

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПАРАМЕТРОВ И КОЛЛИГАТИВНЫХ СВОЙСТВ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АЛЬБУМИНА

Евселева Е.А., Симонян Е.В., Миняева О.А.

*ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, Россия (454092 Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail: kanc@chelsma.ru*

Исследованы пути совершенствования способов контроля качества белковых препаратов на примере раствора альбумина 10% для инфузий. С помощью электрофореза в агаре и на пленках из ацетатцеллюлозы определена однородность альбумина. Сравнение результатов электрофореграмм белков сыворотки крови, полученных с использованием мембран из ацетатцеллюлозы и агарового геля, не выявило существенных различий. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии исследованы молекулярные параметры водных растворов альбумина. Установлено, что введение в подвижную фазу кислоты трихлоруксусной в концентрации 0,1% способствует появлению пиков примесных белков. Методом осмометрии выявлен линейный характер зависимости температуры замерзания от концентрации раствора альбумина, что свидетельствует о выполнении правила Вант – Гоффа для осмотического давления растворов неэлектролитов. Показано, что альбумин преимущественно находится в виде мономерных молекул, свернутых в глобулы.

Ключевые слова: альбумин, мономеры, высокоэффективная жидкостная хроматография, осмометрия.

## DETERMINATION OF MOLECULAR PARAMETERS AND COLLIGATIVE PROPERTIES OF WATER SOLUTIONS OF ALBUMIN

Evselyeva E.A., Simonyan E.V., Minyaeva O.A.

*South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, street Vorovskiy, 64), e-mail: kanc@chelsma.ru*

Ways of improving the quality control methods is investigated for protein drugs example 10% albumin solution for infusion. By means of electrophoresis in agar and acetate films of albumin is determined the uniformity . Comparison of the results electrophoregrams serum proteins obtained using cellulose acetate membranes and agar gel revealed no significant differences. The molecular parameters of aqueous solutions of albumin is investigated by high performance liquid chromatography (HPLC). It is found, that the injection trichloroacetic acid with 0.1 % concentration in the mobile phase facilitate the appearance of peaks of impurity proteins. The linear dependence of the freezing temperature on the concentration of albumin is detected by osmometry method. It is evidenced that the Van't - Hoff rule is observed for the osmotic pressure of solutions of non-electrolytes. Demonstrated that albumin is predominantly in the form of monomeric molecules folded into globules.

Keywords: albumin, monomers, high performance liquid chromatography, osmometry.

### Введение

Интерес к исследованию альбумина, неугасающий последние 40 лет, связан с открытием всё новых его функций в организме. Уникальное строение альбумина позволяет ему связывать различные по своей химической природе вещества и переносить их в крови. Альбумин участвует в антиокислительных процессах, в поддержании онкотического давления плазмы, в направленной передаче нейтрофилов в очаги воспаления и т. д. [4]. Значение альбумина, как и других белков, в поддержании гомеостаза огромно. Однако известно, что при связывании белковых молекул с различными лигандами, их конформация определённым образом изменяется. Альбумин может образовывать димеры, состоящие из двух молекул, связанных дисульфидным мостиком через цистеиновые аминокислотные

остатки, а также олигомеры. Примеси димеров и других олигомеров в препарате альбумина в количественном отношении могут варьировать от 5 – 10% и более [4].

**Цель исследования** - изучение молекулярных параметров и коллигативных свойств водных растворов альбумина.

#### **Материалы и методы исследования**

В качестве объекта исследования использовали раствор альбумина для инфузий с концентрацией 10%, производимый на Челябинской станции переливания крови.

Определение молекулярных параметров альбумина проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил с добавлением раствора трихлоруксусной кислоты. Длина волны детектирования – 280 нм, поскольку в этой области поглощают большинство аминокислот, входящих в состав альбумина, скорость подачи элюента – от 50 до 150 мкл/мин. Испытание проводили в сравнении со стандартным образцом предприятия альбумина.

Электрофоретическую однородность препарата оценивали методом электрофореза на пленке из ацетатцеллюлозы на приборе УЭФ-01-АСТРА; в качестве красителя использовали пунцовый С, в качестве отмывающего раствора – кислоту уксусную. Просветляющим раствором служило вазелиновое масло и смесь ледяной уксусной кислоты и ацетона в соотношении 1:1. Считывание результатов электрофореза и их обработка производилось с помощью специальной программы, которая совместно с персональным компьютером и планшетным сканером выполняет функции денситометра. Определение фракционного состава проводили методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле. В качестве реактивов использовали агар «Дифко» фирмы «Defco Laboratories», буферный раствор для электрофореза белков, антисыворотки для иммуноэлектрофореза к белкам плазмы крови человека, разрешенные к применению Министерством РФ, краситель бромфеноловый синий водорастворимый.

