

# 基于自由基反应荧光增强的葡萄糖检测

牛 静<sup>1</sup>, 胡 鹏<sup>1</sup>, 赵梦溪<sup>1</sup>, 尹海燕<sup>2</sup>, 王红旗<sup>2</sup>, 刘继红<sup>2\*</sup>

(1. 黄淮学院化学化工系, 驻马店 463000; 2. 河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 郑州 450002)

**摘 要:** **目的** 建立一种基于自由基反应荧光增强的葡萄糖检测方法。**方法** 葡萄糖分子被葡萄糖氧化酶氧化, 酶反应产物  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{Fe}^{3+}$  一起组成 Fenton 试剂,  $\text{Fe}^{3+}$  催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟基自由基, 催化产物迅速的和 OPDA 反应生成一种荧光低聚物并产生增强的荧光信号, 实现葡萄糖的间接检测。**结果** 在 0.20~12.50 mmol/L 浓度范围内, 荧光强度和葡萄糖浓度呈线性关系, 相关系数  $r = 0.98$ , 检测限为 25  $\mu\text{mol/L}$ 。**结论** 该方法具有较高的灵敏度和简便的操作步骤, 并且易于实现定量分析。

**关键词:** 葡萄糖; 自由基反应; 荧光

## Determination of glucose by turn-on fluorescence method based on radical reactions

NIU Jing<sup>1</sup>, HU Peng<sup>1</sup>, ZHAO Meng-Xi<sup>1</sup>, YIN Hai-Yan<sup>2</sup>, WANG Hong-Qi<sup>2</sup>, LIU Ji-Hong<sup>2\*</sup>

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China;

2. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**ABSTRACT: Objective** To construct a fluorescence sensing platform for the determination of glucose based on the free radical reactions. **Methods**  $\text{H}_2\text{O}_2$  which was the oxidative product of glucose and its oxidase were catalyzed by  $\text{Fe}^{3+}$ . The catalytic reaction product could quickly react with *o*-phenylenediamine, and generate a fluorescent oligomer and an enhanced signal of fluorescence. Thereby the detection of glucose was indirectly realized. **Results** The fluorescent intensity was linearly dependent on the glucose concentration in the range of 0.20~2.50 mmol/L with the correlation coefficient of 0.98, and the detection limit was 25  $\mu\text{mol/L}$ . **Conclusion** The method is sensitive and simple, which can be applied for quantitative analysis.

**KEY WORDS:** glucose; radical reactions; fluorescence

## 1 引 言

葡萄糖作为有机体所必需的能量分子, 为体内各种代谢途径提供燃料, 而体液里葡萄糖含量的异常变化也成为身体健康的一个预警信号。临床诊断上, 人体血液或者

尿中葡萄糖含量高于正常值通常是糖尿病的标志<sup>[1]</sup>。目前, 糖尿病的患病率在全球以惊人的速度增加, 而医学上还没有能彻底根治的方法, 只能通过加强对糖尿病患者的血糖浓度进行频繁的测定来监控病情。因此, 制备新型高效的葡萄糖传感器具有重要的科学研究意义和实际应用价值。

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估项目(2016)、河南省高等学校重点项目(16A150015)、河南省农业科学院科技发展专项资金项目(20157813)

**Fund:** Supported by the Project of Risk Assessment of Agro-product Quality and Safety (2016), the Key Project of Colleges in Henan (16A150015) and the Research Development Special Fund of Henan Academy of Agricultural Sciences (20157813).

\*通讯作者: 刘继红, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术。E-mail: ljha3100@163.com

\*Corresponding author: LIU Ji-Hong, Associate Researcher, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Henan Academy of Agricultural Science, No. 116, Huayuan Road, Jinshui District, Zhengzhou 450002, China. E-mail: ljha3100@163.com

