

吖啶橙与肝素钠相互作用的分光光度法研究

孙 伟, 雅勤, 滕文荟, 焦 奎

青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东 青岛 266042

摘 要 用分光光度法研究吖啶橙与肝素钠的结合反应, 吖啶橙主要以静电作用的方式与肝素钠发生相互作用。在 pH 2.0 的 Britton Robinson (B R) 缓冲溶液中, 吖啶橙在 478 和 492 nm 处有特征吸收峰, 当加入肝素钠后, 492 nm 处的吸光度值强度降低且在 453 nm 处出现了一个新的吸收峰, 说明两者之间发生了较强的相互作用形成了一种新的复合物, 利用摩尔比法求解两者的结合比为 1: 3。在最佳条件下, 吸光度值的降低与肝素钠的浓度在 3.0~15.0 mg · L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系, 表观摩尔吸光系数 $\epsilon = 1.599 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 检测限(3 σ) 为 0.236 mg · L⁻¹。该方法简单、快速, 应用于肝素钠注射液效价的测定, 结果令人满意。

关键词 分光光度法; 吖啶橙; 肝素; 相互作用

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)01-0116-04

引 言

肝素(Heparin)是一种蛋白多糖, 它常与蛋白质结合在一起, 广泛存在于生命体的肝脏、肠粘膜、肺等器官内。它是由己糖胺和己糖醛酸组成的具有重复二糖单元的链状分子, 具有广泛的生物学功能和药用价值, 如抗凝血、澄清血脂、降低胆固醇、抗炎症等。对肝素的分析方法主要有光散射法^[1, 2]、分光光度法^[3-6]、荧光法^[7]、电化学分析^[8]等方法。其中分光光度法具有仪器价格便宜、操作简单等优点。小分子染料与肝素钠发生结合反应后引起反应体系光谱特性的变化, 进而作为光谱探针从分子水平上认识小分子与肝素钠相互作用的机理, 为生命科学研究提供了有用的信息。

吖啶橙(Acridine orange)是一种阳离子染料, 其分子结构式如图 1 所示, 已用于分光光度法^[9]和荧光法^[10]测定 DNA 等生物大分子。本研究发现在 pH 2.0 的酸性条件下, 吖啶橙能够与肝素发生相互作用, 导致溶液发生明显的褪色现象, 利用光谱特性的变化对相互作用的过程进行了研究, 优化了相互作用的条件, 考察了常见干扰物质对测定的影

响, 并应用于肝素钠注射液样品的测定, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cary 50 Probe 型紫外-可见分光光度计(澳大利亚 Varian 公司); 752 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂); pH S 25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

1.0 g · L⁻¹ (140 IU · mL⁻¹) 肝素钠(Heparin, Hep, 140 IU · mg⁻¹, 中国医药上海化学试剂公司)贮备液, 4 ℃冰箱保存, 使用时再进行稀释(其摩尔质量以每个重复二糖单元的摩尔质量表示, 为 665 g · mol⁻¹); 1.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 吖啶橙(AO, 中国医药上海化学试剂公司), 0.2 mol · L⁻¹ 的 Britton Robinson(B R) 系列缓冲溶液; 所用试剂均为分析纯, 实验用水均为二次石英蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 的比色管中依次加入 0.6 mL 的 1.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹ AO, 0.2 mol · L⁻¹ B R 缓冲溶液 1.0 mL 和一定量 Hep 标准溶液或 Hep 注射液样品溶液, 用水定容至刻度后摇匀, 在 25 ℃下静置反应 15 min。以对应的试剂空白为参比, 用 1 cm 比色皿在 492 nm 处测定其吸光度值。其中试剂空白记为 A₀, 含有 Hep 的记为 A, 计算 $\Delta A = A_0 - A$ 。

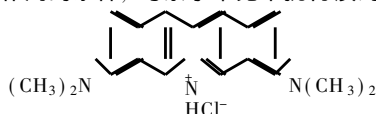


Fig 1 The molecular structure of acridine orange

收稿日期: 2005-10-08, 修订日期: 2006-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(20405008, 20635020), 青岛市自然科学基金项目(04-2 JZ-114)和青岛科技大学博士后科学基金项目(0022125)资助

