

## 结构匹配酞菁缔合物红区荧光探针在纳克级肝素测定中的应用

周涛, 杜光心, 郑霄, 张艳, 黄萍, 邓雅斌, 李东辉\*

厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361102

**摘要** 肝素是一种聚阴离子生物活性多糖, 具有重要的临床价值, 简便快速、特异性高的分析方法的研发一直受到重视。基于分子缔合作用原理, 构建了酞菁离子缔合物荧光探针, 并藉此建立了肝素高特异、高灵敏的荧光分析新方法, 分析浓度可达纳克级。发射强红色荧光的四磺基铝酞菁( $AlS_4Pc$ )是一种带负电的金属酞菁荧光化合物, 研究发现, 母体结构相同、荷电相反的阳离子铜酞菁化合物阿利新蓝(Alcian blue 8 GX)对 $AlS_4Pc$ 具有高效荧光猝灭作用。由于二者均具有大平面的酞菁母体, 但电性相反, 分子结构有着高度的匹配性, 易于通过静电作用、平面疏水作用等分子间力而形成强的缔合作用, 生成近乎无荧光的缔合物。据此现象构建了 $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8 GX缔合物荧光探针。进一步的糖类物质考察、筛选实验显示, 具有强负电性的阴离子生物多糖可以使 $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8 GX缔合体系的荧光发生不同程度的恢复, 重新发出 $AlS_4Pc$ 的荧光, 其中尤以肝素存在下的荧光恢复行为最为显著, 且恢复程度与肝素的浓度呈正相关。这是因为肝素带有大量磺酸根阴离子, 对 $AlS_4Pc$ 构成强的竞争结合(Alcian blue 8GX)的作用, 导致 $AlS_4Pc$ 从缔合体系中游离出来, 体系荧光得以恢复。基于这一发现, 研究建立了一种高灵敏、高特异性测定肝素的荧光增强分析法。考察了体系的分子光谱(荧光光谱和吸收光谱)行为以探讨缔合物形成和反应体系荧光恢复的作用机理; 对反应参数(包括pH、反应温度、反应时间、 $AlS_4Pc$ 以及Alcian blue 8 GX的用量等)进行了优化; 在最佳条件下, 方法的线性回归方程 $y=1.08x+58.62$ , 工作曲线线性区间为 $6.0\sim 600.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 检测限为 $5.7\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 提出了简便实用的样品前处理方法(极性有机溶剂沉淀分离法)以解决实际样品测定时存在偏差的问题; 此外, 较为全面地考察了多种类物质(常见阴、阳离子、小分子、表面活性剂及生物大分子)对肝素测定的干扰行为; 本法应用于实际样品(肝素钠注射液)的测定, 取得了较为满意的结果。开拓了酞菁类化合物作为分子光谱探针在分析科学中的应用。

**关键词** 酞菁; 荧光; 肝素; 探针

**中图分类号:** O657.3   **文献标识码:** A   **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)04-1109-05

### 引言

金属酞菁化合物(phthalocyanine)是一类具有18电子平面共轭体系的大环化合物, 对光、热以及酸碱具有较高的稳定性。由于酞菁染料独特鲜艳的蓝、绿颜色, 染色和着色性能优异, 在纺织染料和颜料中占据举足轻重的地位。经过长期的研究和发 展, 金属酞菁作为高性能催化剂、光电材料、光漂白剂、分子探针以及光化学诊治剂等 在催化、材料科学、信息技术、分析科学、医疗卫生等诸多高科技领域获得了广泛应用<sup>[1-2]</sup>。

