

# 氧化酶光度法葡萄糖定量测量条件探讨

李振庆 倪一 海峰 黄梅珍

(上海交通大学 物理系光学工程研究所 上海 200240)

**摘要** 依据人体尿糖、血糖的浓度范围, 研究从 2.0~ 38.5mmol/L 不同浓度的葡萄糖水溶液在不同温度下与葡萄糖氧化酶试剂反应的动力学过程, 在可见光谱区, 结合分光光度法和最小二乘法对溶液中的葡萄糖含量进行定量分析, 分析波长, 光谱带宽, 反应温度及反应时间等对定量精度的影响。实验结果表明, 对于本文所用的葡萄糖氧化酶试剂, 在 32℃下葡萄糖氧化酶与葡萄糖反应 10min 后在 550nm 处进行定量, 相关系数超过 0.9999, 预测标准误差 (SEP) 0.626mmol/L。如果测量时间和温度偏离指定条件, 将产生较大的测量误差; 但如果定量波长偏离吸收峰, 并在一定带宽 (如 30nm) 范围内进行定量, 仍能得到满意的结果。

**关键词** 葡萄糖氧化酶 光度法 温度 最小二乘法

## 引言

人体体液中的葡萄糖定量检测方法和仪器手段一直是生命科学、临床医学和医学传感器技术研究关注的热点, 为此, 各国开展大量的研究, 提出无损检测体内葡萄糖的偏振光测定法、拉曼光谱法、近红外吸收及散射法、中红外发射光谱法、荧光法、无线电射频法等<sup>[1-6]</sup>。这些技术虽然有着美好的前景, 但离实用仍有相当的距离。

目前, 临床上广泛使用的葡萄糖测定方法仍然是葡萄糖氧化酶比色法和酶电极法, 其中, 氧化酶比色法由于特异性好, 灵敏度高, 成本低, 一直作为经典的葡萄糖定量方法被广泛应用, 基于该原理的微型葡萄糖传感器和便携式高灵敏葡萄糖检测仪器有广阔的应用前景, 初步研究表明, 唾液中葡萄糖的含量与血糖有相关性<sup>[7]</sup>, 如果唾液糖能替代血糖作为糖尿病患者的另一个“生命体征”的话, 必将给糖尿病患者带来福音, 但唾液中葡萄糖的含量仅为血糖含量的 1/50~ 1/100 显然, 对唾液糖的测定需要有更高的灵敏度和精度。应用氧化酶比色法测定葡萄糖时, 一般要求将反应物置于一定温度 (如 37℃) 的恒温水浴中反应指定的时间 (一般为 10~ 30min), 然后在指定的波长下进行比色。由于联酶反应及氧化还原反应是一个动力学反应的过程, 参与反应的各个组分的含量及其对环境温度的敏感性以及测量的时间等都将影响到定量的精度, 这些问题的研究对新型葡萄糖酶传感器的设计具有指导意义。而对

于市售的某种氧化酶试剂, 在实际测量过程中, 对于规定的测试条件 (如时间、温度、波长等) 的偏离将对结果造成怎样的误差和影响, 反过来, 当葡萄糖定量要求达到一定的精度时, 对应的测试条件需要控制在怎样的水平, 也是一个非常值得研究探讨的问题, 这对于广大的酶试剂用户具有参考价值。

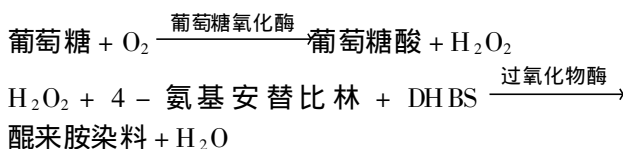
此外, 氧化酶法葡萄糖定量若以 LED 为光源进行比色测量, 无需分光, 可设计成掌上型专用仪器, 将是非常有意义的。但是 LED 可提供的波长有限, 不一定恰好在吸收峰, 并且都有一定带宽 (20~ 50nm)。所以, 有必要探讨测量波长和带宽对氧化酶法葡萄糖定量精度的影响。

