مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸۵ خرداد و تیر ۱۳۹۲، صفحات ۷۴ تا ۸۴

استفاده از اتانول و دمای پایین در جداسازی آلبومین از پلاسمای انسانی

دکتر کامران موسوی حسینی[۱]، دکتر صالح نصیری[۲]، مجید حیدری[۳]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون، aramhaydari@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۷/۱۳ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: *پلاسمای انسانی منشا پروتئین‌ها و آنزیم‌های متفاوتی می‌باشد که دارای اثرات دارویی متفاوتی می‌باشند. از این داروها می‌توان فاکتورهای انعقادی هشت و نه، ایمونوگلوبولین‌ها، و آلبومین را نام برد. آلبومین دارای مولکولی زنجیره‌ای با ۵۸۵ آمینو اسید می‌باشد. آلبومین دارای ۱۷ پل دی سولفیدی می‌باشد که ایجاد یک پروتئین کروی پایدار می‌نماید. وزن مولکولی آلبومین حدود ۶۶۵۰۰ دالتون می‌باشد که حدود ۸۰ درصد فشار انکوتیک خون را سبب می‌شود. هدف از این مطالعه، تهیه‌ی آلبومین از پلاسمای انسانی با استفاده از اتانول و دمای پایین بوده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه پلاسمای مورد استفاده از نوع FFP و اتانول مصرفی از نوع تجاری با خلوص ۹۴ تا ۹۶ درصد بود. مواد شیمیایی مصرفی شامل سدیم هیدروکساید، سدیم کلراید، اکتانوئیک اسید Analytical Grade و از شرکت مرک بود. در این مطالعه جداسازی آلبومین از پلاسمای انسانی با استفاده از اتانول در دمای پایین صورت پذیرفت. با تنظیم پارامترهایی از قبیل pH، درجه حرارت، و درصد غلظت الکل در شرایط مختلف اجزای مختلف خونی از پلاسما جدا گردید که شامل قسمت‌های یک تا پنج بود. هر کدام از این اجزا می‌تواند منبع خوبی جهت جداسازی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در مراحل بعدی باشد. جزء اول منبع خوبی برای فیبرینوژن و فاکتور هشت انعقادی، جزء دوم مناسب برای تهیه‌ی ایمونوگلوبولین‌ها و در نهایت جزء پنجم منبع بسیار مناسب جهت تهیه‌ی آلبومین بود.*

یافته‌ها: *در این مطالعه آلبومین با دو غلظت پنج و بیست درصد تهیه گردید و مقایسه‌ی کیفیت در دو غلظت حکایت از خلوص بیش از ۹۵ درصد داشت. در تهیه‌ی آلبومین با غلظت ۵ درصد راندمان ۷۱ درصد و در تهیه‌ی آلبومین با غلظت ۲۰ درصد راندمان ۷۵/۵ درصد به‌دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *آلبومین تهیه شده خلوص بیش از ۹۵ درصد را نشان داد و میزان پلیمر آن کمتر از ۵ درصد بود. در تهیه‌ی آلبومین ۵ درصد می‌توان از غلظت پایین‌تر پایدار کننده‌ی سدیم کاپریلات استفاده نمود و همچنین در فرمولاسیون نشان داده شده که فرآیند تهیه را می‌توان با pH حدود ۴/۷ به‌جای ۶/۵ شروع نمود، زیرا امکان آلودگی کاهش می‌یابد.*

واژگان کلیدی: خالص سازی، پلاسمای انسانی، پروتئین، آلبومین

مقدمه

خون حاوی انواع پروتئین‌ها می‌باشد که دارای اثرات دارویی متنوعی هستند (۵-۱). در اثر پالایش پلاسما این پروتئین‌ها را می‌توان جداسازی نمود (۹-۶). مهم‌ترین نقش سرم خون تنظیم حجم پلاسما و نقل و انتقال مولکول‌های کوچک، برخی داروها، اسیدهای چرب و هورمون‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد (۱۱و ۱۰). یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های

۱- دکترای تخصصی شیمی دارویی، دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون
۲- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون
۳- کارشناس ارشد ایمونولوژی، مربی مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون

Archive of SID
www.SID.ir

خون آلبومین می‌باشد که ۵۰ تا ۶۰ درصد پروتئین پلاسما را تشکیل می‌دهد. آلبومین از زنجیره‌ای با ۵۸۵ آمینواسید تشکیل شده و با ۱۷ پل دی سولفید ایجاد یک پروتئین کروی نسبتاً پایدار می‌نماید (۱۲). با توجه به وزن مولکولی حدود ۶۶۵۰۰ دالتون حدود ۸۰ درصد فشار انکوتیک کلوییدی خون را سبب می‌شود (۱۳). آلبومین علاوه بر افزایش حجم پلاسما می‌تواند در سوختگی‌ها، جراحی، خونریزی و یا سایر مواردی که موجب کاهش حجم خون می‌گردد، مصرف شود، همچنین درسندرم نفروتیک، سیروزکبدی، هیپوآلبومینمی، هیپربیلیروبینمی و نوزادان نارس می‌تواند مصرف گردد (۱۴). مصرف آلبومین ۵ درصد بیش‌از آلبومین ۲۰ درصد می‌باشد و در اکثر موارد آلبومین ۵ درصد نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد؛ زیرا این غلظت تقریباً مشابه میزان آلبومین در پلاسما می‌باشد و غلظت بالاتر آن (۲۰ درصد) در حالات خاصی مانند سیروزکبدی و سندرم نفروتیک و بیمارانی که به‌واسطه‌ی نارسایی قلبی نمی‌توانند افزایش بار عروق را تحمل کنند و نوزادان نارس و بیماران دیالیزی که باید آلبومین با میزان سدیم کم به‌کار برند، مصرف می‌گردد (۱۵). لذا در مواردی که آلبومین ۵ درصد می‌تواند مصرف شود بهتر است از آلبومین ۲۰ درصد استفاده نشود، در غیر این صورت باید آلبومین ۲۰ درصد تزریقی رقیق گردد. همچنین نشان داده شده است سطح پایین آلبومین در سرم می‌تواند خطر بیماری عروق کرونر را افزایش دهد (۱۶). روش‌های متعددی جهت خالص‌سازی آلبومین از پلاسمای انسانی پیشنهاد گردیده است که این روش‌ها مبتنی بر خواص فیزیکو شمیایی و بیولوژیکی آن می‌باشد (۱۷). از مهم‌ترین خواص آلبومین از نظر خالص سازی می‌توان بار منفی آن در pH فیزیولوژیکی و هیدروفیل بودن که حلالیت زیادی در آب به آن می‌بخشد یاد نمود. از جمله روش‌های پیشنهادی استفاده از ریوانول- آمونیوم سولفات جهت رسوب دادن آلبومین می‌باشد (۱۸). اساس روش مبتنی بر رسوب دادن به‌وسیله‌ی ریوانول و اضافه نمودن سدیم کلراید ۵ درصد و بازیابی ریوانول به‌وسیله‌ی ذغال فعال و مرحله‌ی بعدی خالص سازی آلبومین به‌وسیله‌ی رسوب دادن با محلول‌های آمونیم سولفات می‌باشد. روش دیگر استفاده از دی‌اتیل اتر به‌عنوان رسوب دهنده‌ی پروتیین می‌باشد که به‌علت شدیدا آتش‌گیر بودن این ترکیب از این روش زیاد استفاده نمی‌شود. از روش‌های دیگر می‌توان به استفاده از PEG (Polyethylene Glycol) اشاره نمود (۱۹)؛ اگر چه این روش بیشتر به همراه استفاده از اتانول سرد مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دیگری که اخیرا مورد استفاده قرار گرفته کروماتوگرافی تبادل یونی و رسوب دادن با PEG می‌باشد. در این روش از PEG 6000 و سفاروز استفاده می‌شود. همانگونه که اشاره شد روش‌های گوناگونی جهت تهیه‌ی آلبومین به‌کار گرفته می‌شود (۲۰)، ولیکن اتخاذ روشی که تولید انبوه را میسر سازد ارجح می‌باشد. روشی که در این مطالعه به‌کار رفت، بر اساس استفاده از اتانول سرد جهت جدا سازی آلبومین (۲۱) و استفاده از اولترافیلتر به‌منظور جداسازی الکل و تغلیظ آلبومین جهت فرمولاسیون می‌باشد.

روش بررسی

پلاسمای مورد استفاده، Fresh Frozen Plasma(FFP) بود. اتانول مصرفی از نوع تجاری با خلوص ۹۴ تا ۹۶ درصد، مواد شیمیایی مصرفی شامل سدیم استات، استیک اسید گلاسیال، سدیم کلراید، سدیم هیدروکساید و اکتانوییک اسید Analytical Grade و از کمپانی Merck بود. آب مصرفی در طول روند کار، آب مقطر دیونیزه بود و بافر استات طبق روش Cohn تهیه گردید (۲۱). سدیم دودسیل سولفات پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد صورت پذیرفت. اندازه‌گیری غلظت پروتئین با روش بیوره انجام شد. اندازه‌گیری pH تمامی محلول‌های پروتئینی با سه برابر رقت توسط سرم فیزیولوژی صورت گرفته است تا از تغییرات اندازه‌گیری pH

Archive of SID

www.SID.ir

اجتناب شود. اندازه‌گیری پلیمرها و اگرگیت‌ها با روش HPLC مدل KNAUER و ژل کروماتوگرافی با ستون TSK-GEL G300W و آزاد سازی پروتئین از ستون توسط بافر فسفات وسدیم سولفات انجام شد. آگارز ژل الکتروفورز جهت تعین میزان α_1، α_2، β و γ گلوبولین توسط دستگاه Corning 10 و اولترافیلتراسیون توسط دستگاه Filtron با سه سری پنج‌تایی فیلتر Nova Lok Cassette 559 FC و فیلتراسیون اولیه توسط فیلترپرس با فیلترهای Carlson, Seitz-EKS و Seitz-AKS-4 با اندازه ۲۰×۲۰ سانتی‌متر و استریل توسط فیلتر کارتریج میلی‌پور ۱/۲ و۰/۲۲ انجام گردید.