四磺基铝酞菁(tetrasulfonated aluminum phthalocya-

nine,  $AlS_4Pc$ )是具有大平面的共轭母体结构, 外周带有四个阴离子磺酸基团的、发射在红色波长区域的强荧光化合物。 $AlS_4Pc$ 具有大平面疏水结构和强负电性, 可选择性地与某些带正电荷、结构合适的物质形成缔合物, 导致自身荧光显著乃至完全猝灭。若体系中存在其他结构匹配的强负电性物质, 由于竞争结合作用, 缔合体系中的四磺基铝酞菁将被游离出来, 其荧光得以恢复。近年来, 这一原理已成功地应用于硫酸软骨素<sup>[3]</sup>和阴离子表面活性剂<sup>[4]</sup>等的高灵敏度、高选择性分析, 显示出诱人的研究和应用前景。

肝素是一种聚阴离子生物多糖, 临床上作为抗凝剂, 还用于抗炎、抗肿瘤<sup>[5]</sup>。其多糖骨架上含有大量硫酸根或磺酸根(图1)。常见的测定方法包括生物方法<sup>[6]</sup>、色质联用<sup>[7]</sup>、分

收稿日期: 2018-01-17, 修订日期: 2018-04-29

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项重点项目(2017R1036-2)资助

作者简介: 周涛, 1991年生, 厦门大学医学院抗癌研究中心硕士研究生 e-mail: zeltar@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: lidh@xmu.edu.cn

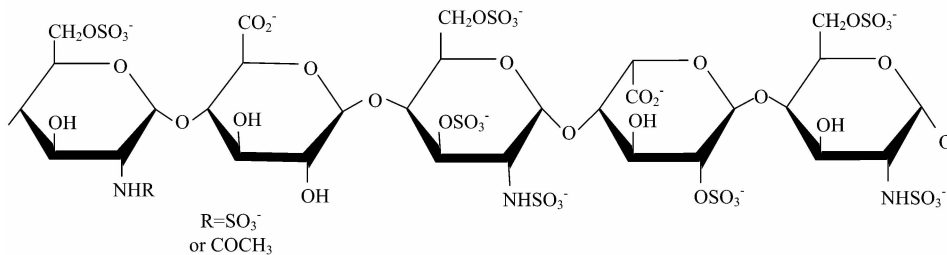


图 1 肝素的分子结构(片段)

Fig. 1 Molecular structure of heparin

光光度法<sup>[8]</sup>、荧光法<sup>[9]</sup>等。这些测定方法有的试剂新颖,但由于未商品化,实际应用有难度;有的须使用特定仪器(如全自动凝血仪),方法普及受限。另外,综观文献,普遍存在干扰实验不足的问题,这对于实际样品的测定是不利的。

如前所述,肝素的分子结构中存在大量与四磺基铝酞菁外周取代基相同或相似的基团(磺酸基或硫酸基团),可以推测,如果  $\text{AlS}_4\text{Pc}$ -Alcian blue 8 GX 缔合体系中存在肝素,则由于肝素的强竞争结合作用,  $\text{AlS}_4\text{Pc}$  将被释放,体系的荧光因之得以恢复,实验结果证实了这一推断。本研究据此建立了肝素荧光分析新方法,其灵敏度可达纳克级。该法用于实际样品的测定,取得了较为满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

LS-55 型荧光分光光度计(PerkinElmer, 美国),带恒温附件和 R928 红敏光电倍增管;精密天平(Sartorius 公司,德国);DC-3006 低温恒温槽(宁波新芝生物科技股份有限公司);OMNI 实验室超纯水系统(锐思捷科学仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

四磺基铝酞菁(J&K 百灵威科技有限公司);肝素钠注射液(万邦生物);肝素钠(国药集团化学试剂有限公司)。

Britton Robinson(B-R) 广泛缓冲液:用浓度均为  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸、乙酸、硼酸混合三酸与  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液混合配制。磷酸广范缓冲液:由  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸、 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾、 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠  $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸钠配制而成。四磺基铝酞菁储备液浓度为  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,使用前稀释为  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

