

酶-离子色谱法检测葡萄糖*

赖丽旻, 胡荣宗**, 翁玉华, 肖山

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要:应用酶反应催化性能高,反应选择性好以及离子色谱法快速、灵敏、准确的特点,率先提出酶-离子色谱法检测葡萄糖的新方法。在含葡萄糖样品溶液中加入一定量的葡萄糖氧化酶(GOD),在葡萄糖氧化酶的催化下,被测葡萄糖被氧化产生 H_2O_2 ,生成的 H_2O_2 与加入的 NO_2^- 进一步反应,生成的 NO_3^- 用离子色谱定性和定量测定。因为被测的葡萄糖与生成的 NO_3^- 存在定量关系,从而可以由 NO_3^- 的浓度计算出葡萄糖的含量。测定葡萄糖的线性范围在5~100 mg/L,测定了市售葡萄糖和蜂蜜中葡萄糖的含量,回收率分别为94%和94.5%。

关键词:葡萄糖;离子色谱;葡萄糖氧化酶

中图分类号:O657.33

文献标识码:B

文章编号:1006-3757(2002)04-0208-05

葡萄糖的分析测定在临床分析、生物过程、食品工业中一直占有十分重要的地位^[1]。测定葡萄糖由于糖类化合物的紫外吸收很弱而示差折光检测法的灵敏度又较低,因此用光分析方法比较困难。受研究者重视的葡萄糖传感器^[2]因为酶固定化的困难和使用寿命的限制难以商品化。Sanae Ikeda^[3]等提出了用酶和单柱离子色谱联用,同时测定尿素和碱金属离子。本文应用酶反应催化性能高,反应选择性好以及离子色谱法^[4]快速、灵敏、准确的特点,率先提出酶-离子色谱法检测葡萄糖的新方法,该方法在文献上还未见报道。

1 实验部分

1.1 实验仪器和试剂

实验仪器:离子色谱仪由自制的PCD-1脉冲电导检测器^[5]、核工业部北京化工冶金研究院YSA型8098A-2[#]阴离子分离柱,中科院上海原子核所科仪厂YSB-2型平流泵和自制的GXYZ-A电化学抑制柱组成。

色谱条件:淋洗液:4.80 mmol/L Na_2CO_3 + 3.00 mmol/L $NaHCO_3$,流速:1.50 mL/min,进样量:100 μ L。

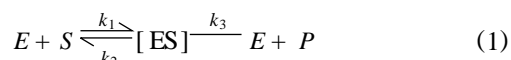
试剂:葡萄糖氧化酶(GOD):用pH=7.4的磷酸缓冲液配成20 U/mL的溶液(Sigma公司,100 U/

mg);葡萄糖:2.000 g/L,再根据需要稀释; NO_2^- :100 mg/L; H_2O_2 :2.000 g/L,用 $KMnO_4$ ^[6]标定,再根据需要稀释; H_3PO_4 :0.067 mol/L溶液;NaOH:0.1 mol/L。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

1.2.1 酶法分析的基本原理^[7]

酶与其底物反应的基本方程式由Michaelis与Menten提出,其反应机理是:底物S与酶E结合形成配合物[ES],随之分解出产物P,并释放出酶。



形成配合物[ES]的平衡常数 K_m 称为米氏常数,定义为 $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$,可以导出公式:

$$V = \frac{k_3 [E]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

当[S]远远小于 K_m 时,

$$V = \frac{k_3 [E]_0 [S]}{K_m} \quad (3)$$

由式(2)、(3)可以看出,对相同的底物浓度时,增加酶浓度 $[E_0]$ 时,可以提高反应速度。使用较高浓度的酶 $[E_0]$ 和较低浓度的底物[S],保证反应速度的相对迅速,使反应在较短的时间里完成。当反应完全时,样品中底物的浓度可由生成的产物的浓度来

* 海洋环境科学部重点实验室开放基金,福建省科技基金项目[2001H081],厦门科技基金项目[3502Z2001251]。

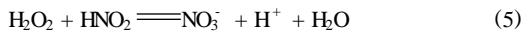
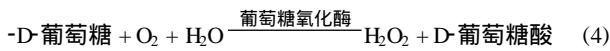
作者简介:赖丽旻,女,硕士研究生。

** 通讯联系人。 收稿日期:2002-08-17; 收到修改稿日期:2002-11-18。

算出. 或进一步通过偶联反应, 由偶联反应产物的浓度来指示底物的浓度.

