

ХИМИЯ

УДК 577.112.083

*П. И. Зайцев*¹, *О. В. Волина*², *О. В. Рыбальченко*²**ПРИМЕНЕНИЕ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА,
СВОБОДНОГО ОТ ИОНОВ НАТРИЯ И КАЛИЯ**

¹ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Российская Федерация, 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

² Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Бычий сывороточный альбумин (БСА) с максимально уменьшенным содержанием ионов Na и K используется в клинической биохимии для создания соответствующих тестов как буферизующий и стабилизирующий компонент. Нами предлагается (в рамках импортозащиты) относительно простой способ удаления ионов натрия и калия из растворов БСА методом ионообменной хроматографии. В статье приведены результаты количественного анализа растворов БСА, выполненные методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Библиогр. 5 назв. Табл. 1.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин (БСА), ионы натрия и калия, ионообменная хроматография, атомно-абсорбционная спектрометрия.

Для цитирования: *Зайцев П. И., Волина О. В., Рыбальченко О. В.* Применение ионообменной хроматографии для получения бычьего сывороточного альбумина, свободного от ионов натрия и калия // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4 (62). Вып. 4. С. 436–439. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu04.2017.407>

*P. I. Zaitsev*¹, *O. V. Volina*², *O. V. Rybalchenko*²**USAGE OF ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY
FOR PRODUCTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA),
SODIUM AND POTASSIUM FREE**

¹ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, 7, ul. Pudozhskaya, St. Petersburg, 197110, Russian Federation

² St. Petersburg State University, 7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Bovine serum albumin (BSA) for tests requires a strongly reduced concentration of sodium and potassium. BSA is also use as a buffering agent, stabilizer, standard and for blending. We propose

a relatively simple method of reducing the content of ions Na and K in solutions of BSA by ion-exchange chromatography. The article presents the results of the quantitative analysis of BSA solutions, made by atomic absorption spectrometry. Refs 5. Tables 1.

Keywords: bovine serum albumin (BSA), ions of K and Na, ion-exchange chromatography, atomic-absorption spectroscopy.

For citation: Zaitsev P. I., Volina O. V., Rybalchenko O. V. Usage of ion-exchange chromatography for production of Bovine serum albumin (BSA), sodium and potassium free. *Vestnik SPbSU. Physics and Chemistry*. 2017. Vol. 4 (62), iss. 4. P. 436–439. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu04.2017.407>

Введение. В современной биохимии при производстве тестов для клинической диагностики существует потребность в сывороточном альбумине, не содержащем ионов натрия и калия, как одном из компонентов диагностических наборов [1]. До недавнего времени приобретение такого препарата импортного производства не составляло проблемы. Однако в настоящее время из-за падения курса рубля и санкционных ограничений доступность таких препаратов стала мала.

Нами была предпринята попытка очистки обычного коммерческого препарата бычьего сывороточного альбумина (БСА) от ионов натрия и калия. Известно, что технология производства альбуминов включает стадию их высаливания из растворов, что приводит к высокому содержанию солей в конечном продукте [2–4]. В лабораторной практике одним из способов обессоливания водных растворов белков является диализ; однако такой способ для глубокого обессоливания представляется трудоёмким и малоэффективным. Для обессоливания коммерческого БСА было решено применить ионообменные смолы, используемые для получения деионизованной воды. Выбор данного типа ионообменных смол был основан на том, что они обладают высокой обменной ёмкостью для неорганических ионов.

Материалы и методы исследования. Для проведения исследования была взята смола PUROLITE NRW-37, используемая в ядерной энергетике для водоподготовки, состоящая из смеси равных долей катионита NRW-100 и анионита NRW-400 в H^+ - и OH^- -формах соответственно. Данная смола использовалась в лабораторной установке для получения деионизованной воды.

В хроматографическую колонку из полипропилена диаметром 25 мм и длиной 250 мм загружали 100 мл смолы NRW-37 и промывали несколько раз деионизованной водой с удельным сопротивлением 18 МОм/см.

Для очистки брали коммерческий препарат бычьего сывороточного альбумина (БСА) от компании «Биолот» кат. № 1.4.1.4 с молекулярной массой 65–68 кДа в виде 2%-го раствора. Раствор БСА в деионизованной воде в количестве 100–200 мл пропускали через колонку со скоростью 1,0–1,5 мл/мин. Собранный на выходе из колонки раствор подвергали анализу на содержание ионов натрия и калия. Для дальнейшего использования образцы растворов БСА подвергали лиофильной сушке и хранили в холодильнике при температуре 2–8°C.

Атомно-абсорбционная спектрометрия с атомизацией (ААС) в непрерывном пламени использована для оценки количественного содержания калия и натрия в водных растворах образцов БСА в диапазоне концентраций 0,2–1,0 мг/л.

Метод ААС основан на свойстве атомов поглощать излучение определённой (резонансной) длины волны. Атомный пар определяемого элемента получают нагревом пробы до высокой температуры при распылении в пламени ацетилено-воздушной смеси. Измеряют поглощение излучения резонансной длины волны атомным паром определяемого элемента. Анализ растворов образцов проводили методом ААС на приборе

Shimadzu AA-7000. Определение содержания элементов натрия и калия в БСА методом атомно-абсорбционной спектроскопии проводили стандартным методом [5]. При анализе использовали следующие параметры:

1) настройки прибора:

— определение концентрации K^+ : ток лампы с полым катодом 10 мА; длина волны резонансной линии: 766,5 нм; ширина щели: 0,5 нм;

— определение концентрации Na^+ : ток лампы с полым катодом 12 мА; длина волны резонансной линии: 589,0 нм; ширина щели: 0,2 нм;

2) матрица: 0,1N HNO_3 .

