

# 分光光度法测定血浆中黑色素含量的方法学研究

张朋俊<sup>1</sup>, 杨润琳<sup>2</sup>, 杨敏<sup>1,2,3</sup>, 柏志成<sup>3</sup>, 李晓天<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>郑州大学药学院, 郑州 450000; <sup>2</sup>江苏省原子医学研究所分子影像中心, 无锡 214063;

<sup>3</sup>南京医科大学, 南京 210000

**摘要:** 黑色素纳米材料(MNP)易与金属离子螯合, 本文建立了分光光度法测定铁过载模型鼠血浆中 MNP 含量的方法, 为 MNP 治疗铁过载提供基础。MNP 标准溶液在 200 ~ 800 nm 波长范围内扫描呈全波谱吸收, 选定 490 nm 波长为检测波长, 且在 5 ~ 100 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。不同浓度的 Fe<sup>3+</sup> 对 MNP 吸收无影响。该方法快速、操作简便且重现性好, 可有效用于血浆中 MNP 的含量测定。

**关键词:** 黑色素; 血浆; 分光光度法; 铁

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.010

## Determination of Melanin in Plasma by UV-VIS Spectrophotometry

ZHANG Peng-jun<sup>1</sup>, YANG Run-lin<sup>2</sup>, YANG Min<sup>1,2,3</sup>, BAI Zhi-cheng<sup>3</sup>, LI Xiao-tian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China;

<sup>2</sup>Molecular Imaging Centre, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China;

<sup>3</sup>Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China

**Abstract:** Melanin is easy to chelate metal ions. In this study, an UV-Vis spectrophotometry method as firstly established for the determination of melanin nanomaterials (MNP) content in plasma of iron overload mouse model, thus provided the basis of MNP for the treatment of iron overload. The standard solution of MNP showed a full spectrum absorption in the wavelength range of 200-800 nm. It had no interference peak at the selected wavelength 490 nm. The good linearity was achieved within the concentration of 5-100 g/mL. Different concentrations of Fe<sup>3+</sup> had no effect on the absorption of MNP. The developed method was rapid, simple and reproducible. It can be effectively used for the determination of MNP in plasma samples.

**Key words:** melanin; plasma; UV-Vis spectrophotometry; iron

由于长期反复输血、地中海贫血、骨髓造血活跃、富含铁食物摄入过多等因素造成人体内铁过载, 又称血色病, 可引起组织器官的功能异常甚至危及生命。临床常用铁螯合剂或去铁剂去除铁积聚, 使体内过量的铁从尿液或粪便排泄。现已有 100 多种铁螯合剂, 其中临床上最常用的治疗药物是去铁胺(DFO), DFO 与 Fe<sup>3+</sup> 螯合比为 1:1, 给药方式为皮下或静脉注射, 但 DFO 体内半衰期短, 需频繁给药才能达到治疗效果, 且副作用多, 易导致生长迟缓、内分泌功能障碍和周围神经病变等。新近上市的口服型去铁药物如去铁酮、去铁斯若等, 由于存在胃肠及

肝肾损害及粒细胞缺乏症等副作用, 其安全性备受争议<sup>[1-3]</sup>。黑色素(melanin)是一种天然的色素, 不仅广泛地存在于人和高等动物的皮肤、毛发和眼球组织中, 而且在一些植物和昆虫的皮中也可以大量存在, 目前研究较多的有鱿鱼墨黑色素和泰和乌鸡黑色素等, 其生物相容性好, 无毒安全<sup>[4,6]</sup>。鱿鱼墨黑色素具有很强的阳离子螯合特性, 它主要通过如羧基和去质子化羟基等阴离子起作用, 黑色素与金属离子的结合能够起到保护细胞的功能<sup>[7]</sup>; Liu Y 等<sup>[8]</sup>还对乌贼墨黑色素与金属离子的结合进行了一系列的研究, 结果发现 Fe<sup>3+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 结合在不同的位点, 且研究显示乌贼墨黑色素对 Fe<sup>3+</sup> 的吸附能力约为 6.7% ~ 8%<sup>[9,10]</sup>。陈士国等<sup>[11]</sup>研究了鱿鱼墨黑色素与 Fe<sup>3+</sup> 的相互作用行为, 黑色素在 pH4.0 下络合 Fe<sup>3+</sup> 最大吸附量为 1.33 mmol/g, 其中酚羟基、吡啶二羟基单元和羧基都参与了 Fe<sup>3+</sup> 的