本文对于浙江东瓯生物工程有限公司的氧化酶试剂在葡萄糖定量过程中的实验条件如温度、时间、波长、带宽等进行探讨, 分析讨论这些实验条件对葡萄糖定量精度的影响。

## 1 测量原理与方法

### 1.1 测量原理

葡萄糖分子与氧在葡萄糖氧化酶的作用下, 生成葡萄糖酸与过氧化氢, 过氧化氢通过过氧化物酶催化放出氧, 并与 4-氨基安替比林结合, 生成红色醌类化合物, 其反应式如下:



### 1.2 测量方法

\* 基学光电科学与技术教育部重点实验室开放课题

根据人体血糖和尿糖的浓度范围,将分析纯葡萄糖粉末(上海分析试剂厂)与蒸馏水配制成浓度分别为 2.03mmol/L、8.10mmol/L、14.18mmol/L、20.26mmol/L、26.34mmol/L、32.42mmol/L 和 38.49mmol/L 的 7 组葡萄糖溶液样品,先将葡萄糖氧化酶试剂(浙江东瓯生物工程有限公司)置于一定温度的恒温水槽中水浴 10min,然后加入待测样品,开始反应后,每隔 2min 的时间间隔,用紫外可见分光光度计(UV190Q 上海亚研电子科技有限公司)测量其吸收光谱,以空气作为参照,所用比色皿的光程为 5mm,测量波段为 450~700nm,带宽 1nm,测量 16 次,测量过程中保持样品温度不变。观测不同浓度样品在不同温度下 450~700nm 可见光范围内吸收光谱的动力学变化过程。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 定标波长的选择

图 1 为 32℃ 下 8min 时测得的不同浓度葡萄糖溶液的光谱曲线,由图中可以看出,在 450~700nm 可见光谱波段内溶液的吸光峰位于 550nm 处,在同一波长处,浓度越高,吸光度越大,用最小二乘法对 1nm 带宽下 450~700nm 各个波长处的吸光度与葡萄糖浓度逐点进行拟合,图 2(a)是相关系数与波长的关系曲线,可见 480~650nm 波段内均有很好的相关性。图 2(b)显示 550nm 处的拟合曲线,相关系数为 0.9998,实验结果表明,即使偏离吸收峰 550nm(如偏离 70nm)进行比色,也能获得相关系数大于 0.998 的满意结果。

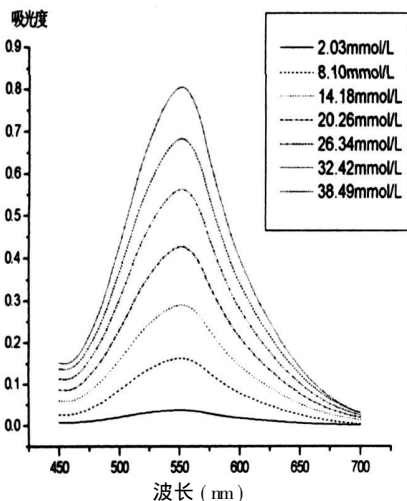


图 1 不同浓度葡萄糖水溶液的吸光光谱  
(32℃, 8min)

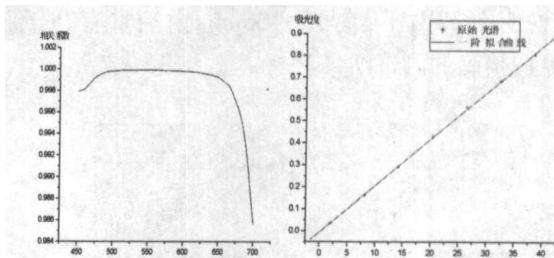


图 2 (a) 不同波长处定标的相关系数

(b) 550nm 处定标拟合曲线 (32℃, 8min)