Определение температуры замерзания проводили на автоматическом криоскопическом осмометре ОМТ–5–02 [2, 3]. Предварительно прибор калибровали с помощью серии растворов рабочих стандартных образцов натрия хлорида. Испытуемый раствор альбумина объемом 0,2 мл помещали в кювету прибора, погруженную в термостат с контролируемой температурой, и замораживали. По зафиксированной температуре замерзания автоматически определяется осмолярность раствора.

#### **Результаты и их обсуждение**

По результатам электрофоретических исследований трех серий препаратов раствора альбумина, на электрофореграмме выявлена только одна интенсивная дуга преципитации.

Содержание раствора альбумина 10%-ного в препарате составило  $99,61 \pm 0,03\%$ . Сравнение результатов электрофореграмм белков сыворотки крови, полученных с использованием мембран из ацетата целлюлозы и агарового геля, не выявило существенных различий. Использование мембран из ацетатцеллюлозы позволяет при относительно низкой их стоимости и доступности за короткое время получить четкое фракционирование и возможность количественной оценки белковых фракций. Параллельно в аналогичных условиях проводили испытание со стандартом, полученным из плазмы здоровых людей, путем фракционирования по модифицированному методу Кона [6]. Полученные результаты свидетельствовали об электрофоретической однородности стандарта и испытуемого раствора белка.

Основным показателем качества альбумина является сохранение нативности молекул в процессе получения и хранения препарата. Поэтому препарат с высоким содержанием мономерного альбумина имеет более высокую лечебную эффективность, осмотическую активность, длительный период циркуляции в организме и отличается отсутствием аллергических реакций. Для выявления структуры и полиморфизма биологических макромолекул, наблюдения за их конформационными превращениями под воздействием различных физико-химических факторов в молекулярной биологии и биофизике широкое распространение получили многочисленные разновидности хроматографических и электрофоретических методов. Одной из основных характеристик физико-химического состояния белков является величина их молекулярной массы. Особенно важное значение имеет данный параметр для олигомерных белков, состоящих из двух и более полипептидных цепей (субъединиц), которые склонны при изменении ближайшего микроокружения или под действием физико-химических факторов либо образовывать более крупные агрегаты, либо распадаться на исходные субъединицы. Изменение молекулярной массы сложных белков влечет за собой изменение конформации белковой глобулы в целом и, как следствие этого, изменение функциональной активности белка.

При определении и анализе молекулярных параметров альбумина методом ВЭЖХ в изократическом режиме было установлено, что при содержании кислоты трихлоруксусной в подвижной фазе 0,1% на хроматограмме наблюдается появление дополнительных пиков, соответствующих полимерам и агрегатам. Увеличение концентрации трихлоруксусной кислоты до 0,5% не влияет на степень разрешения, но при этом оказывает разрушающее воздействие на хроматографическую колонку. Однако, снижение концентрации менее 0,1% нежелательно, так как из-за низкого содержания примесных белков (димеров, олигомеров и т.д.) возможно непроявление их пиков. Было также установлено, что оптимальная скорость подачи элюента составляет 100 мкл/мин. В этих условиях время удерживания основного

пика альбумина находится в пределах 4,5 мин. Анализ всех серий раствора альбумина, проведенный за 12 месяцев, показал, что суммарное содержание полимеров и агрегатов находилось в пределах 0,22 – 1,51%, что соответствовало требованиям ФСП [1].

Молекулы альбумина, а также ассоциаты молекул, присутствующие в водных растворах, могут образовывать глобулы [5]. Для проверки данной гипотезы оценивали осмолярность раствора как характеристику, выражающую осмотическое давление через суммарную концентрацию кинетически активных частиц в единице объема раствора.

