

静脉注射丙种球蛋白的溶液性质 及稳定性研究*

梁国眉 冯榕荫 梁雪薇

(测试中心)

摘 要

采用小角激光光散射法(LALLS)结合粘度测定,分别对在不同pH和离子强度下的人血免疫丙种球蛋白(IgG)溶液性质进行了研究。结果表明,IgG在溶液中存在着不同的结构层次,包括单体、二聚体、聚集体、聚集堆积至沉淀析出。水溶性高分子聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)的加入有利于保护丙球单体的稳定,起着防止其自身聚集的作用。

关键词 小角激光光散射,静脉注射免疫丙球蛋白,聚乙烯基吡咯烷酮,聚集体

正常人血中含有的免疫丙球蛋白(IgG)几乎是血液中一切有效抗体的总汇。在IgG分离和储存过程中,部份血清蛋白质会发生分子间吸附,生成聚集体。使用这些IgG制剂用于静脉注射时,IgG的聚集体会导致人体内抗补体活性而引起某些不良反应,严重者甚至会出现过敏性休克。所以,排除IgG中的聚集体便成为制备静脉注射IgG的必要条件^[1]。目前对从人血中分离制备静注IgG制剂的研究工作渐多^[2,3]。本文用小角激光光散射法(LALLS)和粘度法对不同pH值和盐浓度下及加入聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)的IgG溶液性质进行了研究,并对IgG单体在溶液中的稳定机理进行了探讨。

1 实验部份

1.1 试样

人血肌注IgG,广州中心血站提供,其浓度用凯氏定氮法和酚试剂法测定^[4]。PVP, M_w 为 8.8×10^4 (LALLS测定),日本生产。

1.2 溶液折光指数随浓度变化率(dn/dc)及特性粘度 $[\eta]$ 的测定

配制IgG浓度依次递减的各组稀溶液,稀释剂分别为不同pH和NaCl浓度及磷酸盐缓冲液的水溶液,并加入PVP进行比较。使用美国LDC/Milton Roy公司的示差折光仪KMX-16和乌氏粘度计分别测定各种IgG溶液的 dn/dc 和 $[\eta]$ 。

本文1990年9月6日收到

*广州市科委重点研究资助项目;黄颖晖曾参加蛋白质浓度测定工作

1.3 静态光散射的测量

IgG溶液的配制如前。根据Rayleigh-Debye理论, 使用美国LDC/Milton Roy公司的KMX-6小角激光光散射仪, 测定IgG在不同盐溶液中的表观重均分子量($\bar{M}_{w,app}$)和反映溶液中各种分子间相互作用的第二维利系数(A_2)^[6], 计算公式如下:

$$\frac{HC}{\bar{R}_\theta} = \frac{1}{\bar{M}_w} + 2A_2C \quad (1)$$

其中, \bar{R}_θ 为溶质的剩余瑞利因子, H 为体系的光学常数。

$$H = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \left(\frac{1 + \cos^2\theta}{2} \right) \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 IgG的等电点及其水溶液性质

当蛋白质处在等电点时, 有最小的溶解度, 这时总的自由电荷为零。每一种血浆蛋白质均有其等电点, IgG的等电点是pH为5.8~7.3^[3]。

由于IgG单体分子链具有大量的极性基团, 大分子之间存在着较强的氢键相互作用, 因此溶液中存在着不稳定因素。实验表明, 溶液的pH值对IgG在溶液中的构型和状态有很大影响。pH在5.4~8.1范围, IgG水溶液呈现白色浑浊, 显示出单体分子间的高度聚集堆积, 表明IgG不溶于中性无盐的水溶液中; 当pH<5时, 溶液澄清透明, 但实验所测IgG的 \bar{R}_θ 值变化起伏很大, 无法稳定, 因此也不能按(1)式获得此时IgG的分子量。由于 \bar{R}_θ 测定值直接依赖于散射大分子的分子量、分子链尺寸和形态^[6], 所以可以认为pH<5的IgG水溶液即使澄清透明, 其单体也是不稳定的, 存在着分子间的瞬时缔合与离解或单体分子链的扩展与收缩; 但在同样的IgG溶液中, 加入微量的PVP, \bar{R}_θ 测定值即显得十分稳定, 如表1所示, 初步表明PVP的存在对IgG单体起到较好的稳定作用。

表1 光散射法测定IgG溶液的 \bar{R}_θ 值(pH<5)

Tab. 1 \bar{R}_θ values of Immunoglobulin G solutions determined by LALLS(pH<5)

