

# 防治血吸虫病藥物的研究

## XXIX. 生物样品中酒石酸的新比色測定法\*

曾 衍 霖

(中国科学院藥物研究所, 上海)

**提要** 用过碘酸使酒石酸氧化断裂为乙醛酸, 然后与对硝基苯肼縮合。生成的乙醛酸对硝基苯肼經提取純化后, 用氢氧化鈉显色, 建立了生物样品中酒石酸的新比色測定法。应用光电比色計时, 检出限度可达5微克。光密度讀数的平均相对偏差为 $4 \pm 3\%$ 。生物样品測定的回收率兔尿为 $106 \pm 15\%$ , 狗血浆为 $74 \pm 6\%$ 。大量錒的存在对測定可无干扰, 因此本法适用于酒石酸錒鉀分子中酒石酸部分的代謝研究。

酒石酸錒鉀(以下簡称 PAT)是当前治疗血吸虫病的主要藥物。有关体内过程的研究, 过去只集中在錒这一部分; 至于酒石酸部分的动态及命运, 則迄今仍属空白, 这可能与缺乏适当的測定方法有关。

1931 Underhill 等用乙酸酸化尿, 再加偏钒酸鈉显色, 以測定尿中酒石酸的含量, 据报告反应似頗专一, 灵敏度可达100—300微克<sup>[1]</sup>。我們曾試过該法, 发现錒有明显的干扰作用, PAT 及酒石酸溶液的顏色反应截然不同, 因此不能直接应用于 PAT 的代謝研究。

1949年 Mathers 曾用过碘酸氧化酒石酸, 然后与对硝基苯肼縮合, 測过水果酒中的酒石酸含量<sup>[2]</sup>。但該法原用作农产品分析, 样品經活性炭脱色后, 尚需用乙酸鉛反复沉淀, 手續繁复, 直接用作生物样品的常規測定, 显然亦有不便。本文报导对該法的精簡与修改, 以及对重要的有关因素如色稳定度、回收率、重現性、可能干扰物质(特别是錒的影响)等所作的观察研究。本法的灵敏度較 Underhill 法提高数十倍, 大量錒的存在对反应可无干扰作用, 从而为 PAT 的代謝研究提供了有利条件。

## 实 驗

### (一) 試剂及仪器

試剂除对硝基苯肼、絲氨酸与丙酮酸为 B. D. H., L. R. 外, 其余均为化学純級以上規格。

对硝基苯肼溶液的配制: 0.5克溶于浓硫酸 3.8毫升, 再加95%乙醇 34.2毫升。其他試剂均用蒸餾水配制。

除吸收光譜的測定用 CF<sub>4</sub> 分光光度計外, 其余实验均用科伟 581 型光电比色計。选

本文1962年6月15日收到。

\* 本文曾于1961年12月17日在上海生理学会会上宣讀。

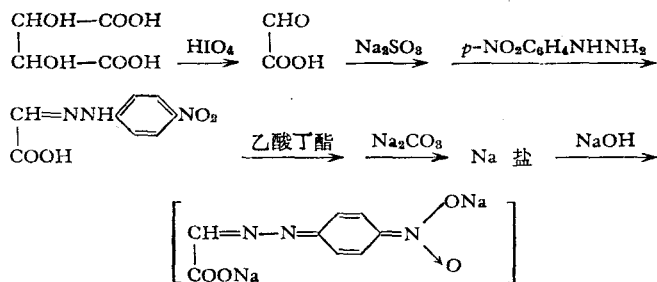
用 480 + 520 号滤光片。

### (二)测定步骤及化学反应过程

测定溶液 5 毫升,加 2% 过碘酸 2.5 毫升,混匀,室温放置 15 分钟。然后加 6% 亚硫酸钠溶液 2.5 毫升混匀,再加对硝基苯肼溶液 1 毫升,混匀后在水浴上加热 10 分钟。冷却,加乙酸丁酯 6 毫升,振摇,吸取酯层 5 毫升,加 10% 碳酸钠 3 毫升,振摇,离心后吸取水层 2 毫升,加 6% 氢氧化钠 3 毫升,2 分钟后进行比色测定。

