

水解蛋白注射液中组胺的荧光测定法

吴 芝 清 任 向 宇

(河北大学生物工程研究所)

王银定 姚文藻* 甘 露* 王兴林** 国纪石**

(河北大学生物系, 保定)

提 要

对于 5% 混合氨基酸注射液中微量组胺 (Histamine) 的检测, 本文提出一种无须大型仪器设备、简便而灵敏的半定量方法, 可在一定程度上替代动物实验法。组胺的检测灵敏度为 10^{-9} g。

生物制品和医用注射剂中的组胺 (Histamine) 是降压物质的主要成分。降压物质的含量, 药典^[1]规定以动物实验(猫或狗)测定。医用水解蛋白注射液中降压物质的允许量, 国内生产厂家控制为每毫升不得超过 $0.1\mu\text{g}$ 组胺所致的降压程度。目前国内某些地区实验动物甚缺, 且价格较贵, 急需找出某种简便的组胺测定方法。

Shore 等^[2]的 OPT 法虽能测定血液中的组胺, 而且实现了分析的自动化^[3], 但不适用于水解蛋白注射液这类样品。高压液相色谱法可进行这类工作^[4], 而该设备一般实验室目前还不具备。另有多种方法^[5,6], 皆需较特殊的仪器或器材。我们建立的水解蛋白注射液中组胺的荧光半定量测定法, 无须特殊的仪器和试剂, 具有足够的检测灵敏度, 且操作方便, 可在一定程度上替代动物实验法。本方法的原理也适用于其他种类药剂中微量组胺的测定。

一、材料与仪器

(一) 材料

5-氨基萘-1-磺酰氯 (DNS-Cl), SIGMA 产品; 组胺, 上海生化所产品, 含量 97%; 水解蛋白注射液, 上海长征制药厂产品; 聚酰胺-6 薄膜 ($80 \times 80\text{mm}$), 上海试剂四厂产品; 其

他试剂皆国产市售品。

几种试剂的配制方法如下:

1. 碱性 NaClO_4 溶液: $1N \text{HClO}_4$ 120ml, $5N \text{NaOH}$ 42ml, 与无离子水 130ml 混合。

2. DNS-Cl 溶液: 以丙酮为溶剂, 使 DNS-Cl 的浓度为 2.5mg/ml 。

3. 组胺贮液: 取干燥的组胺少许精确称量, 按组胺含量标示计算, 以 $0.1N \text{HCl}$ 为溶剂制成 $100\mu\text{g/ml}$ 溶液, 装棕色瓶, 保存于冰箱中。使用前以 $0.1N \text{HCl}$ 稀释成规定浓度。

4. $0.1M \text{NaHCO}_3$ 缓冲液 ($\text{pH}9.2$): $0.1M \text{Na}_2\text{CO}_3$ 与 $0.1M \text{NaHCO}_3$ 按 1:9(V/V) 混合。

(二) 仪器

紫外分析仪 (254nm), 上海科艺光学仪器厂产品; 微量薄膜浓缩器, 本实验室设计组装, 已由河北大学机电厂组织批量生产。

二、方法与结果

(一) 水解蛋白注射液中组胺的测定方法

样品中的组胺含量较氨基酸 (5%) 低几个数量级, 它们与 DNS-Cl 具有相同的化合能力, 故无法直接测定, 需经萃取手续。萃取液浓缩

* 河北大学生物系 1985 年毕业生。

** 河北大学生物系 1984 年毕业生。

后,以 DNS-Cl 标记,用聚酰胺薄膜层析将 DNS-组胺分出,根据 DNS-组胺层析点的荧光量即可估算出样品的组胺含量。测定步骤如下:

1. 样品中组胺的萃取

基本按照 Shore 等^[2]的方法,稍有改进,程序如下:

取待测样品 2.0ml,加入碱性 NaClO₄ 溶液 7ml、正丁醇 (c. p.) 20ml 及固体 NaCl 3g,振荡萃取 5 分钟,500 × g 离心 5 分钟,弃水相,得正丁醇相约 20.9ml。自正丁醇相取样 19.0ml,加入以 NaCl 饱和的 0.1N NaOH 10ml,振荡萃取 1 分钟。500 × g 离心 5 分钟,弃水相,得有机相约 18.7ml。自有机相取样 17.5ml,加入正庚烷 (c. p.) 36ml、0.1N HCl 6.0ml,振荡萃取 10 分钟,离心如前,弃有机相,得水相约 6.4ml,用于测定。

与萃取前的样品比较,萃取液中残存氨基酸的数量及种类皆出现明显的变化,残存氨基酸以亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile) 及苯丙氨酸 (Phe) 为主,其他氨基酸或消失或仅存少量 (见图 1),这就为其后萃取液的 DNS-Cl 标记及聚酰胺薄膜层析创造了条件。

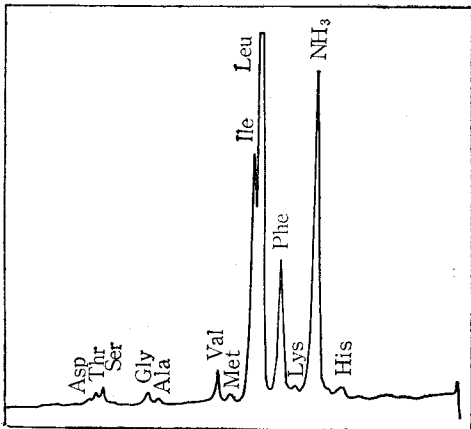


图 1 组胺萃取液中残存氨基酸的种类及数量比例
(由日立 835 型氨基酸自动分析仪测定)

2. 萃取液中组胺的荧光标记

取萃取液 5.0ml,在微量薄膜浓缩器中抽干后,加 0.1M NaHCO₃ 缓冲液 (pH9.2) 100

μl 及 DNS-Cl 溶液 100μl,室温下反应 5 分钟。之后加入丙酮:水 = 1:1(V/V) 溶液 300 μl,所得溶液用于层析。

3. DNS-组胺的聚酰胺薄膜层析

本方法所用聚酰胺薄膜的层析分离距离约 80mm,宽度可视点样数量而定。样品点的直径不超过 2mm,样品点间距离 10mm。以苯:冰醋酸 = 9:1(V/V)^[8] 为展层剂,单向上行层析。待溶剂前沿升至距离薄膜上缘约 5mm 时停止展层,冷风吹干后,于紫外灯 (254nm) 下观察。DNS-组胺特征层析荧光点的 R_f = 0.89, 很易辨识。

4. 样品中组胺含量的计算

我们测得 DNS-组胺在聚酰胺薄膜上的检测灵敏度为 0.001 μg,设正好处于检测灵敏度之荧光点的点样量为 x μl,则可知点样液 500 μl 中组胺的含量为

$$\frac{0.001}{x} \cdot 500 = \frac{0.5}{x} (\mu g)$$

已知待测样品的采样量为 2.0ml,组胺自样品中萃取回收率为 81.3%,萃取后的取样比例为 $\frac{5}{6.4}$,故可推知待测样品中组胺的浓度为:

$$C = \frac{0.5}{x} \left/ \left(\frac{5}{6.4} \cdot 0.813 \cdot 2 \right) \right. \\ = \frac{0.394}{x} (\mu g/ml) \dots \dots (1)$$

设样品的浓度为 0.1 μg/ml (限额浓度),由式 (1) 可知,层析时点样 3.94 μl,则 DNS-组胺层析点的荧光量正好处于检测灵敏度。故对于一个未知的待测样品,层析时规定点样 4 μl,观察 DNS-组胺特征层析荧光点的出现与否,以此为指标对其组胺含量的范围,可立即明确作出数量级程度的半定量估计:如果层析点的荧光强烈,肉眼明晰可辨,则样品的组胺含量必高于 0.1 μg/ml,超出了规定的限额;如果层析点的荧光微弱,以肉眼无法辨识,则样品的组胺含量必低于 0.1 μg/ml,可视为合格。