溶液	[IgG] (g/ml)	$\bar{R}_\theta \times 10^5$ (cm ⁻¹)
IgG/H ₂ O	3.724×10^{-3}	5.238, 6.781, 8.314, 9.976
	5.693×10^{-3}	2.348, 2.869, 3.253, 3.841
	9.83×10^{-3}	5.811, 6.435, 7.622, 8.373
	1.293×10^{-2}	8.691, 10.51, 12.1, 12.54
IgG-PVP/H ₂ O	5.11×10^{-4} ([PVP] = 2.49×10^{-5})	2.087, 2.091, 2.108

2.2 IgG盐溶液的性质及单体稳定性的探讨

表2列出了在静态光散射实验中, 盐浓度及PVP对IgG的溶液性质和单体稳定性的

影响。

IgG单体的一级结构分别由两对相同的多肽链组成,其分子量为 1.5×10^5 ^[7]。IgG在磷酸盐缓冲溶液中澄清透明,表明盐的加入能增加IgG的水溶性;光散射测量结果, $\bar{M}_{w,app}$ 为 $(3.20 \sim 3.40) \times 10^5$,表明在强离子强度下,IgG发生缔合,形成二聚体和多分子聚集体,导致重均分子量明显增大;同时, A_2 为负值,表明溶液中IgG处于不稳定的缔合状态。

表2 离子强度和PVP对IgG溶液静态光散射参数的影响

Tab. 2 Effects of ion strength and PVP on static light scattering parameters

溶 液	溶解度 试验	n (25°C)	dn/dc (ml/g)	$\bar{M}_w \times 10^{-5}$ (g/mol)	$A_2 \times 10^4$ ($cm^3 \cdot mol/g^2$)	
IgG/NaCl aq.	[NaCl] = 0.02mol/L	微白色 浑浊				
	[NaCl] = 0.15mol/L	澄清透明	1.3354	0.196	2.00 1.99	0.0181 0.017
IgG/Na ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄ + NaCl aq.	[Na ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄] = 0.1mol/L	澄清透明	1.3368	0.173	3.20	-0.845
	[NaCl] = 0.1mol/L			3.40	-1.71	
IgG-PVP/ NaCl aq.	[NaCl] = 0.15mol/L	澄清透明	1.3341	0.189	1.62	1.02
					1.75	1.00
					1.71	2.03
					1.65 1.74	1.66

NaCl的加入同样能增加IgG的水溶性,当NaCl浓度为0.02mol/L时,溶液呈微白色浑浊,但其浑浊程度较中性的无盐水溶液小。IgG在生理盐水溶液([NaCl] = 0.15mol/L)中溶液澄清透明, $\bar{M}_{w,app}$ 为 2.0×10^5 , A_2 为正值,表明IgG在生理盐水中比较稳定,这为使用生理盐水作为静脉注射用IgG的主要稀释保存液提供了实验依据。测得的 $\bar{M}_{w,app}$ 较单体分子量大,可以认为这是由于在血浆分离提取IgG的过程中,产生部分IgG二聚体和多聚体所致。这一实验结果与肌注IgG/生理盐水溶液不能用于静脉注射的事实是一致的。由于IgG仍有一定的缔合体存在,所以 A_2 仍是一个接近零的正数。

上述 R_θ 测定的实验已表明,少量PVP的加入能稳定IgG单体分子。进一步的实验表明,在加入PVP的IgG/生理盐水稀溶液里, A_2 为明显增大的正数,表明IgG单体在溶液中呈稳定状态,不再发生分子间的缔合聚集作用。实验测得IgG的 $\bar{M}_{w,app}$ 几乎与单体分子量相同,明显低于在生理盐水下测得的分子量。这一实验事实说明少量PVP能有效地抑制IgG聚集体的生成,而且能把原来在IgG提取分离过程中已形成的IgG₂聚集体重新解离为单体。实验中PVP的加入量仅为IgG浓度的4~5%,其散射光强均为IgG散射光强的1%,在这样的条件下,PVP的散射光强可作为溶剂背景的散射光强处理,而不影响IgG分子量的测定结果^[8]。

2.3 PVP对IgG溶液粘度行为的影响

IgG溶液粘度测量结果表明,当 $[NaCl]$ 为 $0.04mol/L$,IgG浓度低于1%时,溶液粘度随浓度的降低而迅速增大,显示出聚电解质效应,见图1。当加入PVP后,其粘度行为的聚电解质效应明显减少,如图2所示。说明了由于PVP的亲水和疏水特性,使之能通过静电作用保护和屏蔽了IgG分子链上的带电基团,抑制了这些基团的离解而使聚电解质效应明显减弱。由于PVP对IgG分子的亲和性,因而削弱了IgG自身分子的亲和缔合及聚集作用,达到使IgG单体稳定的目的。这与LALLS实验中,PVP的加入使IgG水溶液($pH < 5$)的 \bar{R}_θ 值稳定,并使IgG在生理盐水溶液中的 $\bar{M}_{w,app}$ 与其单体分子量几乎相同, A_2 为明显增大的正数这些实验事实是一致的。

