

论著·基础研究

赋形剂对 γ -谷氨酰基转移酶诊断试剂冻干参数的影响*黄幸雷¹, 吴润锋^{2△}

(1. 美康生物科技股份有限公司, 浙江 宁波 315104; 2. 宁波美康保生生物医学工程有限公司, 浙江 宁波 315104)

摘要:目的 研究不同赋形剂对体外诊断试剂冻干参数的影响。方法 利用差示扫描量热仪对加入不同赋形剂的 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)诊断试剂进行测试,并用冻干显微镜进行观察。结果 GGT 试剂的塌陷温度并不是某一个温度点,而是一个温度范围;同时 PEG8000、PEG20000、PVP、BSA 均能提高 GGT 试剂的共晶点和玻璃化温度,降低 GGT 试剂共熔点。结论 4 种赋形剂对 GGT 试剂冻干参数的影响非常接近。

关键词:GGT 试剂; 冷冻干燥; 检测; 赋形剂

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.17.002 **中图分类号:**TQ42

文章编号:1673-4130(2018)17-2085-04 **文献标识码:**A

Effect of excipients on freeze-drying parameters of γ -glutamyltransferase diagnostic reagent*HUANG Xinglei¹, WU Runfeng^{2△}

(1. Medicalsystem Biotechnology Co., Ltd, Ningbo, Zhejiang 315104, China; 2. Ningbo M&P Biomedical Engineering Co., Ltd, Ningbo, Zhejiang 315104, China)

Abstract: Objective To study the effects of different excipients on the freeze-drying parameters of in vitro diagnostic reagents. **Methods** γ -glutamyltransferase diagnostic reagent (GGT) with different excipients was tested by differential scanning calorimetry and observed with a freeze-dried microscope. **Results** The collapse temperature of GGT reagent is not a certain temperature point, but a temperature range. At the same time, PEG8000, PEG20000, PVP and BSA can increase the eutectic point and glass transition temperature of GGT reagent and reduce the eutectic point of GGT reagent. **Conclusion** The effects of four excipients on the freeze-drying parameters of GGT reagents are very close.

Key words:GGT reagent; freeze-drying; detection; excipient

影响物料冻干的关键参数一般有 4 个,即共晶温度、共熔温度、塌陷温度和玻璃化转变温度。共晶温度是指物料中水分完全冻结成冰晶时的温度^[1]。真空冷冻干燥技术的原理是将水由固态不经过液态而直接升华为气态的过程,此过程只有两相的转变,即固态转化成气态。若冷冻干燥预冻过程中物料未完全冻实而留存部分液态物料,则在升华干燥阶段会出现“鼓泡”现象,即液态物料在低压状态下的沸腾现象,此现象容易导致冻干后的物料再次复溶,内部结构不均匀,并发生部分物料黏团的现象,最终导致产品复溶性差。因此,预冻阶段温度应降至共晶温度以下,将物料中的水分完全冻结成冰晶而不能存有液态物料。共熔温度也叫共熔点,水有固定的熔点,而溶液却并不如此,冻结实后的溶液通常不在一个固定的温度全部发生熔化,而是随着温度的逐渐升高,晶体

量逐渐减少,一直到最后固体才完全熔化。当熔化开始出现液体时的温度叫熔点,对于溶液来说,则是溶质和溶媒共同的熔化点,这个温度称之为共熔温度^[2]。塌陷温度又称崩塌温度,是针对某些冻干后的物料而言的。冻干后的物料当温度逐渐上升时,其刚性逐渐降低,当温度达到某一临界值时,其刚性不足以维持物料的三围立体结构,导致物料开始塌陷,这一临界温度即称之为物料的塌陷温度。玻璃化转变温度是指物料最大冻结浓缩液的玻璃化转变温度。玻璃化转变温度除了与物料配方有关外,还与物料的结构、预冻温度和速度密切相关^[3]。本课题拟用体外诊断试剂 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)诊断试剂为研究对象,研究 GGT 试剂的冷冻干燥成型特性,通过差示扫描量热仪对加入不同赋形剂的 GGT 试剂进行测试,并用冻干显微镜进行观察,以探讨赋形剂对 GGT

* 基金项目:宁波市重大专项(2015C110029)。

作者简介:黄幸雷,男,生物学工程师,主要从事生物学及体外诊断试剂的研究工作。△ 通信作者,E-mail:runfeng.wu@nbmedical-system.com。

本文引用格式:黄幸雷,吴润锋. 赋形剂对 γ -谷氨酰基转移酶诊断试剂冻干参数的影响[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(17):2085-2087.