收稿日期: 2015-12-14 接受日期: 2016-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(51473071, 81472749, 81401450); 十二五重大新药专项(2012ZX09505-001-001); 江苏省科技厅资助项目(BE2014609); 江苏省卫生厅资助项目(Q201406)

\* 通讯作者 Tel: 86-371-67781889; E-mail: lixt@zzu.edu.cn

络合。天然黑色素不溶于水和大多数溶剂,且易与蛋白质和多糖结合,较难提取与分离,国内外应用最为广泛的是化学降解法或酶解法等提取组织中的黑色素。近来研究发现黑色素经聚乙二醇化制备的纳米材料(MNP)水溶性良好,粒径小( $<10\text{ nm}$ ),易与 $\text{Fe}^{3+}$ 螯合,螯合比高达 $1:90$ <sup>[12]</sup>,按黑色素分子量 $40\text{ kDa}$ 计算,每 $1\text{ g}$ 黑色素可以结合约 $126\text{ mg Fe}^{3+}$ 。我们首次尝试尾静脉注射MNP于铁过载小鼠模型,治疗有效,与临床常用药物DFO相比,可减少给药次数与给药剂量且无毒副作用(另文发表),因此迫切需要建立MNP的含量测定方法,这对于进一步制定安全有效的治疗方案至关重要。

黑色素是一种生物大分子多聚体,基本结构是共价交联的吡啶环,因其高度的共轭效应而产生广谱光吸收特性,在紫外光和可见光区均有吸收<sup>[13]</sup>,总黑色素含量的测定多采用分光光度法,或采用HPLC法对其降解产物进行测定<sup>[6,14,15]</sup>。关于血浆中黑色素含量的测定未见报道。本文拟采用紫外分光光度法对小鼠血浆中黑色素含量进行检测,旨在建立一种操作简单、准确度高、重现性好的含量测定分析方法。

## 1 仪器与试剂

Lambda 25 型紫外分光光度计(美国PerkinElmer); Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(美国Millipore); 5415R 型低温超速离心机(德国Eppendorf)。

黑色素(Sigma-Aldrich, M8631), MNP 参照文献<sup>[12]</sup>制备; ICR 小白鼠, 江苏常州卡文斯实验动物有限公司, 实验动物使用许可证 SCXK(苏)2014-0023; 右旋糖酐铁(Sigma-Aldrich, D8517);  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、HCl 均为分析纯(国药集团试剂有限公司), 水为超纯水。

## 2 实验方法

### 2.1 给药方法与血样的采集

取 ICR 小白鼠, 参照 Imran<sup>[1]</sup>的方法尾静脉注射右旋糖酐铁溶液( $150\text{ mg/kg}$ ) $200\text{ }\mu\text{L}/20\text{ g}$  建立铁过载模型, 一周后造模成功。

一次性尾静脉注射 MNP 溶液( $100\text{ mg/kg}$ ) $200\text{ }\mu\text{L}/20\text{ g}$ , 三周后眼眶取血于枸橼酸钠抗凝管中, 以 $3000\text{ rpm}$  离心 $10\text{ min}$  得血浆, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$  中保存待测。

### 2.2 血浆样品处理与测定

取小鼠血浆样品 $20\text{ }\mu\text{L}$ 于EP管中,以超纯水稀释至 $400\text{ }\mu\text{L}$ ,涡旋 $2\text{ min}$ 于最佳波长处测定吸光度值。

### 2.3 标准溶液的配制与测定

取浓度为 $10\text{ mg/mL}$ 的MNP标准储备液,分别用超纯水稀释,配成浓度分别为 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,在 $200\sim 800\text{ nm}$ 全波长扫描,测得各个波长的吸光度。

另取正常小鼠空白血浆 $20\text{ }\mu\text{L}$ 7份,分别准确加入系列MNP标准溶液,震荡混匀,以超纯水稀释至 $400\text{ }\mu\text{L}$ 制备成浓度分别为 $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的MNP血浆标准溶液,在 $200\sim 800\text{ nm}$ 全波长扫描,测得各个波长的吸光度,确定最佳吸收波长。

### 2.4 MNP-Fe 混合溶液的配制与测定

精密称定一定量的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 以 $1\%$ 的HCl溶解,配成浓度分别为 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的系列 $\text{FeCl}_3$ 标准溶液,在最佳波长处测定其吸光度。

