

## 痕量葡萄糖的双酶催化荧光分析

刘庆业<sup>1</sup>, 梁月园<sup>1</sup>, 梁爱惠<sup>2</sup>, 蒋治良<sup>1, 2\*</sup>

1. 广西师范大学环境与资源学院, 广西 桂林 541004

2. 桂林工学院材料与化学工程系, 广西 桂林 541004

**摘要** 在 HAc-NaAc 缓冲溶液中, 葡萄糖氧化酶(GOD)催化葡萄糖与溶解氧反应生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 辣根过氧化物酶(HRP)催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化过量的 KI 生成 I<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sub>3</sub><sup>-</sup> 分别与罗丹明 S(RhS), 罗丹明 6G(Rh6G), 丁基罗丹明 B(b-RhB), 罗丹明 B(RhB) 结合形成缔合物微粒, 使得 4 体系分别在 556, 556, 584 和 584 nm 处的荧光峰强度线性降低。在最佳条件下, 葡萄糖的浓度分别在 0.083~9.99, 0.17~8.33, 0.33~8.33, 0.33~9.99 μmol·L<sup>-1</sup> 范围内与 RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 四体系的荧光猝灭强度呈良好的线性关系, 其回归方程、相关系数、检出限分别为  $\Delta F = 40.0c + 3.0$ ,  $\Delta F = 23.9c + 8.1$ ,  $\Delta F = 25.6c + 4.2$ ,  $\Delta F = 18.4c + 0.8$ ; 0.995 1, 0.997 3, 0.996 0, 0.996 5; 0.059, 0.17, 0.21, 0.16 μmol·L<sup>-1</sup>。RhS 催化体系最灵敏、稳定, 将其用于人血清中葡萄糖的检测, 结果满意。

**关键词** 葡萄糖; 罗丹明染料; 酶催化; 荧光猝灭

**中图分类号**: O657.6 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)09-2535-04

### 引言

葡萄糖是生命有机体活动中不可缺少的物质, 与人类的生命活动息息相关<sup>[1]</sup>。因此研究灵敏、快速检测葡萄糖的方法具有重要意义。目前, 葡萄糖的分析方法主要有分光光度法<sup>[2, 3]</sup>、荧光法<sup>[4]</sup>、化学发光法<sup>[5]</sup>、磷光法<sup>[6]</sup>、色谱法<sup>[7]</sup>、电化学<sup>[8]</sup>和传感器<sup>[9-12]</sup>等方法。这些方法各有其特点。分光光度法所用仪器成本低廉, 可检测低至 0.8 μmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖<sup>[2]</sup>。与光度法相比较, 酶催化荧光法具有较高的灵敏度。Yuan<sup>[4]</sup>等用对苯二酚荧光法可检测 1.0×10<sup>-6</sup>~1.5×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖, 检出限达 1×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>。罗丹明染料是一种常用的稳定的荧光分析试剂, 已用于光度法、荧光法、共振散射光谱分析中<sup>[13-15]</sup>。但将 GOD 和 HRP 双酶偶联生成 I<sub>3</sub><sup>-</sup> 并与罗丹明染料结合应用于葡萄糖的荧光检测尚未见报道。本文研究了 GOD-葡萄糖-HRP-KI-罗丹明体系, 建立了一种灵敏的测定葡萄糖的荧光猝灭新方法。

### 1 实验部分

#### 1.1 实验仪器与试剂

Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国 Varian 公司, 激发

狭缝和发射狭缝均选择 5 nm, PMT 检测器电压选择 450 V)。1.00×10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖。辣根过氧化物酶购于华美生物工程公司(300 U·mg<sup>-1</sup>, RZ>3)。1 mg·mL<sup>-1</sup> 葡萄糖氧化酶。2.0×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 罗丹明 S(Rhodamine S, RhS), 2.0×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 罗丹明 6G(Rhodamine 6G, Rh6G), 2.0×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 丁基罗丹明 B(butyl-Rhodamine B, b-RhB), 2.0×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 罗丹明 B(Rhodamine S, RhB)。0.05 mol·L<sup>-1</sup> KI。pH 3.6~5.6 的 HAc-NaAc 缓冲溶液: 取一定量的 0.2 mol·L<sup>-1</sup> HAc 和 0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaAc 溶液按一定比例配制。所用试剂均为分析纯, 实验用水均为亚沸水。