作者简介: 孙 伟, 1975 年生, 青岛科技大学化学与分子工程学院副教授

e-mail: sunwei@qust.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果与讨论

2.1 紫外可见吸收光谱

吡啶橙与肝素钠相互作用的吸收光谱曲线如图 2 所示。在 pH 2.0 的 BR 缓冲溶液中, 吡啶橙的最大吸收波长在 478 和 492 nm (曲线 1), 当在其溶液中不断加入肝素钠后, 溶液在 478 和 492 nm 处的吸光度值均下降 (曲线 2~4), 同时在 453 nm 处出现一个新的吸收峰 (曲线 5~7), 这种吸收光谱的变化说明了吡啶橙和肝素钠在溶液中生成了复合物, 从而导致了肝素钠分子构象从随意卷曲的结构变为螺旋的构象^[11]。由于肝素钠每个重复的二糖单元结构中带有 3.0~4.0 个负电荷, 而吡啶橙为阳离子染料, 两者之间可以通过静电作用而相互结合。利用 492 nm 处吸光度值的降低, 从而建立了一种测定肝素钠的分光光度分析新方法。

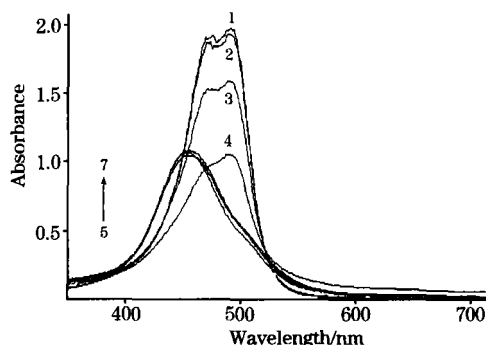


Fig 2 The UV-Vis absorption spectra of acridine orange heparin reaction system

1: pH 2.0 BR + $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ acridine orange;
2~7: 1+5.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ heparin, respectively

2.2 最大结合数的求解

固定吡啶橙的浓度为 $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 改变肝素的加入量, 可得到 492 nm 处吸光度值 A 与肝素钠浓度 c_{Hep} 的关系, 结果如图 3 所示。由图可知, 加入肝素后, 结合反应开始进行, 吡啶橙的吸光度值降低, 当肝素浓度增大到一定

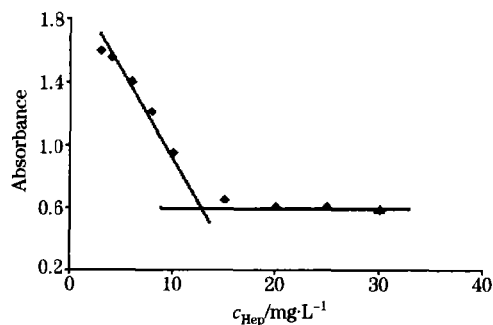


Fig 3 Determination of coordination number of Hep-AO complex

pH 2.0 BR buffer + $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AO with different amount of heparin

值时, A 值不再变化, 表明两者的结合反应已达到平衡。图中折线交点所对应的 c_{Hep} 为 $12.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1.92 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 据此可求解出肝素钠的每个重复二糖单元所结合的吡啶橙分子个数为 $N_c = c_{\text{AO}}/c_{\text{Hep}} \approx 3$ 。

2.3 反应条件优化

2.3.1 pH 的影响及缓冲溶液的用量

在 pH 1.5~6.0 范围内, 试验了缓冲溶液酸度对结合反应的影响, 结果如图 4 所示, 当 pH 为 2.0 时, 吡啶橙的吸光度差值 ΔA 达最大, 此时结合反应最完全, 因此选择 pH 2.0 为实验最佳酸度。考察了缓冲溶液用量的影响, 选择所加的 BR 缓冲溶液的体积为 1.0 mL。

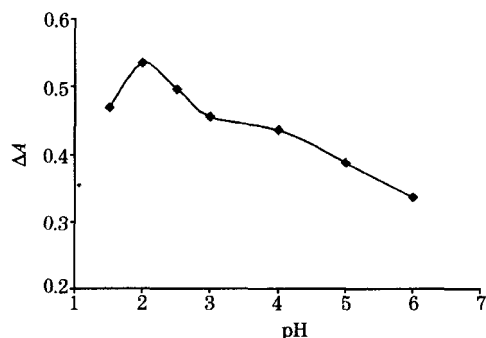


Fig 4 The influence of pH on the binding interaction

Different pH BR buffer solution + $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AO + $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ heparin