جداسازی آلبومین: پلاسمای نرمال انسانی (FFP) منجمد شده در تانک، خرد و ذوب و سانتریفوژ گردیده، خمیر حد واسط جهت فاکتورهای انعقادی جدا شد (۲۴-۲۲). رسوب حاصل شامل FVIII بود. بافر استات طبق روش Cohn تهیه شد و به مایع رویی جهت تنظیم pH حدود ۶/۹ اضافه گردید. همچنین جهت گرفتن FIX ژل سفادکس اضافه گردید. پس از سانتریفوژ pH محلول رویی به‌دست آمده توسط بافر استات تنظیم شد و میزان الکل محلول به ۸ درصد افزایش داده شد. باز عمل سانتریفوژ انجام گردید و فراکشن I شامل فیبرینوژن جدا گردید. میزان الکل سوپر I و pH محلول تنظیم شد و به‌مدت ده ساعت فراکشن و سوپر II+III حاصل گردید (فراکشن II+III جهت تهیه‌ی گاماگلوبولین‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد) (۲۵). سوپر III و II سانتریفوژشده و سوپر حاصله توسط فیلتر پرس کارلسون ۴۰×۴۰ سانتی‌متر فیلتر گردید و فراکشن VI شامل α و β گلوبولین، سرولوپلاسمین، هاپتوگلوبین و ترانسفرین و همچنین سوپر VI حاصل شد. پس‌از سانتریفوژ VI فراکشن V+ VI شامل آلبومین و سوپر دارای آب و الکل به‌دست آید که الکل سوپر مجددا بازیابی گردید. لذا خمیر V+ VI در ۶/۵ برابر وزنی آب مقطر حل و سانتریفوژ گردید و فراکشن VI جدا شد. سوپرحاصله سانتریفوژ شد و فراکشن V مورد نیاز فرمولاسیون آلبومین، به‌دست آید.

فرمولاسیون آلبومین

فیلتراسیون اولیه: فرآیند فرمولاسیون جهت اجتناب از آلودگی باکتریایی در pH اسیدی حدود ۴/۷ به‌جای ۶/۵ شروع گردید. ابتدا محلول توسط فیلتر پرس با فیلترهای ۲۰×۲۰ سانتی‌متر کارلسون و EKS توسط ۰/۸ بار فشار فیلتر شد و محلول پروتئینی با غلظت حدود ۱۰ درصد جهت اولتر افیلتر به‌دست آمد.

اولترافیلتراسیون: دمای محلول پروتئینی به‌دست آمده درتانک در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد توسط مدار متانول اتیلن گلیکول ثابت نگه داشته شد و با افزودن ۶ حجم آب مقطر اولترافیلتراستون در ۰/۵ بار فشار صورت گرفت. پس‌از جداسازی الکل و املاح عمل تغلیظ توسط اولترافیلتراسیون ادامه یافت.

پس از اتمام اولترافیلتراسیون دستگاه اولترافیلتر توسط محلول‌های سرم فیزیولوژی و سدیم هیدروکساید ۰/۵ نرمال و ۰/۲ نرمال شسته گردید و عمل Back Wash توسط آب مقطر تحت ۳ بار فشار صورت گرفت.

فرمولاسیون اولیه: پس ازاتمام اولترافیلتراسیون پایدار کننده لازم که سدیم کاپریلات بود از واکنش کاپریلیک اسید و سدیم هیدروکساید به‌دست آید و جهت آلبومین ۲۰ درصد غلظت ۰/۰۳ مولار و جهت آلبومین ۵ درصد غلظت ۱۵ میلی‌مولار به آن اضافه شد و pH محلول دراین مرحله توسط سدیم هیدروکساید به ۶/۹ افزایش داده شد.

فرمولاسیون نهایی: پس از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل و آلبومین و سدیم و پتاسیم توسط دستگاه های اسپکتروفتومتر و فلیم فتومتر، مقدار پروتئین و سدیم با افزودن آب مقطر و محلول سدیم کلراید تنظیم گردید. میزان سدیم در آلبومین ۵ درصد ماکزیمم ۱۴۵ میلی‌مول در لیتر و در آلبومین ۲۰ درصد ماکزیمم ۱۲۰ میلی‌مول در لیتر تنظیم می‌گردد.

Archive of SID

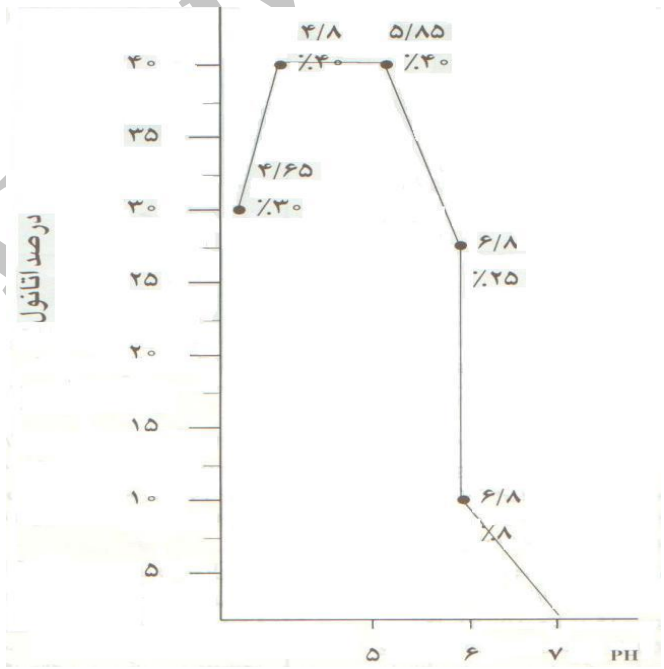
www.SID.ir

فیلتراسیون استریل: فیلتراسیون توسط فیلتر ذغالی AKS- 4 که دارای سطوح فعال بود (جهت جذب پروتئین‌های ناخواسته) و فیلتر EKS صورت می‌گیرد و سپس توسط فیلتر کارتریج میلی‌پور ۱/۲ و در نهایت توسط فیلتر استریل کارتریج میلی‌پور ۰/۲۲ تحت فشار ۰/۴ بار فیلتر گردید.

