



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103115919 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201210579953. 9

(22) 申请日 2012. 12. 27

(71) 申请人 中国科学院过程工程研究所
地址 100190 北京市海淀区中关村北二条 1
号

(72) 发明人 张松平 姬晓元 苏志国 王占丽
王平

(51) Int. Cl.

G01N 21/78(2006. 01)

G01N 21/47(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

一种葡萄糖检测试纸

(57) 摘要

本发明提供了一种用于葡萄糖测定的试纸和检测方法,利用同轴共纺静电纺丝技术,将葡萄糖氧化酶、过氧化物酶原位包埋在中空的聚合物纳米纤维的腔室内,显色剂邻-联二茴香胺均匀分布在中空纳米纤维的壳层壁上,从而得到一种宏观上具有无纺布膜形态的葡萄糖检测试纸。当向试纸上滴加葡萄糖溶液时,葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖并产生过氧化氢,在过氧化物酶的催化作用下将无色的邻-联二茴香胺氧化成为有色的产物,从而使试纸显色,通过测定试纸颜色变化进行葡萄糖的定量检测。基于中空纳米纤维的葡萄糖检测试剂具有制备简单、酶用量少、检测操作简便、储存稳定性高的突出优点,在准确快速葡萄糖测定方面具有应用前景。

1. 一种用于葡萄糖检测的试纸,其特征在于制备步骤包括:

1) 将一定质量的葡萄糖氧化酶、过氧化物酶溶解于缓冲液中得到组合试剂 A 溶液;将该组合试剂 A 溶液与甘油充分混合,其中溶液与甘油的体积比为 10:90—30:70;将该混合液作为同轴共纺静电纺丝的内相溶液,加入到微量进样器中;

2) 将一定质量的邻-联二茴香胺溶于有机溶剂,并将一定质量高分子聚合物溶于此有机溶剂中充分溶解,得到的透明溶液作为同轴共纺静电纺丝的外相电纺液,加入到另一微量进样器中。其中外相电纺液是溶于 N,N-甲基乙酰胺(内含 5-10mg/ml 的邻-联二茴香胺)的重量百分比为 10~30%的聚氨酯溶液、溶于 N,N-二甲基乙酰胺(内含 5-10mg/ml 的邻-联二茴香胺)的重量百分比为 10~30%的聚偏氟乙烯溶液、溶于氯仿(内含 5-10mg/ml 的邻-联二茴香胺)的重量百分比为 10~30%的聚乳酸溶液或溶于 N,N-二甲基乙酰胺(内含 5-10mg/ml 的邻-联二茴香胺)的苯乙烯马来酸酐共聚物溶液;

3) 将内、外相电纺液分别通过管线连接至同轴电纺喷丝头的进液口,将喷丝头的出液口与高压电源的正极连接,用铝箔纸或不锈钢网连接至高压电源的负极作为接收板;

4) 利用两台注射泵分别控制内、外相电纺液的流速,进行同轴静电纺丝,在接收板上得到具有中空结构的聚合物纳米纤维,其中用于葡萄糖检测的组合试剂 A 被原位包埋在这种中空纳米纤维的空腔中,而显色剂邻-联二茴香胺则均匀分布在中空纤维的壳层中,从而制备出用于葡萄糖检测的试纸。

2. 如权利要求 1 所述的用于葡萄糖检测的试纸,其特征在于:上述步骤 1) 中组合试剂 A 溶液各组分含量如下:

葡萄糖氧化酶:0.1-2.0g/L

过氧化物酶:0.1-2.0g/L

pH 7.0 的磷酸盐缓冲液:50mM。

3. 如权利要求 1 所述的用于葡萄糖检测的试纸,其特征在于所制备出的试纸具有无纺布膜的形态,原位包埋在中空纳米纤维中的葡萄糖氧化酶、过氧化物酶在中空纳米纤维的空腔中,保持游离分散的状态。

4. 利用权利要求 1 所述的葡萄糖检测试纸进行葡萄糖浓度的检测的方法,其特征在于:将上述步骤 4) 中所制备出的用于葡萄糖检测的试纸用打孔器均匀裁剪成直径为 0.5cm 左右大小的膜片;配制一系列已知浓度的葡萄糖溶液,用移液器取 10-30 μ l 葡萄糖溶液滴到裁剪好的膜片上,30s 左右后观察膜片颜色变化,或用光密度仪读取膜片在 440nm 处的反射率,绘制已知葡萄糖浓度和反射率之间的工作曲线,或者将显色后的膜片作为标准比色卡;在裁剪好的膜片上滴加 10-30 μ l 未知浓度的葡萄糖溶液,30s 左右后观察膜片颜色变化,或用光密度仪读取膜片在 440nm 处的反射率,即可根据工作曲线计算样品中的葡萄糖浓度,也可以通过和标准比色卡对照,粗略估计样品中葡萄糖的浓度。

一种葡萄糖检测试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于定量检测葡萄糖含量的检测试纸,包括用于葡萄糖检测的测定试纸及利用这种试纸进行检测的方法,特别涉及一种基于中空结构纳米纤维的固定化多酶体系的葡萄糖检测试纸。

背景技术

[0002] 糖尿病是世界性的多发病和常见病,随着人们生活水平的提高和老年人口的增多,其发病率呈明显上升趋势。我国发病率已达到 2.5-3%,十分接近欧美发达国家的 2-5%。全世界约有两亿多病人,已成为全球性的卫生保健问题,并严重地威胁着人类的健康,成为仅次于心血管病、癌症的第三大危险疾病。因而,糖尿病的诊断和治疗不仅是我国,也是全世界医学界面临的重大课题。

