

劳里法测定 NR 手套中水溶性蛋白质含量的影响因素分析

李枚辉, 汤胜修, 盛腊云, 张 玉

(中橡集团株洲橡胶塑料研究设计院, 湖南 株洲 412003)

摘要:分析劳里法测定 NR 手套中水溶性蛋白质质量分数时的影响因素及应注意的问题。劳里法定量测定 NR 手套中水溶性蛋白质时应注意:①严格控制福林试剂的浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 若储存时溶液变为黄绿色或绿色, 必须重复溴氧化步骤;②控制样品溶液中蛋白质的质量浓度在 $2\sim 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内;③加入福林试剂时, 溶液温度控制在 $10\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间;④比色应在显色剂加入后 $30\sim 60\text{ min}$ 内进行;⑤吸光度的最佳测定波长为 750 nm 。

关键词:NR 手套;水溶性蛋白质;劳里法;标准曲线;溶液浓度;显色

中图分类号:TQ332;TQ330.1;TQ336.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1000-890X(2004)05-0297-05

NR 手套(主要为医用手套、检查手套和家用手套)中蛋白质引起人体过敏问题已经越来越得到各国的广泛重视。据美国一家国家职业安全和健康机构报道,在美国, $8\%\sim 12\%$ 的从事健康保护的职员对胶乳产生过敏反应,世界的平均水平为 $2\%\sim 5\%$ 。虽然这其中也有由于残留的化学物质、润滑剂、粉尘、致热原等引起的过敏,但研究表明, NR 引发的 I 型超敏反应(引起休克甚至死亡的严重过敏)几乎肯定是由于乳胶制品中水溶性蛋白质的存在。国际上普遍认为, NR 手套中水溶性蛋白质质量分数小于 0.0001 , 对胶乳过敏的人在皮肤刺激试验中几乎不显示过敏反应,但大多数国家对其质量分数要求为小于 0.00005 。

最常用的水溶性蛋白质含量测定方法是劳里法。国际标准化组织制定的 ISO/DIS 12243《天然橡胶及其制品中水溶性蛋白质含量的测定方法》、欧洲标准 EN 455-3:2000《一次性使用医用手套——生物性能的要求和检测》以及美国材料试验学会制定的 ASTM D 5712—1999《天然橡胶及其制品中水溶性蛋白质含量分析的标准测定方法》中均采用劳里法。劳里法所需仪器设备简单、试剂购买容易,试验结果可靠,但其处理过程比较

复杂,所需时间较长,对试验人员的操作技能要求高,试验准确性影响因素较多。本工作以 ASTM D 5712—1999 标准为依据,结合 ISO/DIS 12243 和 EN 455-3:2000 标准,对劳里法测定中遇到的一些问题进行分析。

1 实验

1.1 方法原理

用缓冲溶液抽提 NR 手套中水溶性蛋白质,然后对溶解于缓冲溶液中的水溶性蛋白质进行沉淀和分离。蛋白质沉淀用浓度为 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液重新溶解,在碱性条件下使其与铜离子生成蛋白质-铜复合物,此复合物可还原福林试剂中的磷钼酸-磷钨酸试剂,生成蓝色物质。溶液的吸光度与溶液中蛋白质的浓度呈正比。由此可测定样品中水溶性蛋白质的含量。

1.2 试剂与仪器

福林试剂,自制。其它试剂均为市售品,分析纯,所用水为蒸馏水或去离子水。

所用仪器为 UV500 紫外-可见分光光度计,美国 UNICAM 公司产品。

2 结果与讨论

2.1 福林试剂的制备与保存

福林试剂作为显色剂,在试验中起着非常重

作者简介:李枚辉(1973-),女,湖南湘潭人,中橡集团株洲橡胶塑料研究设计院工程师,学士,主要从事乳胶制品的分析检测工作。

要的作用。在 ISO 标准、ASTM 标准以及 EN 标准中,对福林试剂的制备均未做详细说明,只在标准中提示可在市场上购买。而国内市场目前还没有福林试剂出售。因此,在查阅大量资料的基础上,制定了福林试剂的配制方法。

