

基于阴离子型环糊精超分子包合物高灵敏荧光光度分光法检测血浆中残留亚甲蓝[△]

周群刚^{1,2*}, 谢 莲¹, 方 敏², 赵 铭¹, 唐建华¹, 王明元², 徐 军², 谢洪平^{1#}(1.苏州大学医学部药学院, 江苏苏州 215123; 2.苏州市中心血站, 江苏苏州 215006)

中图分类号 R969.1; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)06-0519-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.06.14

摘 要 目的: 建立检测血浆中微量亚甲蓝的高灵敏荧光光度法。方法: 利用羧甲基- β -环糊精对亚甲蓝荧光信号的增敏作用, 用荧光光度法直接测定血浆中的微量亚甲蓝。结果: 亚甲蓝检测浓度在 0.008~0.2 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好($r=0.999\ 0$)。包合反应 20 min 后体系荧光强度稳定, 20、40、60、120 min 的 RSD 为 0.57%。高、中、低浓度的日内 RSD 分别为 0.36%、0.53% 和 0.92%, 日间 RSD 分别为 2.31%、2.62% 和 5.43%; 回收率为 97.04%~107.70%。20 个实际样品亚甲蓝残留量均在线性范围内, 且低于规定最大残留量。结论: 本方法准确、简便、快速、灵敏度高, 可直接用于血浆中微量亚甲蓝的测定。

关键词 血浆; 亚甲蓝; 羧甲基- β -环糊精; 荧光增敏

Determination of Residual Methylene Blue in Plasma by Sensitive Fluorescence Spectrometry Based on Supramolecular Complex of Anion-type Cyclodextrin

ZHOU Qun-gang^{1,2}, XIE Lian¹, FANG Min², ZHAO Ming¹, TANG Jian-hua¹, WANG Ming-yuan², XU Jun², XIE Hong-ping¹(1.School of Pharmacy, Suzhou University Health Section, Jiangsu Suzhou 215123, China; 2. Suzhou Central Blood Station, Jiangsu Suzhou 215006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the sensitive fluorescence spectrophotometry for trace methylene blue in plasma. METHODS: Based on the sensitizing effect of carboxymethyl- β -cyclodextrin on the fluorescence signal of methylene blue, the trace methylene blue in plasma was determined directly by fluorescence spectrophotometry. RESULTS: The linear range of methylene blue were 0.008-0.2 $\mu\text{mol/L}$ ($r=0.999\ 0$). The fluorescence intensity in the reaction system was stable after 20 min; RSDs were 0.57% at 20, 40, 60, 120 min. Intra-day RSDs were 0.36%, 0.53% and 0.92% at high, medium and low concentrations; inter-day RSDs were 2.31%, 2.62% and 5.43%, respectively. The recovery rates were 97.04%-107.7%. The residual quantity of methylene blue in 20 plasma samples was in the linear range and lower than the specified maximum residue. CONCLUSIONS: The method is accurate, simple, rapid and sensitive, and could directly be used for the determination of trace methylene blue in plasma.

KEYWORDS Plasma; Methylene blue; Carboxymethyl- β -cyclodextrin; Fluorescence enhancement

为降低临床上输血感染病毒的风险, 增加输血的安全性, 一般采用亚甲蓝光化学法灭活血浆中的病毒^[1]。在灭活病毒以后, 需使用特制的滤器滤除 85% 以上的亚甲蓝^[2], 最大残留量为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。为了保证用血安全, 需要对血浆中亚甲蓝的残留量进行检测。测定方法有化学发光法^[3]、高效液相色谱法^[4]及共振瑞利散射法^[5]等, 这些方法中, 有的灵敏度较低, 有的需采用固相萃取富集后才能测定。在原卫生部编制的《血站技术操作规程(2012年版)》^[6]中, 利用小柱萃取富集预处理后以分光光度法检测。但是, 该方法检测灵敏度仍然较低, 大多数样本的吸光度在《中国药典》(2010年版)附录方法所规定的 0.3 以下, 预示着检测结果不准确。同时, 该方法不但操作繁琐, 而且需要大量的血浆, 浪费宝贵的血浆资源。周群刚等^[7]利用电中性的 β -环糊精发展了一种亚甲蓝增敏荧光光度

法, 以提高检测灵敏度, 实现了不经分离、富集直接测定血浆中亚甲蓝, 表现出了快速、简单、需要血浆量少的优点。但是, 该方法的最低定量限(0.089 $\mu\text{mol/L}$)与血浆中最大残留量 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 非常接近, 前者仅仅为后者的 0.46 倍, 预示着该方法存在两个问题: (1) 检测信号的绝对值较低, 导致该方法对于大多数的实际检测样本的信噪比低; (2) 样本的实际残留量极有可能低于该定量限, 从而导致该方法不能用于有些实际样本的检测。本文利用阴离子型环糊精对亚甲蓝荧光的增敏作用, 建立了一种新的检测血浆中残留亚甲蓝的方法。与之前方法相比该方法检测限低、灵敏度高、操作简便, 具有一定的创新性和应用价值。