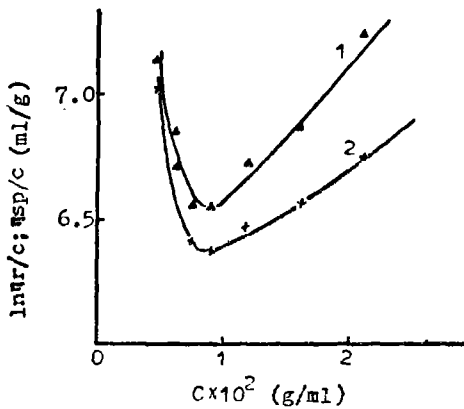


图1 IgG/NaCl aq. 的 η_{sp}/C , $\ln\eta_r/C$ 与 IgG 浓度(C)的关系 ($[NaCl]=0.04mol/L$)

Fig.1 The relationships between η_{sp}/C and $\ln\eta_r/C$ and IgG concentration

1. $\eta_{sp}/C \sim C_{IgG}$,
2. $\ln \eta_r/C \sim C_{IgG}$.

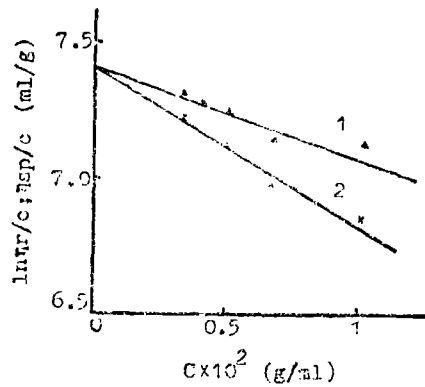


图2 IgG-PVP/NaCl aq.的 η_{sp}/C , $\ln\eta_r/C$ 与IgG浓度(C)的关系

$[NaCl]=0.04mol/L$,
 $[PVP]=2.5 \times 10^{-5}g/ml$

Fig.2 The relationships between η_{sp}/C and $\ln\eta_r/C$ and IgG concentration in the presence of PVP

1. $\eta_{sp}/C \sim C_{IgG}$;
2. $\ln\eta_r/C \sim C_{IgG}$

3 结 论

用LALLS法对 \bar{R}_θ 、 $\bar{M}_{w,app}$ 及 A_2 的测定结果表明,采用低温Cohn氏乙醇法或利凡诺法从人血浆中分离提取的IgG含有自身分子的聚集体;溶液的pH值,盐浓度均会影响IgG的水溶性和缔合聚集能力;PVP的加入能提高IgG在溶液中单体的稳定性,有利于抑制IgG分子的自身凝聚,甚至能使在提取分离过程中已形成的二聚体或多聚体重新解离为单体。

感谢项目协作单位广州市中心血站提供IgG样品和血清白蛋白样品,

参 考 文 献

- 1 柏乃庆. 血液保存. 第二版, 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 288~290
- 2 Dejanov II, Ivanovski D, Jamovski L *et al.* A large scale chromatographic procedure for the purification of human plasma immunoglobulin G for intravenous infusion. in Curling JM ed, Separation of plasma proteins, Joint Meeting of the 19th Congress of the International Society of Haematology, Budapest, 1982, Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals AB, 1983: 141~149
- 3 刘文芳. 血浆蛋白分离方法及其制品的应用. 成都: 成都市中心血站, 1986: 1
- 4 管原洁, 副岛正美. 张旭译. 蛋白质的定量法. 第二版, 北京: 农业出版社, 1981: 108
- 5 Yamakawa H. Modern Theory of Polymer Solution. New York: Harper and Row, 1971: 186
- 6 Huglin M B. Light Scattering from Polymer Solutions, London and New York: Academic Press, 1972: 89
- 7 陶慰孙, 李惟, 姜涌明等. 蛋白质分子基础. 第一版, 北京: 人民教育出版社, 1982: 263
- 8 Lin Thy-How, George D, Phillies J. J Colloid and Interface Sci, 1984; 100: 84

Studies on the Solution Properties and Stability of Immunoglobulin G for Intravenous

Liang Guomei Feng Rongyin Liang Xuwei*

Abstract

The properties of Immunoglobulin G (IgG) solutions with different pH values and ion strengths were investigated by means of low angle laser light scattering and viscosimetry. It was found that there were different types of structure, including monomer molecules, dimers, aggregates and precipitates in the IgG solutions. The addition of water-soluble poly(vinyl-pyrrolidone) was effective for the stability of IgG monomer and prevented it from aggregation in the solution.

Keywords low angle laser light scattering, Immunoglobulin G, poly(vinyl-pyrrolidone), aggregates

* Instrumentation Analysis and Research Center