

酞菁红区荧光探针阳离子表面活性剂体系高灵敏荧光增强法测定硫酸软骨素的研究

陈林, 黄萍, 杨惠卿, 邓雅斌, 李东辉* (厦门大学医学抗癌研究中心, 福建 厦门 361102)

摘要: 目的 建立高灵敏荧光增强法测定硫酸软骨素的新方法, 并用于实际样品测定。方法 对荧光光谱行为的考察显示, 在 pH 7.0 的介质中, 具有共轭结构的阳离子头部和长碳链尾部的阳离子表面活性剂对四磺基铝酞菁(AlS₄Pc) 的荧光具有高效猝灭作用, 二者形成无荧光离子缔合物。此离子缔合物可对带有磺基团的高分子黏多糖硫酸软骨素(CS) 作出灵敏响应。在 CS 的存在下, 反应体系荧光显著恢复, 最大恢复倍数可达 900 倍。由于猝灭效率高, 荧光恢复程度大, 甚至可实现目视化观测。结果 工作曲线响应区间 0.2 ~ 6 μg · mL⁻¹, 检测限 0.09 μg · mL⁻¹, 工作曲线 $\log Y = 0.15823\rho - 0.03597$, $r = 0.9987$ 。本实验对该法用于批量样品分析的可行性进行了考察, 结果表明, 所建立的方法可望用于高通量分析。结论 该法操作简便, 灵敏度、稳定性与检测准确性好。所建立的方法成功地用于组成复杂的实际样品中 CS 的定量分析, 解决了实际工作中的难点。

关键词: 近红外荧光探针; 酞菁; 硫酸软骨素; 荧光恢复

doi: 10.11669/cpj.2014.10.022 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2014)10-0890-06

Determination of Chondroitin Sulfate with High Sensitivity by Fluorescence Recovery through Shifting the Equilibrium between Anionic Phthalocyanine and Cationic Surfactant

CHEN Lin, HUANG Ping, YANG Hui-qing, DENG Ya-bin, LI Dong-hui* (Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To propose a novel method for quantitative determination of chondroitin sulfate in real samples using the ion-association phthalocyanine complex as a fluorescent probe emitting at red-region. **METHODS** The fluorescence of tetrasulphonated aluminum phthalocyanine (AlS₄Pc), an anionic metal phthalocyanine, was quenched dramatically by cationic surfactants which contain a positively-charged head with a conjugated structure and a long carbon chain as tail through the formation of an almost non-fluorescent association complex. Hexadecylpyridinium bromide (CPB) screened from a series of cationic surfactants was selected as a quencher because of its high fluorescence quenching efficiency. It was found that the ion-association complex (AlS₄Pc-CPB) emitted strong fluorescence in the presence of chondroitin sulfate due to the ability of chondroitin sulfate to shift the association equilibrium of the ion-association complex, which led to the release of AlS₄Pc, thus resulting in an increase in the fluorescence of AlS₄Pc. The method based on the above-mentioned phenomenon was investigated in the aspects of spectral characteristics, effect of pH, influence of reaction time, order of addition of reagents, the usage of reagents and interference of foreign substances. **RESULTS** Under optimal conditions, the linear range of the assay for chondroitin sulfate was 0.2 ~ 6 μg · mL⁻¹ with a detection limit of 0.09 μg · mL⁻¹. **CONCLUSION** The established method is not only sensitive, accurate but also simple and reliable. It has been used to the analysis of real samples with complicated composition with satisfactory results. It has also been successfully applied in batch test combined with well-plate technique, exhibiting great potential for high-throughput analysis.

