

研究报告

肌苷酶电极生物传感器

孙士青¹, 史建国¹, 李雪梅¹, 杨俊慧¹, 马耀宏¹, 孟庆军¹, 孙岱²

1 山东省科学院生物研究所 山东省生物传感器重点实验室, 济南 250014

2 山东省胸科医院, 济南 250013

摘要: 为了构建肌苷酶电极生物传感器, 以固定化核苷磷酸化酶 (EC 2.4.2.1)、黄嘌呤氧化酶 (EC 1.2.3.2)与过氧化氢电极组成电流型酶电极生物传感器, 用于检测肌苷片中的肌苷, 其输出电流可达 500 nA。结果发现, 肌苷测定的线性范围为 1~268 mg/L, 精度: RSD 小于 0.14%, 响应时间: 60 s, 使用寿命大于 25 d, 实际测定肌苷片中肌苷含量回收率: 100.8%。由此表明: 采用双酶电极法测定肌苷片中的肌苷含量, 由于酶促反应专一性高、样品不需分离直接进样分析、处理条件温和、反应时间短暂因而结果较为可靠。

关键词: 核苷磷酸化酶, 黄嘌呤氧化酶, 生物传感器, 酶电极, 肌苷测定

An Enzyme Electrode Biosensor for Inosine Determination

Shiqing Sun¹, Jianguo Shi¹, Xuemei Li¹, Junhui Yang¹, Yaohong Ma¹, Qingjun Meng¹, and Dai Sun²

1 Addressed Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Shandong Key Laboratory for Biosensors, Ji'nan 250014, China

2 Shandong Provincial Chest Hospital, Ji'nan 250013, China

Abstract: An enzyme electrode biosensor was used for the amperometric determination of inosine in its tablets by co-immobilizing nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase on a hydrogen peroxide electrode. As a fundamental electrode the hydrogen peroxide electrode has an advantage of stability in analysis compared with the O₂ electrode. The enzyme electrode showed a linear response to inosine in the range of 1~268 mg/L with a response of 60 seconds under a sample injection volume of 25 μ L. Based on the enzyme electrode, inosine solutions were determined with an average recover rate of 100.8% and a relative standard deviation (RSD) of less than 0.14% in 20 assays. The lifetime of the enzyme electrode was relative long and could be used continuously at 25°C for 25 days. These results demonstrated that the enzyme electrode biosensor could be used to determine inosine and its derivatives specifically, rapidly, conveniently and economically.

Keywords: nucleoside phosphorylase, xanthine oxidase, biosensor, enzyme electrode, inosine analysis

肌苷是肌体内 ATP、辅酶 A、DNA 及 RNA 的组成成分, 参与机体的物质代谢和能量代谢, 肌苷又可作为辅助保肝药用于抢救肝昏迷、活化肝功能、促进受损伤肝脏的恢复。肌苷片中肌苷的含量测定部颁标准采用紫外分光光度法^[1,2], 该法难以排除样品中微

量次黄嘌呤的干扰。有报道用高压液相色谱法测定肌苷制剂中肌苷含量^[3], 虽分离效果较好但由于肌苷化学稳定性较差可能在分离过程中即有部分分解。国外近年有采用固定化酶电极生物传感器测定肌苷及其衍生物的报道^[4,5], 但均是以 O₂ 电极为基础电极。本

Received: March 11, 2008; Accepted: May 27, 2008

Supported by: the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. Y2007D54).

Corresponding author: Shiqing Sun. Tel: +86-531-82605742; Fax: +86-531-82605742; E-mail: sundaiman77@yahoo.com.cn

山东省自然科学基金项目(No. Y2007D54)资助。

研究采用双酶共固定技术将核苷磷酸化酶(EC 2.4.2.1)与黄嘌呤氧化酶(EC 1.2.3.2)制成双酶共固定化复合酶膜, 结合过氧化氢型电极构成肌苷酶电极生物传感器, 用于肌苷片中肌苷的含量测定, 具有操作简便、专一性高、结果精密度好、分析速度快等优点。

1 材料

核苷磷酸化酶(EC 2.4.2.1)、黄嘌呤氧化酶(EC 1.2.3.2)、肌苷标准品购自美国 Sigma 公司; 牛血清白蛋白、戊二醛购自上海化学试剂采购供应站进口分装; 核微孔膜(0.2 μm)购自美国 Nucleopore 公司; 铂、银纯度为 99.999%, 购自中国人民银行济南分行; 其他试剂均为分析纯。肌苷片, 购自上海普康药业有限公司。SBA-40 型肌苷生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所制造。

