

光导纤维电化学发光葡萄糖传感器的研究

李瑛琇, 朱连德, 朱果逸^{*}

(中国科学院长春应用化学研究所电分析化学开放实验室, 长春 130022)

摘要:以碳糊为固定化载体, 将葡萄糖氧化酶固定在碳糊电极上, 制成了光导纤维电化学发光葡萄糖生物传感器。葡萄糖的酶催化反应、鲁米诺的电化学氧化和化学发光反应在电极表面同时发生, 因此该传感器的信号响应在 10 s 内达到发光强度峰值。葡萄糖浓度在 1.0×10^{-7} ~ 2.0×10^{-6} mol/L 范围内与发光强度呈线性关系, 检出限为 6.4×10^{-8} mol/L, 可应用于市售饮料中葡萄糖的测定。

关键词:电化学发光; 生物传感器; 光导纤维; 葡萄糖; 鲁米诺

中图分类号: O657.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2001)05-0089-04

在常见的电化学发光物质中, 鲁米诺中的化学发光(ECL) 现象研究和应用最早^[1], 已广泛应用于测定痕量金属离子、鲁米诺及标记有鲁米诺的化合物、过氧化氢和一些在酶作用下能够产生过氧化氢的物质^[2-5]。在与酶促反应联用时, 为了减少酶的使用和简化实验装置, 通常将酶固定化以构建电化学发光生物传感器^[6-10]。固定酶的方法主要有两种方式: 一种是将酶固定在电极附近的载体上如尼龙 66^[6]、预活化膜^[7]、光诱导交联聚合物^[8-9]等。另外一种是将酶通过共价键合的方法直接固定在电极上^[10-11], 但这种酶电极在溶液中长期使用会导致电极表面的污染从而使测量结果的重现性变差, 解决的方法一般是采用一次性电极和表面可更新的电极。最近 Leeca 等^[12]将一次性的丝网印刷电极(Screen-printed electrode)用于电化学发光研究, 制备了价格低廉的胆碱光纤电化学发光传感器, 但由于酶膜的影响, 该传感器的响应速度很慢, 长达 2 min。表面可更新的电极如碳糊电极在电分析化学中有广泛地应用^[13]。近年来, 人们发现许多具有生物活性的物质固定在碳糊电极上时, 它们的稳定性得到较大的提高, 因而碳糊已经广泛用于酶、抗体(抗原)、生物组织和细胞的固定以研制安培生物传感器^[14]。然而迄今为止碳糊电极在电化学发光传感器的研究和应用尚未见报道。本文将葡

萄糖氧化酶固定在碳糊电极中制成了光纤电化学发光葡萄糖传感器。此传感器制作简单, 表面易于更新, 对葡萄糖的响应时间仅为 10 s, 直线性范围宽, 灵敏度高, 检出下限为 6.4×10^{-8} mol/L, 可应用于市售饮料中葡萄糖的测定。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

电化学发光仪(组装), 包括 R931A 型光电倍增管(日本滨松电子公司), Parc 273 型恒电位仪(美国 EG&G 公司), 电化学发光池(如图 1 所示,

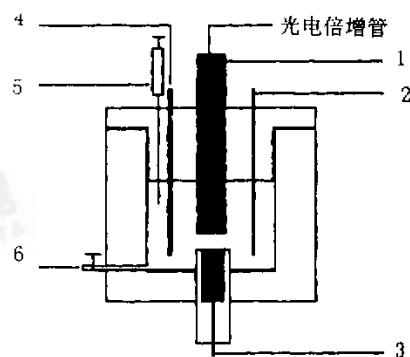


图 1 电化学发光池构型图

Fig. 1 Configuration diagram of electrochemiluminescence cell

1. 光导纤维束; 2. 一对电极; 3. 碳糊电极; 4. 参比电极;
5. 注射器; 6. 废液出口

收稿日期: 2001-01-21; 修定日期: 2001-04-01

作者简介: 李瑛琇(1972-), 女, 硕士研究生

总体积为 8 mL, 用不透明树脂材料加工而成) 和 X-Y t 台式记录仪。

鲁米诺储备液: 准确称取 0.0885 g 鲁米诺(>98%) 溶于少量的 0.1 mol/L NaOH 溶液中, 转入 50 mL 容量瓶用二次蒸馏水定容。实验时用 0.1 mol/L pH 8.5 硼砂缓冲溶液逐级稀释。硼砂缓冲溶液: 称取 9.5343 g 硼砂和 1.5458 g 硼酸溶于水中, 定容至 500 mL, 使用时用稀盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 值。葡萄糖氧化酶(EC 1.1.3.4, 139 U/mg, 简称 GOD, Sigma 公司); 其它试剂均为分析纯以上。

