

维多利亚蓝 B 分光光度法测定硫酸软骨素

陈媛媛, 蒋治良*, 李振中, 周苏梅, 孙双娇

广西师范大学资源与环境学系, 广西 桂林 541004

摘要 在 pH 4.0 醋酸-醋酸钠缓冲液中, 阳离子染料维多利亚蓝 B 在 614 nm 处有一吸收峰。它与硫酸软骨素(Chs)反应生成缔合微粒后导致 614 nm 处的吸收峰降低, 其吸光度差值与 Chs 浓度在 $0.1 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。据此建立了一个简便、快速、准确测定硫酸软骨素含量的分光光度新方法。该法已用于合成样及康得灵注射液样品分析, 结果满意。

主题词 维多利亚蓝 B; 硫酸软骨素; 缔合微粒; 分光光度法

中图分类号: O657.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)06-1148-03

引言

硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, 简称 Chs)是一类动物性粘多糖, 由动物喉骨、鼻软骨、气管、或骨键、韧带等含 Chs 的软骨组织制取^[1]。Chs 是治疗骨关节疾病药物的主要成分之一。对于关节炎、特别是中老年人最常见的退化性关节炎和关节疼痛、修复关节接头的软骨、关节格格发响有特殊的功效。目前, Chs 测定方法主要有高效液相色谱法^[2, 3]、光度滴定法^[4]、分光光度法^[5]等。高效液相色谱法测定 Chs 的最低检测限为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 操作相对较复杂。用十六烷基三甲基溴化铵光度滴定法^[4]测定 Chs 的线性范围为 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 但操作过程复杂。基于天青 A 与 Chs 建立的分光光度法具有灵敏、快速、简便的特点, 其线性范围为 $0 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[5]。

维多利亚蓝 B(简称 VB)是一种阳离子染料, 已用于脱氧核糖核酸、亚硝酸盐等的分光光度分析^[6], 但未见利用维多利亚蓝 B 与 Chs 形成缔合微粒光度法测定 Chs 的报道。维多利亚蓝 B 分子的氨基带正电荷, Chs 的磺酸基和羧基带负电荷, 二者通过静电引力和疏水作用力形成缔合物微粒, 发生变色效应, 吸光度降低。据此本文建立了一种快速、简便、准确的测定 Chs 含量的分光光度分析法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-3400 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司); 722

型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 岛津 RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津公司)。

Chs 标准品(SIGMA 公司); $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ VB 溶液; pH 3.6 ~ 4.8 醋酸-醋酸钠缓冲液; Chs 样品溶液: 取一定量的康得灵注射液于 50 mL 容量瓶, 定溶, 待测。用水均为二次去离子水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中, 分别加入 0.50 mL pH 4.0 缓冲液, 0.50 mL $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ VB 和一定量的 Chs 标准液, 加蒸馏水定容到 5 mL 刻度, 摇匀。放置 15 min, 以水为参比液, 测 614 nm 处吸光度 A 值; 不加 Chs, 按上述步骤做空白, 测定吸光度 A_0 值。计算 $\Delta A = A_0 - A$ 。

2 结果与讨论

2.1 体系的吸收光谱和共振散射光谱

分别研究了维多利亚蓝 B、亚甲基蓝、结晶紫、铬天青 S、天青 A、罗丹明 B、罗丹明 S、罗丹明 6G 与 Chs 作用。实验结果表明, 维多利亚蓝 B 灵敏稳定。图 1 表明, 维多利亚蓝 B 在 614 nm 处有一最强吸收峰; 随着 Chs 浓度的增加, 混合溶液在 614 nm 处的吸光度值逐渐降低, 这与 VB-Chs 缔合物及其缔合微粒的形成有关。共振散射光谱图 2(1)表明, 维多利亚蓝在溶液中存在聚集且有固液界面形成, 在 400 nm 出现一个最强的共振散射峰; 当加入 Chs 后, 共振散射光强度增强, 表明体系中形成了维多利亚 VB-Chs 缔合微粒, 也与小分子缔合微粒体系共振散射光谱结果一致^[7]。VB 微粒体系的共振散射光谱轮廓[图 2(1)]与 VB-Chs 缔合微粒体

