

11

75-30

胆红素在碱性溶液中稳定性的极谱研究

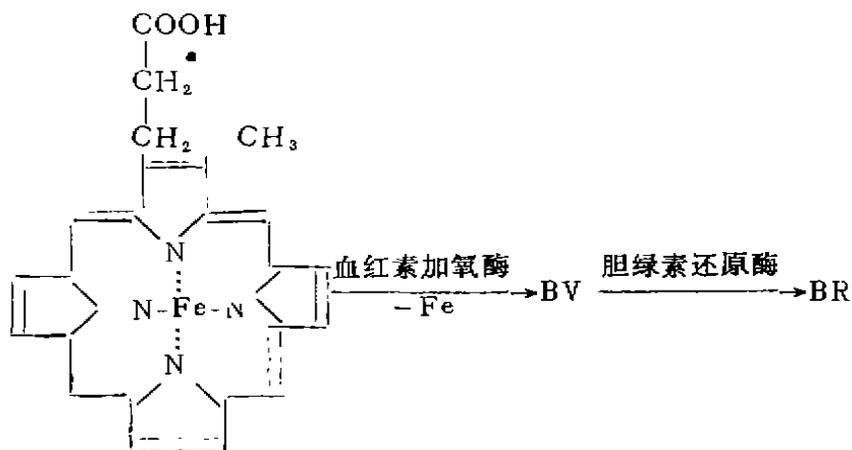
王琰 R446.112

(基础科学系)

摘要 胆红素为人体内存在的胆色素之一，是细胞的代谢产物，对人体有重要的生理作用。检测人体血液中胆红素的含量，可作为诊断肝病的重要依据，在临床上具有重要意义。但胆红素是一种热敏性和光敏性较强的物质，很不稳定，升高温度和光照都将加速其氧化，使检测结果偏低。为了确定极谱法检测胆红素的最佳操作条件，对胆红素在碱性水溶液中的稳定性进行了深入研究，试验了支持电解质的种类和浓度、溶液的酸度、溶液中的溶解氧、光照以及微量金属离子的存在对胆红素稳定性的影响。本文提出的极谱法测定胆红素的最佳操作条件为：0.2 mol/L $\text{NH}_4\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液，pH=9.5，试液通氮 6 min 或加入 4×10^{-4} mol/L EDTA 溶液，避光，测定在 0.5h 内完成。

关键词 胆红素，胆红素的稳定性，胆红素的极谱法，胆色素 控制

胆红素 (Bilirubin, 简称BR) 为人体内存在的胆色素之一，是细胞的代谢产物，主要来源于衰老红细胞中血红素的降解产物，少量来源于其它色素蛋白、未成熟的红细胞和快速转化的游离血色素。血红素在血红素加氧酶的作用下生成胆绿素 (Biliverdin, 简称BV)，再经胆绿素还原酶的作用生成胆红素；



本文1992年10月13日收到。

成年人体内每天代谢产生约300mg胆红素, 血液中胆红素的含量维持在 $2 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内^[1]。当人体患某些疾病时, 血液中胆红素含量会超出正常范围^[2]。由于胆红素对人体具有重要的生理作用, 临床上把检测人体血液中的胆红素含量作为诊断肝病的重要依据, 故对胆红素进行准确、快速、简便的定量检测方法的研究具有实际意义。迄今已提出多种检测方法, 常用的有分光光度法、偶氮反应法、荧光法和氧化反应法等四类。近年来又开发出以偶氮反应为基础的干片化学法, 高效液相色谱法, 以及方波伏安法、吸附溶出伏安法等电化学分析方法^[3, 4, 5]。但由于这些方法或是未能有效地解决胆红素的水溶性和稳定性差的问题, 或是灵敏度低, 分析程序复杂, 而使其应用受到一定局限。因此, 仍有必要继续探寻检测胆红素的理想的分析方法。用单扫描极谱法测定胆红素, 相对于常用的分光光度法来说, 方法简便、快速、灵敏度高, 可望在临床检测及胆红素的纯度鉴定等方面得到应用。由于胆红素是一种热敏性和光敏性较强的物质, 很不稳定, 升高温度和光照都将加速其氧化, 使检测结果含量偏低^[6]。为了确定用单扫描极谱法检测胆红素的最佳操作条件, 有必要对胆红素在碱性水溶液中的稳定性进行深入的研究。