2.3.2 吡啶橙浓度的影响

考察了吡啶橙浓度对结合体系的影响, 结果表明, ΔA 随着吡啶橙浓度的增大而增大, 当吡啶橙浓度为 $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ΔA 最大且保持恒定。

2.3.3 反应时间和稳定性

考察了反应时间的影响, 结果表明, 室温下吡啶橙与肝素结合 15 min 后, 即达到反应平衡, 此时 ΔA 最大且在 2 h 之内保持稳定。

2.4 离子强度的影响

通过加入不同浓度 NaCl 来考察了离子强度对结合反应的影响, 结果如图 5 所示。结果表明, 随着离子强度的增大,

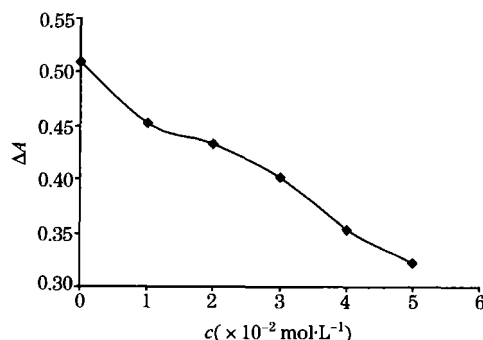


Fig 5 The influence of ionic concentration on the binding interaction

pH 2.0 BR buffer + $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AO + $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ heparin (c : concentration of NaCl)

ΔA 值逐渐减小。这主要是由于肝素钠与吡啶橙之间以静电作用结合, 而强电解质 NaCl 的加入会存在静电屏蔽作用, 阻碍了吡啶橙与肝素钠的结合反应, 减弱肝素钠和染料的合作力, 从而导致体系的 ΔA 值降低。

2.5 共存物质的影响

当固定吡啶橙的浓度为 $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 肝素钠的浓度为 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 实验了常见金属离子、氨基酸等物质对 AO-Hep 体系的干扰, 结果如表 1 所示。可以看出, 常见的干扰物质对测定基本没有影响, 表明吡啶橙作为肝素钠的光谱探针具有较好的选择性。实验了 SDS, CTMAB 等表面活性剂对反应的影响。结果表明, 它们的加入对体系测定的影响较为显著, 这说明离子型表面活性剂参与了体系的竞争反应, 从而削弱了吡啶橙和肝素钠的静电作用力。实验了蛋白质、DNA 对体系的影响, 结果表明, 两者对实验的影响较大, 这是因为, 蛋白质和 DNA 也可以通过静电力等作用与有机小分子染料结合, 从而阻碍吡啶橙和肝素钠的结合反应。

2.6 工作曲线和检测限

在最佳实验条件下, 按照实验方法绘制了测定肝素钠的工作曲线, 当肝素钠的浓度在 $3.0 \sim 15.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与 ΔA 成线性关系, 线性回归方程为 $\Delta A = -0.143 + 0.0839c$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ($n=9, r=0.993$), 对 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肝素钠进行 11 次平行测定的相对标准偏差为 1.43%, 方法的检出限

(3σ) 为 $0.236 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 表观摩尔吸光系数 $\varepsilon = 1.599 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2.7 样品分析及回收率

肝素钠注射液由天津市生物化学制药厂生产, 批号分别为 20031003 和 20040910 样品, 效价均为 $12500 \text{ IU} \cdot 2 \text{ mL}^{-1}$ 。精确吸取肝素钠注射液进行适当比例稀释后, 按实验方法对肝素钠的效价进行了测定, 其结果如表 2 所示, 回收率实验结果如表 3 所示, 由表中可以看出, 本方法具有简单、灵敏、准确的优点, 实验结果令人满意。

Table 1 Effect of coexistent substance on the determination of $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ heparin