#### 1.2 实验方法

在 5 mL 刻度试管中, 依次加入 HAc-NaAc 缓冲液、KI、葡萄糖、GOD、HRP, 摇匀, 反应一定时间后, RhS(或 Rh6G, b-RhB, RhB), 用水稀释至 3.0 mL, 摇匀。用荧光分光光度计扫描得到各个体系的激发光谱和发射光谱。测量各体系的荧光强度  $F$ , 以不加葡萄糖作试剂空白  $F_0$ , 计算  $\Delta F = F_0 - F$  值。

### 2 结果与讨论

在 HAc-NaAc 缓冲液中, 在 GOD 的催化作用下葡萄糖

收稿日期: 2008-04-12, 修订日期: 2008-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(20667001, 20865002)和广西自然科学基金项目(0832260, 0991021Z)资助

作者简介: 刘庆业, 1963 年生, 广西师范大学环境与资源学院副教授

\* 通讯联系人 e-mail: zlijiang@mailbox.gxnu.edu.cn

与氧气反应生成葡萄糖酸和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。当有 HRP 存在时, HRP 可催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{OH}$  可氧化过量的  $\text{I}^-$  生成  $\text{I}_3^-$ , 而  $\text{Rh}^+$  可与  $\text{I}_3^-$  结合形成  $(\text{Rh}-\text{I}_3)_n$  缔合微粒<sup>[15]</sup>。因荧光分子 Rh 被包裹在缔合微粒中而不能被激发产生荧光, 从而导致体系的荧光强度降低。据此, 可以建立间接测定葡萄糖的荧光法。

## 2.1 激发光谱和发射光谱

固定发射光波长  $\lambda_{\text{em}}=556\text{ nm}$  时, RhS 体系和 Rh6G 在 524 nm 处产生最强的激发峰, 两体系分别在 544 和 540 nm 处有一个因生成缔合微粒形成固液界面而产生的瑞利散射峰。为使体系发射峰和激发峰分开, 两体系均选择 500 nm 作为激发波长。固定发射光波长  $\lambda_{\text{em}}=584\text{ nm}$  时, b-RhB 和 RhB 体系在 556 和 554 nm 处产生最强的激发峰。同样, 为了使得激发峰和发射峰分开, 这两个体系分别选择 540 和 530 nm 作为体系的激发波长。分别固定 RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 体系的激发波长  $\lambda_{\text{ex}}=500, 500, 540, 530\text{ nm}$  时, 4 体系分别在 556(图 1), 556, 584, 584 nm 处产生荧光峰, 且其荧光强度随着葡萄糖浓度的增大而减弱, 即发生荧光猝灭现象。同时, RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 体系分别在 500, 500, 550, 540 nm 处附近产生较宽的瑞利散射峰, 这是由于体系中存在疏水性的缔合微粒的结果。RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 体系分别选择 556, 556, 584, 584 nm 波长进行测量。

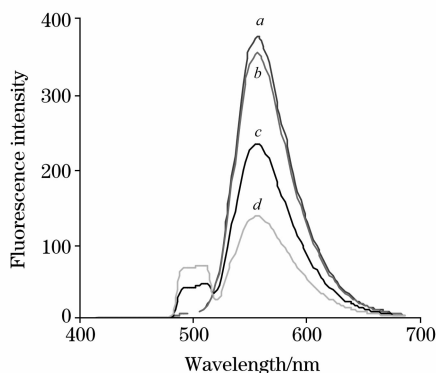


Fig. 1 Emission spectra of the RhS system ( $\lambda_{\text{ex}}=500\text{ nm}$ )

a: Blank; b:  $0.50 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose;  
c:  $3.50 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose;  
d:  $6.00 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose

## 2.2 条件的选择

研究了试剂加入顺序对体系荧光猝灭强度的影响。结果表明, 依次加入 HAc-NaAc 缓冲液、KI、葡萄糖、GOD、HRP, 反应一定时间, 再加入 Rh 放置一定时间后测定, 结果较好。由于底物 KI 在弱酸介质及较弱碱介质中稳定, 本实验在选 HAc-NaAc 缓冲体系, 考察了 pH 值对四种体系的影响。RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 体系分别在 pH 为 4.4, 4.4, 4.6, 4.6 时, 体系的  $\Delta F$  值最大。HAc-NaAc 缓冲溶液的用量分别为 0.08, 0.1, 0.2, 0.2 mL 时较佳。HRP 的常用底物为苯胺、苯酚类化合物, 但具有致癌作用, 也不能用于共振散射光谱分析。我们对卤化物底物进行了研究, 发现碘化物是一种较好的无毒易得的底物。对于 RhS, Rh6G, b-

