

尿素氮-葡萄糖双功能分析仪的研究

冯德荣 李智红 周万里 朱思荣 史建国

(山东省科学院生物研究所 济南 250014)

摘要 由固定化脲酶、谷氨酸脱氢酶、谷氨酸氧化酶、葡萄糖氧化酶的复合酶膜组成的双电极系统,可以同时测定尿素氮和葡萄糖的含量,每次进样量为 25 μ l, 20s 即可测定出尿素氮和葡萄糖的含量。在 0~60mg/dl 尿素氮、0~500mg/dl 葡萄糖范围内具有良好的线性关系,连续测定 20 次的变异系数分别为 1.02% 和 1.05%。酶膜使用寿命为两星期以上。此仪器可广泛应用于临床检验和体育训练中。

关键词 酶电极, 尿素氮, 葡萄糖

哺乳动物蛋白质氨基酸分解代谢的最终产物为尿素。由肾脏排泄进入血浆中的尿素习惯上以尿素氮浓度表示。测定尿素的方法主要分两类:二乙酰-脲直接缩合法和酶法^[1]。二乙酰-脲法特异性较好,亦不受污染氮的干扰,但此方法要用腐蚀性强酸试剂,并需要煮沸加热,不适于自动化测定。另一类为酶法,选用脲酶(EC 3.5. 1.5)水解尿素,产生氨,继而用各种测氨的方法加以测定^[2~6]。pH 电极法是利用酶反应前后氢离子活度的变化来检测尿素的^[7~9]。还有用氢离子场效应管型尿素传感器来测定尿素的^[10]。有的生化分析仪利用氨电极测量尿素水解前后电导率的变化定量尿素,此法反应速度很快,但精度稍差,且干扰很大。我们做过电导型和电流型尿素传感器的比较研究^[11]。近年来利用谷氨酸脱氢酶-NADH 酶偶联速率法适于自动化分析。

测定葡萄糖的方法很多,固定化酶电极是一种比较先进的方法^[1,12,13]。在上述基础上,我所研制了 SBA-40 型尿素氮-葡萄糖双功能分析仪,它有两个过氧化氢电极,一个电极装有一个复合酶膜,膜上依次固定着脲酶、谷氨酸脱氢酶、谷氨酸氧化酶,另一个电极固定着葡萄糖氧化酶膜。两个酶膜反应的最后产物都有 H₂O₂ 由电极检测,即可得到尿素和葡萄糖的浓度,此双电极系统,只需进样 25 μ l 全血或血清,20s 即可同时测出尿素氮和葡萄糖的含量。此方法快速、准确,有利于自动化分析,可广泛应用于临床检验和体育训练中。本文研究了该仪器的性能参数及应用。

1 材料、原理及方法

1.1 材料

脲酶、谷氨酸氧化酶、谷氨酸脱氢酶、葡萄糖氧化酶、NADH (均来自美国 Sigma 公司)、戊二醛(上海化学试剂采购供应站经销,进口分装)、核微孔膜(美国 Nucleopore

本文于 1994 年 7 月 4 日收到。

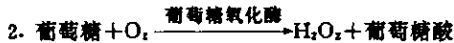
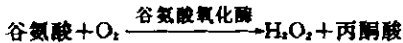
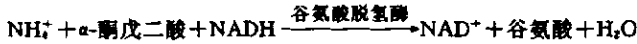
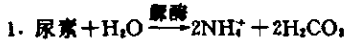
Co.)、其他药品均为分析纯。

1.2 酶电极的制备

酶电极的制备方法见维生素 C 电极和乳酸电极制备方法^(14,15)。

1.3 原理

双电极系统测定尿素氮，葡萄糖的原理根据下列酶促反应：



在反应 1 系列中，尿素在脲酶的作用下生成 NH_4^+ ，在 α -酮戊二酸和 NADH 存在的条件下， NH_4^+ 被谷氨酸脱氢酶作用生成谷氨酸，谷氨酸又在谷氨酸氧化酶作用下生成 H_2O_2 。反应 2 也同样产生 H_2O_2 。产生的 H_2O_2 分别与尿素及葡萄糖含量成正比，用两支过氧化氢电极来检测 H_2O_2 的生成量。

