

不同苯原酚化合物用于 GOD-Trinder 法测定血糖的比较研究

徐 生¹, 邓 健^{1*}, 许金生², 袁亚莉¹, 张 伟¹

1 南华大学化学化工学院, 湖南 衡阳 421001

2 衡阳师范学院, 湖南 衡阳 421008

摘 要 对苯酚、2,4-二氯苯酚、2,6-二氯苯酚及间-苯二酚等四种苯原酚化合物作为过氧化物酶(POD)催化4-氨基安替比林(4-AA)-过氧化氢-酚显色体系测定血糖的葡萄糖氧化酶法(GOD-Trinder)进行比较研究。结果表明,苯酚、2,4-二氯苯酚及间-苯二酚三种苯原酚分别构成 GOD-POD-4-AA-H₂O₂-酚显色体系测定血糖时,其检测结果均无显著性差异($P>0.05$),但2,4-二氯苯酚显色体系的显色灵敏度、方法的精密度和准确度均优于苯酚显色体系。间-苯二酚显色体系灵敏度不及苯酚,但检测速度快,线性范围宽,可用于较高浓度葡萄糖溶液的在线快速分析。

主题词 葡萄糖; 血清; 葡萄糖氧化酶; 过氧化物酶; 生物化学检验

中图分类号: O613 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)03-0526-03

引 言

血糖是临床常规的生化检测项目。血糖测定经历了无机、有机、生化和正在兴起的仪器分析方法四代的发展^[1-6],其中己糖激酶法(HK)和葡萄糖氧化酶(GOD)法已得到广泛应用。GOD法又可分为速率法和比色法,后者即 GOD-Trinder 法,采用葡萄糖氧化酶偶联过氧化物酶(POD),以4-氨基安替比林(4-AA)-H₂O₂-苯酚作为显色体系^[7],由于具有特异性强、操作简单等优点,已成为目前血糖测定的常规方法,其缺点是灵敏度较低。本文用苯酚、2,4-二氯苯酚、2,6-二氯苯酚及间-苯二酚等四种苯原酚分别与4-AA-H₂O₂构成显色体系测定血糖,并对其方法进行学比较研究,以寻求更为灵敏、准确、快速的血糖测定方法,取得满意结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

723 SP 2100 型分光光度计(计算机控制), pH S-3C 型数字式酸度计, CS501 型超级恒温箱。

0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0); 葡萄糖标准液; 酶试剂(含 GOD, POD, 4-AA, 用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液配制); 酚试剂(分别为苯酚溶液, 2,4-二氯苯酚溶液, 2,6-二氯苯酚溶液, 间-苯二酚溶液, 浓度均为 0.1 mol·L⁻¹);

酶酚混合试剂: 取酶试剂与酚试剂等体积混合而成。试验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

取3支试管,分别标明“测定”、“标准”和“空白”,在测定管中加入 20 μL 血清,标准管中加入 20 μL 葡萄糖标准液,空白管中加入 20 μL 蒸馏水,各管中再加入 3.0 mL 酶酚混合试剂,混匀。置 37℃ 水浴中反应至显色完全,冷却到室温,用分光光度计选取其最大吸收波长为测定波长,空白调零,分别测定各管吸光度。按下式计算血糖含量

$$\text{血糖}(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) = (A_{\text{测}} / A_{\text{标准}}) \times c_{\text{标准}}$$