试剂冻干工艺关键参数的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要材料 烧杯若干个[四川蜀玻(集团)有限责任公司];10 L 液氮(宁波方辛气体有限公司);不锈钢保温桶 1 个、方形塑料试管 20 个(宁波美康生物科技股份有限公司)。

1.1.2 主要试剂 GGT 诊断试剂(宁波美康生物科技股份有限公司);聚乙二醇(PEG)8000、PEG20000、牛血清清蛋白(BSA, 国药集团化学试剂有限公司);聚乙烯吡咯烷酮(PVP)[国药集团化学试剂有限公司(沃凯)]。

1.1.3 主要仪器设备 AL104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];PE20 型 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];移液枪[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];HS-3 型垂直混合仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);KS-9982 型超声仪(宁波海曙科生超声设备有限公司);FDSC 196 冻干显微镜(Linkam);DSC200F3 型差示扫描量热仪(美国 Perkin-Elmer 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品处理流程 厂家试剂首先加入 10% 赋形剂,然后搅拌均匀,最后进行物理参数测试。

1.2.2 试剂制备 取厂家购买的 GGT 试剂分为 5 组,每组 GGT 试剂质量为 10 g,分别加入 1 g 以下赋形剂,第 5 组为不加赋形剂的空白对照组。见表 1。

表 1 赋形剂编组

实验组号	赋形剂
1	PEG8000
2	PEG20000
3	PVP
4	BSA
5	空白对照

1.2.3 GGT 试剂共晶点和共熔点的测试方法^[4]

本实验用美国 Perkin-Elmer 公司的 DSC200F3 型差示扫描量热仪,取 5 μL GGT 试样于铝皿中,20 mL/min 的氮气下,以 5 °C/min 的速度从 25 °C 冷却到 -40 °C,又以相同速度从 -40 °C 升温至 25 °C,通过配套软件 Pyris Series (美国 Perkin-Elmer 公司,5.0 版本)记录降温 and 升温过程样品的热流曲线,即 DSC 曲线。

1.2.4 GGT 试剂塌陷温度测试方法^[5] 塌陷温度实验采用冻干显微镜,配有液氮冷却系统(LNP 94/2)、可编程温度控制器(TMS 94V)和真空泵(E2M1.5, Edwards)。使用方法参照仪器使用说明书,样品处理过程如下:样品以 10 °C/min 从 20 °C 降温至玻璃化转变温度以下,抽真空,使压力保持在 20 Pa,然后以 1 °C/min 升温。图像采集使用彩色高灵敏度冷 CCD (Retiga 2000R, Q Imaging),程序运转过程

中仔细观察图像中样品变化,本文中的塌陷温度均取样品结构局部丧失时的温度^[6]。每个实验重复 3 次,取平均值。

1.3 数据处理 运用 Microsoft excel 2010 进行数据处理分析。

2 结果

2.1 GGT 试剂的 DSC 图谱 将 GGT 试剂用差示扫描量热仪测试得到其 DSC 曲线,如图 1 所示。从图 1 中可以看出 GGT 试剂在从 25 °C 到 -40 °C 的降温过程中,-14.23 °C ~ -15.00 °C 之间有一个放热峰。在从 -40 °C 到 25 °C 的升温过程中,在 -1.67 °C ~ 3.48 °C 之间有一个吸热峰。物料在结晶过程中会放出一定的相变潜热,因此,从图 1 中可判断出 GGT 试剂的共晶点温度在 -15 °C 左右,因为 15 °C 之前有一个明显的放热峰。而物料在融化过程中会吸收一定的相变潜热,由此从图 1 中可判断 GGT 试剂的共熔点温度在 -1.67 °C 左右,因为从 -1.67 °C 开始有一个明显的放热峰。从图 1 中还可看出在 -18.75 °C 比热容有突变,从而可确定 GGT 试剂的玻璃化转变温度为 -18.75 °C。

