

PVA固定化葡萄糖氧化酶电极的研制及应用*

血清中葡萄糖含量的测定

岑传铨 庄秀润**

(应用化学系)

摘 要

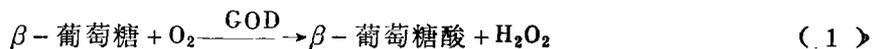
本文报道了用聚乙烯醇(PVA)固定葡萄糖氧化酶(GOD)并制成酶电极,对膜的导电性能进行试验,在葡萄糖含量为 $2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} M$ 的试验范围内,响应电流的变化与浓度成线性关系。用此电极以安培法测定血清中葡萄糖含量并与邻甲苯胺比色法、GOD-过氧化物酶比色法进行比较,结果较为满意。

关键词 葡萄糖, 酶电极, 葡萄糖氧化酶电极, 固定化酶, 血清

一、前 言

血清中葡萄糖含量的测定,目前临床上多采用邻甲苯胺比色法^[1]和葡萄糖试剂盒进行酶法测定,前者所用显色剂有一定毒性,后者GOD只能一次性使用,不经济。用酶电极法测定葡萄糖^[2-6],如Updike和Hicks^[2]、Nilsson^[5]将GOD包埋在聚丙烯酰胺凝胶内,Notin等^[3]将GOD与醋酸纤维制成膜,Tran-Minh和Broun^[4]将戊二醛与GOD交联,把制得的膜与氧电极或pH玻璃电极结合来测定葡萄糖;近年来,Foulds, Umaña, Bartlett^[6-8]用电聚合吡咯或其衍生物包埋GOD于铂片或玻璃碳上,用安培法测定葡萄糖。以上这些方法有的是酶的固定化操作麻烦,难获得较薄的膜,其物理性质也不够理想;有的则对试剂要求严格,如吡咯要通 N_2 除 O_2 和提纯等。用PVA固定GOD制成膜覆盖于铂片上制成葡萄糖氧化酶电极测定葡萄糖尚未见报道。用PVA作固定化材料不仅易得到很薄的膜且其韧性、强度均较好,同时操作方便、材料易得,制得的GOD/PVA/pt电极用安培法测定血清中葡萄糖含量,结果较为满意。

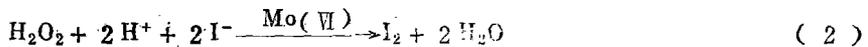
安培法测定葡萄糖的反应如下



本文1989年3月6日收到。

*本项目为福建省自然科学基金资助课题。

**黄仲一、梁爱菊参加本实验工作。



葡萄糖含量在 2.0×10^{-5} — $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 试验范围内 I_2 还原成 2I^- 的电流大小与葡萄糖含量成线性关系。

二、实验部分

1. 仪器

DHZ-1A电化学综合测试仪；C29- μA 电流计；78-1型磁力搅拌器；PHS-73型酸度计；非磁性镀层涂层测厚仪；圆盘铂电极（ 1.3cm^2 ，自制）；Ag-AgCl电极；铂丝电极。

2. 试剂

GOD (Boehringer Mannheim GmbH)，55单位/mg；10%PVA（试剂级）水溶液；磷酸盐缓冲溶液（ $\text{pH}=7.0$ ，由磷酸氢二钾和磷酸二氢钾配成）；底液：270ml磷酸盐缓冲液（ $\text{pH}=7.0$ ）加入30ml 1.0MKI及6ml 0.1M钼酸钠；透析袋用的半透膜；葡萄糖标准溶液：用 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸盐缓冲液配成0.01M和200mg/dl的葡萄糖标准溶液，用时按需要稀释。所用试剂除注明外均为分析纯。

3. 实验方法

(1) 酶的固定化与酶电极的制备：取一定量10% PVA水溶液，与含GOD的磷酸盐缓冲液（ $\text{pH}=7.0$ ）按5:1比例混匀，在有机玻璃板上铺成 10cm^2 大的膜，置于 $0-4^\circ\text{C}$ 冰箱内过夜干燥。剪下一块同圆盘铂电极面积一样大小的膜（ 1.3cm^2 ）置于铂圆盘电极铂片上，包上一层透析袋用的半透膜后，套上硅橡胶O型圈使膜固定在电极上即成。PVA膜遇水膨胀能紧密地贴住铂片，使接触良好。

(2) 测定方法：在综合测试仪上（恒电流部分），三电极体系：以酶电极为工作电极，Ag-AgCl电极为参比电极，铂丝电极为辅助电极。准确吸取底液约3ml，在不断搅拌下注入试样使总体积达到3ml，于0.0V电位， $20-25^\circ\text{C}$ 下记录2min时的电流值（每次更换溶液时要冲洗电极并在底液中平衡至空白值，每次读数时均扣去该空白值）。

