



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107796798 A

(43)申请公布日 2018.03.13

(21)申请号 201710969672.7

(22)申请日 2017.10.18

(71)申请人 福建医科大学

地址 350004 福建省福州市台江区交通路
88号

(72)发明人 邓豪华 陈伟 李柯林 彭花萍
庄琼琼

(74)专利代理机构 福州智理专利代理有限公司
35208

代理人 王义星

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

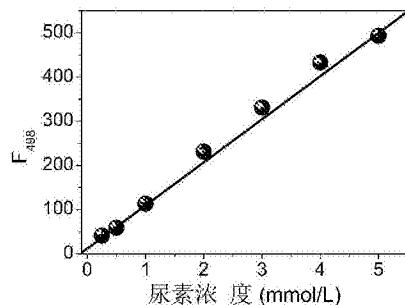
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法

(57)摘要

本发明公开一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法，其特征是利用脲酶特异性催化尿素生成氨和二氧化碳，新生成的氨能够刻蚀铜纳米粒子生成铜纳米团簇荧光材料，从而表现出荧光发射光谱特征的变化，可以直接用于尿素的含量检测。在0.25~5mmol/L范围内 F_{498} 与尿素浓度呈线性关系，检测限为0.01mmol/L。本发明选择性高，重现性好，能够作为分析方法应用于环境及生命科学体系中尿素的测定。



1. 一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法,其特征是利用脲酶特异性催化尿素生成氨和二氧化碳的体系,新生成的氨能够刻蚀铜纳米粒子生成铜纳米团簇荧光材料,从而表现出荧光发射光谱特征的变化,能直接用于尿素的含量检测;测定步骤如下:将脲酶溶液和尿素测定液按体积比为2:5混合,37°C反应30分钟后,加入氢氧化钠溶液和铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟,而后测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498})以判断尿素的浓度。

2. 根据权利要求1所述的一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法,其特征是所使用的脲酶浓度为2.5 U/mL,脲酶溶液和尿素测定液的总体积为1.05 mL;所使用的氢氧化钠浓度为30 mmol/L,体积为0.15 mL;所使用的铜纳米粒子溶液的体积为0.3 mL。

3. 根据权利要求1所述的一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法,其特征是所使用的铜纳米粒子溶液由以下方法制备:将1 mL浓度为0.1 mol/L的硝酸铜溶液在搅拌条件下逐滴加入到10 mL浓度为0.1 mol/L的抗坏血酸溶液中,室温搅拌反应1小时后再在室温条件下继续孵育12小时,即得到铜纳米粒子溶液。

4. 根据权利要求1所述的一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法,其特征是利用氨刻蚀产生的铜纳米团簇在498 nm处的发射光强度值(F_{498})以判断尿素含量,所使用的激发波长为385 nm。

5. 根据权利要求3或4所述的一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法,其特征是将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL含不同浓度尿素的磷酸盐缓冲液中,所述的磷酸盐缓冲液浓度为10 mmol/L、pH=7.40,摇匀后37°C温浴30分钟,反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟,测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498}),在尿素浓度为0.25~5 mmol/L的范围内 F_{498} 与尿素浓度呈线性关系,检测限为0.01mmol/L。

6. 一种基于氨刻蚀反应的血清尿素荧光测定方法,包括如下步骤:取新鲜人血清,用磷酸盐缓冲液稀释4倍,所述的磷酸盐缓冲液浓度为10 mmol/L、pH=7.40,将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL稀释的人血清溶液中,摇匀后37°C温浴30分钟,反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟,测定反应液在498 nm处的发射光强度值 F_{498} ,通过标准曲线进行定量,获得血样中的尿素含量。

7. 根据权利要求6所述的一种基于氨刻蚀反应的血清尿素荧光测定方法,其特征是所使用的铜纳米粒子溶液由以下方法制备:将1 mL浓度为0.1 mol/L的硝酸铜溶液在搅拌条件下逐滴加入到10 mL浓度为0.1 mol/L的抗坏血酸溶液中,室温搅拌反应1小时后再在室温条件下继续孵育12小时,即得到铜纳米粒子溶液。

基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法，属于分析化学及纳米技术领域。

背景技术

[0002] 尿素是人体蛋白质代谢的终产物，由肝脏产生，经血液运输至肾脏以尿液形式排出。尿素的生成量取决于蛋白质的摄入量、组织蛋白质的分解代谢以及肝功能状况。尿素是临床及生物化学一个重要的目标分析物，它是评价尿毒症毒素水平、肾脏及肝脏细胞功能的重要标志。目前，尿素的测定方法包括：氨电极法、脲酶-波氏法，脲酶-谷氨酸脱氢酶偶联法，脲酶-亮氨酸脱氢酶偶联法等。