1. 2. 2 实验原理

在含葡萄糖样品溶液中加入一定量的葡萄糖氧化酶(GOD), 在 GOD 的催化下, 欲测葡萄糖被氧化产生 H₂O₂, 生成的 H₂O₂ 与加入的 NO₂⁻ 进一步反应, 所生成的 NO₃⁻ 用抑制式离子色谱法定性和定量. 因为被测葡萄糖与生成的 NO₃⁻ 存在定量关系, 从而可以由 NO₃⁻ 浓度来计算葡萄糖的含量. 方程(4)、(5)是该方法的化学反应方程式.



葡萄糖的含量可由式(6)计算:

$$\text{葡萄糖} \% = \frac{C \times V}{m \times 10^6} \times 100 \% \quad (6)$$

式中 C 为测得的葡萄糖浓度(mg/L); V 为被测样品的总体积(L); m 为被测样品质量(g).

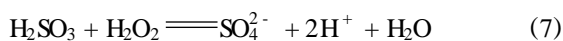
1. 3 实验方法

在定量待测液中加入 0.30 mL 的 20 U/mL GOD 溶液(pH=7.4)和适量的 100 mg/L NO₂⁻ 溶液. 反应 10 min, 此时间为 t₁. 用 0.067 mol/L 的 H₃PO₄ 溶液调节 pH 值为 2~3, 再反应 10 min, 此时间为 t₂. 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调为中性, 此溶液用三次水定容为 10 mL, 并用离子色谱法测定溶液中 NO₃⁻ 峰高. 用同样的方法做葡萄糖标准溶液与 NO₃⁻ 峰高的工作曲线, 求得待测溶液中葡萄糖的浓度. 并依据上述公式推算葡萄糖的含量. 整个反应的反应温度都为 30 ± 0.2 .

2 结果和讨论

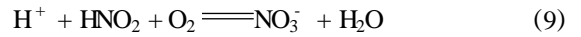
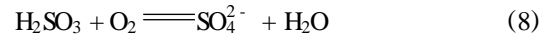
2. 1 还原剂的选择

查表^[8]计算得下列反应的标准摩尔反应吉布斯自由能 rG_m:



其中(5)式的 rG_m 等于 - 172.5 kJ/mol, (7)式的 rG_m = - 309.6 kJ/mol. 热力学数据表明 H₂SO₃, HNO₂ 都可被 H₂O₂ 氧化成可被常规离子色谱分析的 SO₄²⁻, NO₃⁻. 但溶液中的溶解氧是氧化剂, 必须考虑

O₂ 的干扰. 分别计算式(8)、(9)的 rG_m:



其中式(8)的 rG_m 等于 - 202.7 kJ/mol, 式(9)的 rG_m 等于 - 55.78 kJ/mol. 从热力学角度看, SO₄²⁻ 容易被 O₂ 氧化生成 SO₄²⁻, 干扰测定结果, 而 NO₂⁻ 不易被 O₂ 氧化, 因此选择 NO₂⁻ 为还原剂以还原 H₂O₂. 实验结果也证实了上述理论分析.

2. 2 方法的可行性

在反应条件一致的情况下, 图 1(b) 是不加入 GOD 所测的离子色谱图, NO₃⁻ 峰高几乎为 0, 说明没有 GOD 的催化, 葡萄糖被氧化的速度十分缓慢. 图 1(a) 是加入 GOD 所测的离子色谱图, 可以看出 NO₂⁻ 峰高减小而 NO₃⁻ 峰高有明显的增高. 说明葡萄糖在加入 GOD 后可较快地被氧化生成 H₂O₂. H₂O₂ 氧化 NO₂⁻ 生成 NO₃⁻. 实验证明了上述测量原理的可行性.

