

# 蛋白药物中人血白蛋白含量测定方法研究进展

陈彦君 林航程 侯笑笑 刘凯莉 韩宁娟

(西安培华学院 陕西西安 710125)

摘要: 蛋白药物是临床上使用的一种特殊的急救药品, 本文总结了蛋白药物中人血白蛋白的含量测定方法, 包括高效液相色谱法、双缩脲比色法、密度仪检测法、旋光法、薄层扫描法、层析法、拉曼光谱法, 为蛋白药物及相关产品的研究和开发提供思路。

关键词: 蛋白药物; 含量测定; 人血白蛋白

Research progress in the determination of human blood albumin content in protein drugs

Chen Yanjun Lin Hangcheng Hou Xiaoxiao Liu Kaili Han Ningjuan

【Abstract】Protein drugs are a kind of special emergency drugs used in clinical practice. This paper summarizes the determination methods of human blood albumin content in protein drugs, including high performance liquid chromatography, biuret colorimetry, densimeter detection, optical rotation, thin layer scanning, chromatography, Raman spectroscopy, to provide ideas for the research and development of protein drugs and related products.

【Key words】protein drug; content determination;

蛋白药物(human albumin)——临床上使用的一种特殊的急救药物,其最早是从人的血浆中提取出来并且大规模生产使用的血液制品。临床上有口服水解蛋白、人血白蛋白、肠内营养剂,丙种球蛋白、胰岛素、生长素等,可用于白蛋白补充,提高免疫力以及保护肾功能的作用。蛋白药物含量测定方法包括凯氏定氮法、双缩脲法、2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法、福林酚法、紫外-可见分光光度法、考马斯亮蓝法等。本文将从文献对于蛋白药物含量测定方法进行综合阐述,为国内相关产品的研究和开发提供理论参考。

## 1 含量测定方法

### 1.1 高效液相色谱(HPLC)技术

高效液相色谱(HPLC)技术在药品定性、定量分析中的应用广泛, HPLC 系统分为进样系统、液体运输系统、色谱柱和检测系统四个部分。流动相被输液泵以稳定的流速(或压力)传递至分析系统中,在色谱柱中,依照分配系数不同,达到分离。

赵斌<sup>[1]</sup>等通过以半微量凯氏定氮法为标准方法,采用 HPLC 法的外标法测定出蛋白药物中人血白蛋白的含量,以人血白蛋白的单体分子作为外标物,进行多点校准,求得标准曲线测定蛋白药物中人血白蛋白的含量,准确度能够达到 99.30% ~ 101.46%。

### 1.2 双缩脲比色法

双缩脲比色法测定的原理是在碱性溶液中,双缩脲试剂中铜离子能与蛋白药物分子中的肽键产生的紫红色反应,紫红色物质在 550nm 处有较强吸收特性测得吸光度,再结合标准曲线法进行蛋白药物含量测定。

王俊平<sup>[2]</sup>等采用双缩脲比色法测定出蛋白药物中人血白蛋白的含量与传统的凯氏定氮法比较,绘制标准曲线,回收率实验得到最高回收率为 99.88%,实验过程中发现双缩脲的成色反应受温度、时间因素影响较大;实验得到双缩脲比色法的最佳温度为 43℃水浴 5 ~ 6min,如实验温度相差 ± 1℃,所得蛋白含量相应增减 0.1%,反应每隔 5min 测定,发现放置时间增长,吸光度有上升趋势,即测定吸光度要迅速。

### 1.3 密度仪检测法

密度仪检测法利用 U 型管振荡的原理,通过测定样品的共振频率来测定样品的密度,20℃时用标准蛋白质校正仪器的 A 值,B 值后

测定样品蛋白含量。

张凌燕<sup>[3]</sup>等采用密度仪检测法测定蛋白药物中人血白蛋白含量与凯氏定氮法比较,采用型号为 DMA 46D 的密度仪对标准样品和氯化钠的样品进行平行检测,测定出蛋白浓度分别为  $20.37 \pm 0.52$  和  $21.58 \pm 0.15$ 。分析可知加入氯化钠调整蛋白样品中钠离子的浓度后,测定结果偏大,发现密度仪检测法随着钠离子的升高对测定结果影响较大。即实验证明样品中离子浓度对密度法影响较大,在蛋白药物中主要是钠离子对其影响。则密度仪检测法测定时钠离子浓度在 (70 ~ 90)mmol/L 的范围内,温度恒定 20℃,进样量固定,样品不稀释,进样后 5 ~ 10min 就可稳定结果,人为误差少,且适合于高浓度蛋白含量检测。