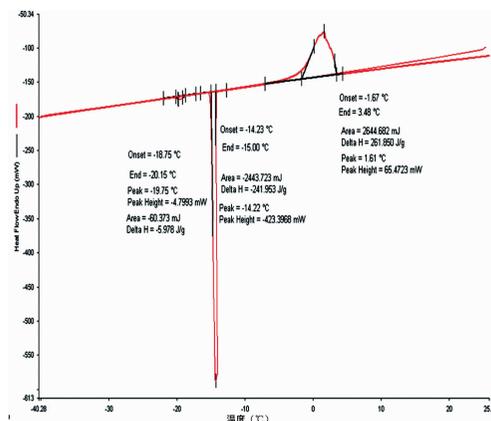


图 1 GGT 试剂的 DSC 图谱

2.2 不同赋形剂对 GGT 试剂共晶点、共熔点和玻璃化温度的影响 用差示量热扫描仪测试添加不同赋形剂的 GGT 试剂,分别得到共晶点、共熔点和玻璃化温度。PEG8000、PEG20000、PVP、BSA 对 GGT 试剂有着相似的效果,即同时提高了 GGT 试剂的共晶点和玻璃化温度,降低了 GGT 试剂共熔点,且四者的变化幅度接近。见表 2。

表 2 不同赋形剂对 GGT 试剂共晶点、共熔点和玻璃化温度的影响(°C)

赋形剂	共晶点	共熔点	玻璃化温度
PEG8000	-10.30	-7.60	-15.90
PEG20000	-11.80	-8.60	-17.30
PVP	-13.50	-5.40	-17.90
BSA	-12.60	-4.50	-16.90
空白对照	-15.00	-1.67	-18.75

2.3 GGT 试剂塌陷温度的确定 GGT 试剂原液的三次塌陷时的温度分别为 -34.9 °C、-37.9 °C 和 -

38.7 °C, 平均塌陷温度为 -37.2 °C。见图 2。所有平行实验得出的塌陷温度均有一定差异, 同时, 4 种赋形剂均不同程度地提升了 GGT 试剂的塌陷温度, 这是由于物料组分的改变会导致塌陷温度的变化。见表 3。



注: A 表示塌陷时的温度为 -34.9 °C; B 表示塌陷时的温度为 -37.9 °C; C 表示塌陷时的温度为 -38.7 °C

图 2 GGT 试剂冻干显微图像

2.4 不同赋形剂对 GGT 试剂冻干曲线关键参数的影响 根据已得到的各温度数据, 可以判断各组试剂的合理预冻温度和升华干燥温度。见表 4。

表 3 不同赋形剂对 GGT 试剂塌陷温度的影响(°C)

赋形剂	一次塌陷温度	二次塌陷温度	三次塌陷温度	平均塌陷温度
PEG8000	23.1	25.3	22.4	-23.6
PEG20000	25.1	23.7	25.8	-24.9
PVP	24.2	27.4	26.3	-26.0
BSA	29.3	28.5	26.4	-28.1
空白对照	-34.9	-37.9	-38.7	-37.2

表 4 不同赋形剂对 GGT 试剂冻干曲线关键参数的影响(°C)

赋形剂	共晶点	共熔点	玻璃化温度	塌陷温度	预冻温度	升华干燥温度
PEG8000	-10.3	-7.6	-15.9	-23.6	<-20.9	<-23.6
PEG20000	-11.8	-8.6	-17.3	-24.9	<-22.3	<-24.9
PVP	-13.5	-5.4	-17.9	-26.0	<-22.9	<-26.0
BSA	-12.6	-4.5	-16.9	-28.1	<-21.9	<-28.1
空白对照	-15.0	-1.7	-18.8	-37.2	<-23.8	<-37.2

3 讨 论

玻璃化转变是指物料从高弹态到玻璃态的转变^[7]。从分子运动的观点, 玻璃化转变是物料的非晶链段从冻结状态到解冻状态的转变, 与热力学相变点熔点等不同, 玻璃化转变还是一个动力学过程^[8], 一般物料在玻璃化转变前后热容不同^[9], 在 DSC 图谱上表现为比热容突变, 从而可确定物料的玻璃化转变温度。

在冻干过程中塌陷温度是一个非常重要的参数。在物料的干燥过程中样品温度过高会引起塌陷, 进而导致干燥层的多孔结构丧失、残余水分增多、复水时间延长, 更严重的将导致生物制品活性丧失^[10-11]。物料在干燥过程中出现塌陷与许多因素有关, 既有材料本身结构特性的影响又有加工特性的影响^[12]。