KEY WORDS: near-infrared fluorescent probe; phthalocyanine; chondroitin sulfate; fluorescence recovery

硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS) 广泛存在于人和动物的软骨组织中, 一般由 50 ~ 70 个 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-氨基半乳糖双糖重复单位组成, 属糖胺聚糖类物质, 在水溶液中解离带负电荷。

CS 具有许多重要的生理活性和药理作用, 广泛应用于临床、化妆品、医用材料等领域^[1]。因其药用效果良好且毒副作用小, 临床上主要用于治疗神经痛、关节炎^[2-4]、耳鸣症以及促进溃疡愈合和防治高血脂

基金项目: 福建省科技重点资助项目(2012Y0081); 福建省公益类科研院所基本专项(2010R1101) 资助项目

作者简介: 陈林, 女, 硕士研究生, 研究方向: 荧光探针技术; * 通讯作者: 李东辉, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 生物医学分子光谱学联系 Tel: (0592) 2187562 E-mail: Lidh@xmu.edu.cn

症^[5]等,疗效显著^[6]。

CS的测定方法主要有高效液相色谱法^[7-10]、分光光度法^[11-15]、散射测定法^[16-18]、光度滴定法^[19]等。这些方法在灵敏度、选择性、操作的简便性尚存在不足,特别是对复杂样品的分析存在困难。近年来提出的共振瑞利散射法具有高灵敏度^[16],但由于目前尚无适用的仪器而难于进行高通量检测。

四磺基铝酞菁(tetrasulfonated aluminum phthalocyanine, AlS_4Pc)是一种强荧光化合物,具有典型的红区发射特性,其荧光量子产率高,因而具有很高的检测灵敏度。可采用长波激发,光漂白作用小,光化学稳定性好。通过荧光光谱筛选实验发现,具有共轭结构的阳离子头部和长碳链尾部的阳离子表面活性剂十六烷基溴化吡啶(CPB)可几乎完全猝灭 AlS_4Pc 的荧光。而在带有磺基阴离子的硫酸软骨素存在下,体系荧光显著恢复。本实验以 AlS_4Pc -CPB离子缔合物为红区荧光探针,考察其对硫酸软骨素的荧光恢复响应行为,发现离子缔合物的荧光恢复程度与CS浓度存在良好的相关性,据此实现了复杂样品中CS简便、准确的测定。所建立的方法与多孔板技术结合,实现了批量样品的分析,显示该法可用于高通量检测。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LS-55型荧光分光光度计(美国PerkinElmer公司,带多孔板阅读器附件);电热恒温水浴锅(上海精密试验设备有限公司);CHN81801 pH酸度计(美国奥立龙公司);1 cm石英比色皿;精密天平(Germany Sartorius公司);OMNI实验室超纯水系统(锐思捷科学仪器有限公司);GL-9406型双波长便携式紫外反射仪(其林贝尔公司,中国)。

1.2 试剂

AlS_4Pc (北京百灵威科技有限公司);CS(纯度95%,美国Sigma公司);CPB(美国Sigma公司);复方CS滴眼液(山东博士伦福瑞达制药有限公司)。其他试剂均为分析纯,实验用水为高纯水。

0.2 mol·L⁻¹ Britton-Robinson系列缓冲液:用浓度均为0.04 mol·L⁻¹的磷酸、醋酸、硼酸混合3酸与0.2 mol·L⁻¹ NaOH溶液按一定比例混合,配成不同pH值的缓冲溶液,并用酸度计测定其pH值。1.0 mmol·L⁻¹ AlS_4Pc 储备液,1.0 mg·mL⁻¹ CS储备液,4℃冰箱保存,工作液即用即配。1×10⁻² mol·L⁻¹ CPB,室温保存。1 mg·mL⁻¹ CS滴

眼液,密闭,置凉暗处(不超过20℃保存)。

1.3 实验方法

于4 mL离心管中依次加入300 μL B-R缓冲液(pH 7.00, 0.2 mol·L⁻¹)、30 μL 1.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹ AlS_4Pc 溶液、6 μL 1×10⁻² mol·L⁻¹ CPB、一定量的CS溶液,加水至3 mL,摇匀后于室温下静置反应40 min。用1 cm石英比色皿在610 nm波长处测量反应体系荧光强度。试剂空白记为 I_{f_0} ,加入CS后的荧光强度 I_f ,荧光强度差 $\Delta I_f = I_f - I_{f_0}$,荧光恢复倍数 $n = I/I_{f_0}$ 。

