

亚甲基蓝褪色光度法测定肝素^①

杜美菊^② 凌翠霞 马淮凌

(商丘师范学院化学系 河南省商丘市 476000)

摘 要 用紫外-可见光谱法研究肝素(Hep)对亚甲基蓝(MB)的褪色反应,在 pH3.0 的 Britton Robinson 缓冲溶液中,肝素与亚甲基蓝形成离子缔合物时,染料发生明显的褪色,体系吸光度的降低与肝素钠浓度成正比。建立了一种简单、灵敏、选择性高的肝素测定方法。本法在 0—4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈现良好的线性关系($r=0.9978$),回收率范围为 98.8%—101.9%。用于肝素钠注射液的分析,结果令人满意。

关键词 肝素,分光光度法,亚甲基蓝。

中图分类号:O657.32

文献标识码:B

文章编号:1004-8138(2006)02-0224-04

1 前言

肝素(Heparin, 简称为 Hep)为葡糖胺聚糖,是一种广泛存在哺乳动物肝、脾、肾、胸腺、肠黏膜、肌肉和血液等中的天然抗凝物质,具有广泛的生物学功能,如抗凝血、调血脂、抗血栓、免疫调节、抗炎、抗过敏等,是预防血栓形成和治疗急性静脉血栓的重要药物^[1]。对于不同的疾病应有不同的最适剂量,临床上需要控制,目前肝素的测定方法有生物方法^[2]、分光光度法^[3,4]、高效液相色谱(HPLC)法^[5]、毛细管电泳法^[6]、质谱法^[7]。分光光度法由于操作简便、快速、仪器价廉、灵敏度较高等优点而得到广泛的应用。因此进一步研究灵敏度高、选择性好的新分光光度法具有重要的意义。本文研究了亚甲基蓝(MB)与肝素的相互作用,根据其离子缔合物溶液在特定波长处吸光度值与肝素的含量成比例的特点,建立了一种快速、简便、灵敏的测定肝素含量的分光光度法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

日立 UV-3010 型紫外可见分光光度计(日本日立公司);UV-760CRT 双光束紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);pHS-3C 型数显酸度计(杭州东星仪器设备厂)。Hep(美国 sigma 公司,150IU/mg)贮备液:0.1000g/L,于冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;亚甲基蓝(生物染色剂,上海三厂)贮备液:1.00g/L,于冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;Britton-Robinson 缓冲溶液:用磷酸、冰乙酸和硼砂配制,在酸度计上用 NaOH 溶液调至所需 pH 值。肝素钠注射液分别由常州千红制药厂及上海制药二厂生产。实验用水均为二次去离子水,所用其他试剂均为分析纯。

2.2 实验方法

取一组 25mL 容量瓶,加入一定量的亚甲基蓝溶液,然后依次加入不同体积的 Hep 溶液,再加

① 河南省自然科学基金项目,项目编号:0511020300

② 联系人,电话:(0370)2592844(办);E-mail:dumeiju@eyou.com

作者简介:杜美菊(1956—),女,河南省睢县人,副教授,研究方向:光谱分析和药物包封。

收稿日期:2005-11-01;接受日期:2005-11-08

入一定量的 BR 缓冲溶液, 以二次去离子水稀释至刻度, 混合均匀。扫描 400—800nm 之间的吸收曲线或测定特定波长下的吸光度值。全部实验均在室温条件下完成。

3 结果与讨论

3.1 吸收光谱

按实验方法配制溶液后, 于 UV-760CRT 紫外可见分光光度计上扫描 400—800nm 的吸收光谱。图 1 为亚甲基蓝在水溶液中的吸收光谱, 当亚甲基蓝浓度较低时, 仅在 656nm 处有一个明显的吸收峰, 随着浓度的增加, 在 611nm 处出现一个明显的吸收峰, 为染料聚集体的吸收。

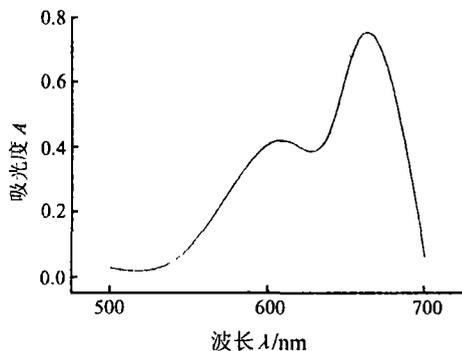


图 1 亚甲基蓝溶液的吸收光谱
pH=3.0。

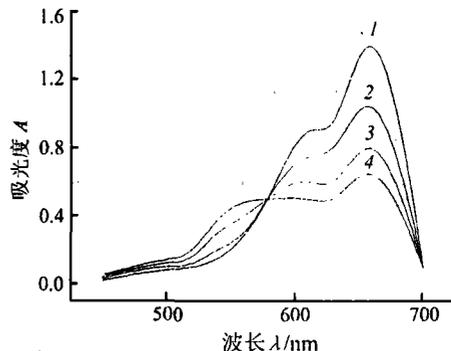


图 2 亚甲基蓝和肝素混合溶液的吸收光谱
肝素浓度 ($\mu\text{g/mL}$): 1—0.0; 2— 2.0×10^{-2} ;
3— 4.0×10^{-2} ; 4— 6.0×10^{-2} 。pH=3.0。

