

依诺沙星-铕络合物为探针的荧光光度法测定肝素

苗延虹*,董光霞

山东农业大学化学学院, 山东 泰安 271000

摘要: 在 pH 值为 7.40 的 HMT-HCl 缓冲溶液中, 铕 (Eu^{3+}) 能和依诺沙星 (Enoxacin) 形成络合物, 发出 Eu^{3+} 的特征荧光, 最大激发和发射波长分别为 330 nm 和 612 nm, 狭缝均为 5 nm, 肝素的加入能使 Eu^{3+} 的特征荧光显著增强。在线性范围 0.117~5.85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 肝素的浓度和荧光强度成很好的线性关系, 线性方程为 $\Delta F = -5.691 + 6.98 c$ ($r = 0.994$) ($c: \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 检出限为 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本方法用于实际样品的测定, 灵敏度高、选择性好、干扰少、操作简单, 结果令人满意。

关键词: 依诺沙星; 铕; 荧光光谱法; 肝素

中图分类号: 0657.31; Q524.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2015)05-0648-04

Spectrofluorimetric Determination on Heparin Using Enoxacin-Europium Probe

MIAO Yan-hong*, DONG Guang-xia

College of Chemistry and Material Science/Shandong Agriculture University, Taian 271000, China

Abstract: A new method for determination of Heparin by fluorometry method was established. In HMT-HCl buffer solution at pH 7.40, Eu^{3+} formed complex with enoxacin, which emitted characteristic fluorescence of Eu^{3+} with maximum excitation wavelength at 330 nm, maximum emission wavelength at 612 nm and slit width at 5 nm. Additional Heparin resulted in a remarkable increase in the Eu^{3+} characteristic fluorescence. Within the range of 0.117~5.85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the concentration of Heparin had a linear relationship with the fluorescent intensity, with linear equation of $\Delta F = -5.691 + 6.98 c$ ($r = 0.994$) ($c: \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and detection limit of 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. This method generated high selectivity, high sensitivity and low disturbance, which had been applied to the determination of practical samples with satisfactory result.

Keywords: Enoxacin; Europium; Spectrofluorimetric; Heparin

肝素具有广泛的生物学功能,在人体内由肥大细胞分泌而自然存在于血液中,在体内外均有延缓或阻止血液凝固的作用,是心血管和血栓病人的首选抗凝血药,可用于调血脂、抗血栓,改善血液流变学指标及免疫调节等,肝素或其衍生物还可广泛应用于美容、化妆行业,是一种重要的生化药物。肝素的检测以化学方法为主,文献报导有分光光度法^[1-5]、共振瑞利散射法^[6,7]、循环伏安法^[8]、离子色谱法^[9]、流动注射法^[10]、高效液相色谱法^[11]、荧光能量转移法^[12]。这些方法中,分光光度法虽然操作简便、快速、仪器价廉,但线性范围较窄,高效液相色谱法具有检出限较低,线性范围宽的优点,但操作繁琐,仪器设备昂贵,电化学方法也不失为一种好的方法,但操作起来仍较复杂。

本文选择依诺沙星作为铕离子的配体,研究了以肝素作为共配位体,与依诺沙星共同敏化铕离子特征荧光的可能性。实验结果表明,依诺沙星-铕离子体系中铕离子位于 612 nm 处的特征荧光能够被肝素显著增强,且增强的荧光强度与一定范围内肝素的浓度成正比,根据这一性质。本文以 ENX- Eu^{3+} 作为荧光探针,建立了一种测定肝素的新方法。本方法与上述文献报导的方法相比,灵敏度较高,选择性好,干扰少,操作简单,用于实际样品的测定,结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 pH S -3 精密酸度计 (上海自动化仪表有限公司), Cary Eclipse 荧光分光光度计 (美国 VARIAN 公司)。

1.1.2 试剂 肝素钠针剂: ①天津健康药业 100606; ②上海第一生化药业 100912; 依诺沙星(中国药品生物制品检定所)贮备液浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 工作液浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Eu^{3+} 贮备液浓度为 $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 工作液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 肝素钠(中国药品生物制品检定所)贮备液

