

经验交流

肝素的定量法*

张昌敬 黎义和 李贤柏

(重庆师范学院生化教研室, 重庆 630047)

摘要 根据核糖核酸酶水解核糖核酸时, 在300nm 波长处光吸收值下降的速率被肝素抑制之特点, 用已知量肝素对抑制程度进行定量, 制得标准检量线, 从而测得未知量的肝素含量。此法简捷方便, 一次能测定多个样品。

关键词 核糖核酸酶, 核糖核酸, 猪肺源肝素, 光吸收值

肝素结构复杂, 包含着类似结构的多个二糖单位, 随来源不同在结构上极不均一^[1], 抗凝血活性亦有差异。因此, 肝素的定量检测不是重量浓度, 而是以生物学活性表示的。肝素的检测有多种方法, 最早测定肝素含量的方法是1924年Howell建立的。后来有1938年Reinert和Winterstein的羊血浆法, 1941年Jaques等的凝血酶法, 1953年Langdell介绍的APTT法, 1967年Seip等在试管中检验肝素的电机法, 1972年Dietrich等的微量法检验哺乳动物肌肉中肝素, 1982年由Bartl和Lill^[2]利用AT-Ⅲ肝素复合物对凝血酶的抑制作用而测定肝素活性的方法等, 然而尚未见到Zöllner和Lorenz的核糖核酸酶抑制法在国内报道或应用, 现将试验探索的结果介绍如下。由于此法特别适用于大批量测定工业样品中肝素含量, 简捷方便, 亦适合目前生物技术产业需要, 介绍此方法有一定意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

称取核糖核酸0.2g 溶于100ml 乙酸缓冲溶液中 (0.2mol/L, pH5.0, 分析纯)。

称取5mg 核糖核酸酶溶于100ml 重蒸水中, 药品购自上海生化试剂商店。

标准肝素用重蒸水稀释成5USP/ml, 标准

肝素购自重庆市药检所的国家标准品。

7530型分光光度计, 上海分析仪器厂生产。

1.2 方法

参考Zöllner和Lorenz^[3]的核糖核酸酶抑制法进行。取配成5USP/ml的标准肝素溶液, 按梯度吸取不同量分别加入试管中, 每管加重蒸水至总体积为2ml, 再加核糖核酸溶液1ml, 测定前逐管加入核糖核酸酶溶液1ml混匀, 立即测定。对照组以重蒸水代替标准肝素溶液同样进行。待测样组以待测样液代替标准肝素液进行测定^[1,4]。

2 结果与讨论

2.1 肝素活性标准检量线

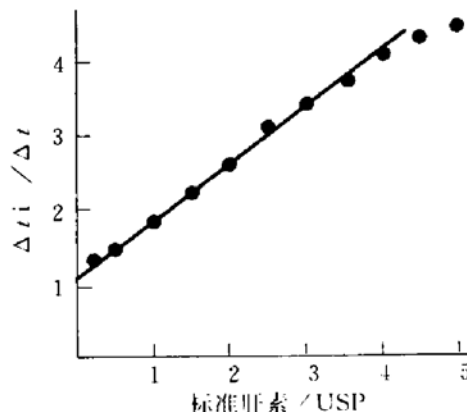


图1 核糖核酸酶抑制法测定
肝素活性的标准检量线

* 重庆市科委拨款资助重点项目。

收稿日期: 1993-05-05, 修回日期: 1993-06-20

取加有标准肝素和试剂的各管,测定其在300nm 波长处光吸收值每下降0.04单位所需时间(Δt_i)以及未含肝素组(对照)所需时间(Δt),以 $\Delta t_i/\Delta t$ 为Y轴,肝素含量为X轴,制得标准检量回归方程, $Y = 1.13 + 0.77X$,相关系数 $r = 0.99$,标准检量线(图1)适用的检量范围在4USP,相当于 $25.00\mu\text{g}$ ($1\mu\text{g} = 0.160 \text{ USP}$)活性以下,超出此范围标准检量

线趋于平缓,在此检量范围内测定待测样时只要测定出 Δt_i 和 Δt 值即可查出肝素含量.