自 1962 年葡萄糖传感器被首次报道以来<sup>[2]</sup>, 科研工作者们提出了多种葡萄糖检测方法<sup>[3-7]</sup>。Lin 等<sup>[8]</sup>借助石墨烯量子点的催化性能开发了葡萄糖比色传感器, 线性范围为 25~375  $\mu\text{mol/L}$ , 检出限低至 16  $\mu\text{mol/L}$ 。Xin 等<sup>[9]</sup>采用电沉积法制备了铜基纳米结构电极材料, 并研究了该电极材料对葡萄糖的电氧化和分析性能, 在  $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-3}$  mol/L 浓度范围内葡萄糖响应电流与浓度呈线性关系, 检出限低至  $5.0 \times 10^{-7}$  mol/L。已开发的葡萄糖传感器已经在临床监测上发挥了巨大作用, 然而现有的检测技术仍然存在着较高的检测成本和不适于高通量分析等不利因素, 在一定程度上限制了它们的推广。鉴于葡萄糖对人类健康的深远影响, 有必要设计一种新的检测方法用于葡萄糖浓度的灵敏监测。

羟基自由基的标准电极电位高达 2.84 V, 具有强大且无选择性的氧化能力, 早期主要用在废水中有机污染物的非生物降解<sup>[10]</sup>。随着自由基生物学的发展和分子生物技术的广泛应用, 科研工作者发现羟基自由基作为一种活性氧物种能够引起诸如 DNA、蛋白质和脂质体等细胞组分的损伤, 导致组织癌变、老化以及其他疾病<sup>[11-13]</sup>。然而借助于其超高的氧化能力, 羟基自由基也被广泛用于 DNA 的氧化解离和癌症化学治疗<sup>[14,15]</sup>。鉴于该基团独特的性质, 还需要进一步拓展其在各方面的应用。

本研究建立了一种基于羟基自由基氧化邻苯二胺(*o*-phenylenediamine, OPDA)的荧光传感器用于葡萄糖分子的灵敏监测。不同于现有的检测技术, 所提出的方法具有较高的灵敏度, 较低的检测成本和简便的操作步骤, 并且易于实现高通量分析。

## 2 实 验

### 2.1 仪器与试剂

Cary 500 紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司); Fluoromax-4 分光光度计(日本 HORIBA Scientific 公司)。

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)购自 Sigma-Aldrich 公司。如无特殊说明, 实验中所用试剂均为分析纯且使用时未经进一步纯化。

### 2.2 实验方法

将一系列不同浓度的葡萄糖溶液(10  $\mu\text{L}$ )加入到含有磷酸缓冲液(PBS 0.10 mol/L, 460  $\mu\text{L}$ ),  $\text{FeCl}_3$  (20 mmol/L, 5  $\mu\text{L}$ ), EDTA (5 mmol/L, 5  $\mu\text{L}$ ), OPDA (60 mmol/L, 10  $\mu\text{L}$ )和 GOD (1 mg/ml, 10  $\mu\text{L}$ )的离心管内, 37  $^\circ\text{C}$ 下孵育 20 min。在 419 nm 的激发波长下记录 450~690 nm 之间的荧光光谱。

## 3 结果与分析

### 3.1 传感器信号产生机制

葡萄糖氧化酶能高效、专一地氧化葡萄糖得到产物

$\text{H}_2\text{O}_2$ 。OPDA 作为一种氢供体能够被羟基自由基氧化而发生聚合反应, 产物为发射强荧光的低聚物<sup>[16]</sup>。这种低聚物吸收 419 nm 的激发光(图 2A), 最大发射峰位于 565 nm<sup>[17-19]</sup>(图 2B)。基于上述现象, 本研究构建了一种信号增强的荧光传感器用于葡萄糖的灵敏检测。检测机制如图 1 所示: 葡萄糖分子被葡萄糖氧化酶所氧化, 其酶反应产物  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{Fe}^{3+}$  一起组成 Fenton 试剂,  $\text{Fe}^{3+}$  催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟基自由基, 催化产物迅速的和 OPDA 反应生成一种荧光低聚物, 产生增强的荧光信号, 实现葡萄糖的间接检测。