1 材料

1.1 仪器

LS-55 荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司)。

1.2 药品与试剂

亚甲蓝(上海 TCI 公司, 纯度 > 98.5%); 羧甲基- β -环糊精(山东滨州智源生物科技有限公司, 纯度 > 98%); 其他试剂

[△] 基金项目: 苏州市科技支撑计划项目(No.SS201221)

* 副主任药师。研究方向: 血液成分制备。电话: 0512-65230072

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药物分析与药物质量控制。电话: 0512-65884526。E-mail: hpxie@suda.edu.cn

均为分析纯。苏州市中心血站提供8份非灭活混合人血浆约1 000 ml,使用一次性病毒灭活配套装置中的过滤器滤除白细胞,得不含亚甲蓝的血浆,即空白血浆;同时提供20份经亚甲蓝病毒灭活的成品血浆样本,即待测血浆。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

称取亚甲蓝0.074 5 g,置于100 ml量瓶中,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)溶解并稀释至刻度。准确量取5.00 ml,用PBS定容到100 ml,得贮备液(100 $\mu\text{mol/L}$),避光、密封保存。

2.2 血浆样品的制备

向420 μl 的待测血浆中加入344 μl 的羧甲基- β -环糊精饱和溶液(0.01 mol/L),使羧甲基- β -环糊精浓度为4.5 mmol/L,充分混匀,避光放置20 min,即得待测溶液。同时,用空白血浆按前述方法配制不含亚甲蓝的待测溶液,即得空白溶液。

2.3 荧光分光光度法测定血浆中亚甲蓝含量

将待测溶液(或空白溶液)置于荧光比色皿中,以665 nm为激发波长、680 nm为发射波长、激发狭缝宽度5 nm、发射狭缝宽度5 nm、激发光程2 mm、发射光程10 mm,测定其荧光强度,由标准曲线计算亚甲蓝含量。

2.4 线性关系考察

用亚甲蓝贮备液和空白血浆分别配制含亚甲蓝浓度为0.008、0.05、0.08、0.15、0.20 $\mu\text{mol/L}$ 的5个标准血浆。利用羧甲基- β -环糊精溶液(0.01 mol/L),按“2.1”项下方法配制标准待测溶液,再按“2.3”项下方法测定标准待测溶液的荧光强度。以扣除空白的待测溶液的荧光强度为依据,即 $\Delta F = F - F_0$ (其中, F 和 F_0 分别为待测溶液和空白溶液的荧光强度),对相应的亚甲蓝浓度(c)进行线性回归,得回归方程为 $\Delta F = 73.898c - 0.0734$ ($r = 0.9990$)。结果表明,亚甲蓝血药浓度在0.008~0.2 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好。

2.5 包合反应时间

对于含亚甲蓝相同浓度的6个样本,室温避光,经不同包合反应时间后,测定其荧光强度(见图1)。从图1可知,室温下反应20 min后体系荧光强度趋于稳定,20、40、60、120 min荧光强度的相对标准偏差(RSD)为0.57%,荧光至少稳定2 h。因此本试验采用反应20 min后测定。

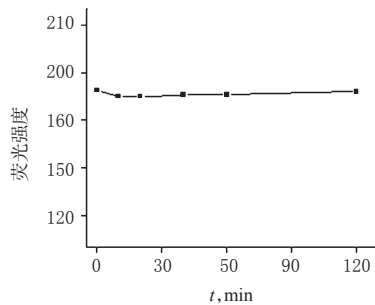


图1 亚甲蓝荧光强度随时间的变化

Fig 1 Change of fluorescence intensity of methylene blue with time

2.6 精密度试验

利用空白血浆和亚甲蓝贮备液,按“2.1”项下方法配制含亚甲蓝0.2、0.08、0.008 $\mu\text{mol/L}$ 的3个高、中、低浓度的待测溶液,按“2.3”项下方法测定其荧光强度。对同一个样本在同一天内测定11次,以测得的荧光强度计算日内RSD;对同一个样本连续测定11 d,以测得的荧光强度计算日间RSD。结果表

明,该方法具有良好的精密度,结果见表1。

表1 精密度及回收率试验结果

Tab 1 Results of precision and recovery tests

亚甲蓝配制浓度, $\mu\text{mol/L}$	亚甲蓝计算浓度, $\mu\text{mol/L}$	日内RSD, %	日间RSD, %	回收率, %
0.2	0.194 0	0.36	2.31	97.04
0.08	0.078 8	0.53	2.62	98.52
0.008	0.008 6	0.92	5.43	107.70

