

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910066803.6

[51] Int. Cl.
G01N 21/76 (2006.01)
G01N 21/69 (2006.01)
C07D 213/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月16日

[11] 公开号 CN 101532961A

[22] 申请日 2009.4.10

[21] 申请号 200910066803.6

[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 韩 双

[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 3 页 说明书 4 页 附图 2 页

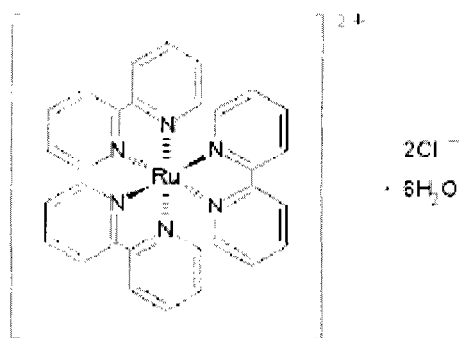
[54] 发明名称

一种电化学发光检测的方法

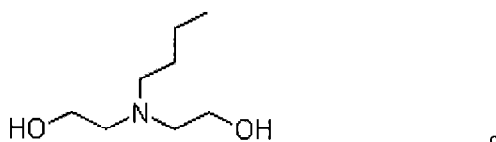
[57] 摘要

本发明涉及电化学发光检测的方法，电化学发光检测的发光体系是吡啶钌/正丁基二乙醇胺发光体系；把吡啶钌和正丁基二乙醇胺在 pH7 ~ 9 的磷酸盐缓冲溶液中混合，用电化学方法激发发光进行分析；吡啶钌的浓度范围为 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \text{ mmol/L}$ ，正丁基二乙醇胺的浓度范围为 $0.05 \sim 50 \text{ mmol/L}$ ；正丁基二乙醇胺/吡啶钌发光体系的电化学发光效率高，共反应物正丁基二乙醇胺浓度可以很低。当吡啶钌浓度是 $1 \mu \text{ mol/L}$ 且正丁基二乙醇胺的浓度为 25 mmol/L ，相同条件下，在金电极上吡啶钌/正丁基二乙醇胺发光体系比吡啶钌/二正丁基乙醇胺发光体系的电化学发光强度强约 1.3 倍，可广泛应用于标记分析。

1. 一种电化学发光检测方法, 适用于所有的电化学发光检测装置, 其特征在于, 电化学发光检测的发光体系是以吡啶钌为发光物质, 正丁基二乙醇胺为共反应物的吡啶钌/正丁基二乙醇胺发光体系, 吡啶钌同时也是被检测物; 把被检测物吡啶钌和正丁基二乙醇胺在缓冲溶液中混合, 用电化学方法激发发光进行分析; 所述的吡啶钌的使用浓度范围为 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \text{ mmol/L}$, 其结构式为:



所述的正丁基二乙醇胺的使用浓度范围为 $0.05 \sim 50 \text{ mmol/L}$; 所述的缓冲溶液为 pH 7~9 的磷酸盐缓冲溶液, 所述的正丁基二乙醇胺的结构式如下:



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, 所述的电化学发光检测装置是使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测; 正丁基二乙醇胺浓度为 0.05 mmol/L , 被检测物吡啶钌浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$, 缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐, 以金电极为工作电极, 施加 1.5 V 的阶跃电位, 同时施加发光检测电压 800 V , 检测吡啶钌发光信号, 完成电化学发光检测。

3. 根据权利要求 1 所述的电化学发光检测方法, 其特征在于, 所述的电化学发光检测装置是使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测, 固定正丁基二乙醇胺浓度为 15 mmol/L , 缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐, 加

入 4.0×10^{-10} mol/L 的被检测物吡啶钌，以金电极为工作电极，施加 1.35 V 的阶跃电位，同时施加发光检测电压 700V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测。

4. 根据权利要求 1 所述的电化学发光检测方法，其特征在于，所述的电化学发光检测装置是使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测，固定正丁基二乙醇胺的浓度为 1 mmol/L，被检测物吡啶钌浓度为 1 mmol/L，溶于 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中，以金电极为工作电极，施加 1.5 V 的阶跃电位，同时施加发光检测电压 500V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测。