收稿日期: 2005-02-26, 修订日期: 2005-06-18

基金项目: 广西自然科学基金(0575042)和广西高校百名中青年学科带头人科研基金资助项目

作者简介: 陈媛媛, 女, 1982 年生, 广西师范大学资源与环境学系硕士研究生 * 通讯联系人

系[图 2(2)~图 2(4)]的轮廓相似,说明 VB-Chs 缔合微粒的外层分子可能为 VB 分子。

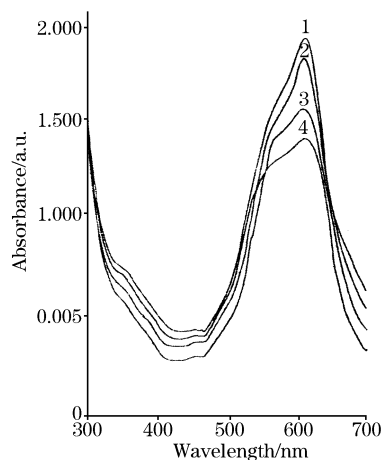


Fig. 1 Absorption spectra

[VB]= $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 4.0

[Chs]: 1: 0.00; 2: $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

3: $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 4: $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

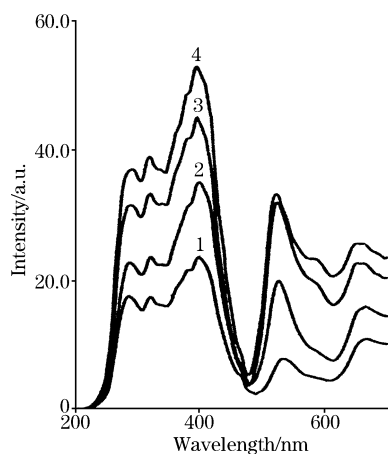


Fig. 2 Resonance scattering spectra

The conditions for 1, 2, 3 and 4 are the same as in Fig. 1

2.2 pH 值的影响

用醋酸-醋酸钠缓冲溶液调节体系的 pH 值,结果表明当缓冲溶液在 pH 4.0 时,体系 ΔA 最大(见图 3)且稳定,所以,本文选择缓冲溶液为 pH 4.0。改变缓冲液的用量,考察缓冲溶液最佳用量。实验表明,缓冲溶液用量为 0.5 mL 时, ΔA 最大,并且体系稳定性较好,本文选择缓冲液用量为 0.5 mL。

2.3 维多利亚蓝 B 浓度的影响

改变维多利亚蓝 B 的浓度,得到如图 4 所示曲线,当维多利亚蓝 B 浓度为 $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, ΔA 最大,且体系较稳定,因此,选择维多利亚蓝 B 浓度为 $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 反应时间的影响

按实验方法,10 min 后体系趋于稳定,吸光度值变化很

小,因而本实验选择 15 min 后测定体系吸光度值。

2.5 共存物质的影响

按实验方法,考察了一些共存物质对测定 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Chs 的影响。结果表明,相对误差在 $\pm 5.0\%$ 范围内,1000 倍的 Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, Br^- , PO_4^{3-} , SiO_3^{2-} ; 500 倍的 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} 、葡萄糖、蔗糖、甘氨酸、尿素; 50 倍的 Cr(III), Fe(III); 10 倍的 L-胱氨酸、L-酪氨酸、L-精氨酸、色氨酸、天冬氨酸、苏氨酸; 1 倍的牛血清白蛋白、人血清白蛋白等不干扰测定。

研究表明^[8],水溶性有机溶剂可溶解缔合微粒,常导致缔合微粒体系的吸光度增大即 ΔA 值降低。分别考察了甲醇、乙醇和丙酮对体系吸光度的影响。结果表明,随着有机溶剂浓度的增加,体系的 ΔA 值逐渐降低,直至接近于 0。这也说明该体系中存在缔合物微粒。

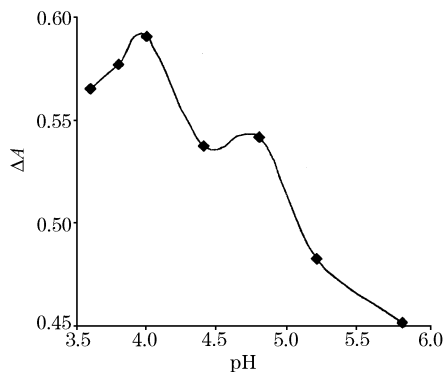


Fig. 3 Effect of pH value

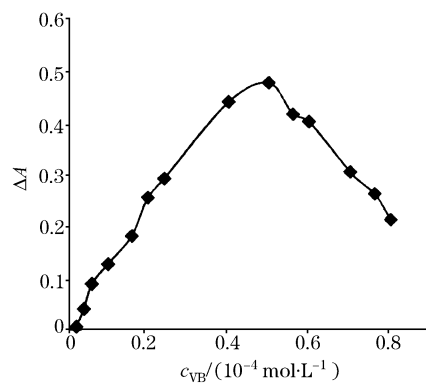


Fig. 4 Effect of VB concentration

Table 1 Analysis of synthetic samples

合成样品	测定均值/($n=6, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
1#	3.05	101.8	2.18
2#	3.04	101.3	2.49
3#	3.08	102.8	3.66