具体制备方法如下:在 1.5 L 的磨口回流瓶中加入 100 g 钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和 25 g 钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加 700 mL 蒸馏水使其溶解完全;然后依次加入 50 mL 浓磷酸和 100 mL 浓盐酸,充分混合均匀,以小火回流 10 h;再加入 150 g 硫酸锂和 50 mL 蒸馏水,并滴加数滴液体溴至溶液呈黄色。开口继续煮沸 15 min 以除去过量的溴,冷却后溶液呈黄色(如果溶液仍呈绿色,则重复滴加液体溴的步骤)。将溶液稀释至 1 L,过滤,滤液于棕色瓶中冷藏保存。使用前

用氢氧化钠标准溶液滴定,以酚酞作指示剂,控制其浓度为 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。配制时有以下几点注意事项。

(1)加液体溴氧化福林试剂时,必须将其氧化完全,即溶液冷却后呈黄色。否则会影响后面显色溶液的颜色,使试验结果偏高。

(2)福林试剂的浓度必须控制为 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,过大或过小都将影响蛋白质与福林试剂的反应程度。

(3)福林试剂在冷藏条件下可以长期保存,但当其颜色变成黄绿色或绿色时,必须重复溴氧化过程。

2.2 蛋白质溶液吸光度-质量浓度标准曲线绘制

蛋白质溶液吸光度-质量浓度标准曲线测定数据如表 1 所示。由表 1 可以看出,溶液中蛋白

表 1 蛋白质溶液吸光度-质量浓度标准曲线测定数据

项 目	溶液编号					
	1	2	3	4	5	6
质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	10.640	21.280	42.560	63.840	106.400	212.800
吸光度	0.177	0.241	0.380	0.489	0.731	1.071

质质量浓度在 $0 \sim 100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,其吸光度-质量浓度曲线的线性因数(表示点与曲线的接近程度)为 0.998(如图 1 所示),即按表 1 中前 5 点数据作图,各点几乎在同一条直线上。但当溶液中蛋白质质量浓度超过 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,即对表 1 中的 6 点作图,其线性因数减小为 0.976(如图 2 所示)。根据这样的标准曲线得出的数据误差较大。但可用计算机软件对上述 6 点的试验数据进行自动拟合(如图 3 所示),其线性因数可达到 0.999 以上。但是,国内绝大部分生产厂家和

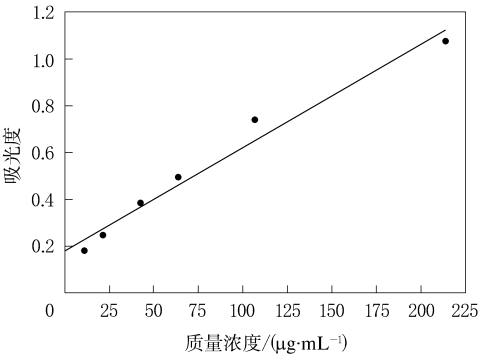


图 2 蛋白质溶液标准曲线(前 6 点)

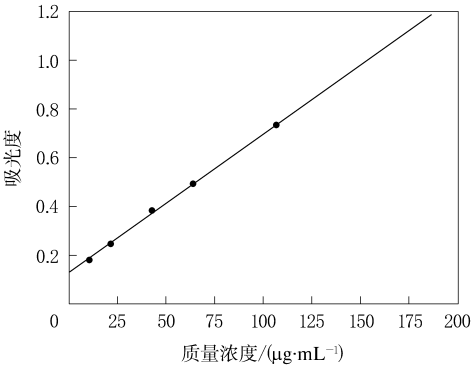


图 1 蛋白质溶液标准曲线(前 5 点)

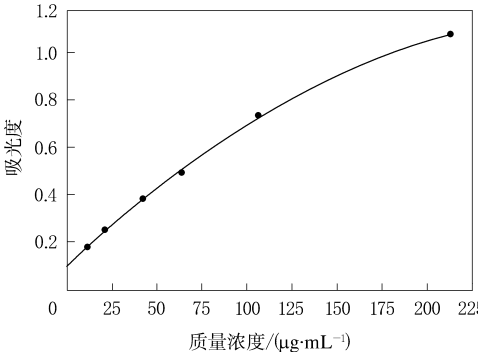


图 3 蛋白质溶液标准曲线(前 6 点拟合曲线)

