

酶 - 离子色谱法检测血清中的葡萄糖^{*}

栾艺华, 胡荣宗^{*}, 黄维雄, 吴述超
(厦门大学化学系分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

[摘要] 利用葡萄糖氧化酶对 *D*-葡萄糖催化氧化的高度专一性, 催化性能高的优点, 催化血清中 *D*-葡萄糖被溶液中的溶解氧氧化为 *D*-葡萄糖酸, 同时结合离子色谱法快速、灵敏、准确的特点, 检测生成的 *D*-葡萄糖酸, 并用标准工作曲线法来定量血清中的葡萄糖的含量, 建立起酶-离子色谱法检测血清中葡萄糖的新方法. 该法线性范围为 1.00 ~ 90.00 mg/L. 测得值与采用贝克曼 CX3 测得值相比, 误差为 -2% ~ 2%.

关键词: 葡萄糖; 葡萄糖氧化酶; 血清; 离子色谱

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-5900(2005)02-0112-04

Determination of Glucose in Serum by Enzyme - Ion Chromatography

LUAN Yi-hua, HU Rong-zong^{*}, HUANG Wei-xiong, WU Shu-chao

(Key Laboratory of Analytical Sciences Ministry of Education of China of Chemistry Department, Xiamen University, Xiamen 361005 China)

[Abstract] *D*-Glucose in serum was oxidized by the oxygen dissolved in solution with the catalysis of glucose oxidase based on its high selectivity to glucose. We used the ion chromatography to determine the production, *D*-glucose acid and then the concentration of glucose in serum could be quantitatively determined through a standard working curve with a linear range of 1.00 ~ 90.00 mg/L. A new method has been developed to determine the glucose in serum.

Key words: glucose; glucose oxidase; serum; ion chromatography

血液中葡萄糖含量的高低是人体健康状况的重要指标, 空腹血糖浓度低于 3.33 ~ 3.89 mmol/L 时称为低血糖, 而超过 7.22 mmol/L 时称为高血糖^[1]. 葡萄糖浓度的突然升高与降低都预示着一种异常情况的发生, 对糖尿病患者, 血液中葡萄糖浓度的监控尤其重要. 因此, 临床上需要一种快速简便的测定血糖的方法.

目前已经有很多的检测血液中葡萄糖含量的化学方法, 如葡萄糖氧化酶电极法^[2]、己糖激酶法^[3]葡萄糖氧化酶-过氧化物酶耦联法等. 虽然检测手段不同, 但基本上都采用了一个相同的反应机理: 即葡萄糖在葡萄糖氧化酶的作用下被 O₂ 氧化为葡萄糖酸并释放出 H₂O₂, 然后通过检测 O₂ 浓度的降低或者 H₂O₂ 浓度的升高间接测定葡萄糖的含量. 基于上述原理的各种方法存在一些缺点, 如光度法易受一些重金属离子的干扰; 葡萄糖氧化酶电极法中酶在电极上固定困难; 己糖激酶法操作条件要求高, 费用昂贵, 难以推广; 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶耦联法, 需两种酶联合使用. 虽然葡萄糖氧化酶仅对 *D*-葡萄糖具有催化氧化的作用, 但过氧化物酶特异性差, 从理论上讲, 尿酸、维生素 C、胆红素、谷胱甘肽都可与色原性物质竞争过氧化氢而抑制反应, 引起结果偏低.

Sanae Ikeda^[4]等提出了用酶和单柱离子色谱法联用, 同时测定尿素和碱金属离子, 但是没有应用到阴离子的检测. 赖丽^[5]等利用葡萄糖氧化酶对葡萄糖催化氧化的高度专一性, 在其催化下, 用溶液中的溶解氧将葡萄糖氧化产生 H₂O₂, 再往体系中加入 NO₂⁻, 使其被 H₂O₂ 氧化为 NO₃⁻, 最后用离子色谱法检测 NO₃⁻, 从而实现对蜂蜜中葡萄糖的定量分析. 该法虽然不用过氧化物酶, 但需要两步反应耦联.

