁力搅拌 15 min 以后加入 2 mL 乙酸乙酯振荡混匀 2 min 最后以 $4000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 2 μL 到反应腔含 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ anti-CAP 的 25 μL PBS 中, 于 25 $^\circ\text{C}$ 下温育 6 min 以后测定其 DPV 还原峰电流, 标准曲线法进行定量。

CV 和 DPV 实验均在含 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的 25 μL $\text{pH} = 6.0$ PBS 中进行, 电位扫描范围分别为 $+0.6 \sim -0.2\text{ V}$ 和 $+0.4 \sim -0.4\text{ V}$ (vs Ag/AgCl)。免疫电极不使用时, 于 4 $^\circ\text{C}$ 下贮存。

5 免疫传感器制作过程中各阶段获得电极的表征

采用扫描电镜 (SEM) 分别对 SPCEs 电极和传感器制作过程中各阶段获得的电极 (SPCEs|Nafion, SPCEs|Nafion/AuNPs 及 SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA) 表面进行了表征。图 2-A 显

示 SPCEs 表面具有明显的片状石墨层结构; 在 SPCEs 上涂覆 Nafion 膜以后 (图 2-B), SPCEs|Nafion 电极表面出现了均匀并有一些深色孔洞的层状结构, 这表明 Nafion 覆盖在 SPCEs 表面成膜; SPCEs|Nafion/AuNPs 的 SEM 如图 2-C 所示, 出现了许多分布均匀、粒径约为 30 nm 的白色亮点, 推测是由于 AuNPs 反射光产生, 根据文献 [9] 报道这种均一的三维点状结构能使电极的有效面积增大, 也可以提高蛋白在电极表面的固定量; SPCEs|Nafion/AuNPs/CAP-BSA 的 SEM 如图 2-D, 出现了许多分散均匀, 且直径约为 200~400 nm 的纳米颗粒, 比 AuNPs (30 nm) 粒径明显增加, 这说明 BSA-CAP 被修饰到 SPCEs 电极表面。

采用 X 射线荧光光谱对免疫传感电极表面进行表征, 显示了 Au-k (峰 9.7 KeV 和 Cl-k (峰 2.7 KeV, 由于 CAP 含有 Cl 元素, 说明 AuNPs 和 BSA-CAP 被修饰到 SPCEs 电极表面。

