

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 21/76

G01N 33/53

C09K 11/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510016848.4

[43] 公开日 2005 年 11 月 16 日

[11] 公开号 CN 1696666A

[22] 申请日 2005. 6. 3

[21] 申请号 200510016848.4

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 徐国宝 刘晓庆 史立红

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司
代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称 环境友好的高灵敏电化学发光检测方法

[57] 摘要

本发明属于一种环境友好的高灵敏电化学发光检测技术领域。该电化学发光体系以钌的络合物为发光物质，以胺为共反应物。它具有发光强度大、灵敏度高、线性范围宽、环境友好、重现性好和试剂稳定的优点。它可广泛应用于免疫分析和核酸分析。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种环境友好的高灵敏电化学发光检测方法, 该发光体系是以钌的络合物为发光物质, 以胺为共反应物, 以表面活性剂为改良试剂, 在缓冲溶液中混合, 用电化学方法激发发光进行分析, 其特征在于共反应物胺的基本结构为 $(R_1)(R_2)N(R_3)$, 其中 R_1, R_2, R_3 为带二到五个碳的烷基, 而且至少一个烷基上带有羟基、羧基、胺基或磺酸基。

2. 根据权利要求 1 所述的电化学发光检测方法, 其特征在于所述的钌的络合物的配体为联吡啶、邻菲咯啉或它们的衍生物。

3. 根据权利要求 1、或 2 所述的电化学发光检测方法, 其特征在于所述的 $(R_1)(R_2)N(R_3)$ 至少一个烷基上带有羟基的是二正丁基乙醇胺。

4. 根据权利要求 1、2、或 3 所述的电化学发光检测方法, 其特征在于所述改良试剂为表面活性剂, 如曲拉通 X-100、吐温-20 或十二烷基磺酸钠。

5. 根据权利要求 1、2、3 或 4 所述的电化学发光检测方法, 其特征在于所述的胺其使用浓度范围为 0.05-50mM。

6. 根据权利要求 1 至 5 任意一个权利要求所述的电化学发光检测方法, 其特征在于所述的缓冲溶液为 pH 在 5-9 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液。

7. 根据权利要求 1 至 5 任意一个权利要求所述的电化学发光检测方法, 其特征在于所述电位范围为 1.1-1.5V。

环境友好的高灵敏电化学发光检测方法

技术领域

本发明涉及一种环境友好的高灵敏电化学发光检测技术领域。

背景技术

电化学发光是化学发光与电化学方法相互结合的产物,是指通过电化学方法产生一些特殊的物质,然后这些电生物物质之间或电生物物质与其它物质之间进一步反应而产生的一种发光现象。电化学发光分析法的灵敏度高,线性范围宽,可控性强,选择性好,装置简单,日益受到人们的关注。1927年,人们发现对Grignard化合物施加电位可产生发光。1929年Harvey在碱性溶液中电解鲁米诺时,发现在阴极及阳极上都有发光现象,揭开了电化学发光研究的序幕。八十年代发现吡啶钌电化学发光可用于草酸、胺类化合物、氨基酸、NADH、丙酮酸的测定以及吡啶钌的超灵敏测定。在此期间,电化学发光开始与流动注射分析(FIA)、高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)等分离技术联用,提高了发光信号的重现性和稳定性,为其实际应用打下了良好的基础。九十年代,电化学发光开始用于免疫分析、PCR分析和DNA的单分子检测。目前研究和应用最广泛的是吡啶钌电化学发光体系,因为它具有水溶性好、发光效率高、性能稳定以及电化学可逆等突出优点。

吡啶钌电化学发光分析是新一代标记免疫分析和核酸测定技术。现有技术是基于浓度高达100mM左右的三丙胺与较低浓度的吡啶钌标记物发生电化学发光反应来进行生物分析,是少数几个被应用于实际测定的电分析技术之一。但是吡啶钌/三丙胺电化学发光体系存在以下主要不足之处。第一、三丙胺在电极上氧化速度较慢,导致电化学发光强度较低,限制了检测的灵敏度;第二、需要很高浓度的三丙胺才能实现高灵敏检测;第三、三丙胺在中性溶液中溶解度不太好,一般要采用很高浓度的磷酸盐才能使高达100mM的三丙胺在中性磷酸盐缓冲溶液中溶解;最后,三丙胺挥发性较大,具有较大的异味和一定的毒性。因此迫切需要寻找比三丙胺具有更加优异性质的物质。