1.4 双电极生物传感器的结构

双电极生物传感器由反应器、2 支过氧化氢电极和微机信号处理系统组成⁽¹⁶⁾

1.5 测定方法

首先进行定标，用 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.0，标准液含尿素氮 10.0mg/dl，葡萄糖 100mg/dl，用微量注射器吸取标准液 25 μ l 注入酶电极反应器内，显示数据后按下“定标”钮便自动定标至标准值 10.0，100。然后待自动冲洗后，注入待测样品，显示结果，左电极为尿素氮含量，右电极为葡萄糖含量。

2 结果与分析

2.1 最适 pH 试验

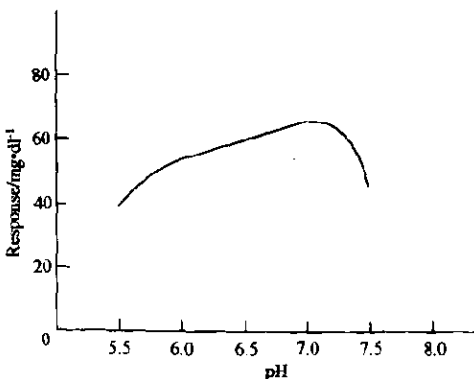


图 1 pH 对电极响应的影响

Fig. 1 Effect of pH on electrode response

不同 pH 的缓冲液对尿素氮电极响应的影 响，结果见图 1，在 pH7.0 时电极响应值 为最高，所以采用 pH7.0 磷酸缓冲液。

2.2 电极的专一性试验

葡萄糖氧化酶电极专一性良好，对谷氨酸、赖氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、乳酸、尿素、丙氨酸、 α -酮戊二酸、尿酸、抗坏血酸均无响应，尿素氮酶电极对甘氨酸、ED-TA、丙氨酸、柠檬酸、天冬氨酸、十六烷基三甲基溴化胺、赖氨酸、L-乳酸、尿酸、葡萄糖、抗坏血酸均无响应，说明该电极的专一性是很高的。

2.3 氟化钠对脲酶的抑制

取不同浓度的氟化钠 (NaF) 溶液分别与 25 μ l、10mg/dl 尿素氮标准液一起同脲酶反应，测定其对脲酶的影响结果见表 1。

表 1 NaF 对脲酶的影响
Table 1 Effect of NaF on urea enzyme

Conc. of NaF/ $\times 10^{-5}$ g · L ⁻¹	0	3	5	7	10	15
Remains of enzyme activity/%	100	21	16	7	0	0

