

海藻酸钡固定化尿酶电极的研制及应用 血清中尿素含量的安培测定

岑 传 铨**

(应用化学系)

摘要 本文报道了用海藻酸钡固定干粉状的尿酶,并制成酶电极。文中对背景液,选择在 $1\text{mmol/L NaH}_2\text{PO}_4$, $1\text{mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$, 1mmol/L EDTA , 0.1mol/L KCl 10mmol/L 硫酸脲经 NaOH 溶液调节至 $\text{pH}=7.0$ 的背景液中测定。其电流值与尿素浓度在 6×10^{-5} — $4\times 10^{-3}\text{mol/L}$ 间成线性关系,检测限为 $2\times 10^{-5}\text{mol/L}$ 。本电极以安培法测定血清中尿素氮含量并与尿酶比色法进行比较结果较为满意。经100多次测定电极寿命约10多天,电极的稳定性和重现性良好。

关键词 尿素,酶电极,固定化酶,血清,尿酶电极

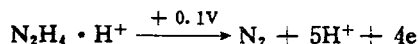
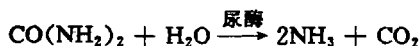
0 前言

测定血清中尿氮(BUN)含量,对临床诊断急性肾炎、尿毒症等疾病具有重要的作用。最常用的是比色法^[1],近年来采用尿酶分析 BUN 特效性好,但是酶制剂只能一次性使用,很不经济。用酶电极法测定 BUN 曾有过报道^[2-9],如 Guilbault, Nilsson, Robert 等人均用水溶性酶制剂与牛血清蛋白和戊二醛交联,或包埋在 PVC、PVA,聚丙烯酰胺或其衍生物中制成膜,他们将制得的膜有的与氨气敏电极或二氧化碳电极结合,有的与 pH 玻璃电极结合以电位法来测定尿氮。Kirstein^[10]等人用 PVA 固定水溶性的尿酶于铂电极上以安培法测定尿氮含量,文献[7]曾提到用 PVA 包埋粉状尿酶制成酶电极,却未报道对试样的分析,对固定化干粉状尿酶的酶电极以安培法测定 BUN 尚未见报道,我们在前人工作基础上通过试验,发现用海藻酸钡固定干粉状的尿酶并制成酶电极,方法简便,固定化手续简单易行,电极重现性稳定性良好。用该电极以安培法测定人体 BUN 与尿酶比色法进行比较,结果满意,测定尿素的线性范围为 6×10^{-5} — $4\times 10^{-3}\text{mol/L}$,寿命约10多天测定次数100多次。

* 本文1990—03—30收到。系1988年福建省自然科学基金课题。

** 张桂达、黄文彪同志参加本实验工作。

本方法基于下列反应



试样中的尿素在尿酶作用下水解为氨,同时使电极表面溶液的 pH 值升高,而电极表面溶液中的肼在 0.1V 的外加电压下,其氧化电流随 pH 的升高而增加,因此只要控制好背景液的 pH 值和缓冲容量,就可以在一定范围内其氧化电流与试样中尿素含量呈线性关系。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:(1)DHZ-1A 电化学综合测试仪($\varnothing 10\text{mm}$ 铂电极,Ag-AgCl 参比电极,铂丝辅助电极);(2) $\text{C}_{20}-\mu\text{A}$ 电流计;(3)78-1型磁力搅拌器(附自制恒温水夹套);(4)PHS-3型酸度计;(5)超级恒温槽。

试剂:(1)尿酶制剂(ART8489 E. Merck)5U/mg;(2)纤维素酯滤膜(孔径0.45 μm);(3)牛血清蛋白(B. R.);(4)戊二醛(B. R.);(5)海藻酸钠(C. P.);(6)氯化钡(A. R.);(7)透析袋用的半透膜;(8)磷酸盐背景缓冲液(pH=7.0):1mmol/L NaH_2PO_4 ,1mmol/L Na_2HPO_4 ,1mmol/L EDTA,0.1mol/L KCl,10mmol/L 硫酸肼用 NaOH 溶液中和至 pH=7.0;(9)Tris(三羟甲基氨基甲烷)-柠檬酸钠背景缓冲液(pH=7.0):1mmol/L Tris,1mmol/L 柠檬酸钠代替(8)中的磷酸盐外,其它试剂与(8)相同;(10)TEA(三乙胺)-柠檬酸钠(pH=7.0):用1mmol/L TEA,1mmol/L 柠檬酸钠代替(8)中磷酸盐外,其它试剂与(8)相同;(11)1mol/L 尿素标准溶液:用 A. R. 尿素分别用上述 pH=7.0 的背景溶液配制而成的。