1.4 批量样品的微孔板测定方法

96孔白色微孔板的A、B、C3行用“1.3”项下方法做3条平行的标准工作曲线,其他各孔可用“1.3”项下方法测定不同浓度的经处理的CS滴眼液样品。

2 结果与讨论

2.1 AlS_4Pc 的分子结构

酞菁是一类具有类似卟啉结构的化合物,又称杂氮卟啉。四磺基铝酞菁(图1)由于其外周的4个苯环上各有一个强极性的阴离子基团,因而在水中有较大的溶解度,十分有利于水相中的实际应用。其中心配位离子为反磁性的 Al^{3+} ,故具有强荧光(水相中的量子产率近40%,醇中近60%^[20]),且发射处于红区(发射峰683 nm)。其激发带有2个,一个位于紫外区,称为Soret带;另一个位于长波区,称为Q带。如采用短波激发,会在其倍频处产生二级散射(散射峰在700 nm左右,接近荧光发射峰),为避开散射光的干扰,激发波长选择在长波处(即Q带)。 AlS_4Pc 与CPB荷电相反,可发生强烈的阴、阳离子缔合作用,导致体系荧光几乎完全猝灭。推测,由于CS的分子骨架上也带有磺酸根阴离子,易于

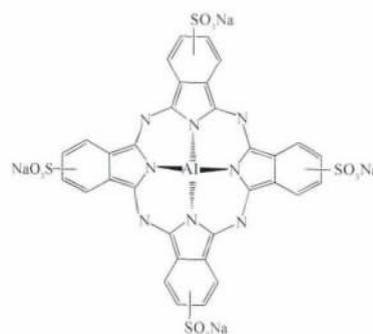


图1 四磺基铝酞菁(AlS_4Pc)的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of tetrasulfonated aluminum phthalocyanine (AlS_4Pc)

与 AlS_4Pc 上的磺酸基发生竞争;同时,多糖的分子结构也具有疏水性,易于与表面活性剂的尾部发生作用,因此当 CS 进入 AlS_4Pc -CPB 体系后,将与 AlS_4Pc 发生对 CPB 的强竞争结合作用,破坏 AlS_4Pc -CPB 的缔合平衡而使 AlS_4Pc 被释放出来,导致体系荧光恢复。研究发现,加入 CS 后体系荧光显著恢复,且荧光恢复程度与 CS 的浓度呈指数相关,本实验的方法即据此现象而建立。

AlS_4Pc -CPB 的激发和发射光谱,见图 2。由于 AlS_4Pc 与 CPB 的缔合作用, AlS_4Pc 的荧光几乎被完全猝灭。CS 加入后,与 AlS_4Pc 竞争性争夺 CPB, AlS_4Pc -CPB 之间的缔合平衡遭到破坏,体系中 AlS_4Pc 被部分释放,导致体系荧光显著恢复。

2.2 阳离子表面活性剂的选择

考察了多种烷基季铵盐型和吡啶盐型阳离子表面活性剂对 AlS_4Pc 的荧光猝灭作用(图 3)。结果显示,CPB 和十六烷基氯化吡啶(CPC)均能急剧猝灭 AlS_4Pc 的荧光,而其他表面活性剂对 AlS_4Pc 的荧光猝灭程度远不如二者,体现出明显的“构效关系”。同样用量的情况下,CPB 的猝灭效果优于 CPC,故本实验选择 CPB 作为猝灭剂。在 AlS_4Pc -