实验室使用的都是 721 型分光光度计,无法对试验数据进行曲线拟合。因此,建议最好将标准曲线溶液和试验溶液中蛋白质的质量浓度控制在 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下,这样吸光度与质量浓度的线性效果较好,测定结果比较准确。

2.3 水溶性蛋白质的抽提

样品中水溶性蛋白质的抽提是一个重要步骤,抽提效果直接影响测定结果。在 ASTM D 5712—1999 标准中,蛋白质抽提方式(方法 A)为:准确移取一定体积的抽提液于聚丙烯容器中,将样品的所有功能表面全部暴露于抽提液中;当样品较大时,可将样品切割成大小合适的片状以适应抽提容器。而在 EN 455-3:2000 标准中,其抽提方式(方法 B)为:取一对手套或两只同边手套(针对分左右手的样品而言),在其中一只手套距中指尖 20 cm 处的腕部作一个标记,将另一只手套插入作了标记的手套内,使两只手套完全吻合。将足量的染色溶液倒入内手套中,在内外手套的夹层中准确注入适量的抽提液,小心排出手套间隙的气泡,使抽提液充满手套间隙。用夹具在 20 cm 标记处密封,不使抽提液漏出,并将手套放在振荡器上振荡抽提。在 ISO/DIS 12243 标准中这两种方法均可应用。方法 A 简单易行,但由于样品是在容器中抽提,容器对蛋白质有一定的吸附,会造成蛋白质的损失。方法 B 避免了容器的吸附,抽提更完全,但操作较复杂,且在用夹具密封手套时会造成两只手套吻合不完全,从而引起误差。通过对同一规格同一批号手套的试验(结果如表 2 所示)证明:两种方法测定结果无明显差异,可以选择其中任一方法进行抽提。

表 2 不同抽提方法蛋白质质量分数测定结果

样品编号	质量分数 $\times 10^6$	
	方法 A	方法 B
1	20.0	19.1
2	80.7	77.8
3	160.8	154.3
4	210.3	211.2

2.4 显色

2.4.1 沉淀的消除

在显色过程中,加入福林试剂后有可能产生沉淀,标准要求测定吸光度前离心或滤除沉淀。

如果用离心法聚集沉淀取清液比色,为分离完全,至少需要在离心速度为 $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下分离 15 min,否则在试验过程中溶液易浑浊,使结果偏大;如果过滤除去沉淀,过滤器对蛋白质有一定的吸附作用,会造成蛋白质的损失。

大量试验发现,在加入福林试剂时,如果使溶液温度保持在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上,几乎不产生沉淀,而且加入福林试剂后,即使溶液温度再下降到 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下,也不会产生沉淀。但是当溶液温度低于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,特别是只有 $2\sim 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,加入福林试剂时产生沉淀的可能性很大,而且沉淀产生以后,即使将溶液加热到 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,也无法澄清。因此,当溶液温度低于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,应适当加热后再加福林试剂,但加热温度不宜超过 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,以免影响后面的反应。

2.4.2 显色时间的确定

按标准要求,应在加入福林试剂后的 1 h 内进行比色。吸光度与显色时间的关系曲线如图 4 所示。由图 4 可以看出,在加入福林试剂的前 30 min,随着显色时间的延长,吸光度迅速增大,在 30 min 时达到最大值,然后呈缓慢下降趋势,并在 1 h 内基本稳定。这是由于蛋白质-铜的复合物与福林试剂反应完全需要一定的时间。因此建议在显色剂加入后 30~60 min 内进行比色。

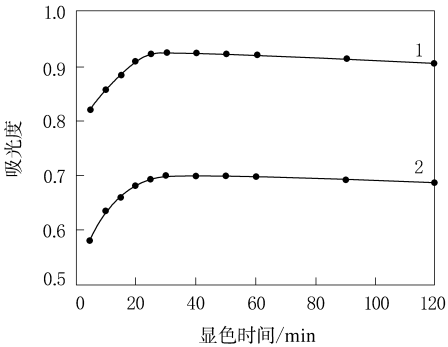


图 4 吸光度-显色时间关系曲线

蛋白质溶液质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$):1—150;2—80。

2.5 测定波长的确定

标准中要求在 $600\sim 750\text{ nm}$ 波长范围内测定吸光度。试验所得吸光度-波长关系曲线如图 5 所示。从图 5 可以看出,在波长为 750 nm 处,样品的吸光度最大。

