

超灵敏检测血清中葡萄糖的中空介孔普鲁士蓝@葡萄糖氧化酶电化学发光传感器

仇华,申聪聪,陈粤华,樊思敏

(河南师范大学 化学化工学院,河南 新乡 453007)

摘要:葡萄糖作为主要供能物质在生物体新陈代谢过程中发挥重要作用.目前已报道的葡萄糖分析方法主要是基于生物酶或纳米模拟酶催化葡萄糖联合光、电、色等检测技术构建的,如比色法、分光光度法、电化学法、高效液相色谱法等.然而仪器操作、生物亲和性、灵敏度等不足限制其在实际血糖检测中的应用.采用经典金属有机框架材料中空介孔普鲁士蓝(Hollow mesoporous Prussian Blue, HMPB)负载葡萄糖氧化酶(GOx)制备 HMPB@GOx 复合纳米材料,结合鲁米诺电化学发光(Electrochemiluminescence, ECL)性能构建一种超灵敏葡萄糖 ECL 体系.测试结果表明,立方结构的 HMPB 比表面积大、氧化还原活性高,同时作为酶载体及 H_2O_2 模拟酶级联放大 ECL 信号,在其他电活性物质如抗坏血酸(AA),多巴胺(DA)和尿酸(UA)共存时仍对葡萄糖具有良好的选择性.基于上述优良性能,该 ECL 传感体系对葡萄糖的检测范围为 $3.3 \times 10^{-2} \sim 167.0 \mu\text{mol/L}$,检测限低至 $2.1 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$,成功检测实际血清中的葡萄糖含量.因此,该 HMPB@GOx 电化学发光传感体系具有成为糖尿病患者血清中葡萄糖便携检测器件的潜力.

关键词:中空介孔普鲁士蓝(HMPB);电化学发光;鲁米诺;葡萄糖氧化酶(GOx);葡萄糖

中图分类号:O413

文献标志码:A

葡萄糖作为生物体内能量的主要来源,对维持生命健康至关重要.近年来,糖尿病的发病率持续增加,作为一种常见的致死性慢性疾病可能引发尿毒症、高血压、心血管及并发症,严重影响患者的生命健康^[1-3].血液中的葡萄糖含量即血糖,成为糖尿病检测的重要靶标,开发一种简单、快速、准确的葡萄糖检测方法有利于实现糖尿病的早期诊断.目前已报道的葡萄糖分析方法有比色法、分光光度法、化学发光法、电化学法、电化学发光法等^[1-2,4-6],其中电化学发光技术(Electrochemiluminescence, ECL)集电化学传感和化学发光为一体,兼具高灵敏度、操作简单、响应时间快、成本低等优点,在临床检验诊断、食品安全检测和环境污染监测等领域具有广阔的应用前景.传统的电化学酶传感器是通过天然的葡萄糖氧化酶特异性,高效地催化氧化 D-葡萄糖为 D-葡萄糖酸内酯和 H_2O_2 ,直接进行电化学检测或通过引入氧化还原介质进一步催化 H_2O_2 氧化生成活性氧级联放大电化学发光信号强度,从而实现葡萄糖的高选择性、高灵敏度检测,使其成为葡萄糖酶传感器研究最广泛的生物酶之一^[7-9].文献[10]将葡萄糖氧化酶和葡萄糖在溶液中混合直接产生 H_2O_2 增强鲁米诺的 ECL 性能,同时测定 H_2O_2 ,葡萄糖及葡萄糖氧化酶的活性.该方法操作简单,应用广泛,然而生成的 H_2O_2 与电极反应界面距离远、易分解,限制了检测灵敏度的提高.通过引入载体固定生物酶不仅可以提高酶的负载效率,而且还能缩短酶催化反应在电极表面的电子传递距离.文献[11]合成具有 ECL 特性的 CdS 量子点负载葡萄糖氧化酶,使得 H_2O_2 在电极表面原位生成,有效增强了 CdS 的发光效率,但 CdS 的生物毒性限制了该方法在生物检测方面应用,同时生物酶需要适当的固定化手段来保证其高效的催化活性.随着纳米材料的进一步研究,科研工作者通过开发一系列纳米模拟酶催化葡萄糖分解来检测葡萄糖含量,如

收稿日期:2022-01-07;修回日期:2022-02-05.

基金项目:国家自然科学基金(22004028;21722501;21803018);河南省重点科技攻关项目(202102310139;212102311071).

作者简介(通信作者):仇华(1981—),女,河北石家庄人,河南师范大学教授,博士生导师,国家优青,研究方向为染料功能调控与生物成像,E-mail:zhanghua1106@163.com.

文献[12]设计合成了 3D Cu-Flo.@AuNPs 复合纳米材料构建无酶葡萄糖 ECL 传感器,该方法无须考虑酶活性因素,拓宽了测试条件,然而小颗粒的纳米材料易团聚制约了其催化的稳定性.因此,鉴于生物酶良好的催化活性和优异的选择性,设计高效、生物安全性好的酶固定化手段能够显著提高实际样品中葡萄糖的测定效率.

立方体结构的普鲁士蓝(Prussian Blue, PB)是由铁和亚铁氰化物组成的金属有机框架材料,能够作为氧化还原介质高效催化 H_2O_2 ,被称为“人工过氧化物酶”,在光物理、生物医学和电化学等领域已得到了广泛应用.由于其具有良好的生物相容性于 2010 年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准为铊的解毒剂^[5,13].已有基于 PB 的过氧化物酶特性构建电化学葡萄糖酶传感器用于临床和环境分析的报道^[14].为提高催化效率,常引入导电性好的碳纳米材料作为载体将 PB 固定在电极表面,如用 PB 纳米颗粒填充碳纳米管,在微碳纤维上垂直排列普鲁士蓝/碳纳米管复合物作为超灵敏检测葡萄糖的生物载体^[15-18].以上方法虽然提高了葡萄糖的检测灵敏度,因其需要载体、氧化还原介质和 GO_x ,构建过程相对复杂.已有文献报道 HMPB 纳米颗粒由于空隙多、比表面积大、生物相容性好等优势被用作肿瘤治疗剂的纳米载体,具有良好的载药量和治疗性能^[13,19-21].HMPB 优越的载体及过氧化物酶性质为设计双功能 HMPB@ GO_x 纳米复合材料,构建电化学发光传感器提供了思路.