1 实验部分

1.1 主要仪器及试剂

JP-2型单扫描示波极谱仪(成都仪器厂)导数部分, 三电极系统, 参比电极为饱和甘汞电极。

PXS 5型离子酸度计(成都仪器厂)。

胆红素为美国SIGMA公司产品, 纯度99%; 牛血清白蛋白为生化试剂, 其余试剂均为A.R.级试剂; 实验用水为二次石英蒸馏水。

$2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 胆红素贮备液系准确称取胆红素溶于适量NaOH溶液配制而成, 通高纯氮气10min后冰冻保存, 使用时间为三天左右。

1.2 实验方法

取2ml 1.0mol/L $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液及8ml二次蒸馏水于10ml烧杯中, 用微量进样器注射一定量胆红素标准溶液及其它实验试剂, 于-1.2~-1.7V (vs. SCE)间作阴极化扫描, 每15min记录一次胆红素的导数波高, 共测试2h。

2 结果与讨论

2.1 支持电解质的影响

试验了生理浓度下的胆红素在 $pH = 9.5$ 的 $0.2 \text{ mol/L NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 、 $0.04 \text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ 、 0.06 mol/L 乙二胺、 0.1 mol/L MgSO_4 及 0.1 mol/L LiAc 等介质中的极谱行为, 发现胆红素在 $0.2 \text{ mol/L NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液中最为稳定, 0.5 h 波高不变, 且波形简单, 只有一个较尖锐的波, 便于测定。故在 $0.2 \text{ mol/L NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液中测定胆红素较为适宜。

胆红素在这五种介质中的极谱导数波波形列于图1。

2.2 pH的影响

溶液酸度对胆红素极谱波高的影响如图2所示。在溶液 pH 值为 $8.0 - 10.5$ 时, 波高随

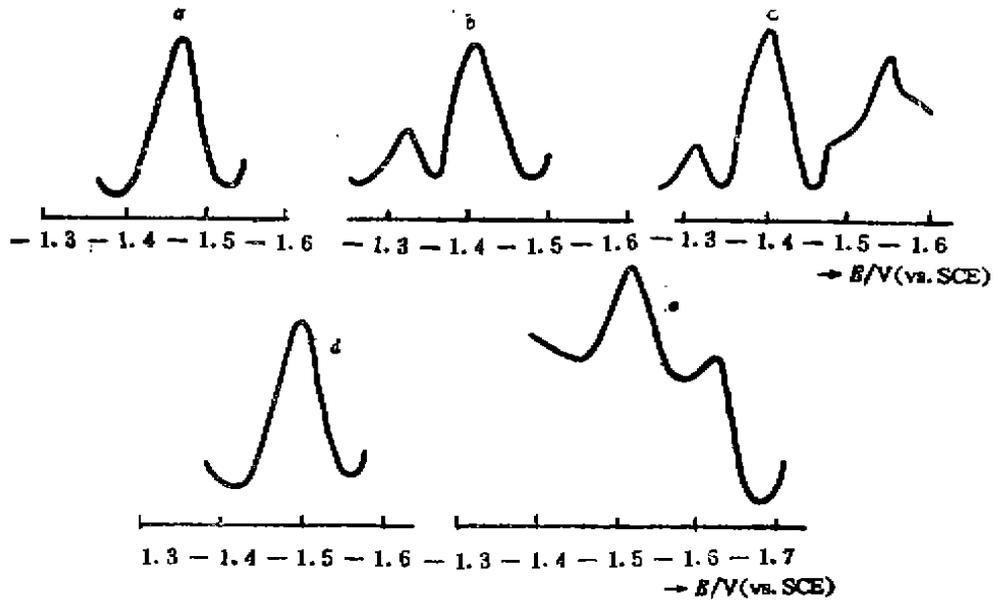


图1 胆红素的极谱导数波波形

- a. 0.2mol/L NH_3-NH_4Cl + 5×10^{-6} mol/L BR
- b. 0.04mol/L Na_2HPO_4 + 5×10^{-6} mol/L BR
- c. 0.06mol/L 乙二胺 + 5×10^{-6} mol/L BR
- d. 0.1mol/L $MgSO_4$ + 5×10^{-6} mol/L BR
- e. 0.1mol/L $LiAc$ + 5×10^{-6} mol/L BR