收稿日期: 2013-11-25

修回日期: 2014-01-20

作者简介: 苗延虹(1967-),女,副教授. E-mail:quguoqing@126.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail:quguoqing@126.com

浓度为 $1.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 工作液浓度为 $11.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。HMT-HCl 缓冲液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): pH 值为 7.40。以上依诺沙星、肝素钠储备液与工作液均需置于 $0 \sim 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的生化培养箱内保存, 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次重蒸去离子水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中依次加入 1.7 mL $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ENX、1.0 mL pH=7.40 的 HMT-HCl 缓冲溶液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、0.5 mL $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Eu^{3+} 和 1.0 mL $11.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hep, 二次重蒸去离子水定容至 10.0 mL, 振荡摇匀, 10 min 后, 扫描荧光激发和发射光谱。在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=330 \text{ nm}/612 \text{ nm}$ 处(激发和发射狭缝均为 5 nm), 用 1 cm 石英荧光液池, 测定荧光强度 F, 同时测定试剂空白的荧光强度 F_0 , $\Delta F=F-F_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 激发光谱和发射光谱

实验条件 浓度: ENX, $3.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Eu^{3+} , $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Hep, $1.17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; HMT-HCl, pH=7.40 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

按照实验方法, 分别扫描 ENX、 Eu^{3+} 、ENX- Eu^{3+} 和 ENX- Eu^{3+} -Hep 溶液的激发和发射光谱(见图 1)。由图 1 a 可知, ENX- Eu^{3+} -Hep 溶液有三个激发峰, 其中 301 nm 处较强, 但为了避免 Eu^{3+} 的直接激发以及二级散射影响, 选定 330 nm 为激发波长, 发射光谱中, 曲线 1, ENX 在 416 nm 处有一个很强的发射峰, 曲线 2, 单纯的 Eu^{3+} 水溶液检测不到 Eu^{3+} 的特征荧光, 比较曲线 1 和曲线 3, 可以看出, ENX 在 416 nm 处的发射强度明显降低, 出现了 591 nm 和 612 nm 的 Eu^{3+} 的特征荧光峰, 分别对应于 Eu^{3+} 的 ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$, ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ 能级跃迁。说明 ENX 和 Eu^{3+} 生成了二元配合物并发生分子内能量转移, 使得 Eu^{3+} 激发并发射特征荧光。曲线 4 由于肝素的加入生成了 Eu^{3+} -ENX-Hep 三元配合物, 更有利于能量传递, 使得荧光强度进一步增强。故实验选取激发和发射波长分别为 330 nm 和 612 nm。

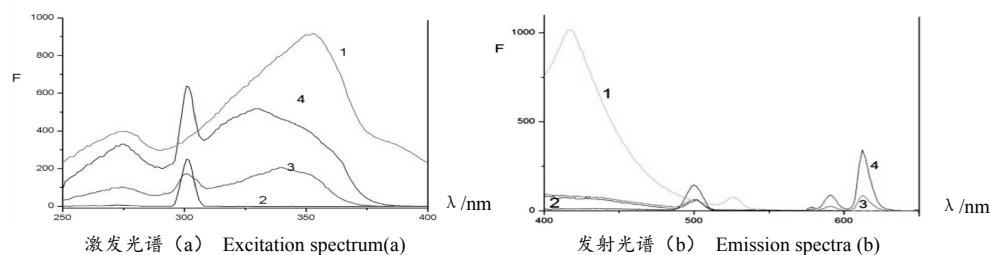


图 1 荧光光谱

Fig.1 Fluorescence spectra

1. ENX 2. Eu^{3+} 3. ENX- Eu^{3+} 4. ENX- Eu^{3+} -Hep

2.2 影响体系荧光强度的因素

2.2.1 酸度对体系荧光强度的影响 在 pH 值为 4.01~8.74 范围内考察了溶液的酸度对体系荧光强度的影响(图 2)。实验结果表明: pH=7.17~7.60 时, 体系的荧光强度大而且比较稳定, 因此选取 pH=7.40 进行下一步研究。

