

经验交流

化学发光法测定葡萄糖

张利华 张志良 沈曾佑

(华东师范大学生物学系,上海)

关键词 葡萄糖测定,化学发光法,葡萄糖氧化酶

葡萄糖在葡萄糖氧化酶作用下氧化生成葡萄糖酸和过氧化氢,用化学发光法可以测定生成的过氧化氢,从而知道葡萄糖的含量。本法所需样品量少,快速方便,灵敏度较比色法高,适用于大量样品的分析,如血糖^[1],也可用于测定葡萄糖氧化酶^[2]、过氧化物酶^[3]、过氧化氢^[4]以及金属离子^[5]等。测定方法包括葡萄糖的氧化和发光强度的测量两个步骤。

葡萄糖的氧化: 0.5ml 葡萄糖, 6U 葡萄糖氧化酶, 0.5ml 1mol/L 磷酸缓冲液, pH7.0, 于 25℃ 保温 15 分钟, 取出置冰水中备用。

测量发光强度: 0.1ml 反应混合液于比色杯中, 置于仪器暗室, 注入 1ml 含有 20μg 过氧化物酶的 10⁻⁴mol/L 鲁米诺 (1mol/L 磷酸缓冲液配制, pH 7.8), 立即记录发光强度峰。

1. pH 对葡萄糖氧化酶作用的影响

文献记载该酶作用的最适 pH 范围较宽, 为 pH4—7^[6]。表 1 结果表明以 pH7 时的活性为最大, 以下的酶氧化作用都在 pH7 条件下进行。

表 1 pH 对酶活性的影响

pH	相对发光强度
5.0	54.6
5.5	65.3
6.0	72.4
6.5	87.1
7.0	100.0
7.5	89.8

2. 鲁米诺浓度对发光的影响

鲁米诺的浓度过低或过高都影响发光强度, 以 10⁻⁴—5 × 10⁻³mol/L 为佳(表 2)。

3. 催化剂的影响

鲁米诺的化学发光除需要氧化剂外, 还需要合适的催化剂, 以加快反应速度, 增大发光强度。表 3 结果表明催化剂的浓度越大, 发光也愈强, 效果愈好。但是

表 2 鲁米诺浓度对发光的影响

鲁米诺浓度 (mol/L)	相对发光强度
10 ⁻³	67.8
5 × 10 ⁻⁴	61.8
10 ⁻⁴	98.3
5 × 10 ⁻⁵	100.0
10 ⁻⁵	84.7

过氧化物酶的用量过大不甚经济, 一般 10—20μg 已能满足测定要求。而高铁氯化钾价格低廉, 浓度用得大些效果更好, 可以用 5 × 10⁻³mol/L 或更高浓度。

表 3 催化剂对发光的影响

过氧化物酶, μg	相对发光强度	高铁氯化钾, mol/L	相对发光强度
100	100	5 × 10 ⁻³	100
84	91	10 ⁻³	14.9
68	68.3	5 × 10 ⁻⁴	8.2
52	56.3	10 ⁻⁴	2.9
20	39.7	5 × 10 ⁻⁵	0.24
10	24.7	10 ⁻⁵	0.1
5	14.1		

4. 缓冲系统

鲁米诺的化学发光一般需要在碱性条件下, 如 pH10.5, 但如果以过氧化物酶为催化剂时, 则在近中性条件下就能发光。表 4 为不同的缓冲介质对鲁米诺发光的影响, 结果表明不论何种介质, pH 增加时, 发光强度也增加。但值得注意的是, 随着 pH 的增加, 本底发光强度也同时增加, 特别是 Tris 和甘氨酸, 在 pH9.0 和 9.5 时, 本底发光已占样品发光的 1/5 以上, 过高的本底已影响到测定的顺利进行; 而磷酸盐系统的本底则要小得多。Puget 等^[7]选用 pH7.8 的磷酸缓冲系统, 其中可能也有这个原因。从表 4 可以看到这时的本底所占的比例很小, 利于测定。

