



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107085022 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201710302370.4

(22)申请日 2017.05.02

(71)申请人 广东药科大学

地址 528400 广东省中山市五桂山镇长命水大道9-13号

(72)发明人 潘育方 汪世桥 翟海云 周清杨帆

(74)专利代理机构 佛山帮专知识产权代理事务所(普通合伙) 44387

代理人 胡丽琴

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

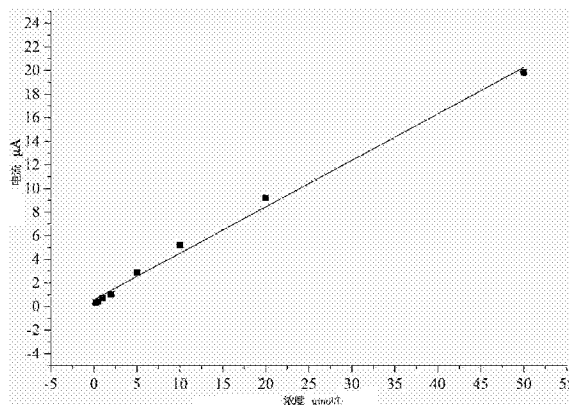
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器的制备及应用

(57)摘要

本发明公开一种3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器的制备及应用,首先将多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带滴涂于玻碳电极上,得到功能化纳米材料电极,电极在掺杂纳米金-分子印迹聚合物溶液中表面聚合分子印迹聚合物和沉积掺杂纳米金,形成一层分子印迹膜,去除3-硝基酪氨酸模板分子得到功能化纳米材料分子印迹电化学传感器。本发明公开的传感器,选择性好;对生物标记物3-硝基酪氨酸灵敏度高;具有制作简单、性能稳定,能重复使用;且制备价格低廉,样品前处理简单,检测快速,设备便携适合现场检测。



1. 一种3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器的制备方法,其特征在于,具体步骤如下:

1) 多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液滴在玻碳电极表面沉积后电活化得到多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带修饰电极;

2) 多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带修饰电极在掺杂纳米金-分子印迹聚合物溶液中表面聚合分子印迹聚合物和沉积掺杂纳米金,形成一层分子印迹聚合膜;所述分子印迹聚合物以吡咯为功能单体、以3-硝基酪氨酸为模板分子;

3) 将步骤2) 制备的传感器中的3-硝基酪氨酸模板分子去除,制得所述3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤1) 中,所述玻碳电极需经过预处理,所述预处理过程如下:将玻碳电极抛光冲洗后,再进行超声清洗,然后于铁氰化钾中扫描,直到得到可逆的循环伏安峰为止。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤1) 中,所述多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液的制备过程如下:取多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带于容器中,超声,得到分散均匀的多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液;所述多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液的浓度为0.4mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1) 中,所述电活化的过程如下:将沉积的电极浸于pH=7.0的磷酸缓冲液中,采用0.6V~-1.8V电压,以0.1~0.5V/s的扫描速率循环扫描10~15圈进行电活化。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2) 中,形成分子印迹聚合膜的方法为电化学聚合法,反应条件为:在扫描速度为0.05~0.1V/s、电位范围为-1.0~1.0V循环扫描8~10圈。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2) 中,所述掺杂纳米金-分子印迹聚合物溶液的制备方法:配制0.1mol/L KNO_3 溶液,加入3-硝基酪氨酸、吡咯和氯金酸溶液,超声形成均一溶液即可;所述吡咯、3硝基酪氨酸和氯金酸的摩尔比为1:1:1。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3) 中,所述3-硝基酪氨酸模板分子去除的过程如下:将步骤2) 制备的传感器浸入pH=7.0的磷酸缓冲液中6~8min即可。

8. 一种运用权利要求1~7任一所述方法制备的3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器。

9. 一种权利要求1~7任一所述方法制备的3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器在定性或定量检测3-硝基酪氨酸分子的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述检测3-硝基酪氨酸分子的步骤如下:

以Ag/AgCl为参比电极,Pt电极为对电极,分子印迹电化学传感器为工作电极,连接到电化学工作站,在待测样品溶液中,扫描电位为1.02V,检测电化学传感器洗脱和吸附模板分子前后的电信号变化,按照电流-浓度标准工作曲线计算样品中3-硝基酪氨酸的浓度。

3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明属于化学分析领域,涉及电化学传感器,具体涉及一种分子印迹电化学传感器,尤其是一种3-硝基酪氨酸的功能化纳米材料分子印迹电化学传感器的制备及应用。

背景技术

[0002] 氧化还原系统在失衡条件下产生了大量的自由基,3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine,3-NT)是由自由基中的过氧化亚硝酸阴离子(ONOO^-)与游离的酪氨酸或蛋白质结构中的酪氨酸相互作用发生了硝基化而生成的。3-硝基酪氨酸能使得蛋白质结果及功能发生变化,最终导致细胞损伤。例如,胰腺中的3-硝基酪氨酸不仅能导致胰岛 β 细胞损伤,还可以导致胰岛素空间结构发生变化,从而使得胰岛素与受体结合能力下降。

[0003] 近年来,国外已有研究发现在许多疾病如心血管疾病、神经退行性疾病、动脉粥样硬化、类风湿关节炎、2型糖尿病等病变的相应组织蛋白中都可以检测到3-硝基酪氨酸的存在。与3-硝基酪氨酸相关的疾病多由氧化应激所导致,且3-硝基酪氨酸作为在机体内残留氧化产物之一,所以目前有研究认为3-硝基酪氨酸也许可以作为氧化应激诱导疾病诊断的生物标记物。

[0004] 目前,分析3-硝基酪氨酸有HPLC、液质、气质串联液质等多种方法,但分析的样品前处理步骤繁琐且需要昂贵的大型分析仪器,分析成本较高。因此,研制简单灵敏、选择性高、耗样量少、成本低的新方法用于血液和尿液中3-硝基酪氨酸的分析测定,对相关疾病的早期诊断具有重大意义。

[0005] 分子印迹技术是以目标分子为模板,以合适的物质作为单体,模板和单体通过共价键或通过分子间力进行预组装,通过单体的聚合,模板分子被嵌入聚合物网络中,将模板从聚合物中洗脱后,聚合物中留下与模板分子空间相匹配的具有多重作用点的印迹孔穴。分子印迹技术具有预定性、特异识别性和广泛实用性等显著特点,其能够很好应用于色谱分离、固相萃取、仿生传感器、膜分离等诸多领域。这项技术目前受到人们越来越多的关注。

[0006] 分子印迹电化学传感器具有选择性好、灵敏度高、有一定使用寿命可再生等特点,在应用于药物分析、生命科学研究中起着十分重要的作用。但是传统的印迹方法所制备的印迹膜厚度难以控制,高交联度使得电子传递速度和响应慢、检测下限高而且再生和可逆性差,影响分子印迹技术在电化学传感器中的应用。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明通过将分子印迹与电化学传感器相结合,提供了一种3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器的制备方法及应用,提供的方法首先在玻碳电极表面上通过滴涂多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带的修饰,提高了传感器的灵敏度,接着采用电聚合方法以吡咯为功能单体、3-硝基酪氨酸为模板分子,在电聚合过程中同时电沉积掺杂纳米金来制备3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器;运用本发明制备的传感器检测血样、尿液中的3-硝基酪氨酸分子,检测度灵敏可靠。

[0008] 为解决上述问题,一方面,本发明在于提供一种3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器的制备方法,具体步骤如下:

[0009] 1) 多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液滴在玻碳电极表面沉积后电活化得到多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带修饰电极;