尿样本吸取一定量后,加水至 5 毫升,直接按上述步骤测定。血浆样本吸取一定量后,先加水至 4 毫升,再加 10% 钨酸钠及 2/3N 硫酸各 0.5 毫升,混匀离心后,吸出上清液;沉淀加水 1 毫升,搅拌后离心,洗涤液加入上清液一并分析。

测定过程中的化学反应如下<sup>[3,4]</sup>:



### (三)显色及褪色

显色极快,加氢氧化钠后迅即达最高峰。此后逐渐褪色。如以半分钟时光密度读数为 100,则 2 分钟后光密度读数降低 6%,8 分钟后降低 32%。褪色情况见表 1。

表 1 乙醛酸对硝基苯肼在氢氧化钠液中的褪色情况

时 间 (分 钟)	1/2	1	2	4	6	8
光密度读数(×100)	65	63.5	61	54.5	49	44
光密度读数消褪率(%)		2	6	16	25	32

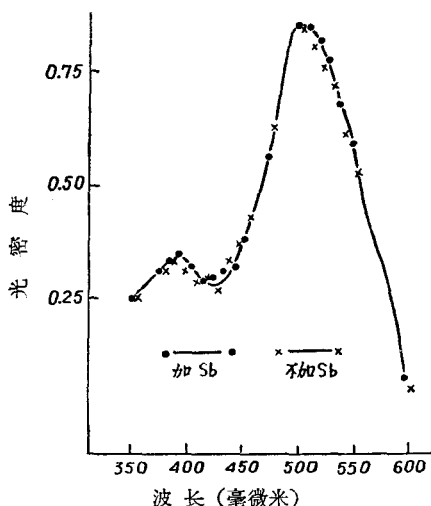


图 1 乙醛酸对硝基苯肼的吸收光谱及锑的影响

因此,在常规测定时,规定在加 NaOH 后 2 分钟进行比色。

### (四)吸收光谱及锑的影响

1 × 10<sup>-4</sup>M 酒石酸水溶液 1.5 毫升,加 0.63% 腈波芬(fouadin)溶液 0.43 毫升(锑含量 20 倍于酒石酸的克分子浓度),再加水至 5 毫升;对照组仅不加腈波芬,其余相同,平行实验。测出的吸收光谱见图 1。乙醛酸对硝基苯肼在 350—605 毫微米间有二吸收峰:一在 390 毫微米较低,另一在 500 毫微米显著得多;加锑后无论吸收峰或吸收强度均无改变。

使用光电比色计时,浓度在 1.5 × 10<sup>-4</sup>M 以下,光密度与浓度成直线关系。分别用 PAT 及

酒石酸作成的标准曲线,完全密合。证明锑对本测定法并无干扰作用。

### (五)其他物质的干扰

葡萄糖二酸及葡萄糖酸经过碘酸氧化后,可以生成乙醛酸已见文献报导<sup>[5]</sup>。1961年 Fleury 等发现葡萄糖经过碘酸氧化后,亦可生成少量乙醛酸<sup>[6]</sup>。除乙二醇外, $\alpha$ -胺基醇亦能被过碘酸氧化断裂。羰基化合物与对硝基苯肼缩合后,有些亦可进入碳酸钠提出液中。因此又试验了丝氨酸、胱氨酸、维生素 C、葡萄糖、丙酮酸及丙酮等血浆中含量较大,可能有干扰作用的一些物质。测定量、试验结果及推算的干扰程度一并列入表 2,除葡萄糖及丙酮酸有程度不等的阳性反应外,丝氨酸的影响并不严重,其余则多属阴性。

