

甲苯胺蓝法测定肝素钠含量的校准曲线研究^①

柳轶男^② 莫秀梅^a 何创龙^a 王红声^a

(东华大学材料科学与工程学院 上海市松江区人民北路 2999 号 201620)

^a 东华大学化学化工与生物工程学院 上海市 201620)

摘 要 甲苯胺蓝法是一种被广泛使用的测肝素钠含量的方法。本文绘制了此方法的校准曲线,并且确定了肝素钠线性范围。肝素钠浓度超过了 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 甲苯胺蓝法将不再敏感。
关键词 肝素钠, 甲苯胺蓝法, 校准曲线。
中图分类号: O657.32 文献标识码: B 文章编号: 1004-8138(2009)02-0278-03

1 前言

肝素钠是一种硫酸化的、带高负电荷的酸性粘多糖混合物, 常用来做抗凝血剂。在肝素钠释放体系中, 肝素钠在较短的时期内被缓慢释放, 同时, 在很高程度上保持了肝素钠的生物活性。因此, 与共价涂层相比, 肝素钠释放体系更适合短期临床应用^[1]。

目前, 肝素钠的测定方法有分光光度法^[2-4]、荧光法^[5]、共振瑞利散射(RRS)、高效毛细管电泳法^[6]。但是, 高效毛细管电泳法只能应用于检测临床肝素钠在血液中的含量, 并且由于不同生物个体的影响, 此方法受到了一定限制。荧光方法对实验要求较高, 不但要尽量避光操作, 测量时间尽可能的短, 而且成本很高。蔡炼等^[7]基于肝素钠对甲基紫(MV)共振瑞利散射的增强作用, 检出限为 0.041mg/L, 只能适用于痕量肝素钠的测定。

甲苯胺蓝(Toluidine blue)染色法测肝素钠含量的方法最初是由 Macintosh, F. C^[8]和 Smith P. K.^[9]提出, 之后由于其操作简便、稳定、选择性好而被广泛应用。但是, 由于分光光度法都是有适用范围的, 只有在适当的浓度内, 吸光度才与浓度呈线性关系, 即符合郎伯-比耳定律。Peng 等^[10]通过伏安法测得肝素钠极限浓度为 0.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 但没有给出校准曲线。本文通过改变肝素钠含量重复甲苯胺蓝染色法, 得到校准曲线和测肝素钠的极值为 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这表明, 如果肝素钠含量超过这个值时, 必须通过稀释, 降低肝素钠溶液浓度才可应用甲苯胺蓝染色法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

MULTISKAN MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司); DKB-600B 型电热恒温水箱(上海一恒科技有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。甲苯胺蓝溶液

① 国家自然科学基金资助项目(30570503), “111”国家引智计划(B07024)
② 联系人, 电话: (021) 67792741; E-mail: happyliuyinan@mail.dhu.edu.cn
作者简介: 柳轶男(1984—), 女, 山东省德州市人, 东华大学材料学院 06 级研究生, 仿生材料专业。研究方向: 生物材料。
收稿日期: 2008-05-23; 接受日期: 2008-11-11
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(0.005%, 0.01mol/L HCl, 0.2% NaCl); 肝素钠 MW6000-20000(上海润洁化学试剂有限公司), 配制成不同浓度的肝素钠 PBS 溶液(pH 7.4); 正己烷(分析纯, 上海玻尔化学试剂有限公司)。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

配制不同浓度的肝素钠 PBS 溶液 2mL, 加入甲苯胺蓝溶液 3mL, 充分搅拌后于 37℃恒温箱中反应 2h。取出后加入 3 mL 正己烷, 充分震动搅拌, 然后读取水层在 630nm 处的吸光度。以肝素钠浓度(mg/mL)为 x 轴, 吸光度为 y 轴, 绘制校准曲线。