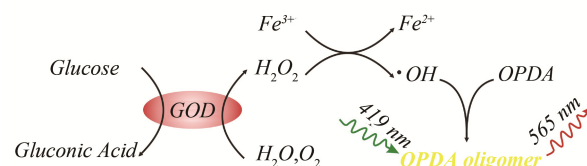


图 1 葡萄糖的检测原理

Fig. 1 The detection mechanism of glucose

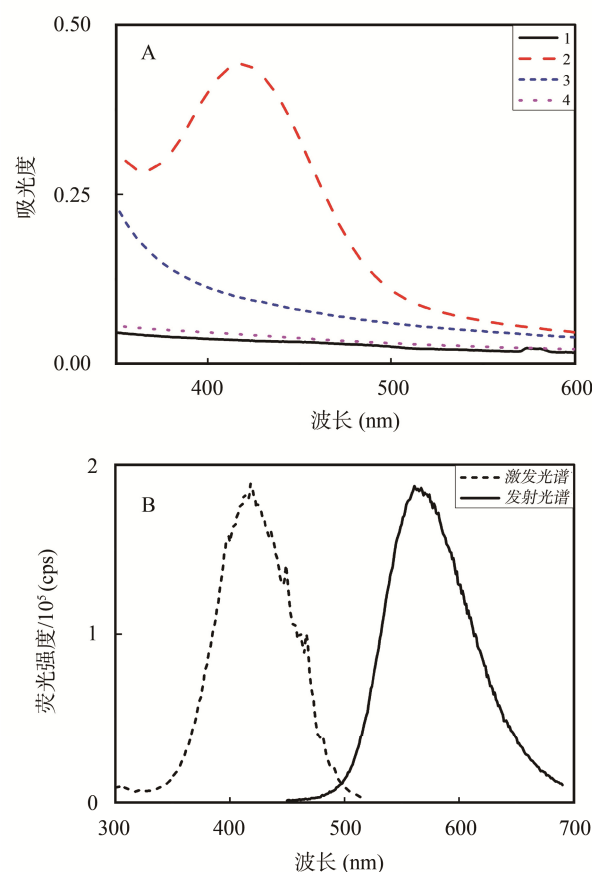


图 2 紫外-可见吸收光谱图

(A): 1.  $\text{H}_2\text{O}_2$ /OPDA; 2.  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ /EDTA/OPDA; 3.  $\text{Fe}^{3+}$ /OPDA; 4. OPDA 和荧光光谱; (B) 表征。

Fig. 2 Spectrum of ultraviolet visible (UV-Vis)

(A) 1.  $\text{H}_2\text{O}_2$ /OPDA; 2.  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ /EDTA/OPDA; 3.  $\text{Fe}^{3+}$ /OPDA; 4. OPDA and fluorescence spectrum; (B) characterization.

### 3.2 实验参数优化

为了达到最佳的分析性能,考察了所选实验参数对体系荧光响应的影响。图 3A 描述了反应温度对体系荧光响应的影响。随着反应温度的升高,体系的相对荧光强度也逐渐增加,在 37 °C 时达到最大值,进一步增加反应温度,体系相对荧光响应却逐渐降低。其原因可能是 GOD 的最佳反应温度是 37 °C。虽然高温条件下对 OPDA 的氧化反应有利,却导致 GOD 失活,不利于葡萄糖的催化,综合考虑选取 37 °C 为最佳反应温度。同时,运用单因素法对  $\text{Fe}^{3+}$ 、EDTA 以及 GOD 的浓度以及反应时间进行简单优化。(见图 3B、C 和 D)。通过加入一定量的  $\text{H}_2\text{O}_2$  模拟 GOD 的氧化产物,考察反应时间对体系荧光响应的影响(图 4),经过试验确定最优的反应时间、 $\text{Fe}^{3+}$  浓度、EDTA 浓度以及 GOD 反应浓度分别为 20 min, 200  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{L}$ 。

### 3.3 传感器的线性范围及检出限

在最优的条件下,对传感器的分析性能做了进一步的考察。图 5A 显示了葡萄糖浓度在 0~12.50 mmol/L 之间变化时的体系荧光响应情况。随着葡萄糖浓度的增加,在 565 nm 处观察到一个明显的浓度依存的荧光发射关

系。图 5B 为葡萄糖的定量分析校正曲线,在 0.20~12.50 mmol/L 之间,荧光强度和葡萄糖浓度呈线性关系,校正方程为  $F=3.5\times 10^4 C+1.37\times 10^5$  ( $F$  为 565 nm 处的荧光强度,  $C$  为葡萄糖浓度),相关系数  $r=0.98$ ,检测限为 25  $\mu\text{mol/L}$ ,低于大多数已报道的葡萄糖传感器<sup>[20-23]</sup>。

