

# 一种快速测定透明质酸浓度的分光光度法

刘杰 周心怡 张华英 张添

(食品科学与工程系)

**摘要** 阿利新蓝染料和透明质酸形成复合物后,其吸收程度发生了差异,这种变化与透明质酸浓度0~257 $\mu\text{g}$ 范围内有良好的线性关系。本法操作简便、快速、重现性好,准确度和回收率分别为2.3%和96.3%~102%。

**关键词** 分光光度法;阿利新蓝染料;透明质酸

**中图分类号** O657.321

## 0 前 言

透明质酸(Hyaluronic Acid HA)是酸性粘多糖类物质,它是由N-乙酰基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸以 $\beta$ -1,3键结合起来的双糖单元,以 $\beta$ -1,4键聚合而成的一种直链粘多糖,普遍存在于动物和人体内,如皮肤、肌肉、腱和软骨等。K. Meyer和J. W. Palmer 1934年首先从牛眼玻璃体中分离出<sup>[1]</sup>,几十年来,不论在HA的分布和化学结构方面,还是在生理功能和临床应用研究均取得不断进展<sup>[2]</sup>,特别在眼科、骨科和烧伤外科等手术中收到了良好的效果。

随着生化制药工业的发展,HA具有独特的生理活性和卓越的保湿功能,日益受到日用化妆品行业的重视<sup>[3,4]</sup>。国内外一般从脐带和雄鸡冠中提取HA,作者则研究出从猪皮中提取化妆品用HA的工艺,成本低廉。为了更好地控制生产过程和保证成品质量,作者又研究出一种快速、简便、重现性好的测定HA的方法。

HA的定量方法常采用咔唑法等,但这种方法选择性不强,操作繁琐,且会受样品中其它粘多糖的干扰。W. Gold<sup>[5]</sup>用阿利新蓝染料法比色测定人尿和血清中的氨基葡聚糖(Glycosaminoglycan GAG)。本法是基于阿利新蓝染料和透明质酸中的氨基葡聚糖形成复合物后,其吸收程度发生差异,这种变化与透明质酸在一定浓度范围内呈线性关系,符合比耳定律。为此,作者据此法用于测定猪皮中的HA含量。

收稿日期:1994-03-05

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器 721 型分光光度计 上海第三分析仪器厂

501 型恒温水浴 上海实验仪器总厂

### 1.2 试剂

0.5mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}$  溶液 称取 41g 无水  $\text{CH}_3\text{COONa}$ (A. R.) 溶解于 1000ml 水中。

阿利新蓝染料(Alcian blue 8GS)溶液 上海化学试剂采购供应站分装 称取 0.14g 阿利新蓝染料,溶于 100ml 0.5mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}$  溶液中,干过滤,每天需新鲜配置。

透明质酸 中科院上海生化所 准确称取 0.1000g HA 溶于适量水,转移到 100ml 容量瓶中,以水定容至刻度,摇匀,此溶液浓度为 1.0mg/ml,作贮备液,贮存在冰箱中。

工作液需每天新鲜配置。

## 2 实验方法

分别在 20ml 比色管中加入一定量(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) HA 的标准工作液,加 12ml 阿利新蓝染料溶液,稀释至刻度,作为标准样液管;另加与 HA 标准液同体积的水,加 12ml 阿利新蓝染料溶液,稀释至刻度,作为显色试剂管;再另加与 HA 标准工作液同体积的水,加 12ml 0.5mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}$  溶液,稀释至刻度,作为参比溶液管。上述三种溶液均在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下恒温 10min 后,在最佳吸收波长 480nm 处,用 2cm 比色皿测其吸光度。