### 1.4 旋光法

旋光法是指通过将平面偏振光透过具有特定的电子光学功能物质(例如带有不对称碳原子的物质)的液体或溶剂时所产生的旋光现象,来测定物质或检测药品中的纯杂水平的技术,它也可以用于计算浓度。

宫玉英<sup>[4]</sup>等采用旋光法测定蛋白药物旋光度与传统的凯氏定氮法比较,绘制标准曲线,通过标准曲线法计算样品中白蛋白的含量,回收率实验得到平均回收率为 99.95%,相对误差仅为万分之五,置信限及离群值检验得到  $P > 0.05$ ,可知旋光法测定结果具有很高的精密度和准确度。即实验可知在相当宽广的浓度范围内,人血白蛋白含量与旋光度值之间有极好的相关性, $r$  值接近 1;回收率试验也表明,旋光法测定蛋白药物含量有极高的精密度和准确度,相对误差微。实验过程中还发现蛋白药物中含活性炭的半成品不能使用旋光法测定人血白蛋白含量。

### 1.5 薄层扫描法

薄层扫描法是将具有特定波长、特定高度的紫外线或可见光照射于薄层板上,扫描薄层色谱中接收紫外或可见光的斑点,或激发后发出强烈荧光的斑点,并计算其可见光的接受程度以及其经激发后所形成的荧光程度,对扫描所得的图像或积分资料进行鉴定、检验,以及含量计算的技术。

林敏<sup>[5]</sup>等采用此薄层扫描法测定蛋白药物中人血白蛋白的纯度,通过电泳,比色,扫描测定人血白蛋白含量,归一化法计算白蛋白的纯

度。将电泳后的膜条按照所设定的扫描要求,在 24 小时内的各个时段内进行了光密度扫描共 8 次,对前八次测得的数据采用了归一化方法估计白蛋白的纯度,统计计算  $\bar{x}=0.9870$ ,  $SD=0.0005$ ,  $CV=0.05$ , 试验结果表明白样品在经电泳后的二十四小时内,色泽变化较小,化学性能好,实验证明重现性较好,纯度检测实验中平均回收率达到 100%,相对回收率的标准偏差为 0.23%。

薄层扫描法具有使用简单、快捷、精确、可靠性高、精密性高等优点,用本法可以检测人蛋白药物的纯度,对于低纯化的制品来说,含杂蛋白浓度较高,峰面积大,用本法检测疗效最好。用本法测定过程中需注意,点样以 1.8~2.4  $\mu\text{l}$  为宜,不能过宽;且在色带和膜条两边边缘应留有 8~5mm 间距,膜条要厚薄一致,电泳带需要分离清晰,且漂洗后膜条应压平整,否则影响了测量结果。

### 1.6 层析法

层析技术是根据蛋白质分子大小、疏水性、电荷量和特殊的生物活性来分离提纯不同的蛋白质。

郑秋君<sup>[6]</sup>等采用层析法进行分离高纯度的人血浆白蛋白并与国内外血浆蛋白分离应用最广泛的 Cohn[科恩原理]方法进行比较。通过 SDS-PAGE 电泳,白蛋白初读及聚合体测定和层析分离浓缩的到高浓度的人血浆白蛋白。进行纯度测定,通过三步层析曲线(DEAE-Spheredex 层析,QMA-Spherosil 层析,CM-Spheredex 层析)得到纯化的白蛋白,采用常规方法并结合 SDS-PAGE 电泳测定纯度得纯度达到 99%以上。聚合体含量测定近似于 0,表明层析法分离的血浆白蛋白的纯度高。

与 Cohn 方法比较,Cohn 法提纯得白蛋白中聚合体含量为 3.5%,表明层析法分离的血浆白蛋白的纯度比 Cohn 法高,而后者多聚体含量又明显高于前者。层析法,它不使白蛋白变性,分离提纯工作可在室温操作,层析法可配备自动控制系统,在制备白蛋白的过程中可同时分离其它蛋白质,如 Ig G、 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶、转铁蛋白、促生长因子和其它可利用的蛋白质;缺点是在操作过程中耗水量大(约为投料量的 30 倍),必须严加控制无菌及填料的再生,否则层析柱的寿命将会缩短而使成本增加。

