

明胶和吸收性明胶海绵的总蛋白质含量测定

董智

(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂 南京 210038)

摘要 目的:测定明胶和吸收性明胶海绵的总蛋白质含量,为控制和提高产品质量提供依据。方法:分别用双缩脲法、联喹啉二羧酸法和考马斯亮蓝法测定了明胶和吸收性明胶海绵的总蛋白质含量。结果:考马斯亮蓝 G250 与明胶溶液的显色反应不够灵敏,而与吸收性明胶海绵的水解液不显色。双缩脲法和 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法的测定结果分别为 70%~78% 和 51%~64%。采用上述同一种方法分别测定明胶和吸收性明胶海绵的总蛋白质含量,结果无显著性差异。结论:考马斯亮蓝法不适用于明胶和吸收性明胶海绵的总蛋白质含量测定,而双缩脲法和 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法的测定结果具有参考价值。

关键词:明胶;吸收性明胶海绵;总蛋白质;双缩脲;2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠;考马斯亮蓝 G250

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)08-1563-04

Assay of total proteins of gelatin and gelatin sponge

DONG Zhi

(Nanjing Jinling Pharmaceutical Factory, Nanjing 210038, China)

Abstract Objective: The total proteins contents of gelatin samples and gelatin sponge samples are meant to known. **Method:** The total proteins contents of gelatin samples and gelatin sponge samples are determined by Biuret's agent 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinolin and coomassie brilliant blue G-250, respectively. **Result:** The results of Biuret's method, 70%~78%, are greater by about 20 percent points than BCA method, 51%~64%. The total proteins contents of gelatin samples and gelatin sponge samples are similar when using the same method. **Conclusion:** Bradford's method seems unfeasible to gelatin samples and gelatin sponge samples due to the insensitive coloration reaction of coomassie brilliant blue G-250 with samples. Biuret's method and BCA method could be applied for the determination.

Key words: total proteins; gelatin sponge; gelatin; Biuret's agent; 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinolin; coomassie brilliant blue G-250

明胶是 1 种从动物结缔组织中提取的蛋白质,一级结构包含 20 种氨基酸。吸收性明胶海绵是明胶的水溶液加入交联剂甲醛,在剧烈搅拌下发泡后,经冷冻成型、热风干燥、辐射灭菌制成的不溶于水的无菌多孔海绵状物,在临床上用于创面止血。该产品的化学本质为以甲醛交联的明胶蛋白质。

总蛋白质含量是上述 2 种产品的一个重要性质,但《中国药典》2010 年版二部收载的这两种产品的质量标准的均未包含该项指标。为控制和提高产品质量,本文参考《中国药典》2010 年版二部附录收

载的蛋白质含量测定等方法^[1,2],对收集到的药用明胶、照相明胶以及吸收性明胶海绵样品进行了测定。现将结果报道如下。

1 仪器与试剂

分析天平(METTLER, AE240);紫外-可见分光光度计(GENERAL 公司, TU-1221 型);移液器(北京青云卓立精密设备有限公司, 100 μ L);牛血清白蛋白化学对照品(中国药品生物制品检定所, 140619-200919);2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠(上海晶纯试剂公司,批号 22204,以下简称 BCA);

考马斯亮蓝 G250(国药集团化学试剂有限公司)。

2 双缩脲法

2.1 对照品溶液 取牛血清白蛋白化学对照品适量,加水溶解,配制成每 1 mL 中含 10 mg 的溶液。

2.2 供试品溶液 取明胶(或吸收性明胶海绵)约 0.3 g,精密称定,精密加水(或 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液) 25 mL,密塞,60 °C 水浴加热使完全溶解,迅速冷却至室温后作为供试品溶液。

2.3 标准曲线 精密量取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置具塞试管中,加水至 1.0 mL,加双缩脲试液 4.0 mL,立即混匀。室温放置 30

min,以 0 号管作为空白,测 540 nm 处吸光度。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。

2.4 样品测定 精密量取供试品溶液 1.0 mL,按“2.3”项下标准曲线的制作过程同法操作。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度,乘以稀释倍数,即得。

