



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103558268 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201310398596. 0

CN 102162806 A, 2011. 08. 24,

(22) 申请日 2013. 09. 04

CN 102636540 A, 2012. 08. 15,

CN 102350372 A, 2012. 02. 15,

(73) 专利权人 盐城工学院

地址 江苏省盐城市亭湖区黄海中路 20 号

郑虎祥等. 滤纸存储试剂在分析化学中的应用. 《盐城工业学院学报(自然科学版)》. 2011, 第 24 卷(第 1 期), 25-29, 38.

(72) 发明人 方海林 孔粉英 王伟 顾赛喜
谈立伟

审查员 海岩冰

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
代理人 韩朝晖

(51) Int. Cl.

G01N 27/26(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102183573 A, 2011. 09. 14,

WO 2013036617 A1, 2013. 03. 14,

US 2010116691 A1, 2010. 05. 13,

CN 103212439 A, 2013. 07. 24,

CN 103033549 A, 2013. 04. 10,

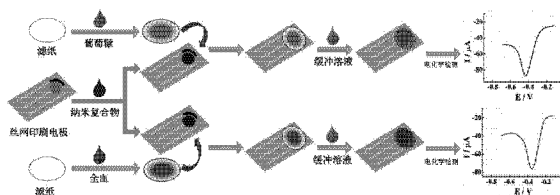
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

一种集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法

(57) 摘要

本发明公开一种集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,所述方法包括如下步骤,将石墨烯/聚苯胺/纳米金复合材料分散在壳聚糖醋酸溶液中,制得石墨烯/聚苯胺/纳米金复合材料混合液,石墨烯/聚苯胺/纳米金复合材料混合液与葡萄糖氧化酶溶液混合均匀,用于修饰丝网印刷电极,将修饰后的丝网印刷电极固定,在滤纸片上滴加样品,晾干,最后用滤纸片覆盖在修饰后的丝网印刷电极表面,滴加磷酸盐缓冲溶液,进行电化学测试。改用小滤纸圆片作为载体,不仅可以方便保存样品,而且减少了试剂用量和样品量,节约制作成本。



1. 一种集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤,

将石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料分散在壳聚糖醋酸溶液中,制得石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料混合液,

石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料混合液与葡萄糖氧化酶溶液混合均匀,用于修饰丝网印刷电极,

将修饰后的丝网印刷电极固定,

在滤纸片上滴加样品,晾干,

最后用滤纸片覆盖在修饰后的丝网印刷电极表面,滴加磷酸盐缓冲溶液,进行电化学测试。

2. 根据权利要求 1 所述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,其特征在于:所述葡萄糖氧化酶溶液溶解于 pH 为 4.0 的柠檬酸与柠檬酸钠缓冲液中。

3. 根据权利要求 1 所述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,其特征在于:所述石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料混合液与葡萄糖氧化酶溶液按照体积比 1:1 混合。

4. 根据权利要求 1 所述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,其特征在于:所述丝网印刷电极采用滴涂法修饰。

5. 根据权利要求 1 所述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,其特征在于:所述滤纸片为色谱级滤纸圆片。

6. 根据权利要求 1 所述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,其特征在于:所述磷酸盐缓冲溶液 pH 为 7.0。

7. 根据权利要求 4 所述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,其特征在于:所述滴涂法操作方法如下,首先石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料混合液与葡萄糖氧化酶溶液的混合液修饰到丝网印刷电极上,室温晾干;接着再滴加 Nafion 乙醇溶液,室温晾干,最终得到修饰好的丝网印刷电极。

一种集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及即时电化学检测全血中的葡萄糖,具体地说,是基于葡萄糖氧化酶修饰在丝网印刷电极上的直接电化学反应并结合滤纸圆片储存试剂来测定全血中的葡萄糖。