[0003] 近年来，荧光金属纳米团簇作为一种新型的荧光纳米材料备受关注。金属纳米团簇是指在一定的分子层保护作用下，由几个到几百个金属原子构成的分子级聚集体，其直径一般小于2 nm，接近于电子的费米波长（约0.7 nm）。由于其独特的物理、电学和光学性质，金属纳米团簇在单分子光电、催化、生物成像和传感器等领域显示出广泛的应用前景。目前，大多数的研究主要集中于金、银及其合金纳米团簇。众所周知，与金和银相比，铜在地壳中的含量更为丰富且价格低廉，因此被广泛应用于人类日常生活中。然而，关于铜纳米团簇的研究还相对较少，这主要是由于其本身稳定性差及发光强度低所造成的。另外，目前大多数基于铜纳米团簇荧光材料分析方法的构建均是利用分析物与已合成出的铜纳米团簇之间的相互作用而设计，而基于铜纳米团簇生成过程的分析方法的报道还十分稀少。

[0004] 本发明利用脲酶-尿素催化反应体系，通过偶联氨刻蚀铜纳米粒子生成铜纳米团簇荧光材料这一过程，构建了一种荧光“turn-on”型测定尿素的新方法。本方法快速、简便、价廉，并且适合复杂生命样品中尿素含量的测定。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法。

[0006] 为了实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法，其特征是利用脲酶特异性催化尿素生成氨和二氧化碳的体系，新生成的氨能够刻蚀铜纳米粒子生成铜纳米团簇荧光材料，从而表现出荧光发射光谱特征的变化，能直接用于尿素的含量检测；测定步骤如下：将脲酶溶液和尿素测定液按体积比为2:5混合，37°C反应30分钟后，加入氢氧化钠溶液和铜纳米粒子溶液，混合均匀后室温孵育15分钟，而后测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498})以判断尿素的浓度。

[0007] 所使用的脲酶浓度为2.5 U/mL，脲酶溶液和尿素测定液的总体积为1.05 mL；所使用的氢氧化钠浓度为30 mmol/L，体积为0.15 mL；所使用的铜纳米粒子溶液的体积为0.3 mL。

[0008] 所使用的铜纳米粒子溶液由以下方法制备：将1 mL浓度为0.1 mol/L的硝酸铜溶

液在搅拌条件下逐滴加入到10 mL浓度为0.1 mol/L的抗坏血酸溶液中,室温搅拌反应1小时后再在室温条件下继续孵育12小时,即得到铜纳米粒子溶液。

[0009] 所述的一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法,其特征是利用氨刻蚀产生的铜纳米团簇在498 nm处的发射光强度值(F_{498})以判断尿素含量,所使用的激发波长为385 nm。

[0010] 所述的一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法,其特征是将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL含不同浓度尿素的磷酸盐缓冲液中,所述的磷酸盐缓冲液浓度为10 mmol/L、pH=7.40,摇匀后37°C温浴30分钟,反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟,测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498}),在尿素浓度为0.25~5 mmol/L的范围内 F_{498} 与尿素浓度呈线性关系,检测限为0.01mmol/L。

[0011] 本发明所述的一种基于氨刻蚀反应的血清尿素荧光测定方法,包括如下步骤:取新鲜人血清,用磷酸盐缓冲液稀释4倍,所述的磷酸盐缓冲液浓度为10 mmol/L、pH=7.40,将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL稀释的人血清溶液中,摇匀后37°C温浴30分钟,反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟,测定反应液在498 nm处的发射光强度值 F_{498} ,通过标准曲线进行定量,获得血样中的尿素含量。

[0012] 所使用的铜纳米粒子溶液由以下方法制备:将1 mL浓度为0.1 mol/L的硝酸铜溶液在搅拌条件下逐滴加入到10 mL浓度为0.1 mol/L的抗坏血酸溶液中,室温搅拌反应1小时后再在室温条件下继续孵育12小时,即得到铜纳米粒子溶液。

[0013] 本发明具体采用以下技术方案:

(一) 铜纳米粒子的制备

将1 mL浓度为0.1 mol/L的硝酸铜溶液在搅拌条件下逐滴加入到10 mL浓度为0.1 mol/L的抗坏血酸溶液中,室温搅拌反应1小时后再在室温条件下继续孵育12小时,即得到铜纳米粒子。

