

用灿烂甲酚蓝褪色分光光度法测定肝素钠的研究

孙伟^{1,2}, 焦奎¹, 牛学良¹, 陆路德²

1. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东 青岛 266042

2. 南京理工大学化工学院, 江苏 南京 210094

摘要 在 pH 3.0 的 Britton-Robinson (B-R) 缓冲溶液中, 用分光光度法研究了灿烂甲酚蓝与肝素钠的相互作用。灿烂甲酚蓝在 592 nm 处有一特征吸收峰, 加入肝素钠后, 吸收峰强度降低但没有新的吸收峰出现, 表明两者能够相互结合形成复合物。在最佳条件下, 利用溶液吸光度值的降低与肝素钠浓度的关系建立了测定肝素钠浓度的分光光度法, 线性范围为 0.6~6.0 mg·L⁻¹, 摩尔吸光系数 $\epsilon=1.03 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 检测限 (3σ) 为 0.173 mg·L⁻¹。将该方法应用于肝素钠注射液浓度的测定, 结果令人满意。

主题词 分光光度法; 肝素钠; 灿烂甲酚蓝; 褪色

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)08-1322-03

肝素是一种粘多糖, 是由六糖或八糖重复单位组成的线性链状分子, 其中三硫酸双糖和二硫酸双糖以 3:1 的比例交替连接, 其相对分子量为 12 000。肝素广泛存在于哺乳动物的各种器官的组织中, 尤其以猪小肠的粘膜中含量最高, 目前主要从猪小肠粘膜和猪肺中提取。肝素是一种天然抗凝血物质, 还具有澄清血浆脂质、降低胆固醇、抗炎症、抗肿瘤、抗病毒等药用功能^[1]。

常用于肝素的测量方法有生物方法和化学方法两大类。生物方法是法定方法, 因受生物个体的影响较大, 不易掌握。化学方法有分光光度法、HPLC 法、毛细管电泳法等^[2-5]。刘绍璞等人采用碱性二苯基萘基甲烷染料和碱性三苯甲烷染料, 如维多利亚蓝 4R、维多利亚蓝 B、乙基紫、甲基紫等与肝素钠相互反应, 采用分光光度法或光散射技术进行测定^[6-8]; 焦庆才等人则采用天青 A 等阳离子染料光度法研究了其与肝素钠的结合反应^[9, 10]。本文采用灿烂甲酚蓝为光度试剂, 在 pH 3.0 的 B-R 缓冲溶液中, 利用其与肝素钠的缔合作用导致溶液褪色现象, 建立了褪色分光光度法测定肝素钠的新方法, 确定了最佳反应条件, 讨论了常见物质的干扰, 并应用于实际样品的测定, 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)。

肝素钠(140 IU·mg⁻¹, 中国医药上海化学试剂公司)标准溶液: 配制 1.0 g·L⁻¹ (140 IU·mL⁻¹) 的贮备液。4 °C 冰箱保存, 使用时再进行稀释。0.2 mol·L⁻¹ 的 Britton-Robinson(B-R) 缓冲溶液; 灿烂甲酚蓝(中国医药集团上海化学试剂公司), 1.0×10⁻³ mol·L⁻¹, 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次石英蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 的比色管中依次加入 0.3 mL 1.0×10⁻³ mol·L⁻¹ 灿烂甲酚蓝, 0.2 mol·L⁻¹ B-R 缓冲溶液 1.5 mL 和一定量肝素钠溶液, 用水定容至刻度, 摇匀后于 20 °C 下静置反应 15 min。以试剂空白为参比, 在室温下用 1 cm 比色皿在 592 nm 处测定其吸光度值。其中试剂空白记为 A₀, 含有肝素钠的记为 A, 计算 $\Delta A = A_0 - A$ 。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

图 1 为灿烂甲酚蓝及其与肝素钠复合物在 300~700 nm 范围内的扫描吸收光谱图。在 pH 3.0 的 B-R 缓冲溶液中, 灿烂甲酚蓝在 592 和 633 nm 处有最大吸收; 当加入肝素钠后出现褪色现象, 最大吸收波长不发生变化, 但吸光度值明显降低, 肝素钠加入量越大, 褪色现象越明显, 表明两者发生结合反应形成新的复合物。选择 592 nm 为测定波长, 利用其吸光度值降低可以对肝素钠进行测定。