### 2.2 温度的影响

图 3 是浓度为 20.26mmol/L 的葡萄糖溶液在不同温度下在 550nm 处的吸光度随时间的变化关系曲线,可见反应开始初期,吸光度随时间快速变大,大约 8min 后变化趋缓,达到最大值,然后吸光度逐渐减小。比较 32℃ 与 37℃ 两种不同温度下的变化情况,由曲线可知,在 0~10min 内,吸光度均随时间逐渐增大,但 37℃ 情况更快达到最大值,维持相对稳定的时间较短,之后吸光度下降的速度较快,而较低温度的 32℃ 情况下达到最大吸光度的时间稍长一些,而且维持最大值稳定的时间较长,之后吸光度的下降也较慢。可见,在不同的温度下进行定量的最佳时间是不同的,找到吸光度较稳定的时段十分关键,结果还表明,对于该种氧化酶试剂,32℃ 是较合适的应用温度。

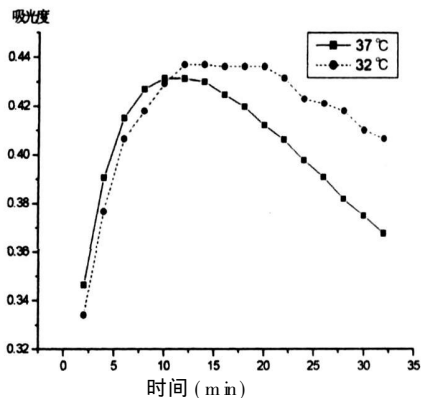


图 3 不同温度下葡萄糖溶液吸光度随时间的变化 (20.26mmol/L, 550nm)

图 4 是两种不同温度下在 550nm 处用最小二乘法拟合不同浓度得到的相关系数与时间的关系曲线,由图 4 中得知,在 32℃ 与 37℃ 下不同时刻葡萄糖溶液吸光度与浓度 550nm 均有较好的相关性,相关系数  $R > 0.998$  相比之下,在 32℃ 时相关性更好一些,而且在葡萄糖溶液与氧化酶反应 10min 以后相关系数约为 0.9998 结合图 3 中低温下葡萄糖与酶作用后较长时间内吸光度保持相对较为稳定的结

果,说明在 32℃下,在 10~ 20m in 内测量有利于获得更加精确的测量结果。

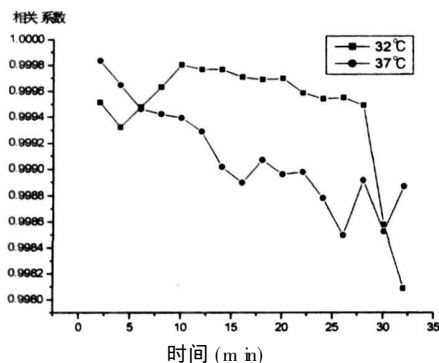


图 4 不同温度下相关系数与时间的关系曲线 (2.03~ 38.49mmol/L, 550nm)

### 2.3 测量时间的影响

图 5 为 32℃下,550nm 处 7 种不同浓度葡萄糖样品的吸光度随时间的变化关系曲线,由图中可以看出,在 0~ 10m in 内,吸光度逐渐变大,表明葡萄糖与酶的反应正在进行之中;大约 10m in 后达到峰值并维持一段时间,然后吸光度开始逐渐变小,这与实验过程观察到的葡萄糖样品的颜色变化:颜色逐渐加深——保持不变几分钟——逐渐变淡的现象相符,浓度越高的样品颜色衰退的现象较明显。从图 5 中可以看出,在大约 10~ 15m in 时测量吸光度相对较为稳定,较适合于对葡萄糖进行定标。