(二) 本方法中技术参数的测定

1. 组胺萃取回收率的测定

表 1 组胺萃取回收率的测定数据

样 品	荧光强度测量值 (F) (任意单位)	$\bar{F} \pm \sigma_n$
0.25 $\mu\text{g/ml}$ 组胺	47.0, 49.0, 47.5, 48.0	$47.9 \pm 0.9 (F_0)$
样品 I	49.0, 51.0, 49.0	49.7 ± 1.2
样品 II	49.0, 48.0, 48.0	48.3 ± 0.6
样品 III	48.0, 48.0, 41.0	48.0 ± 0
		$48.7 \pm 0.9 (F_x)$

取组胺溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$) 2.0ml 为样品, 按上述萃取程序处理, 所得萃取液稀释 10 倍后以 Shore 等^[2]的 OPT 法测定其组胺量。我们使用 930 型荧光计 (上海第三分析仪器厂产品), 激发波长 360nm, 发射波长 450nm。每个样品测三次, 其平均值记为 F_x ; 另对浓度为 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 的组胺溶液, 不经萃取也按上述方法测定其荧光强度, 平均值记为 F_0 , 所得数据列为表 1。

根据关系式 $\frac{F_x}{F_0} = \frac{C_x}{C_0}$ 计算, 投入的 20 μg

组胺经萃取后尚存 16.256 μg , 故本萃取程序的组胺回收率为 81.3%。

2. 组胺与 DNS-Cl 反应时间的测定

许多作者介绍 DNS-Cl 与氨基酸的反应需 2—4 小时^[8], 尚未见组胺与 DNS-Cl 反应时间的报道。我们以如下方法对反应时间进行了测定。

取组胺贮液 (100 $\mu\text{g/ml}$) 0.2ml, 抽干后加 0.1M NaHCO_3 缓冲液 100 μl 、DNS-Cl 溶液 100 μl 混匀, 室温下反应。当反应进行至 0.5、5、10 及 20 分钟时取样, 每次取样 0.1 μl , 立即在聚酰胺薄膜上点样, 吹干后立即展层。要求点样时间不得超过 5 分钟。在每片聚酰胺薄膜上, 于样品点右侧事先皆点 DNS-Cl 标记两小时以上的组胺溶液 0.1 μl 作为对照, 所得结果如图 2 所示。