2.5 测定结果 见表 1。标准曲线为:

$$Y = 0.0472X + 0.01 \quad r = 0.9999$$

线性范围在 $2.0 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。

表 1 总蛋白质含量测定结果(%)

Tab 1 Results of total proteins assay with Biuret's method

样品名称 (samples name)	样品来源 (samples source)	产品批号 (batches number)	总蛋白质含量 (total proteins content)
明胶(gelatin)	上海鑫港明胶有限公司(Shanghai Xingang Gelatin Co Ltd)	/	76.76
	河南省焦作金箭明胶有限责任公司(Henan Jiaozuo Jinjian Gelatin Co Ltd)		78.70
	青海明胶股份有限公司(QingHai Gelatin Co Ltd)		77.67
	包头东宝明胶股份有限公司(Baotou Dongbao Gelatin Co Ltd)		77.67
	包头东宝乐凯彩感明胶股份有限公司(Baotou Dongbao Lucky Color Film Gelatin Co Ltd)		77.87
	罗赛洛(温州)明胶有限公司(ROUSSELOT (Zhejiang) Gelatin Co Ltd)		78.17
吸收性明胶海绵 (absorbable gelatin sponges)	PB Leiner		76.16
	南京金陵制药厂(Nanjing Jinling Pharmaceutical Factory)	100401	72.45
		100503	72.45
		100505	70.07

3 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法

3.1 对照品溶液 取牛血清白蛋白化学对照品适量,加水溶解,配制成每 1 mL 中含 0.8 mg 的溶液。

3.2 供试品溶液 取明胶(或吸收性明胶海绵)约 0.1 g,精密称定,精密加水(或 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸) 10 mL,密塞,60 °C 水浴加热使完全溶解,迅速冷却至室温。将上述溶液完全转移至 250 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀后作为供试品溶液。

3.3 标准曲线 精密量取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 分别置具塞试管中,加水至 0.5 mL,加铜-BCA 试液 10.0 mL,立即混匀。37 °C 水浴加热 30 min,放冷。以 0 号管作为空白测 562 nm 处的吸光度。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。

3.4 样品测定 精密量取供试品溶液 0.5 mL,按“3.3”项下标准曲线的制作过程同法操作。从线性

回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度,乘以稀释倍数,即得。

3.5 测定结果 见表 2。标准曲线为:

$$Y = 1.110X + 0.0172 \quad r = 0.9994$$

线性范围在 $0.162 \sim 0.81 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。

4 考马斯亮蓝法

4.1 对照品溶液 取牛血清白蛋白化学对照品适量,加水溶解,配制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液。

4.2 供试品溶液 取明胶约 0.5 g,精密称定,精密加水 10 mL,密塞,60 °C 水浴加热使完全溶解,迅速冷却至室温后作为供试品溶液。

4.3 标准曲线 精密量取对照品溶液 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL, 分别置具塞试管中,加水至 0.1 mL,加酸性染色液 5.0 mL,立即混匀。以 0 号管作为空白测 595 nm 处的吸光度。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方

程。

回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度,乘以稀释倍数,即得。

4.4 样品测定 精密量取供试品溶液 0.1 mL,按“4.3”项下标准曲线的制作过程同法操作。从线性

表 2 总蛋白质含量测定结果(%)
Tab 2 Results of total proteins assay with BCA method

样品名称 (samples name)	样品来源 (samples source)	产品批号 (batches number)	总蛋白质含量 (total proteins content)
明胶(gelatin)	上海鑫港明胶有限公司(Shanghai Xingang Gelatin Co Ltd)	/	58.92
	河南省焦作金箭明胶有限责任公司(Henan Jiaozuo Jinjian Gelatin Co Ltd)		51.24
	青海明胶股份有限公司(QingHai Gelatin Co Ltd)		54.35
	包头东宝明胶股份有限公司(Baotou Dongbao Gelatin Co Ltd)		57.06
	包头东宝乐凯彩感明胶股份有限公司(Baotou Dongbao Lucky Color Film Gelatin Co Ltd)		54.26
	罗赛洛(温州)明胶有限公司(ROUSSELOT (Zhejiang) Gelatin Co Ltd)		53.22
	PB Leiner		64.24
吸收性明胶海绵 (absorbable gelatin sponges)	南京金陵制药厂(Nanjing Jinling Pharmaceutical Factory)	100401	58.60
		100503	55.37
		100505	55.79