取空白血浆中加入一定量的MNP和 $\text{FeCl}_3$ 溶液分别配置以下不同浓度的各组混合溶液,在最佳波长处测定其吸光度以考察 $\text{Fe}^{3+}$ 对测定结果的干扰。A组:混合溶液中MNP浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ , $\text{Fe}^{3+}$ 分别为 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ; B组:混合溶液中 $\text{Fe}^{3+}$ 浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,MNP分别为 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ; C组:混合溶液中 $\text{Fe}^{3+}/\text{MNP}$ 的浓度分别为 $5/5$ 、 $10/10$ 、 $20/20$ 、 $30/30$ 、 $50/50$ 、 $100/100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 最佳吸收波长的选择及标准曲线

对“2.3”项下各个系列溶液在 $200\sim 800\text{ nm}$ 波长范围内扫描,可见MNP溶液呈全波长吸收,且随着浓度的增高其吸光度在各个波长也随之升高,如图1中所示a~f分别为浓度 $5\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL}$  MNP的光谱图。图2中所示a为MNP水溶液( $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ )的光谱扫描图,b为MNP血浆溶液( $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ )的光谱扫描图,b与a相比可见血浆在 $200\sim 450\text{ nm}$ 有较多蛋白干扰峰,在 $450\sim 800\text{ nm}$ 几乎无影响。故选定 $490\text{ nm}$ 波长,以吸光度(A)为纵坐标,以MNP浓度(C)为横坐标进行线性回归,MNP水溶液标准曲线为 $A_1 = 0.0091C_1 - 0.0081$ , $R^2 = 0.9997$ ; MNP血浆溶液以空白血浆校正后标准曲线为 $A_2 = 0.0085C_2 - 0.0076$ , $R^2 = 0.9995$ ,在 $5\sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓

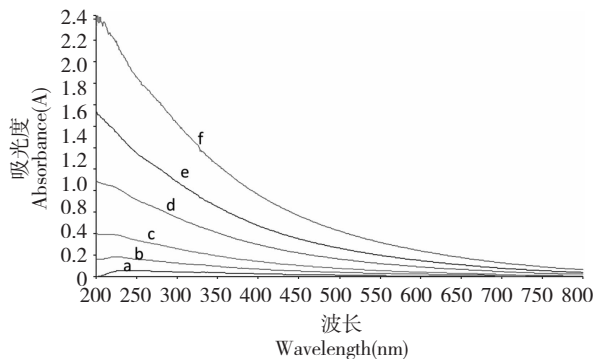


图1 不同浓度的MNP水溶液的UV-VIS光谱图

Fig. 1 UV-Vis spectrum of different concentrations of MNP solution

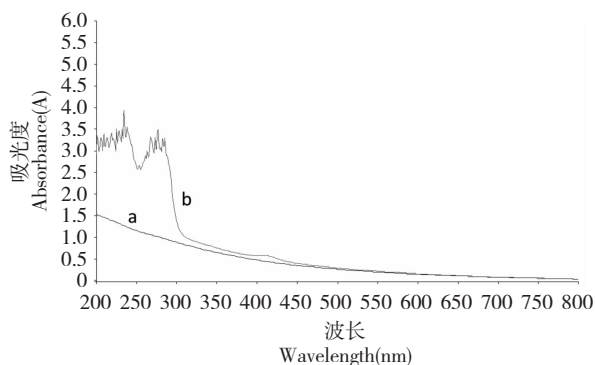


图2 MNP水溶液(a, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和MNP血浆溶液(b, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的光谱图

Fig. 2 UV-Vis spectrum of MNP water solution (a) and plasma solution (b) (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