2.2.2 缓冲液种类及用量的影响 实验了以下缓冲溶液: $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 、 Tris-HCl 、 NaAc-HAc 、 HMT-HCl (pH 值均调至 7.40) 对体系荧光强度的影响。结果表明: HMT-HCl 缓冲体系对荧光增强效果最好。同时实验了 HMT-HCl 缓冲液用量的影响, 结果显示: 当缓冲液用量在 0.8~1.2 mL 时荧光较强。故选择 pH=7.40 的 HMT-HCl 缓冲溶液 1.0 mL, 做进一步的研究。

2.2.3 依诺沙星与铕离子的浓度比对体系荧光强度的影响 固定 Eu^{3+} 浓度为 $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对体系在 ENX 浓度不同时的荧光强度进行测定(图 3)。结果显示: ENX 与 Eu^{3+} 浓度比为(6.5~7.5):1 时, 体系的荧光强度较大。故选择 Eu^{3+} 浓度为 $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (即浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Eu^{3+} 工作液加 0.5 mL), ENX 浓度为 $3.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (即浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ENX 工作液加 1.7 mL), 即 ENX 与 Eu^{3+} 浓度比为 6.8:1 做进一步的研究。

2.2.4 反应时间和加入顺序的影响 在最佳实验条件下, 考察了荧光强度随时间的变化情况(图 4)。

结果发现,当各反应组分混合后,体系的荧光强度受光照的影响较大,被荧光照后体系变得不稳定。未经照射的体系在 10 min~60 min 内荧光值稳定。故选择 10 min 后开始测定。当改变加样顺序时,按 ENX、HMT-HCl 缓冲液、Eu³⁺、Hep 的顺序加入时体系的荧光强度最大,加入稳定性也更好,稳定时间更长,故实验中选择这一加入顺序。

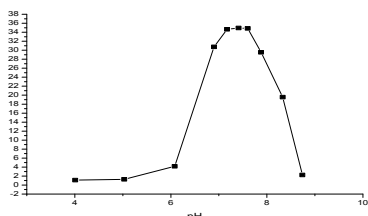


图 2 pH 值对 Eu³⁺-ENX-Hep 体系荧光强度 F 的影响
Fig.2 The influence of pH on F of Eu³⁺-ENX-Hep system

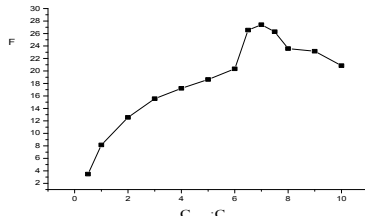


图 3 依诺沙星和 Eu³⁺ 的浓度对体系 F 的影响
Fig.3 The influence of ENX and Eu³⁺ concentration on F

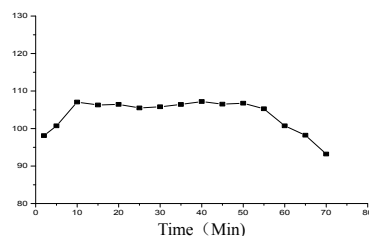


图 4 反应时间对体系的荧光强度的影响
Fig.4 The influence of reaction time on F

2.2.5 干扰物质对体系荧光强度的影响 在最佳实验条件下,当肝素钠浓度为 1.17 μg · mL⁻¹ 时,研究了一系列常见的干扰物质的影响,结果如表 1 所示。表中所列干扰物基本不干扰测定。