4.5 测定结果 均小于 1%,已明显偏离真实值,具体数据不再报道。标准曲线为:

$$Y = 0.7116X + 0.021 \quad r = 0.9916$$

线性范围在 0.1137 ~ 1.137 mg · mL⁻¹之间。

5 讨论

5.1 由于无法获得明胶对照品,只能采用蛋白质含量测定中常用的牛血清白蛋白对照品,故无法消除对照品与样品在化学性质上的差异所造成的系统误差。本文 3 种测定方法采用不同浓度的对照品溶液和供试品溶液是由于测定方法的灵敏度和线性范围不同所造成的,并无本质差别。

5.2 由于吸收性明胶海绵不溶于水,故先用 1 mol · L⁻¹ 盐酸在 60 °C 条件下将其适度水解后再进行测定。另外,由于样品呈海绵状,表观体积大,无法采用先加少量盐酸溶液加热使水解,然后完全转移、定容的方法制备所需浓度的供试品溶液,故本文采用将样品置于干燥的具塞锥形瓶内,精密而定量加入盐酸溶液,密封后加热水解的方法。

5.3 双缩脲法的原理是基于蛋白质分子中 2 个以上的肽键结构与 Cu²⁺ 在碱性溶液中形成紫红色配合物的反应^[1]。吸收性明胶海绵经盐酸水解后,肽键断裂,理论上可影响双缩脲反应,但本文所用的水解条件较温和,只造成少量肽键的断裂,对最终测定结果的影响有限。只要严格控制水解条件和反应时间,该法仍可控制样品的总蛋白质含量。

5.4 考马斯亮蓝法的标准曲线线性关系不理想, *r* 较小,标准曲线略呈拱形。

5.5 考马斯亮蓝法测蛋白质含量的原理为在酸性溶液中考马斯亮蓝 G250 与蛋白质分子中的精氨酸和芳香族氨基酸结合形成蓝色复合物,在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度呈正比^[1]。明胶分子中精氨酸和芳香族氨基酸残基含量较低,特别是芳香族氨基酸含量很低^[3],这可能是考马斯亮蓝法测定明胶的总蛋白质含量的结果(小于 1%)严重偏离真实值的原因之一。

5.6 文献报道考马斯亮蓝 G250 不与单体精氨酸、赖氨酸以及相对分子质量小于 3000 的多肽结合。^[4] 预试验发现,吸收性明胶海绵经盐酸水解后无法与考马斯亮蓝染色液显色。推测是由于吸收性明胶海绵水解成了多肽和氨基酸单体,考马斯亮蓝染料无法与其结合而显色所致。

5.7 采用常量凯式定氮法^[5] 测定明胶和吸收性明胶海绵的氮含量,结果均约为 16.0%。另测定商品明胶和吸收性明胶海绵的干燥失重,结果均约为 12%,与文献报道一致。如此可按明胶蛋白质换算系数 5.5 进行折算^[6],则样品的总蛋白质含量约为 88%。由于此结果并未去除非蛋白氮的影响,故大于样品中蛋白质的真实含量。

5.8 试验发现,明胶溶液加三氯乙酸试液后并未出现明显的混浊现象。另外,由于吸收性明胶海绵不

溶于水,也无法用三氯乙酸等蛋白质沉淀剂将蛋白氮与非蛋白氮分离。因此明胶和吸收性明胶海绵的蛋白氮含量测定方法有待进一步研究。

5.9 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法测定蛋白质含量的原理是蛋白质分子在碱性溶液中将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , Cu^+ 与 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸结合形成紫色复合物。^[1]可见该原理是基于蛋白质的还原性。明胶大分子的还原性主要体现在链上的某些具有还原能力的氨基酸残基上,如蛋氨酸、酪氨酸、组氨酸等,其中主要是蛋氨酸的贡献。^[7~10]作为对照品的牛血清白蛋白与作为样品的明胶,两者在还原性方面的差异成为影响该法测定结果准确性的首要因素,也是本文所用双缩脲法的测定结果普遍高于联喹啉二羧酸法的原因之一。