5. 根据权利要求 1 所述的电化学发光检测方法，其特征在于，所述的电化学发光检测装置是使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测。固定正丁基二乙醇胺浓度为 25 mmol/L，被检测物吡啶钌浓度为 1 μ mol/L，缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中，以金电极为工作电极，电位从 0 扫到 +1.5 V，速度是 0.1 V/s，同时施加发光检测电压 700V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测。

6. 根据权利要求 1 所述的电化学发光检测方法，其特征在于，所述的电化学发光检测装置是使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测，固定正丁基二乙醇胺浓度为 50 mmol/L，被检测物吡啶钌浓度为 1 μ mol/L，缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中，以金电极为工作电极，施加 1.35 V 的阶跃电位，同时施加发光检测电压 700V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测。

7. 根据权利要求 1 所述的电化学发光检测方法，其特征在于，所述的电化

学发光检测装置是使用MPI-A型毛细管电泳电化学发光检测仪检测，固定正丁基二乙醇胺浓度为10mM，吡啶钼浓度为1 μ M, 缓冲溶液为pH 7.5的0.1 M磷酸盐缓冲溶液中, 以金电极为工作电极，施加1.5 V的阶跃电位，同时施加发光检测电压 800V，检测吡啶钼发光信号，完成电化学发光检测。

一种电化学发光检测的方法

技术领域

本发明涉及一种电化学发光检测的方法。

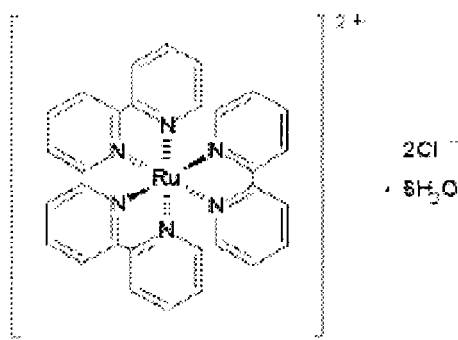
背景技术

吡啶钌电化学发光分析是新一代标记分析技术。现有技术是基于高浓度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的。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、三丙胺反应较慢，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浓度高达100 mmol/L 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。参考文献（*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 421-424）比较了三丙胺和一系列胺的电化学发光强度，发现二正丁基乙醇胺与吡啶钌的电化学发光强度远大于三丙胺与吡啶钌的电化学发光强度，而且二正丁基乙醇胺还具有环境友好、溶解度好、使用浓度低、检测吡啶钌浓度的线性范围宽等优点。但是二正丁基乙醇胺与吡啶钌的电化学发光强度不是最强的，仍然需要寻找与吡啶钌电化学发光强度更强的共反应物。

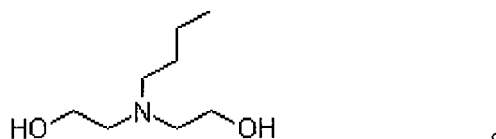
发明内容

本发明的目的是提供一种电化学发光检测的方法。其应用于电化学发光标记分析。

一种电化学发光检测方法,适用于所有的电化学发光检测装置,其特征在于,所述的电化学发光检测装置包括光学仪器和电化学仪器两大部分,光学仪器是化学发光强度测定仪,电化学仪器是应用 CII 系列电化学分析仪;电化学发光的发光体系是以吡啶钌为发光物质,同时吡啶钌也是被检测物,正丁基二乙醇胺为共反应物的吡啶钌/正丁基二乙醇胺发光体系,把吡啶钌和正丁基二乙醇胺在缓冲溶液中混合,用电化学方法激发发光进行分析;所述的吡啶钌的使用浓度范围为 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \text{ mmol/L}$, 其结构式为:



所述的正丁基二乙醇胺的使用浓度范围为 $0.05 \sim 50 \text{ mmol/L}$; 所述的缓冲溶液为 pH 7~9 的磷酸盐缓冲溶液, 所述的正丁基二乙醇胺的结构式如下:



有益效果: 本发明提供了一种电化学发光检测的方法,应用于电化学发光标记分析。正丁基二乙醇胺与吡啶钌的电化学发光效率高,所使用的共反应物正丁基二乙醇胺浓度可以很低。当吡啶钌浓度是 $1 \mu\text{mol/L}$ 且正丁基二乙醇胺的浓度为 25 mmol/L 的情况下,相同条件下,在金电极上吡啶钌/正丁基二乙醇胺发光体系比文献中报道的吡啶钌/二正丁基乙醇胺发光体系的电化学发光强度强约 1.3 倍 (如图 3)。

附图说明

附图1是利用吡啶钌/正丁基二乙醇胺体系电化学发光测定吡啶钌含量的示意图。横坐标是Log吡啶钌的浓度 ($\text{Log}(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{mmol/L})$), 吡啶钌的浓度单位为mmol/L; 纵坐标是Log(吡啶钌/正丁基二乙醇胺体系电化学发光强度/a. u.) ($\text{Log}(I_{\text{ECL}}/\text{a. u.})$)。

附图2是正丁基二乙醇胺的浓度对吡啶钌/正丁基二乙醇胺体系电化学发光影响的示意图。横坐标是正丁基二乙醇胺的浓度, 浓度单位为mmol/L, 纵坐标是吡啶钌/正丁基二乙醇胺体系电化学发光强度 ($I_{\text{ECL}}/\text{a. u.}$)。

附图3是25 mmol/L正丁基二乙醇胺(英文缩写BDEA)和25mmol/L二正丁基乙醇胺(英文缩写DBAE)分别与1 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶钌在相同条件下发生电化学反应的发光强度比较图。

具体实施方式

实施例 1: 使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测。固定正丁基二乙醇胺浓度为 0.05 mmol/L, 被检测物吡啶钌浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$, 缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐, 以金电极为工作电极, 施加 1.5 V 的阶跃电位, 同时施加发光检测电压 800V, 检测吡啶钌发光信号, 完成电化学发光检测, 得到的发光信号平均强度为 22.33。

实施例 2: 使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测。固定正丁基二乙醇胺浓度为 15 mmol/L, 缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐, 加入 4.0×10^{-10} mol/L 的被检测物吡啶钌, 以金电极为工作电极, 施加 1.35 V 的阶跃电位, 同时施加发光检测电压 700V, 检测吡啶钌发光信号, 完成电化学发光检测, 得到吡啶钌发光信号的平均强度为 68。

实施例 3: 使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测。固定正丁基

二乙醇胺的浓度为 1 mmol/L，被检测物吡啶钌浓度为 1 mmol/L，溶于 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中，以金电极为工作电极，施加 1.5 V 的阶跃电位，同时施加发光检测电压 500V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测，得到的发光信号平均强度为 6751。

实施例 4：使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测。固定正丁基二乙醇胺浓度为 25 mmol/L，被检测物吡啶钌浓度为 1 μ mol/L，缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中，以金电极为工作电极，电位从 0 扫到 +1.5 V，速度是 0.1 V/s，同时施加发光检测电压 700V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测，得到的发光信号平均强度为 3123.33。

实施例 5：使用电化学工作站和 BPCL 微弱发光测量仪检测。固定正丁基二乙醇胺浓度为 50 mmol/L，被检测物吡啶钌浓度为 1 μ mol/L，缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中，以金电极为工作电极，施加 1.35 V 的阶跃电位，同时施加发光检测电压 700V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测，得到的发光信号平均强度为 5204。

实施例 6：使用 MPI-A 型毛细管电泳电化学发光检测仪检测。固定正丁基二乙醇胺浓度为 10mM，被检测物吡啶钌浓度为 1 μ M，缓冲溶液为 pH 7.5 的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液中，以金电极为工作电极，施加 1.5 V 的阶跃电位，同时施加适当发光检测电压 800V，检测吡啶钌发光信号，完成电化学发光检测，得到的发光信号平均强度为 8820.67。