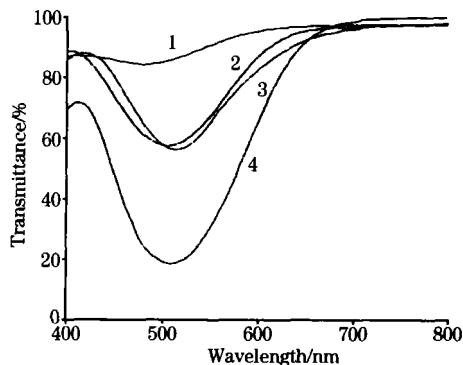


Fig 1 Absorption spectra

1, Resorcinol; 2, Phenyl hydroxide;
3, 2,6-dichlorophenol; 4, 2,4-dichlorophenol

收稿日期: 2005-01-06, 修订日期: 2005-04-10

基金项目: 国家自然科学基金委重点课题子课题(20135010)资助项目

作者简介: 徐 生, 1981 年生, 南华大学化学化工学院 99° 级本科生, 东南大学化学化工系研究生 通讯联系人

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

按实验方法测定不同酶酚混合试剂与同一样品显色后的吸收光谱, 结果见图 1。苯酚、2,4 二氯苯酚、2,6 二氯苯酚和间-苯二酚与 4 AA 构成的偶联对测定葡萄糖时的最大吸收波长及相应的表观摩尔吸光系数($\lambda_{\max}/\text{nm}$, $\epsilon_{\lambda}/\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) 分别为: 505, 5.68×10^3 ; 510, 1.53×10^4 ; 515, 7.85×10^3 ; 485, 2.27×10^3 。其中以 2,4 二氯苯酚显色灵敏度最高, 约为苯酚的 3 倍; 间-苯二酚的显色灵敏度较低, 为苯酚的 0.4 倍。

2.2 显色时间

取 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖标准液分别用四种酶酚混合试剂

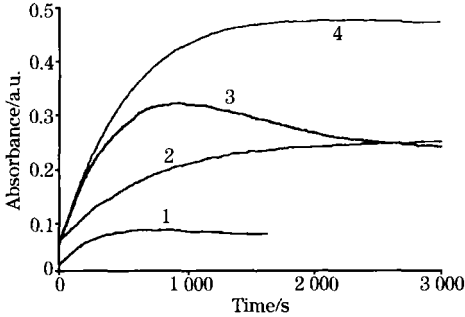


Fig 2 Changes of absorption with the reacting time

1, Resorcinol; 2, Phenyl hydroxide;
3, 2,6 dichlorophenol; 4, 2,4 dichlorophenol

在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温比色皿中显色, 选取其最大吸收波长作为测定波长, 立即进行时间扫描测试, 结果见图 2。

图 2 表明, 4 AA-苯酚体系 25 min 显色完全, 此后吸光度几乎不再随时间变化, 可见该色原体系稳定性良好, 只是灵敏度略低; 4 AA-2,4 二氯苯酚体系 20 min 显色完全, 生成的有色化合物亦非常稳定, 且显色灵敏度最高; 4 AA-2,6 二氯苯酚体系显色完全所需时间为 13 min, 但生成的有色化合物稳定性较差; 间-苯二酚显色速度最快(仅为 9 min), 且生成的有色化合物稳定性好, 其缺点是显色灵敏度较低。

实验还发现, 待测样品中葡萄糖浓度增高, 到达反应终点的时间缩短。临床检测中, 由于血糖浓度分布范围较大, 使用苯酚、2,4 二氯苯酚或间-苯二酚显色体系的显色时间分别以 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30, 25, 10 min 为宜。

2.3 酶的浓度及介质酸度的选择

试剂中酶的浓度对血糖测定影响较大, 选用适当的酶量可使反应在较短的时间内完成, 且产物颜色稳定。实验发现, 反应终溶液中 GOD 或 POD 用量少于 $4000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 时反应速度明显变慢, 到达显色终点的时间延长, 酶用量过多又造成浪费。酶的活性亦受反应介质的酸度和温度的影响。GOD 和 POD 在 pH 6.6~8.0 范围均具有良好的催化活性, pH < 6 或 pH > 8.5 时催化活性下降, 且反应终点的吸光度降低。本试验选取 GOD 和 POD 的浓度均为 $6000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 测定介质为 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液。

2.4 线性范围与检测限

用四种酶酚混合试剂分别测定葡萄糖系列标准溶液的吸光度, 得出各方法的线性回归方程、线性范围、相关系数及检测限(空白值的 3 倍标准偏差), 见表 1。

Table 1 Analytical parameters of four enzyme phenol mixed reagents

Enzyme phenol mixed reagents	Regression equation / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Correlation coefficient (r)	Linear range / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Limit of detection, 3σ / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
4 AA-phenol hydroxide	$0.046c - 0.026$	0.999 8	0~40.0	0.20
4 AA-2,4 dichlorophenol	$0.080c + 0.043$	0.999 2	0~37.5	0.15
4 AA-2,6 dichlorophenol	$0.045c + 0.011$	0.996 8	0~12.5	0.35
4 AA-resorcinol	$0.098c + 0.036$	0.998 2	0~50.0	0.50

由表 1 可见, 4 AA-2,6 二氯苯酚显色体系的线性范围较窄, 加之显色稳定性不高, 不宜用于血糖测定, 因此不再予以讨论。

2.5 精密度和回收率

用三种不同酶酚混合试剂分别对不同血清样品进行精密

度和加标回收试验, 结果见表 2。

2.6 样品测定

用三种酶酚混合试剂分别测定样品中血糖含量, 结果见表 3。

Table 2 Results of precision and recovery test($n=5$)