1.2 尿酶的固定化与电极的制作

1.2.1 纤维素酯微孔滤膜吸附尿酶 取一定量干粉状尿酶分散于水中,澄清后吸取0.1ml 清液滴于纤维素微孔膜上,置于5—7℃冰箱中,干燥后放在铂片电极上,用透析膜包上再扎上O型橡皮圈,浸于背景液中保存备用。

1.2.2 牛血清蛋白(BSA)-戊二醛(GA)交联尿酶 称一定量干粉状尿酶于1ml12%BSA 水溶液中分散均匀,稍澄清后取澄清液15 μl 滴于铂电极上再加入2.5%的GA水溶液4 μl ,搅匀后在5—7℃冰箱中干燥,然后包上透析膜扎上O型橡皮圈浸于背景液中保存备用。

1.2.3 海藻酸钡固定化尿酶 称一定量干粉状尿酶于0.5ml 水中,分散均匀后加进0.5ml4%的海藻酸钠尽量混匀,取出0.05ml直接涂布在一薄层直径为1cm 的尼龙丝网上,将网浸泡在4%的 BaCl_2 中1h,取出网膜用蒸馏水冲洗多余的 BaCl_2 后将其贴于铂电极面上。包以透析膜扎上O型橡皮圈浸在背景液中保存备用。

1.3 实验方法

1.3.1 测定方法 将经实验方法(2)清洗过的酶电极浸入5ml 的背景溶液中与 Ag-AgCl 参比电极及铂丝辅助电极组成三电极体系的电解池,将此电解池置于带有恒温水夹套的电磁搅拌器上,电极与综合测试仪连接(恒电位系统)在0.1V 外加电压下搅拌保持 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温,平衡5min 时读取背景空白电流,然后在继续搅拌下用微量注射器注入一定量的标准溶液或试样

记录平衡5min 时的净电流值。

1.3.2 电极的清洗 将用过的酶电极浸入另一5ml 的背景溶液中在0.1V 外加电压下平衡清洗5min 后取出电极作为进行下一次测定用。

2 结果与讨论

2.1 酶的固定化方法的选择

我们曾在 Tris-柠檬酸钠 ($\text{pH}=7.0$) 背景液中用上述三种固定化酶电极按实验方法进行试验,发现:(1)用纤维素酯微孔滤膜固定化方法虽简单,但达到平衡的时间较长,再现性差测定尿素的线性范围窄,这可能是由于所用的尿酶是干粉状的酶制剂,不溶于水的固体杂质易堵塞膜的滤孔,造成膜电阻增大所致。(2)用 BSA-GA 交联法固定酶达到平衡的时间较前者短,但只能用很少量的酶制剂否则不易成膜而形成糊状物,测定尿素时的线性范围窄、电流小,这可能因为酶制剂中不溶于水的固体较多,影响与 BSA-GA 的交联,电极寿命短。(3)海藻酸钠法固定酶,方法简便、成膜较好,测定尿素的线性范围较大,再现性、稳定性好,感应时值短,操作非常简便,这由于海藻酸钠导电性能较好,膜的外层是海藻酸钠沉淀包着里面相当量的海藻酸钠,有利于质量传递。

本实验选用海藻酸钠来固定尿酶制成酶电极。

2.2 背景溶液的选择

由于脲的氧化电流的大小与溶液 pH 有关,为此我们用不含酶膜的铂电极外包一层透析膜,按实验方法(不加入尿素)分别在不同背景溶液中各加入不同量 NaOH,记录在不同 pH 下脲的氧化电流绘制 $[\text{NaOH}]-\text{pH}$ 和 $[\text{NaOH}]-i$ 曲线如图1—3所示。