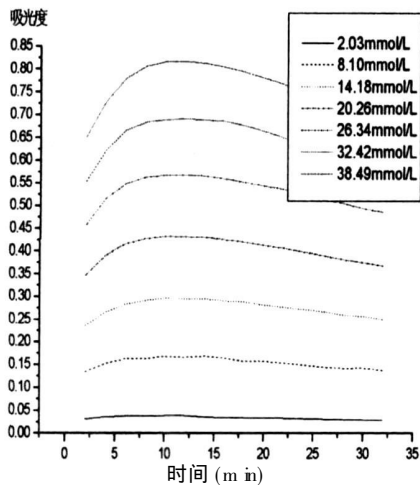


图 5 不同浓度葡萄糖溶液吸光度随时间的变化关系 (32℃, 550nm)

按定义<sup>〔8〕</sup>

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - Y_{pi})^2}{n_p}}^{1/2}$$

其中,SEP 为标准预测误差,  $n_p$  为样品数,  $Y_i$  为葡萄糖浓度理论值,  $Y_p$  为测量值。

在 32℃情况下,以反应 10m in 时不同浓度的葡

萄糖水溶液的吸光度与浓度间作最小二乘法线性定标,得到定标方程,计算各浓度的预测值以及预测误差。考虑到实际应用中测量时间可能出现误差,为考察因测量时间的误差引起的预测误差,以 10m in 时所作的定标方程为参考标准,分别计算各浓度样品在 6m in, 8m in, 12m in, 14m in 时的预测值及标准预测差 (见表 1)。

表 1 32℃下在不同时间测量的测量值及标准预测误差

理论值 (mmol/L)	测量时间 (m in)				
	6	8	10	12	14
2.03	1.985	2.079	2.020	2.092	1.948
8.10	8.109	8.036	8.044	8.056	8.213
14.18	13.898	14.098	14.034	14.128	14.166
20.26	21.871	22.033	21.735	21.718	21.798
26.34	27.222	27.376	27.053	27.219	27.272
32.42	32.573	32.721	32.371	32.720	32.746
38.49	38.065	38.508	38.299	38.605	38.597
SEP	0.723	0.786	0.626	0.656	0.694

由表 1 可见,当测量时间偏离 10m in 时,误差增大,当测量时间不足 10m in,如 6m in 和 8m in 时,预测误差较大,而当测量时间超过 10m in,如 12m in 和 14m in 时,预测误差较小,由前述 32℃下溶液的吸光度在小于 10m in 时变化较快,而在 10~ 15m in 时间段保持相对稳定的实验现象很容易解释这个结论。

### 2.4 光谱带宽的影响

定量分析 32℃下 10m in 的测量光谱,以 550nm 为中心,分别取 1nm, 10nm, 20nm, 30nm 带宽范围内吸光度的光谱面积与浓度作相关性分析及面积定量,利用最小二乘法拟合,得到的不同的预测模型,利用如下相对误差公式:

$$\text{相对误差} \Delta = \frac{|Y_{pi} - Y_i|}{Y_i} \times 100\%$$

上式中  $Y_i$  为葡萄糖浓度的理论值,  $Y_{pi}$  为葡萄糖浓度的测量值,  $\Delta$  为相对误差。

在不同光谱带宽范围作面积定量得到的测量值的相对误差 (见表 2)。

表 2 不同光谱带宽范围作面积定量的相对误差

理论值 (mmol/L)	带宽 (nm)			
	1	10	20	30
2.03	0.59	0.64	0.64	0.74
8.10	0.67	0.70	0.73	0.75
14.18	1.03	1.03	1.02	1.00
20.26	0.50	0.51	0.52	0.53
26.34	1.34	1.34	1.35	1.35
32.42	0.15	0.15	0.15	0.15
38.49	0.50	0.50	0.51	0.52

结果表明,不同光谱带宽范围作面积定量得到的测量值的相对误差差别很小,即使带宽增大到30nm,相关系数仍然大于0.9999。该结果说明,氧化酶法葡萄糖定量可以采用有一定带宽的光源(如带宽30nm的发光二极管),无需分光,无需滤光,可设计成掌上型专用仪器,取代传统的分光光度计,这已在我们研制的“便携式多功能比色仪”中得到验证(见另文报道)。