6 免疫传感器制作过程中各阶段获得电极的电化

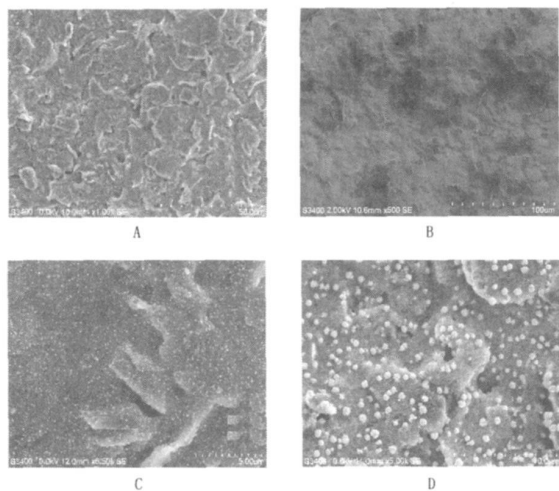


图 2 不同电极表面形貌电镜图

Fig 2 The SEM images of different electrodes' surface

A. SPCEs B. SPCEs | Nafion/AuNPs C. SPCEs | Nafion/AuNPs
D. SPCEs | Nafion/AuNPs/CAP-BSA

学特性

在含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的 PBS 中,测定了不同电极的 CV 曲线(图 3)。SPCEs | Nafion 出现了 1 对准可逆的氧化还原峰, $E_{\text{pa}}(\text{阳极}) = +0.24 \text{ V}$; $E_{\text{pc}}(\text{阴极}) = +0.14 \text{ V}$, $\Delta E_{\text{p}} = 0.10 \text{ V}$, 分别对应于 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 电对(简称 FeCN)的氧化还原反应,根据受扩散控制公式^[7]求得电子转移系数 α 为 0.49 电子传递速率常数 K_s 为 0.81 s^{-1} ,表明该电极电子传递效率较快(图 3-a)。SPCEs | Nafion/AuNPs 电极的氧化还原峰电流较 SPCEs | Nafion 明显增大,且 ΔE_{p} 减少(图 3-b),推测是因为 AuNPs 大大增加了电极比表面积,由此提高了 FeCN 在电极表面的电子传递速率和可逆性。SPCEs | Nafion/AuNPs/CAP-BSA 氧化还原峰电流(图 3-c)较图 3-b 明显减小,推测是因为在 AuNPs 表面包被的 BSA-CAP 均为绝缘体且相对分子质量较大,覆盖了电极表面活性位点,阻碍了 FeCN 的电子传递。SPCEs | Nafion/AuNPs/CAP-BSA 在含 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CAP 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Anti-CAP 的 $\text{pH} = 6.0$ PBS 中 25°C 温育 6 min 以后,峰电流继续下降(图 3-d),这是因为游离在溶液中的 anti-CAP 吸附到电极表面, CAP 及其抗体发生免疫反应形成的免疫复合物进一步阻碍了 FeCN 电子传递。

7 免疫电极的制备及测定条件优化

试验了 AuNPs, BSA-CAP 在 SPCEs 电极表面的修饰条件以及竞争性反应液中抗体的含量。Gu H Y 等^[16]研究发现小尺寸的金胶(大约 30 nm)能

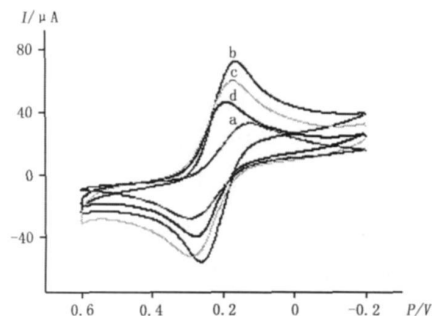


图 3 各阶段电极的循环伏安图

Fig 3 Cyclic voltammograms of different electrodes

A. SPCEs | Nafion B. SPCEs | Nafion/AuNPs C. SPCEs | Nafion/AuNPs/CAP-BSA

D. SPCEs | Nafion/AuNPs/CAP-BSA 温育以后

给予蛋白质更多的取向自由度,从而增加辅基靠近金胶的机会,使电子方便地通过金胶的传输通道。而我们合成的单分散金胶直径在 30 nm 左右,故具有较好的抗原包被性能。将此条件下制备的 SPCEs | Nafion/AuNPs 电极置入 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CAP-BSA 溶液中浸泡,随着时间增加电流不断下降,2 h 后基本稳定,说明此时 BSA-CAP 在金胶上吸附达到饱和。因此选择电极包被 BSA-CAP 条件为:在 25°C 的 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA-CAP 中浸泡 2 h。

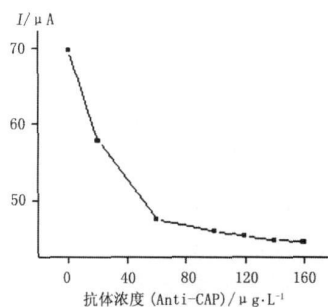


图 4 温育液中 anti-CAP 浓度和 DPV 响应电流关系图

Fig 4 Effect of the concentration of anti-CAP in the incubation solution on the DPV current

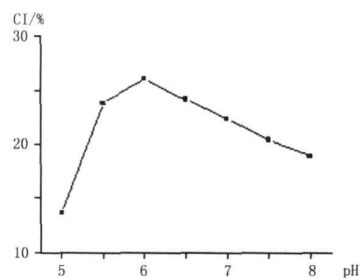


图 5 pH 对传感器 CI (%) 影响

Fig 5 Effects of pH on the CI (%)