表 2 血浆中可能干扰物质对测定的影响

試驗物質	A 測定量 (微克)	B 光密度相当于 酒石酸的量 $10^{-4} M$	C 正常血浆含量 <sup>[7]</sup> (微克/0.25 毫升)	D 測定量 血浆含量 (倍数)	E 干 扰 程 度 B/D $10^{-4} M$
絲 氨 酸	126	0.35	0.75—5	168—25.2	<0.01
胱 氨 酸	480	—	4.5—12.5	106.7—38.5	—
維 生 素 C	176	—	1.75—3.75	100.6—40.0	—
葡 萄 糖	743	0.90	150—425	5.0—1.8	0.18—0.52
丙 酮 酸	35	1.01	1.75—3	20.0—11.7	0.05—0.09
丙 酮	3940	—	3.75—34	1050.7—115.0	—

### (六)回收率及重现性

狗血浆 4.5 毫升,加 0.139% PAT 溶液(500 微克/毫升 Sb) 0.5 毫升,混匀后吸取 0.25 毫升。兔尿 4.5 毫升加 0.04% 酒石酸溶液 0.5 毫升,混匀后吸取 0.5 毫升。对照血浆或小便加等量蒸馏水代替 PAT 或酒石酸溶液,平行测定。因正常狗血浆与兔尿均含有本测定反应阳性物质,其含量暂以酒石酸量表示,称作本底。回收率的计算,都减去对照管的本底。结果回收率狗血浆为  $74 \pm 6\%$ ,兔尿为  $106 \pm 15\%$ 。

根据作者利用本文介绍方法测定<sup>[8]</sup> 37 个兔尿样本及 12 个狗血浆样本的重复测定资料统计,光密度读数的相对平均偏差为  $4 \pm 3\%$ 。

## 讨 论

酒石酸被过碘酸氧化断裂为乙醛酸,可在室温迅速完成,仅需 5—10 分钟。虽然乙醛酸还可进一步被氧化为甲酸及二氧化碳,但后一反应进行极慢,约需 36 小时以上<sup>[9,10]</sup>。因此一般都认为第一步反应可用作定量分析。

乙醛酸的对硝基苯脎经氢氧化钠显色后,虽然褪色较快,但常规测定时,平均相对偏差只有 4%,足见只要比色时间准确控制,对分析的精密密度影响不大。

血浆测定的回收率较差,虽曾改用三氯乙酸、乙醇或硫代水杨酸作沉淀剂,尚未得到改善。

羰基化合物大都能与对硝基苯肼缩合。除乙二醇外,凡相邻碳原子上含有胺基或羰基的醇,亦能被过碘酸所氧化断裂。所以狗血浆及兔尿中的本底,除酒石酸及乙醛酸为可能成分外,当亦包括这些能够参加测定反应的物质。取样 0.25 毫升时,正常狗血浆的本

底相当于  $0.48-0.75 \times 10^{-4}M$  酒石酸。根据本文实验五的结果估计,葡萄糖可能是构成血浆本底的主要物质之一。

本法的专一性虽然略差,但反应机制则较清楚。根据不同的实验要求,若对测定步骤作适当的修改补充,专一性便可有所提高。例如碳酸钠提取液用乙酸丁酯 3—5 毫升再洗一次,可以减低非酸性羰基化合物的影响。又如增加几个不经氧化的对照测定样本,即将过碘酸及亚硫酸钠先行相混,然后加入测定液中,便可检出样本中原来含有的酸性羰基化合物的含量,包括乙醛酸、丙酮酸、酮戊二酸等等。当然比较理想的办法还是将酒石酸分离提纯后再行测定。测定前加用离子交换树脂及纸上层析的方法正在进行研究中。

正常兔尿的本底读数颇高,平均每小时排出量约相当于 1.25 毫克酒石酸的比色读数。植物饲料中常含有酒石酸及乙醛酸,可能它们便是构成兔尿本底的重要成分。因此利用草食动物实验时,除要估计机体代谢产物的干扰外,还应考虑到饲料的影响。下文进行 PAT 的体内分解研究时,实验前先使家兔禁食一天,自由饮水,以减少饲料中含有的外源性干扰物质的来源;同时略行提高 PAT 的剂量,使本底读数相对地下降。采取了上述这些措施之后,兔尿本底读数已不成为实验的重要障碍。