由表 1 可见，NaF 对脲酶有强烈的抑制作用。并对 NaF 抑制的可逆性进行了研究，证明 NaF 对脲酶的抑制是可逆的。

2.4 酶膜的稳定性

酶膜置冰箱 0~4 $^{\circ}$ C 可保存半年以上。室温连续使用葡萄糖氧化酶膜可达 1 个月以上，脲酶可达半个月以上。见图 2。

2.5 仪器稳定性试验

对含有葡萄糖和尿素氮的标准样品连续测定 20 次，对数据进行统计处理，结果说明该仪器具有良好的稳定性。

葡萄糖酶电极响应：

$$N=20 \quad X=100.05 \text{ (mg/dl)}$$

$$S=1.05 \text{ (mg/dl)} \quad CV=1.05\%$$

尿素氮酶电极响应：

$$N=20 \quad X=99.75 \text{ (mg/dl)}$$

$$S=1.02 \text{ (mg/dl)} \quad CV=1.02\%$$

X 为测定平均值，S 为标准偏差，CV 为变异系数

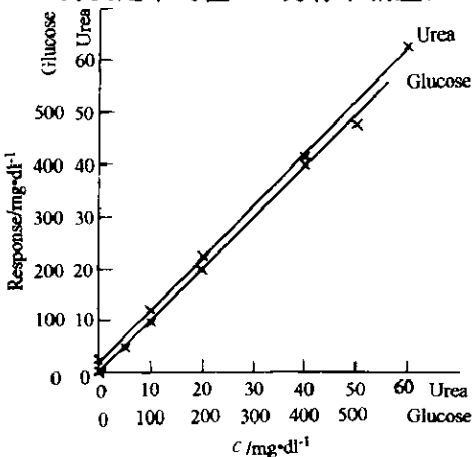


图 3 线性关系试验
Fig. 3 Test of linear range

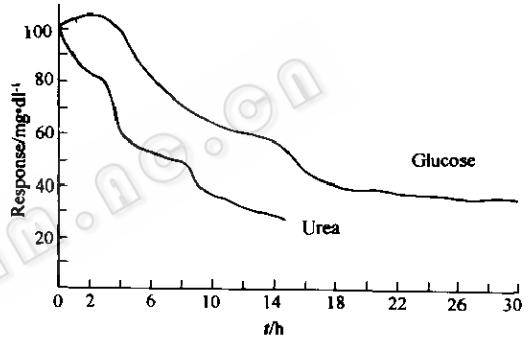


图 2 酶膜的稳定性
Fig. 2 Stability of enzyme membranes

2.6 线性关系试验

用电极测定尿素氮、葡萄糖混合标准液，其结果见图 3，说明浓度在 0~60mg/dl 的尿素氮、0~500mg/dl 葡萄糖混合标准液具有良好的线性关系。

线性公式为：

$$\text{尿素氮 } y=1.01x-1.76, r=0.9999,$$

$$\text{葡萄糖 } y=0.96x-2.91, r=0.9993$$

2.7 回收率试验

用尿素氮电极做回收率实验，结果见表 2：

表 2 尿素氮电极回收率试验

Table 2 Recovery test of urea-nitrogen

Sample amount /mg · dl ⁻¹	Mount added /mg · dl ⁻¹	Amount measured /mg · dl ⁻¹	Recovery rate /%
34.5	25.0	60.0	102.0
26.5	25.0	51.5	100.0
14.8	25.0	40.0	101.0
14.5	25.0	40.0	102.0

回收率在 100.0%~102.0% 之间, 说明该方法的准确度是很高的。

2.8 对血样测定的稳定性试验

取两份血液样品, 分别测定仪器的低值响应和高值响应的稳定性, 其结果见表 3。

表 3 血液的稳定性响应

Table 3 Stability test of blood sample

No. (N)	Response of low conc. /mg · dl ⁻¹		Response of high Conc. /mg · dl ⁻¹	
	Urea	Glucose	Urea	Glucose
1	9	85.8	17.7	174.5
2	10	86.2	17.4	173.5
3	9	85.8	17.7	176.5
4	9	86.6	17.4	176.0
5	9	86.8	17.7	178.0
6	9	86.8	17.7	178.0
7	9	86.2	18.0	179.5
8	9	88.6	17.7	176.0
9	9	86.8	17.1	175.5
10	9	86.8	17.7	181.5
X	X=9.1	X=86.74	X=17.61	X=176.9
S	S=0.31	S=0.74	S=0.25	S=2.39
CV/%	CV=3.4	CV=0.85	CV=1.40	CV=1.35