[0003] 目前,检测葡萄糖含量最主要及简便的方法是利用血糖仪检测,血糖仪的核心是一种适用于患者自我检测血糖的试纸。患者可以通过一滴毛细血管全血作为样本滴在血糖试纸上,然后利用血糖仪根据不同的试纸原理进行血糖含量测定。目前市场上血糖仪检测的基本原理是一种利用葡萄糖氧化酶作为敏感元件来快速、准确、方便的测量葡萄糖含量的生物传感器。葡萄糖传感器检测装置基于其使用变换器的物理化学原理可分为电化学传感器、压电传感器、热电传感器、声学传感器、和光学传感器。其中,在血糖仪中应用最为广泛的是电化学传感器以及光学传感器,电化学传感器试纸包括试剂混合物以及一个或多个电极,其中该试剂混合物包含至少一种电子转移剂即电子媒介物和分析物特异性生物催化蛋白质如具体的酶。此类传感器依靠电子媒介物和电极表面之间电子的转移,并通过测量电化学氧化还原反应发挥作用。电催化传感器虽然具有长期稳定性,但由于它们对设备要求高、装置复杂、对分析物选择性较差而存在很大的问题。光学传感器试纸主要包括试剂混合物(分析物特异性生物催化蛋白质如具体的酶和显色试剂),相对电化学传感器来说比较简单,无需复杂的电极之间电子的转移,仅仅通过特殊显色剂的显色来实现对葡萄糖浓度的检测。

[0004] 普通的葡萄糖检测试纸中的酶都是通过将酶溶液吸附或直接喷洒酶粉于空白试纸上将酶分子附着于试纸表面,但是此种方法载酶率低、操作繁琐造成了大量的浪费。为了保证使用有效期内的酶活达到检测灵敏度的要求,往往需要大量增加试剂中昂贵的酶的添加量,因此在一定程度上增加了葡萄糖检测成本。即使这样附着过量的酶,以上两种试纸的储存条件还是比较苛刻,通常需要干燥、避光、低温和密封保存。主要是因为试纸中的特异性的酶(葡萄糖氧化酶和过氧化物酶)稳定性差,易失活和一些显色试剂见光易分解导致的。[CN202414431U] 提出了一种新型的血糖试纸的包装来提高血糖试纸的稳定性,这种包装包括上设多个泡罩腔的载体,每个所述泡罩腔内均匀独立的储存有血糖试纸,泡罩腔上方开口,开口位置封有铝箔。这种实用新型设置了多个泡罩腔,则生产时可将每片血糖试纸独立的放进各个泡罩腔中,然后附上铝箔;使用时,可以单独的破坏泡罩腔上对应未知的铝箔,单独的取出一片血糖试纸,不影响其他血糖试纸的储存环境。但是此方法制备操作比较

复杂,而且又进一步的增加了血糖试纸的额外成本。

[0005] 各种专利都致力于提供一种更加方便快捷而且成本低的检测方法,但是还是没有很好的解决这一问题,势必使检测的成本维持在很高的水平上。

[0006] 目前基于电化学葡萄糖传感器的专利主要由以下几种:

[0007] [CN 101487814A] 涉及了一种包含物为电子媒介体的纳米金葡萄糖氧化酶传感器的制备方法。该发明将二茂铁与巯基环糊精在有机溶剂中搅拌反应,加入乙醇使反应物沉淀分离,无水乙醇清洗沉淀,干燥,得黄色包含物电子媒介固体;将 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 DMF 中,与另一溶有 NaBH_4 和前述溶液迅速混合,搅拌并反应,离心沉淀,固体产物再用乙醇:水混合溶剂洗涤,真空干燥;将固体产物溶于二次水中,取葡萄糖氧化酶溶于二次水中形成酶溶液;将两溶液混合,将混合液滴在铂圆盘电极表面,在戊二醛的饱和蒸汽中,得到包含物为电子媒介体的纳米金葡萄糖氧化酶传感器。本发明虽然解决了第一第二代酶传感器存在的某些缺陷,但是制备过程过于繁琐,实用性过低。

[0008] [CN 102621207A] 涉及了一种葡萄糖传感器,该发明的葡萄糖传感器的工作电极表面被葡萄糖氧化酶与三角银纳米颗粒复合膜所覆盖。通过将三角银纳米颗粒用于葡萄糖传感器,有效地提高了葡萄糖检测器的灵敏度,使检测限达到了 $3\text{--}20 \mu\text{mol/L}$ 。

[0009] [CN 101530327A] 公布了一种皮下组织实时监测用针状电流式测定葡萄糖传感器及其制作方法,包括一个针状式参考电极和至少一个针状式工作电极,工作电极包括导电层和酶膜层,其特征在于:所述工作电极还包括高分子材料内膜层和高分子材料控制扩散层,导电层、高分子材料内膜层,酶膜层及高分子材料控制扩散层由里至外依次覆盖而成。按照本发明的制作方法,葡萄糖传感器稳定性好、灵敏性高、输出电流与葡萄糖浓度的线性范围广泛、响应时间短可连续实时监测,酶结合的牢固性、稳定性好,灵敏度、选择性和重现性高。

[0010] [CN 202355415U] 实用新型专利涉及一种可以监测人体体力活动的物联网血糖仪器。包括:带面板的壳体,面板上设有显示单元的液晶显示屏和操控单元的多个操控键,壳体中设有运动能量消耗检测单元,壳体中还设有血糖检测单元,血糖检测单元在所述的壳体上设有血糖试纸检测位,血糖检测单元与有线或无线通讯单元、显示单元、操控单元电连接;操控单元设有能耗-血糖检测转换开关,能耗-血糖检测转换开关在所述面板上设有能耗-血糖检测转换操作键。本实用新型具有两个监测单元,用于监测人体体力活动所消耗的能量消耗监测单元和监测人体血糖的监测单元。本实用新型在能耗监测的同时,还可以监测血糖,并将两方面的监测所获得的数据通过网络迅速的传输出去。