2.6 样品溶液中蛋白质浓度的控制

NR 手套中水溶性蛋白质质量分数因生产工

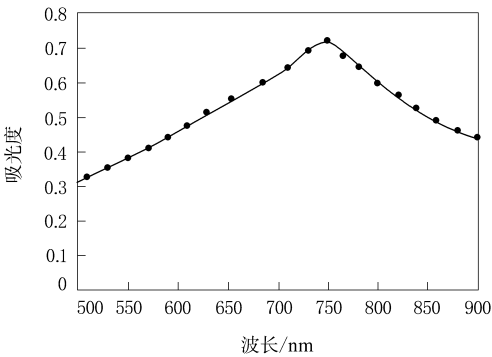


图5 吸光度-波长关系曲线

艺的不同而差异很大。经特殊处理生产出的低过敏性手套中水溶性蛋白质质量分数可小于0.000 02,而普通工艺生产的NR手套中水溶性蛋白质质量分数可高达0.002。面对样品中水溶性蛋白质质量分数的巨大差异,在无法确定样品的大致级别时,要在试验前先按正常步骤进行预试验,以确定样品溶液的吸光度范围。然后根据所测吸光度的大小对样品溶液进行浓缩或稀释,以使溶液中蛋白质质量浓度控制在 $2\sim100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。对样品溶液进行浓缩或稀释可参考以下方法。

(1)浓缩。准确移取20.00 mL蛋白质抽提液于聚丙烯离心管中,按比例移入标准要求的沉淀剂使蛋白质沉淀完全。停放、离心后将溶液倾出,只留下蛋白质沉淀。准确移取5.00 mL浓度为 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液将沉淀溶解完全。这样可以将样品溶液中的蛋白质质量浓度增

大至原来的4倍。

(2)稀释。准确取抽提液5.00 mL(或其它合适的量),加入沉淀剂使蛋白质沉淀完全后分离,然后加入20.00 mL(或其它合适的量)浓度为 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液将沉淀溶解完全,以使溶液中蛋白质质量浓度减小至 $2\sim100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 数据处理

由于NR胶乳中有多达240种不同的蛋白质和多肽,其中有57种能结合胶乳过敏患者血清中IgE抗体而被确认为过敏原,因此,在测定NR手套中水溶性蛋白质质量分数时,因其种类多、蛋白质本身的不稳定性以及其它因素的影响,对平行结果的要求不能以常规的分析检验对待。EN 455标准要求做4个平行样品,当个值超出均值的20%时,重新测定。而在ASTM标准中,则用“目前还没有可证明的标准参考资料来确定本方法的精度”来描述。

试验测定了大量NR手套样品中水溶性蛋白质质量分数,随机抽取部分检测数据如表3所示。由表3可以看出,样品中蛋白质质量分数在0.000 01~0.000 05范围内,相对偏差在20%以内或样品中蛋白质质量分数超过0.000 05时,相对偏差在10%以内是可以达到的。

3 结语

综上所述,劳里法测定NR手套中水溶性蛋

表3 实际样品中蛋白质质量分数测定结果

项 目	样品编号								
	1			2			3		
吸光度	0.520	0.542	0.531	0.637	0.506	0.523	0.374	0.353	0.335
蛋白质的质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	67.79	71.46	69.63	87.14	65.62	68.33	47.30	43.52	40.25
蛋白质质量分数 $\times10^6$	87.54	85.11	79.96	77.37	71.56	69.73	57.65	62.42	66.58
蛋白质质量分数均值 $\times10^6$	84.2			72.9			62.2		
相对偏差/%	3.96	1.08	5.03	6.13	1.83	4.34	7.31	0.35	7.04

项 目	样品编号								
	4			5			6		
吸光度	0.203	0.189	0.196	0.972	0.965	0.902	0.752	0.736	0.740
蛋白质的质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	20.85	18.62	19.71	162.73	160.52	147.86	98.62	90.72	93.52
蛋白质质量分数 $\times10^6$	19.73	14.96	16.25	638.99	647.96	609.66	1 990.71	2 002.41	1 956.52
蛋白质质量分数均值 $\times10^6$	17.0			632.2			1 982.2		
相对偏差/%	16.05	12.00	4.41	1.07	2.49	3.56	0.42	1.01	1.29

