

胆碱氧化酶电极生物传感器研究

冯德荣 孙士青* 朱思荣

(山东省科学院生物研究所 济南 250014)

王宁 葛淑兰

(山东省卫生学校 济南 250002)

摘要 以固定化胆碱氧化酶(EC 1.1.3.17)与 H_2O_2 电极构成电流型酶电极生物传感器,其输出电流可达 500nA。用于胆碱测定的线性范围:0~200mg/L,精度:RSD 小于 1.5%,响应时间:40s,使用寿命大于 60d,实际测定氯化琥珀胆碱注射液中胆碱含量,回收率:100.3%~102.3%。

关键词 生物传感器,酶电极,胆碱测定,胆碱氧化酶

胆碱是生物体组织中乙酰胆碱、卵磷脂和神经脂的组成成分,胆碱的测定方法分为两类:化学法^[1]和酶法^[2]。化学法是目前饲料、医药、食品行业分析胆碱的主要手段,该法虽成本较低但专一性差,操作复杂,费时费力;酶法分析先用³²P-标记的 ATP 在胆碱激酶作用下生成³²P-磷酸胆碱,层析分离后用液体闪烁谱仪测定,该法专一性较好,但分析成本高,难以推广应用。

近年来采用固定化酶电极生物传感器测定胆碱及其衍生物的研究较多^[3,4],但多以 O_2 电极为基础电极,本文采用固定化胆碱氧化酶复合 H_2O_2 电极构成胆碱酶电极生物传感器分析仪,并用于氯化琥珀胆碱注射液中的氯化琥珀胆碱和胆碱的测定。

1 材料

胆碱氧化酶(E C1.1.3.17),美国 Sigma 公司;氯化胆碱美国 Sigma 公司;戊二醛,上海化学试剂采购供应站进口分装;核微孔膜,孔径 0.2 μ m,美国 Nucleopore 公司;铂、银纯度均为 99.999%,中国人民银行济南分行;其它试剂均为分析纯。氯化琥珀胆碱注射液,上海旭东海普药业有限公司。

2 方法

2.1 固定化胆碱氯化酶膜的制备

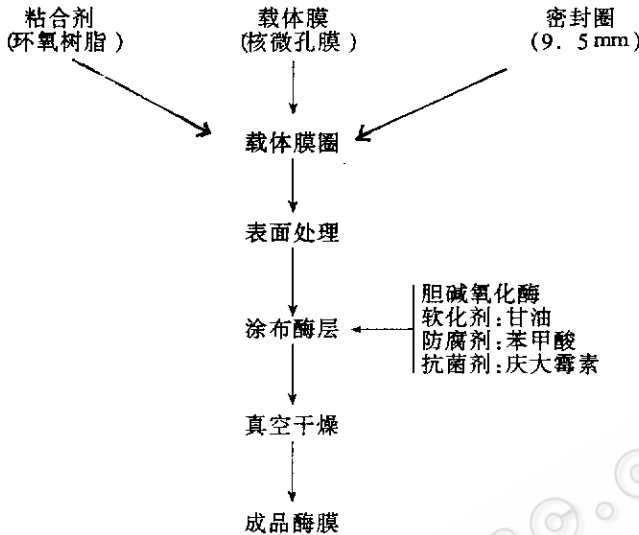
见下页的上图。

2.2 固定化胆碱氯化酶膜参数

* 通讯联系人。

本文于 1996 年 7 月 1 日收到。

基础活性>50;线性:0~200 mg/L,各点偏差小于±1mg;响应:20s 测定值大于 40s 测定值的 90%;膜完整性:亚铁氰化钾测定值-2~6 范围内;工作寿命大于 60d;储藏寿命:4℃1 年以上。



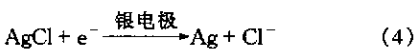
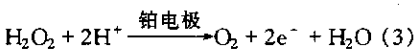
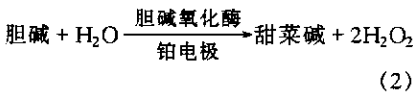
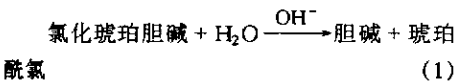
2.3 H₂O₂ 电极制备

两电极均为长 20mm 的圆柱体,铂电极表面积 4mm²,银电极表面积 60mm²,用专用模具制

作。两电极之间用环氧树脂填充,电极外套为聚四氟乙烯材料,电极套头端与酶膜圈应嵌合良好,铂电极与酶膜须紧密接触(见图 1),铂电极为正极,银电极为负极,两电极之间极化电压 0.65V。酶电极输出电流 0~500nA。

2.4 反应原理

固定化胆碱氧化酶复合 H₂O₂ 型电极测定胆碱依据下述反应:



胆碱酶电极生物传感器结构

胆碱酶电极生物传感器由生化反应系统(一次仪表)和电信号处理系统(二次仪表)组成(见图 2)。

2.5 测定方法

仪器定标:采用 0.1mmol/L

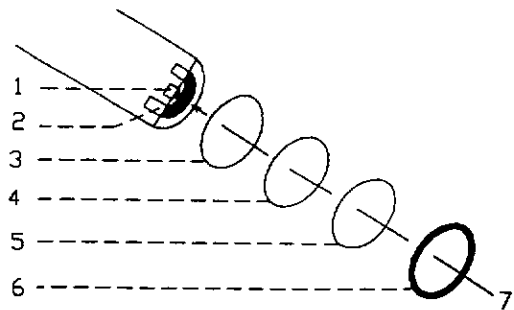


图 1 胆碱酶电极结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of immobilized enzyme membrane and probe assembly

- 1. Platinum electrode; reaction 3, 2. Silver electrode; reaction 4, 3. Inner-membrane, 4. Immobilized choline oxidase; reaction 2, 5. Nucleopore membrane, 6. Sealed ring, 7. Substrate

pH7.8 的硼酸缓冲液,标准液含氯化胆碱 100mg/L,取 25 μ l 标准液注入反应池,40 s 后仪器自动显示酶膜基础活性,按动定标键(CALIBRATE)定标 10.0,自动清洗后即可测定样品。

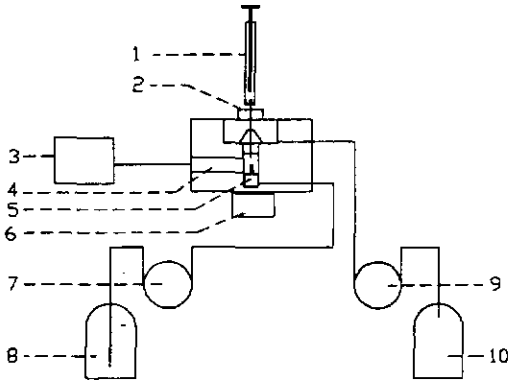


图 2 胆碱酶电极分析仪结构示意图

Fig.2 Schematic diagram of enzyme electrode biosensor for choline

- 1. Injector, 2. Touch switch, 3. Signal processor, 4. Enzyme electrode, 5. Stir bar, 6. Magnetic stir, 7. Pump 1, 8. Buffer,
- 9. Pump 2, 10. Waste

游离胆碱样品制备:取氯化琥珀胆碱注射液 1.0ml,蒸馏水定容至 100ml。

总胆碱样品制备:取氯化琥珀胆碱注射液 0.5ml,加蒸馏水 50ml、调 pH10.0、加热微沸 3min,冷却、调 pH7.0,蒸馏水定容 250ml。

琥珀胆碱含量 = 总胆碱含量 - 游离胆碱含量

3 结果与讨论

3.1 酶电极专一性试验

取可能的干扰物乙酰胆碱配成浓度 100mg/L 的溶液,以 100mg/L 的氯化胆碱标准液在胆碱氧化酶 H₂O₂ 电极上响应为 100,测定结果表明乙酰胆碱在胆碱酶电极上响应为 0。

3.2 最适 pH 试验

不同 pH 的硼酸缓冲液对胆碱酶电极响应的的影响见表 1 所示,在 pH7.8 时酶电极响应值最高,所以采用 pH7.8 的硼酸缓冲液。

表 1 不同 pH 缓冲液对胆碱酶电极响应的的影响

Table 1 Effect of pH on electrode response

pH	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4	8.6	8.8
Rel. resp	60	62	64	68	73	83	100	95	85	81	72	68

3.3 氯化钠与磷酸氢二钠对胆碱氧化酶活性的抑制

氯化钠与磷酸氢二钠是生物传感分析中常用的工作系统,胆碱氧化酶的活性受其抑制情况见表 2。

表 2 氯化钠与磷酸氢二钠对胆碱氧化酶的抑制

Table 2 Effects of NaCl and Na₂HPO₄ on choline oxidase

Conc. of NaCl / $\times 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Rel. resp.	Conc. of Na ₂ HPO ₄ / $\times 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Rel. resp.
0	100	0	100
2	77	2	85
4	68	4	73
8	58	8	67
16	51	16	57
32	44	32	49

由表2可见氯化钠与磷酸氢二钠对胆碱氧化酶的抑制作用随着浓度的升高而增加,但这种作用是可逆的。

3.4 精密度试验

对含有胆碱的同一标准品连续测定20次,每次进样25 μ l,结果如下: $N = 20$, $X = 100.3$ (mg/L), $S = 1.1$ (mg/L), $RSD = 1.09\%$ 。

3.5 线性范围

用胆碱酶电极测定40、80、120、160、200mg/L 氯胆碱标准液,以浓度为 X , 响应值为 Y 进行回归分析得线性回归方程: $Y = 0.25 + 0.995X$, $r = 0.9939$ 。见图3。