3 结果与讨论

3.1 吸收光谱

配制溶液后, 于 WFH-203B 三用紫外分析仪上扫描 200—800nm 的吸收光谱。图 1 为纯甲苯胺蓝溶液和不同浓度肝素、甲苯胺蓝溶液中的吸收光谱。甲苯胺蓝在 630nm 处有一强吸收峰, 当加入肝素后呈现褪色反应, 630nm 处的吸光度明显下降。肝素浓度为 16μg/mL 和 160μg/mL 时, 尽管浓度差值很大, 但是吸光度差值相对较小, 在 200—400nm 处甚至发生重合。说明肝素浓度在 160μg/mL 以下, 甲苯胺蓝方法已经不敏感了。

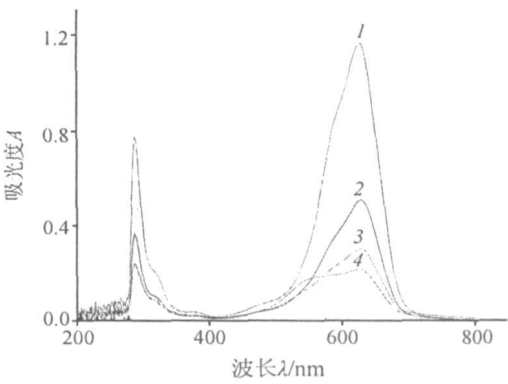


图 1 吸收光谱

肝素浓度(μg/mL): 1——0; 2——8;
3——16; 4——160。

3.2 Smith P.K.^[9]的校准曲线讨论

Smith P.K. 的校准曲线如图 2, 估测其数据值还原得到的校准曲线如图 3。

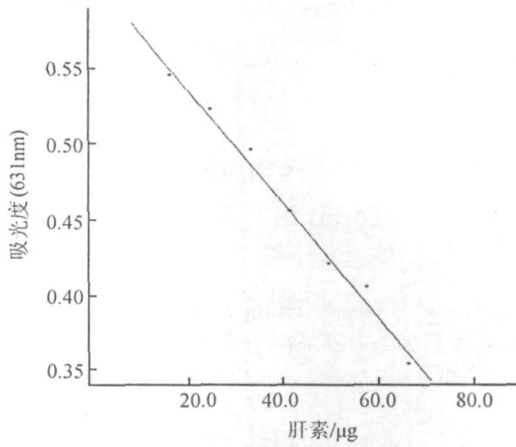


图 2 Smith P.K. 的校准曲线^[9]

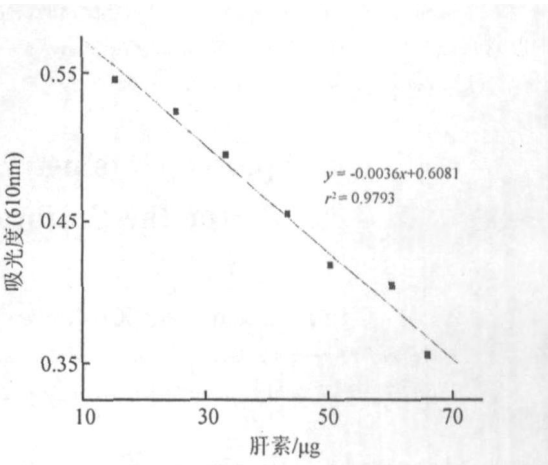


图 3 还原后的校准曲线^[9]

线性方程约为: $y = -0.0036x + 0.6081 (x: \mu\text{g})$ 。
如果肝素钠质量与吸光度一直呈线性趋势, 那么当 $y = 0$ 时, $x \approx 169\mu\text{g} = 0.169\text{mg}$ 。
这意味着当肝素钠质量达到 0.169mg 以上时, 吸光度为 0。但是实验中发现即使肝素钠质量为 5mg, 仍然可以测到其吸光度值。因此, 只有在一定的范围内肝素钠质量才和吸光度值成线性关系。