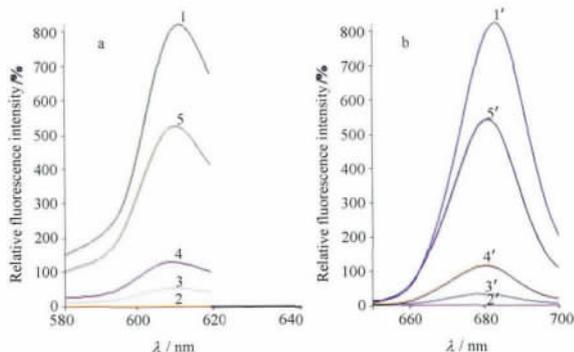


图 2 AlS_4Pc -CPB 体系的激发光谱 (a) 和发射光谱 (b) 及硫酸软骨素 (CS) 的加入对 AlS_4Pc 荧光光谱的影响

1, 1' - 缓冲液 + AlS_4Pc , [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2, 2' - 缓冲液 + AlS_4Pc + CPB, [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [CPB] = $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3, 3', 4, 4', 5, 5' - 缓冲液 + AlS_4Pc + CPB + CS, [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [CPB] = $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 曲线 3~5 和 3'~5' 中 CS 的浓度分别为 5、6、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Fig. 2 Excitation (a) and emission (b) spectra of AlS_4Pc -CPB in the absence and presence of chondroitin sulfate with increasing concentrations

1, 1' - buffer + AlS_4Pc , [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2, 2' - buffer + AlS_4Pc + CPB, [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [CPB] = $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3, 3', 4, 4', 5, 5' - buffer + AlS_4Pc + CPB + CS, [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, [CPB] = $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, concentrations of CS for curves 3~5 and 3'~5' : 5, 6 and 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

• 892 •

Chin Pharm J 2014 May, Vol. 49 No. 10

CPB(或 CPC)体系中加入 CS 后, AlS_4Pc 的荧光均显著恢复(最高恢复倍数可达 900 倍),甚至可实现目视观测(图 4)。

2.3 实验条件的优化

2.3.1 酸度的影响 采用 B-R 广泛缓冲体系

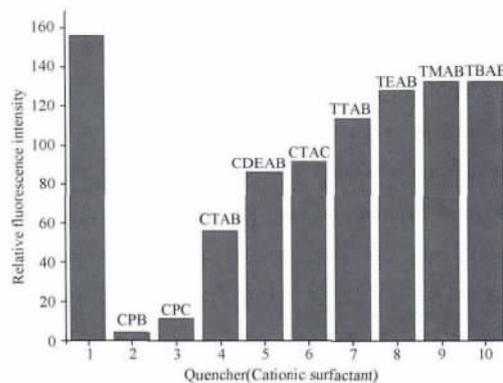


图 3 不同阳离子表面活性剂对 AlS_4Pc 荧光猝灭作用的比较

[AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 阳离子表面活性剂浓度: $1.70 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CDEAB - 十六烷基二甲基乙基溴化铵; CTAB - 十六烷基三甲基溴化铵; CTAC - 十六烷基三甲基氯化铵; TTAB - 十四烷基三甲基溴化铵; TEAB - 四乙基溴化铵; TMAB - 四甲基溴化铵; TBAB - 四丁基溴化铵

Fig. 3 Comparison of quenching effect of different sorts of cationic surfactants on the fluorescence of AlS_4Pc

[AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; [Cationic surfactant] = $1.70 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; CDEAB - hexadecyl dimethyl ethyl ammonium bromide; CTAB - hexadecyl trimethyl ammonium bromide; CTAC - hexadecyl trimethyl ammonium chloride; TTAB - tetradecyl trimethyl ammonium bromide; TEAB - tetraethyl ammonium bromide; TMAB - tetramethyl ammonium bromide; TBAB - tetrabutyl ammonium bromide