收稿日期: 2004-06-28, 修订日期: 2004-09-28

基金项目: 中国博士后科学基金(2003033492)和国家自然科学基金(20405008, 20375020)资助项目

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, 博士后

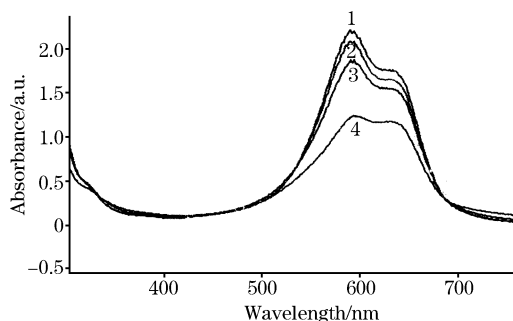


Fig. 1 UV-Vis absorption spectra of brilliant cresyl blue interaction with heparin

1, $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BCB; 2, $1 + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ heparin;
3, $1 + 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ heparin; 4, $1 + 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ heparin

2.2 最佳实验条件的选择

2.2.1 酸度的影响

试验了溶液 pH 值对吸光度的影响, 结果如图 2 所示。由图中可以看出, 在 pH 1.5~4.0 的范围内, 在 pH 3.0 时的 ΔA 变化最大, 所以选用 pH 3.0 的 B-R 缓冲溶液; 其最佳用量范围为 1.0~3.0 mL, 实验选用 1.5 mL B-R 缓冲溶液。

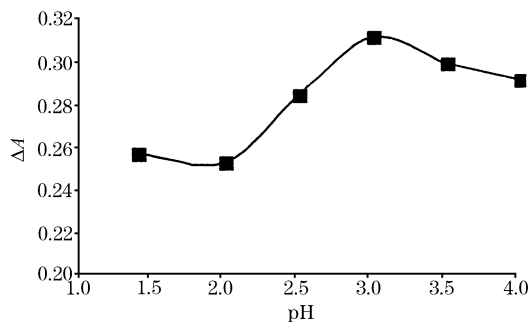


Fig. 2 Effect of pH on the interaction of brilliant cresyl blue and heparin

2.2.2 灿烂甲酚蓝用量的影响

实验结果表明, 当固定肝素钠的浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 灿烂甲酚蓝的浓度在 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸光度的差值最大, 选择灿烂甲酚蓝的最终浓度为 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 反应时间、温度和体系的稳定性

考察了反应时间和温度对结合反应的影响, 结果发现在 20°C 下反应 15 min 即达到反应平衡, 体系具有很好的稳定

性, 吸光度值在 2 h 内基本保持恒定。

2.3 干扰物质的浓度

对常见的金属离子、氨基酸、葡萄糖等物质对该体系的干扰进行了试验, 结果如表 1 所示。常见的干扰物质对测定的影响不大。实验了 β -CD, 十二烷基硫酸钠, Tween-20 等表面活性剂对反应的影响, 结果表明, 它们的加入会极大的干扰体系的测定, 尤其是离子型表面活性剂。实验了 NaCl 对体系的影响, 随着 NaCl 的加入, ΔA 值逐渐减小, 表明 NaCl 的存在会极大的影响两者的反应, 说明两者之间可以通过静电作用而相互结合。

Table 1 Effect of coexisting substance on the determination of $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 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}	4.62	Citric acid	8.0	4.31
Fe ³⁺	1.0×10^{-5}	4.23	Glucose	8.0	-7.45
Cu ²⁺	1.0×10^{-5}	3.90	L-Arginine	10.0	-0.74
Cd ²⁺	1.0×10^{-5}	0.77	L-Leucine	10.0	-3.89
Ni ²⁺	1.0×10^{-5}	1.88	L-Tryptophan	10.0	-5.05
Pb ²⁺	1.0×10^{-5}	-4.14	L-Glutamine	10.0	-1.24
Mg ²⁺	1.0×10^{-5}	3.38	L-Lysine	10.0	2.33
Co ²⁺	1.0×10^{-5}	4.14	L-Valine	10.0	1.56
Zn ²⁺	1.0×10^{-5}	-1.50	L-Glutamic acid	10.0	-3.84