پاستوریزاسیون: فر آورده‌های دارویی بیولوژیک باید مورد غیرفعالسازی ویروسی قرار می‌گرفت (۲۹-۲۶). به این منظور پاستوریزاسیون آلبومین در بن‌ماری و یا کابینت هوای گرم که به‌خوبی هوا در آن در گردش می‌یابد، صورت پذیرفت. باید توجه داشت که پاستوریزاسیون باید در درجه‌ی حرارت دقیقا یکنواختی انجام گیرد. آلبومین تهیه شده در نهایت در۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ساعت پاستوریزه گردید و به مدت دو هفته در ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

یافته ها

مقدار ۳۱/۳ گرم پروتئین از هر لیتر پلاسما به‌دست آمد که راندمانی معادل ۷۱/۲ درصد را به‌دست می‌دهد و در مورد آلبومین ۲۰ درصد مقدار ۳۳/۲ گرم پروتئین از هر لیتر پلاسما با راندمانی معادل ۷۵/۵ درصد به‌دست آمد. از آنجا که آلبومین دارای بالاترین حلالیت و پایین‌ترین نقطه‌ی ایزوالکتریک در مقایسه با پروتئین‌های اصلی پلاسما می‌باشد (۳۰)، آخرین پروتئینی بود که با افزایش غلظت اتانول از صفر به ۴۰ درصد رسوب کرد و این افزایش غلظت همراه با کاهش pH بود که تقریباً pH از خنثی شروع گردید و به ۴/۶۵ ختم شد و همچنین درجه‌ی حرارت تا منهای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش یافت. پروتئین‌های دیگری مانند فیبرینوژن و ایمونوگلوبولین‌ها در مراحل زودتر به‌ترتیب فراکشن I و فراکشن II+III رسوب می‌کنند. این در حالی است که آلبومین در تمام مراحل در سوپر باقی ماند و در شرایط مختلف از خمیر جدا گردیدند. بسیاری از پروتئین‌های ناخواسته در فراکشن VI جدا می گردند. جدا کردن آلبومین در مرحله‌ی V توسط کاهش pH تا ۴/۶۵ که نزدیک pI می‌باشد، صورت پذیرفت. نمودار ۱ تنظیم pH و درصد غلظت الکل را در طول روند کار نشان می‌دهد.



نمودار ۱: نمایش گرافیکی تغییرات pH و غلظت الکل در طول روند جدا سازی آلبومین

Archive of SID

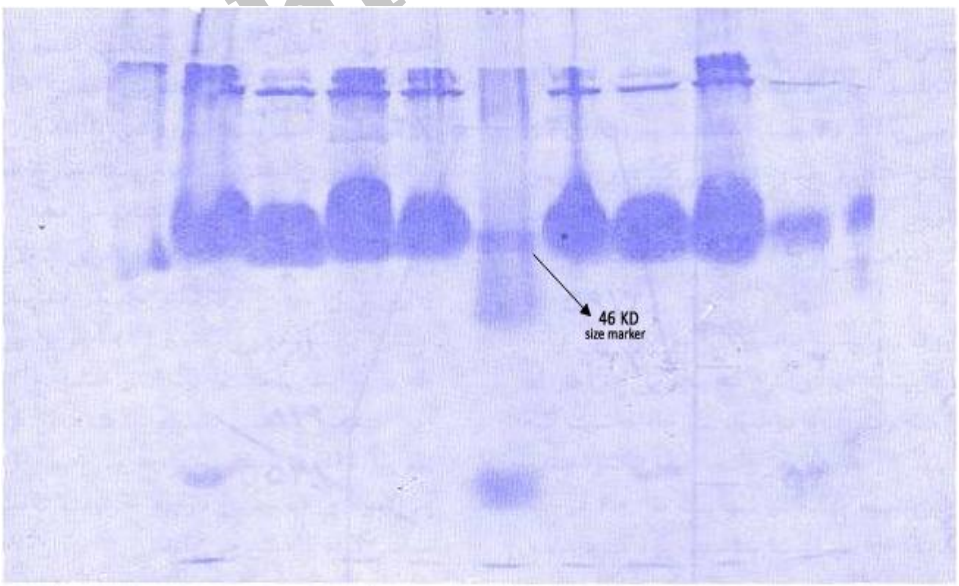
www.SID.ir

جهت جدا سازی آلبومین به روش اتانول سرد با تنظیم سه پارا متر غلظت اتانول، درجه‌ی حرارت و pH که بالطبع میزان قدرت یونی با تغییر آن تغییر می‌یابد، روند کار پیش می‌رود (۳۱). غلظت الکل می‌تواند از صفر تا ۴۰ درصد و pH از خنثی تا ۴/۶۵ تغییر یابد. همچنین درجه حرارت می‌تواند تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد کاهش یابد. در جدول ۱ تنظیم این ۳ پارامتر در مقایسه با روش کیستر و نیشتمان و کوهن (Kistler and Nistschmann, Cohn)(۳۲) آمده است.