RhB, RhB 催化体系, 当 KI 加入浓度高于  $1.67 \times 10^{-3}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 4 个体系的  $\Delta F$  值达到最大值且稳定。GOD 和 HRP 分别为葡萄糖- $\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ -KI 反应的酶催化剂。分别考察了 GOD 和 HRP 对 RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 体系的催化作用。结果表明, 当 GOD 加入浓度分别大于 6.68, 6.68, 5, 3.34  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  GOD, HRP 加入浓度分别大于 10, 8, 10, 10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 体系的  $\Delta F$  值达到最大且稳定。罗丹明染料是一类稳定的阳离子荧光试剂, 且与  $\text{I}_3^-$  发生缔合反应形成缔合物微粒<sup>[16]</sup>, 存在荧光猝灭效应和共振散射效应, 但利用其荧光猝灭效应测定葡萄糖较用其共振散射效应更灵敏。图 2 表明, 当 RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 的加入浓度分别为  $2.0 \times 10^{-5}, 2.0 \times 10^{-5}, 0.67 \times 10^{-5}, 4.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 四种罗丹明体系的  $\Delta F$  值达到最大。酶催化反应完成后, 再加入罗丹明染料, 定容到 3.0 mL, 摇匀, 计时, 此时间为缔合反应时间。结果表明, 4 体系在缔合反应 10~40 min 内荧光强度基本保持不变, 故均选择在 10 min 后测量荧光强度。考察了 20~50  $^\circ\text{C}$  温度区间对体系荧光强度的影响。RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 4 个体系在 20~30  $^\circ\text{C}$  之间的  $\Delta F$  较大且基本不变, 实验选择在室温下进行。考察了酶催化反应时间对体系荧光强度的影响。当 RhS, Rh6G, b-RhB, RhB 体系反应时间分别在 30, 30, 50, 30 min 后, 其  $\Delta F$  值达到最大且稳定。

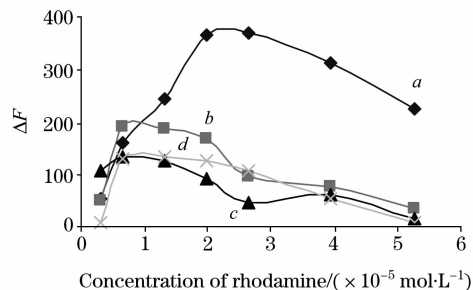


Fig. 2 Effect of Rh concentration

a: RhS; b: Rh6G; c: b-RhB; d: RhB

## 2.3 共存物质的影响

考察了共存物质对 RhS 体系荧光猝灭测定葡萄糖的影响。当葡萄糖的浓度为  $6.67\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 相对误差在  $\pm 10\%$  之内时, 1 000 倍  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$ ; 300 倍  $\text{Mn}^{2+}$ ; 100 倍  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ; 60 倍 L-酪氨酸、尿素、烟酸, 50 倍  $\text{Fe}^{3+}$ , HSA, BSA; 10 倍蔗糖、维生素 B2、L-赖氨酸、L-谷氨酸、L-胱氨酸等不干扰测定。表明该酶催化荧光法测定葡萄糖具有较好的选择性。

## 2.4 工作曲线及方法的检出限

在选定的实验条件下, 按实验方法操作, 以葡萄糖浓度  $c$  为横坐标, 对应的  $\Delta F$  为纵坐标绘制工作曲线, 各体系的  $\Delta F$  与葡萄糖浓度的关系见表 1。从表 1 中可知, RhS 体系的灵敏度较高, 线性范围较宽, 且稳定。本文选择该体系测定葡萄糖。与已报道的葡萄糖分析法比较<sup>[2-12]</sup>, 本法具有灵敏度高, 选择性好, 试剂易得且无毒。

Table 1 Analytical feature of the four Rh methods

体系	回归方程	线性范围/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	相关系数( $r$ )	检出限 $DL(3\sigma/K)/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
RhS	$\Delta F = 40.0c + 3.0$	0.083~9.99	0.995 1	0.059
Rh6G	$\Delta F = 23.9c + 8.1$	0.17~8.33	0.997 3	0.17
b-RhB	$\Delta F = 25.6c + 4.2$	0.33~8.33	0.996 0	0.21
RhB	$\Delta F = 18.4c + 0.8$	0.33~9.99	0.996 5	0.16

## 2.5 样品分析

按实验方法,取 90  $\mu\text{L}$  健康人血清测定其葡萄糖,结果在 4.49~5.90  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间。这与人体正常血清中葡萄

