

硝化络合分光光度法测定血红素中铁离子的含量

何丹鸿 袁 曦 林功舟 付小云¹ 陈恩瑜¹ (福建 350005 福建医科大学附属第一医院药剂科;¹ 福建医科大学 98 届药学专科班毕业生)

摘要 本文探讨用分光光度法测定血红素及其制剂中铁离子的含量。通过对血红素进行硝化的前处理,将其中铁离子游离出,并与适量的邻菲罗啉在 pH 为 4.6 的缓冲液中定量生成橙红色络合物,用分光光度法在 $510 \pm 1\text{nm}$ 处测定其含量。结果显示,铁离子与邻菲罗啉生成的橙红色络合物在 $510 \pm 1\text{nm}$ 波长处有最大吸收,且在 $0.4 \sim 2.8\mu\text{g/ml}$ 范围内浓度与吸收度符合 Beer 定律,相关系数 $r = 0.9998$,方法平均回收率 $\bar{X} = 99.07\%$, $RSD = 0.53\%$ 。本法结果准确,方法可行,适用于医院、药厂生产的各种血红素制剂的质量分析与检验,并可为医生用药提供依据。

关键词 分光光度法;血红素;铁离子;含量测定

Determination of Iron - ion Hematin by spectrophotometry

He Danhong(He DH), Yuan Xi(Yuan X), Lin Gongzhou(Lin GZ), et al (First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005)

ABSTRACT Iron - ion in Hematin was determination by spectrophotometry at wavelengths of $510 \pm 1\text{nm}$. The result showed a good linear relationship in the concentration range of $0.4 \sim 2.8\mu\text{g/ml}$ ($r = 0.9998$). The average recovery rate was 99.07% , the coefficient of variation was 0.53% ($n = 5$). The method is feasible, the result is accurate. It is suitable for analysis of hospital preparation and pharmaceutical factory.

KEY WORDS spectrophotometry, hematin, Iron - ion, determination

当前缺铁性贫血最有效的治疗方法是补充铁剂,临床常用的铁剂可分为血红素铁类和非血红素铁类两种,而前者作为铁强化剂和抗贫血药已逐渐受到人们的重视。并有不同的剂型出现,但其中的铁离子含量测定方法未见报道。本文就其铁离子的含量测定方法做了探讨,结果准确可靠,现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 UV-260 型分光光度计(日本);751-GW 型分光光度计(上海分析仪器厂);pHs-25 型酸度计(上海分析仪器厂无锡分厂)。

1.2 试剂

血红素标准品(美国 Sigma 化学公司,批号:H-3505);血红素供试品(本院制剂室提供);硫酸高铁铵(上海试剂四厂 AR,批号:970412);血红素胶囊(福州屏山药厂提供);血红素口服液(福州屏山药厂提供);浓硝酸(AR);10%盐酸羟胺;0.1%邻菲罗啉;醋酸盐缓冲液(pH=4.6)。

2 方法与结果

2.1 铁标准贮备液的制备($100\mu\text{g/ml}$)

精密称取硫酸高铁铵 $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ 0.4317g 置 200ml 烧杯中,加三蒸水 150ml 溶解,加浓硫酸 2.5ml ,摇匀,移入 500ml 量瓶中,再用三蒸水稀释至刻度,摇匀,备用。

2.2 铁标准供试液的制备($10\mu\text{g/ml}$)

精密量取铁标准贮备液 1.0ml ,置 10ml 量瓶中,加三蒸水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 测定波长的选择

精密量取 8.0ml 标准供试液,置 50ml 量瓶中,精密加入 10% 盐酸羟胺 1.0ml 、醋酸盐缓冲液 5.0ml 、 0.1% 邻菲罗啉 3.0ml ,加三蒸水至刻度,摇匀,以不加铁标准供试液为空白,按规定^[1]用分光光度计在 $400 \sim 600\text{nm}$ 波长处扫描,结果表明,本品在 $510 \pm 1\text{nm}$ 波长处有最大吸收。

2.4 稳定性试验

2.4.1 放置时间对供试液的影响:取上述铁标准供试

液分别于 0,0.5,1,3,6 和 12h 测定吸光度,结果表明,吸光度不变,提示本品至少在 12h 内稳定。

2.4.2 温度对供试液的影响:取上述铁标准供试液分别于室温在 20~32℃之间测定吸光度,吸光度不变,提示本品对温度稳定。

2.5 工作曲线的制备

精密量取 0.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 和 14.0ml 铁标准供试液,置 50ml 量瓶中,各分别精密加入 10%盐酸羟胺 1.0ml、醋酸盐缓冲液 5.0ml、0.1%邻菲罗啉 3.0ml,加三蒸水至刻度,摇匀,以不加铁标准供试液为空白,在 510±1nm 波长处测定其吸光度(A),用最小二乘法进行线性回归,得回归方程: $A = 0.2049c + 0.00386$, $r = 0.9998$ 。结果表明,本品在 0.4~2.8μg/ml 范围内浓度与吸光度符合 Beer 定律。