[0010] 2) 多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带修饰电极在掺杂纳米金-分子印迹聚合物溶液中表面聚合分子印迹聚合物和沉积掺杂纳米金,形成一层分子印迹聚合膜;所述分子印迹聚合物以吡咯为功能单体、以3-硝基酪氨酸为模板分子;

[0011] 3) 将步骤2) 制备的传感器中的3-硝基酪氨酸模板分子去除,制得所述3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器。

[0012] 进一步地,在步骤1) 中,所述玻碳电极需经过预处理,所述预处理过程如下:将玻碳电极抛光冲洗后,再进行超声清洗,然后于铁氰化钾中扫描,直到得到可逆的循环伏安峰为止。

[0013] 更进一步地,所述玻碳电极预处理过程中,所述玻碳电极抛光是通过将玻碳电极依次用 $0.5\mu\text{m}$ 、 $0.05\mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 粉在麂皮上抛光。

[0014] 更进一步地,所述玻碳电极预处理过程中,所述玻碳电极超声清洗是指在抛光后用超纯水冲洗,再在质量分数为50%的硝酸溶液、乙醇和水中分别超声清洗5min。

[0015] 进一步地,在步骤1) 中,所述多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液的制备过程如下:取多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带于容器中,超声,得到分散均匀的多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液。

[0016] 更进一步地,所述多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带的制备过程如下:将多壁碳纳米管(MWCNT)分散于 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (摩尔比为9:1)溶液中,室温搅拌后向溶液中缓慢加入 KMnO_4 氧化;加入含有30% H_2O_2 的冰水终止反应,得到多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带。

[0017] 更进一步地,所述多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液的浓度为 0.4mg/mL 。

[0018] 更进一步地,所述多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带悬浊液的制备中:超声时间为 $0.5\sim 1\text{h}$ 。

[0019] 进一步地,步骤1) 中,所述电活化的过程如下:将沉积的电极浸于磷酸缓冲液中,采用 $0.6\text{V}\sim -1.8\text{V}$ 电压,以 $0.1\sim 0.5\text{V/s}$ 的扫描速率循环扫描 $10\sim 15$ 圈进行电活化。

[0020] 更进一步地,所述磷酸缓冲液为 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸缓冲液。

[0021] 进一步地,步骤2) 中,形成分子印迹聚合膜的方法为电化学聚合法,反应条件为:在扫描速度为 $0.05\sim 0.1\text{V/s}$ 、电位范围为 $-1.0\sim 1.0\text{V}$ 循环扫描 $8\sim 10$ 圈。

[0022] 进一步地,步骤2) 中,所述掺杂纳米金-分子印迹聚合物溶液的制备方法:配制 0.1mol/L KNO_3 溶液,加入3-硝基酪氨酸、吡咯和氯金酸溶液,超声形成均一溶液即可。

[0023] 更进一步地,步骤2) 中,所述吡咯、3-硝基酪氨酸和氯金酸的摩尔比为 $1:1:1$ 。

[0024] 进一步地,步骤3) 中,所述3-硝基酪氨酸模板分子去除的过程如下:将步骤2) 制备的传感器浸入 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸缓冲液中 $6\sim 8\text{min}$ 即可。

[0025] 一方面,本发明提供一种运用本发明方法制备的3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器。

[0026] 另一方面,本发明提供一种本发明制备的3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器在定性或定量检测3-硝基酪氨酸分子的应用。可用于检测体液,尤其是血液、尿液中的3-硝

基酪氨酸分子。

[0027] 进一步地,所述应用的检测步骤如下:

[0028] 以Ag/AgCl为参比电极,以Pt电极为对电极,分子印迹电化学传感器为工作电极,连接到电化学工作站,在待测样品溶液中,扫描电位为1.02V,检测电化学传感器洗脱和吸附模板分子前后的电信号变化,按照电流-浓度标准工作曲线计算样品中3-硝基酪氨酸的浓度。

[0029] 进一步地,所述电流-浓度标准工作曲线的绘制过程如下:

[0030] 以Ag/AgCl为参比电极,以Pt电极为对电极,分子印迹电化学传感器为工作电极,连接到电化学工作站,在 $2.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ mol/L浓度的3-硝基酪氨酸中,扫描电位为1.02V,检测电化学传感器洗脱和吸附模板分子前后的电信号变化与3-硝基酪氨酸浓度的关系,绘制电流-浓度标准工作曲线。

[0031] 碳纳米管具有独特的力学、电学和热力学等性质,通过化学手段对碳纳米管通过表面修饰来改善碳纳米管的溶解度性和分散性,增强多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带导电性强,成为构建电化学传感器的优良材料;本发明采用多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带修饰电极能够在电极表面形成网络结构从而加速电子传递同时提供更多结合位点。因此基于多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带构造的电化学生物传感器能够提高电化学信号的灵敏度。

[0032] 金纳米粒子特有的催化功能和高的有效面积等优势,对生物活性物质显示出突出的电导性能和优秀的生物相容性。另外,由于分子印迹传感器表面上的有效结合位点决定着传感器的灵敏度,因此为了进一步提高分子印迹传感器的导电性,本发明采用同时沉积纳米金和分子印迹膜来构造导电分子印迹聚合膜,从而使得分子印迹膜拥有高导电性、大的表面积和优秀的生物相容性等优势,也提高了检测的灵敏度和对目标分子的选择性。

[0033] 本发明制备的传感器灵敏度高,检测速度快,只需要几分钟就可以完成一个基本的检测过程;本发明检测3-硝基酪氨酸的方法,操作简单、快速、灵敏,便于现场检测。

[0034] 本发明通过研制功能化纳米材料分子印迹电化学传感器,采用复合纳米金-分子印迹聚合物对电极进行修饰,获得的电化学传感器兼备选择性响应能力强、检测灵敏度高的优势,可望实现检测的微型化和现场操作化,能简化操作、快速响应、高检测精度及较强抗干扰性,这对3-硝基酪氨酸的快速、灵敏的分析检测和相关疾病的早期诊断具有重要意义。

[0035] 本发明公开的分子印迹电化学传感器,为生物标记物3-硝基酪氨酸的功能化纳米材料分子印迹电化学传感器,其制备是首先将多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带滴涂于玻碳电极上,得到功能化纳米材料电极,再把该功能化纳米材料电极同时沉积纳米金和分子印迹膜,最终得到功能化纳米材料分子印迹电化学传感器。

[0036] 本发明公开的传感器还具有如下优势:选择性好;对3-硝基酪氨酸灵敏度高;具有制作简单、性能稳定,能重复使用;且制备价格低廉,样品前处理简单,检测快速,设备便携适合现场检测。

附图说明

[0037] 图1为电流-浓度的标准工作曲线。

[0038] 图2为3-硝基酪氨酸的分子印迹电化学传感器的制备流程图。

具体实施方式

[0039] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0040] 实施例1电极的制备

[0041] 1) 玻碳电极的预处理:将玻碳电极依次用 $0.5\mu\text{m}$ 、 $0.05\mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 粉在麂皮上抛光,用超纯水冲洗后在质量分数为50%的硝酸溶液、乙醇和水中分别超声清洗5min,然后将电极于 5mmol/L 铁氰化钾中扫描,直到得到可逆的循环伏安峰为止;

[0042] 2) 多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带纳米材料的制备:120mg MWCNT分散于40mL $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (摩尔比为9:1)溶液中,室温搅拌1h。然后向上述溶液中缓慢加入600mg KMnO_4 后,65℃条件下,水浴加热2h。最后加入400mL冰水(包含有5mL 30% H_2O_2)终止反应。用聚四氟乙烯膜过滤,水洗,乙醇洗,最后60℃真空干燥过夜,得到MWCNT@GONRs纳米材料;将所得MWCNT@GONRs纳米材料溶解于去离子水溶液中,超声1h,得到均一溶液;