所用试剂均为分析纯,实验用水为高纯水。

### 1.3 方法

在烧杯中依次加入水、缓冲液和  $30 \mu\text{L}$   $\text{AlS}_4\text{Pc}$  ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),混匀后分装到 4 mL 的塑料离心管,每管中加入  $57 \mu\text{L}$   $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的阿利新蓝,终体积为 3.0 mL。室温放置 10 min 后加入一定浓度的肝素溶液。而后测量体系的荧光激发、发射光谱及荧光强度。未加阿利新蓝的溶液之荧光强度记为  $I_{10}$ ,加阿利新蓝的溶液荧光强度记为  $I_t$ ,猝灭前后荧光强度的变化量  $\Delta I_t$  以  $\Delta I_t = I_{10} - I_t$  计算,荧光猝灭倍数  $n = I_{10} / I_t$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{AlS}_4\text{Pc}$ 和 Alcian blue 8GX 的分子结构与分子光谱性质

四磺基铝酞菁(图 2)母体结构的四个苯环上各带有四个强吸电子基团—磺酸基,因而水溶性良好。 $\text{AlS}_4\text{Pc}$  具有强发光能力(荧光量子产率达 0.37),发射在红区,故能有效避开背景荧光和散射光的干扰,获得较高的检测灵敏度。 $\text{AlS}_4\text{Pc}$  的上述优点,使其可通过分子组装形成缔合物荧光探针。

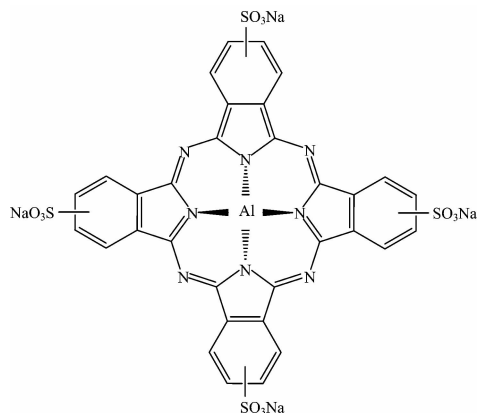


图 2 四磺基铝酞菁的分子结构

Fig. 2 Molecular structure of  $\text{AlS}_4\text{Pc}$ 

阿利新蓝(图 3)具有相同的母体结构,外周苯环通过硫醚键各带一正电基团,中心配位离子是顺磁性的  $\text{Cu}^{2+}$ ,因而化合物不发荧光<sup>[10]</sup>。 $\text{AlS}_4\text{Pc}$  与 Alcian8GX 分子结构匹配、荷电相反,因而二者可通过静电作用、大平面疏水作用而发生强的缔合作用,形成离子缔合物( $\text{AlS}_4\text{Pc}$ -Alcine 8GX),导致体系荧光几乎完全猝灭。可以推测,由于肝素带有大量磺酸根阴离子,故易于与  $\text{AlS}_4\text{Pc}$  上的磺酸基发生竞争,当肝素进入 Alcian 8GX- $\text{AlS}_4\text{Pc}$  体系后,将与  $\text{AlS}_4\text{Pc}$  竞争结合 Alcian 8GX,从而逐步释放  $\text{AlS}_4\text{Pc}$ ,引起体系荧光恢复。实验结果证实了上述推测:加入肝素后,体系荧光显著恢复(图 4),且荧光程度与肝素的加入量呈正相关。据此发现建立了肝素荧光分析新方法。

