

离子选择性电极在生理学及医学研究中的应用与进展

苏 渝 生

(中国科学院南京土壤研究所)

离子选择性电极测定生物体离子活度或浓度,无需提纯,可直接对活体进行微量、连续动态检测,灵敏度高,而且费用省。在它表面上加上某些活性物质,还可形成其他专一性生物传感器。此文介绍它在生理学与医学中的应用,实际上它是一项在生物学其他分支也有着广泛应用前景的新技术。

离子选择性电极 (Ion Selective Electrode, 简称 ISE) 是一种电化学敏感器,它可以有选择地测定溶液中某一离子的活度或浓度。离子对于生物机体的重要性早已为人们所认识,但是离子在活组织中的形态和作用仍然是有待探索的问题。例如在五十年代末,超速离心机的试验结果曾说明血浆蛋白结合 10% 的钠和 20% 的钾,这个观点在生理学和医学界曾流行一时,后来用 pNa 玻璃电极研究证明血浆中的钠和钾实际处于全部离解的状态。又例如离子化钙是生理活性物质,它在神经递质释放的痛调节中起重要作用。已证明脑啡肽是参与针刺镇痛的,目前又普遍认为 Ca 离子对抗吗啡镇痛,吗啡可降低神经元钙,但吗啡镇痛又与针刺镇痛相似,若针刺镇痛有一部分系通过内源性镇痛物质释放,那么可以设想,在针刺镇痛过程中,当在脑室内注射肽酶抑制剂杆菌肽以后,在增强电针镇痛效应的同时,应伴有 Ca^{2+} 离子活度的下降,相反,用蛋白质合成抑制剂环己亚胺处理,则应在减弱电针镇痛的同时增高 Ca^{2+} 离子的活度。最近由于使用了钙 ISE, 这项研究才有所进展。总之,ISE 作为一项新技术七十年代初期开始用于生理学及医学的研究,最近又有了新的进展。本文将简要介绍 ISE 的基本原理、性质、应用与进展。

一、ISE 的原理

将 ISE 与适当的参比电极配合,插入待测溶液(可以是容器包围的溶液或活体组织的某一部),就构成电化学电池。这个电池的电动势 E 由下式决定:

$$E = E_M + E'_M + E'_R + E_R + E_i \quad (1)$$

式中 E_M 为离子选择性电极膜与外部试液接触处的电位, E'_M 是膜与有固定离子活度的内溶液接触处的电位, E_R 为参比电极的电位, E'_R 为内参比电极的电位,在不使用内参比电极而使内膜与金属直接接触时, $E'_M + E'_R$ 为接触电位所代替, E_i 为液接界电位,在一定条件下,式(1)右边除第一项外,其它各项为常量,故式(1)可以写成:

$$E = \text{常数} + E_M \quad (2)$$

当电极有 Nernst 功能时, E_M 是与溶液中离子活度 a_A 有关的量:

$$E = E^{0''} + \frac{RT}{Z_A F} \ln a_A = E^{0''} + \frac{2.303}{Z_A F} RT \log a_A \quad (3)$$

显然,这里的 $E^{0''}$ 与通常意义的标准电位不同,有时称 $E^{0''}$ 中所包括的 $E'_M + E'_R$ 为电极的零电位。

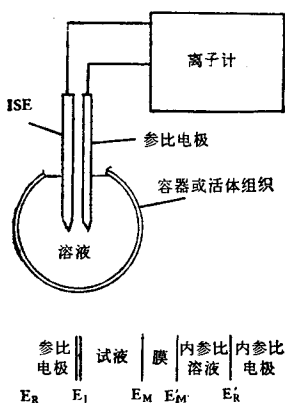


图 1 ISE 工作原理简图

在有干扰离子时,说明 ISE 测量电池电动势的公式 (Nernst-Никольский 公式)是:

$$E = E^{0''} + \frac{RT}{Z_A F} \ln \left[a_A + \sum_{x=B, C, \dots} K_{A,x}^{\text{pot}} a_x^{\frac{Z_A}{Z_x}} \right] \quad (4)$$