Определение эффективной осмотической концентрации и понижения температуры замерзания раствора при помощи автоматического осмометра является достаточно экспрессным методом, требующим очень малого количества испытуемого раствора, и характеризующимся высокой воспроизводимостью результатов. Согласно проведенным исследованиям 10%-ный раствор альбумина для инфузий изотоничен крови: его осмолярность составляет  $\bar{C} = 300 \pm 3$  мОсм/кг при понижении температуры замерзания раствора относительно воды на  $\Delta t_{зам} = -0,280 \pm 0,003$  °С.

Для установления правильности и линейности рекомендуемой методики готовили серию разведений стандартного раствора альбумина для инфузий в концентрациях 1 – 10% и 0,1 – 1%, и проводили определение температуры замерзания и осмолярности. Было установлено, что температура замерзания в обоих интервалах концентраций линейно зависит от концентрации. Уравнение линейной регрессии имеет вид:  $\Delta t_{зам} = (2,60 \pm 0,07) \cdot 10^3$  °С (рис. 1). Критерием приемлемости методики является коэффициент корреляции, величина которого должна быть не ниже 0,99. Для экспериментальных данных  $R = 0,997$ , что соответствует критерию приемлемости. Поскольку линейная зависимость температуры замерзания от концентрации отвечает критерию приемлемости, то методика определения концентрации альбумина в водных растворах по калибровочному графику  $\Delta t_{зам} = f(C)$  при концентрации белка до 10% от может быть использована для количественного определения альбумина и контроля качества препарата.

Известно [5], что осмотическое давление в реальных растворах высокомолекулярных соединений описывается уравнением Галлера  $\pi = \frac{R \cdot T \cdot C}{M} + bC^2$ , где  $C$  - массовая концентрация раствора;  $R$  - универсальная газовая постоянная;  $T$  - температура в стандартных условиях;  $b$  - константа, учитывающая гибкость и форму макромолекул. При низких концентрациях, когда  $bC^2 \rightarrow 0$ , и в случае глобулярной структуры макромолекул вещества в растворе ( $b = 0$ ) уравнение Галлера переходит в уравнение Вант-Гоффа

$$\pi = \frac{R \cdot T \cdot C}{M}.$$

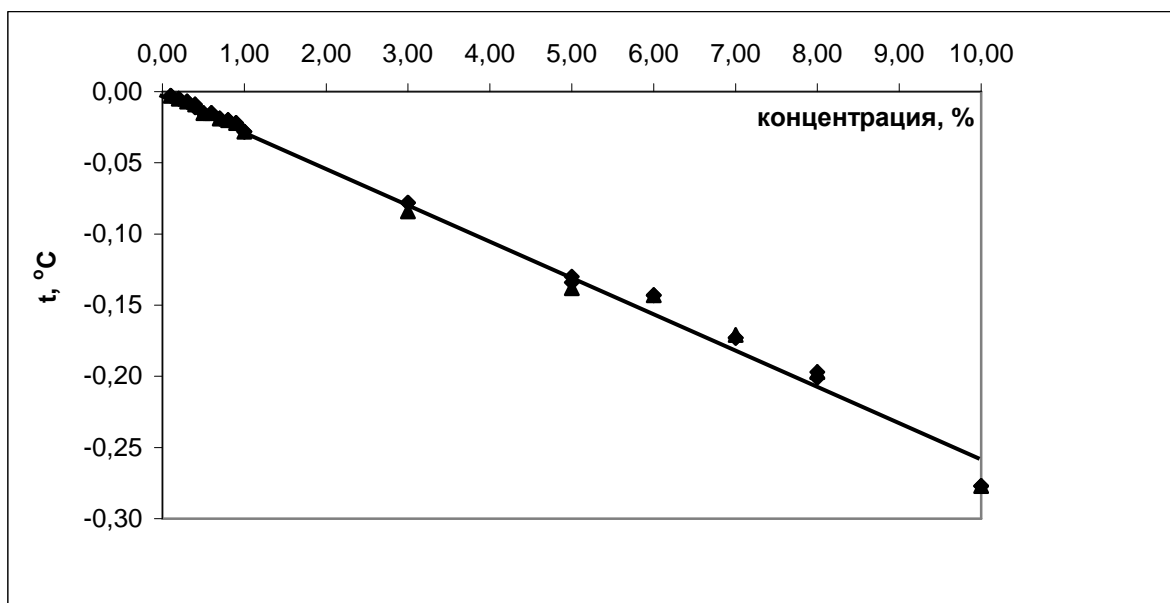


Рис. 1.