背景技术

[0002] 自从1967年第一支葡萄糖传感器诞生以来[参见:Wilson, R, Turner, A. P. F., Biosens. Bioelectron., 1992, 7, 165-185.],由于它的低成本、商业效用、高的生物催化活性和稳定性,其应用范围已经从临床实验室向人们自我检测扩展,被广泛应用于监测糖尿病患者血液中葡萄糖的浓度水平,有利于对发病率渐增的糖尿病的防治。

[0003] 随着第三代生物传感器的发展,即通过对电极的表面进行修饰来构筑酶直接电子传递的界面,越来越多的研究者将目光投向了新型材料的合成以及酶的直接电化学测定。现今已出现很多关于利用葡萄糖氧化酶(GOD)的直接电化学性质来测定葡萄糖含量的报道[参见:Wang, Y., Liu, L., Li, M., Biosens. Bioelectron. 2011, 30, 107-111.],但是没见到利用第三代生物传感器直接测定全血中葡萄糖的报道,更多的是测定血清中的葡萄糖浓度,这对实现血糖浓度的即时测定产生了困难。而且现有技术电化学测试采用的传统电解池需要较大的试剂和样品用量,成本较高,同时是对资源的一种浪费。

发明内容

[0004] 本发明的主要目的在于,克服现有的血糖浓度即时测定存在的缺陷,而提供一种新型集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,测试简便、快速,使用自制的传感器便于携带,从而更加适于实用,且具有产业上的利用价值。

[0005] 本发明的目的及解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。依据本发明提出的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,所述方法包括如下步骤,

[0006] 将石墨烯/聚苯胺/纳米金复合材料分散在壳聚糖醋酸溶液中,制得石墨烯/聚苯胺/纳米金复合材料混合液,

[0007] 石墨烯/聚苯胺/纳米金复合材料混合液与葡萄糖氧化酶溶液混合均匀,用于修饰丝网印刷电极,

[0008] 将修饰后的丝网印刷电极固定,

[0009] 在滤纸片上滴加样品,晾干,

[0010] 最后用滤纸片覆盖在修饰后的丝网印刷电极表面,滴加磷酸盐缓冲溶液,进行电化学测试。

[0011] 优选的,为了保持葡萄糖氧化酶的活性,葡萄糖氧化酶溶液溶解于pH为4.0的柠檬酸与柠檬酸钠缓冲液中。

[0012] 优选的,前述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,所述石墨烯/聚苯胺/纳米金复合材料混合液与葡萄糖氧化酶溶液按照体积比1:1混合。

[0013] 前述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,所述丝网印刷电极采用滴涂法修饰。

[0014] 前述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,所述滤纸片为色谱级滤纸圆片(Whatman No. 1 滤纸)。

[0015] 前述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,所述磷酸盐缓冲溶液 pH 为 7.0。

[0016] 前述的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法,所述滴涂法操作方法如下,首先石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料混合液与葡萄糖氧化酶溶液的混合液修饰到丝网印刷电极上,室温晾干;接着再滴加 Nafion 乙醇溶液,室温晾干,最终得到修饰好的丝网印刷电极。

[0017] 借由上述技术方案,本发明集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法至少具有下列优点:

[0018] 1. 本发明摒弃了传统电化学中的电解池,改用了很小的滤纸圆片作为承载体,不仅可以起到保存样品的作用,而且大大减少了试剂用量和样品量,减少了制作成本;

[0019] 2. 该检测方法应用到的自制传感器,制作简单、快速,便于携带和测定,同时也为一次性即时测定其他物质提供了一个很好的应用平台和启示。

[0020] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例详细说明如后。

附图说明

[0021] 图 1 所示为本发明集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法测定示意图;

[0022] 图 2 所示为本发明集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法与传统方法产生的葡萄糖氧化酶峰电流对比图;

[0023] 图 3 所示为葡萄糖氧化酶 / 石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金修饰丝网印刷电极对不同浓度葡萄糖的电化学响应;

[0024] 图 4 所示为葡萄糖氧化酶 / 石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金修饰丝网印刷电极对全血中不同浓度的葡萄糖的电化学响应。