从以上结果可以看出, 双电极系统对低值和高值的响应都是比较稳定的。

2.9 对比试验

应用该仪器与传统的全自动分析仪(酶法)比较, 下表是在卫生部临床检验中心临床化学室所作的对比试验结果(见表 4)。

表 4 对比试验

Table 4 Comparative test

No.	Enzyme method /mg · dl ⁻¹	SBA-analyser /mg · dl ⁻¹	No.	Enzyme method /mg · dl ⁻¹	SBA-analyser /mg · dl ⁻¹
1	7.8	8.5	13	13.5	13.5
2	13.3	14.0	14	18.8	18.6
3	12.9	12.6	15	18.3	18.9
4	9.2	9.5	16	13.9	13.5
5	12.5	12.6	17	14.4	14.1
6	12.4	12.1	18	14.4	14.3
7	10.2	10.5	19	14.5	14.1
8	10.3	10.4	20	16.2	16.2
9	10.7	11.1	21	14.9	15.6
10	11.1	11.3	22	15.0	14.8
11	11.4	12.2	23	15.3	15.1
12	12.2	12.5	24	15.8	15.6

对两组数据进行回归分析, 回归方程为: $y=0.799+0.948x$, $R=0.990$

对结果进行 t 校验: $t=0.027$ $t_{0.1(46)}=1.684$

$t < t_{0.1(46)}$, $p > 0.1$

由以上结果可以看出, 两种方法测定结果无显著差异, 采用本文所述的双功能仪器法准确度高、稳定性好、操作安全简便, 试剂消耗低, 并具有良好的线性关系。

参 考 文 献

- [1] 朱志勇. 实用医学检验学, 北京: 人民军医出版社, 1992, pp. 261~265.
- [2] Guilbault G G, Hrabankova E. *Analytica Chimica Acta*, 1970, **52**: 287~294.
- [3] Guilbault G G, Nagy G, Kuan S S. *Analytica Chimica Acta*, 1973, **67**: 195~201.
- [4] Guilbault G G, Nagy G. *Analytical Chemistry*, 1973, **45**: 417~419.
- [5] Guilbault G G, Montalvo J G. *Journal of American Chemistry Society*, 1970, **92** (8): 2533~2538.
- [6] Anfalt T, Graneli A, Jagner D. *Analytical Letters*, 1973, **6** (11): 969-975.
- [7] Nilsson H, Akerlund A, Mosback K. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1973, **320**: 259~534.
- [8] Guilbault G G, Stokbro W. *Analytica Chimica Acta*, 1975, **76**: 237~244.
- [9] Ballot C, Manika B S, Melaet C *et al.* *Analytica Chimica Acta*, 1984, **163**: 205~308.
- [10] 钟丽婵. 生物工程学报, 1992, **8**: 87~94.
- [11] 冯德荣, 李智红, 朱恩荣. 第二届酶工程学术讨论会, 吉林大学学报增刊, 1993. p. 80
- [12] 冯德荣, 尚雪芹, 高飞等. 全国第二次工业生化学术会议论文摘要, 1987, p. 208.
- [13] 黎高翔. 全国固定化生物催化剂学术讨论会论文摘要, 1988, p. 18.
- [14] 冯德荣, 邱维忠, 周万里等. 中国医药工业杂志, 1990, p. 21.
- [15] 冯德荣, 冯云水, 周万里等. 山东科学, 1990, **3**: 1~6.
- [16] 冯德荣, 尚雪芹, 周万里等. 食品与发酵工业, 1993, **4**: 33~37.

Study on Bifunctional Analyser of Urea-nitrogen and Glucose

Feng Derong Li Zhihong Zhou Wanli Zhu Sirong Shi Jianguo

(Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014)

Abstract The urea-nitrogen and glucose bifunctional analyser consisted of two electrodes, immobilized urease, glutamate oxidase, glutamate dehydrogenase and glucose oxidase can simultaneously determine the concentration of urea-nitrogen and glucose. The linear range is 0~60mg/dl for urea-nitrogen and 0~500mg/dl for glucose with a response of 20 seconds and 25 μ l sample injection. The coefficient of variation is 1.02% and 1.05% respectively in 20 assays. The enzyme membranes can be used continuously at 25 $^{\circ}$ C for two weeks. This bifunctional analyser can be used widely to determine urea-nitrogen and glucose at the same time in clinical and physical training.

Key words Enzyme electrode, urea-nitrogen, glucose