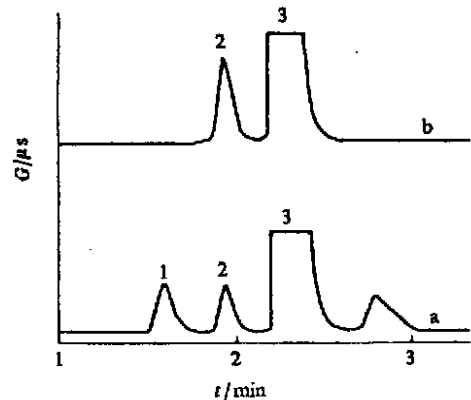


图 1 样品的离子色谱图

Fig. 1 Ion chromatogram of samples

a. 加入 GOD b. 未加 GOD

1. 系统峰 2. NO₂⁻ 3. 磷酸根 4. NO₃⁻

洗脱液: 4.8 mmol/L Na₂CO₃ + 3 mmol/L NaHCO₃

流速: 1.5 mL/min, pH=7.4, [葡萄糖] = 10 mg/L, GOD = 6 U

t₁ = 10 min, [NO₂⁻] = 20 mg/L, pH=2~3, t₂ = 10 min

2. 3 反应速度与反应时间的选择

2. 3. 1 H₂O₂ 与 NO₂⁻ 反应时间(t₂)的选择

图 2(b) 为 H₂O₂ 与 NO₂⁻ 反应生成的 NO₃⁻ 峰高与时间的关系图. 从图 2(b) 可以看出, 随着反应时间的增大 NO₃⁻ 峰高也增大, 但 10 min 后峰高增长缓慢. 同时考虑到 NO₂⁻ 在酸性条件下会歧化的影响,

选择反应时间 t_2 为 10 min, 然后立即用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 约为 7 以终止反应继续进行.

2.3.2 葡萄糖氧化时间 (t_1) 的选择

选择 t_2 为 10 min, 测定葡萄糖在酶的催化下被氧化, 反应时间 t_1 的变化对 NO_3^- 峰高的影响, 测定结果如图 2(a). 从图 2(a) 可以看出, 随着反应时间的增大, NO_3^- 峰高也增大. 当反应 10 min 后, NO_3^- 峰高变化不明显, 因此选择反应时间 t_1 为 10 min.

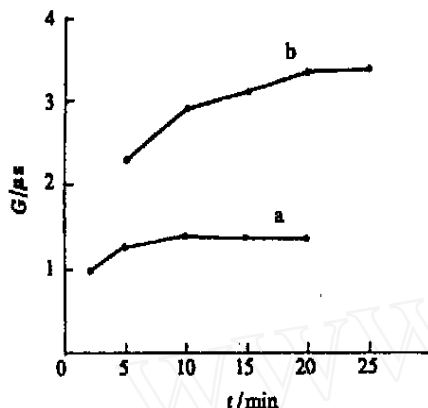


图2 反应时间对 NO_3^- 峰高的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on the peak height of NO_3^-

a. t_1 b. t_2 洗脱液: 4.8 mmol/L Na_2CO_3 + 3 mmol/L NaHCO_3
流速: 1.5 mL/min, pH=7.4, [葡萄糖] = 10 mg/L, GOD = 6 U
pH=2~3, [NO_2^-] = 20 mg/L, [H_2O_2] = 8 mg/L

2.4 定量关系

2.4.1 H_2O_2 浓度与生成的 NO_3^- 浓度的线性关系

图 3 是 H_2O_2 浓度与反应生成的 NO_3^- 峰高的线性关系, 线性范围为 0.40 ~ 20 mg/L, 回归方程为 $y = 0.3406x + 0.3403$, 相关系数的平方 $R^2 = 0.9976$.

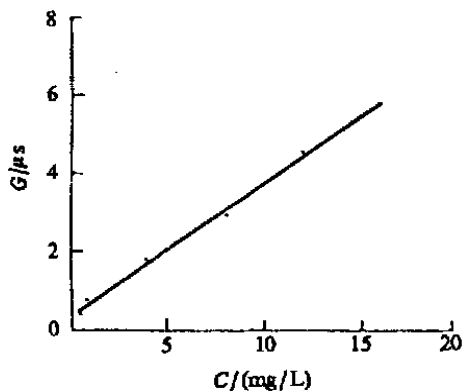


图3 H_2O_2 的浓度与生成的 NO_3^- 峰高的线性关系

Fig. 3 Calibration curve of H_2O_2

洗脱液: 4.8 mmol/L Na_2CO_3 + 3 mmol/L NaHCO_3
流速: 1.5 mL/min, [NO_2^-] = 20 mg/L, pH=2~3, $t_2 = 10$ min

2.4.2 葡萄糖的浓度与生成的 NO_3^- 浓度的线性关系

按实验方法测定葡萄糖的浓度与反应生成 NO_3^- 的峰高之间的线性关系, 如图 4, 线性范围在 5 ~ 100 mg/L, 直线回归方程为 $y = 0.021x + 0.5998$, 相关系数 $R^2 = 0.9977$.