具体实施方式

[0025] 为更进一步阐述本发明为达成预定发明目的所采取的技术手段及功效,对依据本发明提出的集成纸基微流控设备电化学检测全血中的葡萄糖浓度的方法其具体实施方式、特征及其功效,详细说明如后。

[0026] 1. 石墨烯的制备

[0027] 首先按照 Hummers 法合成氧化石墨烯:将 5.0g 石墨粉和 2.5g NaNO_3 加入到 15.0mL 6°C 浓 H_2SO_4 中,在 0°C 强力搅拌下缓慢加入 15g KMnO_4 (控制温度不超过 20°C),加完后,保持 35°C 继续搅拌 30min,然后加 230.0mL 蒸馏水稀释,温度升至 98°C,保持 15min 后加 700.0mL 蒸馏水稀释,接着加入 200.0mL 3% H_2O_2 并趁热抽滤(防止副反应生成苯六甲酸),最后在鼓风干燥箱中 60°C 烘干即得氧化石墨烯,然后利用化学分散法制备石墨烯。即将氧化

石墨烯粉 200.0mg 与水 200.0mL 混合,用超声波振荡至溶液清晰无颗粒状物质,加入 2.0mL 肼在 100℃油浴回流 24h,产生黑色颗粒状沉淀,过滤、在鼓风干燥箱中 60℃烘干即得石墨烯。

[0028] 2. 纳米金金胶溶液的制备

[0029] 1.0mL 质量百分比浓度为 1% 的 HAuCl_4 溶液加入到 100.0mL 蒸馏水中,加热使其沸腾,在剧烈搅拌下快速加入 2.5mL、1% 的柠檬酸钠溶液,待溶液沸腾后搅拌 15min,搅拌过程中会发生明显的颜色变化,其颜色变化为由灰 - 蓝 - 紫,最后变为酒红色,颜色变化完成后停止加热,继续搅拌 10min,由此制得的纳米金金胶溶液,将产物在 4℃的条件下保存。

[0030] 3. 石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料的制备

[0031] 苯胺与石墨烯的质量比为 100:1,将 1.0mg 石墨烯和 100.0mg 苯胺单体添加到 20mL 2.0mol/L 盐酸溶液中,在常温下搅拌半小时,然后向 10mL 水溶液中加入 0.46g 过二硫酸铵 (APS),将得到的溶液继续用磁力搅拌器继续搅拌。在反应过程中,溶液的颜色从无色变为深绿色,5 个小时后,将获得的石墨烯 / 聚苯胺纳米复合材料用离心机高速分离,然后用蒸馏水多洗几次,在 60℃条件下干燥。

[0032] 称取 0.01g 石墨烯 / 聚苯胺纳米复合材料加入到 25mL 的纳米金金胶溶液中,并且超声分散 10 分钟,在常温下静置 3 天后,离心分离混合液体得到沉淀,60℃烘干沉淀并研磨成细粉末状,即得到石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料,常温下密封保存。

[0033] 4. 微流体纸基电化学传感的构建

[0034] 称取 0.5g 壳聚糖,加入到 1.0% 的 HAc 溶液 100.0mL,在 80-90℃水浴下溶解,冷却至室温,得到粘稠的 0.5% (w/v) 壳聚糖溶液;将实验制备所得的石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料分散在 0.5% 的壳聚糖溶液 (醋酸配置) 中,制备成浓度为 1.0mg/mL 石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金 / 葡萄糖氧化酶纳米复合材料,再与 16mg/mL 的 GOD 溶液 (溶解于 pH 为 4.0 柠檬酸与柠檬酸钠缓冲液中,有利于更好地保持 GOD 的活性) 按体积 1:1 混合均匀,采用滴涂法制备修饰电极:首先取 8 微升上述混合液修饰到丝网印刷电极上,室温晾干;再加 3 微升 0.5% 的 Nafion 溶液 (溶于乙醇),室温晾干。然后,将修饰电极固定在配套的装置上,将空白或者已经滴加过样品的直径为 1cm 的色谱级滤纸圆片 (Whatman No. 1 滤纸) 覆盖在修饰电极表面,滴加 15 μL 浓度为 0.1mol/L, pH 为 7.0 的 PBS (磷酸盐) 缓冲溶液,最后进行电化学测定,其制备和测定过程如图 1 所示:

[0035] 电化学方法的选择,经过文献考察,采用纳米复合材料固定葡萄糖氧化酶测定葡萄糖使用的电化学方法有循环伏安法、静态电流时间法、动态电流时间法、微分脉冲伏安法以及方波伏安法。结合微流体纸基电化学传感装置,并对其检测的可行性及其稳定性做了对比,最终选择电化学方法为微分脉冲伏安法。通过对比试验,根据微分脉冲伏安法所测得的葡萄糖氧化酶的峰电流响应特征大小,对石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料的浓度 (0.1-2.0mg/mL)、葡萄糖氧化酶的浓度 (4-15mg/mL) 进行了优化,最后,选择响应电流最大的值为最佳条件。实验得出混合后石墨烯 / 聚苯胺 / 纳米金复合材料的最佳浓度为 0.5mg/mL,葡萄糖氧化酶的最佳浓度为 8mg/mL。在实验过程中,对滤纸的大小,样品滴加量以及检测前所需加的 PBS 量进行了研究,选择直径为 1cm 的滤纸圆片,这样刚好能够覆盖三电极表面并且也不会使滤纸暴露在丝网印刷电极外面;样品滴加量选择的为 2 μL ,因为当滴加 1 μL 的量,测定葡萄糖不成线性关系,当体积大于 2 μL 时,测定性能也没有改变,反而浪费

样品量 ;选择的 PBS 的量的标准为溶液在滤纸上不溢出,刚铺满,能紧密地与丝网印刷电极所接触,最后选定为 15 μ L。

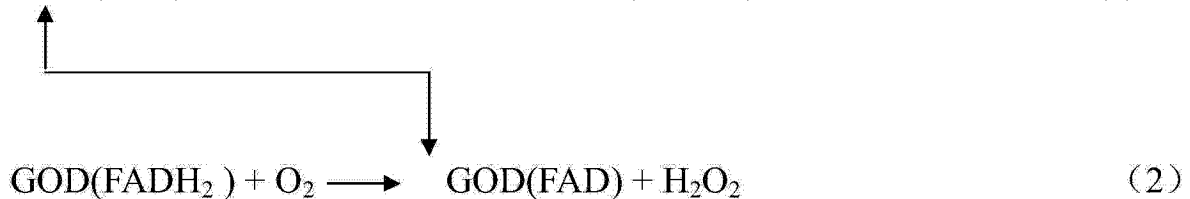
[0036] 与传统方法的对比实验

[0037] 传统的电化学检测方法是把三电极体系即工作电极-玻碳电极、对电极-铂电极、参比电极-饱和甘汞电极/银-氯化银电极放入电解池中,丝网印刷电极是集三电极与一体,而本发明的方法摒弃了传统的电解池,改用滤纸作为缓冲溶液的载体,不仅减少了成本,方便携带,也大大减少了试剂的用量。为了考察新的检测体系的可行性,与传统方法产生的葡萄糖氧化酶峰电流进行对比。将已经修饰了石墨烯/聚苯胺/纳米金/葡萄糖氧化酶的丝网印刷电极分别放入 a:含有 10mL 0.1mol/L 的 PBS 缓冲溶液的电解池中, b:滴加了 15 μ L a 中 PBS 缓冲溶液的滤纸片,放在修饰电极上表面做对比,最后用微分脉冲伏安法进行检测。结果表明两种方法所测得的葡萄糖氧化酶还原峰电流基本一致,如图 2 所示,图形很接近。说明该方法可行,电化学检测并不会随着缓冲溶液的体积减小而减小。