白质质量分数时应注意:①严格控制福林试剂的浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,若储存时溶液变为黄绿色或绿色,必须重复溴氧化步骤;②控制样品溶液中蛋白质的质量浓度在 $2 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内;③加入福林试剂时溶液温度控制在 $10 \sim 30^\circ\text{C}$ 之间;④比色应在显色剂加入后 $30 \sim 60 \text{ min}$ 内进行;⑤吸光度的最佳测定波长为 750 nm 。只要试验人员具有熟练的试验操作技能,严格按标准操作,并保证试验条件的一致性,在本工作所确定的

条件下即可得到比较准确的结果。

此外,NR手套中蛋白质质量分数的测定还有高压液相色谱法、NR胶乳过敏原免疫学测定法等。高压液相色谱法虽然避免了其它化学物质的干扰从而使测定更加灵敏,但作为标准方法,其试验过程过于复杂,仪器设备昂贵,不具备普及条件。而胶乳过敏原免疫学测定法的有效性也有待于进一步证实。

收稿日期:2003-11-26

双星鞋主攻高端市场

中图分类号:TS943.714 文献标识码:D

2003年青岛双星集团改变中低档市场策略,主攻高端市场,企业销售实现大幅增长,仅专业鞋销售同比增长59%,实现销售收入同比增长46%。

为迎接全球一体化尤其是国际知名品牌的挑战,从2002年起,双星以“打专业牌、带动休闲鞋大发展”为经营思路,主攻高档专业运动鞋。以运用高新材料为切入点,关注用户健康环保要求,使用对人体无刺激的材料,将无苯粘合技术、木质纤维用于生产,使用国际著名的杜邦公司及莱茵公司新材料,采用防电、防火、防水材料,生产的绝缘鞋、防火鞋和防水鞋为快速占领高端市场增添了砝码。

在研究大量运动员脚型的基础上,利用先进的开发软件,在掌握帮面主要材料伸缩性能、大底变形性能和中底变形模量的基础上研制的具有透气和防臭等优点的专业排球鞋1月份上市后订单已排至7月。2003年12月,该产品通过了专家鉴定,综合性能达到了国际同类产品的先进水平。与华东理工大学合作开发的纳米抗菌防臭运动鞋,技术鉴定为达到世界领先水平,该产品上市后,始终畅销不衰。

无垫底气道运动鞋、名人专用篮球鞋及专业网球鞋等成为第二十届山东省运动会青岛代表团、青岛乒乓球训练中心、颐中网球俱乐部及高尔夫球俱乐部等队的首选;第七代专业跑鞋、专业网球鞋、专业羽毛球鞋及名人专业篮球鞋不仅受到

国家专业体育队青睐,而且大量出口日本、美国及中东等十几个国家和地区。

(青岛双星集团 张艾丽供稿)

炭黑分散度测量仪

中图分类号:TQ330.38⁺1 文献标识码:D

英国《欧洲橡胶杂志》2004年186卷1期24页报道:

炭黑分散度测量仪 Dispergrader 是一种测量炭黑在胶料中分散度的仪器。Tech Pro公司于2000年从 Optigrade 公司手中购买了生产这种仪器的权利,而且立即着手提高其效率。

Dispergrader 可以测量炭黑在胶料中的分散度,但是 Optigrade 公司生产的仪器最大局限性是它只能测量硫化胶样品。Tech Pro公司的总裁 John Putman 来自一家混炼胶厂,他认为这种仪器要能检测未硫化胶才能在工厂里广泛应用。

由于 Dispergrader 已用于检测未硫化胶样品,因此公司现在正把它销往各个混炼胶厂。它能够在几秒钟内得出新鲜混炼胶可重复且一致的分散度测量结果。能够做到这一点的含义很深远,潜在的节约效果巨大。这正是目前各公司为了对付想确保充分分散而不得不过度混炼想要做的。如果他们能把胶料混炼至炭黑分散度刚好达到要求的程度,则每批混炼胶的混炼时间可以节省30s或1min,从而大幅度提高生产效率。

(涂学忠摘译)