

# 红外光谱法对可生物降解聚合物微球中血红蛋白含量的测定

陈利根, 单晓茜, 刘昌胜

(华东理工大学 材料科学与工程学院, 上海 200237)

**摘要:** 建立了可生物降解聚合物微球中血红蛋白含量的红外光谱分析方法。选择合适的内标物, 排除了聚合物壳材和表面活性剂残留的光谱干扰, 不需对样品进行分离。工作曲线的相关系数达 0.999 8, 回收率为 98% ~ 100%, 相对标准偏差小于 4.2%。

**关键词:** 红外光谱; 血红蛋白; 生物降解; 聚合物; 微球

**中图分类号:** O657.33; R331.141 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)07 - 0776 - 03

## Determination of Hemoglobin in Biodegradable Polymer Microspheres by Infrared Spectroscopy

CHEN Li-gen, SHAN Xiao-qian, LIU Chang-sheng

(School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** A method for the determination of hemoglobin content in biodegradable polymer microspheres by infrared spectroscopy was developed. By using an appropriate absorption peak and internal standard, the spectral and matrix interferences generated from the internal standard, remnant surfactants and polymer shell were eliminated, thus sample separation was not required prior to analysis. The correlation coefficient of the calibration curve was 0.999 8. The recovery range was 98% - 100% for six samples and the relative standard deviation (RSD) was less than 4.2%. The method is rapid and simple.

**Key words:** infrared spectroscopy; hemoglobin; biodegradation; polymer; microspheres

近年来蛋白质药物长效剂型的研究取得很大进展, 特别是生物可降解材料制成的蛋白质微球, 通过肌肉或皮下注射, 使药物在体内控制释放, 成为蛋白质药物一个新的发展方向<sup>[1]</sup>。在蛋白质微球制备的设计和优化过程以及产品中蛋白质的稳定性评价时, 微球中蛋白质的含量分析很重要。目前, 聚合物微球中蛋白质含量的精确分析是一项困难的工作, 国内外鲜有报道。已有的报道一般将蛋白质和聚合物载体材料分离, 然后对分离得到的蛋白质含量进行分析。分离通常采取萃取、过滤、电泳等手段, 并且需要在样品中加入有机溶剂、含碱性物质的水溶液等<sup>[2-4]</sup>。这不但使得分析过程冗长, 还会改变蛋白质的活性, 影响分析结果。

本文采用红外光谱法测定可生物降解聚合物微球中血红蛋白 (Hb) 的含量, 以固体粉末压片法取样, 不需对样品进行特殊处理。通过选择 Hb 红外吸收光谱中合适的吸收峰作为特征峰, 并选用合适的内标物, 方法排除了内标物和聚合物微球壳材的光谱干扰; 且聚合物微球制备过程中添加的表面活性剂及溶剂残留对分析也没有干扰。该方法快速、简便, 工作曲线的线性和相关系数以及测试的精密度和回收率均令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Nicolet 5700 傅立叶变换红外光谱仪 (美国热电公司), 配置 OMN IC E. S. P. 傅立叶变换红外光谱软

收稿日期: 2007 - 11 - 20; 修回日期: 2007 - 12 - 24

基金项目: 上海市纳米专项基金资助项目 (0452 nm 022)

第一作者: 陈利根 (1958 - ), 男, 浙江绍兴人, 高级工程师, Tel: 021 - 64252275, E-mail: chenligen@sohu.com

件包; YP-2压片机(上海山岳科学仪器厂)。

血红蛋白(Hb, 上海源聚生物科技有限公司); 聚乳酸、聚乳酸-聚乙二醇三嵌段共聚物(山东岱罡生物技术有限公司); 聚丙烯腈(上海石化股份有限公司腈纶事业部); 司盘 80(Span80)、吐温 80(Tween80)、KBr(光谱纯)均购于上海国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 样品的制备

1.2.1 空白微球的制备 按照制备可生物降解聚合物微球化 Hb 的完整工艺制备空白微球, 微球壳材为聚乳酸(PLA)和聚乳酸-聚乙二醇三嵌段共聚物(BAB), 用纯水替代 Hb 的水溶液。

1.2.2 标样的制备 分别按 Hb-PAN(聚丙烯腈)-空白微球质量比为 1:6:0.3、1.25:6:0.3、1.5:6:0.3、3:6:0.3、6:6:0.3 的比例准确称取 Hb、PAN 和空白微球, 加入适量溴化钾, 充分研磨至均匀, 压片。按此比例制备标样, 内标峰和 Hb 特征峰的峰高比适当。