本文通过模板法制备出 80 nm 左右的立方体 PB 纳米颗粒,控制盐酸刻蚀时间调控合成 HMPB 的中心空腔大小,并以此作为 GO_x 的载体及 H_2O_2 氧化还原介质,以鲁米诺- H_2O_2 电化学发光体系为基础构建电化学发光酶传感器级联放大电信号超灵敏检测葡萄糖.为了进一步增强电极的导电性及 HMPB@ GO_x 在电极表面的负载效率,本文通过电沉积技术将带正电的导电聚合物聚苯胺(PAA)镀在电极表面上一层,通过静电作用将 HMPB@ GO_x 修饰在电极表面构建电化学发光葡萄糖传感器.测试结果表明,基于 HMPB@ GO_x 构建的 ECL 传感体系在其他电活性物质如抗坏血酸(AA),多巴胺(DA)和尿酸(UA)共存时仍对葡萄糖具有良好的选择性,高的灵敏度和低的检出限,进一步实现了实际血清中葡萄糖含量的测定.因此,该 HMPB@ GO_x 电化学发光传感体系具有成为糖尿病患者血清中葡萄糖便携检测器件的潜力.

1 实验部分

1.1 材料制备

1.1.1 PB 及 HMPB 纳米颗粒的合成

PB 的合成:称取 6.0 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 220 mg 铁氰化钾($K_3[Fe(CN)_6]$),加入到 80 mL, 0.010 mol/L 的盐酸中混合搅匀,并在室温下搅拌 0.5 h 得到黄色的溶液.然后将混合溶液放入聚四氟乙烯反应釜中,在烘箱中 80 °C 反应 24 h,自然冷却至室温.最后用一定量丙酮、二次水多次离心、洗涤,得到蓝色的 PB 纳米颗粒.

中空介孔普鲁士蓝(HMPB)的合成:在 60 mL 1.0 mol/L 的 HCl 中加入 300 mg 的 PVP 和 60 mg 的 PB 纳米颗粒,将混合液密封在聚四氟乙烯反应釜中,140 °C 反应 4 h.然后用水和乙醇多次离心、洗涤沉淀物,于真空干燥箱中过夜干燥,得到了 HMPB.为验证空心程度对 GO_x 负载效率及 ECL 信号强度的影响,本文控制刻蚀时间为 0,1.0,2.0,4.5 和 8.0 h 作为对照合成材料.

1.1.2 HMPB@ GO_x 的合成

将 10 mg 的 GO_x 和 1.0 mg 的 HMPB 溶解在 0.5 mL 的 PBS 中,在 4 °C 条件下震荡过夜.用二次水离心、洗涤多次以除去多余的 GO_x ,重新分散在 0.5 mL 二次水中,制得 HMPB@ GO_x 复合物于 4 °C 冰箱中备用.

1.2 材料表征

用日立 SU8010 场发射扫描电子显微镜(SEM)对 PB 的微观表面形貌进行表征;通过 JEM-2100 高分辨率透射电子显微镜(TEM)观察 HMPB 材料内部微观结构;利用 Zeta 电位及阻抗表征 HMPB@ GO_x 的复合材料及 ECL 传感体系的构建过程.

1.3 ECL 传感器构建及电化学测试条件优化

1.3.1 ECL 传感器的构建

利用上海辰华电化学工作站 CHI760E,在室温下采用标准的三电极体系(直径为 3 mm 的玻碳电极为

工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂柱为对电极), 在 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中进行电化学性能测定.

将用 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 打磨好玻碳电极浸入 25 mmol/L 的苯胺溶液(用 0.5 mol/L H_2SO_4 稀释), 在 $-0.2\sim 1.0$ V 的电压范围内扫描 5 圈, 在电极表面制备出聚苯胺(PAA)导电薄膜. 移液枪吸取 7.5 μL 上述制备好的 HMPB@GOx 复合纳米材料滴加在玻碳电极表面, 室温下干燥备用.

1.3.2 条件优化

电极表面 PAA 量的优化: 将打磨干净的工作、参比和对电极浸没在苯胺溶液中, 通过控制扫描圈数分别为 1, 2, 5, 10, 15, 30 调控电极表面 PAA 的量. 将电聚合 PAA 后的玻碳电极浸入含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 鲁米诺和 6.7 $\mu\text{mol/L}$ 葡萄糖溶液中, 设置光电倍增管高压为 600 V, 测定鲁米诺的电化学发光强度.

pH 优化: 配置 pH 分别为 5.3, 6.3, 7.0, 8.0, 8.3, 9.0 的 PBS 缓冲液(5 mmol/L 磷酸二氢钠, 5 mmol/L 磷酸氢二钠和 100 mmol/L 氯化钠), 用于鲁米诺(0.01 mol/L)的稀释. 将 HMPB@GOx 修饰好的电极置于含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 鲁米诺和 6.7 $\mu\text{mol/L}$ 葡萄糖溶液中, 设置光电倍增管高压, 测定鲁米诺的电化学发光强度.

鲁米诺浓度优化: 用 PBS(pH 8.3)将鲁米诺分别稀释成 10, 25, 40, 50, 75 和 100 $\mu\text{mol/L}$. 将 HMPB@GOx 修饰好的电极置于鲁米诺和 6.7 $\mu\text{mol/L}$ 葡萄糖溶液中, 设置光电倍增管高压, 测定鲁米诺的电化学发光强度.

GOx 浓度优化: 将 1.0 mg 的 HMPB 和 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0 mg 的 GOx 溶解在 1.0 mL 的 PBS 中, 按照以上步骤合成不同 GOx 负载量的 HMPB@GOx 复合物并修饰于电极表面. 将修饰好的电极置于含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 鲁米诺和 6.7 $\mu\text{mol/L}$ 葡萄糖溶液中, 设置光电倍增管高压, 测定鲁米诺的电化学发光强度.

PB 刻蚀时间优化: 将不同刻蚀时间的 HMPB 按照以上方法与 GOx 混合形成 HMPB@GOx 复合物并修饰于电极表面, 设置光电倍增管高压, 测定鲁米诺的电化学发光强度.

1.4 葡萄糖测定

按照以上最优条件, 将 HMPB@GOx 复合物修饰好玻碳电极浸入含有不同浓度葡萄糖(依次为 0, 3.3×10^{-2} , 3.3×10^{-1} , 1.7, 3.3, 6.7, 16.6, 50.0, 100.0 和 167.0 $\mu\text{mol/L}$)的鲁米诺溶液中, 设置光电倍增管高压为 600 V, 测定鲁米诺的电化学发光强度.

