蛋白质含量的紫外 - 可见吸收光谱测定法及蛋白质状态的影响

樊寒秋[#]，陈冬丽[#]，刘晓静，秦国宏[*]
（南京正大天晴制药有限公司，芳华药物研究院，江苏南京 210046）

摘要：紫外 - 可见吸收光谱法操作简便、分析速度快，适用于纯化后蛋白浓度的检测，是蛋白类药物开发过程中常用的检测方法。基于丰富的蛋白质和氨基酸的紫外吸收研究，当前已开发出多样的检测方法来针对不同的研究阶段和样品类型。但该法的干扰因素较多，例如蛋白质状态会影响其在 280 nm 处的紫外吸收（A_{280}）：蛋白质聚集会导致表观 A_{280} 高于真实 A_{280}，而蛋白质降解 / 解折叠可能导致表观 A_{280} 低于真实 A_{280}。总结不同蛋白质含量的紫外吸收测定方法，有助于为特定产品找到更适用的方法。此外，文章论述了蛋白质状态对紫外吸收的影响，并提出了相应的简便、易操作的判断方法和措施。

关键词：紫外 - 可见吸收光谱法；蛋白质；蛋白质聚集；蛋白质降解 / 解折叠；含量测定；干扰；偏差
中图分类号：R917；O657.32　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)05-0584-09
引用：樊寒秋 , 陈冬丽 , 刘晓静 , 等. 蛋白质含量的紫外 - 可见吸收光谱测定法及蛋白质状态的影响 [J]. 中国医药工业杂志 , 2025, 56(5): 584-592. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.05.003

Determination of Protein Concentration by Ultraviolet-visible Absorption Spectrometry and Effect of Protein State

FAN Hanqiu[#], CHEN Dongli[#], LIU Xiaojing, QIN Guohong*
(*Fanghua Pharmaceutical Research Institute, Nanjing Chia-Tai Tianqing Pharmaceutical Company, Nanjing 210046*)

ABSTRACT: Ultraviolet-visible absorption spectrometry is a rapid and simple method for quantifying protein concentration post-purification. It is widely utilized in the development of protein drugs. Based on extensive research on ultraviolet absorption of proteins and amino acids, a diverse range of detection methods has been developed to address different phases of research and sample types. Various factors can interfere with the accuracy of measurements, such as the state of the protein affecting its A_{280} value, protein aggregation leading to an artificially high A_{280} reading, and protein degradation or unfolding resulting in a lower apparent A_{280} value. By summarizing the ultraviolet absorption measurement methods for different protein contents, a more applicable method can be found for certain products. In addition, by discussing the impact of protein state on UV absorption, some corresponding simple and easy-to-operate methods and measures for judgment could be proposed.

Key Words: ultraviolet-visible absorption spectrometry; protein; protein aggregation; protein degradation/unfolding; assay; interference; deviation

在蛋白类药物开发过程中，准确测定蛋白质浓度是大多数生化、理化试验的重要先决条件。大量的生化数据（如酶活性）表示为蛋白质含量的函数，在此类计算中，蛋白质含量的测定误差往往会放大其他误差。因此，准确测量蛋白质浓度至关重要。

常见的蛋白质定量测定方法有凯氏定氮法、双缩脲法、福林酚法（Lowry 法）、2,2'- 联喹啉 -4,4'- 二羧酸法（BCA 法）、考马斯亮蓝法（Bradford 法）、

[#] 对文章贡献等同。
收稿日期：2024-08-02
作者简介：樊寒秋（1995—），女，硕士，从事新制剂的开发和研究。
陈冬丽（1990—），女，执业药师，从事药品质量管理研究。
通信作者：秦国宏（1983—），男，副研究员，从事新药研发工作。
E-mail：qinguohong5425@dingtalk.com

紫外 - 可见吸收光谱法（ultraviolet-visible absorption spectrometry，UV-Vis 法）等[1]。在选择蛋白质的定量分析方法时，蛋白成分的组成通常是一个关键的决定性因素。用 Bradford 法测定富含精氨酸（Arg）残基的蛋白质会产生人为偏高的结果，改用 Lowry 法或 BCA 法测定则结果准确性较高。相反，用 BCA 法测定富含半胱氨酸（Cys）的蛋白质会产生人为的高值，而 Lowry 法或 Bradford 法的测定结果更准确。一般来说，BCA 法和 Lowry 法适合分析复杂的蛋白质混合物[2]。选择蛋白质定量分析方法时需综合考虑蛋白量、方法特异性、存在的干扰物质、蛋白质中的氨基酸组成、样品制备过程以及样品所处的缓冲体系与检测方法的兼容性[3]。各种检测方法的测定范围及优缺点概述如表 1 所示。

UV-Vis 法操作简便、快速，无需其他耗材或复杂处理过程，灵敏度高，样品可回收，被广泛应用于测定蛋白质浓度。当前，基于各类探测技术和仪器的发展，以及丰富的蛋白质和氨基酸吸收光谱的研究成果，UV-Vis 法已成为蛋白质含量测定的首选方法[4]。特别是已知蛋白质的摩尔消光系数时，该法可简便、快速地获得准确的检测结果[5]，目前被广泛用于抗体药物的开发与商业化产品的质量控制。然而，该法专属性较差，对结构相近的有关物质缺乏选择性[6]；并且蛋白质状态（如聚集和降解 / 解折叠）也会影响紫外吸收值，从而影响检测结果。本文将从蛋白质含量的紫外吸收光谱测定方法和蛋白质状态对紫外吸收的影响角度进行论述，并对蛋白质不同状态产生的干扰进行分析，以提出简便、易行的判断方法和应对措施。