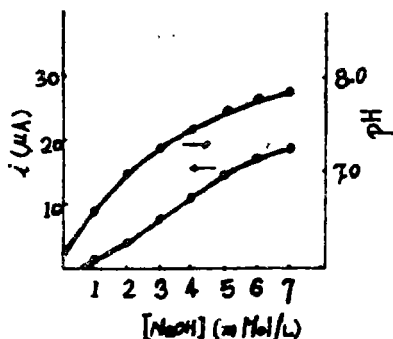


图1 TEA-Citrate 背景液中
[NaOH]与脲氧化电流及 pH 的关系曲线

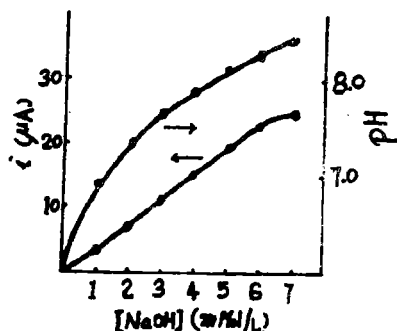


图2 在 Tris-Citrate 背景液中
[NaOH]与脲氧化电流及 pH 的关系曲线

由图可见,脲的氧化电流随 NaOH 浓度增大而增加,在一定 pH 范围内,电流与 NaOH 浓度成线性关系。不同背景溶液其 pH 范围是不同的,TEA 为背景液时 pH 范围为6.2—7.0,Tris 为背景液时 pH 范围为6.2—7.7,而磷酸盐为背景液时 pH 从6.1—8.5(>8.5未做)仍呈线性关系,更值得注意的是在磷酸盐溶液中 $[\text{NaOH}]-i$ 曲线的斜率较大、灵敏度较高,我们根据文献[11]关

于尿酶最适 pH 为 6.0—7.3,同时也依缓冲剂种类而变化的报道,本实验选用 pH=7.0 的磷酸盐缓冲液作为背景溶液。

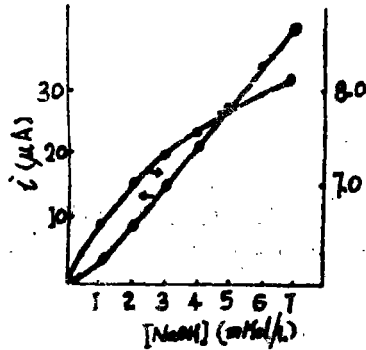


图3 在磷酸盐背景液中[NaOH]与脲氧化电流及 pH 的关系曲线

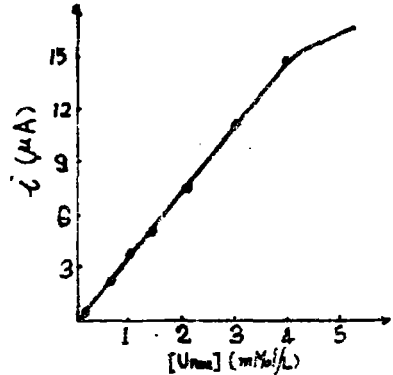


图4 [Urea]—i 关系曲线

2.3 硫酸脲用量的选择

当溶液 pH 一定时脲的氧化电流的大小与硫酸脲的浓度有关,因此加入不同量的硫酸脲,按实验方法记录 5min 时的净电流值,结果如下,当硫酸脲浓度为 5mmol/L, 8mmol/L 和 11.5mmol/L 时其电流值分别为 7.3μA, 8.6μA, 8.6μA, 本实验选用 10mmol/L 硫酸脲。

2.4 酶的负载的选择

称一定量的酶制剂按上述 2.1(3)海藻酸钡固定化方法制成酶的负载分别为 1.0U/cm², 1.5U/cm², 3.0U/cm² 和 10U/cm² 的酶电极,按实验方法对尿素标准溶液进行测定,实验结果表明四种不同负载的酶电极中过高酶负载(10U/cm²)的酶电极,其测定尿素的线性范围反而变窄,这也可能是由于酶制剂过多,其中所含的不溶性的固体杂质也多,影响了质量传递,我们选用酶的负载为 3.0U/cm²。

2.5 电极性能的稳定性和重现性

2.5.1 电极稳定性试验 在 3×10⁻³mol/L 的尿素浓度下按实验方法连续测定 6 次所得电流值其标准偏差为 0.011μA,变动系数为 0.16%。

2.5.2 电极重现性试验 将酶电极分别放在 2×10⁻³mol/L 和 1×10⁻⁴mol/L 的尿素溶液中,按上述实验方法反复测量四次,电流值结果如表 1。

表1 电极的重现性(μA)