1.5 选择性测定

按照以上最优条件, 将 HMPB@GOx 复合物修饰好玻碳电极浸入 pH 8.3 的鲁米诺溶液中, 连续滴加 6.7 $\mu\text{mol/L}$ 的葡萄糖, 抗坏血酸、尿酸或多巴胺, 设置光电倍增管高压为 600 V, 测定鲁米诺的电化学发光强度.

1.6 实际样品测定

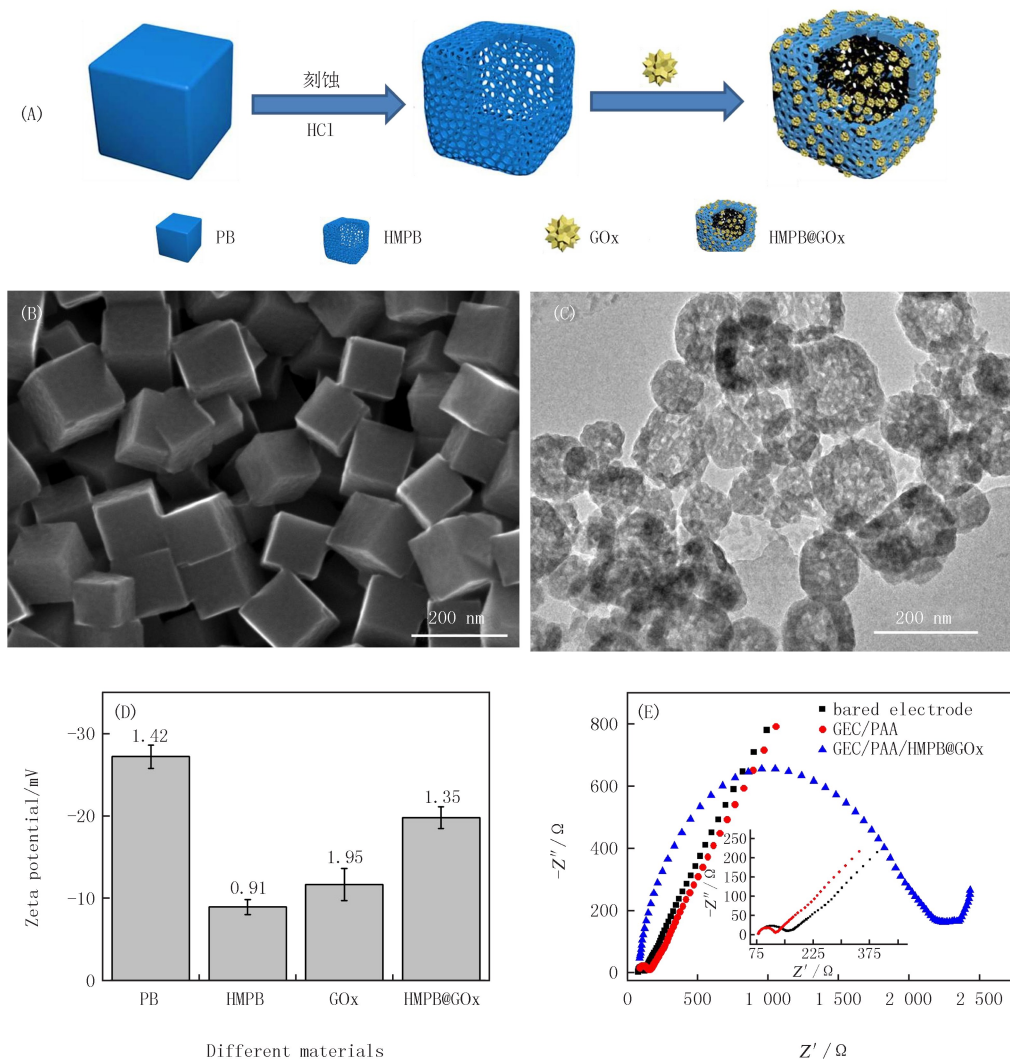
从新乡医学院第三附属医院取得全血 3 份, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 3 000 r/min 离心 15 min, 取得上层淡黄色血清, 分别将血清 10 倍, 100 倍, 1 000 倍, 5 000 倍和 10 000 倍稀释, 用本方案构建的 ECL 传感器测定其葡萄糖含量. 选取 1 000 倍稀释的血清为实际样品, 用本方法构建的 ECL 传感器测定其葡萄糖含量并与血糖仪测定结果做对比.

2 结果与讨论

2.1 ECL 传感器构建及机理探究

HMPB 金属有机框架大的比表面积和过氧化物酶特性在葡萄糖、 H_2O_2 等生物分子检测领域发挥着重要作用. 因此, 本文基于 HMPB@GOx 复合物原位生成并迅速催化 H_2O_2 分解设计了一种 ECL 传感器用于葡萄糖的超灵敏检测. 图 1 为 HMPB@GOx 复合物的合成及表征图. 以 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 和 PVP 为原料合成了立方体 PB 纳米颗粒, 通过调控 HCl 刻蚀时间获得合适的中空介孔普鲁士蓝. 然后将 HMPB 与葡萄糖氧化酶(GOx)混合过夜, 形成 HMPB@GOx 复合纳米材料(图 1(A)), 并将该复合纳米材料通过静电吸附修饰在电聚合 PAA 的玻碳电极表面构建葡萄糖传感器. 通过扫描电子显微镜(SEM), 透射电子显微镜(TEM)对 PB 及 HMPB 的形貌及内部结构进行表征, 从图 1(B, C)可以看出, 合成的 PB 是粒径为 80 nm 左右均匀的立方体, 刻蚀后 HMPB 的棱角变得柔和且中间出现大的空腔结构, 表明刻蚀成功. 进而通过 Zeta 电位和电

极表面阻抗谱的变化来探究 HMPB@GO_x 复合物的形成及 ECL 传感器的构建过程,结果表明,带负电荷 PB 经过刻蚀,质子由于静电吸附残留在 HMPB 中使其所带负电荷急剧减少,当 GO_x 与 HMPB 复合之后,所带的负电荷反而增加,这是由于带较多负电荷的 GO_x 负载在 HMPB 的空腔及表面增加了复合物的 Zeta 电势(图 1(D)),证明 HMPB@GO_x 成功合成.提高导电性及酶在电极表面的固载效率是增强电化学传感器灵敏度的关键因素,本文通过测定工作电极表面的阻抗探究电化学传感器的构建过程,如图 1(E)所示,相比干净的玻碳电极,电聚合 PAA 之后阻抗有所减小,当 HMPB@GO_x 修饰在电极表面后阻抗显著增大(内插图 为玻碳电极和聚合 PAA 后的放大图),这是由于导电聚合物 PAA 薄膜的引入加速了溶液中电荷在电极表面的聚集和电子的转移速率,而 HMPB 表面负载大量的生物分子 GO_x 抑制了电子的快速转移,表明基于 HMPB@GO_x 的葡萄糖电化学传感器构建成功.