1 蛋白质含量的紫外吸收光谱测定法

1.1 测定原理

UV-Vis 法本质上是一种电子跃迁光谱学技术[7]。UV-Vis 吸收光谱产生于分子价电子在电子能级间的跃迁，是研究物质电子光谱的方法[8]。入射光和蛋白质发色基团中电子云之间的相互作用导致电子跃迁，将一个或多个外层电子或键合电子从基态激发至高能态，这种量子效应导致蛋白质对入射光波长产生特定吸收，生成相应的 UV-Vis 吸收光谱。根据比尔 - 朗伯定律，在单色光辐射穿过被测物质溶液时，在一定浓度范围内被该物质吸收的量与该物质的浓度和液层的厚度（光路长度）成正比，其关系可用式①描述[6,9—10]。

$$A=\lg\frac{1}{T}=Ecl \text{ 或 } A_\lambda=\lg\frac{1}{T_\lambda}\ (2.2) \quad \text{或 } T_\lambda=\frac{I_\lambda}{I_{\lambda 0}} \qquad ①$$

式中：$A(A_\lambda)$ 为样品溶液在给定波长 λ 下的吸光度；E 为吸收系数；c 为溶液的质量百分浓度 /%（或 $g\cdot mL^{-1}$）；l 为液层厚度 /cm，也可用 b 表示；$T(T_\lambda)$ 为透射率，I_λ 为透射后的光强度，$I_{\lambda 0}$ 为入射光的光强度[9]。在药物分析中，E 通常采用百分吸收系数 $E_{1\,cm}^{1\%}$［当溶液的质量百分浓度为 1 %～ n %（或 $g\cdot mL^{-1}$）、液层厚度为 1 cm 时的吸光度值］；或摩尔吸光系数 ε_λ（也称摩尔消光系数，即溶液浓度为 1 mol/L、液层厚度为 1 cm 时的吸光度值）表示。

在一定条件下，物质的吸收系数是恒定的，且与入射光的光强度、吸收池的厚度及样品的浓度无关。当已知某纯物质在一定条件下的吸收系数

表 1 不同蛋白质定量测定方法的测定范围及优缺点

Tab.1 Measuring Ranges, Advantages and Disadvantages of Different Protein Quantification Methods

检测方法	测定范围	优缺点概述
凯氏定氮法	0.2 ～ 2.0 mg 氮	灵敏度较低；样品不可回收；已不再普遍使用[2]
双缩脲法	1 ～ 10 mg 蛋白质	检测快速，灵敏度低；样品不可回收
Lowry 法	20 ～ 250 μg 蛋白质	灵敏度高；样品不可回收；需室温孵育至少 40 min[2]；可干扰检测结果的物质较多，制备蛋白质样品所需缓冲液的关键成分通常会干扰检测结果；能影响双缩脲反应的离子，会导致更强的干扰
BCA 法	80 ～ 400 μg 蛋白质	灵敏度较高，与 Lowry 法相似；样品不可回收；需在适当温度（通常为 60 ℃）孵育；还原剂和铜螯合物会干扰检测结果
Bradford 法	1 ～ 200 μg 蛋白质	灵敏度高；相对于 Lowry 法更简单、更快、更灵敏，已取代 Lowry 法[4]；样品不可回收；受普通试剂和生物样品中非蛋白组分的干扰较小，但去污剂、Triton X-100、SDS 等均会干扰检测，并且当检测样品的 pH 值较高时会影响显色[1]
UV-Vis 法	0.2 ～ 2 mg 蛋白质	操作最简便、快速，通常为首选方法；样品可回收；不能识别结构相似的物质，适用于纯化蛋白质的检测；摩尔消光系数已知时，准确度高；非常适用于快速估计蛋白质浓度[2]

（$E_{1\,cm}^{1\%}$或ε_λ），可在相同条件下将含该物质的供试品制成供试溶液，测定其吸光度，按式②（光路 l 为 1 cm）计算供试溶液中该物质的含量。

$$c=\frac{1}{E}\times A \text{ 或 } c=\frac{1}{\varepsilon_\lambda}\times A_\lambda \qquad ②$$

研究[11—12]表明，蛋白质在 180 ～ 240 nm 的吸收几乎完全是由肽键的 π→π* 跃迁引起的；240 ～ 300 nm 则由色氨酸（Trp）、酪氨酸（Tyr）和苯丙氨酸（Phe）残基的芳香侧链主导，其中 Phe 残基的摩尔吸收系数比 Tyr 和 Trp 小得多，因此蛋白质在该范围的吸收光谱主要取决于 Tyr 和 Trp 残基；二硫键（S—S）在 260 nm 附近具有显著的吸收特性。基于上述蛋白质结构及其紫外吸收特性，以及分光光度法的特性，UV-Vis 法常被用来测定蛋白质浓度[4]。