## 3 实验条件的选择

### 3.1 吸收曲线

按试验方法,在 430nm 至 540nm 波长范围内分别测定其吸光度,绘制阿利新蓝染料和 HA-阿利新蓝染料复合物的吸收曲线,见图 1。

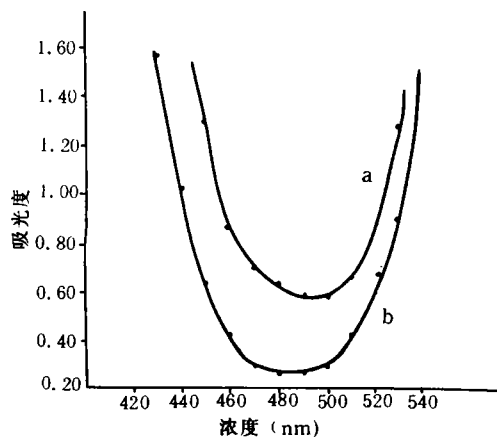


图 1 吸收曲线

a HA-阿利新蓝染料试剂 b 阿利新蓝染料试剂

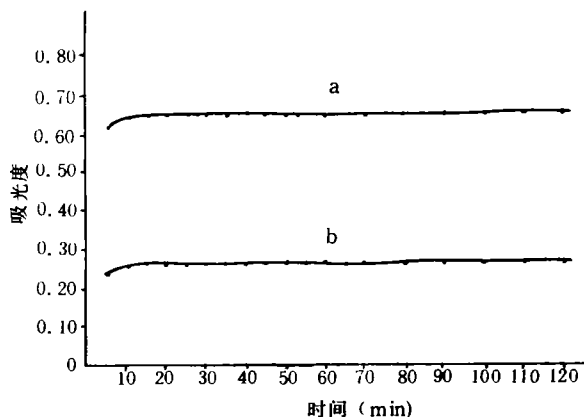


图 2 稳定性试验 (25 $^\circ\text{C}$ )

a HA-阿利新蓝染料复合物 b 阿利新蓝染料试剂

由图 1 可看出,阿利新蓝染料试剂在 480nm 处表现为吸收最小,而 HA-阿利新蓝染料复合物却在 490nm 处吸收最小,在 480nm 处两者对比度较大,故选择 480nm 作为最佳吸收波长。

### 3.2 稳定性试验

按试验方法,在 480nm 处测定其放置一定时间后吸光度的变化,见图 2。

由图 2 所示,在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  放置 10min 后至 2h 内,HA-阿利新蓝染料复合物和阿利新蓝染料本身吸光度变化很小,故选择恒温  $25^\circ\text{C}$  放置 10min 后进行测定。

### 3.3 温度的影响

HA-阿利新蓝染料复合物的存在与温度关系较大标样按试验方法测定温度对吸光度的影响,见图 3。

从图 3 可见,随温度上升,HA-阿利新蓝染料复合物吸光度发生变化,因此必须选择  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下恒温 10min 后才能测定,所以在不同批次实验时,工作曲线需进行斜率校正。

### 3.4 工作曲线的绘制

准确称取标样 0.1072g,用水溶解后,稀释至 100ml 容量瓶内定容,得贮备液。

吸取 3ml 贮备液,再在 10ml 容量瓶中稀释定容,得工作液。取一定量工作液按试验方法测得吸光度,绘制工作曲线,线性关系良好,见图 4。

回归线方程:

$$y = 1.45 \times 10^{-3} + 1.84 \times 10^{-3} C_{\text{HA}}$$

$$r = 0.9997$$

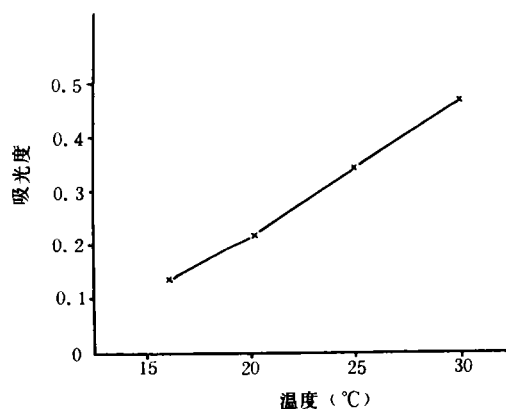


图 3 温度的影响

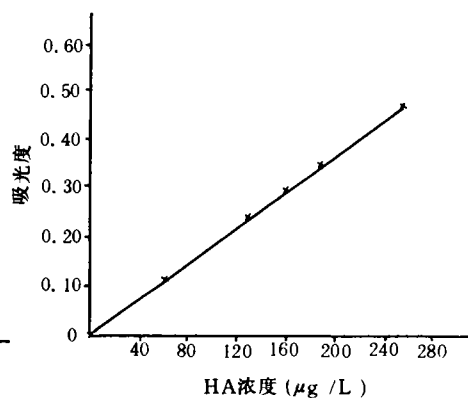


图 4 HA 的工作曲线

### 3.5 干扰试验

酶解液或成品中由于分离不完全,可能会含有水不溶性蛋白质,产生浑浊,影响吸光度数值,所以必须进行干扰试验。

精确称取 10g 明胶,用水温热溶解后,稀释至 150ml,干过滤,取滤液备用。

分别吸取上述明胶溶液 0, 0.20, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70ml 放入试验方法所述之参比液管内,测得吸光度  $A_1$ , 另将上述同体积的明胶溶液则放入标准液管中,测得吸光度  $A_2$ , 然后求出它们之间的差值  $\Delta A = A_2 - A_1$ , 见表 1。

表 1 蛋白质干扰试验

| 加入明胶溶液体积 (ml)                | 0 | 0.20  | 0.40  | 0.50  | 0.60  | 0.70  |
|------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| 参比液管吸光度 ( $A_1$ )            | 0 | 0.025 | 0.040 | 0.055 | 0.068 | 0.090 |
| 标准吸光度 ( $A_2$ )              | 0 | 0.090 | 0.102 | 0.122 | 0.135 | 0.154 |
| 吸光度差值 $\Delta A = A_2 - A_1$ | 0 | 0.065 | 0.062 | 0.067 | 0.067 | 0.064 |

由  $A_2$  可看出,随着明胶加入量增多,浓度变大,浑浊度随之也增大,造成吸光度数值上升,但从吸光度差值  $\Delta A = A_2 - A_1$  表明,在扣除了明胶浊度造成的影响后,吸光度差值基本上保持稳定,数值在  $0.065 \pm 0.003$  左右,从而也可说明蛋白质不会与阿利新蓝染料发生作用,也不影响 HA-阿利新蓝染料复合物的形成,因此,用差减法可以扣除未除净的蛋白质造成的浑浊对吸光度影响。

### 3.6 重复性试验

吸取样品酶解液 5ml,在 10ml 容量瓶中稀释定容,摇匀。然后,再吸取 1ml 稀释液按试验方法进行吸光度测定。数据见表 2。

表 2 重复性试验

| 测定次数 (n) | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 平均值   | S                    | CV (%) |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|--------|
| 吸光度 A    | 0.194 | 0.200 | 0.195 | 0.192 | 0.192 | 0.200 | 0.198 | 0.200 | 0.196 | $3.6 \times 10^{-3}$ | 1.8    |

## 4 样品测定

本法既可以作为猪皮提取 HA 酶解条件时的质量控制,又可作为猪皮 HA 成品的含量测定。

### 4.1 酶解条件时的质量控制

**4.1.1 酶解液 HA 的测定** 称取一定量猪皮样,在特定的工艺条件下进行酶解,得酶解液 500ml 左右。精确吸取 2ml 酶解液,稀释至 10ml 定容,得样品稀释液,再按试验方法进行 HA 的测定,注意斜率校正因子,见表 3。

表 3 酶解液 HA 的测定

| 测定次数 (n) | 样品液吸光度 A | 空白液吸光度 $A_0$ | 斜率校正因子 K | 酶解液 HA 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 平均值 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | S    | CV (%) |
|----------|----------|--------------|----------|--------------------------------|--------------------------|------|--------|
| 1        | 0.168    |              |          | 522                            |                          |      |        |
| 2        | 0.174    |              |          | 540                            |                          |      |        |
| 3        | 0.178    | 0.004        | 0.848    | 555                            | 535                      | 12.7 | 2.4    |
| 4        | 0.170    |              |          | 530                            |                          |      |        |
| 5        | 0.170    |              |          | 530                            |                          |      |        |