(A) HMPB@GO_x 复合物合成示意图; (B) PB 的 SEM 图; (C) HMPB 的 TEM 图; (D) PB, HMPB, GO_x 和 HMPB@GO_x 的 Zeta 电势图; (E) ECL 葡萄糖传感器构建过程的 EIS 图.

图 1 HMPB@GO_x 复合物的合成及表征示意图

Fig. 1 The schematic diagram of HMPB@GO_x synthesis and characterization

鲁米诺-H₂O₂ 体系是目前应用最广泛的 ECL 体系之一,作为传统的发光试剂鲁米诺自身的发光强度较低,H₂O₂ 作为共反应剂能够快速分解产生活性氧,如 $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ 等显著增强鲁米诺的发光强度^[22-24].本文中 HMPB@GO_x 通过静电吸附作用大量固载在电极表面,GO_x 特异性识别并催化葡萄糖原位生成 H₂O₂,进而被 HMPB 快速催化分解生成大量的活性氧从而显著增强鲁米诺的 ECL 强度.HMPB 载体的存在基本

保全了 GO_x 的生物活性,同时调控 H₂O₂ 在电极表面原位生成进一步催化分解,该级联放大信号策略实现了葡萄糖的超灵敏检测.

2.2 条件优化

测试条件的优化对 ECL 传感器灵敏度、稳定性提高至关重要,本文主要从电聚合 PAA 量、电解液 pH、发光试剂鲁米诺浓度、GO_x 在 HMPB 上的负载量和 HMPB 的刻蚀时间等方面进行测试条件优化.

2.2.1 电聚合 PAA 量的优化

玻碳电极作为 ECL 传感器的反应基底,适当的改性能显著增强鲁米诺的 ECL 的发光强度.本文通过控制电聚合时间对电极表面 PAA 的量进行优化,如图 2(A)所示,从 0 到 5 圈随着聚合时间的增加 ECL 强度逐渐增大,随后 ECL 强度迅速降低,这是由于 PAA 厚度过大使反应物与电极之间的距离变大减缓其电子转移速率,实验证明电聚合 5 圈 PAA 的电极对 HMPB@GO_x 吸附量及导电性能最好.图 2(B)为 PAA 电聚合过程的循环伏安图,第一次电位扫描时苯胺聚合的氧化峰电位出现在较低的 0.80 V,该电位与铂电极和石墨烯电极(0.76 V)基本一致,在随后的循环中,此电位保持不变,但电流随循环次数的增加而增大.当电位反向扫描时,曲线上出现两个还原峰,其峰电流强度也随着扫描次数的增加而增大,这是由于电极表面生成聚苯胺量在增加,这两个还原峰是由生成的氧化掺杂态聚苯胺的还原而引起的.

2.2.2 测试 pH 的优化

鲁米诺作为化学发光的主体,其 ECL 强度与电解液 pH 有关,为提高该 ECL 葡萄糖传感器的灵敏度,本文对电极修饰后测试 pH 进行优化.如图 2(C)所示,pH 在 5.3~7.0 范围内鲁米诺的电化学发光信号较弱,碱性环境下鲁米诺的电化学发光强度迅速增大,至 pH 为 8.3 时达到最大,之后 ECL 强度迅速降低,这是由于葡萄糖氧化酶在强碱性条件下会迅速失活,因此选择 pH 为 8.3 作为最优的测试条件.

2.2.3 鲁米诺浓度的优化

鲁米诺作为电化学发光体,其浓度大小是决定其 ECL 强度最主要的因素.如图 2(D)所示,增加鲁米诺浓度可增强 ECL 发光,当其浓度为 50 μmol/L 时,ECL 信号强度最高,即该传感器灵敏度最大.这是由于在等量的共反应剂条件下,高浓度的鲁米诺会发生部分聚集,限制了其 ECL 的增强幅度.

2.2.4 GO_x 负载量的优化

GO_x 作为葡萄糖的特异性催化剂,HMPB 上的负载量的优化是提高电化学发光性能重点考察因素之一.图 2(E)结果表明,随着 GO_x 质量浓度增大,在 HMPB 表面上的负载效率增加,质量浓度为 20 g/L 时负载量适中,其催化性能最优,当 GO_x 质量浓度继续增大,电极表面电子的传递速率降低,而且包裹在内部的 HMPB 不能有效催化 H₂O₂ 分解使得 ECL 强度迅速降低.

2.2.5 HMPB 刻蚀时间优化

HMPB 比表面积的优化是提高 GO_x 负载量的关键,本文通过调控 HCl 对 PB 的刻蚀时间来控制 HMPB 空腔大小.图 2(F)结果表明,随着刻蚀时间的增加 HMPB 的空腔逐渐增大,对 GO_x 的负载量增多,能够有效增强鲁米诺的 ECL 强度,4.0 h 为最佳.当刻蚀时间达到 4.5 h 时,HMPB 的产率和 ECL 强度均迅速降低,表明部分 PB 被刻蚀完全,HMPB 的立方结构出现残缺导致负载的 GO_x 的泄露.当刻蚀时间为 8.0 h 时,PB 被刻蚀完全,无法形成 HMPB.