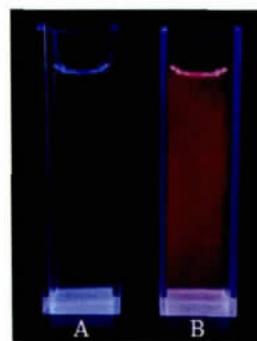


图 4 CS 存在下 AlS_4Pc -CPB 体系荧光恢复的目视化观测

A - AlS_4Pc + CPB; B - AlS_4Pc + CPB + CS; 手提式紫外灯照射 [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; [CPB] = $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; [CS] = $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Fig. 4 Naked-eye observation of fluorescence recovery for AlS_4Pc -CPB association complex in the presence of CS under irradiation by a portable UV reflectometer

A - AlS_4Pc + CPB; B - AlS_4Pc + CPB + CS; Portable UV lamp irradiation [AlS_4Pc] = $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; [CPB] = $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; [CS] = $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

中国药学杂志 2014 年 5 月第 49 卷第 10 期

(pH 2~12), 考察反应介质酸度对体系荧光恢复程度的影响(图5)。可以看出, pH 7.0 时荧光恢复倍数达到最大。故选用 pH 7.0 的 B-R 缓冲溶液为反应介质。

2.3.2 反应时间和温度的影响 考察了温度和反应时间对反应体系荧光恢复行为的影响, 发现室温反应 40 min 后达到平衡, 并可在 24 h 内维持恒定, 表明反应体系有好的稳定性。

2.3.3 标准曲线 在最佳条件下, 制作标准曲线, 反应体系对 CS 浓度呈现指数响应关系(图 6A)。对纵坐标(荧光强度)取对数, 可得直线(图 6B), 线性回归方程为 $Y = 0.15823X - 0.03597$ ($Y = \log I$), $r = 0.9987$, 线性范围 $0.2 \sim 6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限为 $0.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

本实验建立的 CS 检测方法的灵敏度优于文献报道的高效液相色谱法^[7-10]、光度滴定法^[18], 也高于某些分光光度法^[21]。

2.3.4 共存物质的干扰 对测定 CS 常见的干扰物质进行了考察(表 1)。结果表明, 常见的金属离子、无机酸根、其他氨基酸、蛋白质、核酸、糖类、维生

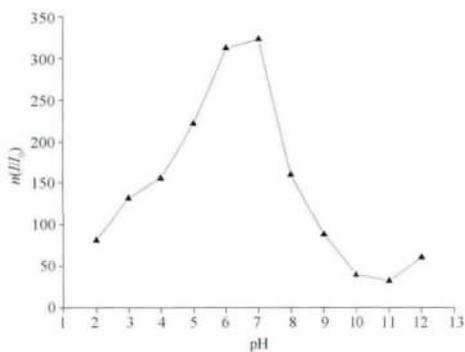


图 5 反应体系荧光恢复倍数与溶液 pH 值的关系
Fig. 5 Effect of solution pH on fluorescence recovery of the reaction

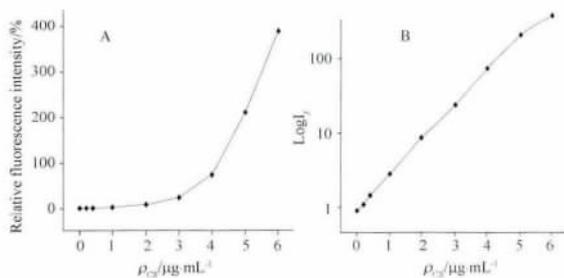


图 6 测定 CS 的标准曲线
A - 标准曲线; B - 对数标准曲线
Fig. 6 Calibration curve for the determination of CS
A - calibration curve; B - calibration curve logarithmic form