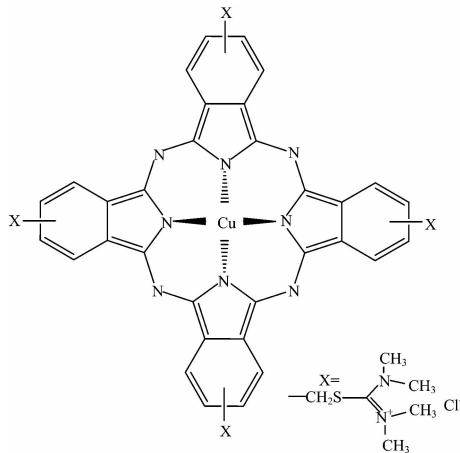


图 3 Alcian blue 8GX 的分子结构  
Fig. 3 Molecular structure of Alcian blue 8GX

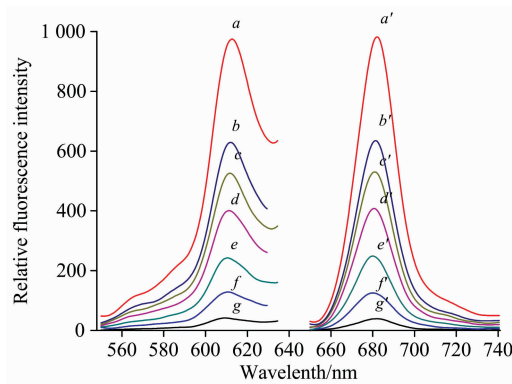


图 4 肝素存在下四磺基铝酞菁-阿利新蓝体系的荧光激发光谱和发射光谱

Fig. 4 Excitation ( $x$ ) and emission ( $x'$ ) spectra of  $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8GX in the presence of heparin with increasing concentration in a pH 7.0 buffer

The concentrations of heparin ( $g, g'$  to  $b, b'$ ) were 0, 120, 240, 360, 480, and  $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively.  $[Alcian \text{ blue } 8GX] = 1.9 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Excitation ( $a$ ) and emission ( $a'$ ) spectra of  $AlS_4Pc$  in the absence of Alcian blue 8GX and heparin were also provided for comparison.  $\lambda_{ex} = 610 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 682 \text{ nm}$

为进一步探讨反应机理,考察了体系的吸收光谱(图 5)。酞菁化合物的长波吸收带(Q带)对微环境变化敏感,讨论重点放在此区域。随着阿利新蓝的加入,短波方向的三个峰明显升高,而长波处 674 nm 的峰明显降低。其后,随着肝素的加入,344 和 674 nm 处的峰均出现增高,其中 Q 带吸收峰(674 nm)峰变化更为明显。阿利新蓝中加入  $AlS_4Pc$  后,二者相互缔合,引起  $AlS_4Pc$  游离态峰的显著降低。加入肝素后,由于其竞争性结合阿利新蓝,导致阿利新蓝- $AlS_4Pc$  缔合物发生解离,  $AlS_4Pc$  被释放重新成为游离状态,因而游离态的吸收峰增强。李东辉等<sup>[11]</sup>在研究  $AlS_4Pc$ -AO 体系与 DNA 相互作用时也发现了类似现象。

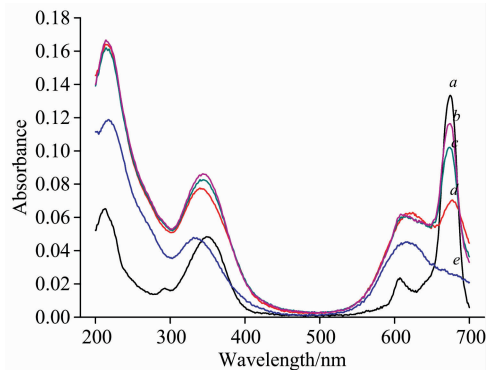


图 5 肝素对四磺基铝酞菁-阿利新蓝紫外-可见吸收光谱的影响

Fig. 5 Variation of absorption spectra of  $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8GX in the presence of heparin in a pH 7.0 buffer

The concentrations of heparin added ( $d$  to  $b$ ) are 0, 360, and  $480 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $b$ ), respectively.  $[Alcian \text{ blue } 8GX] = 1.9 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Absorption spectra of free  $AlS_4Pc$  ( $a$ ) and Alcian blue 8GX ( $e$ ) are also provided