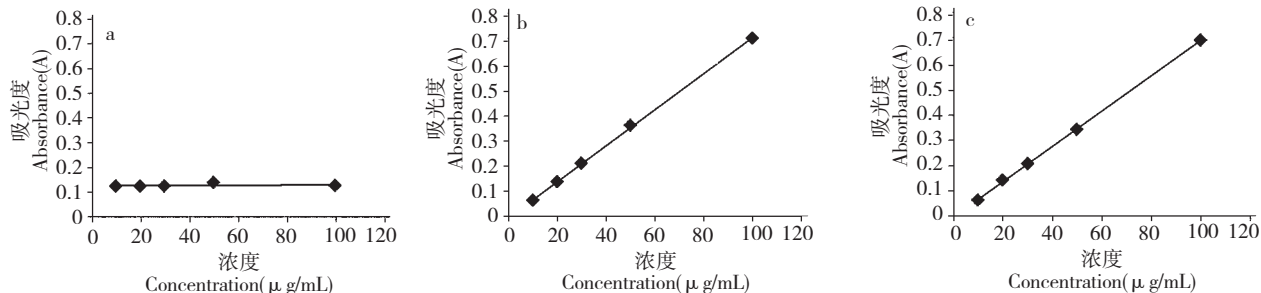


图3 不同浓度的 $\text{Fe}^{3+}$ 对MNP吸收值(a)、一定浓度的 $\text{Fe}^{3+}$ 对不同浓度MNP吸收值(b)及同步变化 $\text{Fe}^{3+}$ 和MNP的浓度对MNP吸收值的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of  $\text{Fe}^{3+}$  on MNP absorption (a), a certain concentration of  $\text{Fe}^{3+}$  on different concentrations of MNP absorption (b) and synchronous changes of the concentration of  $\text{Fe}^{3+}$  and MNP on MNP absorption (c)

### 3.3 精密度试验

同一血浆样品按“2.2”的方法处理后,重复测定6次,其含量测定结果RSD为0.85%,精密度良好。

度范围内均有良好的线性关系,且分析可知MNP的水溶液与血浆溶液之间呈显著相关性,相关系数为0.9326( $A_2 = 0.9326 A_1$ ),即血浆中MNP萃取率可达到93.26%。

### 3.2 样品中 $\text{Fe}^{3+}$ 的干扰及MNP含量的计算

对“2.4”项下各个溶液测定可知,在490 nm波长处,A组MNP-Fe混合溶液中MNP溶液的浓度一定(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), $\text{Fe}^{3+}$ 在5~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内对混合溶液的吸收没有影响(图3a);B组MNP-Fe混合溶液中 $\text{Fe}^{3+}$ 浓度为20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,MNP的浓度在5~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内变化,而C组MNP-Fe混合溶液中 $\text{Fe}^{3+}$ 和MNP的浓度在5~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内同步变化,结果显示B组和C组的吸收值在5~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内均具有良好的线性关系(图3b, 3c)。然而分析A、B和C三组数据可知,加入 $\text{Fe}^{3+}$ 后MNP的吸收值均降低,且与相应浓度的MNP血浆标准溶液的吸收度之间均呈显著相关性,相关系数为0.8382。由每1 g MNP可以结合约126 mg的 $\text{Fe}^{3+}$ 可知上述各组溶液中MNP均已转化成MNP-Fe络合物,且过量的 $\text{Fe}^{3+}$ 对其吸收没有影响(图3a)。另外由图4可知MNP-Fe络合物与同浓度MNP的可见吸收光谱相似,因此样品按2.3的方法处理后在490 nm测得其吸收度 $A_{\text{测}}$ ,可得MNP的实际吸收度 $A_{\text{实}} = 0.8382 A_{\text{测}}$ ,通过血浆标准曲线可计算出样品中MNP的含量。

### 3.4 重复性试验

取6份相同的血浆样品按“2.2”的方法处理后,分别测定其含量,测定结果RSD为1.08%,有良好的重复性。

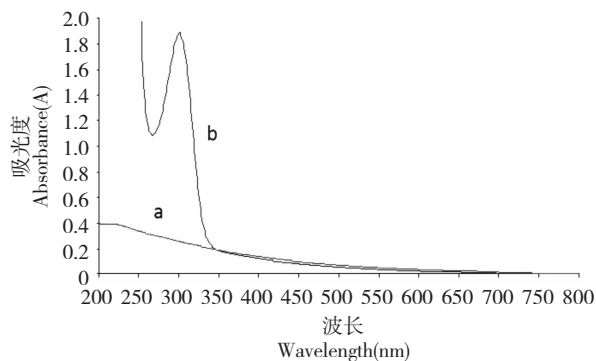


图4 MNP 溶液(a, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和 MNP/Fe 混合溶液(b, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的光谱图

Fig. 4 UV-Vis spectrum of MNP solution (a, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and mixed solution of MNP/Fe (b, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