2.7 回收率试验

利用空白血浆和亚甲蓝贮备液,按“2.1”方法分别配制含亚甲蓝0.2、0.08、0.008 $\mu\text{mol/L}$ 的3个高、中、低浓度的待测溶液,按“2.3”项方法测定其荧光强度。以每个样本连续测定5次的荧光强度的平均值按“2.4”项下回归方程计算亚甲蓝浓度,并据此计算回收率,结果见表1。该结果表明本文所建立的方法具有良好的回收率。

2.8 实际血浆样本中亚甲蓝残留量检测

取20份待测血浆,按“2.1”项方法对每份血浆配制3个平行待测溶液,测定荧光强度。以空白溶液3次测定的平均荧光强度为标准,计算 ΔF 。按回归方程计算相应的亚甲蓝残留量,(见表2)。结果表明,20个实际血浆样本中亚甲蓝的含量均在线性范围内,且低于最大规定残留量0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。由此说明本方法对于实际的成品血浆能够实现亚甲蓝残留量的准确检测,并表现出快速、简单、低血浆消耗的显著特点。而基于 β -环糊精的荧光分光光度法^[7],最低定量限为0.089 $\mu\text{mol/L}$,20个实际血浆样本中仅有8个样本亚甲蓝浓度在线性范围内,因此用这种方法仅有40%的实际样本能得到准确检测。

表2 实际血浆样本中亚甲蓝残留量

Tab 2 The residual quantity of methylene blue in actual plasma sample

血浆样本 编号	亚甲蓝残留量, $\mu\text{mol/L}$				RSD, %	平均RSD, %
	检测样本1	检测样本2	检测样本3	平均值		
23 042	0.042 71	0.042 66	0.040 89	0.042	2.47	
36 259	0.068 87	0.080 68	0.082 17	0.077	9.44	
32 668	0.098 90	0.088 02	0.089 64	0.092	6.37	
7 218	0.094 03	0.095 66	0.093 96	0.095	1.02	
32 501	0.046 16	0.043 34	0.041 98	0.044	4.87	
23 043	0.155 38	0.175 22	0.158 93	0.163	6.48	
32 631	0.083 04	0.095 14	0.090 35	0.090	6.81	
39 413	0.050 03	0.051 68	0.043 15	0.048	9.38	
25 617	0.138 14	0.130 82	0.138 60	0.136	3.21	
39 402	0.040 64	0.046 76	0.042 97	0.043	7.10	
13 184	0.158 13	0.167 80	0.156 36	0.161	3.83	5.59
39 408	0.047 91	0.050 87	0.054 59	0.051	6.55	
39 407	0.152 68	0.157 55	0.170 56	0.160	5.77	
13 178	0.116 99	0.101 94	0.105 71	0.108	7.24	
32 507	0.057 14	0.050 35	0.058 79	0.055	8.07	
39 414	0.079 43	0.078 29	0.082 28	0.080	2.57	
36 248	0.074 97	0.069 61	0.074 00	0.073	3.92	
25 616	0.049 52	0.049 38	0.041 70	0.047	9.55	
39 411	0.053 17	0.050 14	0.053 04	0.052	3.29	
36 255	0.054 88	0.050 95	0.053 88	0.053	3.83	

3 讨论

3.1 羧甲基- β -环糊精对亚甲蓝荧光的增敏作用

由于 β -环糊精与亚甲蓝能够形成超分子包合物而增强亚甲蓝的荧光强度,据此已经建立亚甲蓝的增敏荧光法^[7]。 β -环糊精与亚甲蓝形成包合物的驱动力主要是疏水作用力^[8],而阴

离子型的羧甲基- β -环糊精与阳离子型的亚甲蓝之间的相互作用,除了疏水作用力外,还存在静电相互作用,这种较强的作用力预示着对亚甲蓝的增敏作用将更为显著。从图2可见,PBS缓冲溶液和羧甲基- β -环糊精对空白血浆的基底荧光没有显著影响,其强度均近乎为0(曲线a和b);然而,羧甲基- β -环糊精对亚甲蓝的荧光确实表现出了显著的增强作用,为84%(曲线c和d)。相对于 β -环糊精的增敏作用^[7],羧甲基- β -环糊精的荧光增强使本文建立方法的灵敏度获得了进一步提高(约为前者的10倍)。