素和表面活性剂等基本不干扰测定, 方法具有良好的抗干扰能力。

2.4 实际应用

2.4.1 复杂样品(滴眼液)的测定 CS 滴眼液是角膜炎等眼科疾病常用的滴眼剂, 含有十余种添加剂, 组成较为复杂, 特别是其中含有高浓度的玻璃酸(即透明质酸, HA)。由于同为黏多糖, 结构上的相似性使 HA 对 CS 的测定常产生严重干扰, 这也是诸多 CS 测定技术应用于实际工作所面临的主要难点, 也是本实验拟解决的重点问题。

通过分级沉淀和容量分析发现, 实际样品(滴眼液)中 HA 的含量很高, 甚至高于主成分 CS, 若以滴眼液直接测定会产生较大正干扰, 参考黏多糖分级沉淀法^[22]并加以改进, 发现以乙醇和氯化钠饱和的盐酸组成的沉淀剂对 CS 和 HA 混合物有很好的分级沉淀效果, 可使 HA 充分沉淀而 CS 仍保留于溶液中, 取上清液即可直接进行测定。与其他黏多糖分级沉淀法相比, 此法简便、快速, 实用性强。

CS 滴眼液样品的前处理: 取 0.5 mL 润洁滴眼液置于 4 mL 离心管中, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 饱和的 HCl 溶液 150 μL 以及无水乙醇 575 μL , 振荡混匀, 产生透明团状沉淀, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 静置 10 min 后再次 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 取上清用于后续测定。

回收率: 精密吸取经过前处理的润洁滴眼液(CS 实际浓度为 $0.41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 20 μL 9 份, 置于 9 个 4 mL 离心管中, 分别加入 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ CS 标准品溶液 20, 30 和 40 μL 各 3 份, 按实验方法测定含量, 并计算回收率, 结果见表 2。

样品测定: 精密吸取经过前处理的 CS 滴眼液 27 μL , 按实验方法测定。滴眼液中 CS 标示量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 实际测得含量为 $1.0002 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 误差为 0.02%, RSD 为 0.30% ($n=9$)。

2.4.2 批量样品的测定 传统的逐样检测方式适合于样品数量少的情形。对于大批样品的检测, 可以使用微孔板。目前, 微孔板主要检测方式是可见光吸收、荧光和化学发光。我们将本实验所建立的检测方法与微孔板技术相结合, 考察了 CS 批量样品检测的可行性。对不同的浓度的多个 CS 样, 均可准确测量其含量(实际含量 = 每孔所加入的样品体积 \times 标示量 / 每孔溶液的终体积, 表 3)。这表明, 本法可望应用于高通量分析, 实现大批样品的快速测定, 节省时间, 简化操作, 具有实际应用的潜力。

表 1 常见干扰物质对 CS 测定的影响. CS = 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Tab. 1 Influence of coexisting substances on the determination of CS. CS = 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Foreign substance	$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Relative error/%	Foreign substance	$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Relative error/%
Ag ⁺	3.97×10^{-3}	+4.6	leucine	4.00×10^{-3}	+5.4
Cd ⁺	4.11×10^{-3}	+5.8	threonine	4.00×10^{-3}	+5.8
Ca ²⁺	1.33×10^{-3}	+4.8	proline	3.30×10^{-3}	+5.6
Co ²⁺	5.00×10^{-3}	+4.7	methionine	3.30×10^{-3}	+5.6
Ba ²⁺	4.57×10^{-3}	+5.7	histidine	3.30×10^{-3}	+5.6
Zn ²⁺	2.17×10^{-3}	+5.4	human serum albumin	3.30×10^{-3}	+5.7
Mn ²⁺	2.20×10^{-3}	+4.9	bovine serum albumin	3.30×10^{-3}	+6.6
Pb ²⁺	6.90×10^{-3}	+5.8	Ct DNA	1.00×10^{-3}	+6.0
Hg ²⁺	6.67×10^{-3}	+5.7	herring sperm DNA	1.00×10^{-3}	+5.7
Cu ²⁺	2.24×10^{-3}	+5.2	salmon sperm DNA	1.00×10^{-3}	+4.6
Al ³⁺	9.18×10^{-3}	+5.6	glucose	3.67×10^{-3}	+5.8
F ⁻	1.27×10^{-3}	-5.0	sucrose	4.00×10^{-3}	+6.0
Cl ⁻	1.18×10^{-3}	+4.9	glycerin	1.53×10^{-3}	+6.3
Br ⁻	1.33×10^{-3}	+5.8	VB ₆	3.50×10^{-3}	+4.8
I ⁻	1.06×10^{-3}	+5.3	CDEAB	7.70×10^{-3}	-5.0
NO ₃ ⁻	2.07×10^{-3}	+5.1	CTAB	7.70×10^{-3}	-4.7
SO ₄ ²⁻	3.20×10^{-3}	+4.7	CTAC	7.70×10^{-3}	-4.7
PO ₃ ³⁻	1.67×10^{-3}	+5.3	SDBS	6.70×10^{-3}	+5.0
EDTA	5.84×10^{-3}	+6.0	triton X-100	3.30×10^{-3}	+5.5
Boric acid	1.67×10^{-3}	+5.8	tween 80	3.30×10^{-3}	+4.9
Ethanol	1.67×10^{-3}	+4.9			