جدول ۱: مقایسه‌ی تنظیم ۳ پارامتر درصد الکل، pH و درجه‌ی حرارت در مقایسه با روش‌های Kistler & Nitchmann , Cohn

پلاسما	مطالعه‌ی حاضر			Kistler & Nitschmann			Cohn		
	درجه‌ی حرارت	pH	اتانول	درجه حرارت	pH	اتانول	درجه‌ی حرارت	pH	اتانول
فراکشن I	-۱	۶/۸۰	۸ درصد	-۳	۷/۲۰	۸ درصد	-۳	۷/۲۰	۸ درصد
فراکشن II + III	-۵	۶/۸۰	۲۵ درصد	-۵	۵/۸۵	۱۹ درصد	-۵	۶/۹۰	۲۵ درصد
فراکشن VI	-۵	۵/۸۵	۴۰ درصد	-۸	۵/۸۵	۴۰ درصد	-۵	۵/۸۰	۴۰ درصد
فراکشن V + IV	-۸	۴/۸۰	۴۰ درصد	-۸	۴/۸۰	۴۰ درصد	-۵	۴/۸۰	۴۰ درصد
فراکشن V	-۱۰	۴/۶۵	۳۰ درصد	-۸	۵/۲۰	۴۰ درصد	-۵	۵/۲۰	۴۰ درصد

SDS-PAGE آلبومین روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد، حاکی از خلوص خیلی بالای آلبومین می‌باشد که در شکل ۱ میزان ناخالصی در مقایسه با آلبومین نمایش داده شده است.

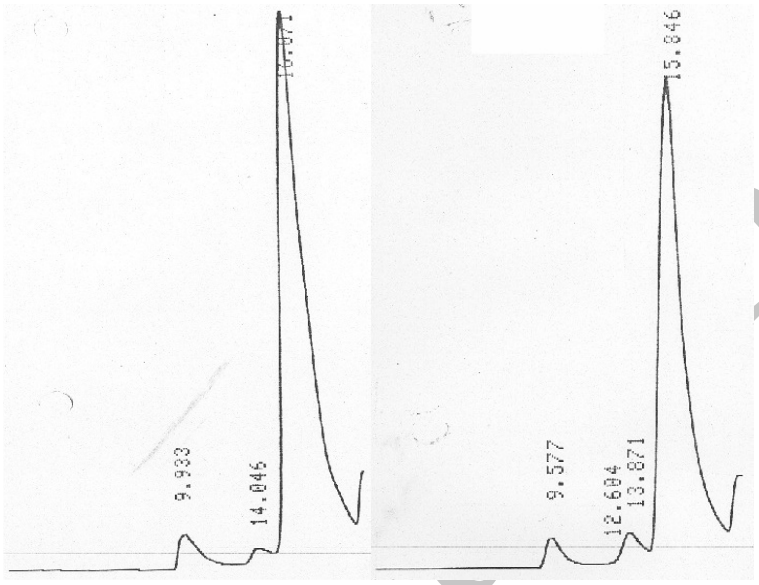


شکل ۱: SDS-PAGE الکتروفورز آلبومین روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

HPLC با ستون TSK-GEL G300SW و الوشن فسفات بافر و سدیم سولفات صورت گرفته است. در نمودار A۱–۲ منحنی HPLC مربوط به آلبومین ۵ درصد با میزان منومر ۹۶/۴ درصد و پلی‌مر اگرگیت ۳/۶ درصد و نمودار A۲–۲ مربوط به آلبومین ۲۰ درصد با میزان منومر ۹۶/۰ درصد و پلی‌مر اگرگیت ۴/۰ درصد را نمایش می‌دهد.



نمودار ۲: منحنی HPLC مربوط به آلبومین ۵ درصد (A1) و ۲۰ درصد (A2)

بحث

ازآنجا که آلبومین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های پلاسما می‌باشد در این روش سعی شده است که فرآورده دارای درجه‌ی خلوص قابل قبول از لحاظ کلینیکی باشد و بتوان آن‌را در حجم بالا تولید نمود. همچنین بتوان درطول روند تولید، پروتئین‌های دیگر مانند فاکتور VIII و فاکتور IX و IgG را نیز جدا نمود. چنانچه هدف جدا سازی پروتئین‌های دیگر پلاسما نباشد، امکان ارایه‌ی روشی که مستقیماً آلبومین را از دیگر پروتئین‌های پلاسما جدا نماید، وجود دارد. استفاده از اتانول جهت این جدا سازی دو ویژگی خاص دارد، اول اینکه با وجود الکل رشد باکتری بسیار کاهش پیدا می‌کند (۳۳) و دیگر اینکه به سهولت با تبخیر قابل جداسازی می‌باشد. معهذا به علت غلظت بالای آلبومین در پلاسما منطقی‌ترین راه جهت جدا سازی این پروتئین پیدا کردن بهترین شرایط از لحاظ pH و غلظت اتانول و قدرت یونی می‌باشد که منجر به اختلاف زیاد حلالیت آن با دیگر پروتئین های پلاسما می‌گردد و جداسازی آن را به کمک رسوب دادن ممکن می‌سازد. در فرمولاسیون آلبومین مشکل آلودگی باکتریایی مشاهده گردید که یکی از عوامل می‌توانست تنظیم pH اولیه در حد ۶/۵ باشد که این عمل می‌توانست با توجه به طولانی بودن روند کار، شرایط رشد باکتری را فراهم سازد. با تغییر این pH در حدود ۴/۷ در شروع فرمولاسیون و تنظیم pH نهایی در حد ۶/۹ (بلافاصله قبل از فیلتراستریل)، با توجه به اسیدی بودن pH محیط در طول روند کار فرمولاسیون امکان آلودگی باکتریایی از بین رفت. افزودن فیلتر اولیه SEITZ- AKS- 4 به سیستم فیلتراسیون باعث افزایش راندمان فیلتراسیون تا ۱۰ برابر گردید؛ زیرا بدون استفاده از این فیلتر فقط قادر به فیلتر نمودن ۱۰ لیتر محلول پروتئین