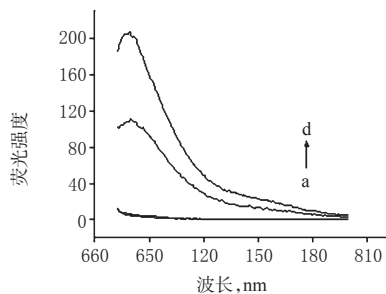


图2 羧甲基- β -环糊精对亚甲蓝荧光的增敏作用

a.空白血浆和PBS;b.空白血浆+羧甲基- β -环糊精;c.空白血浆、亚甲蓝+PBS;d.空白血浆、亚甲蓝+羧甲基- β -环糊精)

Fig 2 Sensitizing effect of CM- β -CD on the fluorescence signal of methylene blue

A. blank plasma and PBS; B. blank plasma and CM- β -CD; C. blank plasma, methylene blue and PBS; D. blank plasma, methylene blue and CM- β -CD

3.2 羧甲基- β -环糊精浓度的影响

在含相同浓度亚甲蓝的血浆样本中,加入不同浓度的羧甲基- β -环糊精饱和溶液,使其浓度在0~5 mmol/L范围内,测定其荧光强度(见图3)。结果当羧甲基- β -环糊精浓度较低时,随着其浓度的增加,亚甲蓝荧光强度显著增强;当血浆中羧甲基- β -环糊精的浓度为4.5 mmol/L时,荧光强度最高,表明较高浓度的亚甲蓝已经被羧甲基- β -环糊精完全包含;继续增加羧甲基- β -环糊精,荧光反而有所下降。因此,优化的羧甲基- β -环糊精浓度为4.5 mmol/L。

4 结语^[8]

本文基于羧甲基- β -环糊精超分子包合物荧光光度法,建立了灵敏检测血浆中残留亚甲蓝的方法。结果证明,该方法

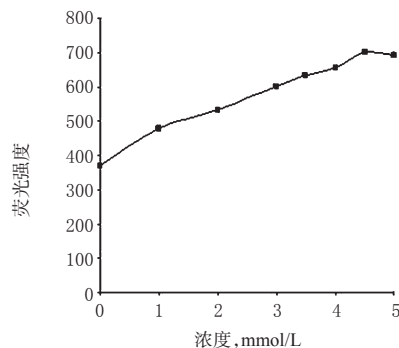


图3 羧甲基- β -环糊精浓度对亚甲蓝荧光强度的影响

Fig 3 The influence of CM- β -CD on the fluorescence intensity of methylene blue

准确可靠,不需分离富集,检测所需血浆量较少,可用于血浆中残留亚甲蓝的快速检测;且相对于 β -环糊精的增敏作用^[7],羧甲基- β -环糊精的荧光增强使本文建立方法的灵敏度约为前者的10倍。

参考文献

- [1] Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes[J]. *Transfusion Medicine Reviews*, 2002, 16(1): 61.
- [2] 谢如锋,许亚勇,黄宇闻,等.去白细胞输血过滤器在血浆病毒灭活中的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 1999, 12(4): 238.
- [3] 范春蕾,黄玉明.化学发光法快速测定亚甲蓝[J]. *西南师范大学学报:自然科学版*, 2005, 30(1): 104.
- [4] 王若燕,周晓萍,杜赛.固相萃取高效液相色谱法测定血浆中亚甲蓝含量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(10): 2012.
- [5] 鲁群岷,何佑秋,刘绍璞,等.金纳米微粒作探针共振瑞利散射光谱法测定亚甲蓝[J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27(5): 849.
- [6] 卫生部.血站技术操作规程:2012版[S]. 2012-01-01.
- [7] 周群刚,唐建华,谢莲,等. β -环糊精增敏荧光分光光度法检测血浆亚甲蓝[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(5): 344.
- [8] 王茹林,张国梅,杨郁,等.亚甲蓝与中性及电荷型 β -环糊精的包合特性[J]. *分析化学研究简报*, 2003, 31(2): 205.

(收稿日期:2013-08-27 修回日期:2013-11-17)

国家卫生和计划生育委员会副主任马晓伟会见拜尔医药保健管理委员会主席

本刊讯 2014年1月15日上午,国家卫生和计划生育委员会副主任马晓伟在京会见了来访的拜尔医药保健管理委员会主席布兰迪考特(Dr. Oliver Brandicourt)一行。

马晓伟介绍了中国深化医药卫生体制改革,特别是加强基层医疗卫生机构能力建设、实施分级诊疗服务模式以及加强医疗卫生行风建设方面的情况。他积极评价拜尔医药保健配合中国政府有关部门在提高基层医疗卫生人员技术水平等

方面开展的工作,表示愿进一步深化合作。

布兰迪考特赞赏中国医改取得的成就。他介绍了拜尔医药保健在华业务情况,表示愿积极承担企业社会责任,支持中国医药卫生事业发展和改革。

国家卫生和计划生育委员会医政医管局、基层卫生司和国际合作司负责人参加了会见。