考察了 13 种糖类物质对  $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8GX 体系荧光的影响(图 6),发现只有肝素钠、硫酸软骨素和大肠杆菌脂多糖三种聚阴离子生物多糖能使体系发生荧光恢复,尤以肝素的响应最为显著,这证明糖结构中具有硫酸根或磺酸根等阴离子基团是  $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8GX 体系发生荧光恢复的关键。

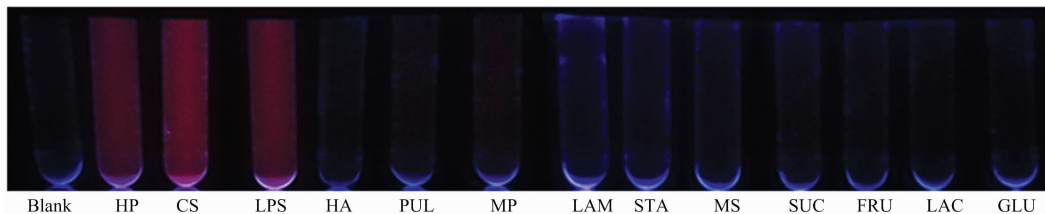


图 6 不同糖类物质对  $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8GX 体系荧光恢复的影响

Fig. 6 Fluorescence recovery of  $AlS_4Pc$ -Alcian blue 8GX in the presence of different types of saccharides

From left to right: blank, heparin, chondroitin sulfate, lipopolysaccharide, hyaluronic acid, pullulan, lentinan, laminaran, starch, maltose, sucrose, D-fructose,  $\alpha$ -lactose, glucose.  $[AlS_4Pc] = 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[Alcian \text{ blue } 8GX] = 3.75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[HP] = [CS] = 1.44 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[LPS] = 6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the concentration of other saccharides is  $12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

## 2.2 试验条件的优化

### 2.2.1 缓冲体系

考察了 Britton Robinson、磷酸广范缓冲液、KCl-HCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Citric acid 和甘氨酸-盐酸等缓冲体系中阿利新蓝对  $\text{AlS}_4\text{PC}$  荧光猝灭的影响,发现 pH 8.0 和 pH 7.0 B-R 缓冲液的效果较好。进一步对这两种缓冲液中体系荧光猝灭和恢复的行为进行了比较,发现 pH 7.0 在低浓度肝素钠的测定中效果更好,故选择 pH 7.0 的 B-R 缓冲液。

### 2.2.2 反应时间的影响

对反应动力学进行了考察,最终选择加入阿利新蓝 10 min 后再加肝素钠,反应 30 min 后测定体系的荧光强度。

### 2.2.3 反应温度

考察了 0, 25 和 37  $^{\circ}\text{C}$  下工作曲线的线性区间和斜率,发现温度影响不大,但低温有利于体系在更长的时间里保持稳定。为便于实验操作,选择在常温下进行反应。

### 2.2.4 $\text{AlS}_4\text{PC}$ 和阿利新蓝的用量

考察了  $\text{AlS}_4\text{PC}$  浓度为  $2 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$   $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下阿利新蓝的用量,发现  $\text{AlS}_4\text{PC}$  浓度增高对于高浓度肝素的响应更灵敏,但线性区间向高浓度方向移动,而低浓

度  $\text{AlS}_4\text{PC}$  测定区间缩短,效果不佳。综合考虑后选择  $\text{AlS}_4\text{PC}$  为  $10^{-6}$   $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 阿利新蓝为  $1.9 \times 10^{-6}$   $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.3 工作曲线

在优化条件下,按 1.3 方法制作肝素测定的工作曲线,得到线性回归方程  $y = 1.08x + 58.62$ ,  $r = 0.9937$ , 线性范围 6.0~600.0  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 检测限为 5.7  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.4 共存物质的干扰