糖的含量(3.9~6.1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )基本一致。在样品中加入已知量的葡萄糖测定回收率,其值在 90.3%~103.3%之间。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Kang X H, Mai Z B, Zou X Y, et al. Anal. Biochem. , 2007, 369, 71.
- [ 2 ] Oliveira A C A, Assis V C, Matos A C, et al. Anal. Chim. Acta, 2005, 535: 213.
- [ 3 ] Maria C G, Townsend A. Anal. Chim. Acta, 1992, 261: 137.
- [ 4 ] Yuan J P, Guo W W, Wang E K. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23: 1567.
- [ 5 ] Marquette C A, Blum L J. Sensors and Actuators B-Chemical, 2003, 90: 112.
- [ 6 ] Li Z M, Zhu G H, Liu J M, et al. Spectrochim Acta Part A, 2007, 67: 1153.
- [ 7 ] Song S, Sun L, Yuan L, et al. J. Chromatograph A, 2008, 1179: 125.
- [ 8 ] Andreescu S, Linda A L. Anal. Biochem. , 2008, 375: 282.
- [ 9 ] Dai Z H, Bao J C, Yang X D, et al. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23: 1070.
- [ 10 ] Cano M A J L, Maye'n M, Mena M L, et al. J. Electroanal Chem. , 2008, 615: 69.
- [ 11 ] Jeykumari D R S, Narayanan S S. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23: 1404.
- [ 12 ] Yang Y L, Tseng T F, Yeh J M, et al. Sens. Actuat. B, 2008, 131: 533.
- [ 13 ] LI Yan, YANG Yan-ming, LIU Shu-yuan, et al(李 燕, 杨焱明, 刘树元, 等). Anal. Test Technology Instrument(分析测试技术与仪器), 2007, 13(4): 236.
- [ 14 ] Jiang Z L, Zhou S M, Liang A H, et al. Environ. Sci. Technol. , 2006, 40: 4286.
- [ 15 ] Liang A H, Zhou S M, Jiang Z L. Talanta, 2006, 70: 444.

# Fluorescence Analysis of Trace Glucose Using Glucose Oxidase and Horseradish Peroxidase

LIU Qing-ye<sup>1</sup>, LIANG Yue-yuan<sup>1</sup>, LIANG Ai-hui<sup>2</sup>, JIANG Zhi-liang<sup>1, 2\*</sup>

1. School of Environment and Resource, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

2. Department of Material and Chemical Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

**Abstract** In acetate buffer solution and in the presence of glucose oxidase (GOD), glucose reduced the dissolved oxygen to form  $H_2O_2$  that oxidized catalytically the excess KI to form  $I_3^-$  by horseradish peroxidase (HRP). The  $I_3^-$  combines respectively with rhodamine S (RhS), rhodamine 6G (Rh6G), butyl-rhodamine B (b-RhB) and rhodamine B (RhB) to form RhS- $I_3^-$ , Rh6G- $I_3^-$ , b-RhB- $I_3^-$  and RhB- $I_3^-$  associated particles that result in fluorescence quenching at 556, 556, 584 and 584 nm, respectively. Under the optimal conditions, the concentration of glucose in the range of 0.083-9.99, 0.17-8.33, 0.33-8.33 and 0.33-9.99  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  is linear with their fluorescence quenching at 556, 556, 584 and 584 nm, with detection limits of 0.059, 0.17, 0.21 and 0.16  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose. And the regression equation was  $\Delta F = 40.0c + 3.0$ ,  $\Delta F = 23.9c + 8.1$ ,  $\Delta F = 25.6c + 4.2$ , and  $\Delta F = 18.4c + 0.8$ , respectively. The RhS system was the most sensitive and stable, and was chosen for use. Influence of some foreign substances on the RhS fluorescence quenching determination of 6.67  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  glucose was examined, with a relative error of  $\pm 10\%$ . Results showed that 1 000-fold  $Mg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , 300-fold  $Mn^{2+}$ , 100-fold  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  and  $Co^{2+}$ , 60-fold L-tyrosine, urea and nicotinic acid, 50-fold  $Fe^{3+}$ , HSA and BSA, 10-fold sucrose, vitamin B<sub>2</sub>, L-lysine, L-glutamic acid and L-cystine did not interfere with the determination. This RhS fluorescence quenching assay was applied to the determination of glucose in the serum samples with satisfactory results.

**Keywords** Glucose; Rhodamine dye; Enzymatic catalysis; Fluorescence quenching

(Received Apr. 12, 2008; accepted Jul. 16, 2008)

\* Corresponding author