[0011] 目前基于光学葡萄糖传感器的专利主要由以下几种:

[0012] [CN 101947115A] 提供了一种基于光纤衰减全反射的植入式人体血糖浓度连续监测系统,由双光路构成,有光源、衰减器、分光镜、光纤耦合装置、光纤 ATR 传感器、测量光探测器、参考光探测器、数据采集系统以及计算机,光源经过衰减器衰减后,经分光镜分为由测量光和参考光构成的两条光路,其中的一条光路是,测量光采用光纤耦合装置,通过耦合方法耦合进入光纤 ATR 传感器,经光纤 ATR 传感器的透过光由测量光探测器接收;另一条光路是,参考光由参考光探测器直接接收;经测量光探测器和参考光探测器所接收的信号由数据采集系统同步采集,送往计算机进行分析处理并显示测量结果,计算机还与光源相连接。本发明采用在体直接测量方法,直接测量组织液中的葡萄糖浓度,避免了离体测量误

差。

[0013] [CN 102469962A] 提供一种从经时地测定而得的生物体的光学光谱和校准模型,以非侵入的方式经时地演算血糖值的血糖值推定装置。具备从多个校准模型或者校准模型制作用的多个数据组制作校准模型的校准模型制作机构。以如下方式构成:测定受检者的生物体光谱而设定基准光谱;求出在上述基准光谱测定时间以外的时间测定的测定光谱与上述基准光谱之差、即示差谱;根据上述示差谱的变化而变更上述演算中使用的校准模型。由此,能够进行血糖值的推定,尤其是在经时地监控时能够进行精度极高的推定。

[0014] 此外,还有很多专利及文献涉及到血糖仪。但大多是对血糖仪外观上的一些小的改变。

[0015] [CN 202421188U] 涉及了一种新型的血糖检测仪,包括:安装血糖仪原件的外壳、显示器、按钮和试纸口,显示器设置在外壳上部,按钮设置在外壳中部,试纸口设置在外壳下部,还包括卡口采血笔支架,支架设置在外壳上,此设计唯一的不同在于在血糖检测仪上安装固定采血笔支架,可以将采血笔固定在血糖检测仪上,使用携带方便。

[0016] [CN 202421126U] 提供了一种具有水电池的血糖仪,包括单片机,所述单片机的输入端分别连有输入电路和 A/D 转换电路,输出端连接有 LCD 显示单元,所述 A/D 转换电路的输入端连接有测量血糖浓度值的借口电路,所述单片机输入端还连接有水电池和测温电路。本实用新型的特点在于通过水电池获得提供血糖仪工作的能力,同时充分利用了绿色能源非常环保。

[0017] [301925966S]、[301642379S]、[301926004S]、[301925968S]、[301925636S]、[301925711S]、[301925740S]、[302065336S] 等分别都针对血糖仪的外观设计发表专利。

[0018] 为了在保证高的检测灵敏度的同时,降低检测试剂中酶的使用量、提高酶的稳定性,简化制作工艺,降低制作成本,本发明设计一种新的葡萄糖检测试纸,并提供利用这种试纸进行葡萄糖检测的方法。

发明内容

[0019] 为了达到上述目的,本发明致力于开发一种新的用于体外定量测定葡萄糖含量的检测技术,主要包括用于葡萄糖检测的测定试纸及利用这种试纸进行检测的方法。

[0020] 为了提高葡萄糖检测试剂的稳定性,并使检测步骤更加简化,本发明提供一种用于葡萄糖检测的检测试纸,以及利用此检测试纸的颜色变化进行葡萄糖检测的方法,其特征在于通过如下步骤制备出葡萄糖试纸,进行葡萄糖的分析检测:

[0021] 基于组合试剂 A 的葡萄糖检测试纸:

[0022] 1) 将一定质量的葡萄糖氧化酶、过氧化物酶溶解于水中得到组合试剂 A 溶液;将该组合试剂 A 溶液与甘油充分混合,其中溶液与甘油的体积比为 10:90—30:70;将该混合液作为同轴共纺静电纺丝的内相溶液,加入到微量进样器中;

[0023] 2) 将一定质量的邻-联二茴香胺溶于有机溶剂,并将一定质量高分子聚合物溶于此有机溶剂中充分溶解,得到的透明溶液作为同轴共纺静电纺丝的外相电纺液,加入到另一微量进样器中。其中外相电纺液是溶于 N,N-二甲基乙酰胺(内含 5-10mg/ml 的邻-联二茴香胺)的重量百分比为 10~30%的聚氨酯溶液、溶于 N,N-二甲基乙酰胺(内含 5-10mg/ml 的邻-联二茴香胺)的重量百分比为 10~30%的聚偏氟乙烯溶液、溶于氯仿(内含 5-10mg/

ml 的邻 - 联二茴香胺) 的重量百分比为 10 ~ 30% 的聚乳酸溶液或溶于 N, N- 二甲基乙酰胺 (内含 5-10mg/ml 的邻 - 联二茴香胺) 的苯乙烯马来酸酐共聚物溶液;

[0024] 3) 将内、外相电纺液分别通过管线连接至同轴电纺喷丝头的进液口, 将喷丝头的出液口与高压电源的正极连接, 用铝箔纸或不锈钢网连接至高压电源的负极作为接收板;