2 方法

2.1 固定化核苷磷酸化酶、黄嘌呤氧化酶复合酶膜的制备

2.1.1 载体膜圈制备

取直径 10 mm 的核微孔膜片用环氧树脂粘贴在内径 9.5 mm 的橡胶密封圈上, 放置过夜使固化完全即得。

2.1.2 载体膜圈表面处理

将载体膜圈置 20% 甲醇溶液中浸泡 15 min, 取出用蒸馏水冲净、晾干。

2.1.3 固定化核苷磷酸化酶-黄嘌呤氧化酶复合酶膜制备

取核苷磷酸化酶 0.1 u、黄嘌呤氧化酶 0.03 u、20% 牛血清白蛋白 5 μL 、2% 戊二醛 2 μL 、均匀喷涂在载体膜圈表面, 静置固化 15 min, 用蒸馏水洗去多余反应物, 冷冻干燥即得。将此固定化复合酶膜装在过氧化氢电极头部便构成双酶电极。

2.1.4 固定化黄嘌呤氧化酶膜制备

黄嘌呤氧化酶 0.03 u、20% 牛血清白蛋白 5 μL 、2% 戊二醛 2 μL 、均匀喷涂在载体膜圈表面, 静置固化 15 min, 用蒸馏水洗去多余反应物, 冷冻干燥即得。将此固定化黄嘌呤氧化酶膜装在过氧化氢电极头部便构成单酶电极。

2.2 过氧化氢电极制备

两电极均为长 20 mm 的圆柱体, 铂电极表面积 4 mm^2 , 银电极表面积 60 mm^2 , 用专用模具置备。两电极之间填充环氧树脂, 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(图 1), 铂电极为正极; 银电极为负极。两电极之间极化电压 0.65 V, 酶电极输出电流 0~500 nA。

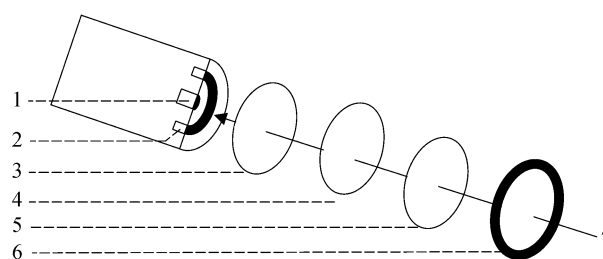


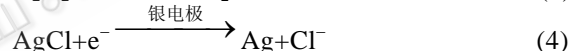
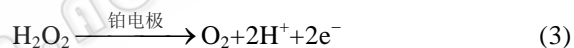
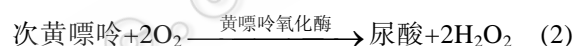
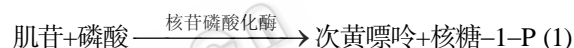
图 1 肌苷酶电极结构示意图

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

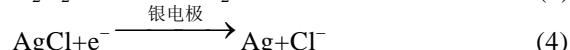
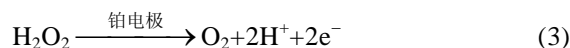
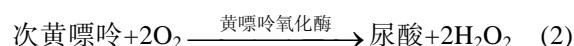
1: platinum anode; 2: silver cathode; 3: inner-membrane; 4: co-immobilized nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase; 5: nucleopore membrane; 6: O-ring; 7: substrate

2.3 原理

2.3.1 固定化双酶复合酶膜结合过氧化氢电极测定肌苷依据反应



2.3.2 固定化黄嘌呤氧化酶酶膜结合过氧化氢电极测定次黄嘌呤依据反应



肌苷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(图 2)。

2.4 测定方法

2.4.1 仪器定标

采用 0.1 mmol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液, 标准液含肌苷 268 mg/L, 取标准液 25 μL 注入反应池 60 s 后仪器自动显示酶膜基础活性, 按动定标键(Calibrate)定标 268, 自动清洗后即可测定样品。

2.4.2 样品制备

取肌苷片 5 片, 精密称定, 研细, 精密称取适量(约相当于肌苷 0.10 g), 置 100 mL 量瓶中加水适量使溶解, 用水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密取续滤液 10 mL, 置 50 mL 量瓶中加水稀释至刻度, 摇匀, 即得, 进样量 25 μL 。