Enzyme phenol mixed reagents	Found / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Average / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Coefficient of variation/ %	Added / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Total found / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recovery / %
4 AA-phenol hydroxide	3.42, 3.49, 3.45, 3.48, 3.44	3.46	0.83	1.5, 2.0	5.01, 5.57	103.3, 105.5
4 AA-2,4 dichlorophenol	2.25, 2.27, 2.29, 2.27, 2.28	2.27	0.65	1.5, 2.0	3.75, 4.30	98.7, 101.5
4 AA-resorcinol	3.36, 3.26, 3.42, 3.35, 3.26	3.33	2.08	1.5, 2.0	4.87, 5.28	102.7, 97.5

Table 3 Determination results of samples with different enzyme phenol mixed reagents

Enzyme phenol mixed reagents	Serum 1/(mmol·L ⁻¹)	Serum 2/(mmol·L ⁻¹)	Serum 3/(mmol·L ⁻¹)	Serum 4/(mmol·L ⁻¹)
4-AA-phenol hydroxide	3 340	4 203	4 723	1 413
4-AA-2,4-dichlorophenol	3 245	4 202	4 574	1 463
4-AA-resorcinol	3 339	4 270	4 631	1 427

配对资料的 t 检验表明, 三种方法测定血糖的结果无显著性差异($P>0.05$)。

3 结 论

GOD-POD-4-AA-H₂O₂-酚显色体系测定血糖时, 其检测结果均无显著性差异, 但 2,4-二氯苯酚显色体系的显色灵敏度、方法的精密度和准确度均优于苯酚显色体系。间-苯二酚显色体系虽然灵敏度较低, 但检测速度快, 线性范围宽, 可用于较高浓度葡萄糖溶液的在线快速分析。

苯酚、2,4-二氯苯酚及间-苯二酚三种苯原酚分别构成

参 考 文 献

- [1] ZHOU Xu kai, et al(周序开, 等). Chin. J. Med. Lab. Sci. (中华医学检验杂志), 1982, 5(1): 56.
- [2] Trinder P. Ann. Clin. Biochem., 1984, 21: 1430.
- [3] Rairo Reljic. Clin. Chem., 1992, 38(4): 522.
- [4] QIU Jiang, PAN Hong-chun, HAN Chong-jia, et al(邱江, 潘红春, 韩崇家, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(6): 831.
- [5] HUANG Ying-ping, et al(黄应平, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(4): 378.
- [6] WANG Le-xin, ZHAO Zhi-min, YAO Hong-bin, et al(王乐新, 赵志敏, 姚红兵, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 980.
- [7] YE Ying-wu, WANG Yu-san(叶应妩, 王毓三). Operating Rules for National Clinic Assay(全国临床检验操作规程). Nanjing: Southeast University Publisher, 2nd Edition(南京: 东南大学出版社, 第2版), 1997. 169.

Comparative Study on GOD-Trinder Method for Measuring Glucose in Serum with Different Benzene-Original Phenols

XU Sheng¹, DENG Jian^{1*}, XU Jir-sheng², YUAN Ya-li¹, ZHANG Wei¹

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanhua University, Hengyang 421001, China

2. Hengyang Normal College, Hengyang 421008, China

Abstract Comparative studies were carried out on GOD-trinder method for measuring glucose in serum with four different kinds of benzene-original phenols: phenyl hydroxide, 2,4-dichlorophenol, 2,6-dichlorophenol and resorcinol. It is shown that when the three coloring systems: phenyl hydroxide, 2,4-dichlorophenol or resorcinol coupling with glucose oxidase peroxidase-4-aminopyrine hydrogen peroxide (GOD-POD-4-AA-H₂O₂) respectively were used for clinical assay of glucose in serum, the determination results showed no significant differences ($P>0.05$). Compared with phenyl hydroxide, the coloring system of 2,4-dichlorophenol is better in the aspects of sensitivity, precision and accuracy; the resorcinol system has lower sensitivity with the advantage of faster detecting velocity, and larger linear range, and can be used for on-line rapid analysis of samples with more concentrated glucose in industry.

Keywords Glucose; Serum; Glucose oxidase; Peroxidase; Biochemical assay

(Received Jan. 6, 2005; accepted Apr. 10, 2005)

* Corresponding author