固定溶液 pH 值和亚甲基蓝浓度, 逐渐加入肝素后呈现褪色反应, 656nm 处的吸光度随肝素浓度的增加而明显下降, 而在 570nm 附近形成一个新的吸收峰, 说明肝素和亚甲基蓝反应形成了复合物, 见图 2。选择 656nm 为测定波长, 利用褪色法来测定肝素。

3.2 酸度的影响

用一系列不同 pH 值的 Britton-Robinson 缓冲溶液, 试验了溶液 pH 值对复合物吸光度的影响, 结果表明, pH 为 2.0—7.0 范围内影响不大, 本实验选用 pH=3.0 缓冲溶液, 用量为 5mL。

3.3 显色稳定性

固定 Hep 和 MB 浓度, 考察了时间对反应的影响。结果表明, 室温下褪色反应在 10min 达到完全, 此后吸光度值能稳定 4h 以上。

3.4 校准曲线和检出限

在选定的实验条件下, 肝素的浓度在 $0-4.0 \mu\text{g/mL}^{-1}$ 范围内呈现良好的线性关系, 回归方程为: $A = 1.12 - 0.800C$, $r = 0.9978$ 。

3.5 共存物质的影响

3.5.1 乙醇用量的影响

固定亚甲基蓝和肝素的浓度, 向体系中加入乙醇, 结果当乙醇用量在 2mL 以上时使体系的吸光度值降低。乙醇的影响说明在二者结合中, 除了静电力之外还存在着其他作用。

3.5.2 其他共存物质的影响

为考察实验干扰因素对测定结果的影响, 在 MB 和 Hep 混合溶液中添加不同阴、阳离子、糖类物质和氨基酸, 观察其对复合物吸光度值的影响, 结果见表 1。

实验结果表明,共存物质的影响均在误差范围内,说明方法有很好的选择性。

3.6 样品分析

表 1 干扰物质对亚甲基蓝和肝素反应的影响

| 共存物质 | 强度(%) | 共存物质 | 强度(%) |
|-------------------|--------|--------|--------|
| Fe ³⁺ | - 3.20 | 葡萄糖 | - 0.90 |
| Mg ²⁺ | 4.10 | 蔗糖 | 4.30 |
| Ca ²⁺ | 1.50 | 柠檬酸 | 3.80 |
| Pb ^{w2+} | 1.20 | L-亮氨酸 | 2.60 |
| Cu ²⁺ | 0.45 | L-谷氨酸 | - 0.11 |
| Mn ²⁺ | 0.78 | L-苯丙氨酸 | 3.90 |
| Hg ²⁺ | - 0.43 | L-赖氨酸 | 4.70 |
| Cd ²⁺ | 1.10 | L-精氨酸 | 1.20 |

3.6.1 样品的制备

精密量取肝素钠注射液 1.00mL 于 100mL 容量瓶中,用二次水稀释至刻度,摇匀,并精密量取此液 2.00mL 于 100mL 容量瓶中,用二次水稀释到刻度,摇匀。

3.6.2 样品的测定

吸取上述制备好的样品二次稀释液 5.00mL,按 2.2 实验方法测定,得到肝素钠注射液效价 (IU/2mL, 1mg = 160IU),结果见表 2。对所分析样品进行标准加入回收实验,结果见表 3。

表 2 肝素钠注射液效价的测定结果

| 产地和批号 | 标示量 (10 ⁴ IU/2mL) | 测得效价值 (10 ⁴ IU/2mL) | | | | | 平均值 (10 ⁴ IU/2mL) | RSD (%, n=5) |
|-----------|---------------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|---------------------------------|-----------------|
| | | | | | | | | |
| 常州 010322 | 1.25 | 1.23 | 1.22 | 1.25 | 1.23 | 1.20 | 1.23 | 1.52 |
| 常州 020801 | 1.25 | 1.22 | 1.25 | 1.26 | 1.28 | 1.24 | 1.25 | 1.79 |
| 上海 010604 | 1.25 | 1.20 | 1.25 | 1.29 | 1.26 | 1.21 | 1.24 | 2.99 |