注: SDBS - 十二烷基苯磺酸钠

Note: SDBS - sodium dodecyl benzene sulfonate

表 2 CS 回收率实验结果

Tab. 2 Result of recovery test of CS

Sample	Number	Content of chondroitin sulfate		Relative error /%	Recovery /%	RSD(n=9) /%
		$\rho(\text{Actual}) / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{Measurement value}) / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (n=3)$			
Eye drops	1	3.39	3.43	1.18	99.8 - 102.1	2.58
	2	3.72	3.71	0.27	98.3 - 100.7	
	3	4.05	3.89	3.95	94.7 - 97.4	

表 3 CS 滴眼液批量样品检测结果

Tab. 3 Result of batch test of eye drops of CS

Actual content $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Measurement value $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Relative error/%
2.87	2.89	+0.7
+0.6	3.28	3.30
-0.8	3.69	3.66
-0.7	4.10	4.07
-6.0	4.51	4.24
-4.8	4.92	4.68
-7.7	5.33	4.92
-8.9	5.74	5.13

3 结论

本实验提出一种测定 CS 的新原理,即以四磺基铝酞菁-阳离子表面活性剂(CPB)构建荧光猝灭体系,利用黏多糖分子的竞争作用破坏缔合平衡,导

致体系荧光显著恢复从而实现 CS 的定量分析。该法简便、快速、抗干扰能力强,开拓了红区荧光探针四磺基铝酞菁的新应用。利用 HA 和 CS 对 AlS₄Pc-CPB 荧光恢复响应的显著差异,实现了复杂样品中 CS 的简便、快速、准确的测定。结合微孔板技术的多样品测定结果显示,所建立的方法可望应用于高通量分析。

REFERENCES

- [1] XU Q Y, LI X R, SHI M. Progress in research of chondroitin sulfate[J]. *Lett Biotech (生物技术通讯)* 2006, 15(6): 633-635.
- [2] NEIL K M, CARON J P, ORTH M W. The role of glucosamine and chondroitin sulfate in treatment for and prevention of osteoarthritis in animals[J]. *Javma-J Am Vet Med A* 2005, 226(7): 1079-1088.
- [3] DISTLER J, ANGUELOUCH A J. Evidence-based practice: Review of clinical evidence on the efficacy of glucosamine and chondroitin in the treatment of osteoarthritis[J]. *J Am Acad Nurse*

Prac 2006 ,18(10) : 487-493.