竞争性反应体系中抗体浓度对抗原浓度测定范围影响较大^[14],考察了温育液中 Anti-CAP 的最大

用量。在电极表面 $25\ \mu\text{L}$ 含 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的 $\text{pH}=6.0$ PBS 中滴加不同浓度的 Anti-CAP 温育 6 min 后测定其电流变化 (图 4), 随着 Anti-CAP 浓度不断增加电流不断下降, 这是因为 CAP 及其抗体免疫复合物不断增多, 对 $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 电子传递阻碍增强。当 Anti-CAP 浓度达到 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后电流不再下降, 说明此时 Anti-CAP 在电极表面反应达到完全, 故选择在温育液中加入 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Anti-CAP 和不同浓度 CAP。本研究中将 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 加入到检测体系中作为电子媒介体 (eT), 通过其在电极表面产生电信号变化值反映 CAP 抗原/抗体结合度。因此其含量高低将直接影响到最高 CAP 检测浓度。但由于 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 会显著破坏抗原/抗体蛋白活性, 所以在保证电极足够的灵敏度前提下, 应尽量在体系中少加 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 。考察了在底液中加入 $0.5\sim 5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 后发现, 电流强度随着 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 增加而显著提高, 被测 CAP 最高浓度范围也增加。当采用 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 时, 对 CAP 的最高值可达 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 远大于牛奶中 CAP 法定允许量^[12], 所以在温育液中加入 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 。免疫反应受 pH 、温育温度、温育时间等影响。考察了免疫电极在含 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CAP 和 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Anti-CAP 的不同 pH 的 PBS 中 $25\ ^\circ\text{C}$ 温育 6 min 以后的 CI (%) 响应, 研究发现 CI (%) 在 $\text{pH}\ 5.0\sim 6.0$ 逐渐增大, $\text{pH}=6.0$ 之后开始减小 (图 5), 因此最佳 pH 选择为 6.0。推测是因为 CAP 抗体活性在 $\text{pH}=6.0$ 时保持最佳。研究了免疫电极在含 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CAP 和 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Anti-CAP 的 $\text{pH}=6.0$ PBS 中不同温度温育下 6 min 以后的 CI (%) 变化 (图 6), 实验结果表明温度在 $25\ ^\circ\text{C}$ 时 CI (%) 达到最大, 说明此时抗原/抗体结合能力最强, 因此选择实验在 $25\ ^\circ\text{C}$ 时进行。试验了温育时间对传感器安培响应的影响。在含 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CAP 和 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Anti-CAP 的 $\text{pH}=6.0$ PBS 中 $25\ ^\circ\text{C}$ 温育不同时间以后的 CI (%) 变化 (图 7), 随着温育时间的增加, CI (%) 随之增加, 当达到 6 min 后趋于稳定值, 说明此时电极表面免疫反应已经进行完全。这较一般酶联免疫温育时间的 50~60 min 缩短了 8~10 倍^[17], 这是因为该法基于竞争性免疫分析, 一次性在溶液中加入抗原/抗体, 减少了洗板过程和二抗的加入; 且由于 DPV 方法具有高灵敏度, 其电流变化可以反映 pg 级抗原/抗体反应^[14]。所以本传感器的最佳反应条件为: 在 $\text{pH}=6.0$ 含 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的

PBS 中, 加入 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Anti-CAP 和不同浓度 CAP, 在 $25\ ^\circ\text{C}$ 下温育 6 min。

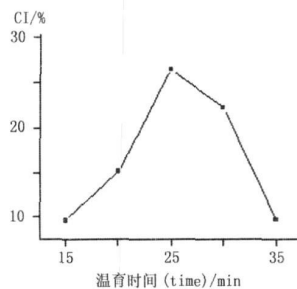


图6 温育温度对 CI (%) 的影响

Fig 6 Effects of incubation temperature on the CI (%)

