

固相萃取法检测病毒灭活 血浆中的亚甲蓝

白莉, 刘蕾, 赵君

河南省红十字血液中心 郑州市 450012

关键词 亚甲蓝; 血浆; 分光光度法; 固相萃取小柱

中图分类号: R446 文献标识码: B 文章编号: 1672-3422(2010)05-0108-02

亚甲蓝光化学法(MB-I)灭活血浆中的病毒,已在我国推广应用^[1]。国外研究表明血浆病毒滴度降低程度与所用的可见光强度和亚甲蓝浓度有直接关系^[2],但亚甲蓝存在致突变的可能,若残留量过多,血浆的外观和色泽改变明显,容易不被患者接受,因此,对血浆中亚甲蓝浓度的控制有重要的意义。我们采用固相萃取小柱 PLB对血浆样品中残留的亚甲蓝进行萃取分离^[3],结合分光光度法进行测定,本法简便、准确、灵敏度高,能够用于血浆样品的分析。

1 材料与方法

1.1 样本来源 8人份混合血浆约 1000ml用 MB-I法制备的病毒灭活血浆过滤前和过滤后的样本各 10份。以上血浆均来自本站无偿献血者的血液。

1.2 试剂与仪器 亚甲蓝($C_{16}H_{18}CN_5S^+ \cdot 3H_2O$ 生化试剂,天津市北方化玻购销中心分装),甲醇(分析纯,天津市北方天医化学试剂厂),冰醋酸(分析纯,广州医药站化学试剂综合公司),固相萃取柱(规格: PLB 60mg/3ml,郑州英诺色谱公司进口分装),可见一紫外分光光度计(UV-2401 IC,日本岛津公司产)。

1.3 方法

1.3.1 亚甲蓝标准溶液的配制 精密称取亚甲蓝 0.0374g($100\mu mol$),置于 1000ml的容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配成 $100\mu mol/L$ 的储备液。储备液应避光,密封保存。分别取储备液 0.1ml,0.25ml,0.5ml,1ml,2ml置于 100ml的容量瓶中,用混合血浆稀释至刻度,制成含亚甲蓝 $0.1\mu mol/L$, $0.25\mu mol/L$, $0.5\mu mol/L$, $1\mu mol/L$, $2\mu mol/L$ 的血浆溶液,作为标准溶液。

1.3.2 血浆中亚甲蓝的固相提取 ①柱预处理:将固相萃取小柱插入适宜的试管中,加入 3ml甲醇活化小柱,待甲醇完全吸入小柱后,用蒸馏水 3ml冲洗甲醇。②上样:加入 2ml含亚甲蓝的血浆样品于小柱上,空白对照为 2ml的混合血浆。在该步骤,分析物被保留在吸附剂上。③清洗:待血浆完全吸入小柱后,用清洗剂 3ml清洗小柱。先后采用 30%、50%、70%、90%的甲醇水溶液 3ml清洗小柱,并收集清洗液检测,最后选取 70%的甲醇水溶液 3ml。④洗脱 换上干净的试管,精密量取 4ml洗脱剂洗脱小柱上的亚甲蓝,将洗脱液完全收集到试管中,震荡混匀。本实验选取 1%的冰醋酸甲醇溶液作为洗脱剂,并根据下一步检测需要的液体量,取洗脱剂 4ml。

后要提高警惕,应想到宫外孕的可能,应感到这一点不致过多的延误加重病情。

参考文献

- [1] Kadar N, Hamesley HD, et al. Positive peritoneal cytology is an adverse factor in endometrial carcinoma only if there is other evidence of extrauterine disease [J]. Gynecol Oncol, 1992, 46: 145.
- [2] Gmshaw RN, Tupper WC, et al. Prognostic Value of peritoneal cytology in endometrial carcinoma. J. Oncol-

ogy, 1990, 36: 37.

- [3] Treloard JD, Kinney W. Positive peritoneal cytology in stage I carcinoma of the cervix [M]. Acta Cytol, 1995: 177.
- [4] 乐杰. 妇产科学 [M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 104-105.
- [5] 王淑贞. 实用妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 202.
- [6] 黄薇, 王世闻. 子宫内膜异位症与盆腔疼痛 [J]. 实用妇产科杂志, 1998, 14: 216.