式中 R 为气体常数 (8.3144 焦耳/度·克分子), F 为法拉第常数 (96484.6×10^4 库仑/克分子), T 为绝对温度 ($^{\circ}K$), a_A 、 Z_A 及 a_x 、 Z_x 分别是待测离子及干扰离子的活度与电荷数, $K_{A,x}^{\text{pot}}$ 为电极对于 x 离子相对于 A 离子的电位选择性系数。因此在 $K_{A,x}^{\text{pot}}$ 小到可以忽略不计或在简单情况下可以估算时,由测得的电动势可以计算待测离子的活度。由于 ISE 的测量电池输出的讯号为高内阻的直流电压,所以离子计实质为一高输入阻抗,极低输入电流的直流电压表,并外加了一些补偿式 (3) 中 $E^{0''}$ 项的定位器及 $2.303/Z_A F$ 项的温度调节器等装置。

二、ISE 的性质与特点

ISE 的主要性质^[6]

1. 功能电位 指在给定的活度(或浓度)范围内 ISE 响应的电位与溶液中待测离子活度的负对数用式 (3) 表示时的线性关系。此直线的斜率为(或近似) $(2.303/Z_A F) RT$, 此性质又称电极的 Nernst 响应。

2. 检测极限 将 ISE 的测量电池的电动势对待测离子活度的负对数作图,得到校准曲线(图 2),其直线部分的外延线与完全偏转后的

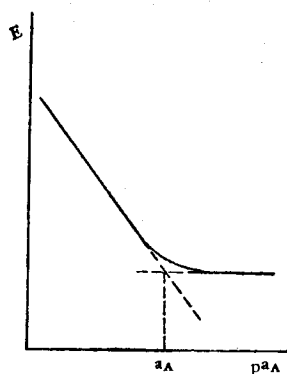


图 2 ISE 实用的检测极限

水平线的交点所对应的活度 a_A 为 ISE 的检测极限。检测极限主要与电极膜材料的性质及溶液的组成等因素有关。

3. 选择性 指 ISE 对同一溶液中不同离子的区别能力。它不同于在分离过程中的类似术语,一般用式 (4) 中的 $K_{A,x}^{\text{pot}}$ 来表示。显然,此值愈小表明 ISE 抗干扰能力愈强。

4. 电阻 由 ISE-溶液-参比电极组成的测量电池,其内阻为三者电阻之和。由于大多数 ISE 的电阻比另两个大得多,所以实际测得的电池内阻大体上代表了 ISE 的电阻。通常用于生理学及医学的微 ISE 有较高的内阻,对测量有较大的影响。

5. 漂移 指在溶液组成及温度一定的溶液中,某一 ISE 测量电池的电动势随时间缓慢有序的改变。漂移对于原位(如肌肉组织)的连续测定有较大的影响,在任何情况下,总是力求选择漂移最小的电极。

6. 动态响应 指 ISE 跟踪离子活度(或浓度)变化的时间性质,对于生理学研究有重要意义。

ISE 的主要特点 其一,由式 (3) 可见,ISE 可在其线性范围内进行等精度测量。通常 ISE 的线性范围为 10^{-1} — $10^{-5} M$, 可见 ISE 能在离子活度(或浓度)有很大幅度变化的情况下(达一万或数十万倍)进行测定;其二,ISE 可以直接测得离子的活度,此为任何其它仪器分析手段所不及。此外,ISE 还可测定若干气体(如 CO_2 、 NH_3 、 H_2S 及 NO_2 等)以及对生理学及

医学研究有重要意义的分子态物质;其三,有灵巧价廉的优点,能制成各种形状,进行采样或连续在线检测,或以微电极的形式插入活体组织测定。

目前 ISE 的主要缺点是除了若干种较成熟的 ISE 外,大多数选择性还不太理想,同时还存在不同程度的漂移现象,因此影响测定精度。为了更好地发挥 ISE 的效能,需要充分了解 ISE 的性能和掌握必须的分析技术。

三、ISE 应用于生理学及医学研究
必须注意的基本问题^[8,10,11]

1. 灵敏度与准确度 生理学和医学的检测对象是人或动物的体液(血液、脑髓液、脊髓液、汗液及尿液等)以及活体组织,除尿液及汗液外其它体液的组成变化很小。由表 1 可见,在正常的血浆内,主要离子 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 和 HCO_3^- 浓度的变化范围很窄,相应的 ISE 在有 Nernst 响应时,37℃时理论的电位变化值最小为 2.06 毫伏(对 Ca^{2+}),最大为 11.35 毫伏(对 K^+)。以 Ca^{2+} -ISE 测定血浆中的 Ca^{2+} 为例,在中值浓度 2.6 毫克分子/升附近,欲鉴别 $\pm 5\%$ 浓度的变化,由式(3)计算出相应的电极电位变化为 $\begin{smallmatrix} +0.20 \\ -0.21 \end{smallmatrix}$ 毫伏。欲使测定电位的可信度在 80% 以上,准确度应为 $0.20 \times (100-80)\% = 0.04$ (毫伏)。又对式(3)(自然对数表达式)求得,