1.2 常见的紫外吸收测定方法与应用

在近紫外区域，由于含有 Trp、Tyr 和二硫键等生色基团，蛋白质通常在 280 nm 处有最大吸收（A_{280}）；该处的吸光度取决于 Trp、Tyr 和 Cys（与二硫键的形成密切相关）残基的含量[13]。在远紫外区域，蛋白质的主链肽键有很强的吸收，最大吸收波长约为 190 nm。早期，研究者们考虑到氧吸收导致的干扰和传统分光光度计在低波长处检测精度的限制，选择在更便于应用的 205 nm 处检测吸光度（A_{205}）[3]。各种侧链，包括含有 Trp、Phe、Tyr、组氨酸（His）、Cys、甲硫氨酸（Met）和 Arg 残基（以上基团按对吸光度的贡献大小降序排列）的侧链，均对 A_{205} 有贡献[14]，但主要为前 4 种氨基酸。

目前应用最广泛的是基于 A_{280} 进行的蛋白质浓度测量。对已知摩尔消光系数的纯化蛋白，测得 A_{280} 值，就能按式②准确计算得蛋白质含量[2]。通过假设 1 mg/mL 蛋白质溶液的吸光度 A_{280} 为 1.3，可估计受试蛋白质的浓度[4]。

准确获得蛋白质的摩尔消光系数，是确保 UV-Vis 法准确测定蛋白质含量的前提。Edelhoch 法是测定蛋白质摩尔吸光系数的首选方法[13,15]。PACE 等[13]在研究 Edelhoch 法时，开发出计算蛋白质在水中的摩尔消光系数［ε_{280}/(L·mol^{-1}·cm^{-1})］的方程（亦称 Pace 方程，式③）。该方程已被大量研究数据证实具有很高的精度与重现性[4,15]，并被广泛用于摩尔消光系数理论值或预测值的计算[15]。研究[13,15—16]表明，使用 Pace 方程获得的理论摩尔消光系数和 Edelhoch 法获得的实测摩尔消光系数无显著差异。Edelhoch 法和 Pace 方程也已被证实适用于检测单克隆抗体、双特异性抗体、融合蛋白、重组蛋白、多肽和双特异性 T 细胞衔接子（bispecific T cell engagers，BiTE）等多种结构类型的生物治疗蛋白[15—18]。与其他测定摩尔消光系数的方法（如氨基酸分析法、凯氏定氮法和重量分析法等）相比，Pace 方程和 Edelhoch 法更加可靠、有效、安全，并能节省时间和成本。Pace 方程和 Edelhoch 法都可用于获取抗体在 280 nm 处的摩尔消光系数[15—16]，但 Edelhoch 法同时考虑了蛋白质结构对 A_{280} 的影响。蛋白质的吸收光谱特性取决于其发色基团的局部环境和溶剂暴露情况[16]。因此，在有更高准确度要求的情况下，建议使用 Edelhoch 法，即在考虑蛋白质折叠、降解或解折叠状态的情况下测量其摩尔消光系数[19]。

$$\varepsilon_{280}=5\,500\times(\text{Trp 残基数})+1\,490\times(\text{Tyr 残基数})+125\times(\text{二硫键数}) \qquad ③$$

对于不含 Trp 残基的蛋白质，Edelhoch 法和 Pace 方程准确度略低，推荐使用 SCOPE 法[17]，即：使用在 205 nm 处的肽键吸收来测量蛋白质浓度。该法适用于检测由无吸收干扰的缓冲液或溶剂稀释的 1 ～ 100 μg/mL 蛋白质溶液[4,13]。在 205 nm 处，侧链中对蛋白质总吸收有显著贡献的残基为 Trp、Phe、Tyr 和 His，其他如 Arg、Met 和胱氨酸的含量相对较低，作用有限[17]。由此可得：蛋白质在 205 nm 处摩尔消光系数（ε_{205}）的变化主要是由上述 4 种氨基酸残基的含量变化引起的。在此基础上，有研究者给出了估计未知蛋白质或蛋白质混合物在 205 nm 处摩尔消光系数的更准确方法，并推荐了推导方程（式④）。式⑤可用于未知蛋白质浓度的粗略估计。

$$\varepsilon_{205}^{1\,mg/mL}=27+120\,(A_{280}/A_{205}) \qquad ④$$

$$c=A_{205}/(31\times l) \qquad ⑤$$

核酸在 280 nm 处有很强的吸收（通常是蛋白质的十数倍），同时也是蛋白制剂中常见的污染物[3]。

因此，当蛋白质样品中存在核酸类物质干扰时，应考虑核酸对紫外吸收的干扰。早在 1941 年就有研究者提出利用 280 和 260 nm 两处蛋白质吸光度的差异来消除干扰的测量方式 [20]；LAYNE 等 [21] 于 1957 年提出估算蛋白质浓度 [c/(mg·mL^{-1})] [11,22] 的方法（式⑥），能在材料量少及其他方法难以应用的条件下（如存在硫酸铵或其他盐的情况）快速、简便地估计蛋白质浓度。然而，对于常规的生化计算来说，这个方程所得的结果不够精确 [2]。