在冻干领域里, 冻干曲线的设计与物料冻干的成败、整体冻干周期和冻干机的能耗密切相关, 合理的冻干曲线可使冻干机在最短的时间内以最低的能耗得到合格的冻干品。因此预冻温度和升华干燥温度作为冻干曲线的关键参数, 应当准确判断。

预冻温度取决于共晶点和玻璃化温度, 预冻温度合理范围应低于共晶点和玻璃化温度中较低者 5 °C 以上^[13]; 升华干燥温度则取决于塌陷温度和共熔点, 升华干燥温度的合理范围应低于塌陷温度和共熔点中较低者^[14]。据此原则, 加入 10% PEG8000 的 GGT 试剂预冻温度可设为 -20.9 °C ~ -25.9 °C, 升华干燥温度应设定为低于 -23.6 °C; 加入 10% PEG20000 的 GGT 试剂预冻温度可设为 -22.3 °C ~ -27.3 °C, 升华干燥温度应设定为低于 -24.9 °C; 加入 10% PVP 的 GGT 试剂预冻温度可设为

-22.9 °C ~ -27.9 °C, 升华干燥温度不高于 -26.0 °C; 加入 10% BSA 的 GGT 试剂预冻温度可设为 -21.9 °C ~ -26.9 °C, 升华干燥温度不高于 -28.1 °C; 不加任何赋形剂的 GGT 试剂预冻温度可设为 -23.8 °C ~ -28.8 °C, 升华干燥温度不高于 -37.2 °C。

4 结 论

PEG8000、PEG20000、PVP、BSA 均能提高 GGT 试剂的共晶点和玻璃化温度, 降低 GGT 试剂共熔点; 塌陷温度并不是某一个温度点, 而是一个温度范围, 不同的赋形剂赋予 GGT 试剂不同的塌陷温度范围; 由于赋形剂的加入改变了 GGT 试剂的组分, 因而其塌陷温度必然发生变化, 4 种赋形剂均不同程度地提升了 GGT 试剂的塌陷温度; 4 种赋形剂均可作为 GGT 试剂合格的赋形剂, 而且四者的对 GGT 试剂物理参数的影响非常接近。

参考文献

- [1] 姚新龙. 蛋白类药物干燥过程中的稳定性维持研究[J]. 维吾尔医药(上半月), 2013, 13(3): 29.
- [2] 蔡继兰, 叶东, 汪宗华. 药品冻干过程中各环节的控制及常见问题分析[J]. 药学研究, 2013, 32(3): 179-182.
- [3] 曹峰, 王俊凤, 亓振, 等. 电阻法测量纳豆菌微生态制剂共晶点及共熔点[J]. 山东食品发酵, 2013(2): 30-32.
- [4] 黎先发. 真空冷冻干燥技术在生物材料制备中的应用与进展[J]. 西南科技大学学报: 自然科学版, 2004, 19(2): 117-121.
- [5] 耿锬锬, 熊非, 朱家壁, 等. 用于药物制剂的冷冻干燥技术及相关影响因素[J]. 药学进展, 2011, 35(3): 104-109.
- [6] 朱明文. 生物制品冷冻干燥技术与策略[J]. 现代科学仪器, 2012(4): 19-23.

有统计学意义($P < 0.05$),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。三组 TGF- β 1 mRNA 吸光度值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着时间延长,模型组和试验组吸光度值逐渐增加,在第 14 天达到高峰。两两比较显示,模型组和试验组 TGF- β 1 mRNA 均明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明肾间质纤维化过程中 tTG 和 TGF- β 1 表达上调,苯那普利的肾保护作用可能通过下调 tTG 和 TGF- β 1 表达水平实现。一方面,tTG 的合成受到 TGF- β 1 的调节,另一方面 tTG 可催化 TGF- β 1 连接蛋白与细胞外基质交联,从而使 TGF- β 1 释放出活性结构^[14-15]。相关性分析结果表明 tTG 和 TGF- β 1 在肾间质纤维化过程中互相作用,参与肾间质纤维化过程。

4 结 论

tTG 和 TGF- β 1 互相作用参与肾间质纤维化过程,苯那普利可通过下调 tTG 和 TGF- β 1 表达水平实现其肾脏保护作用。tTG 和 TGF- β 1 具有成为肾间质纤维化治疗的潜在有效靶点。

参 考 文 献

[1] 胡岳,王涌,邱江锋.组织型转谷氨酰胺酶在肿瘤发生、发展、侵袭和转移中的作用及其作用机制的研究进展[J]. 肿瘤,2013,33(9):831-836.