从图 3、图 4 可以看出, 采用本方法从反应生成的 NO_3^- 的色谱峰高可以定量分析被测溶液中葡萄糖的含量.

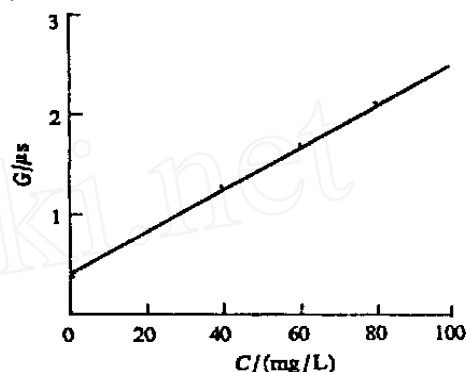


图4 葡萄糖的浓度与生成的 NO_3^- 峰高的线性关系

Fig. 4 Calibration curve of glucose

洗脱液: 4.8 mmol/L Na_2CO_3 + 3 mmol/L NaHCO_3
流速: 1.5 mL/min, pH=7.4, GOD = 6 U, $t_1 = 10$ min
[NO_2^-] = 20 mg/L, pH=2~3, $t_2 = 10$ min

2.5 实验条件的选择

2.5.1 pH 值的选择

pH 值及外来盐类都能影响酶反应速度, 因此, 考虑到 GOD 的最佳反应条件 pH 值为 7, 并使其与生理条件相接近, 在葡萄糖被氧化的 t_1 时间内选择 pH 值为 7.4^[7] 的磷酸盐缓冲溶液. 在中性条件下过氧化氢几乎不与 NO_2^- 反应; 在酸性条件下 H_2O_2 具有强氧化性, 可氧化 NO_2^- , 但 NO_2^- 在强酸条件下会发生歧化反应. 经过实验确定, 在 NO_2^- 被氧化的 t_2 时间内, 反应介质的 pH 为 2~3. 此后, 用 0.1 mol/L NaOH 调节被测溶液的 pH 约为 7 以终止反应.

2.5.2 酶用量的选择

从等式 (3) 可以知道, 理论上酶浓度每增加一次应观察到反应速度有相应的增大. 但是, 在酶浓度很高的时候, 却往往不能保持线性关系. 图 5 是在相同的反应时间里, GOD 的用量对生成的 NO_3^- 的离子色谱峰峰高的影响. 即 GOD 的用量对反应速度的影响. 从图 5 可以看出, 随着 GOD 的用量的增加催化反应的速度加快. 在 GOD 的用量为 6 U 时,

催化反应速度的加快就已不明显,所以选择 GOD 的用量为 6 U.

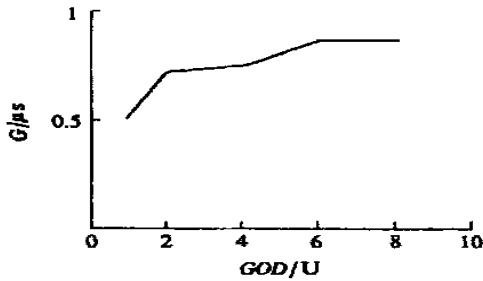


图5 GOD的用量与 NO_3^- 峰高的影响

Fig. 5 Effect of GOD dosage on the peak height of NO_3^-

洗脱液:4.8 mmol/L Na_2CO_3 + 3 mmol/L NaHCO_3

流速:1.5 mL/min, pH=7.4, [葡萄糖]=10 mg/L

$t_1=10$ min, $[\text{NO}_2^-]=20$ mg/L, pH=2~3, $t_2=10$ min

2.6 洗脱液的选择

随着洗脱液浓度的增加各离子的保留时间降低而检测灵敏度提高. 综合考虑到洗脱液浓度对 NO_3^- 的检测灵敏度、保留时间及分离度和对磷酸根保留时间及峰高的影响, 则确定洗脱液浓度为4.8 mmol/L Na_2CO_3 + 3 mmol/L NaHCO_3 .