[0038] 本发明检测方法对纯葡萄糖的伏安电流响应特征

[0039] 测定不同浓度的纯葡萄糖前,先在滤纸上滴加 2 μ L 不同浓度的葡萄糖。室温晾干后,用上述方法对纯葡萄糖进行检测,如图 3 所示,从图中可以看出,葡萄糖氧化酶的还原峰电流值随着葡萄糖浓度的增加而减小,它的反应机理为:

[0040]



[0041] 在溶解氧的存在下, GOD (FAD) 的产生导致 FAD 还原峰电流的增加。当葡萄糖浓度增加时,电催化反应就受到酶催化反应的影响,如下述等式 GOD (FAD) 浓度减小:

[0042] $\text{GOD}(\text{FAD}) + \text{Glucose} \rightarrow \text{GOD}(\text{FADH}_2) + \text{Gluconolactone}$ (3) 因此,还原峰电流随着葡萄糖浓度的增大而减小,由此也提出了葡萄糖传感器。

[0043] 本发明中在微芯片集成丝网印刷电极的微流控装置下,响应电流的变化和葡萄糖的浓度呈线性关系,线性范围为 0.2×10^{-3} mol/L 到 11.2×10^{-3} mol/L,检出限为 1.0×10^{-4} mol/L (S/N=3),如图 3 中的内插图所示。该传感器的重复性通过重复检测 5.0mM 葡萄糖 10 次,得到相对标准偏差 RSD 为 6.7%,说明重复性良好。这些结果表明,固定的 GOD 仍有较高的酶的活性,且说明该方法可以用少量的样品量准确地检测出所测物质的浓度。而且人体中血糖浓度的正常值为 5.6-6.9mmol/L,说明本发明的自制传感器可进一步对血糖浓度进行测定。

[0044] 本发明检测方法对全血中的葡萄糖的伏安电流响应特征

[0045] 实验采用的自制传感器直接测定人体血糖的含量,血样取自正常人空腹血液。具体的测定方法如下:取 10 μ L 已知浓度的全血与 10 μ L 不同浓度的葡萄糖混合,再将 2 μ L 混合血液滴在滤纸片上,室温干燥后,加入 15 μ L 磷酸钠缓冲溶液,测定它们的线性关系,如图 4 所示。

[0046] 在计算结果时,我们了解到临床医学中所测得血清中葡萄糖含量大于测定全血中的葡萄糖含量,它们之间有 11% 的浓度相差。通过换算后,本发明将该方法的测定结果与医院专业人员使用 Roche 全自动临床化学分析仪进行比较,它是以葡萄糖氧化酶比色法体外定量测定血清。测定结果如表 1 所示,在医学界,临床认为家用血糖仪的测试结果与医院测试相比,偏差在 20% 以内即认为是准确的 [参见 :Gross, T. M., Diabetes Technology & Therapeutics, 2000, 2, 49-56.]。此实验准确的表明,本发明的测试结果与医院里获得结果相比,结果令人满意。

[0047] 表 1 本发明传感器对实际样品的测定结果与医院测定结果的比较

[0048]

序号	医院测定值(mM)	传感器测定值(mM \pm SD ^a)
1	5.5	5.14 \pm 0.18
2	5.8	5.93 \pm 0.23
3	6.4	5.81 \pm 0.33
4	6.6	6.80 \pm 0.36
5	8.1	8.48 \pm 0.31

^a SD, 标准偏差 (n=3).