$$c=1.55A_{280}-0.76A_{260} \quad ⑥$$

有研究者基于吸光度差异原理，提出在溶液中无细胞提取物的情况下，利用在 230 和 260 nm 两处测得的吸光度快速、准确测定蛋白质浓度的方法（式⑦）[23]。文献 [24] 则描述了将 215 和 225 nm 两处蛋白质吸光度的差值乘以转换因子来估计蛋白质含量的方法（式⑧）。该法可以在特定条件下精确测量 5 μg/L 以内的特定蛋白质含量，适用于测量微量未表征的啮齿动物胚胎蛋白、血浆中的总蛋白和白蛋白，以及脑脊液和胸膜液中的蛋白质，不适用于尿液中蛋白质的测定 [25]。此外，基于 235 和 280 nm 两处吸光度之间的差异（主要是基于肽键以及可能的二级和三级结构的微小贡献），文献 [24] 还提出了另一种计算方法（式⑨），相对于前法可以校正核酸或特定氨基酸组分的干扰。

$$c=0.183A_{230}-0.075\,8A_{260} \quad ⑦$$

$$c=144(A_{215}-A_{225}) \quad ⑧$$

$$c=(A_{235}-A_{280})/2.51 \quad ⑨$$

在生物化学研究和药物开发的不同阶段，针对不同的样品和可接受的准确度，应使用基于不同波长处吸光度进行计算的测定方法。影响紫外吸收光谱法测量准确性的因素，除了方法的固有误差外，还有蛋白质结构（生色基团）、缓冲系统等与所选方法的适用性，核酸干扰，光谱仪线性范围，光散射矫正等外部干扰；同时，蛋白质自身的状态也会产生干扰，如蛋白质的聚集或降解 / 解折叠，分别会引起光散射 [22,26—27] 和吸收峰蓝移 [13,28—29]，从而影响检测结果。下面将探讨蛋白质状态对蛋白类药物质量研究和控制中常用的检测指标（A_{280}）的影响，以及识别、判断与应对措施。

2 蛋白质聚集对检测结果的影响

由于蛋白质天然状态下的构象改变所需的能量很低，所以溶液中的蛋白质存在 3 种状态，分别为天然构象、部分可逆展开的中间体、不可逆变性或修饰的状态。部分未展开的中间体或已发生不可逆变性状态的蛋白，可在非常低的浓度下发生聚集、沉淀或吸附。因聚集和沉淀而形成的微小粒子自身产生的 A_{280} 极小 [23]，可使入射光发生瑞利散射与米氏散射 [26—27]，减少到达检测器的光量，导致表观 A_{280} 高于真实 A_{280}，即检测值较真实值大；并且，表观 A_{280} 会随着入射光波长的减小而增大。因此，蛋白聚集体散射会造成蛋白浓度测定值高于预期结果。

2.1 原理

因蛋白质聚集和沉淀生成的微小粒子，若粒径 r 小于入射光波长 λ 的 1/10，会引起瑞利散射（弹性散射）。瑞利散射的散射光强度与入射光光波长的四次方成反比（式⑩）[30]，即入射光波长越短，散射光强度越大。在紫外吸收图谱中，随着入射光波长的降低，受瑞利散射影响而产生的吸收伪影越大，造成的干扰越强。

$$I_R=I_0(2\pi n_0/\lambda)^4(r^6/2D^2)[(\varepsilon-\varepsilon_0)/(\varepsilon+2\varepsilon_0)]^2(1+\cos^2\theta) \quad ⑩$$

式中：I_R 和 I_0 分别为瑞利散射的散射光光强和入射光光强；n_0 为介质折射率；D 为粒子与观察者之间的距离；ε_0 和 ε 分别为相对介电常数和介电常数；θ 为散射角。

粒径大于或等于入射光波长 λ 的粒子，主要引起米氏散射，米氏散射的散射光强度与入射光波长的二次方成反比，与粒径大小成正比，即粒径越大，散射光强度越大；但随着粒径的增加，散射光强度随波长变化的起伏变弱 [30]。由于蛋白质聚集体的粒度分布范围较广（从纳米级到微米级），所以瑞利散射和米氏散射通常同时存在，吸收伪影是它们共同作用的结果。

美国 Thermo Fisher 公司进行了以 UV-Vis 吸收光谱识别牛血清 γ 球蛋白（bovine gamma-globulin，BGG）样品中蛋白质聚集体的试验 [26]，证实加热和高盐状态均会导致蛋白聚集体增加；同浓度下，高

盐 BGG 溶液在 260 ～ 340 nm 的吸光度值均大于不含盐的 BGG 溶液，并且不论样品外观是否澄清，均不影响该结果。该现象产生的原因为微小的 BGG 聚集体引起的瑞利散射和米氏散射。

2.2 判断方法

采用基于光散射原理的检测技术和方法，如浊度法、动态光散射法、纳米颗粒跟踪分析技术和流式细胞术等[31]，可检测出溶液中悬浮的蛋白质聚集体。当使用 UV-Vis 法测得的蛋白质浓度高于预期时，应判断该检测结果是否真实、准确。若样品外观出现明显的乳光或沉淀，说明出现了蛋白质聚集，检测结果不准确。而对于外观澄清的样品，在排除仪器和人为因素后，可根据以下方法进行判断。