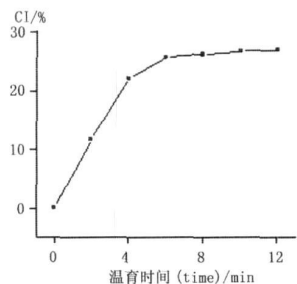


图7 温育时间对 CI (%) 的影响

Fig 7 Effects of incubation time on the CI (%)

8 结果与讨论

8.1 免疫传感器对 CAP 的测定 在优化条件下, 传感器温育后安培响应的降低百分率与 CAP 浓度呈良好的线性相关性, CI (%) 与 CAP 分别在 $0.2\sim 10.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10.0\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈线性关系 (图 8), 回归方程分别为:

$$\text{CI}(\%) = 5.65 + 1.77c \quad R^2 = 0.9946$$

$$\text{CI}(\%) = 22.67 + 0.12c \quad R^2 = 0.9647$$

以 3 倍标准偏差法 (3σ) 计算得到该方法的检测限为 $0.11\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该法检测下限和检测范围优于 HPLC^[15], 但是较 HPLC 简便、廉价、省时。

8.2 免疫传感器的精密性、制备重复性、稳定性和抗干扰性

精密性 (组内偏差): 通过对 3 个牛奶样品中 CAP 的含量 (在空白牛奶中添加) 进行测定以获得组内偏差, 测定 CAP 浓度为 $2.8\ 15\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的组内 RSD 分别为 3.2%, 3.5%, 2.9% ($n=5$), 说明该电极对 CAP 检测具有良好的精密性。

制备重复性 (组间偏差): 由于使用的 SPCEs 电极是同一批次印制的, 因此彼此结构完全相同 (包括电极材料、面积和碳层厚度等)。且只使用 1 次即抛弃 (以避免同一电极检测多个样品时的交叉污染)。所以比较了采用 5 个同一批次 SPCEs 电极制

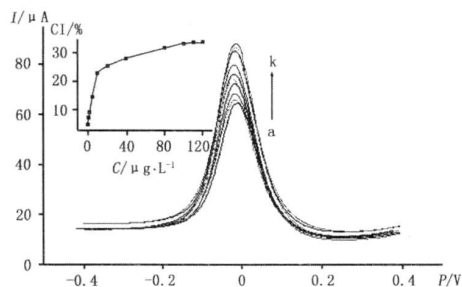


图 8 免疫电极对不同浓度 CAP 的 DPV 电流响应图

内插图: CI(%) 与 CAP 浓度线性关系

Fig 8 DPVs of the immunosensor incubate in 25 μL pH = 6.0 PBS solution containing different concentration of CAP, 1 mmol·L⁻¹ K₃Fe(CN)₆ and 100 μg·L⁻¹ Anti-CAP at 25 °C for 6 min

Inset The calibration curve of CI(%) vs CAP

CAP 浓度 (concentration of CAP): (a) 0 (b) 0.2 (c) 0.8 (d) 2.0 (e) 5.0 (f) 10.0 (g) 20.0 (h) 40.0 (i) 100.0 (j) 110.0 (k) 120.0 μg·L⁻¹

备的 CAP 免疫传感器, 对同一 CAP 浓度的牛奶进行测定以获得组间偏差。测定含 15 μg·L⁻¹ CAP 的牛奶获得的组间 RSD 为 5.2% (n = 4), 说明该免疫传感器具有较好的重复性。

稳定性: 免疫电极在 4 °C 冰箱中存放 20 d 后对 20 μg·L⁻¹ CAP 测定时的电流响应值为初始值的 95%; 存放 40 d 后仅仅下降为原来的 87%。表明制作的免疫电极在 40 d 内非常稳定, 电极表面 BSA-CAP 的生物活性保持良好。