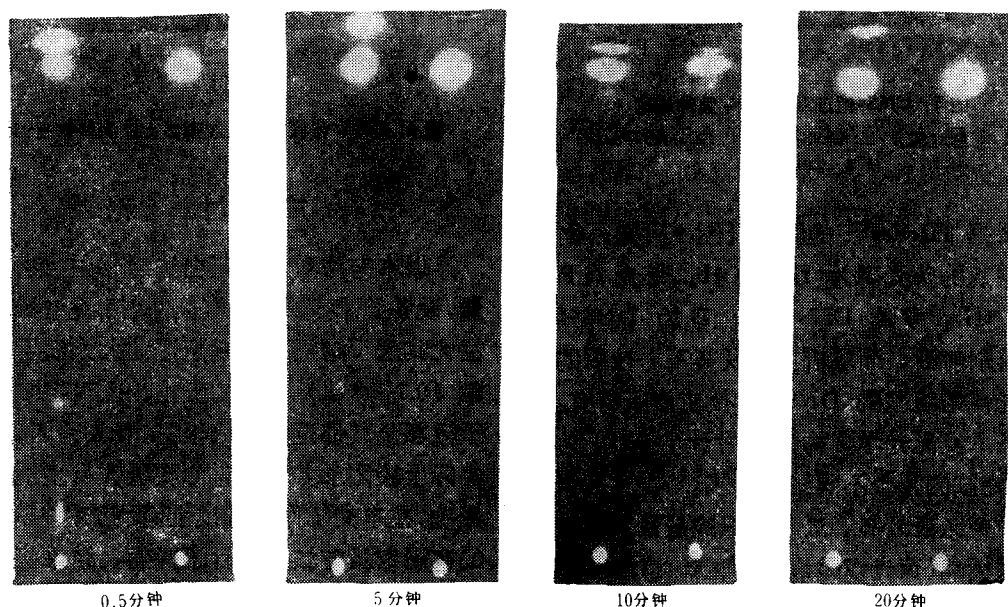


图 2 组胺与 DNS-Cl 反应 0.5、5、10 及 20 分钟时取样的聚酰胺薄膜层析图谱

由图 2 可见, 经 5 分钟反应所得的 DNS-组胺层析图谱与反应 20 分钟或反应 2 小时以上所得图谱无大差别, 故可以认为反应无须很

长时间便可完成, 我们把 DNS-Cl 与组胺的反应时间定为 5 分钟。

3. DNS-组胺层析点 R_f 值的测定

混合氨基酸的 DNS-标记物在使用本文的展层剂层析时,已知 DNS-脯氨酸 (DNS-Pro) 及 DNS-异亮氨酸 (DNS-Ile) 跑在所有 DNS-氨基酸之前^[7],我们发现 DNS-组胺则跑在 DNS-Pro 和 DNS-Ile 之前。为了确定 DNS-组胺的 R_f 值,进行了如下实验。

取浓度为 $0.36\text{nM}/\mu\text{l}$ 的组胺、脯氨酸及异亮氨酸各 $50\mu\text{l}$, 分别抽干,均加 0.1M NaHCO_3 缓冲液 $100\mu\text{l}$ 、DNS-Cl 溶液 $100\mu\text{l}$, 反应 2 小时后于同一聚酰胺薄膜上各点样 $1\mu\text{l}$, 并点样 DNS-Cl 与 0.1M NaHCO_3 缓冲液的反应液 $1\mu\text{l}$ 为对照,层析图谱如图 3 所示。

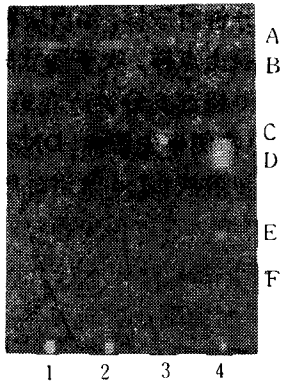


图 3 DNS-组胺层析点 R_f 值的测定

1.空白对照; 2. DNS-组胺; 3. DNS-Pro;
4. DNS-Ile

根据 Hartley^[7] 的图谱及图 3 可知,位于图 3 原点的荧光点为 DNS-OH, 荧光点 E 为 DNS-NH₂, C 为 DNS-Pro, D 为 DNS-Ile, A 为溶剂前沿;而层析点 B 及其下方较弱的几个荧光点为组胺的 DNS-Cl 反应液所特有。由于组胺本身无光学异构体,估计它们可能是 DNS-组胺的几个不同结构形式。在这几个层析点中荧光量最高、最易辨识的是紧靠溶剂前沿的层析点(荧光点 B),故确定该点为 DNS-组胺的特征层析点,其 R_f 值约为 0.89。

4. DNS-组胺在聚酰胺薄膜上的检测灵敏度

一般认为 DNS-氨基酸在聚酰胺薄膜上的检测灵敏度为 $0.01\mu\text{g}$ ^[8],对于 DNS-组胺的检

测灵敏度我们以如下方法进行了测定。

将组胺贮液稀释为 $0.004\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 取 $50\mu\text{l}$ 抽干,加入 0.1M NaHCO_3 缓冲液 $100\mu\text{l}$ 及 DNS-Cl 溶液 $100\mu\text{l}$, 室温反应 5 分钟,此时溶液中 DNS-组胺的浓度为 $0.001\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 分别点样 1、2、4、5 μl 层析,结果如图 4 所示。

由图 4 可见,点样 $1\mu\text{l}$ 时 DNS-组胺的层析点已肉眼可辨,进一步的实验证明,点样 $0.5\mu\text{l}$ 的 DNS-组胺层析点也能隐约看出。考虑到观察者个人视力的差别及心理因素的影响,我们将 DNS-组胺在聚酰胺薄膜上的检测灵敏度定为 $0.001\mu\text{g}$ (10^{-3}g)。