5.10 在联喹啉二羧酸法的测定结果中,PB Leiner公司的明胶样品结果偏高,可能与该样品的还原性较大有关,并不一定表明样品的蛋白质含量高。双缩脲法测定该样品,其结果并未明显高于其他样品,从1个方面证实了此推测。

5.11 本文所用双缩脲法的测定结果与文献报道bFGF胶原海绵的总蛋白质含量^[11]以及采用氨基酸自动分析仪测定明胶总氨基酸含量^[9,10]的结果基本吻合,表明该法具有一定的准确性和参考价值,但只有进行严格的方法学研究后才能证明其科学性。

参考文献

- 1 ChP (中国药典). 2010. Vol II (二部): Appendix(附录) VII M
- 2 DONG Zhi(董智). Determination of cross-linking degree of gelatin in gelatin sponge (吸收明胶海绵中明胶交联度的测定). *Chin*

- J Pharm Anal(药物分析杂志)*. 2010, 30(3): 511
- 3 XU Wen-da(徐文达). Lecture on basic chemistry of gelatin(明胶化学基础讲座). *Sci Technol Gelatin(明胶科学与技术)*, 1984, 4(4): 44
- 4 WANG Xiao-ping(王孝平), XING Shu-li(邢树礼). Determination of protein quantization using the method of coomassie brilliant blue(考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究). *Tianjin Chem Ind(天津化工)* 2009, 23(3): 40
- 5 ChP (中国药典). 2010. Vol II (二部): Appendix(附录) VII D
- 6 ZENG Guo-ai(曾国爱). On gelatin protein conversion factor F(关于明胶的蛋白质换算系数F). *Sci Technol Gelatin(明胶科学与技术)* 2003, 23(1): 48
- 7 LI XUN(李迅), PENG Bi-xian(彭必先). Study of photographic property of gelatin macromolecule(明胶大分子的照相性质研究). *Photogra Sci Photochem(感光科学与光化学)*, 1993, 11(2): 45
- 8 WANG Qing-lan(王庆岚), PENG Bi-xian(彭必先). The progress on study of reducing power of photo gelatin(照相明胶还原性的研究进展). *Sci Technol Gelatin(明胶科学与技术)*, 1987, 7(2): 57
- 9 CHEN Li-juan(陈丽娟), PENG Bi-xian(彭必先). The preliminary study of relationship between reducing power and methionine content of gelatin(明胶的还原性与蛋氨酸含量之间的关系初步研究). *Sci Technol Gelatin(明胶科学与技术)*, 1989, 9(1): 9
- 10 CHEN Li-juan(陈丽娟), PENG Bi-xian(彭必先). A study of the reducing power change of photo gelatin in dependence on their extraction depth(明胶大分子的还原性与抽提的关系). *Photogra Sci Photochem(感光科学与光化学)*, 1993, 11(4): 335
- 11 ZOU Hai-yan(邹海燕), YE Chun-ting(叶春婷), PENG Yan-hao(彭燕豪) et al. Determination of physicochemical properties of bFGF collagen sponge(bFGF胶原海绵的理化性质检测). *Acad J Guangdong Coll Pharm(广东药学院学报)* 2003, 19(1): 53

(本文于2010年8月5日收到)

《常用药品处方书写名与商品名互查手册》已出版

由解放军总医院王睿教授编写的《常用药品处方书写名与商品名互查手册》已在科学出版社出版发行,该书按照临床常用药物的系统进行分类,全书共分21章,对常用药物通用名与商品名进行了梳理和归纳,并简要介绍了相关药品的用法和用量。可供广大临床医师、药师、护士、医药学研究生参考使用。

当当网、卓越网、新华书店及医学书店有售。定价29.00元。免邮寄挂号费用,联系人:温晓萍;电话:010-64034601 64019031;地址:100717北京市东黄城根北街16号科学出版社温晓萍(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、发票等)。