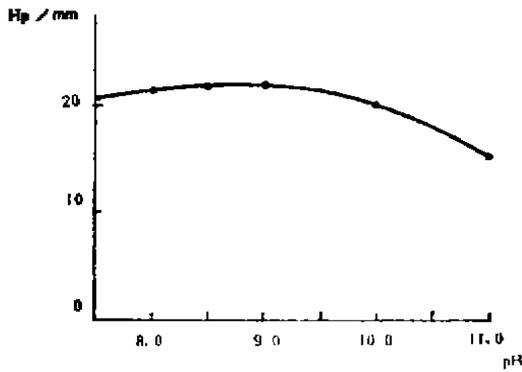


图2 溶液酸度对胆红素波高的影响
 0.2mol/L NH_3-NH_4Cl +
 1×10^{-6} mol/L BR

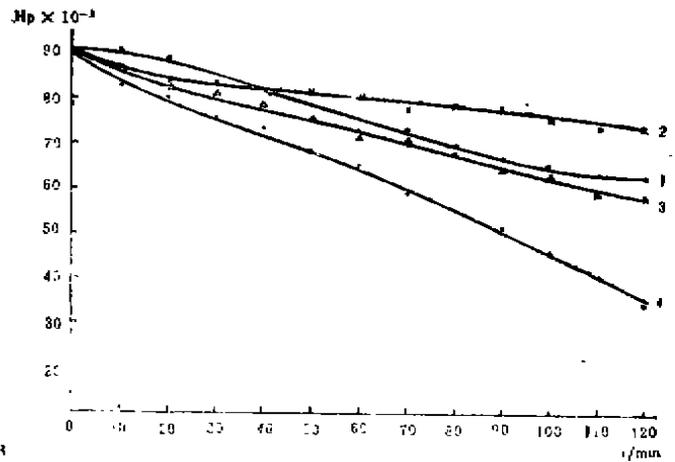


图3 不同酸度时胆红素波高随时间的变化
 (BR 1×10^{-6} mol/L在
 0.2mol/L NH_3-NH_4Cl 中)
 曲线1: pH = 8.5 曲线2: pH = 9.5
 曲线3: pH = 10.5 曲线4: pH = 11.5

pH 的变化较小,尤以在 $pH = 9.5$ 时为最高。进行 $2h$ 测定,波高随时间的关系如图3所示,以 $pH = 9.5$ 时波高随时间延长的衰减为最小。当溶液 pH 值小于 7.5 或大于 10.5 时,波高明显降低,这是因为当 $pH < 7.5$ 时胆红素的溶解度减小,而 $pH > 10.5$ 时胆红素的稳定性变差,易被氧化。因此,宜在 $pH = 9.5$ 的 $NH_3 \cdot NH_4Cl$ 缓冲溶液中测定胆红素。

2.3 溶解氧的影响及抗氧化剂的作用

试验了加入微量抗氧化剂 $EDTA$ 、 Na_2SO_3 、抗坏血酸以及溶液通氮除氧后胆红素极谱波高随时间的变化,结果如图4所示。

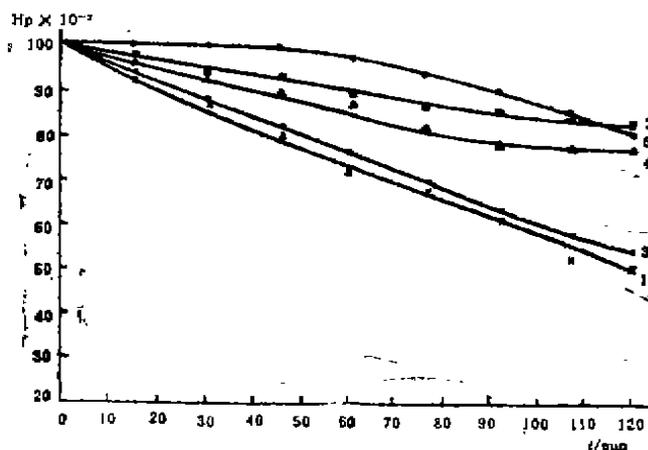


图4 抗氧化剂的稳定作用

曲线1: $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L BR} + 0.2 \text{ mol/L } NH_3 \cdot NH_4Cl (pH = 9)$;