- [4] HE Z X ,JIN Y ,ZHANG T M. Structure of chondroitin sulfate and its application the therapy of osteoarthritis[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志) 2012 47(5) : 387-391.
- [5] MOURAO P A S ,PEREIRA M S ,PAVAO M S G. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from e-chinoderm-sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action [J]. *J Bio Chem* ,1996 ,271 (39) : 23973-23984.
- [6] LING P X ,WANG F S. *Research Progress of Biochemical Substances for Drugs*(生化药物研究进展) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House 2004: 403.
- [7] JI D ,ROMAN M ,ZHOU J ,*et al.* Determination of chondroitin sulfate content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection after enzymatic hydrolysis: Single-laboratory validation[J]. *J Aoa Int* , 2007 90(3) : 659-669.
- [8] HUANG Y ,TOYODA H ,TOIDA T ,*et al.* Determination of chondroitin sulfates in human whole-blood ,plasma and blood-cells by high-performance liquid-chromatography [J]. *Biomed Chromatogr* ,1995 9(2) : 102-105.
- [9] AKIYAMA H ,SHIDAWARA S ,MADA A ,*et al.* Chemiluminescence high-performance liquid-chromatography for the determination of hyaluronic-acid ,chondroitin sulfate and dermatan sulfate [J]. *J Chromatogr-Biomed Appl* ,1992 579(2) : 203-207.
- [10] JIN P ,MA J ,WU X ,*et al.* Simultaneous determination of chondroitin sulfate sodium ,allantoin and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical eye drops by an ion-pair high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharmaceut Biomed* ,2009 50(3) : 293-297.
- [11] KAMATA K ,TAKAHASHI M ,TERAJIMA K ,*et al.* Spectrophotometric determination of sodium chondroitin sulfate in eye drops after derivatization with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole [J]. *Analyst* ,1995 120(11) : 2755-2758.
- [12] YA Q ,SUN W ,GAO R F. Spectrophotometric determination of chondroitin sulfate with acridine orange [J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志) 2006 27(2) : 68-70.
- [13] SHI W J ,ZHU X X. Spectrophotometric determination of chondroitin sulfate by using victoria pure blue BO as reagent [J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志) 2004 25(1) : 28-30.
- [14] GAO G Z ,JIAO Q C ,DING Y L ,*et al.* Study on quantitative assay of chondroitin sulfate with a spectrophotometric method of azure A [J]. *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析) 2003 , 23(3) : 600-602.
- [15] CHEN Y Y ,JIANG Z L ,LI Z Z ,*et al.* Spectrophotometric determination of chondroitin sulfate with victory blue B [J]. *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析) 2006 26(6) : 1148-1150.
- [16] CUI Z P ,HU X L ,LIU S P ,*et al.* A dual-wavelength overlapping resonance Rayleigh scattering method for the determination of chondroitin sulfate with Nile blue sulfate [J]. *Spectrochim Acta A* , 2011 83(1) : 1-7.
- [17] LI T S ,LIU S P ,LIU Z F ,*et al.* A sensitive and simple method for the determination of chondroitin sulfate with crystal violet by resonance Rayleigh scattering technique [J]. *Arch Pharm* 2005 , 338(9) : 427-432.
- [18] LIU J ,LIU Z F ,HU X L ,*et al.* Determination of chondroitin sulfate A by resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering with proteins as probes [J]. *Chin J Appl Chem*(应用化学) 2010 27(7) : 842-848.
- [19] XU Z Z ,XU Y W ,WANG X B ,*et al.* Determination of chondroitin sulfate by photometric titration [J]. *China Drug Standards* (中国药品标准) 2008 9(6) : 465-467.
- [20] AMBROZ M ,BEEBY A ,MACROBERT A J ,*et al.* Preparative , analytical and fluorescence spectroscopic studies of sulfonated aluminium phthalocyanine photosensitizers [J]. *J Photochem Photobiol B* ,1991 9(1) : 87-95.
- [21] LING P X ,ZHANG T M. *Hyaluronic Acid*(透明质酸) [M]. Beijing: China Light Industry Press 2002: 5-8.

(收稿日期: 2013-12-13)