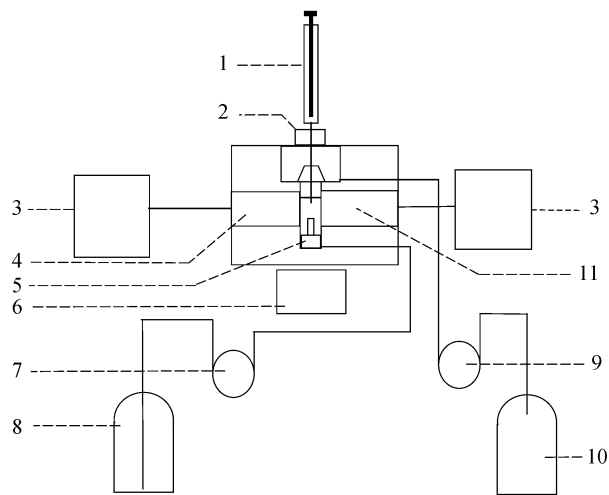


图 2 肌苷酶电极分析仪结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of enzyme electrode biosensor for inosine

1: injector; 2: touch switch; 3: signal processor; 4: bi-enzyme electrode; 5: stir bar; 6: magnetic stir; 7: pump1; 8: buffer; 9: pump 2; 10: waste; 11: mono-enzyme electrode

2.4.3 酶电极专一性试验

取可能的干扰物腺苷(Adenosine)、腺苷-5'-磷酸(Adenosine-5'-P)、乳酸(Lactic acid)、胞苷(Cytidine)、胞苷-5'-磷酸(Cytidine-5'-P)、鸟苷(Guanosine)、鸟苷-5'-磷酸(Guanosine-5'-P)配成浓度 268 mg/L 的干扰物样品溶液,按 2.4.1 标定仪器后,测定干扰物样品在同一酶电极上的相对响应,结果见表 1。

表 1 酶电极专一性试验
Table 1 Specificity of enzyme electrode

Substrate	Response	Substrate	Response
Inosine	268	Cytidine	0
Adenosine	0	Cytidine-5'-P	0
Adenosine-5'-P	0	Guanosine	0
L-lactic acid	0	Guanosine-5'-P	0

2.4.4 固定化复合酶膜参数测定

基础活性测定:固定化复合酶膜安装在 H_2O_2 电极头部后在 0.1 mmol/L pH 7.2 磷酸缓冲液中浸泡稳定 30 min 后,照 2.4.1 方法操作,仪器显示值即为酶膜基础活性。要求酶膜基础活性>50,否则为不合格;

线性测定:方法同 2.4.7,要求连续两次分析结

果偏差小于 1 mg;

响应测定:方法同 2.4.1 要求 30 s 测定值>60 s 测定值的 90%,否则为不合格;

内膜完整性测定:按 2.4.1 标顶仪器后取 1%亚铁氰化钾溶液 25 μ L 注入反应池,60 s 后仪器显示酶电极对亚铁氰化钾溶液的响应值,要求该参数在 -2~+6 范围内,超出此范围说明酶膜的内膜不完整、抗干扰性能不合格;

以上各参数是每个酶膜第一次使用时先行考察的项目,反映了酶膜的工作状态。

工作寿命:是酶膜达到工作状态所能持续的时间,要求 25 d 以上。

2.4.5 酶电极最适 pH 试验

具报道核苷磷酸化酶与黄嘌呤氧化酶的提取、纯化均以磷酸盐缓冲液为提取溶媒,在该缓冲液中酶活性较为稳定^[4],因此将 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液调成不同 pH,分别测试肌苷酶电极在其中的相对响应,结果见表 2。

表 2 不同 pH 磷酸盐缓冲液对肌苷酶电极响应的影响
Table 2 Effects of different pH buffer to response of enzyme electrode

pH	5.6	5.8	6.2	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4
Response	62	65	72	90	100	95	83	75

2.4.6 精密度试验

用 2.4.1 方法对含有肌苷的同一标准液连续测定 20 次,结果见表 3。

2.4.7 线性范围试验

按 2.4.1 方法,测定 50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L、268 mg/L 肌苷标准液,以标准液浓度为 X,响应值为 Y 对测定结果进行回归分析,结果见表 4。

2.4.8 回收试验

样品配制:按 2.4.2 方法操作,弃去初滤液后精密量取 5 份续滤液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,分别加入肌苷标准品:0 mg、2.53 mg、5.68 mg、7.82 mg、11.86 mg 加蒸馏水溶解稀释至刻度,摇匀即得;