[0025] 4) 利用两台注射泵分别控制内、外相电纺液的流速, 进行同轴静电纺丝, 在接收板上得到具有中空结构的聚合物纳米纤维, 其中用于葡萄糖检测的组合试剂 A 被原位包埋在这种中空纳米纤维的空腔中, 而显色剂邻 - 联二茴香胺则均匀分布在中空纤维的壳层中, 从而制备出用于葡萄糖检测的试纸;

[0026] 5) 将上述步骤 4) 中所制备出的用于葡萄糖检测的试纸用打孔器均匀裁剪成直径为 0.5cm 左右大小的膜片; 配制一系列已知浓度的葡萄糖溶液, 用移液器取 10-30 μ l 葡萄糖溶液滴到裁剪好的膜片上, 30s 左右后观察膜片颜色变化, 或用光密度仪读取膜片在 440nm 处的反射率, 绘制已知葡萄糖浓度和反射率之间的工作曲线, 或者将显色后的膜片作为标准比色卡; 在裁剪好的膜片上滴加 10-30 μ l 未知浓度的葡萄糖溶液, 30s 左右后观察膜片颜色变化, 或用光密度仪读取膜片在 440nm 处的反射率, 即可根据工作曲线计算样品中的葡萄糖浓度, 也可以通过和标准比色卡对照, 粗略估计样品中葡萄糖的浓度。

[0027] 上述用于如权利要求 1 所述的用于葡萄糖检测的试纸, 其特征在于: 上述步骤 1) 中组合试剂 A 溶液各组分含量如下:

[0028] 葡萄糖氧化酶: 0.1-2.0g/L

[0029] 过氧化物酶: 0.1-2.0g/L

[0030] pH7.0 的磷酸盐缓冲液: 50mM

[0031] 该检测方法的原理如下: 其中葡萄糖氧化酶特异性地将葡萄糖氧化为葡萄糖酸, 并生成过氧化氢; 过氧化物酶利用过氧化氢, 将无色的邻 - 联二茴香胺氧化为红棕色的氧化型产物。如果反应发生在溶液体系中, 则可以通过检测溶液在 440nm 处吸光值的变化, 来检测反应速率。为了提高酶的稳定性, 并且使检测更加容易操作, 本发明着重于提供一种利用上述反应原理进行葡萄糖检测的试纸, 其特征在于所制备出的试纸具有无纺布膜的形态, 原位包埋在中空纳米纤维中的葡萄糖氧化酶、过氧化物酶在中空纳米纤维的腔室中, 保持游离分散的状态, 有效提高了酶催化反应活性。当葡萄糖溶液滴加到试纸上时, 由于发生上述显示反应而使试纸变为棕红色, 利用光密度仪测定膜在 440nm 处的折光率, 并以空白膜的折光率为参比, 计算折光率的差值 Δ 折光率(%). 通过测定不同葡萄糖浓度下的 Δ 折光率(%), 以 Δ 折光率(%) ~ log(葡萄糖浓度) 作图, 即可获得葡萄糖检测的标准曲线。

[0032] 由于本发明所提供的用于血清总葡萄糖检测的试纸具有无纺布膜的形态, 还可以和 24 孔板或 96 孔板相结合, 将包埋有葡萄糖氧化酶、过氧化物酶以及邻 - 联二茴香胺的纳米纤维膜铺设在孔板的表面, 构建 Microarray 微阵列, 通过在孔板内依次滴加待检测的含葡萄糖的溶液, 从而可以用于葡萄糖的高通量检测。

[0033] 本发明所制备出的用于葡萄糖检测的试纸, 葡萄糖氧化酶、过氧化物酶被包埋的中空纳米纤维的空腔内, 纳米微环境为酶和辅酶提供特殊的稳定性机制, 因此其稳定性得到了大幅度的提高。显色剂分布在中空壁上, 使得葡萄糖试纸能够快速显色, 大大缩减了检测所用时间, 而且由于酶的高活性和高稳定性, 使得酶的用量减少, 从而可以使检测成本大幅度降低。

附图说明

[0034] 下面结合附图及具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0035] 图 1 实施例 1 的葡萄糖检测工作曲线,在 Unico 2800UV-Vis 分光光度计上获得。

[0036] 图 2 实施例 2 所述原位装载了葡萄糖氧化酶、过氧化物酶以及邻-联二茴香胺的中空聚氨酯纳米纤维,即用于葡萄糖检测的试纸的扫描电镜照片(断面图)。

[0037] 图 3 实施例 2 的葡萄糖检测试纸检测不同浓度葡萄糖标准液时,X-Rite 500 光密度仪检测的结果。

[0038] 图 4 实施例 2 的葡萄糖检测试纸工作曲线 2,在 X-Rite 500 光密度仪上获得。

[0039] 图 5 实施例 2 所述,利用葡萄糖检测试纸检测待测样品中葡萄糖浓度过程中,试纸颜色随葡萄糖浓度的变化情况。

[0040] 图 6 实施例 2 所述,葡萄糖检测试纸的储存稳定性。

具体实施方式

[0041] 下面以具体化的形式阐述本发明的实施方式,但本发明并不限制于该实施方式中。

[0042] 实施例 1 用于葡萄糖检测的溶液形态试剂和检测方法

[0043] 本实施例描述一种用于总葡萄糖检测的测定试剂和检测方法,试剂中各组分含量如下所示:

[0044] 葡萄糖氧化酶:0.01g/L

[0045] 过氧化物酶:0.01g/L

[0046] 邻-联二茴香胺:0.1mg/mL

[0047] pH 7.0 的磷酸盐缓冲液:50mM

[0048] 其检测方法是采用 Unico 2800Uv-Vis 分光光度计进行检测,操作如下:

[0049]