吡啶钌不仅可以与三丙胺发生电化学发光反应,还可以与大量的其它胺

类物质发生电化学发光反应。目前，人们主要研究了以下两种情况下吡啶钌/胺类物质电化学发光规律。第一种情况是吡啶钌浓度接近或高于胺类物质的浓度。这种情况下，胺的结构对电化学发光的影响的研究较多也比较系统。此时，吡啶钌电催化氧化胺对电化学发光贡献很大，而且通常含有吸电子基团的类发光较弱。第二种情况是吡啶钌的浓度远远低于胺的浓度。目前仅有一篇文献（J. Electrochem. Soc. 1990, 137, 3127）粗略比较了几种胺的电化学发光强度，但没有总结出发光规律。该文发现三丙胺的电化学发光强度优于其它的几种胺，而且吡啶钌/三丙胺电化学发光体系可以用于免疫分析。随后多篇文献对吡啶钌/三丙胺体系的电化学发光机理进行了深入的研究。发现在吡啶钌的浓度远远低于三丙胺的浓度的情况下三丙胺在电极上的直接电化学氧化起着非常重要的作用（Anal. Chem. 2000, 72, 3223），吡啶钌电催化氧化三丙胺对电化学发光贡献相对较小。通过加入表面活性剂等促进三丙胺在电极上的直接电化学氧化可以增强电化学发光强度。

发明内容

本发明的目的是提供一种发光强度更大，更加灵敏，对环境更加友好的电化学发光方法，提供应用于免疫电化学发光分析及其他重要物质分析的方法。

本发明是一种环境友好的高灵敏电化学发光检测方法，该发光体系是以钌的络合物为发光物质，以胺为共反应物，以表面活性剂为改良试剂，在缓冲溶液中混合，用电化学方法激发发光进行分析，其特征在于共反应物胺的基本结构为 $(R_1)(R_2)N(R_3)$ ，其中 R_1, R_2, R_3 为带二到五个碳的烷基，而且至少一个烷基上带有羟基、羧基、胺基或磺酸基；

本发明所述的钌的络合物的配体为联吡啶、邻菲咯啉或它们的衍生物；

本发明所述的 $(R_1)(R_2)N(R_3)$ 至少一个烷基上带有羟基的是二正丁基乙醇胺；

本发明所述的改良试剂为表面活性剂，如曲拉通 X—100、吐温-20 或十二烷基磺酸钠；

本发明所述的胺其使用浓度范围为 0.05-50mM；

本发明所述的缓冲溶液为 pH 在 5-9 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液；

本发明所述电位范围为 1.1-1.5V。

本发明的突出优点是该体系发光效率高、灵敏度高、线性范围宽、共反应试剂浓度低、环境友好、重现性好和试剂稳定。利用该体系检测物质的线性范围宽，检测限低，可广泛应用于免疫分析、核酸分析。吡啶钌浓度很低且二正丁基乙醇胺的浓度仅为20mM的情况下，就可以实现比采用三丙胺更加灵敏的检测，相同条件下在金电极上吡啶钌/二正丁基乙醇胺甚至比吡啶钌/三丙胺电化学发光的强度强10倍以上，在铂电极上强30倍以上。

附图说明

附图1是利用吡啶钌/二正丁基乙醇体系电化学发光测定吡啶钌含量的示意图。

附图2是pH对吡啶钌/二正丁基乙醇体系电化学发光的影响示意图。

附图3是二正丁基乙醇的浓度对吡啶钌/二正丁基乙醇体系电化学发光的影响示意图。

附表说明

表1是带有不同结构或功能团的各种胺与吡啶钌组成的电化学发光体系的发光强度对比。

胺	发光强度 (a. u.)
二正丁基乙醇胺	381
三乙醇胺	174
三丙胺	62
N, N'-二乙基-N'- -甲基亚乙基胺	28
三乙酸胺	21
二乙基丙醇胺	13

具体实施方式

实施例1：固定二正丁基乙醇胺浓度为25mM，缓冲溶液为pH 7.5的0.1M磷酸

盐，加入1f M的吡啶钌，以金为工作电极，施加1.35V的阶越电位，同时施加适当发光检测高压，利用发光信号检测吡啶钌，重复测定三次，得到吡啶钌发光信号的平均强度为47.41。

实施例2：固定二正丁基乙醇胺浓度为0.05mM，吡啶钌浓度为1 μ M，缓冲溶液为pH 5的0.1M磷酸盐，以金为工作电极，施加1.5V的阶越电位，同时施加适当发光检测高压，利用发光信号检测吡啶钌，重复测定三次，得到的发光信号平均强度为52.4。

实施例3：固定二正丁基乙醇胺的浓度为1mM，吡啶钌浓度为1mM，溶于pH 9的0.1 M磷酸盐缓冲溶液中，以金为工作电极，电极电位从0V循环伏安扫描至1.1V，同时施加适当的发光检测高压，重复测定三次，得到的发光信号平均强度为 1.26×10^6 。

