

一种提取血红素的新方法研究

张炜煜 周淡宜 钱亚玲 胡 欣(杭州 310013 浙江省医学科学院)

摘要 目的:探讨血红素制备新工艺。方法:采用氯仿为溶剂,猪血粉与乙醇进行酯化反应,得血红素二乙酯,然后用氢氧化钠溶液进行水解,再用盐酸溶液酸化,将析出的晶体用水洗至中性。结果:用此法生产的血红素其纯度可达 80 %以上。结论:用此法生产血红素切实可行,且未见报导。

关键词 血红素;制备工艺;酯化;水解

Zhang Weiyu(Zhang WY) ,Zhou Danyi(Zhou DY) ,Qian Yaling(Qian YL) ,*et al*(*Zhejiang Academy of Medical Sciences , Hangzhou 310013*)

ABSTRACT OBJECTIVE:To develop a new technique of heme preparation .**METHOD:**Chloroform .Pig blood powder was estified with ethanol in chloroform forming a product named protoporphyrin diethyl ester. Hydrolyzed the product NaOH ,acidify the solution with HCl ,and then wash the crystal formed with water until it reached neutral .**RESULTS:**The purity of heme could be more than 80 % by this method .**CONCLUSION:**The method used to produce heme is practical . No paper about this procedure published .

KEY WORDS heme ,preparation procedure ,esterification ,hydrolysis

1 材料与仪器

1.1 材料

猪血粉(安徽东方肉类有限公司) ;无水乙醇、氯仿、丙酮等试剂均采用分析纯;饱和氯化氢气体由本实验室发生;血红素标准品(美国 Sigma 公司) ;血红素二乙酯标准品(美国 Prophyrin 公司) 。

1.2 仪器

岛津 UV-2100 紫外可见分光光度计,岛津 LC-6A 高效液相色谱仪。

2 方法

2.1 酯化

取猪血粉 100g,加无水乙醇 200 ml,氯仿 1000 ml, 85℃回流 30 min,与此同时,通饱和氯化氢气体 10 ml,过滤,滤液用 500 ml 水洗后,分取氯仿层浓缩,回收氯仿,得血红素二乙酯。

2.2 水解

取上述回收氯仿后的残留物,加 2 %氢氧化钠溶液 1000 ml,60℃水浴中不断搅拌 4h,得黑绿色血红素钠盐溶液,加 18 %盐酸溶液酸化,将析出的晶体滤出,水洗 3 次至中性,得血红素产品。

2.3 正交试验设计

2.3.1 水解反应正交试验 为了探讨血红素二乙酯的最佳水解条件,我们以 10g 血红素二乙酯为底物,以得率为指标,进行了 $L_9(3^4)$ 正交试验,观察氢氧化钠溶液的浓度、用量及反应温度之间的关系及对得率的影响,设计因素水平见表 1。

2.3.2 酯化反应正交试验 为了探讨血红素的最佳酯化条件,我们以 100g 血粉为底物,以最终得率为指标,进行了 $L_9(3^4)$ 正交试验,观察反应过程中血粉、乙醇、氯化氢气体、反应时间及氯仿用量间比例对得率的影响,设计因素水平见表 2。

3 结果

表 1 水解反应正交试验因素水平表

水平	A NaOH 浓度/ %	B NaOH 用量/ ml	C 反应温度/℃	D 反应时间/ min
1	1	100	20	60
2	2	500	60	120
3	3	1000	80	240

表 2 酯化反应正交试验因素水平表

水平	A 乙醇/ ml	B 氯化氢气体/ ml	C 回流时间/ min	D 氯仿/ ml
1	100	10	30	200
2	200	20	60	500
3	300	30	120	1000

3.1 正交试验结果

3.1.1 水解反应正交试验结果 见表 3。

表 3 水解反应结果

编号	A	B	C	D	血红素得率/ g/10g
1	1	1	3	2	0.6
2	1	2	1	1	0.726
3	1	3	2	3	2.142
4	2	1	2	1	0.828
5	2	2	3	3	2.548
6	2	3	1	2	0.720
7	3	1	1	3	0.555
8	3	2	2	2	1.678
9	3	3	3	1	1.375
k ₁	3.468	1.983	2.001	2.929	
k ₂	4.096	4.952	4.648	2.998	
k ₃	3.608	4.237	4.523	5.245	
R	0.628	2.969	2.647	2.316	