1.3.3 亚甲蓝含量测定 ①分光光度法测定亚甲蓝波长的选择:用洗脱液(1%的冰醋酸甲醇溶液)配制一定浓度的亚甲蓝溶液,利用分光光度计在400 nm~800 nm处扫描,扫描参数的设定:Measuring Mode Abs Scan Speed Fast Slit Width 1.0 Sampling Interval 0.5 ②以洗脱剂为测定的参比溶液,将1.3.2的样品处理后的洗脱液于653 nm处测定,绘制标准曲线并计算样品中亚甲蓝的浓度。

1.3.4 回收率及稳定性实验 将配制含亚甲蓝0.4 μmol/L, 1 μmol/L, 1.5 μmol/L的血浆溶液,按

1.3.2和1.3.3的方法进行测定5次,计算回收率。

2 结果

在波长400 nm~800 nm处扫描亚甲蓝1%的冰醋酸甲醇溶液,491 nm和653 nm处有两个吸收峰,见图1。本试验选取653 nm为检测波长。

亚甲蓝标准溶液经1.3.2处理和1.3.3检测后,所得标准曲线的方程为 $y=38.815x-0.0326$ $r=0.996$

血浆中亚甲蓝回收及稳定性实验结果,见表1。

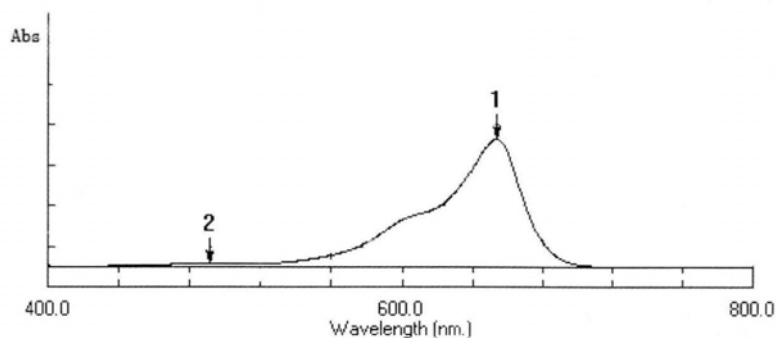


图1 亚甲蓝溶液在400 nm~800 nm的吸收曲线

表1 血浆中亚甲蓝的回收率实验结果(n=5)

血浆亚甲蓝含量 (μmol/L)	亚甲蓝测定值 (μmol/L)	CV	回收率
0.4	0.41 ± 0.03	7.31%	102%
1.0	1.06 ± 0.09	8.49%	106%
1.5	1.39 ± 0.12	8.63%	92.7%

3 讨论

亚甲蓝是一种吩噻嗪类酸性染料,中国药典2005年版二部是采用分光光度法直接测定其含量。但对于血浆中微量的亚甲蓝若直接采用分光光度法检测,由于在此波长处血浆蛋白的吸收度远大于残存的微量亚甲蓝的吸收度,因此不能直接采用分光光度法检测血浆中残存的微量亚甲蓝。我们采用固相萃取法提取血浆中残存的微量亚甲蓝,以达到分析目的。固相萃取是一种试样预处理技术,是利用固体吸附剂将样品中的目标化合物吸附,将样品的基体和干扰化合物分离,然后再用洗脱液洗脱或加

热解吸附,达到分离和富集目标化合物的目的。在选择固相萃取柱时要根据试样的性质(亚甲蓝是一种极性化合物,在水或甲醇中易溶),结合柱子的技术参数,据此选择强极性的固相萃取小柱PLB亚甲蓝被吸附于小柱顶部,用酸性较强冰醋酸甲醇溶液可快速洗脱。在采用分光光度法检测亚甲蓝时,波长的选择不同于药典2005版二部在661 nm处测定,亚甲蓝1%的冰醋酸甲醇溶液最大吸收波长是653 nm,因此选择653 nm为本实验的测试波长。

参考文献

- [1] 谭丽芳,肖建美,肖拥军. 病毒灭活血浆质量及应用调查[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(19): 4421
- [2] WAGNER SJ Virus inactivation in blood components by Phorbactive Phenothiazine dyes[J]. Transfus Med Rev, 2002, 16(1): 61-66
- [3] 素真,张博,岳秀英. 高效液相色谱法测定血清中光敏剂亚甲蓝的含量[J]. 分析科学学报, 2006, 22(1): 119-120