[0049] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,虽然本发明已以较佳实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案范围内,当可利用上述揭示的技术内容做出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围。

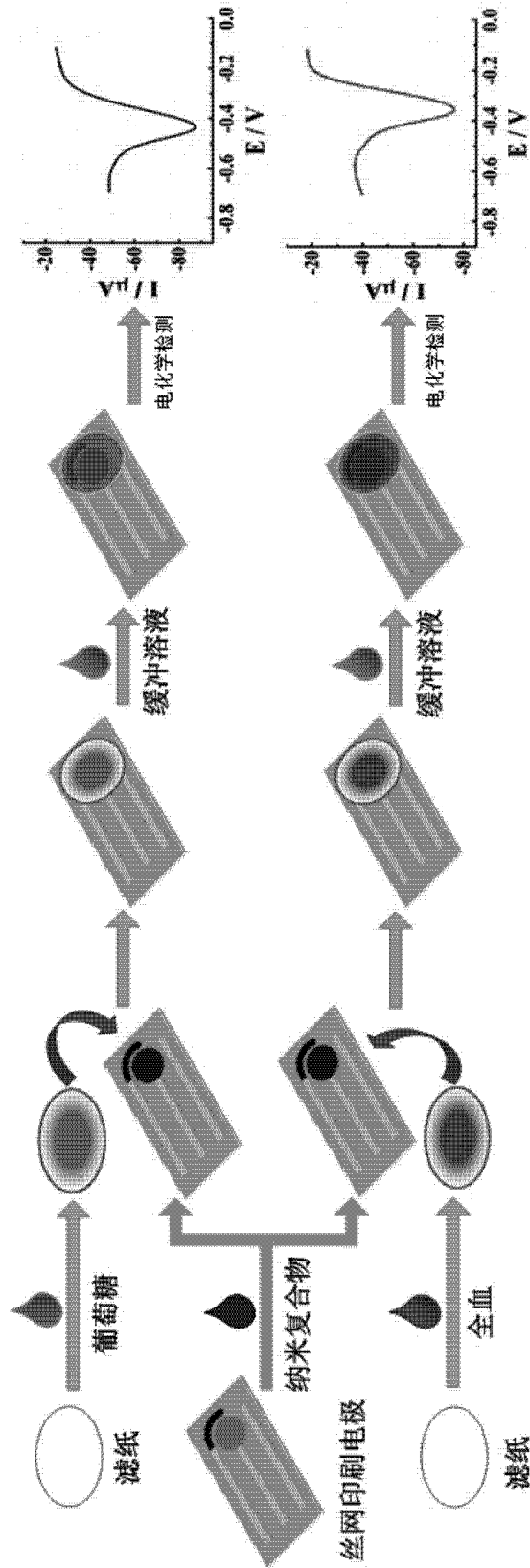


图 1