Массовые концентрации К и Na находили по градуировочным характеристикам, построенным с использованием градуировочных растворов, приготовленных из стандартных растворов путём последовательного разбавления. Стандартные образцы для градуировочных растворов приготовлены из моноэлементных стандартов К и Na фирмы Merck в 0,1N HNO_3 . Градуировочные характеристики строили в диапазоне 0,2–1,0 мг/л. Значение массовой концентрации по градуировочной характеристике определяемого элемента и границы её абсолютной погрешности рассчитывали на основе трёх параллельных измерений пробы.

Атомно-абсорбционный анализ проводили в непрерывном пламени ацетилено-воздушной смеси без коррекции фона. Для спектрального анализа использовались 1%-е растворы БСА, поскольку такая концентрация оказалась оптимальной при подготовке образцов для анализа. В растворы для консервации была добавлена концентрированная HNO_3 из расчёта 20 мкл кислоты на 20 мл образца.

Результаты исследования. Полученные данные приведены в таблице.

Содержание K^+ и Na^+ в водных растворах БСА

Образец	K^+		Na^+	
	<i>C</i> , мг/л	RSD, %	<i>C</i> , мг/л	RSD, %
БСА, 2%-й исходный раствор	$0,29 \pm 0,03$	2	68 ± 3	1
БСА, 2%-й очищенный раствор	$< 0,02$	—	$0,049 \pm 0,004$	1

Как видно из представленных результатов анализа, очистка растворов БСА с помощью ионообменных смол позволяет существенно снизить концентрацию ионов K^+ и Na^+ в исследуемом образце по сравнению с исходным образцом.

В заключение следует отметить, что предложенный способ снижения концентрации ионов К и Na в образце коммерческого БСА позволяет получить препарат, пригодный для создания соответствующих тестов в клинической диагностике. Полученный препарат БСА не уступает по этим показателям (содержанию K^+ и Na^+) препарату BSA K/Na free производства компании Roche Diagnostics GmbH. Так, фирма-производитель в паспорте на свой продукт кат. № 11 297 368 103 заявляет следующие значения концентраций K^+ и Na^+ [1]:

$$K(AAS) \leq 4 \text{ мг/кг};$$

$$Na(AAS) \leq 35 \text{ мг/кг}.$$

Приведённые в таблице результаты анализа, пересчитанные на килограмм сухого вещества, составляют:

$$K(AAS) < 1 \text{ мг/кг};$$

$$Na(AAS) = 2,45 \text{ мг/кг}.$$

Таким образом, используя ионообменные смолы, применяемые для деионизации воды, можно существенно уменьшить концентрацию ионов калия и натрия в исходном коммерческом БСА и получить препарат, не уступающий по своим характеристикам импортному образцу.

* * *

Авторы выражают искреннюю благодарность ресурсному центру МАСВ СПбГУ, возглавляемому Евгением Серебряковым, за совместную плодотворную работу.

Литература

1. Biochemicals for clinical chemistry. Albumin. Custombiotech.roche.com. 2010. P. 4.
2. Способ получения альбумина ветеринарного. Патент РФ № 2055523 C1, A 61 B 10/00. 10.03.96. Зайцев П. И.
3. Способ выделения альбумина. Патент СССР 1127525. A61K 37/02 1977.
4. *Curling J. M., Lindquist L. O., Eriksson S.* Chromatographic processing of human plasma — a pilot plant study // *Process Biochemistry*. 1977. P. 22–28.
5. ГОСТ Р 51309–99. Вода питьевая. Определение содержания элементов методами атомной спектроскопии.

References

1. Biochemicals for clinical chemistry. Albumin. Custombiotech.roche.com. 2010, pp. 4.
2. *Sposob polucheniia al'bumina veterinarnogo [Method of obtaining of veterinary albumin]*. Patent of the Russian Federation No 2055523 C1, A 61 B 10/00. 10.03.96. Zaitsev P. I. (In Russian)
3. *Sposob vydeleniia al'bumina [Method for the isolation of albumin]*. Patent USSR No. 1127525. A61K 37/02 1977. (In Russian)
4. *Curling J. M., Lindquist L. O., Eriksson S.* Chromatographic processing of human plasma — a pilot plant study. *Process Biochemistry*, 1977, pp. 22–28.
5. GOST R 51309-99. *Voda pit'evaia. Opredelenie sodержaniia elementov metodami atomnoi spektrometrii [Drinking water. Determination of the content of elements by atomic spectrometry]*. (In Russian)

Статья поступила в редакцию 13 марта 2017 г.

Контактная информация

Зайцев Пётр Иванович — e-mail: zpi.spb@mail.ru

Волina Ольга Владимировна — кандидат химических наук; e-mail: olgavolina@gmail.com

Рыбалыченко Оксана Владимировна — доктор биологических наук, профессор; e-mail: ovr@inbox.ru

Zaitsev Petr Ivanovich — e-mail: zpi.spb@mail.ru

Volina Olga Vladimirovna — PhD; e-mail: olgavolina@gmail.com

Rybalchenko Oksana Vladimirovna — Doctor of Biology, Professor; e-mail: ovr@inbox.ru