抗干扰性: 研究了牛奶中主要可能干扰物对免疫电极检测 CAP 的影响。结果表明: 当 CAP 浓度为 20 μg·L⁻¹ 时, 100 倍浓度的尿酸、抗坏血酸、苯甲酸、葡萄糖、L-半胱氨酸以及 1000 倍的 Na⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Cd²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺ 对检测没有影响。尿酸、抗坏血酸、苯甲酸不干扰测定, 推测是由于 Nafion 呈现强负电性, 具有很强的抗有机酸干扰能力。然而, 对硝基苯甲酸以及硝基苯的存在使电流下降 10%, 产生显著干扰, 这是由于该 2 种物质含有的电化学还原性基团所致^[7]。因此, 若它们与 CAP 共存, 在检测前必须先进行分离。而牛奶中这 2 种物质几乎不存在, 因此不会造成干扰。

8.3 实际样品检测 在优化免疫反应条件及电化学测试条件下, 10 个样品中均未检测出 CAP 残留。为验证该方法在牛奶检测中的可行性, 我们在其中 3 个空白奶样中加入了 5~15 μg·L⁻¹ 的 CAP 质控品进行模拟, 采用本法进行了测定并和标准的 HPLC 方法^[15] 进行对照, 结果见表 1, 吻合性较好。样品回收率 (检出量/加入量 × 100%) 在 88% ~

102% 之间, 平均每份样品的测试时间为 10 min, 说明本方法可用于牛奶样品中痕量 CAP 的快速测定。

表 1 牛奶样品中 CAP 的检测结果 (n = 3)

Tab 1 Determination result of CAP in milk sample

样品 (sample)	序号 (number)	加入量 (added) / μg·L ⁻¹	检出量 (found) / μg·L ⁻¹		回收率 (recovery) / %
			本法 (this method)	HPLC	
A	1	5.0	4.4	4.5	88.0
	2	10.0	9.1	9.7	91.0
	3	15.0	14.7	13.6	98.0
B	1	5.0	4.5	4.6	90.0
	2	10.0	9.4	9.8	94.0
	3	15.0	15.3	14.2	102.0
C	1	5.0	5.1	5.1	102.0
	2	10.0	10.1	9.7	101.0
	3	15.0	15.3	15.1	102.0

9 结论

制作了 SPCE 上 Nafion/AuNPs/CAP-BSA 一次性安培型免疫传感器, 并采用竞争免疫分析法对牛奶中的痕量 CAP 含量进行了检测, 结果令人满意。和常规的 CAP 检测方法, 如 HPLC 法相比具有以下优点: (1) 该一次性免疫传感器廉价 (成本 < 2 元/片), 小巧且集成度高 (pH 试纸大小且集成三电极), 样品需要量少 (2 μL), 用后可抛弃, 避免了同一电极检测多个样本时交叉干扰问题, 且同一批次制作的电极结果重现性良好; (2) 检测条件温和快速: 该传感器基于竞争性免疫反应, 同时在溶液中加入抗原/抗体, 可在室温下 10 min 内检测出牛奶中 CAP 含量, 明显较基于夹心免疫分析的安培免疫传感器检测 (40~60 min) 快^[17]; (3) 抗干扰能力强: 电极表面的 Nafion 膜显著降低了奶制品中常见的食品添加剂 (如抗坏血酸、苯甲酸等) 干扰; 而包被的 AuNPs 扩增了电极比表面积, 使该传感器的灵敏度大大提高, 且可长久保持 BSA-CAP 活性, 提高了传感器的使用寿命。综上所述, 本研究构筑的 CAP 一次性免疫传感器和分析方法适合于液态奶中痕量 CAP 的现场快速分析, 为食品中抗生素残留检验提供一类新的超痕量分析手段, 在药物分析应用方面具有实际意义。

参考文献

- 1 YANG Xiao-jiao (杨小皎), ZHANG Jian-xin (张建新), GAO Zhi-xian (高志贤), et al Development of the immunogen and coating for rapid detection of chloramphenicol (用于检测氯霉素的免疫原和包被原的制备). J Prev Med Chin PLA (解放军预防