表 1 干扰物质对体系荧光强度的影响
Table 1 Effect of coexistent substances

干扰物 Coexistent substances	浓度 Concentration(mol·mL ⁻¹)	ΔF %	干扰物 Coexistent substances	浓度 Concentration(mol·mL ⁻¹)	ΔF %
Ca ²⁺ (Cl ⁻)	5.0×10 ⁻⁷	-4.76	Mg ²⁺ (NO ₃ ⁻)	5.0×10 ⁻⁷	4.02
Al ³⁺ (Cl ⁻)	1.0×10 ⁻⁶	4.41	Fe ³⁺ (Cl ⁻)	1.0×10 ⁻⁷	1.01
Zn ²⁺ (SO ₄ ²⁻)	1.0×10 ⁻⁶	-5.01	Mn ²⁺ (Cl ⁻)	1.0×10 ⁻⁶	-5.63
Cu ²⁺ (SO ₄ ²⁻)	5.0×10 ⁻⁷	-2.87	Ba ²⁺ (NO ₃ ⁻)	1.0×10 ⁻⁶	-0.45
Na ⁺ (Cl ⁻)	1.0×10 ⁻⁵	3.92	K ⁺ (Cl ⁻)	1.0×10 ⁻⁶	-2.08
葡萄糖 Glucose	1.0×10 ⁻⁵	-3.03	蛋氨酸 Methionine	1.04×10 ⁻⁵	-2.2
L-组氨酸 L-histidine	9.90×10 ⁻⁶	4.9	亮氨酸 L-leucine	1.00×10 ⁻⁵	4.8
谷氨酸 Glutamic acid	2.00×10 ⁻⁵	1.9	色氨酸 Tryptophane	5.00×10 ⁻⁵	4.9
L-赖氨酸 L-lysine	1.00×10 ⁻⁶	4.9	甘氨酸 Glycine	1.00×10 ⁻⁵	3.8
L-胱氨酸 L-cystine	4.00×10 ⁻⁶	6.9			

2.3 工作曲线、线性范围及检出限

在最佳实验条件下,绘制了肝素钠浓度 c(g · mL⁻¹)与ΔF 之间的响应曲线,线性方程为ΔF=-5.691 +6.98c(μg · mL⁻¹), 相关系数 r=0.994, 线性范围 0.117~5.85 μg · mL⁻¹。取 11 支 10 mL 的比色管按实验方法配制空白溶液,测得 s=0.02, 检出限为 0.06 μg · mL⁻¹。

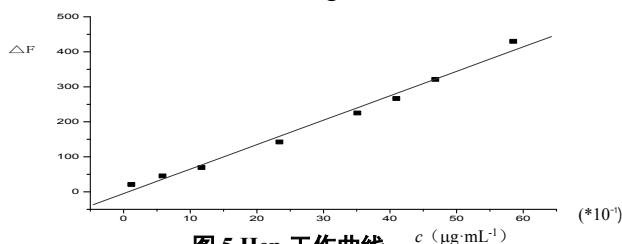


图 5 Hep 工作曲线
Fig.5 Working curve of Hep

3 肝素钠样品的测定

取两支肝素钠针剂(每支标示量为 12500 IU/2 mL): ①天津健康药业 批号 100606, ②上海第一生化药业 批号 100912, 用二次重蒸去离子水稀释至 100 mL 容量瓶中,再逐级稀释至测定肝素的线性范围,利用标准曲线法按实验方法测定,结果如表 2 所示,同时按实验方法测定效价,结果如表 3 所示。由表 2 和表 3 可以看出,此方法的回收率令人满意,故此法可用于针剂中肝素的测定。

表 2 肝素钠样品测定的回收率实验 (n=5)

Table 2 Recovery test of the determination of heparin sodium in samples (n=5)

肝素钠样品 Hep samples	样品加入量 Samples added(μg·mL ⁻¹)	标准样品加入量 Standard sample added(μg·mL ⁻¹)	测得值 Found(μg·mL ⁻¹)	标准样品平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
①	1.575	2.34	2.38	101.7	3.3
②	1.575	1.17	1.14	97.0	2.4

表3 肝素钠针剂效价的测定 (n=5)

Table 3 Determination results of heparin in heparin sodium injection samples (n=5)

肝素钠样品 Hep samples	样品加入量 Samples added($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得值 Found($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	换算成标示值 Conversion of mark value(IU/2 mL)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
①	1.575	1.554	12333	98.7	2.6
②	1.575	1.630	12936	103.5	1.5