实施例4：固定二正丁基乙醇胺浓度为10mM，吡啶钌浓度为1 μ M，缓冲溶液为pH 9的0.1M硼酸盐，以金为工作电极，施加1.5V的阶越电位，同时施加适当发光检测高压，利用发光信号检测吡啶钌，重复测定三次，得到的发光信号平均强度为 1.1×10^6 。

实施例5：固定吡啶钌浓度为1 μ M，缓冲溶液为pH 7.5的0.1M磷酸盐，加入含有不同结构或功能团的各种胺，固定胺的浓度为25mM。以金为工作电极，测定方法同实施例1，每种胺重复测定三次，其平均结果见下面表格1。

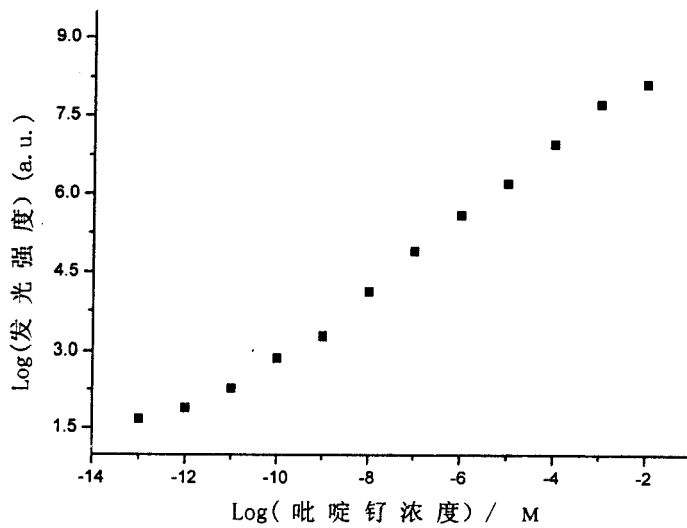


图 1

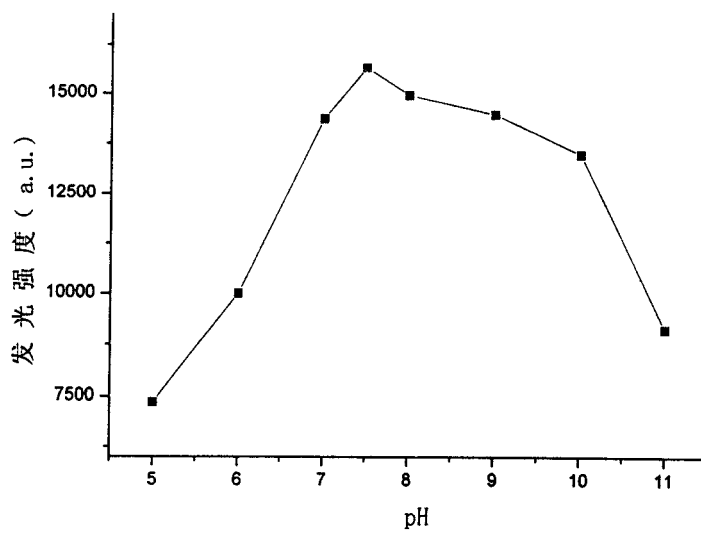


图 2

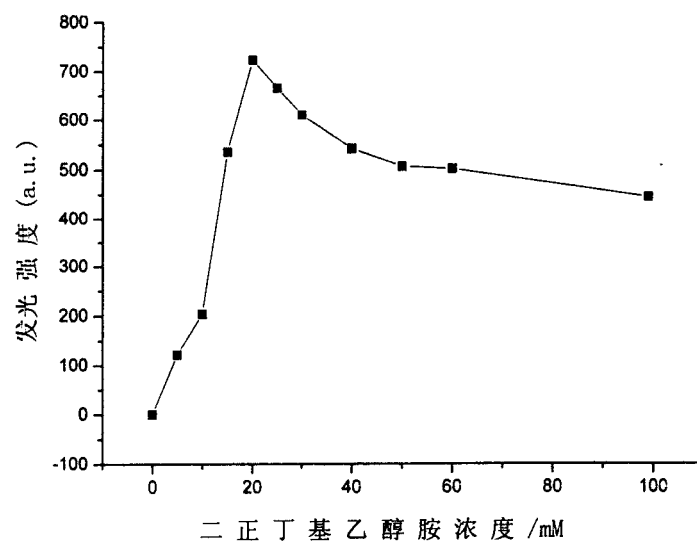


图 3