

人血白蛋白含量测定方法探究

石振飞¹ 杨列清² 井金荣³ 冯璐宾⁴

山东泰邦生物制品有限公司 山东省泰安市 271000

摘要: 文章测量了人血白蛋白的含量及其方法学验证中的重复性。主要根据《中国药典》2015年版四部通则0704和通则0731采用消解仪及凯氏定氮仪相结合的方式测定人血白蛋白的含量。实验表明,消解温度和控制比较优化的是80℃消解5min,350℃消解5min,410℃消解60min,至溶液变成澄明的绿色,再继续消解10min;对于试剂的加入,其中水50mL,40%氢氧化钠10mL,2%硼酸10mL为最佳。根据2015年版《中国药典》判断,人血白蛋白含量符合规定,且该仪器测量方法及仪器适于人血白蛋白含量测定。

关键词: 人血白蛋白;消解;滴定

引言:

人血白蛋白是一种血液制剂,广泛用于临床。其含量的测定,目前国内外仍采用经典的凯氏定氮法,该法操作复杂,费时费力。为了寻求一种简便的方法,本文对测定人血白蛋白含量进行了实验研究,提出了血液制剂人血白蛋白含量测定的新方法,并探讨了其实际应用的可行性。此法快速简便,稳定可靠,可以推广应用。

1 检测条件

1.1 仪器

(1) 凯氏定氮仪K-360;(2) 消解仪K436;(3) AB204-N型电子天平。

1.2 试剂

氢氧化钠、硼酸、硫酸铜、硫酸、硫酸钾试剂均采用分析纯;

水采用广州屈臣氏食品饮料有限公司的饮用水。

1.3 蛋白质检测方法设置

滴定类型: 硼酸
蒸馏搅拌速度: 5s
滴定搅拌速度: 7s
蒸汽力度: 80%
开始滴定: 480s
40%氢氧化钠: 10mL 2%
反应时间: 10s
蒸馏时间: 480s
水: 50mL
硼酸: 10mL

2 供试品的制备

精密量取1.55mL人血白蛋白[10g/瓶(20% 50mL)],至50mL容量瓶中,加0.9%氯化钠溶液稀释至刻度,摇匀,精密量取1mL置消解管内,加硫酸钾0.3g与30%硫酸铜溶液5滴,再沿瓶壁滴加硫酸2.0mL,放入消解仪,安装完善,消解仪调到3档180℃消解5min(去除水分),

调到6档350℃消解5min(接近硫酸沸点),调到7档410℃消解60min,至溶液变成澄明的绿色,再继续消解10min,取出,冷却^[1]。

3 实验操作步骤

按照说明书的要求将已冷却的消解管装入凯氏定氮仪的正确位置,关上安全门,连接水源。按照1.2的检测方法设置蛋白质含量测定的方法,其中水50mL,氢氧化钠10mL,硼酸10mL。将配制好的40%的氢氧化钠,2%的硼酸和纯化水分别置自动蒸馏仪相应的大瓶中,用F=1.001的0.005mol/L的硫酸滴定液自行自动滴定,记录数据。

4 含量测定检测结果及分析

4.1 滴定结果

滴定结果如表1所示。

| 表1 滴定结果 | | | 单位: mL |
|---------|---------|---------|---------|
| 序号 | 1 | 2 | 空白 |
| 结果 | 7.593 1 | 7.589 9 | 0.430 2 |

4.2 计算公式

$$\text{蛋白质含量} \% = [F \times T \times (V_{\text{终}} - V_{\text{空}}) \times V_{\text{稀}} \times 6.25] / (W_{\text{取}} \times M_{\text{标}}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

F为滴定液的浓度值与其名义值之比, F=1.001;

T为滴定度, T=0.1401mg/mL;

$V_{\text{终}}$ 为样品滴定体积;

$V_{\text{空}}$ 为空白滴定体积;

$V_{\text{稀}}$ 为样品稀释的体积, 稀释体积=50mL;

$W_{\text{取}}$ 为样品取样量, 取样量=1.55mL;

$M_{\text{标}}$ 为标示量, 标示量=10g/50mL × 1000=200mg/mL^[2]。

5 方法学验证

5.1 重复性试验

取同一供试品, 供试品溶液制备方法按照《2015版中国药典》四部通则0704制备6份供试品。按照正文含

作者简介: 石振飞, 出生年月: 1987年10月, 民族: 汉, 性别: 男, 籍贯: 山东省泰安市, 职称: 工程师, 学历: 研究生, 毕业于吉林农业大学, 研究方向: 血液制品分离、纯化。

量测定方法, 测定每份样品中蛋白质含量的滴定量, 结果RSD=0.40% (n=6), 表明重复性良好(如表所示)。

测定样品中蛋白质含量的滴定量

| 取样量/mL | 结果滴定量/mL | 蛋白质含量/% | RSD/% |
|--------|----------|---------|-------|
| 1.55 | 7.614 0 | 100.7 | 0.40 |
| | 7.668 0 | 101.4 | |
| | 7.596 2 | 100.4 | |
| | 7.660 1 | 101.3 | |
| | 7.608 7 | 100.6 | |
| | 7.608 7 | 100.7 | |