加入物	参比管	检测管 1	检测管 2	检测管 3	检测管 4	检测管 5	检测管 6
葡萄糖氧化酶	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
过氧化物酶	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
邻-联二茴香胺	600 μ L	600 μ L	600 μ L	600 μ L	600 μ L	600 μ L	600 μ L
加入 200 μ l 葡萄糖样品后,葡萄糖浓度	0 mmol/L	5 mmol/L	10mmol/L	15mmol/L	20mmol/L	25mmol/L	30mmol/L
快速混合后在 440nm 波长处连续检测吸光度值的变化,计算 $\Delta_{A440}(\text{min}^{-1})$,通过测定不同葡萄糖浓度下的 $\Delta_{A440}(\text{min}^{-1})$,绘制 $\Delta_{A440}(\text{min}^{-1})$ —葡萄糖浓度的标准曲线。							

[0050] $\Delta_{A440}(\text{min}^{-1}\text{mg})$ —葡萄糖浓度的工作曲线如下: $\Delta_{A440}(\text{min}^{-1})=0.0205 \times \text{葡萄糖浓度} / \mu\text{mol/L} + 0.0052$; $R^2=0.996$,检测线性范围:0-20mmol/L。

[0051] 样品中葡萄糖浓度的检测:在检测管中加入 100 μ L 葡萄糖氧化酶、100 μ L 过氧化物酶、600 μ L 邻-联二茴香胺,然后加入 200 μ L 待检测的含有葡萄糖的血清样品,快速混合后在利用紫外分光光度法在 440nm 波长处连续检测吸光度值的变化,计算出反应速率,根据工作曲线定量计算血清样品中的总葡萄糖浓度。

[0052] 实施例 2 葡萄糖检测试纸的制备及检测方法

[0053] 用于葡萄糖检测的试纸的制备:将 1mg 葡萄糖氧化酶、1mg 过氧化物酶溶解于 200 μ L 的水中,然后和 800 μ L 甘油充分混合,将混合液加入到 5ml 的进样器,作为同轴电纺的内相电纺液;将邻-联二茴香胺溶于 N,N-二甲基乙酰胺中,配制成 10mg/ml 的溶液,然后将一定质量的聚氨酯充分溶解配成重量百分比为 25% 的溶液,作为外相电纺液,加入到另一 5ml 的进样器中;将内、外相电纺液分别通过管线连接至同轴电纺喷丝头的进液口,将喷丝头的出液口与高压电源的正极连接,用铝箔纸或不锈钢网连接至高压电源的负极作为接收板。调节喷丝头到接收板间的距离为 25cm,电压为 17Kv。利用注射泵控制内相电纺液流速为 0.07ml/h,外相流速为 0.5ml/h,进行同轴共纺静电纺丝,得到中空聚氨酯纳米纤维。该纳米纤维的中空内腔中原位装载了葡萄糖氧化酶和过氧化物酶,壳层负载着显色剂邻-联二茴香胺,从而获得葡萄糖检测试纸,该葡萄糖试纸宏观上具有无纺布膜的形态。利用扫描电镜观测该试纸的形态。

[0054] 用葡萄糖检测试纸检测葡萄糖的浓度,绘制葡萄糖检测的工作曲线:将上述电纺出的中空纤维膜用打孔器均匀裁剪成直径为 0.5cm 左右大小的膜片,取溶于磷酸盐缓冲液中的已知浓度葡萄糖溶液 20 μ L,滴到已裁剪好的膜片上,30s 左右后观察膜片颜色变化或用光密度仪读出 440nm 处反射率,通过一系列不同浓度的葡萄糖溶液的试纸显色以及反射率制备出标准葡萄糖显色比色卡。从而可以实现直接用肉眼观察就能粗略估计葡萄糖浓度的显色试纸;也可以通过光密度仪的反射率读数,精确检测葡萄糖浓度。

[0055] 通过测定不同葡萄糖浓度下的 Δ Reflection,绘制 Δ Reflection—葡萄糖浓度的工作曲线如下: Δ Reflection=17.57*log(葡萄糖浓度 /mM)-12.83 ; $R^2=0.99$,葡萄糖检测线性范围:0-50mM。

[0056] 利用葡萄糖试纸检测待测血清样品中葡萄糖浓度:将 20 μ L 待检测的葡萄糖样品滴加到检测试纸上,30s 后用光密度仪对试纸检测,检测 440nm 处的反射率。根据葡萄糖浓度的工作曲线,计算待测血清样品中葡萄糖的浓度,或者直接通过颜色变化读出大约葡萄糖浓度。

[0057] 葡萄糖检测试纸的储存稳定性的测定:将制备出的葡萄糖检测试纸封存于快封袋中,分别放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中和 25 $^{\circ}$ C 恒温孵化器中,间隔一段时间,用打孔器均匀裁剪直径为 0.5cm 左右大小的膜片,取溶于磷酸盐缓冲液中的已知浓度葡萄糖溶液 20 μ L,滴到已裁剪好的膜片上,30s 左右后观察膜片颜色变化或用光密度仪读出 440nm 处反射率。通过比较反射率随试纸存放时间的变化,考察葡萄糖试纸的储存稳定性。