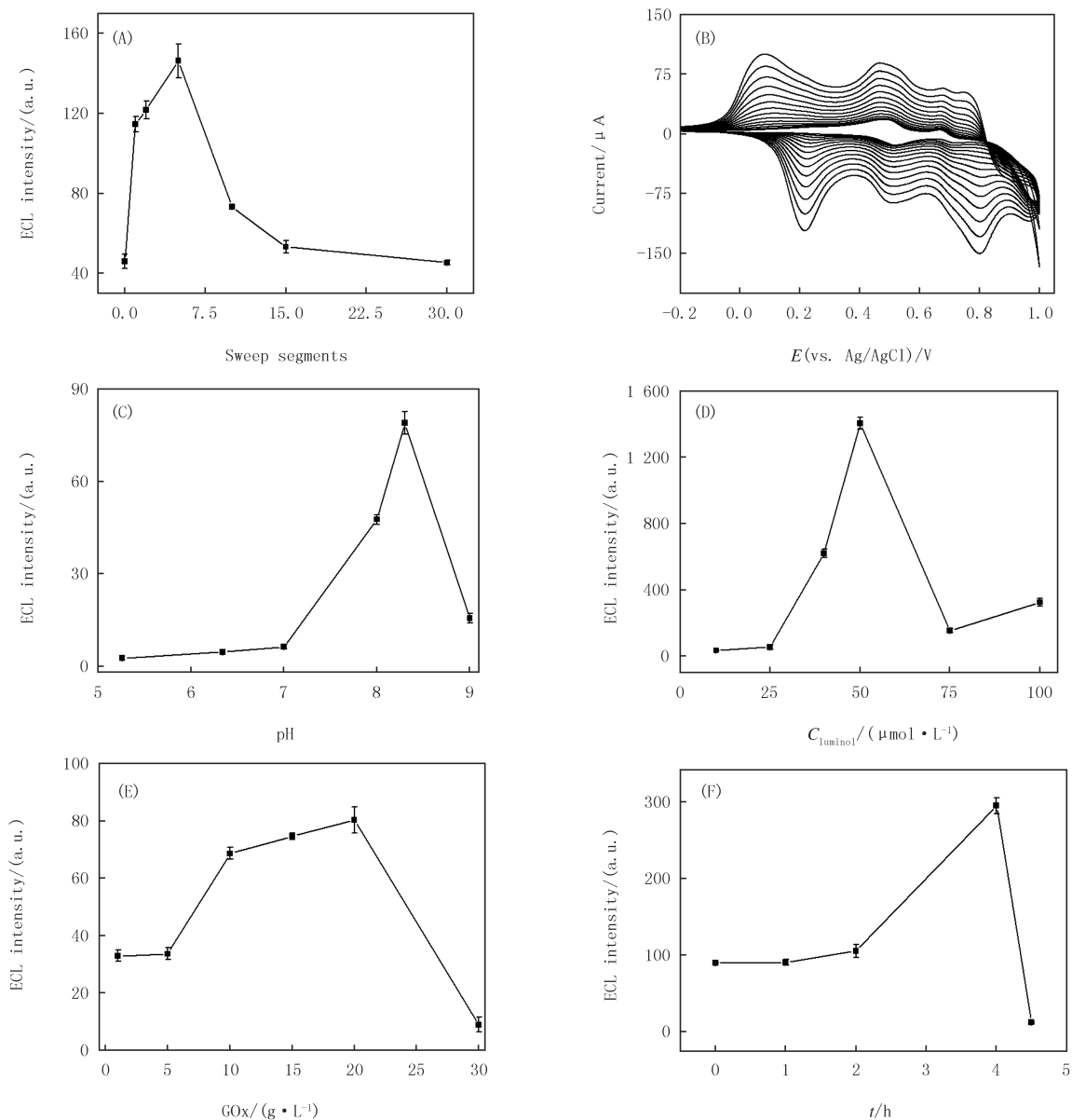
2.3 葡萄糖测定

在上述最优条件下,该 HMPB@GO_x 传感器对葡萄糖进行了定量测定.如图 3 所示,ECL 强度随着葡萄糖浓度增加逐渐增强,仅在 4 s 达到最大,且 ECL 强度在葡萄糖浓度为 $3.3 \times 10^{-2} \sim 167.0 \mu\text{mol/L}$ 范围成良好的线性关系,线性相关系数 R^2 达到 0.99,检出限为 $2.1 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ ($\text{LOD} = 3S/N$),这与以往报道的葡萄糖检测体系相比,表现出较高的灵敏度和较低的检测限(表 1).这是由于双功能的 HMPB 作为 GO_x 的载体在不降低酶活性的前提下提高了 GO_x 在电极表面的固载效率,同时催化原位生成的 H₂O₂ 快速分解产生生活性氧使得鲁米诺的电化学发光强度级联放大,从而实现对葡萄糖的超灵敏测定.

2.4 选择性和稳定性研究

生物体液中存在多种电化学活性的物质,如抗坏血酸(AA)、尿酸(UA)和多巴胺(DA)等,这些物质在葡萄糖检测过程中会成为重要的干扰因素.因此,良好的葡萄糖选择性是血糖检测非常重要的指标.如

图4(A)所示,加入 $6.7 \mu\text{mol/L}$ 的 AA, DA, UA 后,该传感器的 ECL 强度几乎不发生变化,当加入 $6.7 \mu\text{mol/L}$ 葡萄糖后,传感器的 ECL 强度显著增加,结果表明,AA, DA, UA 对葡萄糖检测的影响可忽略不计,该传感器具有良好的抗干扰能力.同时,考察了该 ECL 传感器的稳定性,在 $6.7 \mu\text{mol/L}$ 的葡萄糖溶液中经过 19 次循环,ECL 强度仍保持在 95% 以上,且相对标准偏差为 2.74% (图 4(B)),表明传感器具有较好的稳定性及抗干扰能力.



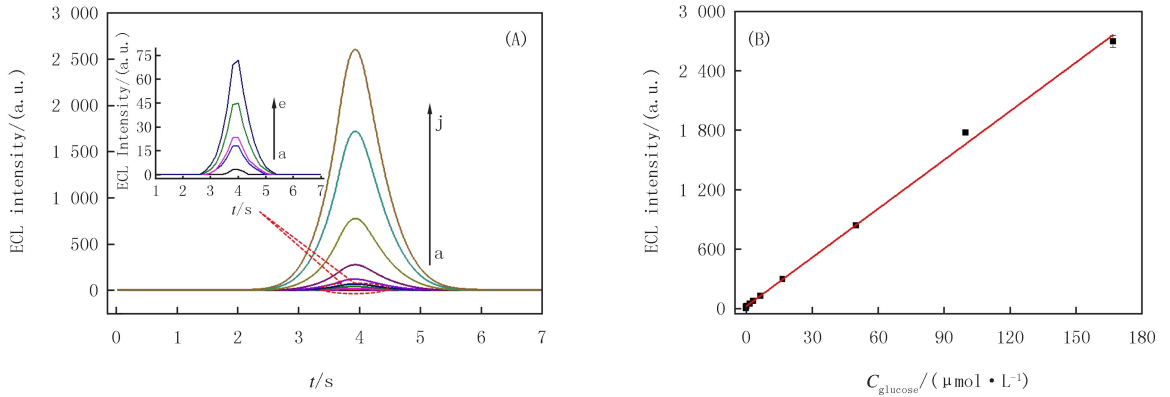
(A) 电极表面电聚合PAA量; (B) PAA聚合的CV图; (C) pH优化图; (D) 鲁米诺浓度优化; (E) GOx负载量优化; (F) 刻蚀时间优化.