三、结果与讨论

1. PVA膜厚度的选择

根据文[9]报道，在达到恒态电流所需要的时间与胶层（膜）厚度有关，因为它影响底物穿过膜扩散到酶活性部位，达到电极感应器检测的速度。为了获得最好的结果，在应用高活性的酶时，酶膜应尽可能用薄的，用不同量的10% PVA与不含酶的 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液以5:1混匀按实验方法1制成PVA/pt电极，并按实验方法2注入0.1M H_2O_2 10 μl 测定其电流值，结果表明，厚度 $< 4\mu\text{m}$ 时膜易破裂不易操作。本实验采用100 μl 10% PVA与磷酸盐缓冲溶液（ $\text{pH}=7.0$ ）按5:1混匀，做成 10cm^2 的膜，经用非磁性镀层涂层测试仪测量其厚

度约为 4—4.5 μm ,) 该膜韧性强度均较好, 响应时间快, 电流响应值大。

2. 透析膜的选择

为了防止酶的漏失常用透析膜覆盖电极包住酶膜以保持电极的稳定性和延长其寿命, 实验证明, 经险处理后的赛璐玢膜虽也可使用, 但易破裂寿命短。采用透析袋的半透膜包扎在电极外面, 结果发现, 在整个电极寿命期间半透膜不破裂, 经检查也未发现 GOD 有渗漏现象。

3. PVA/pt 电极性能的试验

据文 [10] 介绍, GOD 在 pH = 5.8—8.0 时其活性最高。为方便起见, 本实验采用 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液, 在 20—25 $^{\circ}\text{C}$ 温度下进行。用上述 PVA/pt 电极分别进行了如下实验: (1) 在一定量的底液中加入不同量的 H_2O_2 ; (2) 在含有一定量葡萄糖的底液中加入不同量的 GOD; (3) 在含有一定量 GOD 的底液中, 加入不同量的葡萄糖, 然后按实验方法 2 进行, 分别记录其电流值, 并绘制不同浓度的 H_2O_2 、GOD 和葡萄糖与电流的关系曲线, 结果见图 1、2、3。从图中可看出, 在反应 2 min 时测得的电流变化率与 H_2O_2 、GOD 和葡萄糖都成线性

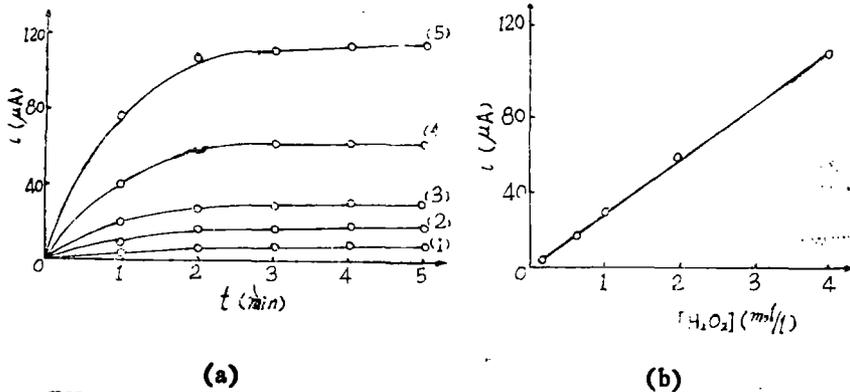


图 1 PVA/pt 电极安培法测定底液中不同浓度 H_2O_2 对 I_2 还原电流的影响 (0.0V)
 (a) 电流-时间曲线: (1) $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; (2) $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$;
 (3) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$; (4) $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$; (5) $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (H_2O_2); (b) 5 min 时电极的线性响应曲线

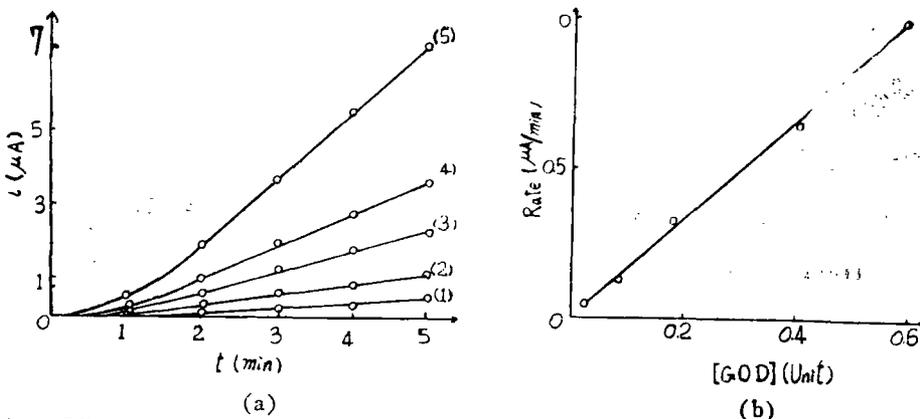


图 2 PVA/pt 电极安培法测定含 $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ 葡萄糖的底液中不同酶量的电流效应 (0.0V)
 (a) 电流-时间曲线: (1) 0.04 单位, (2) 0.12 单位, (3) 0.2 单位, (4) 0.4 单位, (5) 0.6 单位
 (GOD); (b) 2 min 时电极的线性响应曲线