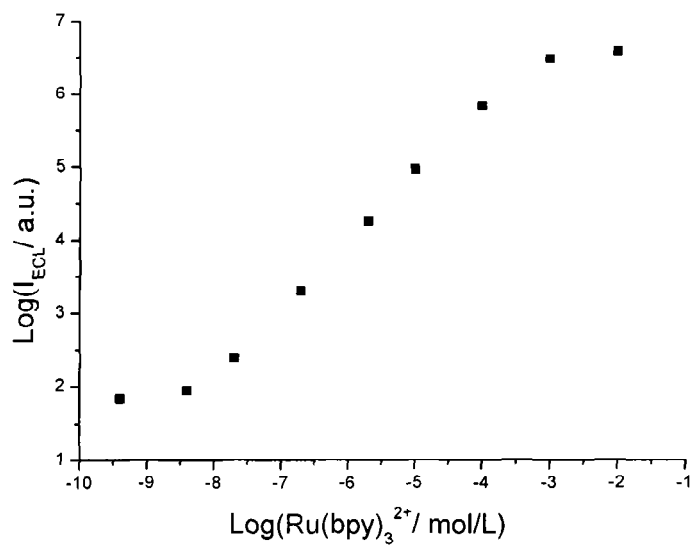


图 1

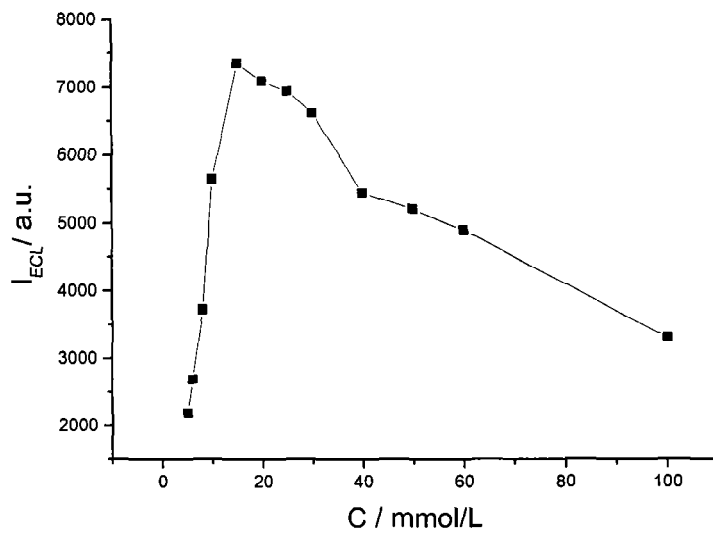


图 2

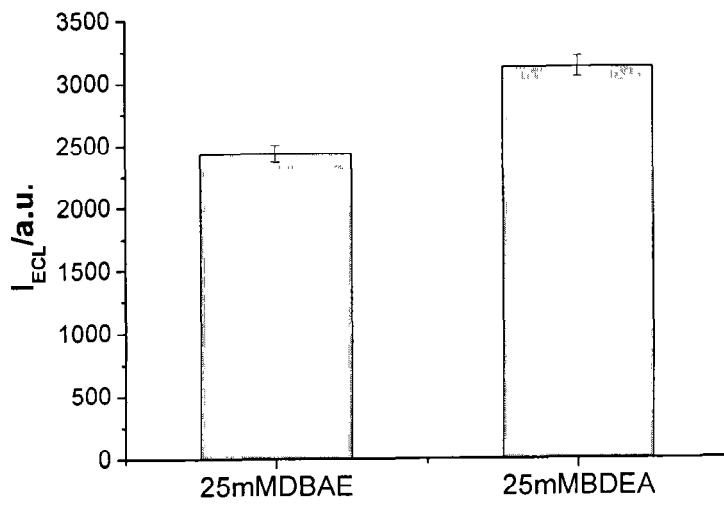


图 3