对常见干扰物进行了考察。结果显示本法对大多数常见的金属离子、无机酸根离子、表面活性剂、糖类、氨基酸具有强抗干扰能力。但  $\text{Hg}(\text{II})$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  以及阳离子表面活性剂 CTAC, CUAB, DNA, 人血清、牛血清白蛋白对测定有一定干扰,因此若上述干扰物浓度较高,测定前需要对样品进行前处理。实验表明,如存在金属离子的干扰,加入 EDTA 或 NaF 可以起到很好的掩蔽作用。

### 2.5 不同测定方法的比较

对本法以及文献报道的肝素常见测定方法进行了比较(表 1)。本方法检测限更低,相对误差小,线性范围处于中等水平,在肝素钠低浓度的检测中有优势。

表 1 肝素不同测定方法的比较

Table 1 Comparison of different methods for the determination of heparin

Method	Incubation time/min	LOD/( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RSD/%	Line range/( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
共振光散射技术	—	$8.4 \times 10^3$	2.3	1 000~20 000
罗丹明 6G 荧光猝灭法	20	6.1	—	50~3 000
AIBN(2,2'-azoisobutyronitrile)	—	—	—	360~2 640
Polymer-H	—	90	—	630~5 000
This method	40	5.7	2.0	6~600

## 2.6 样品测定

本法应用于肝素钠注射液的分析。由于未能直接获得该药品的标准品,因此首先以肝素钠注射液通过有机溶剂沉淀法制备肝素钠标准品。取肝素钠注射液 5 mL,加入等体积的无水乙醇,析出白色絮状沉淀,8 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 4 min,去上清,沉淀以无水乙醇洗涤并同样离心,重复两次,沉淀真空干燥恒重。通过上述实验,既获得了纯品肝素钠,同时也确定了肝素钠注射液的质量浓度。称取 12 mg 产物溶于 10

mL 水制成标准溶液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

以  $\text{AlS}_4\text{PC}$ -Alcian blue 8GX 为探针,加入系列浓度的上述肝素钠标准溶液,制作标准工作曲线( $y = 1.08x + 68.50$ ,  $r = 0.9939$ )。以稀释 625 倍和 3 125 倍后的肝素钠注射液为样品(取高、中、低三个浓度),测定其含量。另外,还以商品化的肝素钠为标准品同样测定了肝素钠注射液。测定结果较为满意(表 2)。

## 3 结 论

提出了肝素定量分析的新方法,即酞菁离子缔合物荧光探针测定法。以结构匹配的阴、阳离子金属酞菁构建离子缔合物荧光探针,通过肝素的特异性竞争结合作用使缔合物荧光显著恢复。据此建立了高灵敏、高选择性的肝素荧光增强定量分析的新方法。该法对大多数无机离子以及常见小分子干扰物质(如糖、氨基酸等)的抗干扰能力强。此外,采用的荧光探针四磺基铝酞菁是一种红区荧光探针,可采用长波激发,光漂白作用小,利于测定体系的稳定。本研究开拓了酞菁红色荧光化合物的新应用。

表 2 实际样品的分析结果

Table 2 Analytical results of practical samples

Content/( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		RSD/%
Values determined	Real values	
56.1	58.0	-3.2
218.0	231.9	-6.4
483.4	463.8	4.0
65.2*	58.0	11.8
226.8*	231.9	-2.3
491.7*	463.8	5.6