实验结果表明,在 pH= 3.0 的 Britton Robin-son 缓冲溶液中,亚甲基蓝与肝素发生缔合,使溶液出现明显的褪色,最大褪色波长为 656nm,此处溶液吸光度的降低与肝素钠浓度成正比,由此建立了测定肝素的新分光光度法。方法的线性范围在 0—4.0μg/mL⁻¹。方法简便,具有较高的灵敏度,选择性良好。用于肝素钠注射液效价的测定,结果令人满意。

表 3 回收率的测定结果

| 样品序号 | 加入量(μg) | 测得量(μg) | 回收率(%) |
|------|---------|-------------|-----------|
| 1 | 10.00 | 9.85±0.186 | 98.5±1.9 |
| 2 | 10.00 | 10.09±0.157 | 100.9±1.6 |
| 3 | 10.00 | 10.21±0.135 | 102.1±1.4 |

参考文献

- [1] 周自永. 新编常用药手册[M]. 北京: 金盾出版社, 1987. 290.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典, 二部[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995. 307.
- [3] Jiao Q C, Liu Q, Sun C *et al.* Investigation on the Binding Site in Heparin by Spectrophotometry[J]. *Talanta*, 1999, **48**(5): 1095—1101.
- [4] 徐红, 刘绍璞, 罗红群. 甲基紫分光光度法微量肝素[J]. 贵阳医学院学报, 2003, **28**(1): 25—27.
- [5] 毛平, 黄晓兰, 李翠贞等. 高效液相色谱法测定血浆肝素含量[J]. 中华医学检验杂志, 1995, **18**(6): 358—360.
- [6] Amdofo S A, Wang H M, Linhardt R J. Disaccharide Compositional Analysis of Heparin Sulfate Using Capillary Zone Electrophoresis[J]. *Anal. Biochem*, 1991, **199**(2): 249—255.
- [7] Schiller J, Arnhold J, Bensrd S *et al.* Cartilage Degradation by Hyaluronate Lyase and Chondroitinase ABC: A MALDI-TOF Mass Spectrometric Study. *Carbohydrate Research*, 1999, **318**(1—4): 116—122.

Spectrophotometric Determination of Trace Heparin with Methylene Blue

DU Mei-Ju LING Cui-Xia MA Huai-Ling

(Department of Chemistry, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000, P. R. China)

Abstract A new spectrophotometric method for the determination of trace heparin was developed based on the discoloration reaction of Hep to MB in the Britton-Robinson buffer solutions of pH 3.0. The reduction in absorbance was directly proportional to the concentration in the linear range of 0—4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9978$) with the recovery of 98.8%—101.9%. The method is sensitive and selective, and was applied to determine heparin in the injection with satisfactory results.

Key words Heparin, Spectrophotometry, Methylene Blue.

关于召开“全国第一届近红外光谱学术会议”的征文通知

中国分析测试协会和中国石油学会石油炼制分会拟于 2006 年 11 月 8~10 日在北京主办全国第一届近红外光谱学术会议。届时邀请国内有丰富经验的近红外光谱分析专家学者和仪器专家作专题报告, 并进行近红外光谱分析技术交流。热忱欢迎光谱学界专家教授及广大从事分析测试技术工作的科技人员踊跃撰稿, 会议将编辑论文集, 并推荐优秀论文在《分析测试学报》及《现代科学仪器》等杂志上发表。会议热烈邀请国内外仪器厂商前来展出近红外光谱仪以及其它各种分析仪器。

征文内容如下:

- (1) 近红外光谱基础理论研究;
- (2) 近红外光谱分析技术国内外发展综述;
- (3) 近红外光谱仪器新设计、新技术;
- (4) 化学计量学方法在近红外光谱分析中的应用研究;
- (5) 化学计量学软件的研制、校正模型数据库的开发和网络技术;
- (6) 近红外光谱校正模型建立规范、技巧与经验;
- (7) 近红外光谱在农业、石化、烟草、食品、制药、纺织、医学和矿物等领域的应用;
- (8) 近红外光谱分析方法的标准化。

论文截稿日期: 2006 年 7 月 25 日

参展厂商报名截至日期: 2006 年 10 月 20 日

论文投寄方式: 推荐采用电子邮件方式, 磁盘函寄也可。

联系人: 褚小立、王艳斌、许育鹏

电话: (010) 82368342

电子邮件: nir2006@sina.com、nir2006@163.com(建议向两个邮箱同时发送)

通讯地址: 北京市 914 信箱第一分箱

邮编: 100083

会议通知可参见仪器信息网站, 网址: <http://www.instrument.com.cn/conference>

中国分析测试协会

中国石油学会石油炼制分会