由于芳香族氨基酸不吸收波长 310 nm 以上的光，因此在大于 310 nm 的波长区域，蛋白质吸光度值应该为 0[12]。而 UV-Vis 吸收光谱中如果有蛋白质聚集体散射贡献的吸收伪影，则会表现出波长大于 310 nm 的区域基线升高。散射造成的吸收伪影可影响整个 UV-Vis 吸收光谱的表观吸光度，且影响程度依赖于入射光的波长。基于此，可根据长波长（大于 310 nm）处的基线判断是否存在因蛋白质聚集体散射引起的蛋白浓度测定值高于预期的情况。

也可采用浊度参数，直接对溶液中的蛋白质聚集状态进行分析[32]。测量样品在近紫外区域的光密度（浊度）变化，尤其是 340 和 350 nm 两处[33]，可检测是否存在由各种应力（如 pH 值、温度和高浓度）诱导而产生的蛋白质聚集[28]，继而判断是否存在蛋白质聚集体散射引起的蛋白浓度测定值偏高。此外，通过 UV-Vis 漫反射光谱、波长 - 反射率关系曲线，也可判断是否存在蛋白质聚集体散射引起的蛋白质浓度测定值偏高。

另一个可使用的参数是聚集指数（aggregation index，AI，式⑪），常用于确定溶液中是否存在较大的聚集物，也可以帮助研究者评估溶液中是否存在低聚物，判断样品的聚集状态。

$$AI=A_{350}/(A_{280}-A_{350})\times 100 \qquad ⑪$$

式中：A_{280} 和 A_{350} 分别是在 280 和 350nm 处的吸光度。当 AI 低于 3 时，样品为透明溶液；AI 在 3 ～ 30，可能存在一些聚集；AI 在 30 以上，样品严重聚集。

蛋白质聚集后可能生成淀粉样蛋白颗粒，因此可加入选择性的、能迅速对淀粉样蛋白颗粒进行染色[28,34]的刚果红[34—35]、硫磺素 S[36—37]、硫磺素 T[34,38]作为聚集指示剂，直接进行观测。上述染料均可与多种淀粉样蛋白原纤维结合，引发特征性光谱变化，并且该反应具有特异性，蛋白单体和二聚体不会被染色。刚果红可能是通过 2 个带负电荷的磺酸基团和 2 个带正电荷的氨基酸残基之间的化学键与淀粉样蛋白发生结合[35]。硫磺素 S 和硫磺素 T 的结合机制可能与刚果红类似[38]。刚果红与淀粉样蛋白颗粒结合后，UV-Vis 吸收图谱发生变化，并且在偏光显微镜下，被染色的淀粉样蛋白呈现出典型的“苹果绿”双折射现象；硫磺素 T 与淀粉样蛋白颗粒结合后，会在 440 nm 处显现出最大吸收峰[34]，在 482 nm 处的荧光增强[38]，也具有特异性。因此，上述染料可用于判断是否存在蛋白质聚集体的散射干扰。

另外，使用渗透法[39]、静态光散射、动态光散射、分析型超速离心技术[40]、前向光散射和光透射分析技术[27]、中子小角散射[41]等手段也可进行分析和判断。

2.3 解决措施

对于蛋白质聚集体浓度较低的样品，外观变化不明显时可通过长波长区域的基线估计散射贡献的吸收伪影，并扣除该值对结果进行校正，即基线校正。该法基于瑞利散射的特性，虽简便、快捷，但校正效果一般。

也可选择将上述长波长基线代入式⑫（由比尔 - 朗伯定律以及瑞利散射公式推导而来）[26]中，进行更准确的散射校正，即从检测结果中扣除散射贡献的吸收伪影，对结果进行校正。

$$A_{scatter}=\log(I_0/I_{no\ scatter})+A_{offset}=\log[I_0/I_0-(f/\lambda^4)]+A_{offset} \qquad ⑫$$

式中：$A_{scatter}$ 为散射引起的吸收伪影；I_0 为入射光光强；$I_{no\ scatter}$ 为未产生散射的对照品的透射光光强，即到达检测器的光强；λ 为波长；f 为一个任意的比例因子，当 λ 为 280 nm 时，f 值推荐为 6.1×10^8；A_{offset} 为偏移量，当 λ 为 280 nm 时，推荐值为 0.006[26]。

在有条件的情况下，可进行漫反射校正，即在UV-Vis分光光度计上安装一个积分球［该附件是一个空心球，空腔内壁上涂有高反射率涂层（一般为硫酸钡）］，收集漫反射产生的均匀散射光，并汇聚到检测器上，得到样品的反射率，从而推算出样品的真实吸光度，对检测结果进行校正。或者直接通过紫外 - 可见 - 近红外漫反射光谱仪测定样品的反射率，进而校正检测结果。

漫反射校正同样适用于蛋白质聚集体浓度较高的样品，即已呈现浑浊或乳白色外观的样品（通常情况下不建议检测浑浊样品的吸光度）。若无进行漫反射校正的仪器或附件，可将样品经过滤或（和）离心[3,7,19]等去浊程序后，再使用UV-Vis分光光度计进行检测，并结合相应方法进行基线校正或散射校正。