\* Commercially available heparin is used as standard

## References

- [ 1 ] Chai L F, Zhao K L, Zhang F. *Contemporary Chemical Industry*, 2017, 46(1): 165.
- [ 2 ] Cheng Z H, Cai T T, Chen J H. *Petrochemical Technology*, 2012, 41(9): 1092.
- [ 3 ] CHEN Lin, HUANG Ping, YANG Hui-qing, et al(陈 林, 黄 萍, 杨惠卿, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2015, 35(8): 2203.
- [ 4 ] Yu F, Guo M L, Deng Y B, et al. *Analytical Sciences*, 2016, 32(2): 201.
- [ 5 ] Harenberg J. *International Journal of Cardiology*, 2016, 212(Suppl 1): S10.
- [ 6 ] Chinese Pharmacopoeia Commission(中华人民共和国药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)*. Beijing: Medical Science Press(北京: 中国医药科技出版社), 2017. 117
- [ 7 ] Galeotti F V, Nicola. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1284: 141.
- [ 8 ] Bromfield S M B, Anna Posocco, Paola, et al. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(8): 2911.
- [ 9 ] Chan C W, Smith D K. *Chemical Communications*, 2016, 52(19): 3785.
- [10] Ermund A M L N, Rodriguez-Pineiro A M, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 492(3): 331.
- [11] Li D H, Chen X L, Fang Y, et al. *Analyst*, 2001, 126(4): 518.

# Application of Structure-Matched Phthalocyanines Associate as a Red-Emitting Fluorescent Probe in the Determination of Heparin at Nano-Gram Level

ZHOU Tao, DU Guang-xin, ZHENG Xiao, ZHANG Yan, HUANG Ping, DENG Ya-bin, LI Dong-hui\*  
Cancer Research Center, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China

**Abstract** Heparin, a polyanionic bio-polysaccharide, has important clinical values. The development of simple, rapid and specific method for the detection of heparin has been being an attractive topic in the last decades. According to the principle of molecular association, a phthalocyanine-based ion-associate fluorescent probe was prepared, followed by the establishment of a novel fluorimetry for the determination of heparin with high specificity at nanogram level. Tetrasulfonated aluminum phthalocyanine (AlS<sub>4</sub>Pc), which emits strong red fluorescence is negatively charged, was found that its fluorescence could be dramatically quenched by a structure-matched cationic copper phthalocyanine (Alcian blue 8 GX) bearing a same parent structure and oppositely charged. Because of their highly matched molecular structures the two phthalocyanines, strong association is easy to occur through intermolecular force, leading to the formation of none-fluorescent associate. Based on this founding, a fluorescent probe of AlS<sub>4</sub>Pc-Alcian blue 8 GX associate was developed in this study. Screening experiments on carbohydrates showed that the fluorescence of AlS<sub>4</sub>Pc-Alcian blue 8 GX recovered when polyanionic bio-polysaccharide existed. The fluorescence recovery is particularly significant in the presence of heparin. We believe that this phenomenon could be attributed to the presence of a large number of sulfonate anion on the skeleton of heparin. The polyanionic structure leads to strong competitive binding to Alcian blue 8GX with AlS<sub>4</sub>Pc, resulting in the dissociation of AlS<sub>4</sub>Pc from the associate, and the fluorescence of the system restored. Based on the above findings, a highly sensitive and specific method for the determination of heparin by fluorescence enhancement was established. The molecular spectra (fluorescence and absorption spectra) of the system were investigated to deduce the mechanism of the formation of associate and the fluorescence recovery. The reaction parameters (including pH, reaction temperature, reaction time, usage of AlS<sub>4</sub>Pc and Alcian blue 8 GX) were optimized. Under the optimal conditions, the linear range of calibration curve is 6.0~600.0 ng · mL<sup>-1</sup>, and the detection limit is 5.7 ng · mL<sup>-1</sup>. A facile pretreatment method employing polar organic solvent as precipitant was developed to avoid the deviation in the detection of practical samples. In addition, the interference behavior of foreign substances on the determination of heparin was investigated comprehensively, which has made up for the deficiency in literatures. The proposed method has been applied to the determination of practical sample (heparin sodium injection) with satisfactory results. This study expands the application of fluorescent phthalocyanines as molecular optical probes in analytical sciences.

**Keywords** Phthalocyanine; Fluorescence; Heparin; Molecular probe

\* Corresponding author

(Received Jan. 17, 2018; accepted Apr. 29, 2018)