2.6 回收率试验

精密称取硫酸高铁胶约 0.43g 五份,按“铁标准贮备液制备”和“铁标准供试液的制备”项下操作,精密量取 10.0ml 铁标准供试液置 100ml 量瓶中,加三蒸水至刻度,摇匀,各精密量取 10.0ml,置 50ml 量瓶中,再分别精密加入 10%盐酸羟胺 1.0ml、醋酸盐缓冲液 5.0ml、0.1%邻菲罗啉 3.0ml,加三蒸水至刻度,摇匀,以不加铁标准供试液为空白在 510±1nm 波长处测定其吸光度(A),并代入回归方程计算,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

编号	投入量 (g)	测得量 (g)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1	0.4302	0.4296	99.86	99.07	0.53
2	0.4418	0.4379	99.12		
3	0.4435	0.4385	98.87		
4	0.4259	0.4191	98.40		
5	0.4270	0.4231	99.09		

2.7 精密度试验

精密称取经 105℃干燥至恒重的血色素标准品约 45mg 五份,分别加入 5ml 浓硝酸硝化至溶液澄明,加少量浓盐酸,用 12mol/L 氢氧化钠液调节 pH 值至 1.5,移入 50ml 量瓶中,加三蒸水至刻度,摇匀,精密量取 1.0ml 至 50ml 量瓶中,加三蒸水至刻度,摇匀,以不加血色素标准品为空白,在 510±1nm 波长处测定吸光度,结果 $\bar{X} = 94.7\%$, $RSD = 0.83\%$ 。

2.8 现性试验

精密量取同一批号血色素口服液 60ml 三份,分别置三个烧杯中,以下按“血色素口服液中铁离子的测定”项下“加少量浓盐酸调节 pH 至 3.0……”步骤后操作,结果 $\bar{X} = 93.9\%$, $RSD = 1.31\%$ 。

2.9 含量测定

2.9.1 血色素样品中铁离子的测定:精密称取经 105℃干燥至恒重的样品约 50mg,加 5ml 浓硝酸硝化至澄明,加少量浓盐酸,用 12mol/L 氢氧化钠液调 pH 值至 1.5,移入 50ml 量瓶中,加三蒸水至刻度,摇匀,精密量取 1.0ml 置 50ml 量瓶中,加三蒸水至刻度,摇匀,以不加样品为空白,照前法测定吸光度,结果见表 2。

表 2 血色素供试品中铁离子的测定结果(n=3)

批号	平均标示量(%)	RSD(%)
980102	94.12	1.08
971128	90.01	0.77
971021	91.96	1.03

2.9.2 血色素胶囊中铁离子的含量测定:取血色素胶囊 10 粒,去外壳,研匀,精密称取胶囊内容物(相当于血色素 5mg),置 50ml 烧杯中,加 0.1mol/L 氢氧化钠液 40ml,溶解完全,滤过,滤液以 7mol/L 盐酸液调 pH 至 3.5,析出棕红色沉淀,沉淀以三蒸水洗至滤液呈无色透明,再将沉淀用 0.1mol/L 氢氧化钠液溶解,滤过,滤液加热浓缩至 5ml,以下按“血色素样品中铁离子的测定”项下“每份加 5ml 浓硝酸硝化……”步骤操作,结果见表 3。

表 3 血色素胶囊中铁离子的含量测定结果(n=3)

批号	平均标示量(%)	RSD(%)
950401	94.2	0.44
960301	90.0	1.06
970505	96.2	0.87

2.9.3 血色素口服液中铁离子的含量测定:精密量取血色素口服液 60ml,加少量浓盐酸调 pH 至 3.0,滤过,水洗至滤液呈无色透明,将滤纸与滤渣置 0.1mol/L 氢氧化钠液中洗脱,完全溶解,弃去滤纸,溶液浓缩至 5ml 左右,加入 10ml 浓硝酸硝化,加热至液体总量约为 5ml,加少量浓盐酸,用 12mol/L 氢氧化钠液调 pH 至 1.5,滤过,滤液置 50ml 量瓶中,加三蒸水至刻度,摇匀,精密量取 1.0ml,置 50ml 量瓶中,加三蒸水至刻度,摇匀,以不加供试液为空白,照前法测定吸光度,结果见表 4。

表 4 血色素口服液中铁离子的含量测定结果(n=3)

批号	平均标示量(%)	RSD(%)
980202	95.84	0.98
980315	96.03	0.67
980619	94.72	0.99

3 讨论

3.1 血红蛋白是由两分子的原卟啉与铁螯合生成^[2], 本法通过对血红蛋白进行硝化处理后, 将其中铁离子游离, 加入适量邻菲罗啉, 在 pH 为 4.6 的缓冲溶液中, 邻菲罗啉与铁定量生成橙红色络合物, 用分光光度法在 $510 \pm 1\text{nm}$ 处测定其含量。本法对 pH 的要求较为严格, 因此应用醋酸盐缓冲液稳定溶液的 pH 值。

3.2 本实验多次涉及滤过操作, 应注意待滤液如为碱性时, 滤材不宜采用以醋酸纤维酯为主要成分的微孔滤膜, 因其易与碱作用, 影响测定结果。

3.3 采用分光光度法测定血红蛋白中铁离子的含量, 简便快捷, 测定结果满意, 可对血红蛋白类的不同制剂作出相应的评价, 以便探讨各种制剂的生物利用度, 指导医生选择用药, 也适用于医院、药厂对产品质量的控制。

参考文献

- 1 中国药典. 二部. 1995: 附录 17.
- 2 北京医学院主编. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 348.