蛋白质聚集在蛋白类药物的生产和贮存过程中难以避免，蛋白质聚集造成的药物安全性威胁和药效降低一直是制药和医疗领域关注的重点。找到灵敏、可靠的检测技术和方法是解决该问题的关键。在利用紫外吸收方法进行蛋白质含量测定时，除了要排除检测干扰，也要综合各项质量数据的变化，确保产品质量符合预期。

3 蛋白质降解 / 解折叠对检测结果的影响

蛋白质在外界压力下会发生降解 / 解折叠等结构变化。此时，虽然总氨基酸浓度不变，但由于肽骨架破坏或变化，芳香族氨基酸暴露于溶剂中，会造成最大吸收峰蓝移[13,19,28—29]，吸光度和光谱精细结构也会产生微小变化[12]，最终导致表观A_{280}低于真实A_{280}。

3.1 原理

一般情况下，蛋白质在UV-Vis波长范围内的吸收光谱是肽键的羰基（190 ～ 210 nm）、芳香族氨基酸（250 ～ 320 nm）、二硫键（250 ～ 300 nm）以及蛋白质结构共同作用的结果。蛋白质在280 nm处产生吸收的生色基团主要是Trp、Tyr和Cys残基（二硫键的贡献较小）[13]；根据电子跃迁及分子轨道的种类，该处主要是n→π* 跃迁产生的吸收带（n→π* 跃迁的能量最小，一般λ_{max}>270 nm）。由于蛋白质分子中生色基团共轭π键的离域作用，当分子中任何一个组成共轭体系的原子受外界溶剂作用时，会立即影响到体系的其他部分，所以蛋白质的生色基团对微环境高度敏感[42]。当蛋白质的天然状态发生变化时，每个芳香族氨基酸残基周围的微环境也随即发生变化，这将导致吸收峰的位移。一般来说，当芳香族氨基酸残基在溶剂中的暴露增多时，吸收峰发生蓝移[13,19,28—29]。

蛋白质结构对A_{280}也有贡献。记录蛋白质被酶消化过程的UV-Vis吸收光谱，直至吸光度稳定。其中的A_{280}为蛋白质完全降解后游离芳香族氨基酸的吸光度值，并且该值与通过式⑫推算所得的值一致，这也是Edelhoch法可更准确地测定蛋白质在280 nm处摩尔吸光系数的原因之一（该方法未忽略蛋白质结构对A_{280}的贡献）。所以综合各项因素，当蛋白质发生降解 / 解折叠时，表观A_{280}降低。

3.2 判断方法

常用的蛋白质二级、三级结构检测方法，均可用于判断蛋白质是否出现降解 / 解折叠，例如圆二色谱、傅里叶变换红外光谱、凝胶电泳、蛋白质内源荧光[43—44]、X射线晶体学和二维核磁共振等技术。上述方法多依赖于专业操作和昂贵设备，且通常处理能力较低、成本高昂。如采用圆二色谱技术检测时不宜采用包括磷酸盐、硫酸盐、碳酸盐和乙酸盐在内的常见生化试剂；基于核磁共振和X射线晶体学的检测方法，可能需要同位素或替代标记辅助、大量蛋白质样品以及强大的计算能力支撑[45]。因此，这些技术在时间和资源有限的情况下，对于许多研究人员和生物制品制造商来说并不总是易于获取或具有成本效益的。

蛋白质主要因Trp、Tyr和Phe残基的存在而吸收紫外线，最大吸收分别在280、275和258 nm处。因UV-Vis吸收光谱可用于表征蛋白质全局结构，故推荐用其判断蛋白质是否发生降解 / 解折叠。已有相关研究[28,46—47]证实UV-Vis吸收光谱也可以用来检测蛋白质三级结构的变化，而且该法不仅操作简便、快速、样品可回收，且对仪器设备要求低，更易在实验室内和实验室间进行，同时可收集大量数据，从而更好地呈现出差异性规律。

该法主要通过折叠性比率（$A_{280}/A_{275}+A_{280}/A_{258}$）这一参数[36,42]来判断蛋白质的结构变化。该参数也称为折叠比，可反映3种芳香族氨基酸残基所处微环境的变化，相较于荧光技术可以更全面地反映出蛋白质三级结构的变化。当折叠比增大时，意味着Trp、Tyr残基所处的微环境从非极性转变为极性，从包埋于蛋白质内部转变为暴露于溶剂中[42]，即蛋白质发生了降解/解折叠。折叠比可有效、敏感、直观地反映出蛋白质的结构变化，基于此特性构建的探针不仅可用于监测因浓度、pH值、温度等因素变化导致的蛋白质构象变化，而且可拓展出广阔的潜在应用价值，例如：应用于辅料或缓冲液的筛选；追踪蛋白质的展开和重折叠过程，评估蛋白质的可开发性；评价蛋白质-蛋白质和蛋白质-配体的相互作用；甚至在有微孔板读取器和紫外线透明板的情况下，可以高通量地筛选出重折叠条件等。