Archive of SID
www.SID.ir

توسط فیلتر کارتریج استریل بودیم، که با استفاده از این فیلترهای ذغالی AKS که دارای سطوح فعال بوده، جذب فعال انجام می‌دهد و پروتئین‌های ناخواسته را به خود جذب می‌نماید امکان فیلترلسیون محلول ۵ درصد و ۲۰ درصد آلبومین تا ۱۰۰ لیتر فراهم گردید. در فرمولاسیون آلبومین، جهت جداسازی حلال و به غلظت رساندن محلول روش‌های لیوفیلیزاسیون، خشک کردن با استون، تبخیر لایه‌ی نازک (Thin Layer Distillation) و یا اولترافیلتراسیون می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در گذشته جهت جدا سازی اتانول و آب از محلول پروتئینی از دستگاه سنتری ترم استفاده می‌گردید که این دستگاه امکان تبخیر اتانول را در درجه‌ی حرارت حدود ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار منفی ممکن می‌ساخت. ولی یکی از بهترین روش‌هایی که امکان جداسازی را برای حجم‌های زیاد ممکن می‌سازد استفاده از اولترافیلتر می‌باشد که روشی است که قادر به جداسازی حلال و نمک‌ها می‌باشد. این روش مواد محلول و معلق را بر اساس عبور از فیلترهای بسیار ریز جدا می‌سازد که می‌توان از آن به عنوان الک مولکولی نیز یاد نمود که مولکول‌های بزرگتر از اندازه‌ی سوراخ‌های فیلتر قادر به عبور نمی‌باشند. جهت اولترافیلتراسیون آلبومین غشاهایی با محدودیت جهت مولکول‌های با وزن مولکولی ۵۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ مناسب می‌باشد. اولترافیلتراسیون توسط کاست ممبران‌های تخت انجام گردید. این نوع فیلترها امکان انجام اولترافیلتراسیون را با غلظت بالا و با سرعت جریان بالا فراهم می‌سازد. فقط اشکال این نوع فیلتر ها قیمت بالای آن می‌باشد و پس از مدتی باید تعویض گردد. با ایجاد سیستم Back Wash روی دستگاه امکان استفاده مجدد از این فیلترها فراهم آمد و Back Wash فیلتر ها با آب مقطر تحت ۳ بار فشار کاملاً باعث احیای فیلترها گردید و فشار دستگاه اولترافیلتر که تا قبل از انجام Back Wash به ۵/۵ بار می‌رسید پس از عمل Back Wash به کمتر از ۳ بار کاهش یافت و امکان استفاده مجدد از دستگاه را با حداقل هزینه فراهم نمود. در فرمولاسیون آلبومین از پایدار کننده استفاده می‌گردد. استفاده از پایدار کننده به‌منظور جلوگیری از دناتوره شدن حرارتی آلبومین می‌باشد که این عمل می‌تواند در حین پاستوریزاسیون (که به منظور غیر فعال نمودن ویروسهایی مانند هپاتیت B، هپاتیت C و HIV صورت می‌گیرد) رخ می‌دهد. معمولاً از سدیم اکتانوئیک اسید و سدیم ان استیل تریپتوفانیت با غلظت مساوی استفاده می‌نمایند (۳۴). در فرمولاسیون به‌کار رفته غلظت ۰/۳۰ مولار سدیم کاپریلیت برای آلبومین ۵ درصد و ۲۰ درصد به‌عنوان استابیلایزر بکار رفته که مقدار استابیلایزر برای آلبومین ۵ درصد به نصف یعنی ۱۵ میلی مولار کاهش داده شد و مشاهده گردید این مقدار بخوبی مقاومت حرارتی لازم را در طول دوره‌ی پاستوریزاسیون به محلول آلبومین می‌دهد. از لحاظ کنترل هر چه بهتر روند تولید باید در نظر داشت که حلالیت پروتئین‌ها به‌وسیله‌ی افزایش الکل یا استون یا دیگر حلال‌های آلی محلول در آب کاهش می‌یابد. این افزایش حلالیت در حرارت معمول باعث دناتوره شدن پروتئین می گردد لذا با کاهش درجه‌ی حرارت می‌توان از این دناتوره شدن پروتئین جلوگیری نمود. به این منظور درطول روند تولید درجه حرارت تا منهای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش داده می‌شود. عوامل بسیار دیگری می‌تواند در دناتوره شدن پروتئین نقش داشته باشد، از جمله اضافه کردن محلول‌ها درحین فرمولاسیون (۳۵) از قبیل محلول سدیم هیدروکساید، سدیم کراید و سدیم کاپریلیت. اگر این محلول‌ها روی سطح محلول آلبومین اضافه گردد چون دریک نقطه باعث تغییرات شدید شرایط شیمیایی می‌گردد، باعث دناتوره شدن پروتئین می‌گردد (۳۶) و این مشکل از طریق اضافه کردن محلول‌ها در زیر محلول آلبومین در عمق تانک بر طرف گردید و تقریباً میزان پروتئین دناتوره شده در انتهای روند تولید صفر گردید. دیگر عواملی که می‌توانند در دناتوره شدن پروتئین تاثیر داشته باشند، مخلوط نمودن یکنواخت و