测定方法:2.4.1 方法进行,结果见表 5。

表 3 精密度试验结果
Table 3 Reproducibility of enzyme electrode to inosine (mg/L)

200.1	200.0	199.9	200.1	200.2	200.5	200.4	200.3	200.4	200.5
199.8	199.9	200.0	200.2	200.6	200.7	200.3	200.7	200.5	200.6

表 4 线性试验结果

Table 4 Linearity of enzyme electrode

X	50	100	150	200	268
Y	50.80	101.80	145.68	194.38	262.61

表 5 回收试验结果

Table 5 Recovery results for inosine(n=3)

Added (mg/L)	Measured (mg/L)	Recovery (%)	Statistic
50.6	50.9	100.6	
113.5	114.1	100.5	X=100.8%
156.3	157.8	101.0	RSD=0.29%
233.6	236.2	101.1	

2.4.9 酶电极法与紫外分光光度法对比试验

酶电极法照 2.4.1、2.4.2 方法操作, 紫外分光光度法照卫生部颁标准肌苷片含量测定项下操作^[1]。

3 结果与讨论

3.1 酶电极专一性

肌苷酶电极对供试的可能干扰物质均无响应(表 1), 说明固定化核苷磷酸化酶-次黄嘌呤氧化酶酶膜只对次黄嘌呤和肌苷产生反应, 具有高度的专一性; 对于肌苷样品中混杂的少量次黄嘌呤所产生的干扰则采用双电极系统予以解决, 即用双酶电极测定肌苷与次黄嘌呤、单酶电极测定次黄嘌呤含量, 两组信号经程序相减处理得出差值从而排除次黄嘌呤对肌苷测定的干扰。

3.2 固定化肌苷酶膜参数

基础活性>50, 线性: 1~270 mg/L; 各点偏差小于 1 mg, 响应: 30 s 测定值大于 60 s 测定值的 90%, 膜完整性: 亚铁氢化钾测定值-2~6 范围内, 工作寿命>25 d。

3.3 酶电极最适 pH

不同 pH 磷酸盐缓冲液对肌苷酶电极响应的影响见表 2、图 3 所示, 由表 2、图 3 可知: 在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中酶电极响应值最高, 所以本研究采用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液。

3.4 精密度试验

对表 3 数据进行统计分析得: $n=20$, $X=200.3$ (mg/L), $s=0.28$ (mg/L), $RSD=0.14\%$, 表明酶电极分析法测定肌苷的精密度符合化学分析要求。

3.5 线性范围

对表 4 数据进行回归分析得线性回归方程: $Y=3.415+0.960X$, 式中 X 为浓度(mg/L), Y 为响应值, 相关系数 $r=0.9998$, 表明酶电极分析法的线性良好。

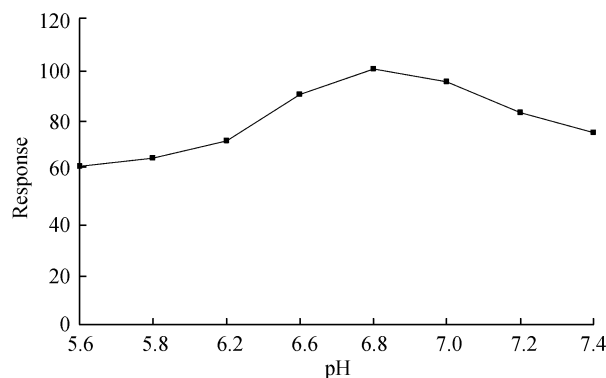


图 3 不同 pH 磷酸盐缓冲液对肌苷酶电极响应的影响

Fig. 3 Effects of different pH buffer to response of enzyme electrode

3.6 回收试验

酶电极法测定肌苷片中肌苷含量的回收率在 100.5%~101.1% 之间, 符合化学分析及药物分析的要求。

3.7 酶电极法与紫外分光光度法对比测定肌苷片中肌苷含量

设紫外分光光度法测定结果为 Y , 酶电极法测定结果为 X , 由表 6 数据可得线性回归方程: $Y=0.4050X+59.26$, 两法测定结果间相关系数 $r=0.8844$, 表明两法测定结果较为一致。对表 6 数据进行方差分析与 F 检验, 得 $F=8.248 < F_{0.01(2,16)}=19.44$, 示两种分析方法间无显著性差异。