[2] 易晓颖,王辞晓,陈彤,等.补益脾肾方对阿霉素肾病大鼠肾间质 TGF- β 1、HGF 影响随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志,2015,29(7):126-128.

[3] TIAN S, LI C, RAN R, et al. Surfactant protein A deficiency exacerbates renal interstitial fibrosis following obstructive injury in mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863(2):509-517.

[4] 高艳霞,蔡宏瑜,万强,等.黄芪山甲方对 UUO 模型中肾间质纤维化 TGF- β 1 及 FN 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2013,14(12):1090-1091.

[5] WEI X, XIA Y, LI F, et al. Kindlin-2 mediates activation of TGF- β /Smad signaling and renal fibrosis[J]. *J Am Soc*

Nephrol, 2013, 24(9):1387-1398.

[6] LIAO X H, ZHANG L, CHEN G T, et al. Augmenter of liver regeneration inhibits TGF- β 1-induced renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition via suppressing T β R II expression in vitro[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 327(2):287-296.

[7] 刘艳妹,桑吉武,刘中柱,等.活性维生素 D₃ 对 UUO 模型大鼠肾间质 OPN、TGF- β 1 表达的影响[J]. 黑龙江医药科学,2015,38(4):3-5.

[8] 赵晓华,马宏,李卫卫,等.组织型转谷氨酰胺酶在幼鼠肾间质损伤中的表达及意义[J]. 中国药物与临床,2009,9(4):307-309.

[9] LIM M J, AHN J, YI J Y, et al. Induction of galectin-1 by TGF- β 1 accelerates fibrosis through enhancing nuclear retention of Smad2[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 326(1):125-135.

[10] 赵晓华.组织型转谷氨酰胺酶与转化生长因子 β 1 在幼鼠肾间质损伤中的表达及意义[D]. 太原:山西医科大学,2009.

[11] AN H J, KIM J Y, KIM W H, et al. The protective effect of melittin on renal fibrosis in an animal model of unilateral ureteral obstruction[J]. *Molecules*, 2016, 21(9):1137.

[12] ZHAN C Y, TANG J H, ZHOU D X, et al. Effects of tanshinone II A on the transforming growth factor β 1/Smad signaling pathway in rat cardiac fibroblasts[J]. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46(6):633.

[13] 苏青.银杏叶提取物对糖尿病大鼠肾脏 tTG 的影响及有效成分体外筛选[D]. 长春:吉林大学,2013.

[14] HOU S X, ZHU W J, PANG M Q, et al. Protective effect of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (LOUR.) MERRILL (Rubiaceae) on uric acid nephropathy rats induced by yeast and potassium oxonate[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014(64):57-64.

[15] WANG Y, XUE C, DONG F, et al. Hydroxysafflor yellow a attenuates small airway remodeling in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(10):1591-1598.

(收稿日期:2018-01-06 修回日期:2018-04-20)

(上接第 2087 页)

[7] 丁玲.果蔬常压冷冻干燥玻璃化转变行为的研究[D]. 洛阳:河南科技大学,2015.

[8] 赵立山.水溶液的液固转变以及玻璃化转变的研究[D]. 北京:北京科技大学,2017.

[9] 冀浩博,张弘,郑华等.差示扫描量热法测定紫胶树脂玻璃化转变温度的条件研究[J]. 材料导报,2014,28(8):98-104.

[10] 杨智,李代禧,张燕等.冷冻干燥过程中重要参数塌陷温度的研究[J]. 应用化工,2014,43(5):962-965.

[11] 刘代春,于颖,卢存义.冻干显微镜研究进展[J]. 机电信

息,2017(32):1-15.

[12] 贺素艳,张光存,于永全,等.真空预冷后甘蓝组织显微结构和超微结构的改变[J]. 电子显微学报,2013,32(2):168-172.

[13] 张凡伟,杨炳南,曹有福,等.响应面法优化刺参的真空冷冻干燥工艺[J]. 食品科技,2017,42(8):165-169.

[14] 杨辉.人参和西司他丁钠真空冷冻干燥工艺的研究[D]. 杭州:浙江大学,2017.

(收稿日期:2018-01-04 修回日期:2018-04-18)