[0043] 3) 活化多壁碳耦合氧化石墨烯纳米材料修饰玻碳电极的制备:取10 μL 的多壁碳耦合氧化石墨烯纳米带溶液滴在步骤1)处理好的玻碳电极表面,红外灯下烘干;将修饰MWCNT@GONRs的玻碳电极浸于pH7.0磷酸缓冲液中,采用电压范围为 $0.6\text{V}\sim 1.8\text{V}$,扫描速率 0.1V/s 来制备活化的MWCNT@GONRs膜;

[0044] 4) 掺杂纳米金-分子印迹聚合物溶液的配制:配制 0.1mol/L KNO_3 溶液,加入 0.5mmol/L 模板分子(3-硝基酪氨酸), 0.5mmol/L 功能单体(吡咯)和 0.5mmol/L 氯金酸溶液,超声10min,形成均一溶液,备用;

[0045] 5) 3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器的制备:将活化的MWCNT@GONRs电极置于步骤4)制备的掺杂纳米金-分子印迹聚合物溶液中,采用电压范围为 $-1.0\text{V}\sim 1.0\text{V}$,扫描速率为 0.05V/s ,扫描圈数为10圈,进行电聚合分子印迹膜,完成后用去离子水冲洗电极,然后在红外灯下干燥晾干;将电极浸入pH=7.0的磷酸缓冲液中6~8min,采用pH7.0磷酸缓冲液洗脱掉传感器表面上的模板分子(3-硝基酪氨酸),自然晾干,即得3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器。

[0046] 实施例2工作曲线的绘制及检测限的测定

[0047] 用方波溶出伏安法进行3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器响应性的实验,测定线性范围及检测限。将3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器浸入不同3-硝基酪氨酸标准品中,然后进行方波溶出伏安法测量。以 Ag/AgCl 为参比电极,以Pt电极为对电极,分子印迹电化学传感器为工作电极,连接到电化学工作站,在不同浓度的3-硝基酪氨酸中,扫描电位为 1.02V ,检测电化学传感器洗脱和吸附模板分子前后的电信号变化与3-硝基酪氨酸浓度的关系,绘制工作曲线,如图1所示。

[0048] 3-硝基酪氨酸溶液浓度在 $2.0\times 10^{-7}\sim 5.0\times 10^{-5}\text{mol/L}$ 范围内呈现良好的线性关系;线性方程为 $I_p(\mu\text{A})=0.3934c+5.778\times 10^{-7}$ 。该方法所得的检测限为 $5.0\times 10^{-8}\text{mol/L}$ 。

[0049] 因此,该3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器具有极高的灵敏度。

[0050] 实施例3修饰电极的再生、重现性及干扰实验

[0051] 在实施例1所述的条件下制备5支3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器,采用同一支3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器对 $5.0\times 10^{-5}\text{mol/L}$ 3-硝基酪氨酸进行连续5次测量,在每一次测量后,电极都要用去离子水对电极表面进行清洗。计算电流响应值的相对标

准偏差为3.2% (n=5),说明该分子印迹电极具有较好的重现性。模板分子与印迹膜上的“孔穴”的结合为可逆过程,3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器可重复使用。此外,采用贮存避光条件下三个月的修饰电极对相同浓度的3-硝基酪氨酸进行测定,氧化峰电流还保持为原来的94.5%,说明该3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器有良好的稳定性。

[0052] 将3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器置于常见共存离子和其他氨基酸溶液中,考察常见共存离子和其他氨基酸对3-硝基酪氨酸测定的影响。结果表明,在误差5%的范围内,100倍浓度的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 CO_3^{2-} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、葡萄糖、蔗糖、淀粉、酪氨酸、半胱氨酸、抗坏血酸、色氨酸、组氨酸、尿酸和苯胺对3-硝基酪氨酸的测定均不产生干扰,说明了本发明制备的3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器对一般干扰物质有一定抗干扰性。