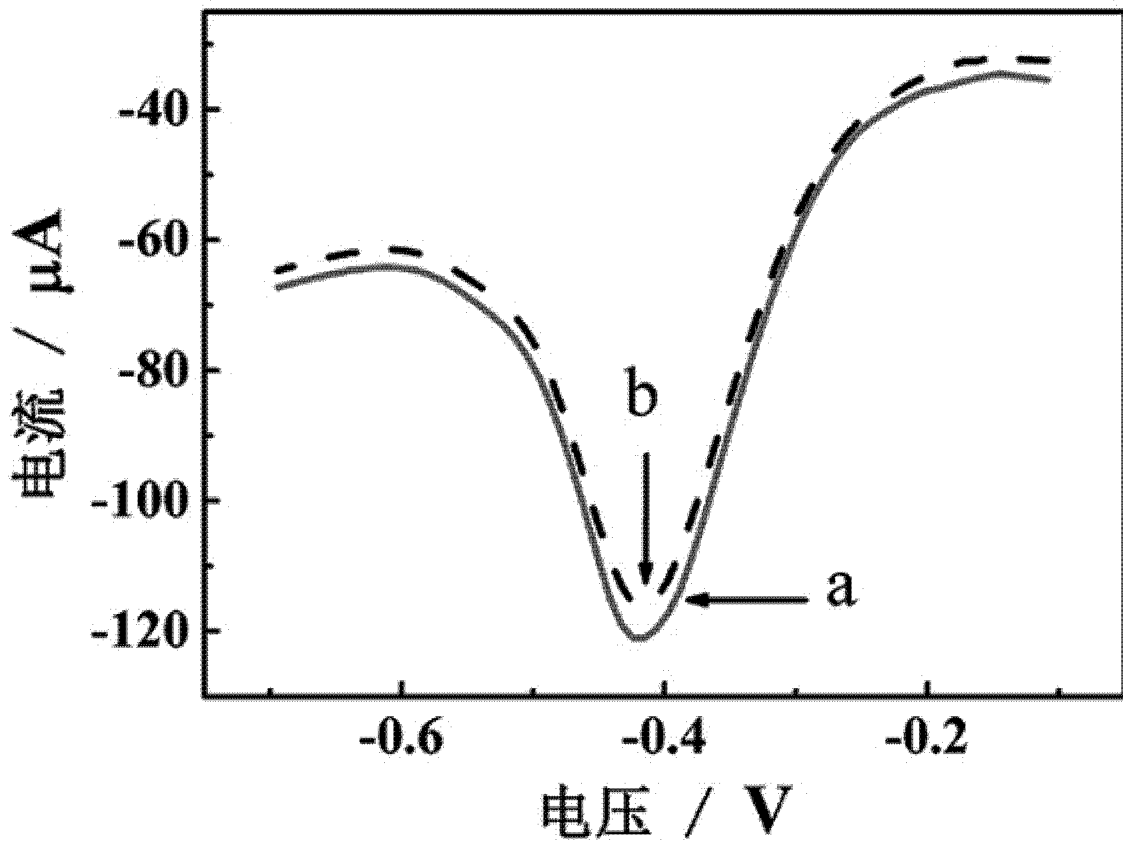


图 2

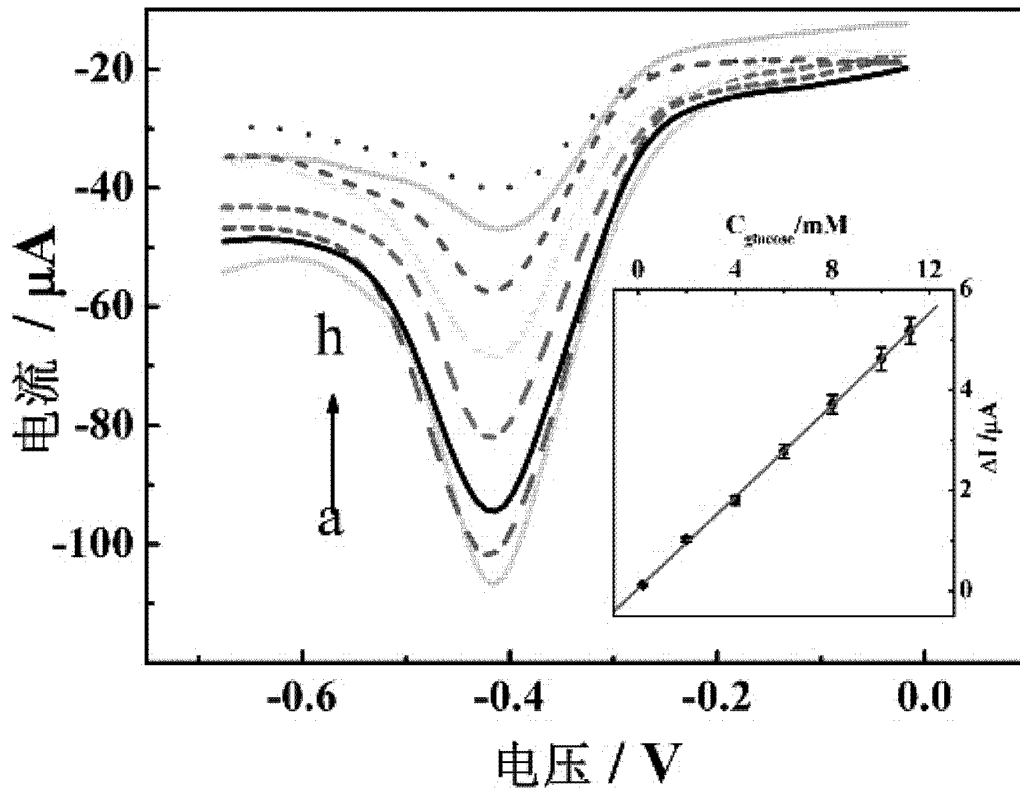


图 3

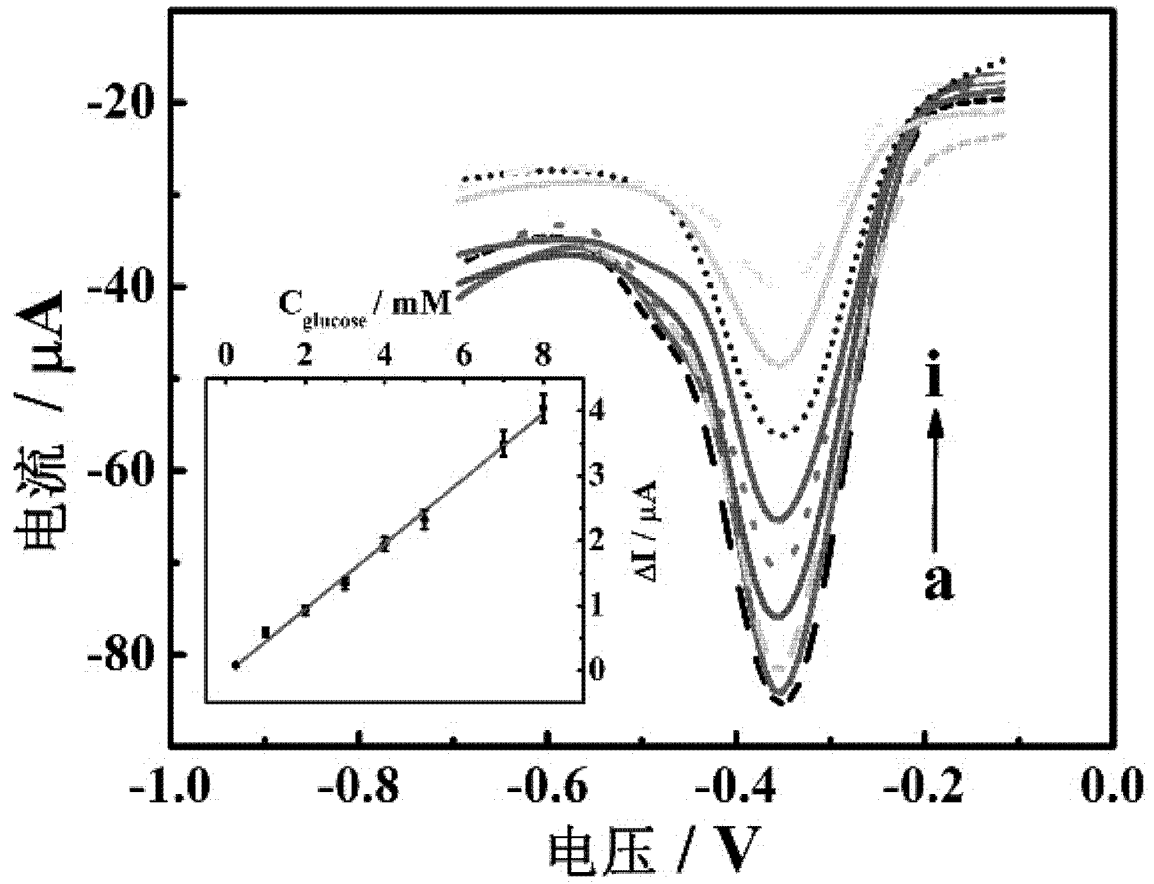


图 4