1.2.3 样品的制备 按照微球化 Hb-PAN 质量比为 6:0.3 的比例准确称取样品和内标物, 加入适量溴化钾, 充分研磨至均匀, 压片。

## 1.3 FTIR 测定

制备好的样品用红外光谱仪测试, 分辨率  $4\text{ cm}^{-1}$ , 扫描 32 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 制样方法

由于微球化 Hb 的包裹物和壳材分别是水溶性和脂溶性的, 不适合制成溶液样品; 且由于样品的性状非常适合研磨, 选择适合研磨的内标物研磨后样品的均匀性非常好。所以, 本方法采用研磨后压片制样, 制样方法简便快速。工作曲线线性优良(相关系数达 0.999 8, 见“2.5”), 表明该制样方法可靠。

### 2.2 血红蛋白特征吸收峰的选择

Hb 的红外光谱图见图 1。从图中可见, Hb 最强的吸收峰出现在  $1655$  和  $1539\text{ cm}^{-1}$  处, 这分别是 Hb 分子中  $\text{N}=\text{C}$  键和  $-\text{CO}_2$  基团伸缩振动的吸收信号。尽管  $1655\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰更强, 但从图 2 可见, 在该处附近壳材有红外吸收, 对其产生光谱干扰。在  $1539\text{ cm}^{-1}$  处及其附近则没有光谱干扰, 故选择  $1539\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰作为 Hb 的特征吸收峰对其进行定量。

### 2.3 内标物的选定

从图 3 可见, 由于聚丙烯腈(PAN)在  $2241\text{ cm}^{-1}$  处有很强的吸收峰, 峰形非常尖锐, 在  $1500\sim 2100\text{ cm}^{-1}$  的基线非常平坦, 对 Hb( $1539\text{ cm}^{-1}$ ) 没有光谱干扰; 并且 PAN 对分析体系中所有物质无化学活性, 呈固体粉末状态, 便于制样。故方法采用 PAN 作为内标物。

### 2.4 表面活性剂及溶剂的光谱干扰与基体效应的排除

在可生物降解聚合物微球化 Hb 的制备工艺中, 除加入作为壳材的聚合物 PLA 和 BAB 外, 还加入了表面活性剂及溶剂。虽经过常温常压挥发、重蒸水洗涤及冷冻干燥, 这些物质的残留仍有可能对分析产生光谱干扰。

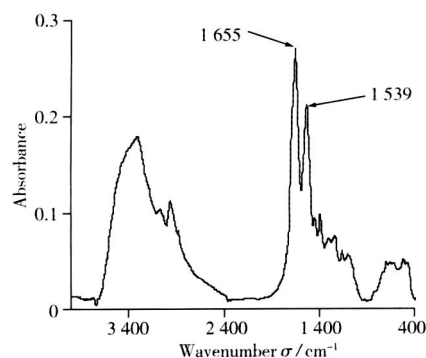


图 1 血红蛋白的红外光谱图  
Fig. 1 FTIR spectrum of hemoglobin(Hb)

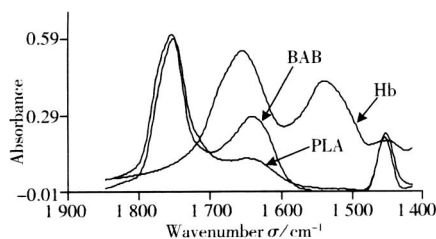


图 2 Hb、PLA 和 BAB 的红外光谱图(局部)  
Fig. 2 Partial FTIR spectra of Hb, polyactic acid(PLA) and polyactic acid-polyethylene glycol block copolymer(BAB)

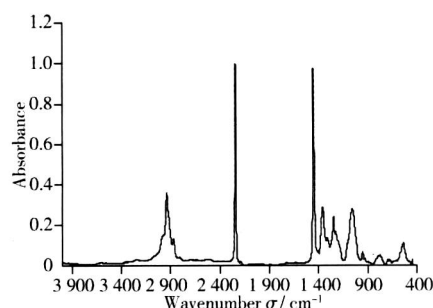


图 3 PAN 的红外光谱图  
Fig. 3 FTIR spectrum of polyacrylonitrile(PAN)