### 3.4 选择性考察

以果糖、麦芽糖、蔗糖和乳糖为干扰物(加入浓度均为 10 mmol/L)做了葡萄糖选择性实验( $n=3$ )。结果显示只有在葡萄糖(加入浓度为 5 mmol/L)存在下体系才能产生明显的荧光信号,而加入高于葡萄糖浓度数倍的干扰物后所产生的荧光信号和背景值差别不大(图 6),体现了该方法对葡萄糖良好的选择性。

### 3.5 实际样品测定

采用本方法对血清样本中葡萄糖进行分析。如图 7 所示,在 2 个罹患糖尿病患者的血清样本中(样本 1: 6.70 mmol/L; 样本 2: 9.70 mmol/L。商业化葡萄糖测试仪测得),本方法检出值分别为 7.48 和 9.37 mmol/L,其标准偏差不超过 12%。以上结果表明,本研究提出的葡萄糖检测方法可以应用于临床诊断上。

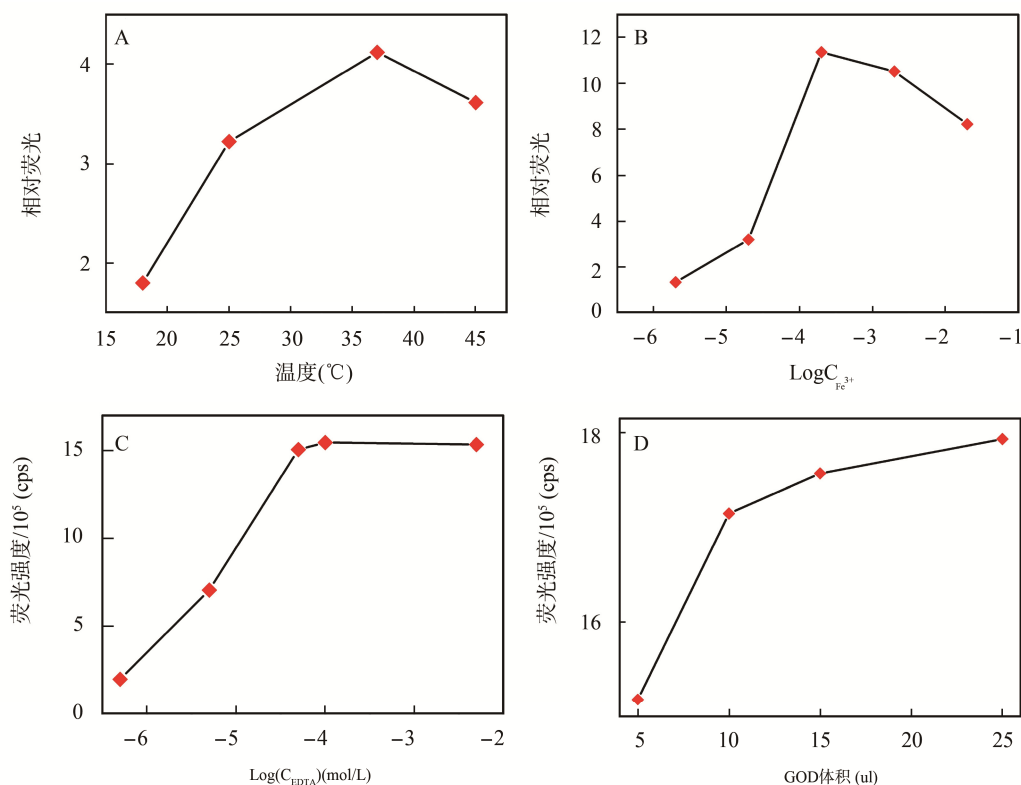


图3 反应温度、 $\text{Fe}^{3+}$ 、EDTA 以及 GOD 的浓度对体系荧光响应的影响

(A)反应温度; (B)  $\text{Fe}^{3+}$  浓度; (C) EDTA 浓度; (D) GOD 浓度。所有反应时间均为 90 min

Fig. 3 Effects of the incubation temperature,  $\text{Fe}^{3+}$  concentration, EDTA concentration and GOD concentration on the fluorescence response of system A. incubation temperature; B. concentration of  $\text{Fe}^{3+}$ ; C. concentration of EDTA; D. concentration of GOD. The incubation time were all 90 min.