[0058] 实施例 3 葡萄糖检测试纸的制备及检测方法

[0059] 用于葡萄糖检测的试纸的制备:将 0.1mg 葡萄糖氧化酶、0.5mg 过氧化物酶溶解于 100 μ L 的水中,然后和 900 μ L 甘油充分混合,将混合液加入到 5ml 的进样器,作为同轴电纺的内相电纺液;将邻-联二茴香胺溶于 N,N-二甲基乙酰胺中,配制成 5mg/ml 的溶液,然后将一定质量的聚氨酯充分溶解配成重量百分比为 20% 的溶液,作为外相电纺液,加入到另一 5ml 的进样器中;将内、外相电纺液分别通过管线连接至同轴电纺喷丝头的进液口,将喷丝头的出液口与高压电源的正极连接,用铝箔纸或不锈钢网连接至高压电源的负极作为接收板。调节喷丝头到接收板间的距离为 20cm,电压为 15Kv。利用注射泵控制内相电纺液流速为 0.07ml/h,外相流速为 0.5ml/h,进行同轴共纺静电纺丝,得到中空聚氨酯纳米纤维。

维。该纳米纤维的中空内腔中原位装载了葡萄糖氧化酶和过氧化物酶,壳层负载着显色剂邻-联二茴香胺,从而获得葡萄糖检测试纸,该葡萄糖试纸宏观上具有无纺布膜的形态。利用扫描电镜观测该试纸的形态。

[0060] 用葡萄糖检测试纸检测葡萄糖的浓度,绘制葡萄糖检测的工作曲线:将上述电纺出的中空纤维膜用打孔器均匀裁剪成直径为 0.5cm 左右大小的膜片,取溶于磷酸盐缓冲液中的已知浓度葡萄糖溶液 30 μ l,滴到已裁剪好的膜片上,30s 左右后观察膜片颜色变化或用光密度仪读出 440nm 处反射率,通过一系列不同浓度的葡萄糖溶液的试纸显色以及反射率制备出标准葡萄糖显色比色卡。从而可以实现直接用肉眼观察就能粗略估计葡萄糖浓度的显色试纸;也可以通过光密度仪的反射率读数,精确检测葡萄糖浓度。

[0061] 利用葡萄糖试纸检测待测血清样品中葡萄糖浓度:将 30 μ l 待检测的葡萄糖样品滴加到检测试纸上,30s 后用光密度仪对试纸检测,检测 440nm 处的反射率。根据葡萄糖浓度的工作曲线,计算待测血清样品中葡萄糖的浓度,或者直接通过颜色变化读出大约葡萄糖浓度。

[0062] 实施例 4 葡萄糖检测试纸的制备及检测方法

[0063] 用于葡萄糖检测的试纸的制备:将 1.5mg 葡萄糖氧化酶、2.0mg 过氧化物酶溶解于 200 μ l 的水中,然后和 800 μ l 甘油充分混合,将混合液加入到 5ml 的进样器,作为同轴电纺的内相电纺液;将邻-联二茴香胺溶于 N,N-二甲基乙酰胺中,配制成 10mg/ml 的溶液,然后将一定质量的聚偏氟乙烯充分溶解配成重量百分比为 25% 的溶液,作为外相电纺液,加入到另一 5ml 的进样器中;将内、外相电纺液分别通过管线连接至同轴电纺喷丝头的进液口,将喷丝头的出液口与高压电源的正极连接,用铝箔纸或不锈钢网连接至高压电源的负极作为接收板。调节喷丝头到接收板间的距离为 20cm,电压为 17Kv。利用注射泵控制内相电纺液流速为 0.1ml/h,外相流速为 0.5ml/h,进行同轴共纺静电纺丝,得到中空聚偏氟乙烯纳米纤维。该纳米纤维的中空内腔中原位装载了葡萄糖氧化酶和过氧化物酶,壳层负载着显色剂邻-联二茴香胺,从而获得葡萄糖检测试纸,该葡萄糖试纸宏观上具有无纺布膜的形态。利用扫描电镜观测该试纸的形态。

[0064] 利用所制备出的葡萄糖检测试纸检测葡萄糖浓度,以及待测样品中葡萄糖浓度的检测的方法步骤同实施例 2 所述。

[0065] 实施例 5 葡萄糖检测试纸的制备及检测方法

[0066] 用于葡萄糖检测的试纸的制备:将 0.1mg 葡萄糖氧化酶、0.1mg 过氧化物酶溶解于 300 μ l 的水中,然后和 700 μ l 甘油充分混合,将混合液加入到 5ml 的进样器,作为同轴电纺的内相电纺液;将邻-联二茴香胺溶于氯仿中,配制成 10mg/ml 的溶液,然后将一定质量的聚乳酸充分溶解配成重量百分比为 25% 的溶液,作为外相电纺液,加入到另一 5ml 的进样器中;将内、外相电纺液分别通过管线连接至同轴电纺喷丝头的进液口,将喷丝头的出液口与高压电源的正极连接,用铝箔纸或不锈钢网连接至高压电源的负极作为接收板。调节喷丝头到接收板间的距离为 15cm,电压为 20Kv。利用注射泵控制内相电纺液流速为 0.05ml/h,外相流速为 0.5ml/h,进行同轴共纺静电纺丝,得到中空聚乳酸纳米纤维。该纳米纤维的中空内腔中原位装载了葡萄糖氧化酶和过氧化物酶,壳层负载着显色剂邻-联二茴香胺,从而获得葡萄糖检测试纸,该葡萄糖试纸宏观上具有无纺布膜的形态。利用扫描电镜观测该试纸的形态。