曲线2: $1 + 4 \times 10^{-4} \text{ mol/L } EDTA$;

曲线3: $1 + 4 \times 10^{-4} \text{ mol/L } Na_2SO_3$;

曲线4: $1 + 4 \times 10^{-4} \text{ mol/L 抗坏血酸}$;

曲线5: $1 \text{ 通 } N_2 \text{ 10 min}$ 。

可以看出,通氮除氧或加入适量抗氧化剂,均能程度不同地提高胆红素在碱性水溶液中的稳定性,且胆红素的极谱波不受抗氧化剂的干扰,这样就为胆红素的测定带来了方便。其中,通氮气的作用是除去溶液中的溶解氧,以防止胆红素与溶解氧反应而被氧化为胆绿素。但若测试时间过长(超过 45 min),则空气中的氧气重新溶解于溶液,影响测定结果。 Na_2SO_3 、抗坏血酸为抗氧化剂,先于胆红素与溶液中的溶解氧反应,以达除氧的目的。 $EDTA$ 为络合剂,激光拉曼光谱表明, $EDTA$ 与胆红素以氢键的形式结合,使胆红素稳定^[7]。

2.4 光照的影响

取 $pH = 9.5$ 的 $NH_3 \cdot NH_4Cl$ 溶液四份,加入胆红素,其中两份加适量 $EDTA$,两份不加。各取一份受光照射,另一份置于加盖瓷盘内避光保存。每隔 15 min 测一次胆红素导数波高,连续测定 $2h$ 。波高随时间的变化如图4。

曲线1为未加稳定剂的胆红素溶液,不避光, $2h$ 波高降低 46% 。加入稳定剂 $EDTA$ 后, $2h$ 波高降低 19% ,稳定性有明显改善(曲线2)。若避光保存,在不加稳定剂的情况下,胆红素也较稳定,若加入 $EDTA$,则 $2h$ 波高保持不变(曲线4)。这说明光照对胆红素的稳定性影响相当大,应尽量在避光条件下进行测定。

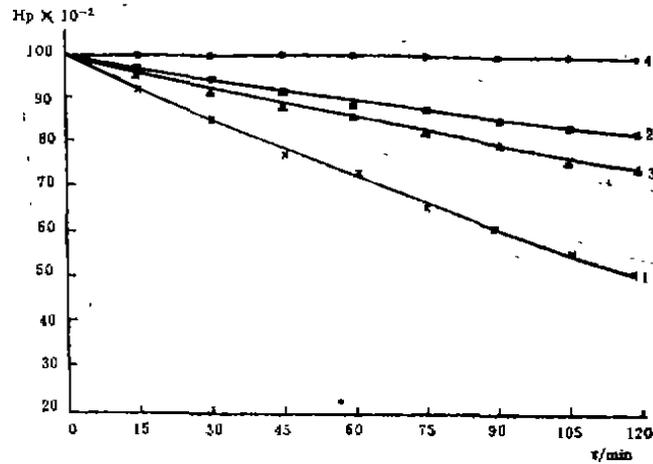


图 5 光照对胆红素波高的影响

曲线 1: $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L BR} + 0.2 \text{ mol/L NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ ($\text{pH} = 9$), 不避光;

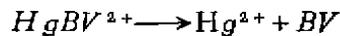
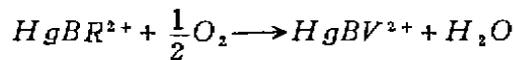
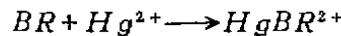
曲线 2: $1 + 4 \times 10^{-4} \text{ mol/L EDTA}$, 不避光;

曲线 3: 同 1, 避光;