$$dE = S \frac{da_A}{a_A} = S \frac{dc_A}{c_A} \tag{5}$$

其中 c_A 为浓度, $S = \frac{RT}{Z_A F}$, 可求出当测定电

位误差为 0.04 毫伏时,对一价离子所引起的测定浓度的相对误差为 0.15%,对二价离子为 0.30% (37℃)。可见若测定血浆中各种离子的电位准确度达到 0.04 毫伏,能够明确响应 5% 浓度的变化。生理学和临床化学的研究比较关心的是在各种条件下体液组成偏离正常值的情况,这也是灵敏度的大小和重现性的问题。由以上计算得知,在生理学和医学研究使用的 ISE 离子计测量范围并不要求很宽,但需具有较高的灵敏度及稳定性,最好具有 ± 0.05 毫伏的准确度。

2. 离子活度系数及络合问题 在体液,特别是在血浆中,无机离子可能处于以下四种状态: 离解、未离解、与有机阴离子络合及与蛋白质结合。单价阳离子在血浆中一般没有络合形式,但血清中有 50% 以上的钙被络合,镁也部分地被络合,并且主要被蛋白质所络合。

由于 ISE 测得的结果是活度,虽然活度与浓度间有非常简单的关系 ($a = fc$),并且在水溶液中当浓度很低时活度就等于浓度 ($f = 1$),但在血液和其它体液中大多数离子的活度系数不能准确测出。在血浆中钠和钾是全部离解的,因此可假定其活度系数与在同一离子强度的水溶液中相同,所以用 ISE 测定 K^+ 和 Na^+ 离子的活度比较简单,而钙的活度系数则较难确定。在用 Ca^{2+} -ISE 的实测电位求解 Ca^{2+} 离子的活度时,需经校正和其它的判别技术。

表 1 血浆中主要无机离子的含量及相应电极电位变化的计算值

离 子	平均值*	95% 的范围	相应的克分子范围	ΔpX	ΔE (毫伏), t℃							
					0°	5°	10°	15°	20°	25°	30°	37°
钠	144.5	138—151	1.38×10^{-1} — 1.51×10^{-1}	0.0391	2.12	2.16	2.20	2.24	2.27	2.31	2.35	2.41
钾	4.3	3.4—5.2	3.4×10^{-3} — 5.2×10^{-3}	0.1845	10.00	10.18	10.36	10.54	10.73	10.92	11.10	11.35
镁	0.85	0.65—1.05	6.5×10^{-4} — 1.05×10^{-3}	0.2083	5.65	5.75	5.85	5.96	6.06	6.16	6.27	6.41
钙	2.6	2.4—2.8	2.4×10^{-3} — 2.8×10^{-3}	0.0670	1.82	1.85	1.88	1.92	1.95	1.98	2.02	2.06
氯	100	101—111	1.01×10^{-1} — 1.11×10^{-1}	0.0410	2.22	2.26	2.30	2.34	2.38	2.42	2.46	2.52
碳酸氢根	24.9	21.3—28.5	2.13×10^{-2} — 2.85×10^{-2}	0.1264	6.85	6.97	7.10	7.23	7.35	7.48	7.60	7.78

* 1. 血浆组成引自: Diem, K. and Lentner, C. *Scientific Tables*, 7th ed, Ciba-Geigy Basle, Switzerland and Macclesfield, U. K., 1970.
2. 单位: 毫克分子/升, ΔpX 及 ΔE 为作者计算结果。

3. 体液及活体组织中的液接界电位 在参比电极盐桥和体液之间形成的液接界电位 E_j 将对测量带来不利的影响。虽然许多体液离子组成的范围比较狭窄,但由于 ISE 在测定体液各组分离子时响应电位变化的幅度较小,对灵敏度及重现性要求较高(详前),因此即使 E_j 的不稳定性为 0.1 毫伏,也将导致测量结果明显的误差。