本法只用到了上述第一步反应, 即在葡萄糖氧化酶的作用下溶液中的溶解氧将葡萄糖氧化为葡萄糖酸, 再用离子色谱法直接检测产物葡萄糖酸定量血糖的含量, 最后应用计算实现对葡萄糖的定量分析. 该法简便直接, 省略了耦联步骤.

* 收稿日期: 2004-11-15

基金项目: 福建省重大科技项目资助 (2003Y010)

作者简介: 栾艺华 (1979-), 女, 山东烟台人, 硕士生, E-mail: yhluan@tom.com;

胡荣宗, 男, 教授, 博士生导师, 享受国务院政府特殊津贴, 福建省优秀专家, E-mail: rzhu@jingxian.xmu.edu.cn

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

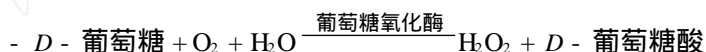
仪器:离子色谱仪:732型电导检测器(Metrohm公司);YSA型8098A-2[#]阴离子分离柱(核工业部北京化工冶金研究院);YSB-2平流泵(中科院上海原子核所科仪厂)和DZS-1A电自生抑制器(自制).

色谱条件:淋洗液:2.4 mmol/L Na₂CO₃ + 1.5 mmol/L NaHCO₃;流速1.5 mL/min;进样量:20 μL;抑制电流:40 mA.

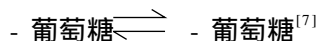
试剂:葡萄糖氧化酶(GOD):以0.02 mol/L KH₂PO₄ - K₂HPO₄缓冲液配成120 U/mL的母液(Sigma公司,100 U/mg.);葡萄糖(C₆H₁₂O₆·H₂O):250.00 mg/L;D-葡萄糖酸钠:50.00 mg/L;混合正常人体血清(南京军区福州总医院).上述溶液均由A.R.级试剂及二次蒸馏水配成.

1.2 实验原理

在含葡萄糖样品的溶液中加入一定量的葡萄糖氧化酶(GOD),在一定温度下,溶液中的葡萄糖在GOD催化下被溶解氧氧化成葡萄糖酸.待反应充分后用离子色谱法检测产物葡萄糖酸(本实验以脉冲电导检测仪为检测器,以峰高来定量,故各图中的纵坐标均以电导值表示葡萄糖酸峰高值),并以此计算样品中葡萄糖的含量.其反应式如下:



该反应的另一产物H₂O₂对GOD有毒害作用^[6],故该反应GOD用量需较大.另外,葡萄糖溶液中存在D-葡萄糖与L-葡萄糖的平衡问题:



而GOD只对D-葡萄糖的催化氧化具有高度专一性^[8],所以应给予足够长的时间使反应充分并使体系达到平衡以获得线性好的工作曲线.

1.3 实验方法

1.3.1 标准工作曲线 往一组葡萄糖标准溶液中各加入6 U的GOD(pH=7.0)溶液,定容,使混合液中葡萄糖浓度分别为1.00,3.00,5.00,7.00,9.00,11.00,30.00,50.00,70.00,90.00 mg/L,然后于(35.0 ± 0.5) °C水浴180 min,取出,用抑制式离子色谱仪检测溶液中的葡萄糖酸,以扣除GOD空白后的峰高对葡萄糖浓度作图,即得标准工作曲线(图1),线性范围为1.00~90.00 mg/L,回归方程为y = 0.076 5x + 0.027 5,相关系数R² = 0.999 8.

2 结果和讨论

2.1 谱峰の確認

在色谱条件一致的情况下,标准葡萄糖酸钠溶液的保留时间与葡萄糖在GOD催化条件下氧化产生的氧化产物的保留时间相一致.从葡萄糖氧化的产物可以看出:只有葡萄糖酸是离子型化合物.谱峰的峰高与葡萄糖的浓度成线性关系,用标准加入法平行测定三次的平均回收率为96.4%,因此推断谱峰为葡萄糖酸的离子色谱峰.