[0067] 利用所制备出的葡萄糖检测试纸检测葡萄糖浓度,以及待测样品中葡萄糖浓度的检测的方法步骤同实施例 2 所述。

[0068] 实施例 6 葡萄糖检测试纸的制备及检测方法

[0069] 用于葡萄糖检测的试纸的制备:将 1mg 葡萄糖氧化酶、1mg 过氧化物酶溶解于 200 μ L 的水中,然后和 800 μ L 甘油充分混合,将混合液加入到 5ml 的进样器,作为同轴电纺的内相电纺液;将邻-联二茴香胺溶于 N,N-二甲基乙酰胺中,配制成 10mg/ml 的溶液,然后将一定质量的苯乙烯马来酸酐共聚物充分溶解配成重量百分比为 20% 的溶液,作为外相电纺液,加入到另一 5ml 的进样器中;将内、外相电纺液分别通过管线连接至同轴电纺喷丝头的进液口,将喷丝头的出液口与高压电源的正极连接,用铝箔纸或不锈钢网连接至高压电源的负极作为接收板。调节喷丝头到接收板间的距离为 25cm,电压为 17Kv。利用注射泵控制内相电纺液流速为 0.1ml/h,外相流速为 0.5ml/h,进行同轴共纺静电纺丝,得到中空苯乙烯马来酸酐共聚物纳米纤维。该纳米纤维的中空内腔中原位装载了葡萄糖氧化酶和过氧化物酶,壳层负载着显色剂邻-联二茴香胺,从而获得葡萄糖检测试纸,该葡萄糖试纸宏观上具有无纺布膜的形态。利用扫描电镜观测该试纸的形态。