2.2 重复性

在同次实验中测定10管同浓度的样品,在肝素浓度为1USP/ml 时,其相对误差为 $\pm 6.9\%$;肝素浓度为4USP/ml 时,相对误差为 $\pm 2.4\%$ (表1).

表1 10管同浓度样品的重复性实验

		(USP/ml)									
管号	检量浓度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		0.97	1.06	1.05	0.95	0.92	1.03	1.04	0.87	0.90	0.96
	4.00	3.92	4.04	4.09	4.04	3.99	3.77	3.88	3.91	3.96	3.97

2.3 回收率

用回收实验检验方法的准确性,向已知浓度的肝素溶液中分别再加入已知不同量的肝素

溶液,经测得 Δt_i 和 Δt 后即可查出相应的肝素浓度值,计算回收率为 $97.3\% \pm 2.4\%$ (表2).

表2 肝素的回收实验

	肝 素 (USP/ml)									
期望浓度/USP	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	1.0
检量浓度/USP	0.24	0.51	0.95	1.45	1.90	2.4	3.0	3.48	3.92	0.95
回收率/%	96	102	95	97	95	96	100	99.41	98	95

肝素抑制核糖核酸酶对核糖核酸的分解,这种抑制可能是竞争性抑制.其原理可以作为定量测定不同对象肝素活性的基本方法,这个方法能快速地检出样品中少量的肝素,除肝素外,其它酸性粘多糖不影响此反应,因而能更真实地反映样品中肝素的实际含量.但是该法亦与其它方法一样并非十全十美,在测定时应考虑的是高盐浓度等因子的影响.

参 考 文 献

1 张惟杰.复合多糖生化研究技术.上海:科技出版社,

1987: 275, 290

2 Lill H. In: Wirt I eds. Heparin: New biochemical and medical aspects. Berlin: Walter de Gruyter, 1982: 91

3 Zöllner N, Lorenz B. Heparin in method of enzymatic anal. New York, San Francisco and London: academic Press, 1974; 2: 79

4 张龙翔等.生化实验方法和技术.北京:高等教育出版社, 1981: 216

40cm). Human normal sera were applied to the column at a flow rate of 0.25ml/min. and the column was washed with 0.01mol/L PBS (pH7.4) at a rate of 3ml/min. Materials adsorbed to the immobilized antibodies were eluted with 6mol/L guanidine-HCl. Between experiments, the column was stored in PBS-azide at 4°C.

Key words affinity chromatography, TSH, normal human serum

Quantitative Method of Heparin. Zhang Changjing, Li Yihe, Li Xianbai. (*Department of Biochemistry, Chongqing Teachers Training College, Chongqing 630047*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 372—373

It is known that the dropping rate of optical absorbing value at 300 nm wave length when ribonucleic acid is hydrolysed with ribonuclease is inhibited quantitatively by heparin. Upon this fact, a standard measuring line is plotted when the inhibition is quantitated by known quantity standard heparin. Any unknown can be determined conveniently by comparing with this standard.

Key words ribonuclease, ribonucleic acid, heparin from hog lung, optical absorbing value
Modifications on the Polarographic Oxygen Electrode Method for Superoxide Dismutase Activity Determination. Zhang Jiquan, Chen Youchun, Zou Yueqi, Yan Jinghui. (*Institute of Animal Science, CAAS, Beijing 100094*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 374—375

The following modifications to the polarographic oxygen electrode method for SOD activity determination were made: (1) directly determining at room temperature, (2) introducing standard SOD as activity unit standard, (3) using phosphate buffer as reaction medium, and (4) increasing the pyrogalllic acid used. These modifications result in: (1) the abolishment of the bubbles easily produced on the electrode surface which severely interfere with the determination, (2) increased sensitivity of determination and (3) broadened linear range of SOD activity.

Key words polarographic oxygen electrode, superoxide dismutase, activity determination