2.4 标准曲线和检测限

在最佳条件下, 按照实验方法绘制了测定肝素钠的工作曲线。当肝素钠浓度在 $0.6 \sim 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与 ΔA 呈线性关系, 线性回归方程为 $\Delta A = 0.0054 - 0.079c$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), ($n=7$, $\gamma=0.994$), 11 次平行测定的相对标准偏差为 4.61%, 方法的检测限 (3σ) 为 $0.173 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 摩尔吸光系数 $\epsilon = 1.03 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2.5 样品分析

肝素钠注射液分别由安徽新力药业股份公司马鞍山分厂 (020911-1) 和天津市生物化学制药厂 (20031003) 生产, 效价均为 $12500 \text{ IU} \cdot 2 \text{ mL}^{-1}$ 。精确吸取肝素钠注射液 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释定容。又精密吸取此溶液 5.00 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用水稀释后摇匀。吸取第二次稀释液 2.0 mL, 按实验方法对肝素钠的效价进行测定, 其结果如表 2 和表 3 所示。回收率实验表明回收率在 101.8%~104.8% 之间。

Table 2 Determination results of heparin sodium injection sample

产品和批号	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			
马鞍山 020911-1	6 026	6 342	6 166	6 518	6 263	3.42	6 250
天津 20031003	6 394	6 580	6 440	6 132	6 386	2.93	6 250

Table 3 Recovery results of the determination of heparin

产品	原有量 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	加入量 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定总量 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)					平均值 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 / %
			1	2	3	4	5		
马鞍山 020911-1	2.24	2.0	4.14	4.28	4.50	4.33	4.43	4.34	104.8
天津 20031003	2.28	2.0	4.42	4.37	4.32	4.21	4.26	4.32	101.8

参 考 文 献

- [1] HE Qing, JIAO Qing-cai(何 庆, 焦庆才). *Biomedicine Assay (生物药物分析)*. Beijing: Chemical Industrial Press(北京: 化学工业出版社), 2003. 258.
- [2] JI Sheng-li, ZHANG Tian-min(姬胜利, 张天民). *Chin. J. Biochem. Pharmaceutics(中国生化药物杂志)*, 1996, 17(5): 216.
- [3] Jiao Q C, Liu Q, Sun C. *Talanta*, 1999, 48: 1095.
- [4] WANG Ping, HUANG Xiao-lan, LI Cui-zhen(王 平, 黄晓兰, 李翠贞). *Chin. J. Medi. Lab. Sci. (中华医学检验杂志)*, 1995, 18(6): 358.
- [5] Amdofo S A, Wang H M, Linhardt R J. *Anal. Biochem.*, 1991, 199(2): 249.
- [6] XU Hong, LIU Shao-pu, LUO Hong-qun, LIU Zhong-fang(徐 红, 刘绍璞, 罗红群, 刘忠芳). *Chem. J. Chin. Univ. (高等学校化学学报)*, 2002, 23(2): 216.
- [7] Liu S P, Luo H Q, Li N B, et al. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 3907.
- [8] LIU Shao-pu, XU Hong, LUO Hong-qun(刘绍璞, 徐 红, 罗红群). *Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2002, 30(6): 712.
- [9] Jiao Q C, Liu Q. *Anal. Lett.*, 1998, 31(8): 1311.
- [10] Jiao Q C, Liu Q. *Spectrochim. Acta A*, 1999, 55: 1667.

Fading Spectrophotometric Determination of Heparin with Brilliant Cresyl Blue

SUN Wei^{1,2}, JIAO Kui¹, NIU Xue-liang¹, LU Lu-de²

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

2. College of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China

Abstract A new fading spectrophotometric method for determining trace heparin is proposed in the present paper. In pH 3.0 Britton-Robinson (B-R) buffer solution, brilliant cresyl blue can react with heparin resulting in the decrease of absorbance of BCB at 592 nm. The conditions for the interaction were optimized, and the interferences of coexisting substances were investigated. Under the optimal conditions the reduction of the absorbance is proportional to the concentration of heparin in the range of 0.6-6.0 mg · L⁻¹ with the detection limit of 0.173 mg · L⁻¹. The molar absorptivity of the method was calculated to be 1.03 × 10⁶ L · mol⁻¹ · cm⁻¹. The method has been applied to determine the heparin sodium injection solution with satisfactory results.

Keywords Spectrophotometry; Heparin; Brilliant cresyl blue; Fading

(Received Jun. 28, 2004; accepted Sep. 28, 2004)