在盐桥尖端出现的液接界电位实质上是扩散电位,由盐桥界面上两种以上的离子淌度不等造成电荷的不平衡分布所引起。在样液与盐桥之间形成的“残余液接界电势”与溶液的离子强度与 pH 值有关,但因体液(如血浆)含蛋白质胶体,后者的电荷又影响离子的淌度,因此即使配制同一离子强度的标准溶液,体液中的液接界电位也无法用 Henderson 公式校正。已经证明,在清液和悬液的平衡液中,参比电极放置的部位明显影响指示电极测出的 pX 值或 pH 值,所以在体液或活体组织内部测定时,要求参比电极尽可能接近指示电极,更关键的是应选择有高度重现性的液接界的结构,同时要避免体液中的胶体或其它物质堵塞盐桥端,否则将造成液接界电位 E_j 的明显漂移。有的研究证实若将血样吸入毛细管中,并垂直插入盛有盐桥溶液的容器,可以得到重现性较好的结果。在活体组织测定中使用微 pH 玻璃电极及 pNa 玻璃电极时,建议将指示电极与参比电极安置在同一轴上,形成毛细管外套式的参比电极。其它被推荐的盐桥形式有醋酸纤维素隔膜盐桥以及更稳定的连续流动液接界结构,但后者较难用于活体组织测定。若体液中某一组分离子浓度固定,则可用对此离子响应的一个 ISE 与对变化的待测离子响应的 ISE 组成无液接界电池,由此电池的电动势求出待测离子的活度。

4. 活体组织测定中的生物电位、流动电位及微参比电极盐桥的尖端电位 活体组织测定包括肌肉组织测定,细胞内测定及心血管内测定等。已证明在心血管中测定时,流动电位可能影响平衡读数,而脉动压(Pulsating pressure)又可能影响液接界电位。

活体组织细胞膜电位或其它的生物膜电位与膜内外离子活度的大小有关。在活体组织中测定时,要尽可能避免生物电位叠加在 ISE 响应的电位上。比较有效的办法是使参比电极尽可能靠近指示电极,同时采用一个三电极系统,例如可用惰性金属(铂或钨)制成薄的套管,固定在微参比电极的外毛细管上,形成第三个电极,能有效地消除生物电位的干扰。

当用极细的玻璃毛细管灌注盐桥溶液,并插入活体组织时,由于静电张力,在界面上又可能产生尖端电位(tip potential)。若插入参比电极固定良好,此值变化很小;若未固定,由示波器可观察到干扰讯号。

5. 测试技术问题

(1) 显示方法与校准 按照 ISE 测定的基本依据 Nernst 公式,有四种显示方法:线性的毫伏显示,线性的 pX 值显示,线性的浓度显示(离子计需设反对数放大器),非线性的对数浓度显示(误差较大)。在临床化学及医学中极少用 pX 等指标,而通用每升毫克分子数或毫克当量数来表示浓度。考虑到体液组成变化很小,相应 ISE 响应的电位变化也很小,为提高测量的准确度,可采用毫伏读数经计算或校准曲线求解的办法。

在选择校准用的标准溶液方面,由于已证明在血浆中的 K^+ 和 Na^+ 是完全离解的,因此有可能用组成接近的同一离子强度的标准溶液校准,例如测定血 K^+ 的标准可用基准 NaCl 配制,使总离子强度为 0.150 克分子/升,与血清离子强度大致相等。Covington 等^[12] 由水化理论提出的 pK 及 pCa 活度标准是:

$$\begin{aligned} & a: 0.1458 \text{ mol NaCl Kg}^{-1} \\ & \quad + 0.0042 \text{ mol KCl Kg}^{-1}, \quad pK = 2.504 \\ & b: 0.1462 \text{ mol NaCl Kg}^{-1} \\ & \quad + 0.000126 \text{ mol KCl Kg}^{-1} \quad pCa = 3.360 \\ & c: 0.1422 \text{ mol NaCl Kg}^{-1} \\ & \quad + 0.0041 \text{ mol KCl Kg}^{-1} \\ & \quad + 0.00122 \text{ mol CaCl}_2 \text{ Kg}^{-1}, \\ & \quad pK = 2.514; \quad pCa = 3.373; \\ & \quad pNa = 0.966 \end{aligned}$$

近年来已为欧美等国研究者所采用。

(2) 干扰及其排除 ISE 在体液中测定离子时的化学干扰与水溶液中相同, 不赘述。已证明, 体液中的其它组分如胆红素、胆固醇、糖及尿素不影响玻璃电极的性能, 但蛋白质在 PVC 电极膜上不易洗净。此外有些气态麻醉剂会使 PVC 膜溶胀。Orion 证明体液内含油的组分影响 PVC 膜 Ca^{2+} 电极的功能电位。