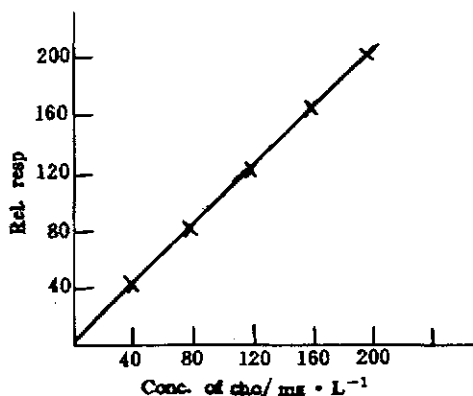


图3 线性范围试验

Fig.3 Linear range of enzyme electrode

3.6 回收试验

取稀释的氯化琥珀胆碱注射液分为4份,其中3份加入已知浓度的氯化胆碱,进行回收试验结果见表3。

表3 氯化胆碱回收试验结果

Table 3 Recovery test of the enzyme electrode to choline chloride

Amount added / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Amount measured / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Recovery rate / %	Statistic
25.8	26.4	102.3	
54.4	54.8	100.7	$X = 101.01$
111.7	112.1	100.3	$RSD = 0.87$
196.8	198.4	100.8	

3.7 酶电极法与银量法测定氯化琥珀胆碱注射液中氯化琥珀胆碱含量对比试验

结果见表4。设银量法结果为 Y , 酶电极法结果为 X , 由表4数据可得回归方程: $Y = 28.12 + 0.7539X$, 两种方法的相关系数 $r = 0.9929$, 说明两者测定结果较为一致。

表4 氯化琥珀胆碱注射液中氯化琥珀胆碱含量

Table 4 Concentration of succinyl choline chloride in injection

Batch No.	Argentometry / %	Enzyme electrode / %
890904	102.12 $X = 103.18$	99.32 $X = 99.65$
	103.51	99.82
	103.90 $RSD = 0.91$	99.82 $RSD = 0.29$
890906	104.50 $X = 104.43$	99.27 $X = 99.26$
	104.70	99.35
	104.10 $RSD = 0.29$	99.15 $RSD = 0.10$
940202	103.71 $X = 103.04$	101.31 $X = 101.19$
	102.71	101.13
	102.71 $RSD = 0.56$	101.13 $RSD = 0.10$

3.8 酶电极法测定氯化琥珀胆碱注射液中氯化胆碱含量

结果见表 5。以固定化酶电极生物传感器测定胆碱及其衍生物的研究报道多以 pH 电极或 O₂ 电极为基础电极, 由于两者分别易受溶液中离子强度及空气中 O₂ 分压影响, 稳定性较差, 而用 H₂O₂ 电极作基础电极则可避免上述两种干扰。

表 5 氯化琥珀胆碱注射液中氯化胆碱含量

Table 5 Concentration of choline chloride in injection

Batch No.	Content /mg·L ⁻¹	Statistic
890904	113.4	X = 112.5
	112.0	RSD = 0.72
	112.0	
890906	84.0	X = 84.9
	85.4	RSD = 0.95
	85.4	
940202	56.0	X = 56.1
	56.0	RSD = 0.41
	56.4	

本文研制的固定化胆碱氧化酶其最适 pH 为 pH7.8 与 Pandey 的报道 pH7.5^[4] 接近, 而与 Luigi 的报道 pH9.0^[3] 有较大差异。显然是由于本文与 Pandey 文采用得自 *Alcaligenes* 中的胆碱氧化酶, 而 Luigi 所用的胆碱氧化酶来自 *Arthrobacter*^[3], 两者之间有明显差别所致。

采用酶电极分析法测定胆碱及其衍生物具有专一性强、分析速度快、试剂消耗低、操作方便等优点, 该法与化学分析法测定结果之间有良好的线性关系。

参 考 文 献

- [1] 夏玉宇. 饲料质量分析检验, 北京: 化学工业出版社, 1994, 33~315.
 [2] G. G. 吉尔伯特. 酶法分析手册, 上海: 上海科学技术出版社, 1984, 188~190.
 [3] Luigi C *et al.* Clinica Chimica Acta. 1985, 151:71~83.
 [4] Pandey P C, Tran-Minh C, Lantreibecq F. Applied Biochem and Biotech. 1991, 31:145.

Study on Enzyme Electrode Biosensor of Choline

Feng Derong Sun Shiqing Zhu Sirong

(Shandong Institute of Biology, Jinan 250014)

Wang Ning Ge Shulan

(Shandong Healthic School, Jinan 250022)

Abstract Choline oxidase was immobilized at a hydrogen peroxide electrode and the enzyme electrode was used for the amperometric determination of choline. As a fundamental electrode the hydrogen peroxide electrode has an advantage of stability in analysis compared with pH electrode and O₂ electrode. The output electrical current of enzyme electrode is 0~500 nA. The linear range of the enzyme electrode is 0~20 mg/L with a response of 40 seconds and 25 μ l sample injection. The coefficient of variation is less than 1.5% in 20 assays. The enzyme membrane can be used continuously at 25°C for 60 days. The recovery rate of this method is 100.3%~102.3%. Choline and its derivative can be determined by enzyme electrode specially, rapidly, conveniently and inexpensively.

Key words Biosensor, enzyme electrode, choline analysis, choline oxidase