Archive of SID

www.SID.ir

سرعت افزایش محلول‌ها و شکل ظرف و همزن و همچنین ارتعاشات می‌باشد که می‌تواند در تشکیل پلی‌مر اگرگیت‌ها تاثیر داشته باشند.

نتیجه گیری

مشخص گردید با استفاده از اتانول و سرما آلبومین تهیه شده دارای خلوص بیش از ۹۵ درصد می‌باشد و میزان پلیمر آن کمتر از ۵ درصد می‌باشد. در تهیه‌ی آلبومین ۵ درصد می‌توان از غلظت پایین‌تر پایدار کننده‌ی سدیم کاپریلات استفاده نمود و همچنین در فرمولاسیون نشان داده شده که فرآیند تهیه را می‌توان با pH حدود ۴/۷ بجای ۶/۵ شروع نمود، زیرا امکان آلودگی کاهش می یابد. همچنین به منظور اجتناب از دناتوره شدن پروتئین نشان داده شد که سرعت افزودن و مخلوط نمودن بافرها هنگام فرمولاسیون حایز اهمیت می‌باشد، زیرا غلظت بالای این مواد در یک نقطه باعث دناتوره شدن پروتئین می‌گردد.

References

1- Farrugia A, Robert P. Plasma protein therapies: current and future perspectives. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006; 19: 243-58.

2- Mousavi Hosseini K, Pourmokhtar M, Dinarvand R, Rezvan H, Jalili MA. Preparation of enriched immunoglobulin M and immunoglobulin A from human plasma. *Med J I.R Iran*. 2004; 17: 315-18.

3- Sahebghadam Lotfi A, Adibi Motlagh B, Mousavi Hosseini K, Mahmoodi M. Purification and isolation of alpha-1-proteinase inhibitor and determination of some of its' physicochemical properties. *Modares J Med* Sci. 2004; 7: 71-80.

4- Halabian R, Shagerdi Esmaili N, Oodi A, Masroori N, Amirizadeh N, Mousavi Hosseini K, et al. Isolation cloning and expression of recombinant human factor VII in CHO cell line. *Sci J Blood Transfus Organ.* 2009; 6: 1-11.

5- Sahebghadam Lotfi A, Motahari M, Shakibi MR, Mousavi Hosseini K, Adibi Motlagh B, Mahmoodi M. Measurements of serum level of IgA-α_1-AT complex in patients with rheumatoid arthritis. *Sci Blood Transfus Organ*. 2005; 2: 65-71.

6- Farrugia A, Evers T, Falcou PF, Burnouf T, Amorim L, Thomas S. Plasma fractionation issues. *Biologicals*. 2009; 37: 88-93.

7- Lihme A, Hansen MB, Anderson IV, Burnouf T. A novel core fractionation process of human plasma by expanded bed absorption chromatography. *Anal Biochem*. 2010; 399: 102-9.

8- Bunouf T. Modern plasma fractionation. *Transfus Med Rev*. 2007; 21: 101-17.

9- Parkkinen J, Rahola A, von Bonsdorff L, Tolo H, Torma E. A modified caprylic acid method for manufacturing immunoglobulin G from human plasma with high yield and efficient virus clearance. *Vox Sang*. 2006; 90: 97-104.

10- Farrugia A. Albumin usage in clinical medicine. *Transfus Med Rev*. 2010; 24: 53-63.

11- Yoshida H, Uchida K, Murata O, Kamiya A. Current non-surgical usage of albumin preparation

Archive of SID

www.SID.ir

in clinic divisions. *Yakugaku Zasshi*. 2000; 120: 1227-31.

12- Peters T. Serum albumin. Recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin Chem*. 1997; 23: 5-12.

13- Montgomery R. Biochemistry. St. Louis: Mosby; 1990.

14- Alves de Mattos A. Current indications for the use of albumin in the treatment of cirrhosis. *Ann Hepatol*. 2011; 10 Suppl 1: S15-20.

15- Tullis JL. Albumin: Background and use. *J Am Med Assoc*. 1977; 237: 335-60.

16- Sokhanvar S, Valaei N, Jahromi Shirazi J, Safavizadeh L. The relationship between serum albumin- protein levels and myocardial infarction. *J Zanjan Uni Med Sci*. 2005; 13: 17-22.

17- Mousavi Hosseini K, Heidari M, Yari F. The preparation of albumin as a biological drug from human plasma by fiber filtration. *Tehran Uni Med J*. 2011; 69: 283-88.

18- Rothestein F. Current concept concerning albumin purification. In Rosenoer VM(ed): Albumin structure, function and uses. Oxford: Pergamon press; 1977; P. 7-25.

19- Gambal D. Simple rapid procedure for isolating serum albumin. *Biochem Biophys Acta*. 1971; 251: 54.