1.2 电极的制备

准确称取 180 mg 碳粉和 20 mg 葡萄糖氧化酶, 在研钵中研磨均匀, 加入 100 μL 石蜡油, 再研磨 30 min 后, 装入内径为 4 mm 的玻璃管中, 压实后在玻璃管另一端插入铜丝作为导体。

1.3 实验方法

每次实验前, 将碳糊电极在称量纸上抛光, 用二次水冲洗干净, 安置在电化学发光池底部与光导纤维正对, 光纤端面与电极距离为 3~5 mm。在电化学发光池中加入 1 mL 0.5 mmol/L 鲁米诺溶液和 3 mL 0.1 mol/L 的硼砂缓冲溶液。然后通过恒电位仪施加 0.8 V 的电位, 待信号平稳后, 通过注射器加入 1 mL 葡萄糖(或样品)溶液, 用记录仪记录发光信号。

2 结果与讨论

2.1 鲁米诺和过氧化氢的循环伏安图

对鲁米诺和过氧化氢分别进行了循环伏安研究。如图 2 所示: 从图 2(a) 可见在 0.56 V 有一个明显的鲁米诺氧化峰, 此时鲁米诺被氧化为二氮酰。在大约 0.88 V 有一个肩峰, 对应着鲁米诺氨基的氧化^[15]。从图 2(b) 可见, 尽管过氧化氢的浓度是鲁米诺的 10 倍, 但在 1.0 V 以下其氧化电流并不明显。因此, 在 0~1.0 V 之间选择电位值, 可以只让鲁米诺发生氧化。

2.2 电极电位与电化学发光强度的关系

实验结果表明, 在 0.3 V 以下, 几乎观测不到发光信号, 高于 0.4 V 以后, 发光强度随电极电位的增加而迅速增强, 但同时背景(噪声)也随之增大, 在 0.8 V 时信噪比达到最大值。由于信噪比影响实验的最低检出限, 因此实验中选择 0.8 V 作为碳糊电极的工作电位。

2.3 缓冲溶液 pH 的影响

缓冲溶液的 pH 值不但影响鲁米诺的发光效率也影响酶的反应活性, 从而影响葡萄糖传感器的响应信号强度。实验结果表明, 当 pH 值为 8.5 时发光强度最大。因此, 在实验过程中, 向体系中加入硼砂缓冲溶液并用其配制各溶液, 从而保证体系 pH 8.5。

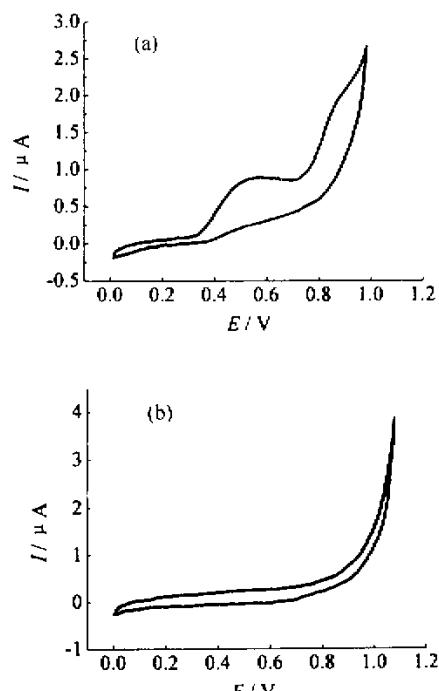


图 2 鲁米诺(a)和过氧化氢(b)的循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms of luminol(a) and hydrogen peroxide(b)