- 医学杂志), 2007, 25(2): 87
- 2 ZHANG Sheng-bang(张胜帮), DONG Shi-hua(董士华), LIU Ji-dong(刘继东), *et al* Studies on the determination of chloramphenicol residues in aquatic products by the ELISA(酶联免疫检测法测定水产品中残留氯霉素的研究). *J Chin Inst Food Sci Technol*(中国食品学报), 2006, 6(5): 133
- 3 CHEN H X, CHEN H, YING J *et al* Dispersive liquid-liquid micro-extraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Anal Chim Acta*, 2009, 632: 80
- 4 LI Peng(李鹏), QU Yue-ming(邱月明), CAI Hui-xia(蔡慧霞), *et al* Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry(气相色谱-质谱联用法测定动物组织中氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素的残留量). *Chin J Chromatogr*(色谱), 2006, 24(1): 14
- 5 Rebecca S, Nicolich, Eduardo W emeck-Bamosq *et al* Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2006, 565: 97
- 6 YANG Ting(杨挺), WANG Shu-ting(王姝婷), GUO Yi-rong(郭逸蓉), *et al* Development of colloidal gold immunostrip for rapid detection of chloramphenicol residue in food of animal origin(动物源食品中氯霉素残留速测金标试纸条的研制). *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 2007, 23(11): 156
- 7 XIAO F, ZHAO FQ, LI JW, *et al* Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube-gold nanoparticle-ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. *Anal Chim Acta*, 2007, 596: 79
- 8 ZHANG Shao-bo(张少波), LIU Ai-lin(刘爱林), ZHUANG Qian(庄茜), *et al* Simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid by electropolymerized 4-(2-pyridylazo)-resorcinol film modified electrode(导电聚合物膜修饰电极用于对乙酰氨基酚和抗坏血酸的同时测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(1): 85
- 9 YANG TH, HUNG CL, KE Jyh-Hang *et al* An electrochemically preanodized screen-printed carbon electrode for achieving direct electron transfer to glucose oxidase. *Electrochem Commun*, 2008, 10: 1094
- 10 WANG JW, WANG LP, DI JW. Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor. *Talanta*, 2009, 77: 1454
- 11 LIN Xiang-qin(林祥钦), KANG Guang-feng(康广凤), CHAI Ying(柴颖). A nafion and choline bi-layer modified carbon fiber electrode for in-vivo detection of dopamine in mouse cerebrum (Nafion/胆碱双层膜碳纤维电极探测小白鼠大脑内的多巴胺). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2008, 36(2): 157
- 12 WU Yuan-yuan(吴媛媛), BAO Yong-ming(包永明), LIANG Xing-dao(梁兴超). Synthesis and identification of chloramphenicol immunogen(氯霉素全抗原的合成与鉴定). *Chemistry*(化学通报), 2005, 6: 458
- 13 KONG Y, CHEN HW, WANG YR, *et al* Fabrication of a gold micro-electrode for amperometric detection on a polycarbonate electrophoresis chip by photodirect electrodeless plating. *Electrophoresis*, 2006, 27: 2940
- 14 HE PL, WANG ZY, ZHANG LY, *et al* Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol. *Food Chem*, 2009, 112: 707
- 15 JIANG Ding-guo(蒋定国), YANG Da-jin(杨大进), FANG Cong-rong(方从容), *et al* Study on the rapid determination of chloramphenicol residues in milk by HPLC(高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素残留量的研究). *Chin J Food Hyg*(中国食品卫生杂志), 2003, 15(1): 36
- 16 GU HY, YU AM, CHEN HY. Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloidal gold electrode. *J Electroanal Chem*, 2001, 516(12): 119
- 17 SONG Wei-wei(宋巍巍), DING Ming-xing(丁明星), ZHANG Nuo-wei(张挪威), *et al* Immuno-voltammetric determination of chloramphenicol residues in milk(伏安免疫法检测牛奶中氯霉素残留). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2007, (35) 12: 1731

(本文于 2009 年 5 月 9 日收到)