图2 测试条件优化图

Fig.2 Optimization of the test conditions

2.5 实际样品测定

为评价该传感器在实际样品中的检测能力,分别将正常人的血清用 PBS 缓冲溶液 ($\text{pH} = 8.3$) 10 倍, 100 倍, 1 000 倍, 5 000 倍和 10 000 倍稀释后检测葡萄糖含量.如图 5 所示, ECL 强度与血清稀释倍数在 100~10 000 倍范围内呈线性关系, 线性相关性系数 $R^2 = 0.97$, 说明本文构建的传感器对血清中的葡萄糖检测非常灵敏.实际工作中, 选取 1 000 倍稀释的血清作为实际样品进行测试 (表 2), 结果与临床结果基本吻合, 表明基于 HMPB@GOx 构建的 ECL 传感器具有临床检测的应用潜力.



葡萄糖浓度(mol/L) a. 0; b. 3.3×10^{-2} ; c. 3.3×10^{-1} ; d. 1.7; e. 3.3; f. 6.7; g. 16.6; h. 50.0; i. 100.0; j. 167.0.

图3 基于HMPB@GO_x构建ECL传感器测定不同浓度葡萄糖图(A)和线性拟合图(B)

Fig.3 Curves of the ECL biosensor based on HMPB@GO_x for different concentrations of glucose detection (A) and calibration curve (B)

表1 葡萄糖检测方法与报道的 ECL 葡萄糖生物传感器分析性能比较

Tab. 1 Comparison of the analytical performance of proposed glucose detection method with some reported glucose biosensors based ECL

ECL 体系	线性范围/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	参考文献
PLANC	0.1~50.0	0.08	[25]
MWNT/NF/GCE	5~800	2	[26]
PtNFs/GO/GODx	5~80	2.8	[27]
MWCNT/AuNPs/GOx/CS/GCE	1~1 000	0.5	[28]
GR/NF/GOD/GCE	2~100	1	[29]
HMPB@GO _x	$3.3 \times 10^{-2} \sim 167.0$	2.1×10^{-2}	本文

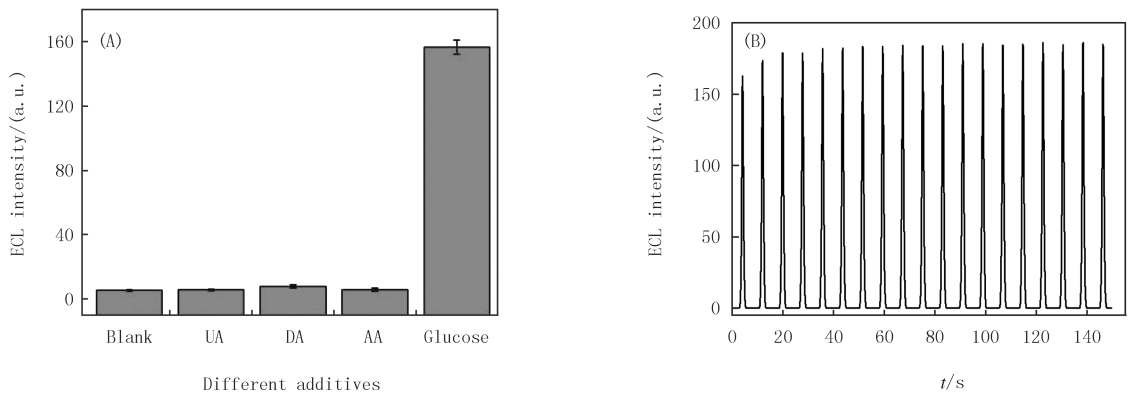


图4 ECL传感器的选择性(A)和稳定性(B)

Fig.4 The selectivity (A) and stability (B) of the ECL biosensor

3 结论

本文通过简单的水热-刻蚀法合成了一种立方结构的中空介孔 HMPB 纳米颗粒,控制刻蚀时间调控其空腔及比表面积,负载大量的 GO_x 制备出 HMPB@GO_x 纳米复合物,进而结合经典的鲁米诺-H₂O₂ 电化学发光体系构建超灵敏葡萄糖传感器.电化学测试结果表明该 ECL 传感体系对葡萄糖的检测范围为 $3.3 \times 10^{-2} \sim 167.0 \mu\text{mol/L}$,检测限低至 $2.1 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$,成功检测实际血清中的葡萄糖含量.而且该传感体系在其他电活性物质如抗坏血酸(AA),多巴胺(DA)和尿酸(UA)共存时仍对葡萄糖具有良好的选择性和稳

定性.这些优异特性主要归因于具有良好生物相容性的 HMPB 作为载体大量负载高活性的 GO_x 催化葡萄糖氧化在电极表面原位生成 H₂O₂,进而作为 H₂O₂ 的模拟酶迅速催化 H₂O₂ 分解产生活性氧,级联增强鲁米诺的电化学发光强度.本研究拓宽了酶及纳米材料在 H₂O₂,葡萄糖检测中的应用,该传感器检测速度快、构造简单、灵敏度高,具有开发糖尿病患者血清中葡萄糖便携检测器件的潜力.

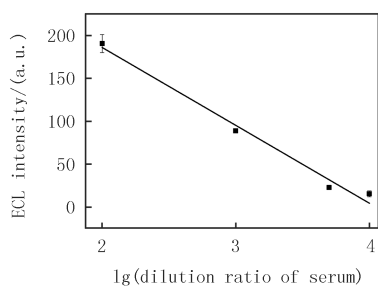


图5 不同稀释倍数血清中葡萄糖测定的线性拟合图

Fig.5 Calibration curve for glucose analysis in human serum with different dilution ratios

表 2 1 000 倍稀释血清中葡萄糖测定

Tab. 2 Determination of glucose in human serum samples dilution 1 000 times

血清编号	参考值 ^a /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定值/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1 号	5.79	5.97±0.286
2 号	5.35	5.32±0.195
3 号	4.82	4.49±0.317

注:^a 血糖仪测定全血中葡萄糖参考值.