6 讨论

6.1 氢氧化钠的影响

40%氢氧化钠的作用是中和硫酸, 变成碱性条件, 加热使氨气游离出来, 硼酸吸收。配制注意事项是及时搅拌, 在通风橱内配制, 放凉后使用。若搅拌不及时容易结晶, 那么溶液浓度容易达不到要求, 所测结果会偏低。若很热使用, 反应过于剧烈。另外氢氧化钠不纯的话, 会导致空白数值不稳定, 影响检测的准确性。同时, NaOH加的都是偏过量的, 浓度偏差不大的情况下, 对结果没有什么影响^[4]。

6.2 硼酸的影响

样品与浓硫酸和催化剂一同加热消解, 使蛋白质分解, 其中碳、氢被氧化为CO₂和H₂O逸出, 而样品中的有机氮转化为氨与硫酸结合成硫酸铵, 硫酸铵用NaOH中和生成NH₃·H₂O, 加热又分解为氨, 用硼酸吸收, 吸收氨后的硼酸生成硼酸氨再以标准硫酸溶液滴定, 根据标准酸消耗量计算蛋白质的含量。所以硼酸应过量使用, 使产生的氨可以充分被吸收, 确保滴定数据准确。

6.3 硫酸铜、硫酸钾与硫酸的影响

硫酸铜在整个消解反应中起到催化剂的作用, 使蛋白质被分解; 而硫酸则与被转化为的氨结合为硫酸铵, 继续进行下一步的反应; 硫酸钾就起到提高硫酸沸点的作用^[5]。

6.4 消解温度和时间的影响

整个消解过程需要有一个升温的过程, 一下子升温太高, 固体样品容易碳化导致实验失败, 只有开始消解时, 由小的消解温度到恒定, 消解管整体才能受热均匀, 一般泡沫不会溢出管外。同时初始消解时温度不可过低, 过低造成消解时间延长。实验证明初始消解温度180℃为宜, 只要消解管内无泡沫产生, 并按照上述时间升温程序把温度提高到410℃左右, 就可加快消解速度。

7 总结

根据上述的讨论进行思考, 设计硼酸、氢氧化钠的加入量不同, 探讨稀硫酸的滴定量, 最终得出加入40%氢氧化钠10mL, 2%硼酸10mL最为合适。同时, 经过与消解仪工程师的沟通和经验得出消解仪调到3档180℃消解5min(去除水分), 调到6档350℃消解5min(接近硫酸沸点), 调到7档410℃消解60min, 至溶液变成澄明的

绿色, 再继续消解10min, 取出, 冷却, 这样的消解程序最为适合人血白蛋白的消解。经过方法学验证中的重复性RSD=0.40% (n=6), 表明重复性良好, 该检测方法条件良好, 适用人血白蛋白含量测定的检测。

从本次能力验证返回的试验报告来看, 有部分实验室在同一日期测定样品, 没有理解作业指导书中要求返回3次独立实验结果的意义。应至少在不同日期对样品进行测定, 或由不同的人员操作, 考量不同批次试剂配制等重现性因素, 以求涵盖尽可能多的实验误差, 并非指在同一天将所有样品平行测完。凯氏定氮法测定人血白蛋白中蛋白质含量为《中国药典》2015年版三部通则规定的法定检测方法, 从本次能力验证统计结果来看, 7家血液制品批发授权药检机构人血白蛋白蛋白质含量测定能力验证结果均为优秀; 有2家非批签发单位实验室本次能力验证结果为不满意^[7]。在通常情况下, 影响能力验证结果的因素为仪器设备、人员操作、标准品、实验试剂等等, 单位自身应按照能力验证要求进行调查并彻底纠正或消除引起偏差的因素。本次能力验证为在血液制品行业内的首次能力评价, 建议血液制品企业、授权批签发药品检验机构及其他相关单位积极参与中国食品药品检定研究院组织实施的能力验证, 并通过参加能力验证进一步熟悉检测和校准实验室能力的通用要求, 对本实验室检验检测结果的准确性和可靠性进行自我评价, 及早消除潜在的偏差因素, 加强实验室检测质量控制, 提高能力验证结果的满意水平。从而更好地推动血液制品的质量控制工作, 提高我国血液制品检验检测实验室的技术能力和整体水平。

参考文献:

- [1]中国药典: 三部[S].2015: 244-246.
- [2]中国药典: 四部[S].2015: 96.
- [3]中国合格评定国家认可委员会.CNAS-RL02: 2016能力验证规则[EB/OL].[2016-04-19].<https://www.cnas.org.cn/fwzl/nlyzzl/nlyzxcgzcyl/875650.shtml>.
- [4]王敏力, 肖林, 周倩, 等.首批人血白蛋白国家参考品的研制[J].中国药学杂志, 2017, 25(6): 51-59.
- [5]中国合格评定国家认可委员会.CNAS-GL03: 2006能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[EB/OL].[2015-06-01].<https://www.cnas.org.cn/images/rkgf/sysrk/rkzn/2015/06/04/E1A627B34D54D56D0CD50057BAE71B57.pdf>.
- [6] International Organization for Standardization. ISO 13528 Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons [S]. 2005.
- [7]中国合格评定国家认可委员会.CNAS-GL02: 2014能力验证结果的统计处理和评价指南[EB/OL].[2014-09-29].<https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkzn/2014/09/821333.shtml>.