Зависимость понижения температуры замерзания раствора от концентрации альбумина

Для определения формы нахождения макромолекул альбумина в водных растворах

была изучена закономерность изменения величины  $\frac{\pi}{R \cdot T \cdot C}$  от массовой концентрации белка (рис. 2).

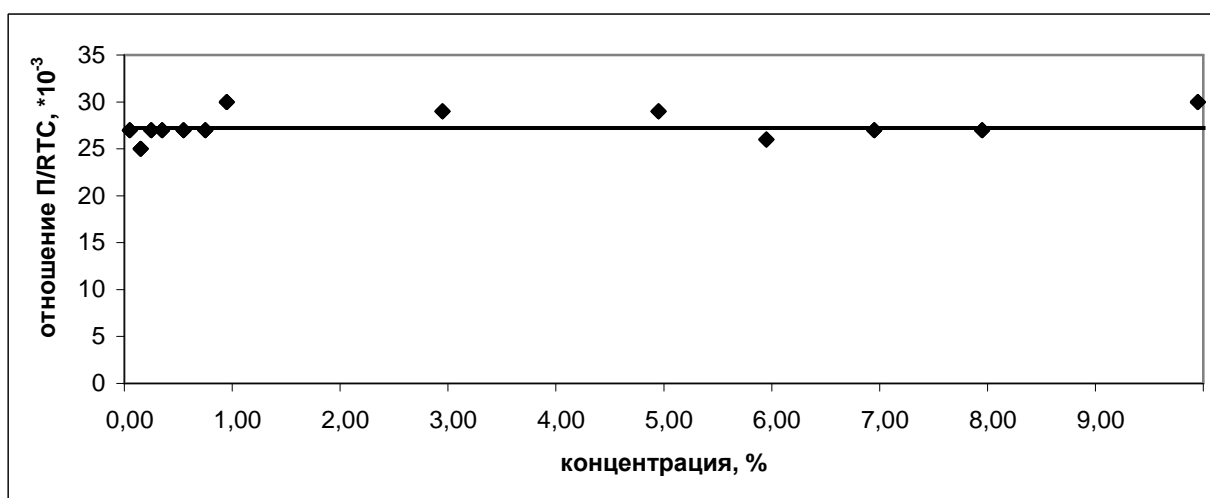


Рис. 2.

Зависимость величины  $\frac{\pi}{C \cdot R \cdot T}$  от массовой концентрации альбумина

Поскольку график  $\frac{\pi}{R \cdot T \cdot C} = f(C)$  представляет собой прямую линию, проходящую параллельно оси концентраций, величина  $\frac{\pi}{R \cdot T \cdot C}$  не зависит от  $C$ . По результатам метрологической обработки было установлено, что угловой коэффициент прямой незначимо

отличается от нуля. Это однозначно свидетельствует о том, что молекулы альбумина в водном растворе находятся в виде глобул.

### **Выводы**

Показана возможность идентификации, количественного определения и оценки степени чистоты раствора альбумина в процессе производства, а также возможность установления содержания олигомеров с помощью сочетания различных вариантов хроматографии (ВЭЖХ, капиллярный электрофорез).

Обосновано использование коллигативных свойств растворов альбумина (метод осмометрии) для оценки степени чистоты и количественного определения содержания белка.

### **Список литературы**

1. Альбумин 10% раствор для инфузий. ФСП ЛС — 001269 - 061011.
2. Государственная фармакопея Республики Беларусь, т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств. – Минск, 2006. – 656с.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XII издание. Часть I / Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. - 704с.
4. Роль и эффективность препаратов альбумина в интенсивной терапии: состояние вопроса в 2006 году / Б.Р.Гельфанд, Д.Н.Проценко, О.А.Мамонтова, О.В.Игнатенко, Е.Б.Гельфанд, О.С.Шипилова// Хирургия. Consilium medicum, 2006 — № 1 — с. 20-26.
5. Физическая и коллоидная химия: учеб. для фармац. вузов и факультетов / под ред. проф. Беяева А.П.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008 г. – 700 с.
6. Шевченко О.П., Долгов В.В., Олефиренко Г.А. Электрофорез в клинической лаборатории. Белки сыворотки крови. - Тверь: Из-во: «Триада», 2006 г. - 160с.

### **Рецензенты:**

Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии, ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, г.Челябинск.

Лиходед В.А., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации ЮУГМУ, ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, г.Челябинск.