[0014] (二) 尿素的测定:

将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL含不同浓度尿素的磷酸盐缓冲液中(10 mmol/L, pH=7.40),摇匀后37°C温浴30分钟。反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL步骤(一)制备的铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟。最后,以385 nm为激发波长,测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498}),通过标准曲线进行尿素的测定。

[0015] 本发明的优点:

(1) 本发明基于脲酶特异性催化尿素生成氨和二氧化碳,新生成的氨能够刻蚀铜纳米粒子生成铜纳米团簇荧光材料,从而表现出荧光发射光谱特征的变化,可以直接用于尿素的含量检测。

[0016] (2) 本发明所使用的铜纳米粒子直接由抗坏血酸还原硝酸铜得到,无需进行进一步的修饰,制备过程简单快速。

[0017] (3) 本发明对尿素的检测是一个荧光“turn-on”过程,背景信号低。

[0018] (4) 本发明对样品的处理要求低,抗干扰性好,可用于人血清中尿素含量的测定。

附图说明

[0019] 图1为加入氨水前后,铜纳米粒子溶液的荧光发射光谱图,图中:A——铜纳米粒子溶液对照组;B——铜纳米粒子溶液 + 氨水。

[0020] 图2为铜纳米粒子溶液与脲酶催化反应液孵育后在紫外灯下的外观图,图中:A——铜纳米粒子溶液;B——铜纳米粒子溶液 + 尿素;C——铜纳米粒子溶液 + 脲酶;D——铜纳米粒子溶液 + 脲酶 + 尿素。

[0021] 图3为铜纳米粒子溶液与脲酶催化反应液孵育后的荧光发射光谱图,图中:A——铜纳米粒子溶液;B——铜纳米粒子溶液 + 尿素;C——铜纳米粒子溶液 + 脲酶;D——铜纳米粒子溶液 + 脲酶 + 尿素。

[0022] 图4为铜纳米粒子溶液与脲酶催化反应液(不同浓度尿素)孵育后的荧光发射光谱图。

[0023] 图5为铜纳米粒子溶液的发射光强度值(F_{498})与尿素浓度之间的线性关系图。

[0024] 图6为铜纳米粒子溶液与不同干扰物作用后的发射光强度(F_{498})图。

具体实施方式

[0025] 实例1:

铜纳米粒子的制备过程如下:将1 mL浓度为0.1 mol/L的硝酸铜溶液在搅拌条件下逐滴加入到10 mL浓度为0.1 mol/L的抗坏血酸溶液中,室温搅拌反应1小时后再在室温条件下继续孵育12小时,即得到铜纳米粒子溶液。

[0026] 实例2:

0.2 毫升实例1所制得的铜纳米粒子溶液与0.8 mL浓度为30 mmol/L的氨水均匀混合后,在室温下反应15 分钟。设置一组无氨水的空白对照。反应结束后测定溶液的荧光发射光谱图(激发波长为385 nm)。结果表明,加入氨水后,铜纳米粒子立即发生刻蚀反应,生成铜纳米团簇荧光材料,反应后溶液的荧光明显增强(见图1),图1中:A——铜纳米粒子溶液对照组;B——铜纳米粒子溶液 + 氨水。

[0027] 实例3:

将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL含10 mmol/L尿素的磷酸盐缓冲液中(10 mmol/L, pH=7.40),摇匀后37°C温浴30分钟。反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL实例1所得的铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟。最后,以385 nm为激发波长,测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498}),通过标准曲线进行尿素的测定。设置对照组:A——铜纳米粒子溶液;B——铜纳米粒子溶液 + 尿素;C——铜纳米粒子溶液 + 脲酶;D——铜纳米粒子溶液 + 脲酶 + 尿素。反应结束后,在紫外灯下观察,对照组无明显荧光(图2中的A,B和C),而实验组的反应液产生强烈的绿色荧光(图2中的D)。图3为对照组和实验组溶液的荧光发射光谱图,图3中:A——铜纳米粒子溶液;B——铜纳米粒子溶液 + 尿素;C——铜纳米粒子溶液 + 脲酶;D——铜纳米粒子溶液 + 脲酶 + 尿素。

[0028] 实例4:

将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL含不同浓度尿素的磷酸盐缓冲液

中(10 mmol/L, pH=7.40),摇匀后37°C温浴30分钟。反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL实例1所得的铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟。最后,以385 nm为激发波长,测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498}),通过标准曲线进行尿素的测定。由图可知,随着尿素浓度的逐渐增大,反应液的发射光谱逐渐增大(见图4)。如图5所示,在尿素浓度为0.25~5 mmol/L的范围内发射光强度值 F_{498} 与尿素浓度呈线性关系,检测限为0.01 mmol/L。

[0029] 实例5:

将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL含3 mmol/L尿素的磷酸盐缓冲液中(10 mmol/L, pH=7.40),摇匀后37°C温浴30分钟。反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL实例1所得的铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟。最后,以385 nm为激发波长,测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498})。重复上述实验6次,得相对标准偏差(RSD)为3.8%,表明本方法重现性良好。

[0030] 实例6:

将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL含不同干扰物的磷酸盐缓冲液中(10 mmol/L, pH=7.40),摇匀后37°C温浴30分钟。反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL实例1所得的铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟。最后,以385 nm为激发波长,测定反应液在498 nm处的发射光强度值(F_{498})。如图6所示,0~18依次为空白、尿素、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、H₂PO₄⁻、HCO₃⁻、葡萄糖、乳糖、肌氨酸、肌酐、肌酸、L-苯丙氨酸、L-亮氨酸、L-色氨酸、L-缬氨酸、L-甘氨酸(其中尿素浓度为10 mmol/L,其他干扰物浓度均为100 mmol/L),结果表明本方法抗干扰能力强。

[0031] 实例7:

取新鲜人血清,用磷酸盐缓冲液(10 mmol/L, pH=7.40)稀释4倍。将0.3 mL浓度为2.5 U/mL的脲酶溶液加入到0.75 mL稀释的人血清溶液中,摇匀后37°C温浴30分钟。反应结束后,加入0.15 mL浓度为30 mmol/L的氢氧化钠和0.3 mL实例1所得的铜纳米粒子溶液,混合均匀后室温孵育15分钟,测定反应液在498 nm处的发射光强度值 F_{498} 。通过标准曲线进行定量,获得血样中的尿素含量。与标准加入法测定结果进行比较,结果表明直接测定法与标准加入法无明显差异(表1),相对误差均小于5%;

表1

样品	直接测定法		相对误差 (%)
	(mmol/L)	(mmol/L)	
1	12.9	12.5	3.2
2	17.7	18.6	-4.8
3	14.1	14.8	-4.7
4	14.7	15.3	-3.9
5	13.7	14.1	-2.8