[0070] 利用所制备出的葡萄糖检测试纸检测葡萄糖浓度,以及待测样品中葡萄糖浓度的检测的方法步骤同实施例 2 所述。

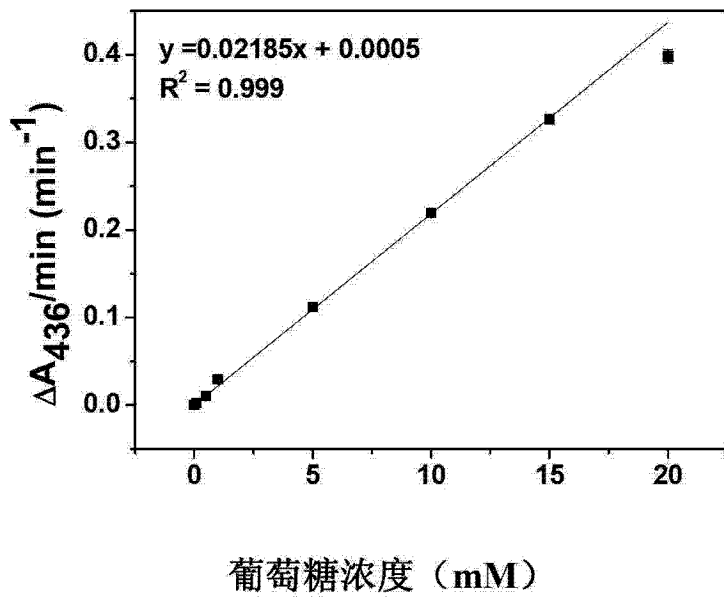


图 1

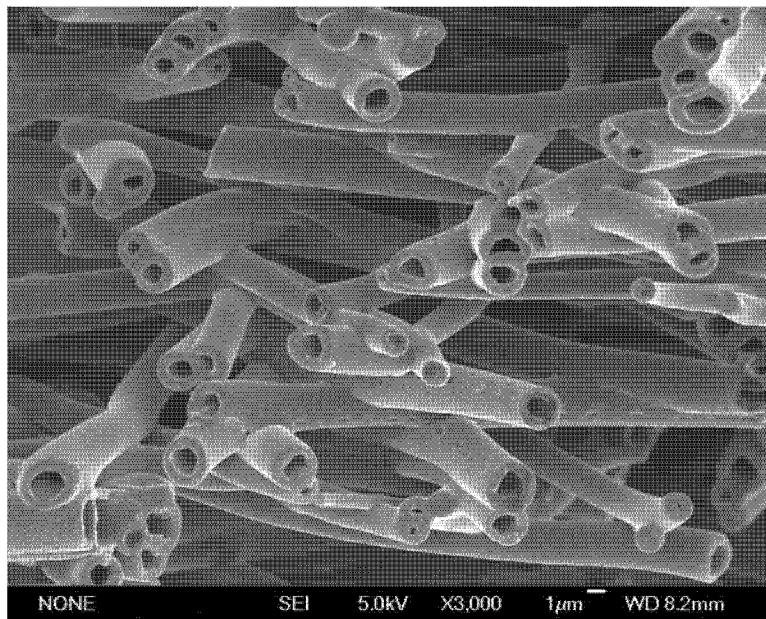


图 2

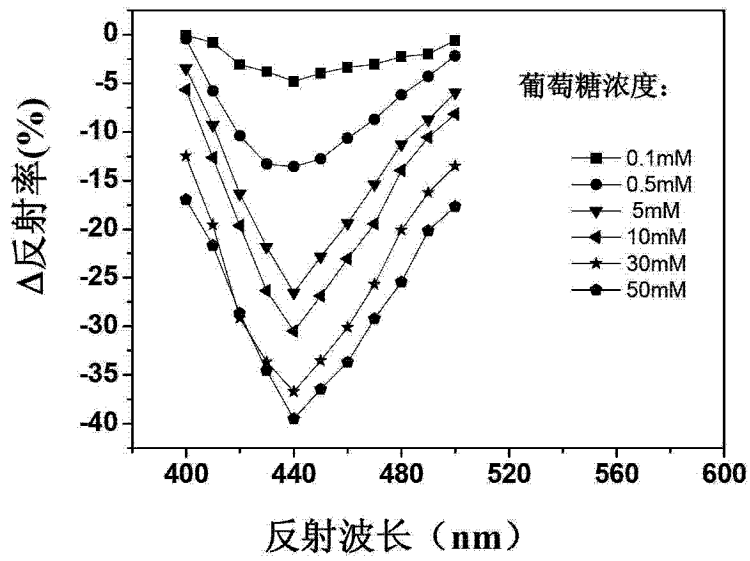


图 3

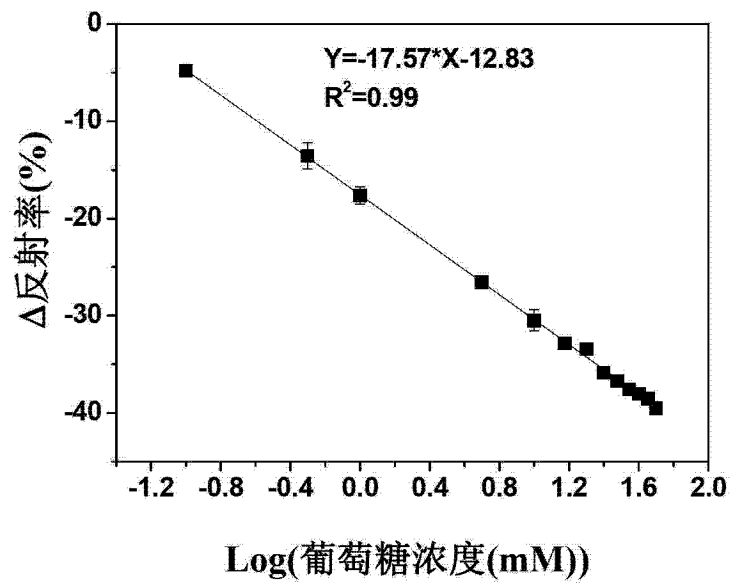


图 4

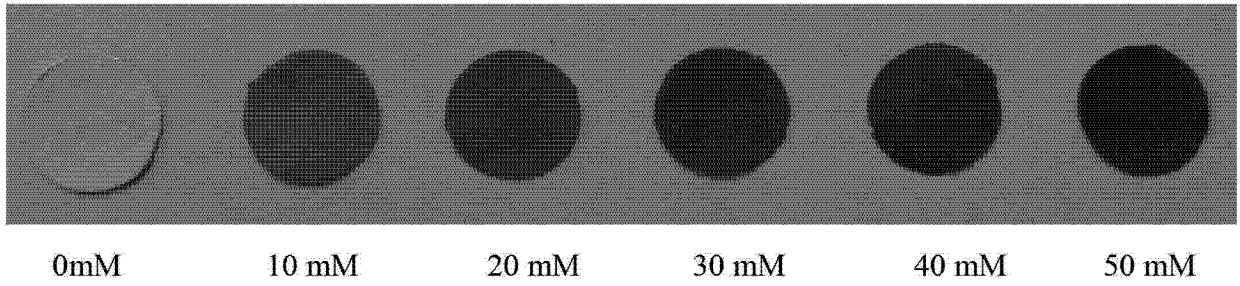


图 5

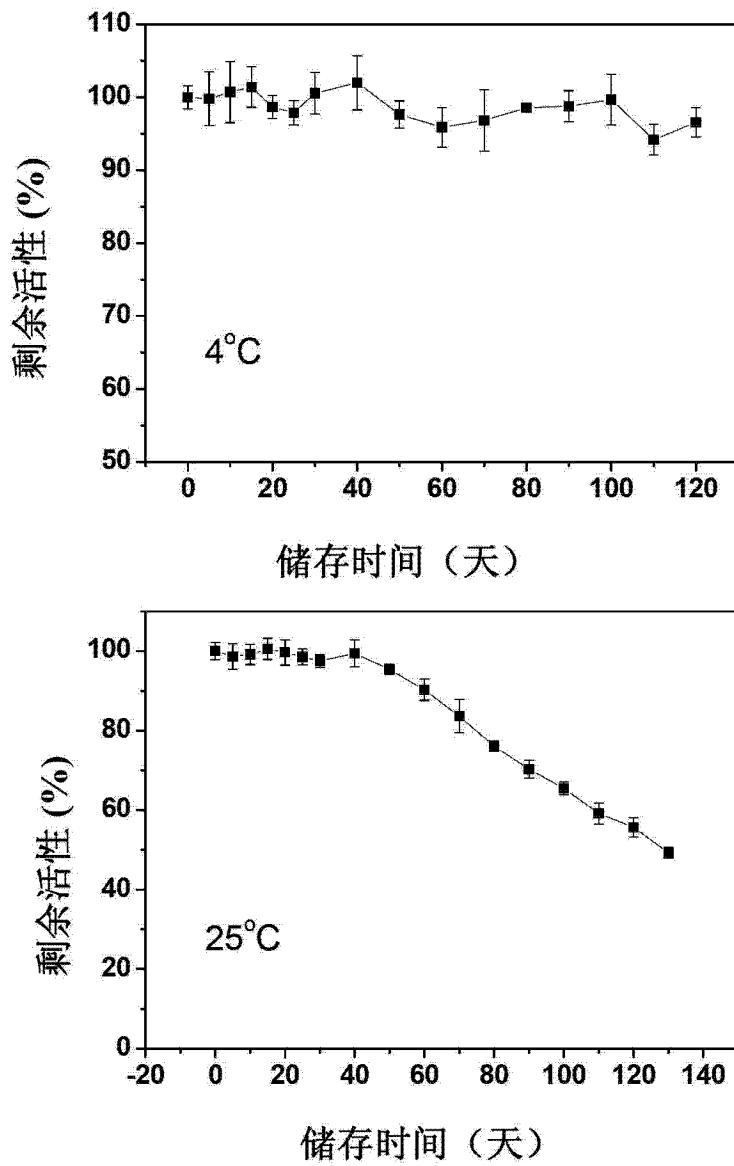


图 6