ISE 在活体组织中测定时所碰到的主要困难之一是电干扰问题。电干扰的主要原因是用于活体组织测定的微 ISE 直流电阻很大, 往往超过 $10^9\Omega$; 若 ISE 的电阻高达 $4 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}\Omega$, 要求配套离子计的输入阻抗 $\geq 1 \times 10^{13}\Omega$, 输入电流 $< 1 \times 10^{-13}\text{A}$ 。用于活体组织测定时配用的参比电极电阻也较高(数千欧至数兆欧), 由于各种原因均可引入错误的讯号, 其中包括电源干扰, 接地杂散电流及测量部位杂散电位的干扰。为排除干扰, 须采取以下措施: (a) 待测活体安置在与地隔离的绝缘台面上; 有条件时应在屏蔽室中工作, 屏蔽网接地; (b) 离子计本身可通过一个大的非电解电容器与地相连接, 以避免因参比电极与活体组织间产生的电位沿漏地电阻产生的压降叠加在 ISE 响应的讯号上; 仪器的参比端不可再作它用(如接地); (c) 采用双端高输入阻抗的放大器。在精细的研究中, 应将输入级与输出级隔离, 调制信号成为方波或正弦波, 以变压器耦合, 最后解调, 电源需单独隔离。

四、进 展

近年来, ISE 在用于生理学及医学的研究中采用了许多新元件和新技术^[4-5], 主要有:

1. 研制新的微电极和相关的测定技术 最近报告了一系列专用的微电极^[6], 其中取样测定的有小球形电极和锥形、凹形、毛细管形及流通形等; 用于活体组织及细胞内测定的电极多为针形(图 3), 在针形电极中性能较可靠的有微 pH、微 pNa 及微 pK 玻璃电极^[7], 它们的漂移较小。有一种中性载体微 Ca^{2+} 电极, 其敏感膜的组成为 10% 的二-[11-(乙氧基烷基)

十一烷基]-N, N'-4, 5-四甲基-3, 6-二噁辛基-1, 8 二酰胺, 8% 四苯砷或 10% 四苯硼钾, 10% PVC 及 72% 磷硝基苯辛醚。另一种液体离子交换剂微电极由管径 2 毫米的硼硅玻璃制成, 尖端直径 < 0.5 微米, 内充 Corning 477315 交换剂, 可测细胞内 Cl^- 离子活度。用于体内测定的导管形电极如图 4 所示。另一种导管形 pH 电极是聚合式膜电极, 在 1000 分共聚物(含 60% 聚二噁烷及 40% 聚双酚 A-碳酸酯)中加入 3 份磷-十八烷环氧基, 间-氯苯基脲中草酰胺, 制成蘸膜液, 然后将固定在 PVC 管前端的陶瓷塞在此液中反复浸渍成膜, 装入内参比电极和内溶液。此电极电阻为 $10^8\Omega$, 在生理溶液 pH 范围内, 其响应为 Nernst 计算值的 95%。不久以前, 在美国临床化学学会(AACC)上报告了一类所谓离子选择性电极应变片(disposable ISE slides), 系将含电活性物质的聚合物涂敷在适当的参比电极导体上而成。目前已有 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 及 CO_2 等, 用于临床分析的 Kodak 电测系统已用此应变片代替传统的流通式电极。

2. 化学敏感半导体器件(CSSD) 它是 MOSFET(有金属栅的场效应器件)、OSFET(无金属栅的场效应器件)、栅控二极管及场效应栅控电容等电压——电流转换器件的总称, 目前应用较成功的主要是由 MOSFET 构成的离子选择性场效应三极管, 在此管栅极氧化物上真空蒸发一层 Si_3N_4 可得 pH 响应器件, 若

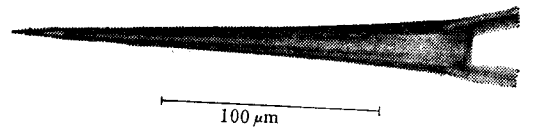


图 3 测定细胞内 Na^+ 离子活度的针形 pNa 玻璃电极 (R. C. Thomas, 1979)