进行 PAT 的代谢研究,生物样本中的酒石酸含量往往在 100 微克以下。所以 Underhill 法之不甚适用,不仅因为锑有干扰,而且灵敏度亦嫌不够。用光电比色计测定,本法的检出限度可达 5 微克,较 Underhill 法提高 20 倍以上,初步已可满足一些实验要求。酮酸二硝基苯腙对光的吸收强度,在紫外光区较可见光区可大一倍以上<sup>[1]</sup>。如果实验要求更高的检出灵敏度,可考虑在紫外光区进行分光光度测定。

**致謝** 本文在张昌绍教授指导下完成,嵇汝运教授审阅原稿,葛民栋同志参加技术工作,均此致謝。

### 参 考 文 献

- [1] Underhill, F. P., Peterman, F. I. and Krause, A. C.: Studies on the Metabolism of Tartrates I. A Colorimetric Method for the Determination of Tartaric Acid. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1931, **43**, 351.
- [2] Mathers, A. P.: Detection of Tartaric acid and Tartrates in Wines. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 1949, **32**, 417.
- [3] Gornall, A. G. and MacDonald, M. P.: Quantitative Determination of the Steroid Hormones with 2,4-Dinitrophenylhydrazine. *J. Biol. Chem.*, 1953, **201**, 279.
- [4] Chattaway, F. D. and Clemo, G. R.: The Relationship between Colour and Constitution in the Nitrobenzaldehydehydrazones. *J. Chem. Soc.*, 1923, **123**, 3041.
- [5] Fleury, M. P. et Large, J.: Etude de l'action de l'acide periodique sur les composés polyhydroxylés. 2<sup>e</sup> l'artie: Action de l'acide periodique sur les acides alcools. *J. Pharm. Chim.*, 1933, **17**, 313.
- [6] Fleury, P. et Dizet, L. L.: Sur une réaction anormale des aldoses avec l'acide periodique. *Bull. Soc. Chim. France*, 1961, 359.
- [7] Kugelmass, I. N.: *Biochemistry of blood in health and disease*, 1959, p. 502, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- [8] 曾衍霖,张昌绍:防治血吸虫病药物的研究 XXX. 酒石酸锑钾在体内的分解,待发表。
- [9] Fleury, M. P. et Bon-Bernatets, M. G.: Action de l'acide periodique sur l'acide tartrique. *J. Pharm. Chim.*, 1936, **23**, 85.
- [10] Adams, R. (ed.): *Organic Reactions*, vol. II., 1944, p. 341, New York: John Wiley & Sons, INC.
- [11] Drew, F. D., Marshall, L. M. and Friedberg, F.: Separation of Keto-acids by Cellulose Columns. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 1852.

## STUDIES ON ANTIBILHARZIAL DRUGS

### XXIX. A NEW COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF TARTARIC ACID IN BIOLOGICAL MATERIALS

ZENG YAN-LIN

*(Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai)*

#### ABSTRACT

Oxidative cleavage of tartaric acid by means of periodic acid gave glyoxylic acid quantitatively, the latter was then condensed with *p*-nitrophenylhydrazine. The *p*-nitrophenylhydrazone thus formed was purified by some extraction procedures and determined colorimetrically after treatment with sodium hydroxide. Quantities as small as 5  $\mu\text{g}$  could be estimated by means of an electrophotometer. The average relative mean deviation was  $4 \pm 3\%$ . Recoveries were  $106 \pm 15\%$  for urine and  $74 \pm 6\%$  for serum.

The absorption spectrum of glyoxylic acid *p*-nitrophenylhydrazone after treatment with sodium hydroxide was determined. As the spectrum did not change even in the presence of antimony in quantities as much as 20 times the molar concentration of tartaric acid, this method would be suitable especially for the studies on the metabolism of the tartaric acid portion of potassium antimony tartrate.