备注:1IU=6.3 μg Note:1IU=6.3 μg

4 机理探讨

Eu^{3+} 的配位数一般是8,而从实验数据上可以看出 Eu^{3+} 与ENX浓度比为1:6.8,故 Eu^{3+} 是不饱和配位,配位化合物中剩余大量正电荷和空轨道。肝素作为一种生物大分子,在水溶液中以带多个负电荷的大阴离子形式存在,可与配位化合物以静电引力相互结合。同时肝素分子中含有硫酸根离子、羧基等基团,可同时参与配位。肝素的化学结构是由四糖单元所组成的聚合物,其四糖单元结构如图6所示,每个四糖单元有3个 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基、2个 $-\text{NHSO}_3\text{H}$ 基和2个 $-\text{COOH}$ 基。其中 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 基和 $-\text{NHSO}_3\text{H}$ 基在上述实验条件下能够完全离解。羧基显弱酸性且肝素中D-葡萄糖醛酸的pKa值为3.6,所以在上述实验条件下羧基也能完全离解。实验所用的肝素含有42个单糖单元,每个肝素四糖单元有7个结合位点(5个硫酸基和2个羧基),所以每个肝素分子中总的结合位点数为73.5(42 \times 7/4)。因此肝素钠可以与ENX- Eu^{3+} 配合物以静电作用和配位作用结合生成具有紧密结构的三元配合物。依诺沙星以及肝素共同作用的结果使钨离子位于612 nm处的特征荧光增强了数倍,且增强的荧光强度与肝素的加入量成正比。本文据此提出了一种以ENX- Eu^{3+} 作为荧光探针,测量肝素的新方法。该方法简便易行,反应迅速,稳定性好,灵敏度高,用于测定肝素具有较好的线性范围,用来测定针剂中肝素的含量,结果令人满意。

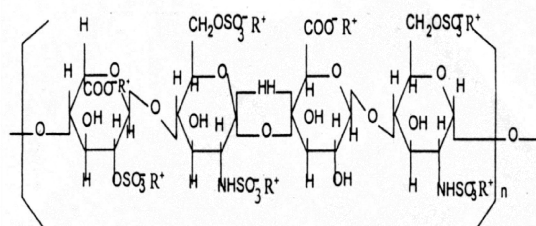


图6 肝素的四糖单元结构

Fig.6 Structure of the tetrasaccharide unit of Hep

参考文献

- [1] 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[J].高等学校化学学报,2002,23(2):216-218
- [2] Niu XL, Zhang WL, Zhao N, *et al.* Voltammetric determination of heparin based on its interaction with malachite green [J]. Bull. Chem. Soc. Ethiop,2008,22(2):165-172
- [3] 刘秀英,张超灿,徐卫林.甲苯胺蓝分光光度法测定肝素钠的研究[J].化学试剂,2009,31(4):271-274
- [4] 郭小群.人体血样中肝素钠含量的测定[J].四川理工学院学报:自然科学版,2008,21(2):76-78
- [5] 司文会,解鹏,訾言勤.夜蓝褪色分光光度法测定肝素钠[J].理化检验-化学分册,2010,46(11):1334-1336
- [6] 黄伟涛,梁娣,罗红群,等.银(I)邻菲罗啉体系共振瑞利散射测定肝素钠[J].西南大学学报:自然科学版,2011,33(7):50-53
- [7] 闫曙光,何佑秋,彭娟娟,等.CdTe量子点作探针共振瑞利散射测定肝素钠[J].西南大学学报:自然科学版,2010,32(3):67-71
- [8] 李晓霞,李延清,苗苗,等.聚亚甲基蓝碳纳米管修饰电极测定肝素钠[J].河南科技大学学报:自然科学版,2011,32(2):97-101
- [9] Ander B, Karlsson A, Ohrlund A. Determination of heparin on intraocular lens surfaces by ion chromatography[J]. Journal of chromatography A,2001,917(1):105-110
- [10] Ghous T. Flow injection determination of heparin by inhibition of ribonuclease (Rnase) [J]. Journal- chemical society of pakistan,2004,26(1):28-34
- [11] Keire DA, Trehy ML, Reepmeyer JC, *et al.* Analysis of crude heparin by ^1H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis,2010,51(4):921-926
- [12] 刘保生,王晶,薛春丽,等.曙红-中性红荧光能量转移抑制法测定肝素[J].分析试验室,2009,28(9):16-19