[0053] 实施例4正常人血清样品检测实验

[0054] 为了评价本发明的检测效果,随机选择6份正常人血清样品进行加标回收率实验。血清样品通过用2倍体积的甲醇沉淀蛋白后,上清液用氮气吹干,残渣复溶后,吸取500 μ L体积样品于10mL容量瓶中,用0.1mol/L磷酸盐缓冲液定容后,采用本发明的3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器来进行电化学分析,每个样品平行测定3次,结果见下表1。

[0055] 从表1中数据可知,该方法的平均回收率在97.0%-101.6%之间,相对标准偏差在1.4%-2.3%之间,说明本发明制备的3-硝基酪氨酸分子印迹电化学传感器检测效果良好。

[0056] 表1血清样品进行加标回收实验结果

[0057]

序号	原始浓度 (μ mol/L)	加入浓度 (μ mol/L)	测试浓度 (μ mol/L)	回收率 (%)	RSD (%)
1	0	10.0	10.16	101.6	1.4
2	0	5.0	5.11	102.2	2.3
3	0	1.0	0.97	97.0	1.9

[0058] 以上所述仅为发明的优选实施例,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

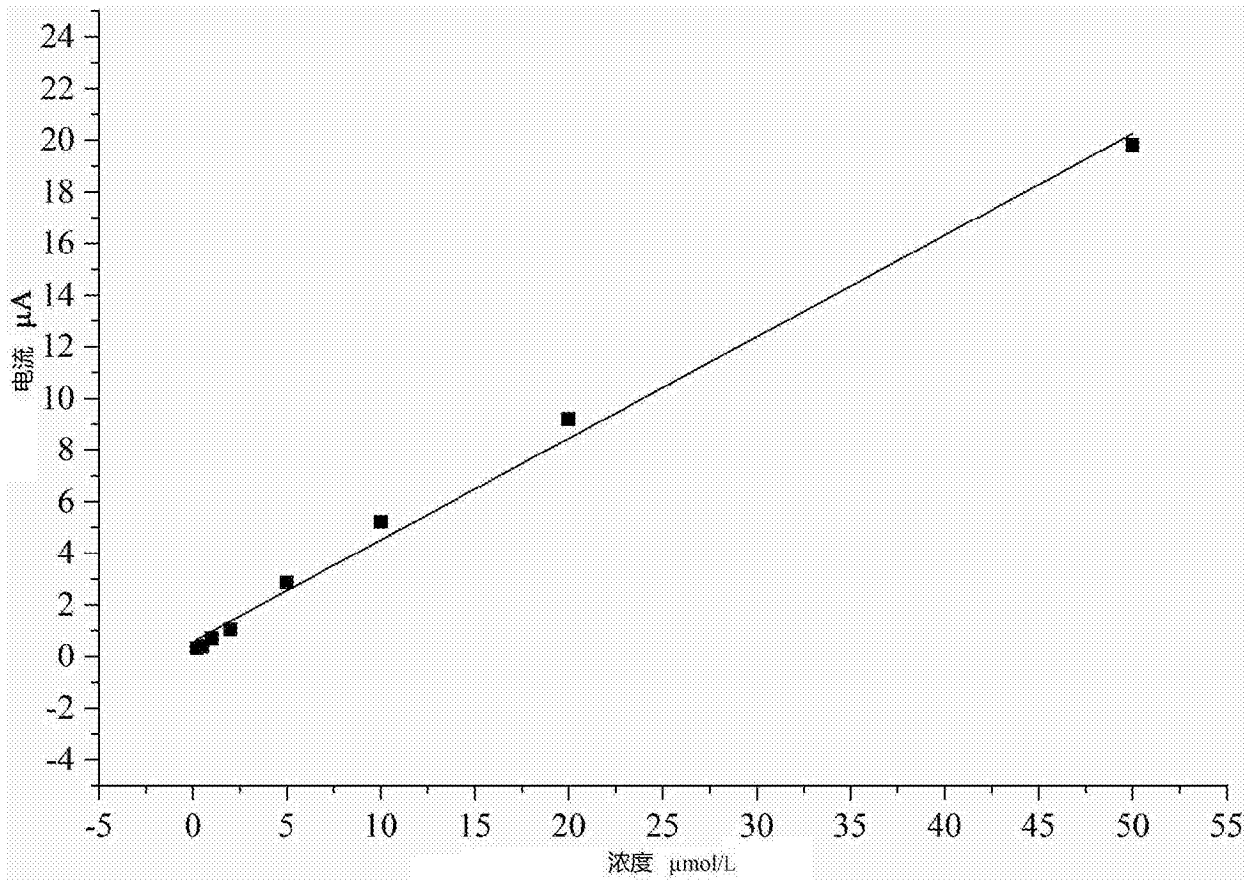


图1

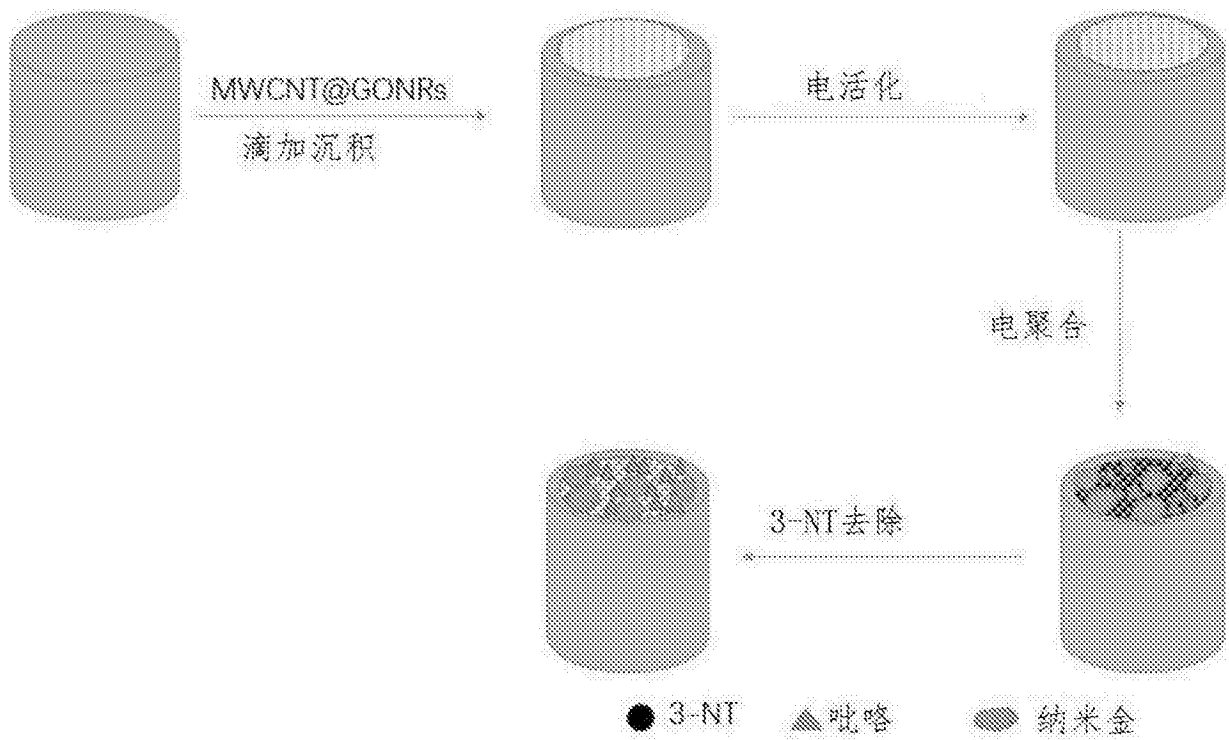


图2