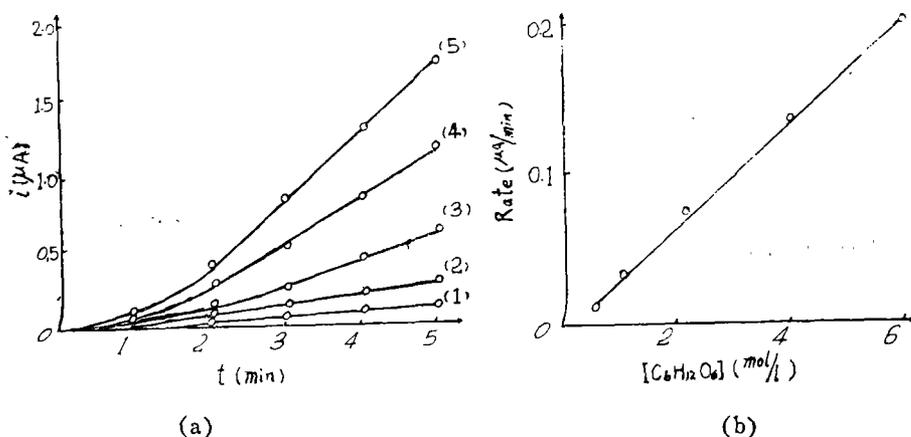


图3 PVA/pt电极安培法测定含0.04单位GOD的底液中不同浓度葡萄糖的电流效应(0.0V)
 (a)电流-时间曲线: (1) $4.0 \times 10^{-4} mol/l$, (2) $1.0 \times 10^{-3} mol/l$, (3) $2.0 \times 10^{-3} mol/l$, (4) $4.0 \times 10^{-3} mol/l$, (5) $6.0 \times 10^{-3} mol/l$ ($C_6H_{12}O_6$);
 (b) 2 min时电极的线性响应曲线

关系。因此可以认为,所制备的PVA膜具有良好的导电性能,是可能用作酶的固定化材料的。

4. GOD/PVA/pt电极的性能试验

根据实验方法1,制备了厚度约为 $4.5 \mu m$ 相同于铂片面积($1.3 cm^2$)含酶量为单位/ cm^2 的GOD/PVA/pt电极,按实验方法2分别注入不同量的葡萄糖标准溶液,分别记录其1—5 min时间的电流值,绘制电流与时间、葡萄糖浓度与电流变化率的关系曲线,如图4所示。由图可见,电流变化率与试验的葡萄糖浓度 $2.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-3} M$ 间有良好的线性关系,但在不同的反应时间其斜率有所变化。

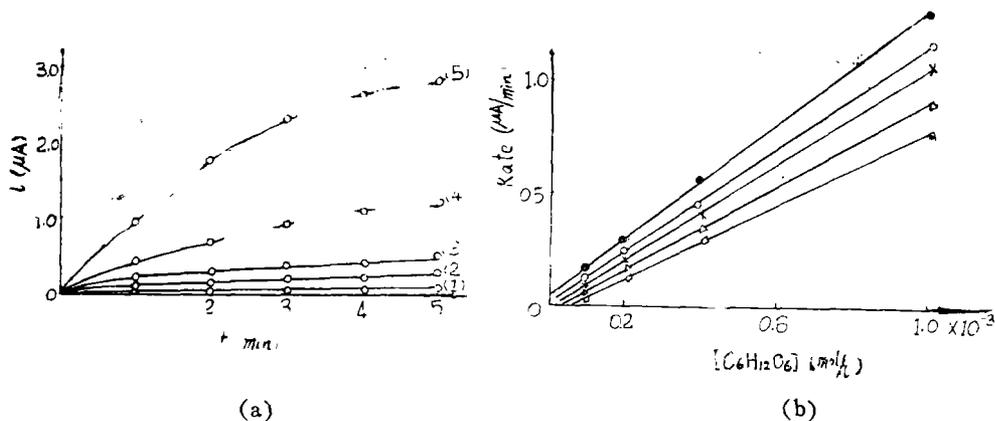


图4 GOD/PVA/pt电极安培法测定底液中不同浓度葡萄糖的电流效应(0.0V, 酶膜厚 $4 - 4.5 \mu m$, 含GOD 1单位/ cm^2)
 (a)电流-时间曲线: (1) $2.0 \times 10^{-5} mol/l$, (2) $1.0 \times 10^{-4} mol/l$, (3) $2.0 \times 10^{-4} mol/l$, (4) $4.0 \times 10^{-4} mol/l$, (5) $1.0 \times 10^{-3} mol/l$ ($C_6H_{12}O_6$);
 (b)分别为1 min(\bullet), 2 min(\circ), 3 min(\times), 4 min(Δ), 5 min(\square)时电极的线性响应曲线