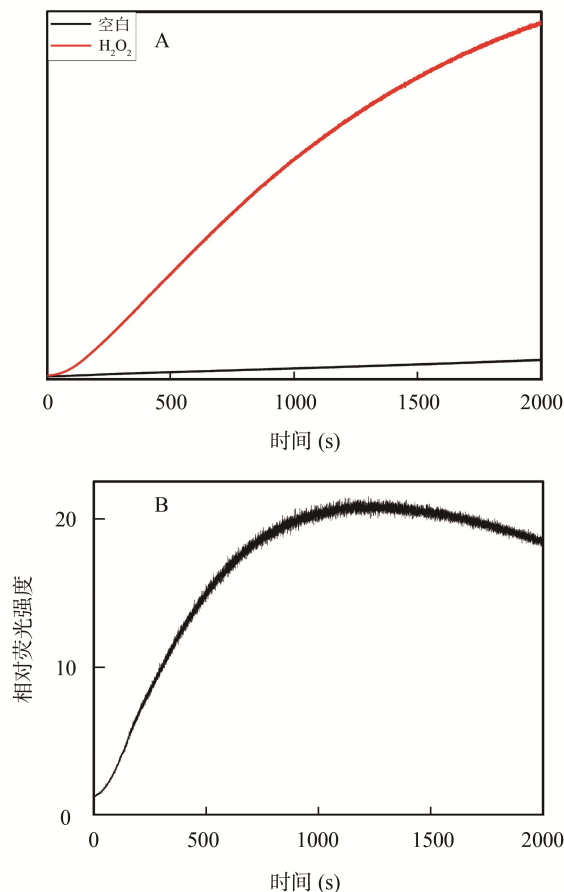


图 4 反应时间对体系荧光响应的影响  
(A) 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(模拟 GOD 氧化产物, 1.76 mmol/L)前后反应体系中  
荧光响应和时间的关系,  $\lambda_{\text{ex}}=419\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=565\text{ nm}$ 。(B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入前  
后体系的信噪比  
Fig. 4 The effect of incubation time on the fluorescence response of  
the system  
(A) time dependence of the fluorescence intensity at  $\lambda_{\text{ex}}=419\text{ nm}$  and  
 $\lambda_{\text{em}}=565\text{ nm}$  after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.76 mmol/L) to the detecting  
system. (B) the ratio between the fluorescence of the target and blank.

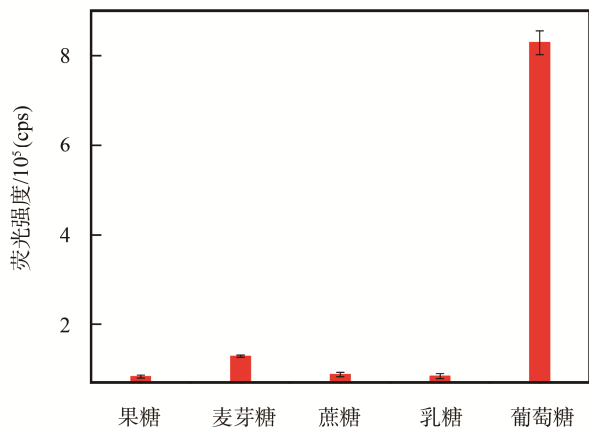


图 6 不同干扰物的选择性考察(同时加入 GOD)。  
Fig. 6 Selectivity results of different interferents  
(after incubation with GOD).