### 1.7 拉曼光谱法

拉曼光谱法是在测定的过程中,直接将样品放置在拉曼显微光学平台上面,优化采集到的拉曼光谱图的仪器参数,并在不同的光激发波长和照射到样品上的功率进行拉曼光谱扫描,然后对得到的不同批号的拉曼光谱图进行光谱特征分析,并且进行对比,最后将光谱的相似性和主要特征峰的存在与否与拉曼光谱峰位移动频率和峰强度的相似度计算结果相结合,得出结论样品中有无假白药物或含量不合格的样品。

王玉<sup>[7]</sup>等采用拉曼光谱法快速鉴别蛋白药物;通过测定标准白蛋白药品得到标准拉曼光谱峰,与假白药物的拉曼光谱图比较,可以看出非常显著得差异。标准人血白蛋白在特定的波长有特定的峰,如在 3407 $\text{cm}^{-1}$ 有宽而强的 OH、NH 伸缩振动峰,3071 $\text{cm}^{-1}$ 和 2934 $\text{cm}^{-1}$ 试处有  $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2$ 的对称和不对称伸缩峰,1656 $\text{cm}^{-1}$ 和 1615 $\text{cm}^{-1}$ 的峰

应属于 C=O 的伸缩振动,可能是酰胺 I 带,1452 $\text{cm}^{-1}$ 的峰归属于 CH 的变形振动,也可能含有环的伸缩振动;1343 $\text{cm}^{-1}$ 的峰可归属于 C-N 伸缩振动(也可直接归属为酰胺 III 带),1208 $\text{cm}^{-1}$ 和 1106 $\text{cm}^{-1}$ 的 2 个弱峰可归属于 CO 和 CN 伸缩振动组合,1004 $\text{cm}^{-1}$ 处中等强度的峰应是典型的环伸缩振动,942 $\text{cm}^{-1}$ 和 897 $\text{cm}^{-1}$ 处及其他一些更弱峰可归属于环上 CH 或 CH<sub>2</sub>的变形振动,752 $\text{cm}^{-1}$ 、644  $\text{cm}^{-1}$ 、563  $\text{cm}^{-1}$ 处以及其他一些更弱峰也可 CN 伸缩和 CH 变形振动,以上这些峰在假人血白蛋白中没有对应得峰。

本法把采集的样品拉曼光谱图和假人血白蛋白的拉曼光谱图加以直观对比,完全能可以判断样品的真实性。实验过程中发现荧光干扰是拉曼光谱法最主要的干扰因素,为使荧光干扰最小化,采用特定的长波束光发射,但与此同时拉曼信号的强度又与长度成反比,可选用 437nm 作为激发波长;利用拉曼光谱可直接测定固体粉末时,为降低对固体中杂质的荧光作用,可采用少许水溶解溶液后可测定之。

### 2 结语

由于我国对采血站设备的进一步调整与完善、生产技术的进一步完善,对蛋白药物质量具有更高的要求,目前药物中人血白蛋白含量测定方法有高效液相色谱(HPLC)技术、双缩脲比色法、密度仪检测法、旋光法、薄层扫描法、层析法、拉曼光谱法等,每个方法都具有各自的特点以及使用要求,我们在使用过程中可以根据实际情况和条件去应用,让蛋白药物得以更为科学合理、高效的使用。

### 参考文献:

- [1]赵斌,倪研,徐柯生, HPLC 法测定蛋白药物的蛋白质含量.中国输血杂志[J]1996,9(4):193,
- [2]王俊平,蒋冬玲,比色法测定蛋白药物含量.中国生化药物杂志[J]1994,15(1):566,
- [3]张凌燕,王焰,邓洋国,密度仪检测法用于蛋白药物含量测定.中国输血杂志[J]2003,6,16(3):191,
- [4]党西胜,宫玉英,王希军,等.旋光法测定蛋白药物含量的研究.河北医药[J]1994,16(2):106,
- [5]李耀冒,林敏,曾庆煜,薄层扫描法测定蛋白药物的纯度.药物分析杂志[J]1990,10(5):274,
- [6]郑秋君,胡忠玉,杨立清,等.应用层析法分离高纯度人血浆白蛋白.中国生物制品学杂志[J]1995,8(2):60.李耀冒,林敏,曾庆煜,薄层扫描法测定蛋白药物的纯度.药物分析杂志[J]1990,10(5):274,
- [7]王玉,王思寰,陈建国,等.拉曼光谱法快速鉴别蛋白药物.药物分析杂志 [J]2012,32(3):537.

基金项目:西安培华学院 2022 年校级大学生创新项目 (PHDC2022076)

作者简介:陈彦君(2002-),女,陕西西安人,本科,研究方向:药学

通讯作者:韩宁娟(1985-),女,陕西西安人,硕士,副教授,研究方向:药物分析。