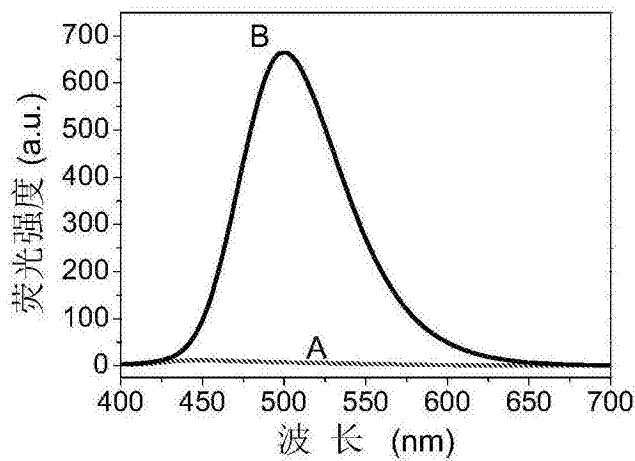


图1

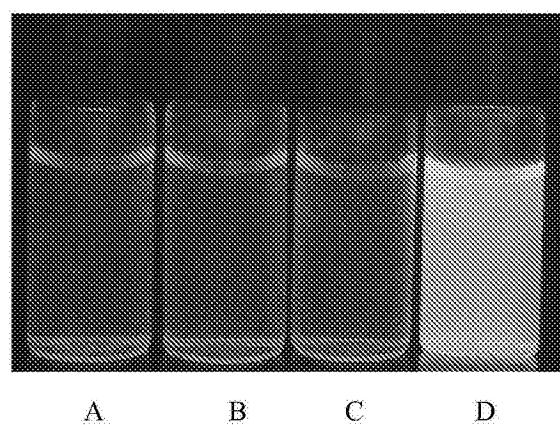


图2

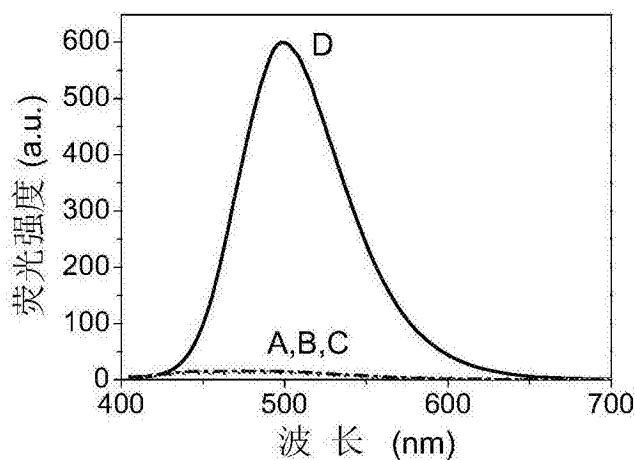


图3

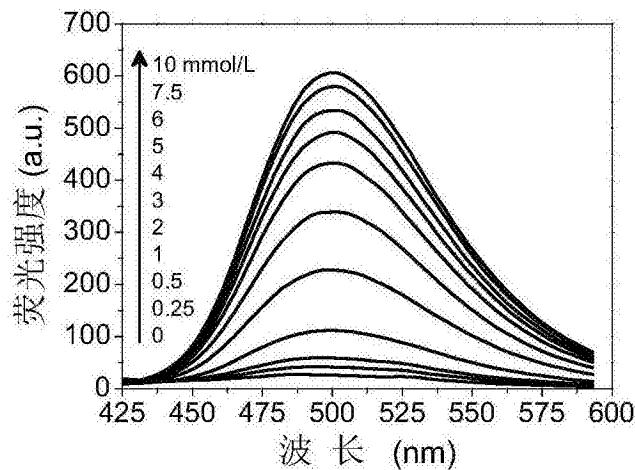


图4

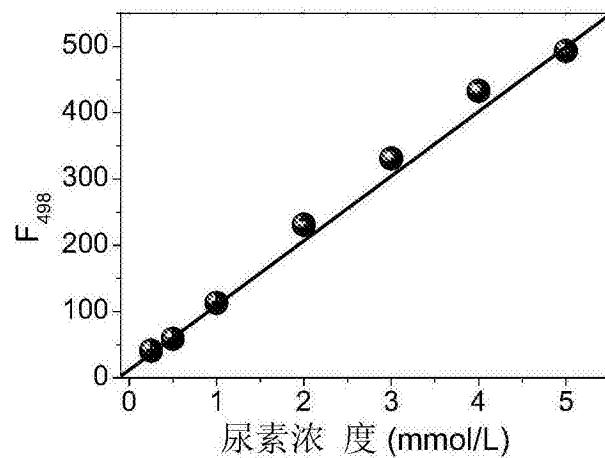


图5

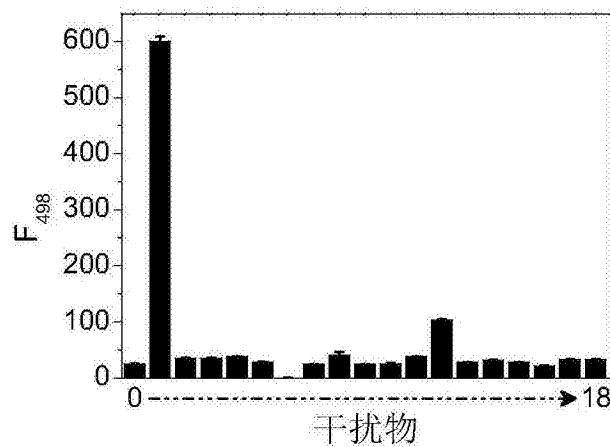


图6

专利名称(译)	基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法		
公开(公告)号	CN107796798A	公开(公告)日	2018-03-13
申请号	CN201710969672.7	申请日	2017-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
[标]发明人	邓豪华 陈伟 李柯林 彭花萍 庄琼琼		
发明人	邓豪华 陈伟 李柯林 彭花萍 庄琼琼		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/5308		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开一种基于氨刻蚀反应的尿素荧光测定方法，其特征是利用脲酶特异性催化尿素生成氨和二氧化碳，新生成的氨能够刻蚀铜纳米粒子生成铜纳米团簇荧光材料，从而表现出荧光发射光谱特征的变化，可以直接用于尿素的含量检测。在0.25~5mmol/L范围内F498与尿素浓度呈线性关系，检测限为0.01mmol/L。本发明选择性高，重现性好，能够作为分析方法应用于环境及生命科学体系中尿素的测定。