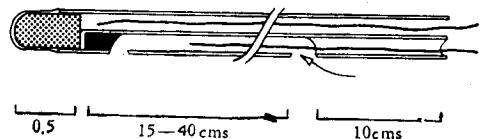


图 4 导管形电极

包复一层离子敏感膜，则可获对离子响应的器件 (ISFET)，在该器件的非饱和区内，离子活度 a_i 与漏极电流 I_D 之间有下列关系：

$$I_D \simeq \alpha \left[K + V_{GO} \pm \frac{RT}{Z_A F} \ln a_A \right]$$

式中 $K = V_T - \frac{1}{2} V_P + E^0$ ， V_T 为阈电压， V_D 为漏源电压， V_{GO} 为外加到参比电极的电压， α 为与沟道宽度有关的常数。这类器件的优点一是可将离子活度直接转换为可测定的电流，由于它的杂散电容小，工作频带宽，可设置在低输入阻抗的前置放大器内，测定线路简单，在活体组织内测定时，受生物膜电位的影响较用 ISE 测定时所受的影响小；二是可以微型化。目前用于临床化学及生理学研究用的 ISFET 主要有 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 O_2 及 pH 等器件，可以测定细胞内 K^+ 活度的 ISFET^[14] 的尖端直径已能作到 1 微米 (图 5)。

3. 发展探测分子的器件 在临床化学和生理学研究中，往往需要测定糖类、脂、醇、各种氨基酸、维生素、肌酸肝等分子。由 ISE 改进的分子探测器，无需破坏试样即可进行元素分析

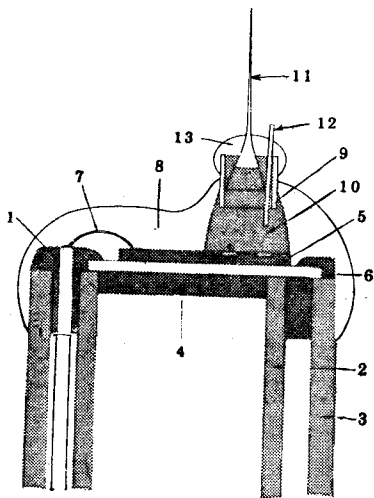


图 5 K^+ -微 ISFET

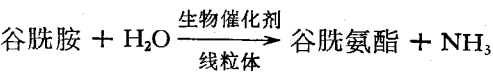
(1)隔离铜导线，(2)外径 3 mm 玻管，(3)外径 6 mm 玻管，(4)Devcon 5 分环氧体，(5)半导体基片，(6)柯伐材料，(7)含 Si(1%) 铅丝，(8)环氧树脂，(9)玻管 (10)缓冲凝胶，(11) K^+ -微电极尖端，(12)压力平衡毛细管，(13)封合胶

和功能团测定。在这一方面，应用较早的是气敏电极和酶电极。气敏电极用于血液中 O_2 、 CO_2 及 NH_3 的测定继续有所报道，而酶电极则已发展成为一大类称之为生物选择性膜电极 (简称 BSE) 的器件，又称生物催化敏感器件。BSE 的可能途径是：



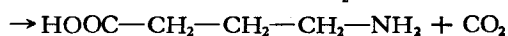
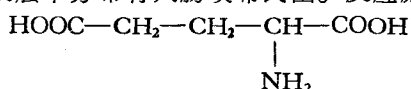
酶电极是含酶的薄膜或凝胶所覆盖的 ISE 及参比电极所构成的电池。由于膜内酶的催化作用，使溶液中待测的有机物或无机物分解为由电池内 ISE 响应的离子。由于酶的催化反应具有特异专一性，故酶电极有高度的选择性。已用此类电极测定了一系列氨基酸的含量。最近较成功的酶电极^[15]还有以 NH_3 电极作为内 ISE 的，涂布了猪胰酶薄层的供测定谷胱胺的酶电极，以 O_2 电极为内电极，涂布了三磷酸吡啶核苷酸和乳酸脱氢酶以测定乳酸盐的酶电极，以 pH 电极为内电极，涂布了青霉素酶供测青霉素的电极等。

1980 年又研制成功了线粒体电极。实验证明线粒体影响某些离子在细胞膜内外的迁移，还证明它有数种(复合的)酶的催化效应。以精细的程序从猪肾中分离出来的线粒体作为生物催化剂层，涂布在氨气敏电极上，形成谷胱胺敏感电极，