**4.1.2 回收率试验** 吸取酶解液 2ml,稀至 10ml 定容,根据试验方法进行回收率试验,结果见表 4。

表 4 酶解液 HA 的回收率试验

| 测定次数 (n) | 样品液 HA ( $\mu\text{g}$ ) | 加标量 HA ( $\mu\text{g}$ ) | 测得 HA 量 ( $\mu\text{g}$ ) | 回收率 (%) | S   | CV (%) |
|----------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------|-----|--------|
| 1        | 282                      | 411                      | 684                       | 98.0    | 2.3 | 2.3    |
| 2        | 282                      | 411                      | 678                       | 96.3    |     |        |

续表 4

| 测定次数<br>(n) | 样品液<br>HA ( $\mu\text{g}$ ) | 加标量<br>HA ( $\mu\text{g}$ ) | 测得 HA 量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 回收率<br>(%) | S | CV<br>(%) |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------|---|-----------|
| 3           | 282                         | 411                         | 689                          | 99.0       |   |           |
| 4           | 282                         | 411                         | 701                          | 102.0      |   |           |
| 5           | 282                         | 411                         | 697                          | 101.0      |   |           |

#### 4.2 成品中 HA 含量测定

猪皮 HA 液经浓缩和真空干燥、灭菌后得无臭、无味灰白色无定形粉末,按试验方法进行不同批次产品分析,结果见表 5。

表 5 成品中 HA 的含量测定

| 测定次数<br>(n) | HA 含量<br>(%) | HA 含量平均值<br>(%) | S    | CV<br>(%) |
|-------------|--------------|-----------------|------|-----------|
| 1           | 41.9         |                 |      |           |
| 2           | 42.0         |                 |      |           |
| 3           | 42.5         | 41.9            | 0.37 | 0.9       |
| 4           | 41.5         |                 |      |           |
| 5           | 41.7         |                 |      |           |
| 6           | 42.3         |                 |      |           |

## 5 结 论

采用阿利新蓝染料分光光度法测定透明质酸含量,操作简便,每份样品在 1h 以内就可以完成测定,干扰因素少,数据的重复性、精密度也高,变异系数为 2.4%,回收率 96.3%~102%,可以认为是一种准确测定 HA 的好方法。

### 致 谢

承无锡化工研究设计院顾秀芬高级工程师提出了宝贵的意见,并核实了样品测试,在此谨表谢意。

### 参 考 文 献

- 1 Meyer K et al. J. Biol. Chem. 1934,107:929
- 2 沈勃江等. 生化药物杂志, 1985,2:23
- 3 凌沛学等. 生化药物杂志, 1986,4:1
- 4 杨根源. 日用化学工业, 1986,5:25
- 5 Gold W. Anal. Biochem. 1979,99:183

## A Simple Spectrophotometric Method for Hyaluronic Acid Assay

Liu Jie Zhou Xinyi Zhang Huaying Zhang Tian

(Dept. of Food Sci. and Eng.)

**Abstract** A new procedure for hyaluronic acid assay is introduced, which is based on the absorption spectra difference between alcian blue dye and soluble alcian blue-GAG of the HA complexes. A linear relationship between concentration quantities in the range of 0~257 $\mu$ g was observed. The spectrophotometric method is described in this report which allows the simple rapid and reproducible. The precision and recovery of this method are within 2.3% and 96.3%~102% respectively.

**Subject-words** Spectrophotometry; Alcian blue dyes; Hyaluronic acid (HA)