表 6 肌苷片中肌苷含量测定结果

Table 6 Contents of inpsine in its tablets (% , n=3)

No.	UV	Enzyme electrode
060910	101.58	100.34
	100.47	100.10
	100.32	99.86
060912	101.76	100.46
	101.58	100.34
	101.82	100.68
060914	100.52	99.90
	100.84	100.22
	101.12	100.00

肌苷的含量测定方法主要有直接紫外分光光度法^[2]与高压液相色谱法^[6], 直接紫外分光光度法虽操作简便易行, 但由于肌苷在发酵生产过程中常混有其他核苷酸且肌苷的化学稳定性较差, 在外界条件改变时易分解产生次黄嘌呤干扰肌苷测定, 因而测得的结果偏高^[6]。高压液相色谱法虽可使肌苷与次黄嘌呤及其它干扰物有较好的分离效果, 但操作

复杂、费时长、分析过程中肌苷有部分降解。Okuma 文采用固定化酶电极生物传感器测定肌苷是以 O_2 电极为基础电极, 由于该基础电极易受空气中 O_2 分压影响, 稳定性较差^[4], 而用 H_2O_2 电极作基础电极则可避免此种干扰^[7]。

对于肌苷样品中混杂的少量次黄嘌呤所产生的干扰则采用双电极系统予以解决, 即用双酶电极测定肌苷与次黄嘌呤含量、单酶电极测定次黄嘌呤含量, 两组信号经传感器内设计计算机程序相减处理得出差值从而排除次黄嘌呤对肌苷测定的干扰。

采用酶电极法测定肌苷片中的肌苷含量, 由于酶促反应专一性高、样品不需分离直接稀释 500 倍即可进样分析、处理条件温和、反应时间短暂因而结果较为可靠。

REFERENCES

- [1] National Pharmacopia Administration. Pharmaceutical Standard of the Ministry of Health (Biochemical Pharmacy Volume 1), WS₁-C₃-0006-89. Beijing: Chemical Industry Press, 1989.
国家药典委员会编, 卫生部药品标准(生化药品第一册), WS₁-C₃-0006-89. 北京: 化学工业出版社, 1989.
- [2] National Pharmacopia Administration. Pharmaceutical Standard of the Ministry of Health (Biochemical Pharmacy Volume 1), WS₁-C₃-0004-898. Beijing: Chemical Industry Press, 1989.
国家药典委员会编, 卫生部药品标准(生化药品第一册), WS₁-C₃-0004-898. 北京: 化学工业出版社, 1989.
- [3] Wang DM, Wang XQ The determination of inosine and benzoic acid in injection by HPLC. *Chin J Pharm Anal*, 1993, **13**(5): 331.
王董民, 王晓琼. 高效液相色谱测定肌苷注射液中肌苷和苯甲酸钠的含量. 药物分析杂志, 1993, **13**(5): 331.
- [4] Okuma H, Watanabe E. Flow system for fish freshness determination based on double multi-enzyme reactor electrode. *Biosens Bioelectron*, 2002, **17**(5): 367-372.
- [5] Hu SS, Liu CC. A bienzyme sensor for the determination of hypoxanthine and inosine. *Electroanalysis*, 1997, **15**(9): 1174-1179.
- [6] Tan RL, Ou GP, Cheng JL. Study of the determination of inosine in its preparation. *Chin Pharm J*, 1996 (**31**) 3: 175.
覃若林, 区国萍, 程坚理. 关于肌苷制剂中含量测定方法的讨论. 中国药学杂志, 1996, **31**(3): 175.
- [7] Dimche N, Horozova E, Jordanova Z. An amperometric xanthine oxidase enzyme electrode based on hydrogen peroxide electroreduction. *J Biosci*, 2002, **57**(10): 883-889.

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中科院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 具有北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学、菌物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、Abstracts of Mycology (美国“菌物学文摘”)、Index of Fungi (英国“菌物索引”)、Review of Plant Pathology (英国“植物病理学文摘”)、Bibliography of Systematic Mycology (英国“系统菌物学文献目录”)、Bibliographie der Pflanzenschutz literature(德国“植物保护文献目录”)、《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜、)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如果您有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请通过新地址汇款(收款单位: 中国科学院微生物研究所, 开户银行: 中国工商银行北京分行海淀镇支行, 帐号: 0200004509089117425)。

中国科学院微生物研究所-期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521 电子信箱: gg@im.ac.cn 联系人: 武文 王闰

网址: <http://journals.im.ac.cn>