3.3 解决措施

通过凝胶电泳[2]、体积排阻色谱等方法可对发生降解/解折叠的蛋白质浓度进行简易测定。目前业内对于该议题的关注较少，原因可能是蛋白质的降解/解折叠对表观A_{280}的影响较小。而且，当发生降解/解折叠的蛋白质浓度足够高到能够影响表观A_{280}时，蛋白质结构早已破坏，疏水区暴露，聚集和沉淀现象明显[48—49]。蛋白质的功能与活性高度依赖于其高级结构，因此蛋白质的降解/解折叠在蛋白类药物的开发中属于重点关注项目。目前，虽然ICH Q5C指导原则中尚未对生物技术产品/生物制品在有效期限内降解产物的最大可接受降低值或变化范围提出建议，但已提出在稳定性试验中若检出的降解产物有明显的定性或定量变化时，应考虑其潜在的危害性，并在长期稳定性试验中对降解产物进行定性和定量分析；ICH Q3B指导原则中对降解产物的限度、报告和控制也进行了详细规定和建议。故当判断蛋白质发生了降解/解折叠，界定降解产物的安全性、报告限度、界定限度等方面的工作更值得关注和研究。

4 总结

基于紫外吸收的蛋白质浓度测定法已发展出多种测量手段和方法，适用于不同类型的样品，被广泛应用在从药物早期开发到上市产品质量控制的各个阶段。UV-Vis法操作简便、快速，是目前抗体类药物蛋白质浓度测定的首选方法。蛋白质在溶液中的稳定性较差，状态改变时可引起表观A_{280}变化，干扰蛋白质含量测定结果。因此，快速判断和排除干扰对检测尤为重要。目前市面上检测蛋白质浓度的仪器设备多关注于如何快速、高通量地得到检测结果，而对于由蛋白质聚集和降解引起的干扰缺乏判断和排除手段。本文对蛋白质聚集体引起的表观A_{280}升高给出了简便、易行的判断方法和解决干扰的措施，同时推荐使用折叠比简单判断蛋白质是否发生了降解/解折叠。所提出的方法都较易排除干扰，或能辅助识别质量变化，提示检测人员是否需启动更深入的研究。期望随着技术进步和仪器整合程度的提高，检测人员可在检测过程中容易地判断蛋白质含量检测结果的准确度，并对干扰检测结果的因素进行判断和排除。

参考文献：

[1] 黄亚东，项　琪. 基因工程技术与重组多肽的开发应用[M]. 武汉：华中科技大学出版社，2021: 15-19.

[2] OLSON B J, MARKWELL J. Assays for determination of protein concentration[J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2007, **3**: 3-17.

[3] JOHN M. WALKER The protein protocols handbook[M]. 2009: 1-6.

[4] SIMONIAN M H. Spectrophotometric determination of protein concentration[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2002, **3**: 177-189.

[5] GILL S C, VON H P H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data[J]. *Anal Biochem*, 1989, **182**(2): 319-326.

[6] 杭太俊. 药物分析（第8版）[M]. 北京：人民卫生出版社，2016.

[7] JAFFE H H, ORCHIN M, WEINER M A. Theory and applications of ultraviolet spectroscopy[J]. *Microchem J*, 1963, **11**(1): 149-150.

[8] 华东理工大学，四川大学. 分析化学（第7版）[M]. 北京：高等教育出版社，2018.

[9] HENDRY W. Determination of organic compounds by ultraviolet-visible spectroscopy [J]. *J Chromatogr Sep Tech*, 2023, **14**(3): 1.

[10] 赵小平, 李 欣. 生物药物检测技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 37-39.

[11] ANTOSIEWICZ J M, SHUGAR D. UV-Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: selected applications [J]. *Biophys Rev*, 2016, **8**(2): 163-177.

[12] SCHMID F X. Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry [J]. *ELS*, 2001, **12**(1): 13-17.

[13] PACE C N, VAJDOS F, FEE L, *et al*. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein [J]. *Protein Sci*, 1995, **4**(11): 2411-2423.

[14] GOLDFARB A R, SAIDEL L J. Ultraviolet absorption spectra of proteins [J]. *Science*, 1951, **114**(2954): 156-157.

[15] BATABYAL D, LORD H, AHLSTROM B, *et al*. Determination of the experimental extinction coefficient of therapeutic proteins using the Edelhoch method [J]. *Biologicals*, 2021, **71**: 42-47.

[16] MAITY H, WEI A, CHEN E, *et al*. Comparison of predicted extinction coefficients of monoclonal antibodies with experimental values as measured by the Edelhoch method [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, **77**: 260-265.

[17] 张璐瑶, 朱 伟, 李瑛傑, 等. 消光系数法与二喹啉甲酸法测定多肽浓度精密度的比较 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2023, **52**(2): 206-211.

[18] 孙开青, 李文华, 周冬梅, 等, 单克隆抗体消光系数测定方法的建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 2018, **31**(6): 633-637.

[19] 王 兰, 武 刚, 于传飞, 等. 一种单抗制品理论消光系数与试验确证结果的比较 [J]. 中国药学杂志, 2016, **51**(17): 1508-1512.

[20] SCOPES R K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm [J]. *Anal Biochem*, 1974, **59**(1): 277-282.

[21] LAYNE E C. Spectrophotornetric and turbidimetric methods for measuring proteins [J]. *Methods Enzymol*, 1957, **3**: 447-454.