20- Wickerchauser M, Hao YL. Large scale preparation of macroglobulins. *Vox Sang*. 1972; 23: 119-25.

21- Cohn EJ. Preparation and properties of serum and plasma proteins. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein compounds of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc*. 1964; 68: 459-78.

22- Nasiri S, Rezvan H, Mousavi Hosseini K, Roostaei MH. Preparation of highly purified solvent/detergent coagulation factor VII and factor IX concentrates from prothrombin complex. *Med J I.R. Iran*. 2001; 15: 103-108.

23- Musavi Mutlagh S, Rezvan H, Pourfathollah A, Mousavi Hosseini K. *Sci Blood Transfus Organ*. 2005; 2: 91-98.

24- Rezvan H, Nasiri S, Mousavi Hosseini K, Golabi M. A study on the application and efficacy of solvent/detergent treatment in the process of purifying factor VII from prothrombin complex. *Med J I.R.Iran*. 2002; 16: 179-82.

25- Aghaie A, Pourfathollah A, Bathaie S, et al. Preparation of an intermediate product suitable for production of IVIg. *Sci J Blood Transfus Organ*. 2006; 3: 101-110.

26- Mousavi Hosseini K, Dinarvand R, Pourmokhtar M, Rezvan H, Jalili MA. Pasteurization of IgM-enriched immunoglobulin. *Daru*. 2004; 12: 40-43.

27- Rezvan H, Motallebi M, Jalili MA, Mousavi Hosseini K, Pourfathollah A. Safety of blood and plasma derivatives: pathogens reducing technologies. *Med J I.R. Iran* .2006; 20: 86-92.

28- Pourmokhtar M, Dinarvand R, Mousavi Hosseini K, Rezvan H, Jalili MA. Solvent/detergent treatment of IgM-enriched immunoglobulin. *Daru*. 2003; 11: 47-51.

29- Rezvan H, Nasiri S, Mousavi Hosseini K. Inactivation of poliovirus type-1 and HSV-1 in

Archive of SID

www.SID.ir

human coagulation factor VII concentrate by pasteurization. *Arch Iran Med*. 2001; 4: 10-13.

30- Harris JR. Blood separation and plasma fractionation. New York: Jon Wiley Sons. 1991; p. 264-68.

31- Kistler P, Freidli H. Ethanol precipitation, in Curling JM. Methods of plasma protein fractionation. London: Academic Press. 1980; p. 3-15.

32- Kistler P, Nitschmann HS. Large scale production of human plasma fractions. *Vox Sang*. 1962; 7: 414-24.

33- Henin Y. Inactivation and partition of human immunodeficiency virus during Kistler and Nitschmann fractionation of human blood plasma. *Vox Sang*. 1988; 54: 78-83.

34- Mousavi Hosseini K, Rezvan H, Motallebi Z, Chabokpey S, Mirbod V. Study of the heat-treated human albumin stabilization by caprylate and acetyltryptophanate. *Iran Biomed J*. 2002; 6: 135-40.

35- Foster PR, Wall JG. The CSVM fractionation process, in Curling JM (ed). Methods of plasma fractionation. London: Academic press. 1980; p. 17-31.

36- Yari F, Mousavi Hosseini K.Simultaneous purification and polymerization method for bovine serum albumin preparation. *Ital J Biochem*. 2007; 56: 163-65.

Archive of SID

www.SID.ir

Separation of Albumin from the Human Plasma by Ethanol and Low Temperature

Mousavi Hosseini K[1], Nasiri S[1], Heidari M[1]

[1]Biotechnology Dept, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Heidari M, Dept. of Biochemistry, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.

E-mail: aramhaydari@yahoo.com

Received: 4 Oct 2012 **Accepted:** 3 Feb 2013

Background and Objective: Human plasma is a suitable source for different proteins and enzymes with a variety of therapeutic effects. Examples include coagulation factors VIII and IX, immunoglobulin, and albumin, which consists of a 585 amino-acid chain, weighing 66.5 kD. Albumin molecule also has 17 di-sulfide bridges which form a stable spherical protein structure, which it cause of 80% of oncotic blood pressure. The aim of this study was to separate albumin from the human plasma by using ethanol at low temperature.

Materials and Methods: Fresh frozen plasma was used as the starting material. In this study, albumin was separated from human plasma by using ethanol (commercial grade with 94-96% purity) in low temperature. By adjustment of different parameters such as pH, temperature, and concentration of alcohol, different factions of plasma can be separated which are from fraction I to fraction V. Fraction I is a good source for fibrinogen and coagulation factor VIII preparation, fraction II is suitable for preparation of immunoglobulin, and fraction V is a good source for albumin preparation.

Results: Albumin was prepared with 5 and 20 percent concentrations. Quality comparison of the two concentrations showed a purity of more than 95%. The average yields of the 5 % and 20 % albumin preparations were 71% and 75.5%, respectively.

Conclusion: Our data show that the produced albumin has a purity of higher than 95% and contains less than 5% polymer. In preparation of 5 % albumin, it is possible to use lower concentrations of sodium caprylate as stabilizer. It has also been shown in the formulation that the preparation process can be started at the acidic pH of 4.7, instead of 6.5, in order to avoid bacterial contamination.

Keywords: Purification, Human plasma, Protein, Albumin

Archive of SID

www.SID.ir