其线性范围为 $5.5 \times 10^{-3} - 1.1 \times 10^{-4} M$ ，斜率为 52.5 ± 2.2 毫伏/每级。

细菌电极又称微生物敏感器。有一种器件外凝胶层中分布有大肠埃希氏菌。反应原理是



产生的 CO_2 由内部 CO_2 电极响应,可测谷氨酸的范围为 100—800 毫克/升。

ISE 另一新品种是免疫电极。为说明其原理, Solsky 等选择了如下模型^[13]: 二硝基苯酚 (DNP) 能与二苯基-18-冠-6 偶合,其作用好比是抗原,按此方式构成的电极可测定对于 DNP 的抗体。因此只要膜载体加入免疫素,就构成相应的抗原-抗体电极,如他们成功地从牛血清蛋白肼 (BSA) 测定了 BSA 的抗体。也有人以羊的红血细胞与三苯基铵离子结合,完成了对 BSA 抗体测定。

4. 发展新方法及仪器 除了应用直接电位法及电位滴定法外,近年来也采用了动力学方法,该法依据化学反应速率与反应物或催化剂的浓度的关系,由 ISE 测定浓度随时间的变化,由记录的时间计算出参与反应的某一物质的浓度。例如可用高碘酸根电极在 20—140 秒内测出 1—54 毫克葡萄糖。此外,在线连续检测、流动注射分析及遥测等新方法,也在生理学及医学研究中得到推广。在线连续检测通常使用微型及半微型流通式电极,既可完成取样测定,也可以在活体组织中测定。例如可以在心脏手术时进行全血中 K^+ 的连续测定。其它的连续检测有活狗全血中的离解钙、钾和葡萄糖,全血中的氯以及用流动注射系统测定血氨等。

在仪器分析的自动化方面,除了改进自动血气分析仪及七十年代中期发展的 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 及 Ca^{2+} ISE 自动分析仪外,新近发展了带微处理机或小型计算机的自动分析仪 (详后)。有人报告了一种微 ISE 的笔形电位计,由集成电路构成,装在外径 1.3 厘米,长 8 厘米的管中,测量范围 $+1\text{V}$ — -1V , 稳定度为 0.5%。

另一新的探索是设计 ISE 遥测计,应用微 ISE 及微电子技术,制成可吞服或埋入体内的探测器,它可将 ISE 在体内响应的活度变为调频

或调幅讯号发射,由体外接收机接收。其中有一种导管型 ISE 遥测计,可连续工作六个月。

5. ISE 与计算机的联用

(1) 设计由小型计算机或微处理机控制的自动分析仪,按设定程序完成方法选择、校准、清洗、进样、测定、计算、显示及打印输出等步骤。配合 ISE 应用的带微处理机的自动分析仪已有多种,较新的有通用型 Philips PW 9416 离子选择自动分析仪、Beckman 5000 型离子计及 ASTRA 8 血气自动分析仪等,后者为 8 通道仪器,可完成 Na^+ 、 K^+ 、pH 及 CO_2 等的自动分析。

(2) 研究病理或某些生理现象,建立适当的数学模型,由 ISE 测定的参数进行解算。

(3) 数据处理及测定精度的改进。例如,血清中的 Na^+ 和 K^+ 可以分别由 pNa 及 pK 玻璃电极测得,虽然后者的选择性不及中性载体电极,但漂移小,又易于微型化。在较早的时候,就已经发展了一种模拟计算机解法,此法依据以下三个假定: pNa 电极功能不受 K^+ 离子干扰,两种电极斜率及钾电极的 $K_{\text{Na}}^{\text{pot}}$ 值稳定,然后将式(4)简化为模拟计算机方程求解。用数字计算机更容易解出一系列 ISE 的参数方程,同时测定多个离子的活度。

ISE 测定的准确度受各种条件的影响。为提高准确度,目前主要选用经改进的多次添加的计算机解法及计算机控制电位滴定法。在直接电位法中,影响 ISE 测量准确度的主要因素是否能准确求得式(3)中的 $(2.303/Z_A F)RT$ (令为 S)及 $E^{0'}$ 值。式(3)可以写成 $y = a + bx$ 的形式(此时 $y = E$, $a = E^{0'}$, $b = S$, $x = -\log a_A$),假如数据由一系列的点 (x_1, y_1) , $(x_2, y_2) \cdots (x_n, y_n)$ 组成,则 a 及 b 的最佳值可由下式给出

$$\begin{aligned} a &= [n\sum x y - \sum x \sum y] / [n\sum x^2 - (\sum x)^2] \\ &= [(xy)_n - X_n Y_n] / [(X^2)_n - X_n^2] \\ b &= [\sum x^2 \sum y - \sum x \sum x y] / [n\sum x^2 - (\sum x)^2] \\ &= [(X^2)_n Y_n - X_n (XY)_n] / [(X^2)_n - (X_n)^2] \end{aligned}$$