$c_{\text{鲁米诺}} = 0.1 \text{ mmol/L}$; $c_{\text{过氧化氢}} = 1 \text{ mmol/L}$; $v = 50 \text{ mV/s}$

2.4 鲁米诺浓度的影响

考察了鲁米诺浓度在 0.01~1 mmol/L 范围内对发光强度的影响, 鲁米诺浓度从 0.01 mmol/L 到 0.1 mmol/L 发光强度增加很快, 从 0.1 mmol/L 到 0.5 mmol/L 达到稳定值。当鲁米诺的浓度增加到 1 mmol/L 时, 由于淬灭效应致使发光强度略有下降。在选择鲁米诺浓度时考虑到鲁米诺浓度增大对电极的污染程度加剧, 故本实验选择鲁米诺的浓度为 0.1 mmol/L。

2.5 葡萄糖传感器的响应

葡萄糖传感器的信号强度随时间的变化曲线如图3所示,该电化学发光传感器对葡萄糖的响应速度很快,加入葡萄糖后即有发光信号产生,到达发光强度峰值的时间大约为10 s。这是由于采用碳糊作固定化载体时,葡萄糖氧化酶和碳粉都与溶液直接接触,酶催化反应、鲁米诺的电化学氧化以及化学发光反应在电极表面几乎同时进行。

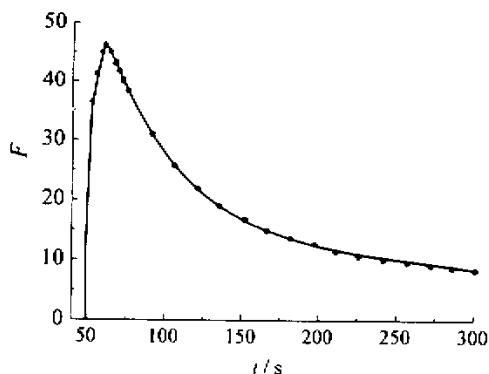


图3 电化学发光强度与时间的关系曲线

Fig. 3 Relationship of electrochemical luminescence intensity and time

$$c_{\text{鲁米诺}} = 0.1 \text{ mmol/L}; c_{\text{葡萄糖}} = 0.2 \text{ mmol/L}$$

2.6 测定葡萄糖的工作曲线

在上述优化的实验条件下,葡萄糖浓度在 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 之间与发光强度有较好的线性关系,相关系数为0.999,检测限为6.4 $\mu\text{mol/L}$ 。对 $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的葡萄糖溶液进行8次平行测定,相对标准偏差为6.2%。在相同条件下,对同一只电极进行6次抛光测定的相对标准偏差为9.7%。以上浓度都是以发光池中的最后浓度计算的。

2.7 干扰实验

参考饮料中其它物质含量。对于 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 葡萄糖,500倍的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ;100倍的蔗糖、乳糖、麦芽糖、果糖、柠檬酸;50倍的乳酸、苯甲酸钠;等量的 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 等均不干扰测定。等量的抗坏血酸有负干扰。实验前将稀释后(1:100)的样品溶液充氧后放置2天使抗坏血酸氧化以消除干扰。

2.8 样品分析

对2种不同口味的市售饮料中葡萄糖的含量

进行测定,结果如表1所示。

表1 饮料样品中葡萄糖的含量及回收率(稀释1:100)

Tab. 1 Glucose content and recovery in soft drink samples (diluted 1:100)

样品编号	葡萄糖(mmol/L)		回收率(%)
	加入量	测得值	
1	—	0.54	—
	0.5	1.02	96
	1.0	1.58	104
2	—	0.97	—
	0.5	1.51	108
	1.0	1.98	101