这就是说, 甲苯胺蓝方法只有在肝素钠质量或浓度较小时才有效。

3.3 肝素校准曲线

从图 4 中可以看出, 随着肝素钠浓度的增加, 肝素钠浓度和吸光度值的关系趋势趋向于一条直线。当 $y = 0.212$ 时, $x \approx 34 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。在浓度为 $0-34 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 肝素钠浓度和吸光度值成线性关系。线性方程为: $y = -3.072x + 0.6569$, $r^2 = 0.9903$ 。如果肝素钠浓度超过这个范围, 必须将肝素钠溶液稀释, 否则甲苯胺蓝方法将不再适合。

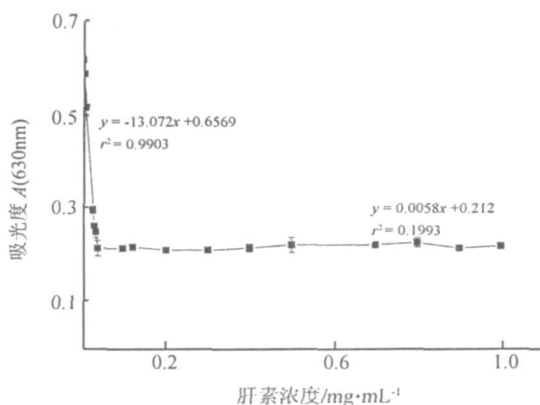


图 4 肝素缓释的校准曲线

参考文献

- [1] Moon H T, Lee Y, Han J K *et al.* A Novel Formulation for Controlled Release of Heparin-DOCA Conjugate Dispersed as Nanoparticles in Polyurethane Film[J]. *Biomaterials*, 2001, **22**: 281—289.
- [2] 孙伟, 焦奎, 牛学良等. 用灿烂甲酚蓝褪色分光光度法测定肝素钠的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, **15**(8): 1322—1324.
- [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, 罗红群等. 碱性二苯基萘基甲烷染料褪色分光光度法测定肝素钠[J]. *高等学校化学学报*, 2002, **23**(2): 216—218.
- [5] Luong-Van E, Grøvdahl L, Chua K N *et al.* Controlled Release of Heparin from Poly(ϵ -Caprolactone) Electrospun Fibers[J]. *Biomaterials*, 2006, **27**: 2042—2050.
- [6] 周小棉, 张蒙恩, 刘建武. 高效毛细管电泳法测定血浆中肝素钠含量及临床应用[J]. *药物分析杂志*, 1997, **5**: 304—306.
- [7] 蔡炼, 徐红. 甲基紫共振瑞利散射法测微量肝素钠[J]. *化工时刊*, 2007, **21**(5): 41—43.
- [8] Macintosh F. C. A Colorimetric Method for the Standardization of Heparin Preparations[J]. *Biochem*, 1941, **35**: 776—782.
- [9] Smith P K, Mallia A K, Hermanmon G T. Colorimetric Method for the Assay of Heparin Content in Immobilized Heparin Preparations[J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, **109**: 466—473.
- [10] Peng X P, Luo H Q, Li N B. Voltammetric Study on the Interaction of Heparin with Toluidine Blue, and Its Analytical Application[J]. *Microchim Acta*, 2007, **156**: 297—302.

Spectrophotometry of Toluidine Blue Method for the Calibration Curve of Heparin

LIU Yi-Nan Mo Xiu-Mei^a HE Chuang-Long^a WANG Hong-Sheng^a

(College of Material Science and Engineering, Donghua University, No. 2999 Renminbeilu, Shanghai 201620, P. R. China)

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, P. R. China)

Abstract Spectrophotometry is one of the methods widely used for the determination of heparin. The calibration curve was studied, the absorbance had a good linear relationship with the concentration of heparin in low level, the toluidine blue method will no longer be sensitive beyond $0-34 \mu\text{g}/\text{mL}$ amount of heparin.

Key words Heparin, Toluidine Blue Method, Calibration Curve.