2.7 精密度的测定与干扰

重复测定葡萄糖浓度为40 mg/L的样品5次, 相对标准偏差RSD(%)为3.93. 与葡萄糖经常共存的相同浓度的柠檬酸、蔗糖不干扰其测定.

2.8 样品的检测

测定了市售葡萄糖和蜂蜜的葡萄糖含量, 并计算了回收率, 结果如表1. 测得结果与文献报导相一致^[9].

表1 实际样品的分析

Table 2 Analytical result of samples

| 样品 | 测得值(mg/L) | 加入量(mg/L) | 检测值(mg/L) | 回收率(%) | 葡萄糖含量(%) |
|-------|-----------|-----------|-----------|--------|----------|
| 市售葡萄糖 | 37.4 | 20 | 56.2 | 94 | 93.5 |
| 蜂蜜 | 19.2 | 20 | 38.1 | 94.5 | 46.6 |

3 结论

本实验方法融合了酶反应催化性能高, 反应选择性好以及离子色谱法快速、灵敏、准确的特点, 实验表明该方法可以快速、准确地测定样品中葡萄糖的含量.

参考文献:

[1] Stanislav Miertus, Jaroslav Katrik, Andrea Pizzariello, Miroslav Stred'ansky, Juraj Svitel, Jozef Svorec. Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring [J]. Biosensors & Bioelectronics, 1998, 13: 911.

[2] Shaojun Dong, Xu Chen. Some new aspects in biosensors[J]. Reviews in Molecular Biotechnology, 2002, 82: 303-323.

[3] Sanae Ikeda, Hideki Morino, Junko Motonaka, Yuji Mishima. Non-suppressed ionchromatography of the mixture of urea and alkmetal ions utilizing the enzyme reaction[J]. Analytical letter, 1998, 31(1): 93-104.

[4] 牟世芬, 等. 离子色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001, 6.

[5] 周志有, 林水潮, 王建华, 胡荣宗. 方波激励脉冲电导检测器[J]. 分析仪器, 2000(4): 17-21.

[6] 化学试剂部标准汇编 1984[M]. 北京: 中国标准出版社, 1986, 364.

[7] 吉尔鲍特 G G(美). 酶法分析[M]. 北京: 科学出版社, 1977, 12.

[8] 黄启巽, 魏光, 吴金添. 物理化学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1996, 471-481.

[9] 李滨, 曹艳, 李燕敏, 赵雅琴. 蜂蜜中糖类测量方法的研究[J]. 中医药学报, 2000, (2): 43-44.

Detection of Glucose by Enzyme-Ion Chromatography

LAI Li-min , HU Rong-zong , WENG Yu-hua , XIAO Shan

(Department of Chemistry , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract : It is well known that enzyme reactions usually proceed with good efficiency and good selectivity. Ion chromatography is rapid , sensitive and precise. The two excellent methods were combined to make a enzyme-ion chromatography to determine glucose. Glucose was oxidized with the catalysis of glucose oxidase to produce hydrogen peroxid , which could oxidize added nitrite into nitrate. Then nitrate was determined by ion chromatography. According to the peak height change of nitrate caused by glucose , glucose could be quantitatively determined with the linear range of its concentration in 5 ~ 100 mg/L. The method was applied to analysis glucose in two food samples , with 94 and 94.5 recovery percent respectively.

Key words : glucose ; ion chromatography ; glucose oxidase

Classifying number : O657.33

请速订阅 2003 年《分析测试技术与仪器》

如果您想

了解当代分析测试领域的新进展与新动向

交流分析测试研究的新理论与新成果

开发分析测试研究工作的新技术与新方法

扩展分析测试仪器的新用途与新功能

研制分析测试的新仪器与新组件

.....

请您订阅向国内外公开发行的《分析测试技术与仪器》杂志,刊号 $\frac{\text{ISSN } 1006 - 3757}{\text{CN } 62 - 1123 / \text{O}_6}$, 邮发代号:54 - 90,定

价 8 元/册,全年定价 32 元. 投稿请与《分析测试技术与仪器》编辑部联系,联系电话:(0931)8277660, E-mail: FXCS@ns.lzb.ac.cn,联系人:张晓鸿,地址:甘肃省兰州市天水路 342 号,中国科学院兰州化学物理研究所.