参 考 文 献

- [1] ZHU N F, GU L T, WANG J, et al. Novel and sensitive chemiluminescence sensors based on 2D-MOF nanosheets for one-step detection of glucose in human urine[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2019, 123(14): 9388-9393.
- [2] LIN C H, DU Y, WANG S Q, et al. Glucose oxidase@Cu-hemin metal-organic framework for colorimetric analysis of glucose[J]. Materials Science and Engineering: C, 2021, 118: 111511.
- [3] 王欢, 所金泉, 王春艳, 等. 氨基化树枝状介孔二氧化硅固定葡萄糖氧化酶用于检测葡萄糖[J]. 高等学校化学学报, 2020, 41(8): 1731-1738. WANG H, SUO J Q, WANG C Y, et al. Glucose oxidase immobilization with amino dendritic mesoporous silica nanoparticles and its application in glucose detection[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2020, 41(8): 1731-1738.
- [4] NAMKOONG Y, OH J, HONG J I. Electrochemiluminescent detection of glucose in human serum by BODIPY-based chemodosimeters for hydrogen peroxide using accelerated self-immolation of boronates[J]. Chemical Communications, 2020, 56(55): 7577-7580.
- [5] ZENG K, YANG M H, LIU Y N, et al. Dual function hollow structured mesoporous Prussian blue mesocrystals for glucose biosensors[J]. Analytical Methods, 2018, 10(32): 3951-3957.
- [6] LIU Y, NAN X, SHI W, et al. A glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase and Au nanocomposites with polynorepinephrine[J]. RSC Advances, 2019, 9(29): 16439-16446.
- [7] MENG C D, DU F X, ABUBAKAR A, et al. Sonochemiluminescence using apertureless USB piezoelectric ultrasonic transducer and its applications for the detection of hydrogen peroxide, glucose, and glucose oxidase activity[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(45): 14934-14939.
- [8] KAFI A K M, ALIM S, JOSE R, et al. Fabrication of a glucose oxidase/multiporous tin-oxide nanofiber film on Prussian blue-modified gold electrode for biosensing[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2019, 852: 113550.
- [9] JIN S X, LIU L P, FAN M Y, et al. A facile strategy for immobilizing GOD and HRP onto pollen grain and its application to visual detection of glucose[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(24): 9529.
- [10] ADDISU K S, GAO W Y, ZHOLUDOV Y T, et al. Stainless steel electrode for sensitive luminol electrochemiluminescent detection of H₂O₂, glucose, and glucose oxidase activity[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(18): 9864-9869.
- [11] QIU B, MIAO M, SHE L S, et al. An ultrasensitive biosensor for glucose based on solid-state electrochemiluminescence on GO_x/CdS/GCE electrode[J]. Analytical Methods, 2013, 5(8): 1941.
- [12] GUO J P, LI S J, WANG J Y, et al. Dual-mode sensing of biomarkers based on nano 3D Cu-Flo. @ AuNPs-electrocatalyzed oxidation of glucose inducing in situ H₂O₂-generation system[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 198: 113820.
- [13] CHEN W S, ZENG K, LIU H, et al. Cell membrane camouflaged hollow Prussian blue nanoparticles for synergistic photothermal/chemotherapy of cancer[J]. Advanced Functional Materials, 2017, 27(11): 1605795.
- [14] KOMKOVA M A, ZAROCHINTSEV A A, KARYAKINA E E, et al. Electrochemical and sensing properties of Prussian Blue based nanozymes "artificial peroxidase"[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2020, 872: 114048.
- [15] YU S, DING L Y, LIN H T, et al. A novel optical fiber glucose biosensor based on carbon quantum dots-glucose oxidase/cellulose acetate complex sensitive film[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 146: 111760.
- [16] BANDI R, ALLE M, PARK C W, et al. Cellulose nanofibrils/carbon dots composite nanopapers for the smartphone-based colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 330: 129330.
- [17] GUO Q H, LIU L J, WU T T, et al. Flexible and conductive titanium carbide-carbon nanofibers for high-performance glucose biosensing

- [J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 281: 517-524.
- [18] JIANG T, NAN W J, HAN L H, et al. A rigidity/flexibility compatible strategy to improve the stability and durability of flexible electrochemical sensor based on a polydimethylsiloxane membrane supported Prussian Blue@Carbon nanotube array[J]. *Electroanalysis*, 2022, 34(4): 655-658.
- [19] XING L, LIU X Y, ZHOU T J, et al. Photothermal nanozyme-ignited Fenton reaction-independent ferroptosis for breast cancer therapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 339: 14-26.
- [20] WU W C, YU L D, PU Y Y, et al. Copper-enriched Prussian blue nanomedicine for in situ disulfiram detoxification and photothermal antitumor amplification[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(17): 2000542.
- [21] CHEN Y, LI Z H, HU J J, et al. Remote-controlled multi-enzyme system for enhanced tumor therapy via dark/light relay catalysis[J]. *Nanoscale Horizons*, 2020, 5(2): 283-293.
- [22] TANG T T, YANG F, WANG L N, et al. A sandwich electrochemiluminescent assay for determination of concanavalin A with triple signal amplification based on MoS₂NF@MWCNTs modified electrode and Zn-MOF encapsulated luminol[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(9): 1-11.
- [23] GUO X J, LI Y B, LI Y C, et al. An L012@PAni-PAAm hydrogel composite based-electrochemiluminescence biosensor for in situ detection of H₂O₂ released from cardiomyocytes[J]. *Electrochimica Acta*, 2020, 354: 136763.
- [24] LIU H B, LIU Z, YI J L, et al. A dual-signal electroluminescence aptasensor based on hollow Cu/Co-MOF-luminol and g-C₃N₄ for simultaneous detection of acetamiprid and malathion[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 331: 129412.
- [25] LI G X, LIAN J L, ZHENG X W, et al. Electrogenerated chemiluminescence biosensor for glucose based on poly(luminol-aniline) nanowires composite modified electrode[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26(2): 643-648.
- [26] LIN Z Y, CHEN J H, CHEN G N. An ECL biosensor for glucose based on carbon-nanotube/Nafion film modified glass carbon electrode[J]. *Electrochimica Acta*, 2008, 53(5): 2396-2401.
- [27] TIAN X T, LIAN S, ZHAO L M, et al. A novel electrochemiluminescence glucose biosensor based on platinum nanoflowers/graphene oxide/glucose oxidase modified glassy carbon electrode[J]. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2014, 18(9): 2375-2382.
- [28] CHEN X P, YE H Z, WANG W Z, et al. Electrochemiluminescence biosensor for glucose based on graphene/nafion/GOD film modified glassy carbon electrode[J]. *Electroanalysis*, 2010, 22(20): 2347-2352.
- [29] HAGHIGHI B, BOZORGZADEH S, GORTON L. Fabrication of a novel electrochemiluminescence glucose biosensor using Au nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 155(2): 577-583.