参考文献

- [1] Harvey N. J Phys Chem. 1929, 33 (2): 1456
- [2] 安镜如, 林金明, 陈 曦. 分析化学, 1991, 19 (11): 1340
- [3] Knight A W, Greenway G M. Analyst, 1994, 119 (5): 879
- [4] 陈 曦, 王小如, 黄本立. 分析化学, 1998, 26 (6): 770
- [5] Knight A W. Trends in Anal Chem. 1999, 18 (1): 47
- [6] Preston J P, Nieman T A. Anal Chem. 1996, 68 (6): 966
- [7] Marquette C A, Ravaud S, Blum L. J Anal Lett, 2000, 33 (9): 1779
- [8] Tsafack V C, Marquette C A, Leca B, Blum L. J Analyst, 2000, 125 (1): 151
- [9] Marquette C A, Blum L. J Anal Chim Acta, 1999, 381 (1): 1
- [10] Kremeskotter J, Wilson R, Kremeskotter J, Schiffri D J, Luff B J, Wilkinson J S. Meas Sci Technol, 1995, 6 (9): 1325
- [11] Wilson R, Kremeskotter J, Schiffri D J. Biosens & Bioelectronics, 1996, 11 (8): 805
- [12] Leca B, Blum L. J Analyst, 2000, 125 (5): 789
- [13] Kalcher K. Electroanalysis, 1990, 2 (6): 419
- [14] Gorton L. Electroanalysis, 1995, 7 (1): 23
- [15] Sakura S. Anal Chim Acta, 1992, 262 (1): 49

xiu, ZHU Lian-de and ZHU Guo-yi (Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022), Fenxi Shiyanshi, 2001, 20(5): 89~92

Abstract: An optical fiber biosensor based on luminol electrochemiluminescence (ECL) was developed for determination of glucose. Using carbon paste as the solid support, glucose oxidase (GOD) was bulk-immobilized in the carbon paste electrode. The enzymatic reaction electrooxi-

dation of luminol and chemiluminescent reaction occurred simultaneously on the surface of the carbon paste electrode, so the response of the biosensor was very fast. The peak intensity was achieved within only 10 seconds after glucose injection. The linear range extends from 1.0×10^{-5} to 2.0×10^{-2} mol/L for glucose with detection limit of 6.4×10^{-6} mol/L. The biosensor was applied to determination of glucose in soft drinks.

Keywords: Electrochemiluminescence; Biosensor; Optical fiber; Glucose; Luminol

《稀有金属》中文版 2002 年征订、征稿简则

《稀有金属》是大型综合性科技期刊,从 2002 年起由北京有色金属研究总院主办,国家有色金属工业协会主管、北京有色金属研究总院院长屠海令任主编。《稀有金属》为中文核心期刊,冶金工业类核心期刊,中国科技论文统计源期刊,中国科学引文数据库源期刊,中国物理学文献数据库源期刊以及中国学术期刊(光盘版)入编期刊等。从 2001 年起,世界著名检索系统美国化学文献(CA)开始收录本刊,表明本刊的办刊质量和学术水平又上了一个新台阶。《稀有金属》主要报道稀有金属、贵金属、稀土金属及镍钴等有色金属在材料研制、合金加工、选矿、冶炼、理化分析测试等方面的最新科研成果及应用及应用,同时还报道超导材料、半导体材料、复合材料、陶瓷材料、纳米材料、磁性材料等新材料的研究开发及应用。本刊适用于稀有及有色金属、冶金、石油化工、地质、能源、航空航天等领域的研究与应用机构、公司厂矿企业和高等院校的科技人员阅读。《稀有金属》增设“专家述评”、“研究快报”和“应用技术”栏目。分别重点报道各领域内著名专家的综合评述文章和各领域内最快、最新的研究开发及应用成果以及企业生产中有关技术的应用情况。“研究快报”类文章三个月左右刊出。本刊热忱欢迎从事稀有金属研究的专家、学者为《稀有金属》(中文版)投稿!《稀有金属》自 2001 年起办理广告刊登业务,向社会各界全面收集广告,以同类期刊中最低廉的广告价格提供质量上乘的服务,广告价格为彩色 2500 元,黑白 1000 元,广告经营许可证号:京海工商广字第 0286 号。

《稀有金属》刊号为 ISSN0258-7076, CN11-2111/TF, 大 16 开, 双月刊, 80 页, 逢单月 4 日出版, 每期定价 10 元, 全年 60 元。本刊可通过全国各地邮局征订, 邮发代号 82-167。读者也可直接向编辑部订阅。《稀有金属》编辑部联系地址: 北京新街口外大街 2 号; 邮编: 100088; 电话: 010-62014488-6312, 4835; E-mail: xyjsbjb@xinmail.com