表 4 不同缓冲系统对发光的影响

pH	磷酸盐		Tris-HCl		甘氨酸-NaOH	
	相对发光强度	本底发光所占%	相对发光强度	本底发光所占%	相对发光强度	本底发光所占%
6.5	0.3	0	—	—	—	—
7.0	1.5	0.2	—	—	—	—
7.5	6.3	0.6	1.7	9.3	—	—
7.8	18.3	0.2	—	—	—	—
8.0	30.2	1.9	4.8	13.9	0.02	18
8.5	100.0	1.7	15.3	17.4	0.13	8
9.0	—	—	100	22.2	0.93	12
9.5	—	—	—	—	4.1	22
10.0	—	—	—	—	17.0	24
10.5	—	—	—	—	100	52

5. 测定葡萄糖浓度的工作曲线

(1) 过氧化物酶作催化剂

取系列不同浓度的葡萄糖按上述方法进行酶氧化,然后取反应混合液 0.1ml,置仪器暗室中,注入 1ml 含有 10 μ g 过氧化物酶的 5 $\times 10^{-4}$ mol/L 鲁米诺(1mol/L 磷酸缓冲液配制, pH7.8),立即记录发光峰,结果见图 1 曲线 A。

(2) 高铁氰化钾作催化剂

葡萄糖的酶氧化作用同上。测定发光时取反应混合液 0.1ml, 10 $\times 10^{-4}$ mol/L 鲁米诺(pH7.8)0.1ml,置仪器暗室中,注入 5 $\times 10^{-3}$ mol/L 高铁氰化钾(pH7.8)1ml,立即记录发光峰,结果见图 1 曲线 B。

图 1 表明葡萄糖浓度与发光强度相关性十分显著。A 的斜率比 B 稍大些,以过氧化物酶为催化剂的灵敏度稍高。该方法可以测定 0.2—200 μ g/ml 葡萄糖,比一般比色法的灵敏度提高 10 倍以上。

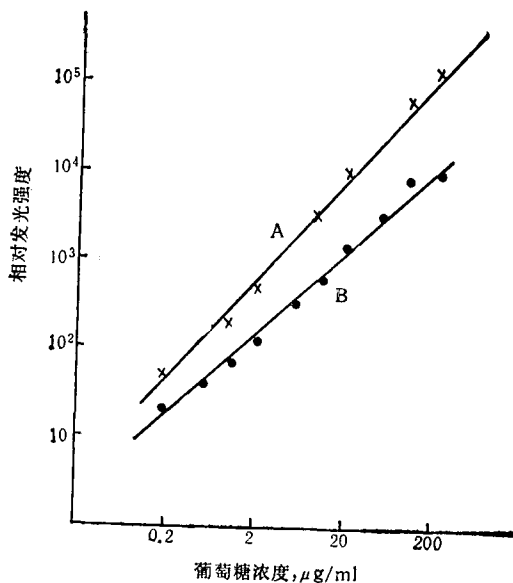


图 1 测定葡萄糖浓度的工作曲线

曲线 A: $r = 0.9987$ $Y = 2.4 + 1.1852X$

曲线 B: $r = 0.9984$ $Y = 1.863 + 0.9625X$

参 考 文 献

- 1 Bostick D T, Hercules D M. *Anal Chem*, 1975; 47: 447
- 2 Puget K, Michelson A M. *Biochimie*, 1976; 58: 757
- 3 张志良等. 植物生理学通讯, 1986; (1): 47
- 4 Chang C A, Patterson H H. *Anal Chem*, 1980; 52: 653
- 5 Bright H J, Appleby M. *J Biol Chem*, 1969; 244: 3625

[本文于1989年1月26日收到]

信息服务

土法制九二〇生产技术

920 植物生长刺激素应用于杂交稻制种、棉花田防止落铃和蔬菜等农作物,可使作物普遍增产 15% 以上。产品在市场上非常紧缺。生产所需厂房 100 平方米,所需原料为农副产品及废物,主要设备为高压锅、培养室等,用电较少,设备投资约 5 千元,该产品成本约 10 元/公斤,售价 20 元/公斤,若每天生产 20 公斤成品,纯利润可达 200 元以上。适合制药厂及高压锅设备厂接产上马。培训费: 单位 2000 元,个人 1500 元;函授: 单位 200 元,个人 120 元。

[北京市星火技术研究所, 北京 867 信箱 20816 组, 邮政编码 100024, 李 群]