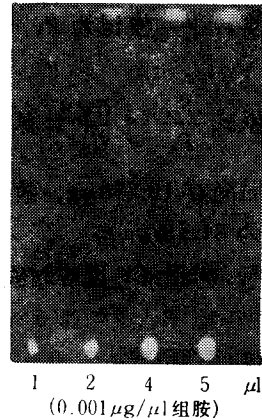


图 4 DNS-组胺在聚酰胺薄膜上检测灵敏度的测定

三、讨 论

以本方法对水解蛋白注射液中组胺半定量,设备要求不高,操作简便,费用也低。本方法尤其适于对组胺含量超过或大大低于规定限额 ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) 样品的查出,但对组胺含量恰于限额及其邻近样品的鉴别,受人为因素影响。实际上较困难。为了排除实验人员主观因素的影响,在本文工作的基础上,我们对样品中组胺的客观定量方法也进行了探索,结果将另文报告。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会:《中华人民共和国药典》(1985年版),化学工业出版社和人民卫生出版社,北京,附录第 88 页,1985。

三碘甲状腺原氨酸(T_3)和甲状腺素 (T_4) 固相放射免疫联合测定法

连秉钧 张 杰 王明华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

提 要

三碘甲状腺原氨酸 (T_3)、甲状腺素 (T_4) 固相放射免疫联合测定法,是将 T_3 抗体涂布在塑料小球上,将 T_4 抗体涂布在塑料管上。这种联合测定主要解决了 T_3 抗体对 T_4 的交叉反应。本法能在同一试管内进行,只需 $50\mu\text{l}$ 血清样品,90 分钟反应,可同时精确地测出两种激素水平,它比以往单独测定 T_3 或 T_4 的 PEG 双抗法更精确、快速和简便。

T_3 和 T_4 固相放射免疫联合测定方法,是在原 T_4 固相放射免疫测定法的基础上建立的^[1]。在测定甲状腺功能以及了解甲状腺病治疗过程中的病情动态变化时, T_3 测定法并不能完全代

替 T_4 法,两者之间存在互补关系。一般情况下,当甲亢患者的 T_4 值高, T_3 值也高;但有时 T_3 值高, T_4 值正常,诊断为 T_3 型甲亢。因此,为了进一步确诊,就必须同时测定患者血清中的 T_3 和 T_4 的含量。过去虽有分别测定二者含量的方法,但因不是联合测定,因而就增加了重复操作的误差。而联合测定法能同时取得两项指标,提高了诊断的准确性,且方法简便,快速,很适用于地方甲状腺疾病的普查工作。

一、材料与 方法

1. T_3 和 T_4 抗体的固相载体

直径 6.35mm 的聚苯乙烯小球,涂布 T_3 抗体(图 1)即为 T_3 抗体固相。10 × 55mm 的聚甲基丙稀酸甲脂的塑料小管,涂布 T_4 抗体,即为 T_4 抗体固相。它们的非特异性结合率均小

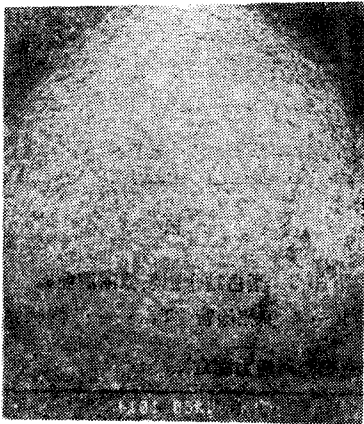


图 1 涂布 T_3 抗体的聚苯乙烯小球电镜扫描图 (1×95)

- [2] Shore, P. et al.: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 127, 182, 1959.
- [3] Evans, D. P. et al.: *Life Science*, 12, PartII, 327, 1973.
- [4] Devalia, J. L. et al.: *J. Chromatogr.*, 343(2), 407, 1985.
- [5] Tadao Sakai et al.: *Analyst* (London), 109 (12), 1569, 1984.
- [6] Haimart, M. et al.: *Agents Actions*, 16(3—4), 71, 1985.
- [7] Hartley, B. S.: *Biochem. J.*, 119 (5), 805, 1970.
- [8] 武祥福等:《生物化学与生物物理进展》, 6, 68, 1979。

[本文于 1986 年 1 月 29 日收到]