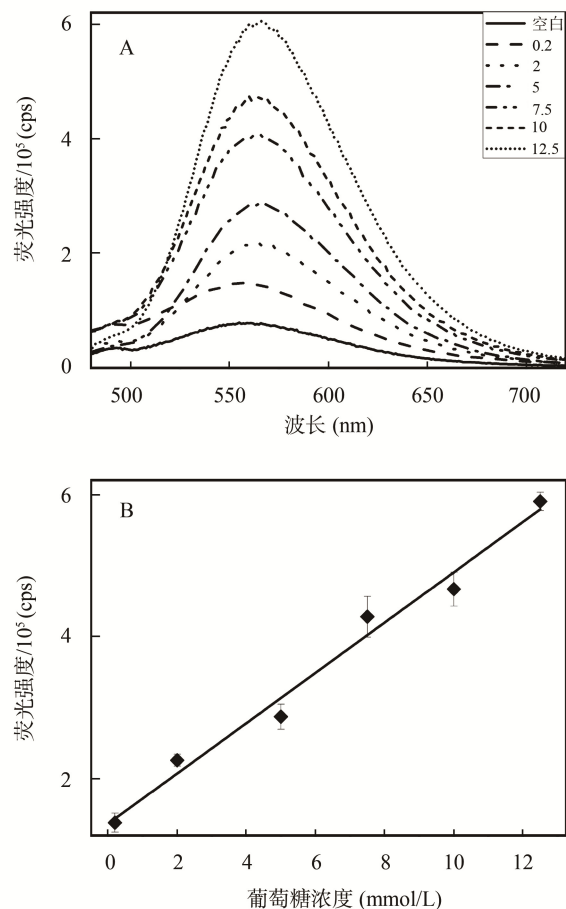


图 5 葡萄糖的荧光分析  
(A) 葡萄糖在 0~12.5 mmol/L 浓度范围内的荧光响应; (B) 葡萄糖  
的荧光分析校正曲线。  $\lambda_{\text{ex}}=419\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=565\text{ nm}$ ( $n=3$ )  
Fig. 5 Fluorescence analysis for glucose  
(A) fluorescence spectrum of different concentrations of glucose  
ranged from 0 to 12.5 mmol/L. (B) the calibration curve of  
fluorescence analysis for glucose.  $\lambda_{\text{ex}}=419\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=565\text{ nm}$  ( $n=3$ )

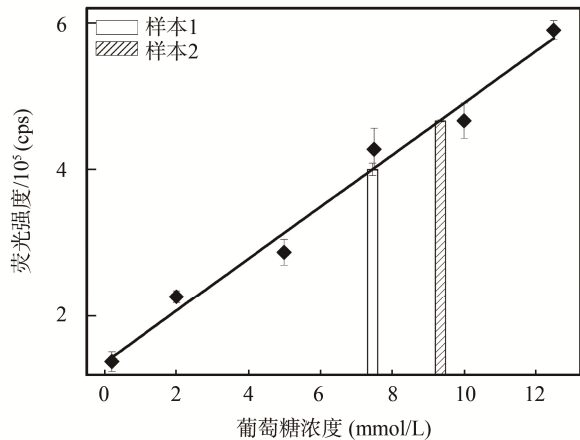


图 7 人血清样本中葡萄糖的检测。  
Fig. 7 Detection of glucose in human blood samples

## 4 结 论

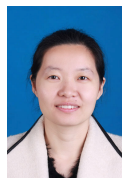
本研究建立了一种基于自由基反应的荧光传感器用于葡萄糖的检测。该方法具有简单、快速和检测成本低廉的优点,在0.20~12.50 mmol/L的葡萄糖浓度范围内,荧光强度和葡萄糖浓度呈良好的线性关系,检测限为25  $\mu\text{mol/L}$ ,本方法实现了目标分子的灵敏检测。此外,该方法呈现出良好的重现性和可靠性以及可扩展性,可以在葡萄糖检测领域发挥重要作用。