1# : $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}^+ - 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$\text{Al}^{3+} - 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose- $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Chs;

2# : $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+} - 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$\text{Pb}^{2+} - 2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Zn}^{2+} - 3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Chs;

3# : $6.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mn}^{2+} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$\text{Cd}^{2+} - 1.7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea- $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Chs

2.6 工作曲线

在上述确定的最佳条件下, 测量不同 Chs 浓度 c_{Chs} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的吸光度, 绘制 ΔA 与 Chs 浓度的关系, 其线性范围在 $0.1 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间, 回归方程为 $\Delta A = 0.1249c_{\text{Chs}} + 0.0107$, 相关系数 $r = 0.9986$ 。与文献[5]比较, 本法工作曲线的斜率较大, 灵敏度较高, 也是目前测定 Chs 较灵敏的方法之一^[2-5]。

2.7 合成样和康得灵注射液样品分析

按实验方法测定了 3 个合成样品的回收率和精密度 (RSD), 结果满意(见表 1)。

取市售康得灵注射液样品溶液 0.10 mL, 加入 0.3 mL pH 4.0 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 2.5 mL 维多利亚蓝 B 溶液, 进行测定。本法结果与参考结果一致(见表 2)。

Table 2 Analytical results of Chs in Kang-De-Ling injection samples

Chs 样品	单次测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	平均值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%	参考结果/%
1 [#]	2.04, 2.05, 2.08, 2.07, 2.00, 1.98, 1.95	2.02	100.5	3.8	2.00
2 [#]	2.07, 2.10, 2.06, 2.08, 2.02, 2.00, 2.03	2.05	101.5	2.8	2.10

参 考 文 献

- [1] XI Jun, ZHANG You-sen(奚 俊, 张有森). Biological J. (生物学杂志), 2000, 17(6): 33.
- [2] QIN Zhen-shun, CHANG Feng-qi, HAN Hui-xin, et al(秦振顺, 常凤启, 韩会新, 等). Chin. J. Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 2002, 12(3): 306.
- [3] Du J P, Ddington N E. Anal. Biochem., 2002, 306: 252.
- [4] SHI Wen-jian, WU Qiu-hua, ZHUANG Qi-jia(施文健, 吴秋华, 庄奇佳). Phys. Testing and Chem. Anal. Part B: Chem. Anal(理化检验-化学分册), 2003, 39(3): 147.
- [5] GAO Gui-zhen, JIAO Qing-cai, DING Yi-lei, et al(高贵珍, 焦庆才, 丁一磊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 600.
- [6] XU Hong, LIU Shao-pu, LUO Hong-qun(徐 红, 刘绍璞, 罗红群), Phys. Testing and Chem. Anal. Part B: Chem. Anal(理化检验-化学分册), 2002, 38(5): 217.
- [7] LUO Yang-he, JIANG Zhi-liang(罗杨合, 蒋治良). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(12): 1630.
- [8] LIANG Ai-hui, JIANG Zhi-liang, LI Zhen-zhong, et al(梁爱惠, 蒋治良, 李振中, 等). Chin. J. Appl. Chem. (应用化学), 2004, 21: 1217.

Spectrophotometric Determination of Chondroitin Sulfate with Victory Blue B

CHEN Yuan-yuan, JIANG Zhi-liang*, LI Zhen-zhong, ZHOU Su-mei, SUN Shuang-jiao

Department of Resource and Environmental Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract In pH 4.0 acetic acid-sodium acetate buffer solution, cationic dye victory blue B shows an absorption peak at 614 nm, and the absorption peak decreases after it reacts with chondroitin sulfate to form association particles. The decrease in absorption value is linear with chondroitin sulfate concentration in the range of $0.1 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the correlation efficient is 0.9986. The method was applied to the determination of chondroitin sulfate in synthesis samples and real samples with rapidity, simplicity and good accuracy.

Keywords Chondroitin sulfate; Victory blue B; Association particle; Spectrophotometry

(Received Feb. 26, 2005; accepted Jun. 18, 2005)

* Corresponding author