2.2 干扰的消除

血清中含大量的氯离子,其存在影响色谱峰的峰型,干扰葡萄糖酸根离子测定的准确性,可通过稀释血清消除其干扰,而且氯离子保留时间在葡萄糖酸根离子之后不会干扰其测定.血清实际样品及GOD中可能存在的其它干扰离子,其峰高值为葡萄糖经GOD催化氧化峰高值的1.25%左右,故可

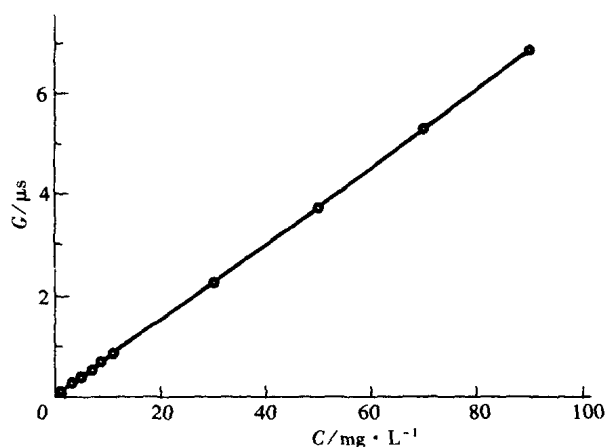


图1 标准工作曲线

Fig. 1 Calibration Curve of C₆H₁₂O₆

洗脱液:2.4 mmol/LNa₂CO₃ + 1.5 mmol/LNaHCO₃;流速:1.5 mL/min; pH=6.7;抑制电流:40 mA;GOD:40 U;葡萄糖:10 mL,1.00~90.00 mg/L

在测定之前扣除空白,并且 GOD 对 D -葡萄糖的催化氧化具有高度专一性使测定结果准确可靠.

2.3 条件实验

2.3.1 反应温度的选择 酶催化反应对温度的要求很高,温度的改变对酶反应速率的影响很大,因此选择一个最佳的反应温度十分重要.据文献报道,温度超过 60°C ,GOD 完全失去活性^[9].在酶蛋白未变性的温度范围内,酶反应速率随着温度的升高而增大,一般以接近生理条件下的温度(37°C)为佳.本实验反应中所需的氧来自反应液中的溶解氧,温度太高将使反应液中的溶解氧降低而影响反应速率.通过实验测得反应温度以 35°C 为佳,不同温度下 5.00 mg/L 的葡萄糖溶液在 GOD 催化氧化下生成的葡萄糖酸的离子色谱峰峰高值如图 2 所示.据图 2 数据本试验选定的温度为 35°C .

2.3.2 缓冲液 pH 的选择 酶在一定的离子强度和 pH 下才表现出最大的催化活性^[10],找出酶反应的最佳 pH 不仅能提高反应速率,缩短反应时间,而且能减少酶的用量.本实验试验了不同 pH 值的 GOD 溶液催化氧化 5.00 mg/L 的葡萄糖溶液生成的葡萄糖酸的离子色谱峰的峰高值如图 3 所示.表明反应以 $\text{pH}=6.0$ 为佳,同文献报道相一致^[11].但是若用磷酸调 pH 值会有很高的磷酸根的峰,影响峰型,最后选定 $\text{pH}=6.7$.

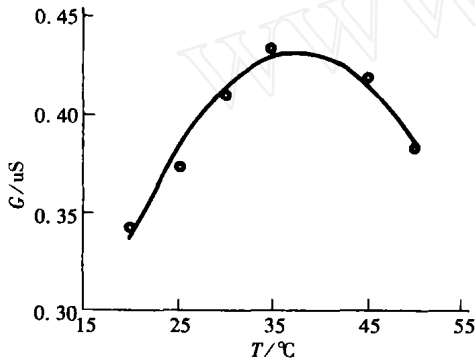


图 2 温度对 GOD 反应的影响

Fig.2 Effect of temperature on GOD reaction

(GOD:6 U;葡萄糖:10 mL,5.00 mg/L;其它实验条件同图 1)