## 参考文献

- [1] Wang J. Electrochemical glucose biosensors [J]. Chem Rev, 2008, 108: 814–825.
- [2] Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery [J]. Ann N Y Acad Sci, 1962, 102: 29–45.
- [3] Zhang C, Yuan Y, Zhang S, *et al.* Biosensing platform based on fluorescence resonance energy transfer from upconverting nanocrystals to graphene oxide [J]. Angew Chem Int Ed, 2011, 50: 6851–6854.
- [4] Li W, Feng, L Ren J, *et al.* Visual detection of glucose using conformational switch of i-motif dna and non-crosslinking gold nanoparticles [J]. Chem Eur J, 2012, 18: 12637–12642.
- [5] Qiu JD, Shi L, Liang RP, *et al.* Controllable deposition of a platinum nanoparticle ensemble on a polyaniline/graphene hybrid as a novel electrode material for electrochemical sensing [J]. Chem Eur J, 2012, 18: 7950–7959.
- [6] Krushnitskaya O, Tonnessen T I, Jakobsen H, *et al.* The assessment of potentially interfering metabolites and dietary components in blood using an osmotic glucose sensor based on the concanavalin a-dextran affinity assay [J]. Biosens Bioelectron, 2011, 28: 195–203.
- [7] Carbone M, Gorton L, Antiochia R. An overview of the latest graphen-based sensors for glucose detection the effects of graphene defects electroanalysis [J]. Electroanalysis, 2015, 27: 16–31.
- [8] Lin LP, Song XH, Chen YY, *et al.* Intrinsic peroxidase-like catalytic activity of nitrogen-doped grapheme quantum dots and their application in the colorimetric detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and glucose [J]. Anal Chim Acta, 2015, 869: 89–95.
- [9] 辛 华, 陈丽波, 史鸿雁, 等. 电化学沉积制备纳米结构铜电极及其葡萄糖检测性能 [J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(3): 482–487.  
Xin H, Chen LB, Shi HY, *et al.* Electrodeposition of nanostructured Cu electrode and its glucose assay performance [J]. Chem J Chin U, 2014, 35(3): 482–487.
- [10] Neyens E, Baeyens J. A review of classic fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique [J]. J Hazard Mater, 2003, 98: 33–50.
- [11] Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures [J]. Physiol Rev, 1998, 78: 547–581.
- [12] Rodriguez H, Holmquist GP, Dagostino R, *et al.* A metal ion-dependent hydrogen peroxide-induced dna damage is more sequence specific than metal specific [J]. Cancer Res, 1997, 57: 2394–2403.
- [13] Mello AC, Meneghini R. Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals [J]. Mutat Res, 1991, 251: 109–113.
- [14] Xu C, Yuan Z, Kohler N, *et al.* FePt nanoparticles as an Fe reservoir for controlled fe release and tumor inhibition [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131: 15346–15351.
- [15] Jain SS, Tullius TD. Foot-printing protein-DNA complexes using the hydroxyl radical [J]. Nat Protoc, 2008, 3: 1092–1100.
- [16] Yang X, Wang E, Nanoparticle A. Autocatalytic sensor for  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity and its application in test paper [J]. Anal Chem, 2011, 83: 5005–5011.
- [17] Gladilovich DB, Stolyarov KP. Extraction-fluorometric determination of iron(III) according to the oxidation reaction of 1,2-phenylenediamine [J]. J Anal Chem Ussr, 1983, 38: 666–670.
- [18] Sivarama G, Krishnan VR. Controlled potential coulometric estimation of o-phenylenediamine [J]. Indian J Chem, 1967, 5: 635–639.
- [19] Kawakubo S, Hagihara Y, Honda Y, *et al.* Speciation of iron in river and tap waters by catalytic spectrophotometry using oxidation of o-phenylenediamine with hydrogen peroxide [J]. Anal Chim Acta, 1999, 388: 35–43.
- [20] Wen D, Guo S, Zhai J, *et al.* Pt nanoparticles supported on  $\text{TiO}_2$  colloidal spheres with nanoporous surface: preparation and use as an enhancing material for biosensing applications [J]. J Phys Chem C, 2009, 113: 13023–13028.
- [21] Wen D, Zou X, Liu Y, *et al.* Nanocomposite based on Depositing Platinum Nanostructure onto Carbon Nanotubes through A One-pot, Facile Synthesis Method for Amperometric Sensing [J]. Talanta, 2009, 79: 1233–1237.
- [22] Bai L, Wen D, Yin J, *et al.* Carbon nanotubes-ionic liquid nanocomposites sensing platform for nadh oxidation and oxygen, glucose detection in blood [J]. Talanta, 2012, 91: 110–115.
- [23] Zhu C, Fang Y, Wen D, *et al.* One-pot synthesis of functional two-dimensional graphene/ $\text{SnO}_2$  composite nanosheets as a building block for self-assembly and an enhancing nanomaterial for biosensing [J]. J Mater Chem, 2011, 21: 16911–16917.

(责任编辑: 姚菲)

## 作者简介



牛 静, 讲师, 主要研究方向为生物传感和纳米分析。  
E-mail: niujing827@126.com



刘继红, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术研究。  
E-mail: ljha3100@163.com