Electrochemiluminescence biosensor for ultrasensitive determination of glucose based on HMPB@GOx

Zhang Hua, Shen Congcong, Chen Yuehua, Fan Simin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: As the main energy supply material, glucose plays an important role in the metabolism of organisms. To date, a series of glucose analysis methods were reported, such as colorimetry, spectrophotometry, electrochemistry and high performance liquid chromatography, which mainly based on biological enzyme or nano-mimic enzyme and combined with optical, electrical and color detection technologies and so on. In this study, an ultrasensitive electrochemiluminescence(ECL) biosensor for glucose detection was prepared based on hollow mesoporous prussian blue(HMPB), a classical metal organic framework material loading with amount of glucose oxidase(HMPB@GOx). The analysis results show that the cubic HMPB has large specific surface area and high redox activity, which acts as a carrier for GOx and H₂O₂ mimic enzyme to cascade amplify the ECL signal. And it still has good selectivity for glucose even coexisting with other electroactive substances such as ascorbic acid(AA), dopamine(DA) and uric acid(UA). Based on the above excellent performance, the ECL biosensor has a detection range of $3.3 \times 10^{-2} - 167.0 \mu\text{mol/L}$ for glucose, and the detection limit is as low as $2.1 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$, which successfully detects the glucose in the actual serum. Therefore, the ECL biosensor based on HMPB@GOx has potential as a portable glucose detection device for diabetics.

Keywords: hollow mesoporous prussian blue(HMPB); electrochemiluminescence; luminol; glucose oxidase(GOx); glucose

[责任编辑 赵晓华 陈留院]

本期专家介绍



徐凤增,山东大学教授,博士,博士生导师,山东大学服务战略与服务管理研究中心主任.主要研究领域为旅游目的地管理,乡村创业与服务创新.在《管理世界》, *Tourism Management* (SSCI, Q1), *Journal of Hospitality Marketing & Management* (SSCI, Q1), *International Journal of Contemporary Hospitality Management* (SSCI, Q1), *Journal of Hospitality & Tourism Research* (SSCI, Q1) 等国内外期刊发表论文 30 余篇,出版《旅游创业理论与案例研究》等学术专著 3 部,主持国家自然科学基金面上项目、教育部人文社会科学青年项目、中国博士后基金、山东省自然科学基金等国家及省部级课题 10 余项,担任国家自然科学基金通讯评审专家,国家社科基金通讯评审专家, *Journal of Hospitality Marketing & Management* (SSCI, Q1), *International Journal of Contemporary Hospitality Management* (SSCI, Q1), *Journal of Hospitality and Tourism Management* (SSCI, Q2), 《经济管理》等期刊匿名评审专家.

刘英基,河南师范大学教授,博士,河南师范大学旅游学院院长,河南省太行山文化与旅游研究院院长,河南省普通高等学校人文社会科学重点研究基地“公共政策与社会管理创新研究中心”研究员,中国旅游协会教育分会理事,河南省研学教育协会监事,河南省地理学会理事.近年来,主持完成国家社会科学基金项目、教育部人文社会科学研究项目、文化和旅游部黄河文化研究课题、河南省哲学社会科学规划项目及其他省、厅级课题 10 余项.在《旅游学刊》《科研管理》《世界经济研究》《中国人口·资源与环境》等 CSSCI 核心期刊发表学术论文 50 多篇,出版学术专著 3 部;作为主要成员获教育部高等学校科学研究优秀成果奖二等奖 1 项,文化和旅游优秀研究成果三等奖 1 项.



仇华,河南师范大学教授,博士生导师,现任河南师范大学化学化工学院副院长.国家自然科学基金优秀青年科学基金获得者、河南省优秀专家、河南省模范教师、河南省学术技术带头人、河南省高层次人才特殊支持“中原千人计划”——中原科技创新领军人才、河南省高校科技创新人才,新乡市创新人才.河南省化学会理事、河南省青年科技工作者协会理事兼高校界别工作委员会秘书长.主要从事生化分析与生物成像、小分子荧光探针设计及癌症诊疗领域研究,主持国家自然科学基金优秀青年科学基金项目、国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目,国家级、省部级及横向项目等 11 项.先后在 *J Am Chem Soc*, *Chem Sci*, *Anal Chem*, *ACS Appl Mater Interfaces* 等高水平 SCI 期刊发表论文 50 余篇,参与编写专著 1 部,授权国家发明专利 9 件,日本、美国、欧洲专利各 1 件.

于鲁冀,郑州大学教授,河南省政协委员.现任郑州大学生态与环境学院环境管理与修复研究所所长,农工党河南省委委员、农工党河南省委人口资源环境工作委员会主任、河南省环保产业协会副会长兼秘书长.兼任中国环境科学学会环境经济学分会常务委员、中国环境科学学会生态环境核算与审计专业委员会委员、河南省城乡规划专家委员会委员、河南省自然资源决策咨询委员会委员、河南省自然资源学会常务理事、河南省环境科学学会理事、河南省水污染治理与河湖生态修复产业技术创新战略联盟理事长等.主要从事环境政策及规划、水生态净化与修复、水体污染控制与治理等方面研究.主持“十二五”国家重大水专项清淇河流域水环境质量整体提升与功能恢复关键技术集成研究与综合示范课题(2015ZX07204-002)、主持或参与了“十一五”“十二五”“十三五”重大水专项子课题研究等 7 项,主持完成了省科技攻关等省级科研项目 30 余项,以及受委托横向项目 200 余项,获河南省科技进步二等奖 1 项、三等奖 3 项,获河南省环境保护科技进步一等奖 3 项、二等奖 1 项、三等奖 1 项;出版专著 4 部,主持编制地方标准 10 余项;发表论文 100 余篇,其中 SCI 论文 10 篇;获发明专利授权 20 余件.