项目	1	2	3	4
2×10 ⁻³ mol/L	7.6	7.7	7.6	7.5
1×10 ⁻⁴ mol/L	0.4	0.4	0.4	0.4

从上可见,电极的稳定性和重现性也是较好的,该电极经十多天反复使用约100多次。电极失效后重新制备不仅方法简单,而且性能仍然很一致。

2.6 线性范围

取不同量的尿素标准溶液分别注入5ml 磷酸盐(pH=7.0)的背景液中,按实验方法记录5min 时的净电流值作出[Urea]-i 曲线如图4所示,实验表明,尿素浓度在 $6 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-3}$ mol/L 间,其浓度与净电流成线性关系,检测下限为 2×10^{-5} mol/L。

3 尿酶电极的应用——血清中尿素含量的测定

取50 μ l 人体血清注于5ml 磷酸盐背景溶液中,用本文方法制得的海藻酸钡固定化尿酶电极,按实验方法用加入标准的工作曲线法计算血清中尿素的含量,并乘以0.4666(为尿素换算成尿素氮的系数)换算得尿氮的含量,结果见表2。

表2 血清中尿素氮含量测定结果

项 目	混合血清(本校医院供样)*					
	1	2	3	4	5	
本法结果	尿氮含量	14.01,15.13	16.81(×4)	17.94,19.06(×2)	19.05,19.62	21.30(×4)
	(mg/dl)	16.25(×2),14.57	18.49	20.18(×2)	20.18(×2),20.74	20.18
	平均值(mg/dl)	15.24	17.15	19.28	19.95	21.08
	标准偏差(mg/dl)	1.00	0.75	0.94	0.64	0.50
	变动系数(%)	6.5	4.4	4.9	3.2	2.4
尿酶比色法结果	尿氮含量	15.18,15.91(×2)	17.83,16.71(×2)	18.99(×3)	19.82,20.34	20.74(×2),22.40
	(mg/dl)	15.17(×2)	18.05,16.27	19.20,17.70	19.04,19.69,19.47	21.57,21.98
	平均值(mg/dl)	15.47	17.11	18.77	19.67	21.49
	标准偏差(mg/dl)	0.4	0.29	0.61	0.95	0.74
	变动系数(%)	2.6	5.2	3.3	4.8	3.4
相对误差(%)						
(与比色法比较)		-1.5	-0.23	+2.7	+1.4	-1.9

参 考 文 献

- [1] 朱忠勇、陈之航,临床医学检验,上海科学技术出版社,(1978),303—304.
- [2] Guilbault G. G. and Hrabankova E., *Anal. Chim. Acta*, 52(1970), 287.
- [3] Guilbault G. G. and Nagy G., *Anal. Chem.*, 45(1973), 417.
- [4] Anfält T., Granelli A. and Jagner D., *Anal. Letters*, 6(1973), 969.
- [5] Nilsson H., Åkerlund A. and Mosbach K., *Biochim. Biophys. Acta*, 320(1973), 529.
- [6] Hamaun H., Kühn M., Böttcher N. and Scheller, J. *Electroanal. Chem.*, 209(1986), 69—76.
- [7] 宣家祥、仝东卿,电分析化学学术会议论文集下册(1987),E 部36.
- [8] Tor R. and Freeman A., *Anal. Chem.*, 58,6(1986), 1042—1046.

* 血清样品由华侨大学校医院化验室张旭同志提供,谨表谢意。

- [9] Robert M. L. and Alexander M. Y. , *Anal. Chim. Acta*, 146(1983), 249—253.
[10] Olsson B. and Johansson G. , *Anal. Chim. Acta*, 171(1985), 345—350.
[11] G. G. 吉尔鲍特, 酶法分析手册, 上海科学技术出版社, (1983), 155.

An Urease Electrode Prepared by Barium Alginate Immobilizing and Applied to Amperometric Determination of Serum Urea

Cen Chuanquan

(Department of Applied Chemistry)

Abstract An enzyme electrode was prepared by immobilizing the dry powdered urease with barium alginate and was applied to the amperometric determination of serum urea nitrogen. The solution containing 1m mol/L NaH_2PO_4 , 1m mol/L Na_2HPO_4 , 1m mol/L EDTA, 0.1mol/L KCl, and 10m mol/L hydrazine sulfate and being neutralized to pH 7 with sodium hydroxide was chosen as background solution for the determination. Of which the current value bears a linear relationship to the concentration of urea in the range of 6×10^{-5} — 4×10^{-5} mol/L and the limit being 2×10^{-5} . As compared with colorimetric estimation, the determination shows a better result. The electrode has proved by more than 100 tests to have a life time of more than 10 days. It is good in stability and repeatability.

Key words enzyme electrodes, immobilized enzyme, urease electrode, serum, urea nitrogen