### 3.5 稳定性试验

同一血浆样品按“2.2”的方法处理后分别于0、2、4、8 h 检测,测定结果 RSD 为 1.32%,稳定性良好。

### 3.6 加样回收率试验

取空白血浆分别加入一定量的 MNP 标准溶液,配制高、中、低 3 个浓度(5、30、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的血浆样品,按“2.2”的方法处理后,考察该方法的回收率,每样本测试 3 次,其平均回收率为 95.93%,RSD 为 1.69%。

### 3.7 样品中 MNP 含量测定

取 6 份不同的待测血浆样品 20  $\mu\text{L}$ ,分别按“2.2”的方法处理后测定,按“3.2”的方法计算后乘以稀释倍数(20 倍),结果样品中 MNP 的平均含量为 198.145  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 4 讨论与结论

### 4.1 关于萃取方法的选择

从血浆中萃取药物的方法很多,但因检测方法不同,其萃取方法也相应不同。我们尝试了用传统的方法即通过沉淀蛋白进行液液萃取,由于黑色素易与血浆蛋白结合,其萃取率不足 10%;通过在沉淀蛋白前加入  $\text{NaHCO}_3$ ,使与蛋白结合的药物释放,然后再通过乙腈-二氯甲烷(1:4)来萃取,其萃取率也只能达到 50% 左右。由于 MNP 易溶于水,因此我们直接以水稀释血浆,其萃取率可达到 93% 左右,且 MNP 在 200 ~ 800 nm 波长范围内扫描呈全波谱吸收,因此可选择合适波长来排除血浆干扰峰的影响。

### 4.2 $\text{Fe}^{3+}$ 干扰的消除

由于 MNP 易与  $\text{Fe}^{3+}$  螯合,血浆中可能存在

MNP-Fe 络合物,因此有必要考察血浆中  $\text{Fe}^{3+}$  对 MNP 吸收的影响。结果分析可知 MNP-Fe 混合溶液中 MNP 均已转化成 MNP-Fe 络合物,具有与同浓度 MNP 的相似的可见吸收光谱,吸收值降低却呈显著相关性,相关系数为 0.8382。因此可通过测定 MNP-Fe 混合溶液的吸收值间接得出 MNP 的吸收值从而计算出样品中 MNP 的浓度。

综上所述,本文建立了一种简便快捷的紫外分光光度法测定小鼠血浆中 MNP 含量的方法。经精密度、重现性、稳定性与加样回收率等试验,均证明了实验方案的可行性。该方法简单易操作,准确可靠,重现性好,可有效用于测定血药浓度并进一步用于测定小鼠组织中 MNP 的分布以确证疗效。

### 参考文献

- 1 Imran ul-haq M, Hamilton JL, Lai BF, *et al.* Design of long circulating nontoxic dendritic polymers for the removal of iron *in vivo*. *ACS nano*, 2013, 7:10704-10716.
- 2 Aslam N, Mettu P, Marsano-Obando LS, *et al.* Deferasirox induced liver injury in haemochromatosis. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2010, 20:551-553.
- 3 Neufeld EJ. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood*, 2006, 107:3436-3441.
- 4 Dong CY(董翠月), Wang SL(王书丽). Study on the natural melanin resources, seedcoat of black brassicanapus. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 2010, 26(3):90-93.
- 5 Tu YG(涂勇刚), Xie MY(谢明勇), Tian YG(田颖刚), *et al.* Spectroscopic properties and stability of melanin extracted from taihe black-bone silky fowl. *Food Sci Technol*(食品科技), 2008, 33:171-175.
- 6 Wang XY(王鑫玉), Sun SR(孙守荣), Zhou YH(周艳华), *et al.* Research progress and applications on measurement of melanin. *China Animal Husband Veterin Med*(中国畜牧兽医), 2008, 35(5):31-35.
- 7 Woo C, Naraoka T, Uchisawa H, *et al.* Peptide moiety of Illexin peptidoglycan from squid Ink. *Proceedings of the 11th World Congress of Food Science*, 2001.
- 8 Liu Y, Simon JD. Metal-ion interactions and the structural organization of Sepia eumelanin. *Pigm Cell Res*, 2005, 18(1):42-48.
- 9 Hong L, Liu Y, Simon JD. Binding of metal ions to melanin and their effects on the aerobic reactivity. *Photochem Photobiol*, 2004, 80:477-481.