曲线 4: 同 2, 避光。

2.5 共存金属离子的影响

试验了多种金属离子存在下胆红素极谱波高的变化, 发现微量 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 等离子存在, 均加速胆红素的氧化。进一步的实验验证^[6], Cu^{2+} 与胆红素的反应为一催化氧化反应, 其催化机理可能是 Cu^{2+} 先与胆红素生成平面结构的配合物, 从而改变了胆红素本来的空间结构, 增加了分子中亚甲基桥键的张力, 从而增加了胆红素的易氧化性^[9]。实验还证明 Zn^{2+} 亦与胆红素形成平面结构的配合物, 加速胆红素的氧化, 其作用机理与 Cu^{2+} 的相似。实验发现, 当 Hg^{2+} 存在时, 胆红素可被迅速氧化成浅绿色产物, 在 -0.83 V (vs. SCE) 左右产生一灵敏的极谱波。同时, 溶液的吸收光谱发生变化, 原在 450 nm 左右的吸收峰降低, 而在 380 nm 和 650 nm 处出现新的吸收峰, 与胆绿素产生的吸收峰位置相同, 因此, 可以认为生成的氧化产物为胆绿素。固定胆红素的浓度不变, 测定不同 Hg^{2+} 浓度下 -0.83 V 处波高随时间的变化, 发现波高的对数与时间成线性关系, 且对不同的 Hg^{2+} 浓度所得结果基本一致。故溶液中的化学反应对胆红素为一级, 对 Hg^{2+} 为零级^[10]。溶液中可能有下述反应:



综上所述, 支持电解质的种类和浓度、溶液的酸度、溶液中的溶解氧、光照以及微量金属离子的存在, 均对胆红素在碱性水溶液中的稳定性产生影响, 主要原因是胆红素被溶液中的溶解氧氧化。为避免由此而引起的测定误差, 一方面应尽量缩短测定时间, 另一方面可通过避光、除氧以减慢胆红素的氧化速度。本文提出的极谱法测定胆红素的佳操作条件为: $0.2 \text{ mol/L NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ ($\text{pH} = 9.5$) 为底液, 测定前通氮除氧 6 min 或加入 $4 \times 10^{-4} \text{ mol/L EDTA}$, 避光, 测定在 0.5 h 内完成。

参 考 文 献

- 1 齐治家主编.生物化学.上海科学技术出版社, 324-330(1985)
- 2 T.R. Koch and O.O. Akingbe. *Clin. Chem.*, 27, 1925(1981)
- 3 J. Saar and C. Yarnitzky, *Isr.J. Chem.*, 23, 249(1983)
- 4 J. Wang, D.B. Luo and P.A. Farias. *J. Electronal Chem.*, 185, 61(1985)
- 5 J. Rlang and M. Ozosoz. *Electronal.*, 2, 647(1990)
- 6 分析化学译刊, 1989年11-12期, 130页
- 7 鲁旋丹. 胆红素的电化学行为研究. 武汉大学硕士研究生毕业论文, 1992
- 8 王聚礼. 胆红素的单扫描示波极谱滴定及 Cu^{2+} 和胆红素的化学反应动力学. 高等学校化学学报, 1992, 13卷(7), 906—909
- 9 宋廷耀编. 配位化学, 成都科技大学出版社, 11-14(1990)
- 10 天津大学物理化学教研室编. 物理化学. 高等教育出版社, 218-234(1983)

(编辑: 姚国安)

A POLAROGRAPHIC STUDY ON THE STABILITY OF BILIRUBIN IN BASIC AQUEOUS SOLUTION

Wang Yan

(Dept. of Natural Science)

ABSTRACT Bilirubin is one of bile pigments existing within man's body, and is the metabolic products of the cells. It plays an important role in physiology of man's body. To examing the content of bilirubin in the blood of a body is of great significance in clinical practice and is an important basis to diagnose a liver disease. Bilirubin has higher sensitivities to heat and light. It will be oxygenated and lessened when it is heated or lighted. To define the best operation conditions that the content of bilirubin is determined with polarography, this paper studies the stability of bilirubin in basic aqueous solution, and takes experiments in the influences of battery electrolyte, pH, dissolved oxygen in solution, light and present of metallic ions. This paper puts forward the best operation conditions as 0.2 mol/L $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ buffer solution, $\text{pH}\approx 9.5$, solution is over flowed by introgen for 6 min or added by 4×10^{-4} mol/L EDTA (ethylenedimine tetra acetic acid), avoiding light, and the determination is completed in 0.5 h.

KEY WODRS bilirubin, stability of bilirubin, polarographic waves of bilirubin, bile pigments