为此,进行了空白实验,对空白微球(见“1.2.1”)进行红外光谱测定。结果显示,在 Hb 的特征吸收峰  $1539\text{ cm}^{-1}$  及附近,空白微球没有红外吸收,残留表面活性剂及溶剂的光谱无干扰。

另外,在制备标样时加入了空白微球(见“1.2.2”),使得标样更接近真实样品,消除了基体效应。

## 2.5 工作曲线

根据“1.2.2”的方法制备标样,进行红外光谱测定,分别读取 Hb 特征峰的峰高值 ( $h_x$ ) 和内标峰的峰高值 ( $h_s$ ),以 Hb 和内标物的质量比  $m_x/m_s$  为横坐标,  $h_x/h_s$  为纵坐标作图。工作曲线线性良好,相关系数达 0.999 8。

## 2.6 血红蛋白含量计算

$D.L. \% = (Rm_{\text{PAN}}/m_{\text{np}}) \times 100\%$ , 式中  $D.L. \%$  为血红蛋白微球的载药量;  $R$  为根据 Hb 工作曲线的回归方程求得的  $m_x/m_s$  值;  $m_{\text{PAN}}$  为制备的样品(见“1.2.3”)中内标物的质量;  $m_{\text{np}}$  为制备的样品(见“1.2.3”)中血红蛋白微球的质量。

## 2.7 方法的精密度与回收率

按样品制备和红外光谱测定方法,对部分微球样品进行精密度实验,结果见表 1。

取数份已测定 Hb 含量的微球样品,分别加入一定量的 Hb 标样,采用实验方法进行分析,并计算回收率,结果见表 2。

表 1 样品分析和精密度

Table 1 Analytical results of samples and precision

No	Measure value of drug loading w / %	Standard deviation SD / %	RSD $s_r$ / %
1	31.8, 31.8, 32.9, 34.6, 34.7	1.4	4.2
2	16.3, 17.5, 16.4, 17.0, 17.1	0.50	3.0
3	24.2, 26.2, 24.4, 25.1, 24.0	0.89	3.6

表 2 回收率实验结果

Table 2 Results of recovery test

No	Original w / %	Found w / %	Recovery R / %
4	20.2	20.0	99
5	62.0	61.7	100
6	40.9	40.1	98

## 参考文献:

- [1] 盛燕, 赵健, 袁媛, 等. 可生物降解聚合物微球化蛋白质药物的稳定性研究 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2006, 29(8): 204 - 208.
- [2] CHO I S W, KM J H. Design of surface-modified poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone [J/OL]. Journal of Controlled Release (2007), doi: 10.1016/j.jconrel.2007.06.003.
- [3] 李军, 张继娟, 赵兴娟, 等. 壳聚糖-海藻酸钠包被猪血红蛋白微囊的制备 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2006, 24(3): 239 - 242.
- [4] 刘明星, 董静, 杨亚江, 等. RP-HPLC 测定雷公藤甲素聚乳酸纳米粒的包封率及载药量 [J]. 分析科学学报, 2004, 20(5): 474 - 476.

(上接第 775 页)

- [8] 于兆文, 黄普选, 赵清岚. 联二萘胺及其苯甲酰衍生物的制备和手性拆分 [J]. 化学研究, 2002, 13: 25 - 27.
- [9] 李成平, 杨会来, 李景华, 等. 高效液相色谱手性固定相法拆分联二萘酚、联二萘酚胺和联二萘胺对映体 [J]. 分析化学, 2006, 34: 1113 - 1136.
- [10] 翁文, 姚碧霞, 尤秀丽, 等. L-酒石酸型手性固定相拆分联萘酚对映体 [J]. 应用化学, 2004, 21: 853 - 855.
- [11] 阮源萍, 敖小平, 张雪曼, 等. 2, 6-O-丁基-环糊精涂渍反相柱高效液相色谱拆分联萘二酚和苯基琥珀酸对映体 [J]. 分析化学, 2004, 32(8): 949 - 952.
- [12] REIJENGA J C, NGELSE B A, EVERAERTS F M. Thermodynamics of chiral selectivity in capillary electrophoresis separation of ibuprofen enantiomers with  $\gamma$ -cyclodextrin [J]. J Chromatogr. A, 1997, 792: 371 - 378.
- [13] STRINGHAM R W, BLACKWELL J A. Factors that control successful entropically driven chiral separations in SFC and HPLC [J]. Anal Chem, 1997, 69: 1414 - 1420.