[22] NOBLE J E. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes [J]. *Methods Enzymol*, 2014, **536**: 17-26.

[23] KALB V J R, BERNLOHR R W. A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts [J]. *Anal Biochem*, 1977, **82**(2): 362-371.

[24] WHITAKER J R, GRANUM P E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm [J]. *Anal Biochem*, 1980, **109**(1): 156-159.

[25] JAMES B, LABORD E, DENZIL L, *et al*. Measurement of protein in serum and rodent embryos by spectrophotometry at 215 and 225 nm [J]. *Microchem J*, 1979, **24**(3): 275-286.

[26] THERMOFISHER. Protein aggregation identified through UV-Visible absorption spectroscopy [EB/OL]. [2024-06-01]. https: //assets. thermofisher. com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/protein-aggregation-uv-visible-absorption-spectroscopy-en-an53585. pdf.

[27] PENZKOFER A, SHIRDEL J, ZIRAK P, *et al*. Protein aggregation studied by forward light scattering and light transmission analysis [J]. *Chem Phys*, 2007, **342**(1-3): 55-63.

[28] JAMEEL F, HERSHENSON S. Formulation and process development dtrategies for manufacturing biopharmaceuticals [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010: 173-205.

[29] DEE D, PENCER J, NIEH M P, *et al*. Comparison of solution structures and stabilities of native, partially unfolded and partially refolded pepsin [J]. *Biochemistry*, 2006, **45**(47): 13982-13992.

[30] SHAME Y, RENZ O. Encyclopedia of color science and technology [M]. Cham: Springer, 2023: 1097-1107.

[31] 高恺旻, 颜晓梅. 生物制药领域蛋白质团聚检测技术的研究进展 [J]. 分析化学, 2018, **46**(10): 1507-1517.

[32] PIGNATARO M F, HERRERA M G, DODERO V I. Evaluation of peptide/protein self-assembly and aggregation by spectroscopic methods [J]. *Molecules*, 2020, **25**(20): 4854.

[33] VINCENTELLI R, CANAAN S, CAMPANACCI V, *et al*. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies [J]. *Protein Sci*, 2004, **13**(10): 2782-2792.

[34] LEVINE H. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T [J]. *Methods Enzymol*, 1999, **309**: 274-284.

[35] KLUNK W E, PETTEGREW J W, ABRAHAM D J. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation [J]. *J Histochem Cytochem*, 1989, **37**(8): 1273-1281.

[36] BITER A B, WELTJE S, HUDSPETH E M, *et al*. Characterization and stability of trypanosoma cruzi 24-C4 (Tc24-C4), a candidate antigen for a therapeutic vaccine against chagas disease [J]. *J Pharm Sci*, 2018, **107**(5):

1468-1473.

[37] GUNTERN R, BOURAS C, HOF P R, *et al*. An improved thioflavine S method for staining neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease [J]. *Experientia*, 1992, **48**(1): 8-10.

[38] LEVINE H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution [J]. *Protein Sci*, 1993, **2**(3): 404-410.

[39] STEIN A, PAGE D. Core histone associations in solutions of high salt. An osmotic pressure study [J]. *J Biol Chem*, 1980, **255**(8): 3629-3637.

[40] 褚文丹, 芦亚菲, 李文奇. 沉降速率法研究蛋白质自聚集 [J]. 试验技术与管理, 2022, **39**(5): 9-14.

[41] VERHEUL M, PEDERSEN J S, ROEFSS S P, *et al*. Association behavior of native beta-lactoglobulin [J]. *Biopolymers*, 1999, **49**(1): 11-20.

[42] BITER A B, POLLET J, CHEN WH, *et al*. A method to probe protein structure from UV absorbance spectra [J]. *Anal Biochem*, 2019, **587**: 113450.

[43] CAMILLONI C, ROCCO A G, EBERINI I, *et al*. Urea and guanidinium chloride denature protein L in different ways in molecular dynamics simulations [J]. *Biophys J*, 2008, **94**(12): 4654-4661.

[44] GAO K, OERLEMANS R, GROVES M R. Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery [J]. *Biophys Rev*, 2020, **12**(1): 85-104.

[45] 韩　旭, 李　倩, 韦泓丽, 等. 工业应用导向的蛋白质结构与功能研究进展 [J]. 生物工程学报, 2022, **38**(11): 22-26.

[46] ZHANG J, YE S, ZHONG K, *et al*. A machine-learning protocol for ultraviolet protein-backbone absorption spectroscopy under environmental fluctuations [J]. *J Phys Chem B*, 2021, **125**(23): 6171-6178.

[47] 张　鹏, 杨一帆, 王　辉, 等. 食品体系中糖基化蛋白质结构的表征和检测方法综述 [J]. 2023, **43**(9): 2667-2673.

[48] 李晨曦, 孙泽宇, 赵　瑜, 等. 二维相关光谱法及其在蛋白类物质分析中的研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 2023, **43**(7): 1993-2001.

[49] 陆治锦, 文玺凯, 刘鲁杰, 等. 不同单克隆抗体聚集与断裂行为的多维分析 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, **51**(1): 42-49.