四、试样的测定

下述血清中葡萄糖含量的测定实验采用 2 min 的反应时间。吸取 50 μ l 血清，按实验方法 2 测定其电流值，并从同时绘制的工作曲线中计算血清中葡萄糖的含量。此外，与邻甲苯胺比色法和酶试剂盒比色法进行比较，结果见表 1。

表 1 血清中葡萄糖含量测定结果

项 目	血清(本校医院供样)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
本 法 测 定 结 果 (mg/dl)	99.88	110.82	57.05	101.46	103.78	98.78	105.11	96.31
	98.27	111.77	55.84	99.25	104.22	94.40	106.03	99.88
	100.67	110.53	56.23	96.16	101.07	93.92	105.60	99.88
	99.07	110.57	56.23	97.93	106.87	93.92	105.60	92.74
	103.87	111.39	54.62	94.84	105.54	93.92	105.60	94.88
平 均 值	100.35	110.02	55.99	97.93	104.29	94.99	105.59	96.74
标准偏差	2.17	0.54	0.88	2.59	2.17	2.12	0.34	3.13
变动系数	2.16	0.48	1.58	2.64	2.08	2.24	0.32	3.24
邻甲苯胺法 测定结果 (mg/dl)	98.0	107.01						
酶试剂盒* 法测定结果 (mg/dl)					102.68			97.93

*酶试剂盒是卫生部上海生物制品研究所临床诊断试剂实验中心生产的 GOD- 过氧化物酶，苯酚，4-氨基安替比林比色法试剂。

工作曲线的绘制：吸取 10、20、30、40、50 μ l 葡萄糖 (2 mg/ml) 的标准溶液，按实验方法 2 测定其电流值，绘制葡萄糖浓度与电流变化率的线性关系曲线。

五、结 束 语

用 PVA 固定化葡萄糖氧化酶制成酶电极，不仅材料易得、操作方便，而且能得到较薄的膜，其韧性、导电性良好，用此电极测定血清中葡萄糖是可行的。该电极使用 31 天 (共测定 450 次以上) 后性能开始明显变坏。

华侨大学校医院化实验室张旭同志，为邻甲苯胺法与酶试剂法代测并提供血清样品，谨表谢意。

参 考 文 献

- [1] 朱中勇、陈之航, 临床医学检验, 上海科学技术出版社, (1978), 280—282.
- [2] Updike, S. J. and Hices, G.P., *Nature*, 214, (1967), 986.
- [3] Notin M. Gullien, R. and Nabet P., *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 30, (1972), 193.
- [4] Tran-Minh, G. and Broun, G., *Anal. Chem.*, 47, (1975), 1359.
- [5] Nilsson, H. Åkerlund, A. and Mosbach, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 320, (1973), 529.
- [6] Foulds, N. C. and Lowe, C. R., *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, 82, 4 (1986), 1253.
- [7] Umaña M. and Waller, J., *Anal. Chem.*, 58, (1986), 2979.
- [8] Bartclott, P. N. and Whitaked, R. G., *J. Electroanal. Chem.*, 224, (1987), 37.
- [9] Guilbault, G. G. (廖辉南、陈石根译), 酶法分析手册, 上海科学技术出版社, (1983), 4-7.
- [10] Guilbault G. G. and Lubrane, G. J., *Anal. Chim. Acta*, 64, (1973), 439.

Preparation of PVA Immobilized Glucose Oxidase Electrode and Its Application in Serum Glucose Determination

Cen Chuanquan Zhuang Xijun

Abstract

In this paper, the authors put forward an enzyme electrode which immobilized glucose oxidase in polyvinyl alcohol (PVA) membrane. The membrane was tested for its conductivity. The result revealed a linear relationship between the rate of current response and glucose concentration in the range of 2×10^{-5} to 1×10^{-3} M. The electrode will be useful for serum glucose amperometric determination, with a result more satisfactory than that of ortho-toluidine or glucose oxidase-peroxidase colorimetric estimation.

Key Words glucose, enzyme electrode, glucose-oxidase electrode, immobilized enzyme, serum