物质名称	浓度 $/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	相对偏差/%	物质名称	浓度 $/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	相对偏差/%
Ba ²⁺	1.0×10^{-5}	4.48	Citric acid	10.0	3.06
Fe ³⁺	1.0×10^{-5}	3.23	L-Valine	10.0	3.82
Cu ²⁺	1.0×10^{-5}	5.45	L-Arginine	10.0	-1.99
Hg ²⁺	1.0×10^{-5}	6.99	L-Tryptophan	10.0	-1.83
Ni ²⁺	1.0×10^{-5}	1.40	L-Serine	10.0	5.50
Pb ²⁺	1.0×10^{-5}	5.67	L-Cysteine	10.0	3.21
Mg ²⁺	1.0×10^{-5}	1.82	L-Leucine	10.0	2.23
Co ²⁺	1.0×10^{-5}	3.08	L-Glutamine	10.0	-1.01
SDS	1.0×10^{-5}	13.99	DNA	10.0	26.43
CTMAB	1.0×10^{-5}	12.31	Hemoglobin	10.0	14.55

Table 2 Determination results of heparin in heparin sodium injection sample

产品批号	单次测定值/ $(\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1})$					平均值 $/(\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD/%	标示量 $/(\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1})$
	1	2	3	4	5			
20040910	6.253	6.225	6.225	6.330	6.253	6.257	0.69	6.250
20031003	6.253	6.262	6.234	6.244	6.234	6.245	0.20	6.250

Table 3 Recovery results for the determination of heparin

产品批号	原有量	加入量	测定总量/(mg·L ⁻¹)					平均值	回收率/%
	/(mg·L ⁻¹)	/(mg·L ⁻¹)	1	2	3	4	5	/(mg·L ⁻¹)	
20040910	7.816	5.0	12.85	12.81	12.88	12.78	12.79	12.82	100.1
20031003	7.816	5.0	12.83	12.81	12.83	12.78	12.81	12.81	99.9

参 考 文 献

[1] Luo H Q, Liu S P, Li N B, et al. Anal. Chim. Acta, 2002, 468: 275.
[2] Liu S P, Luo H Q, Li N B, et al. Anal. Chem., 2001, 73: 3907.
[3] Jiao Q C, Liu Q. Anal. Lett., 1998, 31: 1311.
[4] SUN Wei, JIAO Kui, NIU Xue-liang, et al(孙伟, 焦奎, 牛学良, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(8): 1322.
[5] SUN Wei, DING Ya-qin, RAO Jun, et al(孙伟, 丁雅勤, 饶俊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(7): 1322.
[6] Zhang S Z, Li N, Zhao F L, et al. Spectrochim. Acta A, 2002, 58: 273.
[7] Bosworth T R, Scott J E. Anal. Biochem., 1994, 223: 266.
[8] Sun W, Jiao K, Han J Y. Anal. Lett., 2005, 38: 1137.
[9] FENG Xi-zeng, LIN Zhang, YANG Lir-jing, et al(冯喜增, 林璋, 杨林静, 等). Chin. J. Anal. Sci. (分析科学学报), 1999, 15: 177.
[10] HE Ming-wei, WANG Guang-ping, LI Jin(贺明伟, 王光平, 李劲). Bull. Hunan Med. Univ. (湖南医科大学学报), 1996, 21: 463.

[11] Mitra A, Nath R K, Chakraborty A K. Colloid Polym. Sci., 1993, 271: 1042.

Spectrophotometric Study on the Interaction of Acridine Orange and Heparin

SUN Wei, DING Ya qin, TENG Wen hui, JIAO Kui

College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China

Abstract The interaction of acridine orange (AO) and heparin was studied by spectrophotometry. In the pH 2.0 Britton-Robinson (B-R) buffer solution, AO had a maximum absorption at 478 nm and 492 nm. After the addition of heparin, the absorbance value at 492 nm decreased greatly and a new absorption peak at 453 nm appeared, indicating a strong interaction taking place in the reaction solution. Under the optimal condition, the decrease in absorbance at 492 nm was linear with the concentration of heparin in the range of 3.0–15.0 mg · L⁻¹. The molar absorptivity was calculated to be $\epsilon = 1.599 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and the detection limit was 0.236 mg · L⁻¹ (3 σ). The method was further applied to the detection of heparin sodium injection samples with satisfactory results. The binding number was calculated to be 1:3 with molar ratio method.

Keywords Spectrophotometry; Acridine orange; Heparin; Interaction

(Received Oct. 8, 2005; accepted Jan. 16, 2006)