### 3 结论

由以上实验结果可知,葡萄糖与酶的反应是一个动力学过程,对于某种氧化酶试剂,选择合适的测量时间和测量温度对提高葡萄糖定量精度极为重要。实验结果表明,本文所用的氧化酶试剂在32℃下葡萄糖氧化酶与葡萄糖作用约10~15min后在550nm峰值附近进行定量,效果较好,相关系数0.9999,预测标准误差SEP可达到0.626mmol/L。结果还表明,用葡萄糖氧化酶法进行葡萄糖定量时,如果测量时间和温度偏离指定值,将产生较大误差,然而,即使定量波长偏离吸收峰,并在一定带宽范围内(如30nm)进行定量,仍能得到比较理想的结果(相对误差<1.4%),该结果显示,氧化酶法葡萄糖定量装置可以采用有一定带宽的光源(如带宽30nm的发光二极管),无需分光,甚至无需滤光,可设计成掌上型专用仪器,取代传统的分光光度计,这是很

有实际应用意义的。

### 参考文献

- 1 陈文亮,徐可欣,杜振辉等. 人体无创血糖检测技术, 仪器仪表学报, 2003 24 258~ 261, 265(第4期增刊)
- 2 赵莹,张元福,杨丽敏等. 中红外光谱无创检测血糖新方法, 高等学校化学学报, 2005, 26 1052~ 1054
- 3 Berger A J, Koo T W, Itzkan I et al. Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy, Applied Optics 1999, 38(13): 2916~ 2926
- 4 Zhao Z M, Mylyl R. Photoacoustic determination of glucose concentration in whole blood by a near-infrared laser diode. Proceedings of SPIE, 2001, 4256 77~ 83
- 5 崔厚欣,徐可欣,陈民森等. 人体血糖浓度近红外光谱无创检测过程中温度对结果的影响, 光谱学与光谱分析, 2006, 26(5): 838~ 841
- 6 Buulsema J T, Hayward J E, Farrell T J et al. Correlation between blood glucose concentration in diabetes and non-invasively measured tissue optical scattering coefficient. Optics Letters 1997, 22(3): 190~ 192
- 7 张家庆. 血糖及其他体液葡萄糖测定进展, 中华内分泌代谢杂志, 2003 19 333~ 335
- 8 Fredric M. Han, Glenn M. Cohen, Kirti Patel and Brent R. Gooch. Multivariate Determination of Glucose Using NIR Spectra of Human Blood Serum, Proceedings of the 16th Annual International Conference of the IEEE

## Study on the experimental conditions for determination of glucose using glucose oxidase and spectrophotometric

Li Zhenqing Ni Yi Ding H aifeng Huang Meizhen

( Institute Of Optical Engineering Department of Physics Shanghai Jiao Tong University Shanghai 200240)

**Abstract** According to the glucose concentration range in human urine and blood, the dynamic processes of the glucose aqueous solutions between 2.0mmol/L and 38.5mmol/L reacting with glucose oxidase (GOD) reagent were studied. The absorption spectra (450~700nm) in different bandwidth, temperature and time were measured and the glucose concentrations were determined by least square method. In this article, some factors which include the wavelength, bandwidth of the spectrum, the temperature and the reaction time will impact on the determination precision were analyzed. The experimental results show that the optimal measurement conditions of the reagent we used are 32℃, 10 to 15 minutes after reacting and calibrating at 550nm, in this situation, we get the correlation coefficient  $r > 0.9999$ , the standard error of the prediction (SEP) is about 0.626mmol/L. The results also show that if the measurement time and temperature is deviate to this optimal conditions, it will result in a considerable measurement error; however, if we calibrate the glucose concentration with in a bandwidth of 20nm rather than 1nm at the center wavelength of the absorption spectra peak, the measurement error is small.

**Key words** Glucose oxidase (GOD) Spectrophotometric Temperature Least square method