上述实验结果表明,以 10g 血红素二乙酯为底物,其最佳水解条件为氢氧化钠浓度为 2 %,用量为 500 ml,

水解温度 60℃,水解时间 4h。

3.1.2 酯化反应正交试验结果 见表 4。

表 4 酯化反应结果

编号	A	B	C	D	血红素得率/ g/10g
1	1	1	3	2	1.08
2	1	2	1	1	0.975
3	1	3	2	3	0.450
4	2	1	2	1	1.3
5	2	2	3	3	1.5
6	2	3	1	2	0.96
7	3	1	1	3	1.4
8	3	2	2	2	1.222
9	3	3	3	1	0.665
k ₁	2.505	3.780	3.335	2.940	
k ₂	3.760	3.697	2.972	3.262	
k ₃	3.287	2.075	3.245	3.350	
全距 R	1.155	1.705	0.563	0.410	

上述试验结果表明,血红素的最佳酯化条件为 100g 血粉,200 ml 乙醇,10 ml 氯化氢,1000 ml 氯仿,回流 30 min。

上述二项试验的结果,其血红素得率(g/10g) = 提取品重量 × 百分标示量(%) ÷ 10。

3.2 纯度鉴别

取样品少许,用 0.1 M KOH 甲醇溶液溶解,同时用标准品血红素二乙酯与血红素作对照,酸性丙酮溶液展开,可见样品在与血红素标准样的相同位置上出现清晰的棕褐色斑点,其 R_f 值为 0.7,而在血红素二乙酯标样的位置上($R_f = 0.9$)样品未见有斑点出现。经定量分析表明,用该法制备的血红素纯度均在 80% 以上。

3.3 含量测定

3.3.1 高效液相色谱条件 仪器:岛津 LC-6A HPLC;固定相:硅胶 G 柱;流动相:乙腈-甲醇-醋酸-吡啶(240:240:1:40);流速:1 ml/min。

3.3.2 含量测定结果 采用峰面积之比,求得血红素样品的百分含量为 93%,见图 1。

4 讨论

4.1 血红素是一种优良的抗贫血药,它可被直接吸收进入肠粘膜细胞,在肠粘膜细胞内卟啉环与铁离子分开,铁离子直接吸收入体内,其副作用小。国内外已有大量的提取工艺与药理资料的报导^[1-3],本文是实验过程中发现的一种全新的提取方法。

血红素其结构为 1,3,5,8-四甲基-2,4-二乙基卟吩-6,7-二丙酸亚铁盐,我们则利用侧链上的两个丙酸基

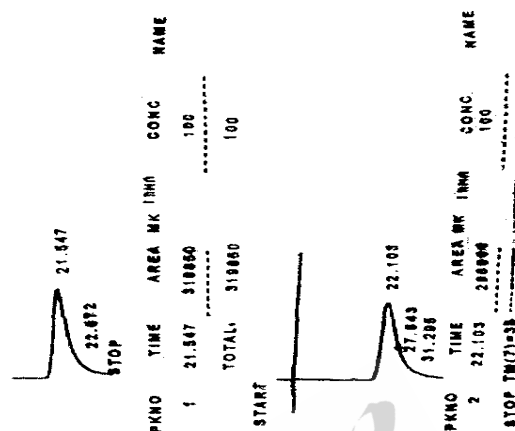


图 1 血红素含量分析 HPLC 图谱

峰 I - 血红素标样 2μg;峰 II - 血红素样品 2μg

与乙醇进行酯化反应,生成血红素二乙酯,并用薄层法鉴别反应是否完全,然后将酯化物在碱性溶液中水解后,再用盐酸还原成血红素,以此来提高反应物的纯度。为了寻求最佳反应条件,本课题对酯化与水解条件进行了正交试验。

4.2 从正交试验结果看,影响水解反应的顺序分别为 B > C > D > A,影响酯化反应的条件顺序分别为 B > A > C > D。从实验中我们发现在水解反应时,其氢氧化钠用量与水解温度、水解时间都是决定水解是否完全的因素,而在酯化反应中醇与酸的用量又必须控制得比较好。

4.3 TLC 方法国内外均未见报导。我们根据血红素与酸性丙酮极性相似的原理,通过试验、摸索,认为以酸性丙酮为展开剂,硅胶 G 板为固定相,血红素二乙酯与血红素的分离效果为好。

4.4 血红素的定量分析其传统方法为比色法,简便快速,但由于该方法分辨率差,而无法运用于现代药物分析。我们根据国外文献报导,尝试了用高效液相色谱法来检测反应产物的含量,取得了一定的结果,从图谱可见采用上述方法其分离效果好且无干扰。但由于高效液相色谱法刚开始,其精密性、重现性、回收率等试验仍待进一步考核。

参考文献

- 1 罗先隽. 血红素制备方法及应用. 生化药物杂志, 1990, (1): 12.
- 2 朱钧, 等. 血红素的提取及补血食品的研制. 营养学报, 1993, 5(1): .
- 3 张爱华. 血红素的应用研究及生化机理探讨. 药学进展, 1992, 16(1): 44.

收稿日期: 1999 - 03 - 18