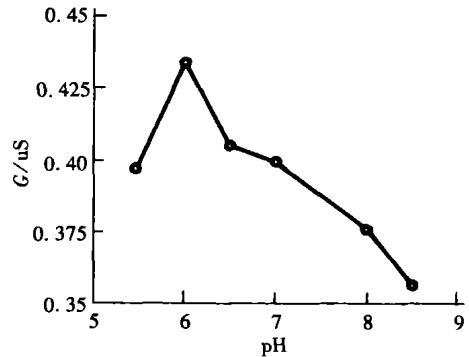


图 3 pH 值对 GOD 反应的影响

Fig.3 Effect of pH on GOD reaction

(GOD:6 U;葡萄糖:10 mL,5.00 mg/L;其它实验条件同图 1)

2.3.3 反应时间的选择 要得到线性范围好的标准工作曲线,必须提供足够长的时间使反应体系达到平衡,因此必须做峰高-时间曲线,以确定反应完全所需的时间(即一定量葡萄糖在一定温度,pH 值下被酶催化氧化生成的葡萄糖酸峰高值随着反应时间的延长而趋于一定值时,反应趋于完全,从反应开始到反应趋于完全的这段时间就是反应完全所需要的时间).不同时间 5.00 mg/L 的葡萄糖在 GOD 催化氧化下生成的葡萄糖酸峰的峰高值如图 4 所示.通过实验测得反应时间达到 110 min 时,峰高增长趋于缓慢.为使反应体系达到平衡并稳定下来,本实验选择反应时间为 180 min .

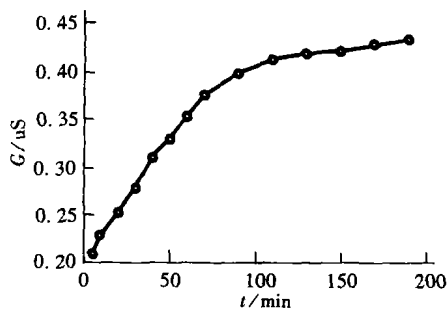


图 4 时间对 GOD 反应的影响

Fig4 Effect of time on GOD reaction

(GOD:15 U;葡萄糖:25 mL,5.00 mg/L;其它实验条件同图 1)

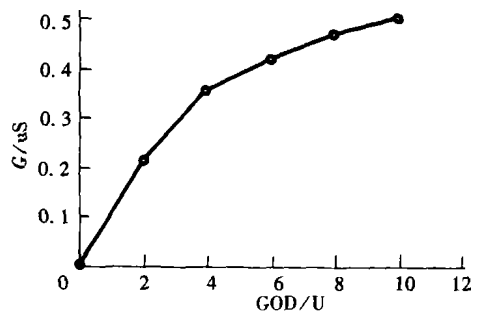


图 5 GOD 用量对反应的影响

Fig.5 Effect of pH on GOD reaction

(GOD:6 U;葡萄糖:10 mL,5.00 mg/L;其它实验条件同图 1)

2.3.4 GOD 用量选择 要使反应快速达到平衡必须使反应物 GOD 和 O_2 二者均过量,而本反应中 O_2 是由反应液中的溶解氧提供(此条件限制反应液中葡萄糖浓度应低于 200 mg/L),本方法不设法提高被

测溶液中溶解氧的含量,所以应使 GOD 过量.相同色谱条件下不同 GOD 用量催化氧化 5.00 mg/L 生成的葡萄糖酸峰的峰高值 h 如图 5 所示.据图 5 数据 GOD 用量以 3.0 mL 2 U/mL 为佳(样品为 10 mL 5.00 mg/L 葡萄糖溶液).

表 1 不同洗脱液对被测离子的影响

2.4 洗脱液浓度的选择

以不同浓度的碳酸钠和碳酸氢钠为淋洗液检测 5.00 mg/L 的葡萄糖酸钠和 20.00 mg/L 的氯离子的混合溶液,分离度和峰高列于表 1.

淋洗液	分离度 (R)	葡萄糖酸的峰高 $h/\mu\text{s}$
4.4 mmol/L Na ₂ CO ₃ + 2.4 mmol/L NaHCO ₃	0.94	0.869 9
2.2 mmol/L Na ₂ CO ₃ + 1.2 mmol/L NaHCO ₃	1.42	0.913 0
4.8 mmol/L Na ₂ CO ₃ + 3.0 mmol/L NaHCO ₃	2.00	0.664 0
2.4 mmol/L Na ₂ CO ₃ + 1.5 mmol/L NaHCO ₃	2.00	0.849 1

综合相应信号和分离度,选取洗脱液的浓度为 2.4 mmol/L Na₂CO₃ + 1.5 mmol/L NaHCO₃.