式中 $X_n = \sum x / n$, $Y_n = \sum y / n$, $(XY)_n = \sum xy / n$

$n(X^2)_n = \Sigma x^2/n$ 即分别是 x , y , xy 及 x^2 的平均值, n 为测量次数, 电线性回归可求出 $a(E'')$ 及 $b(S)$ 的最佳值, 用小型机或某些计算器均可解算。

目前, 在临床化学及生理学研究中使用 ISE 较准确的方法是多次添加法。此法的依据是

$$E = E'' + S \log \frac{c_x V_x + \sum_i c_i V_i}{V_x + \sum_i V_i}$$

可先设 $c_x = 0$, 然后在添加次数 $i = 2, 3 \dots$ 时解方程中的 S 及 E'' 的初始值, 再借此初始值代入方程求出 c_x 的估算值, 重复此运算至 S 、 c_x 收敛时为止。近来我国已有人用小型台式机按此法测定了血钙以尿中 NO_3^- 的含量。

结 语

Frike 曾预言, 离子选择性电极未来发展的主要动力将来源于医学和生物学。从最近文献及有关国际会议所反映的情况看来, ISE 在生理学和医学研究中的应用在稳步发展。而且可

以预见, 随着探测细胞及亚细胞级 ISE 技术的出现, 将有力地推动生理学和医学的研究。

参 考 文 献

- [1] Meyerhoff, M. E. et al.: *Anal. Chem.*, **54**, 27, R, 1982.
- [2] Frike, G. H.: *Anal. Chem.*, **52**, 259 R, 1980.
- [3] Koryta, J.: *Anal. Chim. Acta*, **111**, 1, 1980.
- [4] 苏渝生, «分析仪器», 1982 年, 1 期 74 页。
- [5] 章咏华, «离子选择性电极通讯», 1982 年 2 期 22 页。
- [6] IUPAC: *Pure and Appl. Chem.*, **53**, 1907, 1981.
- [7] Thomas, R. C.: *Ion-Selective Intracellular Microelectrodes*, Academic Press, 1978.
- [8] D. M. Band et al.: *Ion-Selective Electrode Methodology*. Vol. 2, Ed. by Convington, A. K., CRC Press, Inc., 1979.
- [9] 藤本守等: «综合临床», **29**, 2699, 1980.
- [10] Galiulina, D. V. et al.: *Lab. Delo.*, 332, 1980.
- [11] R. A. 德斯特主编 (殷晋尧等译): «离子选择性电极», 科学出版社, 1976 年。
- [12] Covington, A. K. et al.: *Anal. Chim. Acta*, **78**, 219, 1975.
- [13] Solsky, R. L. et al.: *Science*, **204**, 1308, 1979.
- [14] Haemnevli, A. et al.: *Anal. Chem.*, **52**, 1179, 1980.
- [15] Kylys, J. J.: *Anal. Lett.*, **14**, 377, 1981.

[本文于 1982 年 7 月 8 日收到]

X 光光谱在生物分子研究中的应用

王 其 武

(中国科学技术大学化学系, 合肥)

一、引 言

同步辐射加速器是一个新型光源, 其发射的 X 光具有波长连续可调、强度大、准直性好等独特的优点^[1]。用于生物分子学的研究中, 不仅能够检测微量化学元素的种类, 而且可以研究在生物大分子中该种原子的局部环境结构及其化学特性^[2]。特别是对一些金属原子, 如 Fe、Cu、Mo 等更有意义, 因为它们往往在生物化学过程中起决定作用。研究它们的周围环境, 键合状态及其与生物过程的关系, 正是分子生物学的重要课题。

X 光光谱与 X 光衍射不同, 它以 X 光的吸收系数或荧光产率作为 X 波光长的函数, 它反映个别原子的局部结构, 只依赖几个 Å 之内的有序结构, 因此对生物大分子来说, 它是进行局部解剖的有力工具。

X 光光谱学包括元素吸收边结构的研究和延伸 X 光吸收精细结构两大部分 (图 1)。

1. 吸收边结构的研究 K-边为原子的 K 层电子被打出时所吸收的能量, 其数值决定于原子序数本身。生物大分子中不同元素 K 边位置相差甚远, 可以分别研究而互不干扰, 如 FeK 边在 7112 eV, 而 MoK 边为 19,999 eV。吸收