2.5 样品测定

2.5.1 精密度与准确性分析 连续重复测定经 GOD 氧化后的 5.00 mg/L 葡萄糖样品 5 次,得相对标准偏差 RSD (%) 为 2.39.以之代入标准工作曲线的回归方程,得葡萄糖 (C₆H₁₂O₆ · H₂O) 平均浓度为 5.02 mg/L,误差为 0.042%,所以此法是准确的.

2.5.2 血清中葡萄糖含量测定的计算公式 在标准工作曲线的离子色谱条件下,葡萄糖酸峰受多种因素(如 GOD 峰等)的干扰,故需作空白扣除.血清经 GOD 反应后其葡萄糖酸实际峰高计算式如下:

$$\text{实际峰高值} = \text{测得峰高值} - \text{血清空白峰高值} - \text{GOD 空白峰高值}$$

将计算所得的实际峰高值代入标准工作曲线回归方程,即可求得葡萄糖 (C₆H₁₂O₆ · H₂O) 浓度 $C/\text{mg L}^{-1}$.血清实际浓度 $C/\text{mmol L}^{-1}$ 计算式如下:

$$C_{(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O})} / \text{mmol L}^{-1} = \frac{C_{(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O})} / \text{mg L}^{-1} \text{ 稀释倍数}}{M_{(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O})} / \text{g mol}^{-1}}$$

2.5.3 血清中葡萄糖含量测定 南京军区福州总医院提供血清样品,用本方法测定结果如表 2:

表 2 实际样品的分析 ($n=6$)

Tab.2 Analytical result of sample

样品	本法测得平均值 $\bar{C}/\text{mmol L}^{-1}$	贝克曼 CX3 测得值 $C/\text{mmol L}^{-1}$	误差范围	RSD
血清	5.98	5.97	- 2% ~ 2%	1.56%

3 结 论

本实验结合了葡萄糖氧化酶对 β -D-葡萄糖催化氧化的高度专一性及离子色谱法快速、灵敏、准确的特点,使血清中葡萄糖含量的检测变得操作简单,方便,有望成为一种临床上常规检测血清中葡萄糖含量的新方法.

参 考 文 献

- [1] Wanghao. Biochemistry[M]. Beijing: People's Medical Publish House, 2002.
- [2] Chenjian, Zhu huayu, Chen changxing. Spectrophotometric determination of glucose in serum[J]. Analytical Instrumentation, 1998(2): 53 - 54.
- [3] Liu wenhui, Duan xueyun. Comparison between HK and GOD - POD Determination for Serum Glucose[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2002, 9(6): 424 - 425.
- [4] Lai limin, Hu rongzong, Weng yuhua. Detection of Glucose by Enzyme - ion Chromatography[J]. Analysis and Testing Technology and Instrumentation, 2002, 8(4): 208 - 211.
- [5] Jin litong, Zhao guizhu, Fang yuzhi. A Study of Bienzyme Electrode for Determination of Glucose in Blood Serum Samples[J]. Journal of East China Normal University, 1994(2): 59 - 63.
- [6] Zhang manfu. Biochemistry[M]. Beijing: Press of China Agriculture University, 2002: 123 - 124.
- [7] Zhang yeiyu, Zhangshijun, Guomei. Simple Depiction GOD[J]. Journal of Zaozhuan Normal College, 1998(3): 81 - 82.
- [8] Yang wenchu, Zhu changwen, Li guilan. The Research of Determinating Glucose in Serum by GOD - Fe³⁺ - CNS⁻ [J]. Journal of Xuzhou College, 1994, 14(8): 199 - 200.
- [9] Chen shigen, Zhou runqi. Enzymology[M]. Shanghai: Fudan University Press, 1997.
- [10] Mao qixia, Huang yongfang, Chen tiannv. Comparison of the Partial Qualities of Several Glucose Oxidases[J]. Journal of South China Agricultural University, 2000, 21(2): 54 - 56.