

血红素纯化技术研究及质量检测

周淡宜,徐水祥(浙江省医学科学院,浙江 杭州 310013)

摘要:目的 研究血红素的纯化方法,并对纯化后的产品进行质量检测。方法 采用正交试验法,以溶剂氨溶液浓度、提取时间和固液比 3 个因素,每个因素选取 3 个水平进行正交试验,并采用 HPLC 对纯化试验所得血红素纯品的含量进行分析。最终采用常规测定 Fe 含量法对放大试验所得纯品进行含量确认。结果 因素 B(提取时间)和因素 C(固液比)对血红素含量有一定影响。结论 最佳工艺 A₃B₂C₃,即用固液比为 1:35 的 1.5% 氨溶液提取 10 min,血红素纯度大于 96%。

关键词:血红素;纯化;正交试验

中图分类号: TQ463.53; R973.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)02-0129-03

The study on heme purification technique and its quality analysis

ZHOU Dan-yi, XU Shu-xiang (*Zhejiang Academy of Medical Science, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the method of heme purification and to detect product quality. **METHOD** The solvent concentration, extracting time and ratio of solid to liquid were the three factors in the experiment, and we choose three levels for each factor to do the experiment by orthogonal test. The content of heme was determined by HPLC. Finally we determined the content of heme by analysis the content of the iron. **RESULTS** The factor B and C had some effect on the content of heme. **CONCLUSION** The optimum technological conditions have been attained by orthogonal experiment as follows: solvent concentration is 1.5% NH₃H₂O, ratio of solid to liquid is 1:35 and extracting time is 10 min. The heme purity is more than 96%.

KEY WORDS: heme; purification; orthogonal test

血红素是一种含铁的化合物。由四个吡咯环通过四甲叉桥构成的多杂环化合物称为卟吩,卟吩的衍生物称为卟啉,所以血红素又称为原卟啉铁(Ferric protoporphyrin)。化学名:1,3,5,8-四甲基-2,4-二乙烯基卟吩-6,7-二丙酸氯化铁,分子式:C₃₄H₃₂FeCLN₄O₄,相对分子质量:651.96。

血红素除了作为生物铁治疗缺铁性贫血外,还是治疗恶性肿瘤的卟啉类药物和治疗急性、慢性迁延性、慢性活动性肝炎的原卟啉二钠盐的前体,因而研究制备高纯度血红素就显得十分重要。传统纯化工艺都离不开有机溶剂,成本高,环境污染严重。本实验采用正交试验法,稀碱、稀酸处理,优选获得了最佳工艺,并采用 HPLC 对正交试验结果进行质量

检测,最后对扩大试验的产品再经原子吸收光谱对其铁含量进行常规分析,进一步确证试验结果。

1 材料与仪器

血红素粗品(80%含量),由本实验室制备;血红素标准品(Sigma公司);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

LC-9A 高效液相色谱仪(岛津公司)。

2 方法与结果

血红素粗品的制备技术已经比较普遍,但纯化技术一直较难解决,血红素纯化一般采用有机溶剂重复提取或用硅胶柱纯化^[1-11],这样导致生产成本高,环境污染严重。利用血红素粗品的主要成分为血红素和珠蛋白,血红素易溶于弱碱

基金项目:本项目为浙江省卫生厅课题,编号为 98A062

性溶液,珠蛋白则不溶于其中的特点,将血红素与珠蛋白分开。利用血红素不溶于水和醋酸的特性,将碱性溶液酸化,血红素重新析出,再将析出的血红素过滤、干燥,获得纯品。预试验已经基本清楚纯化血红素的主要影响因素是三个,即氨浓度、提取时间及固液比。我们采用正交表,即三因素三水平共试验九次来选择最佳纯化条件。

2.1 正交试验条件设计

选用 $L_9(3^4)$ 正交方案,以血红素含量为指标系统考察了氨浓度、提取时间和固液比 3 个因素,每个因素 3 个水平设计试验方案,见表 1。正交试验结果见表 2。

表 1 因素水平表

Tab 1 The factors and levels of orthogonal design

因素水平	A	B	C
	氨浓度 (%)	提取时间 (min)	固液比
1	0.5	5	1: 15
2	1.0	10	1: 25
3	1.5	15	1: 35

表 2 正交试验结果

Tab 2 The results of orthogonal test

试验号	1	2	3	4	血红素含量 /%
	A	B	C	空	
1	1	1	1	1	89
2	1	2	2	2	95
3	1	3	3	3	96
4	2	1	2	3	91
5	2	2	3	1	99
6	2	3	1	2	90
7	3	1	3	2	96
8	3	2	1	3	96
9	3	3	2	1	91
M_1	280	276	275	279	$T = \sum_{i=1}^9 y_i = 843$
M_2	280	290	277	281	
M_3	283	277	291	283	
m_1	93.3	92.0	91.7	93.0	
m_2	93.3	96.7	92.3	93.7	$\bar{y} = T/9 = 93.7$
m_3	94.3	92.3	97.0	94.3	
M极差	3	14	16	4	
Si	2.000	40.667	50.667	2.667	$S_{总} = 96.001$

正交试验的极差分析显示,影响血红素含量的诸多因素的主次关系依次为固液比 (C)、提取时间 (B) 和氨浓度 (A)。

2.2 正交试验的方差分析

为进一步判断上述 3 类受控制的因素对试验结果的影响,将正交试验数据进行方差分析,结果见表 3。

表 3 方差分析表

Tab 3 The variance analysis of orthogonal test

方差来源	变动平方和	自由度	平均变动	F值	显著性
A氨浓度 (%)	2.000	2	1.000		
B提取时间 (min)	40.667	2	20.334	17.43	*
C固液比	50.667	2	25.334	21.71	**
误差	4.667	4	2.333		

正交试验的方差分析结果表明:固液比的差异高度显著 ($F_C > F(2, 4; 0.01)$), 提取时间也呈显著水平 ($F_B > F(2, 4; 0.05)$), 说明固液比和提取时间对纯化产品中血红素含量起主要作用。氨浓度则没有显著性差异,即氨浓度因素对最后

结果的影响最小。最终得到血红素纯化的最佳纯化条件是 $A_3 B_2 C_3$, 即 1.5% 氨溶液, 10 min 的提取时间和固液比为 1: 35。

2.4 纯品血红素含量分析

2.4.1 色谱分离条件 检测波长: 405 nm; 色谱柱: C_8 -5 μ m 柱 (150 nm \times 4.4 mm I.D.); 流动相: 乙腈-甲醇-醋酸吡啶 (240: 240: 1: 40); 流速: 1 mL/min。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取血红素对照品 25 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加 0.1 mol KOH 甲醇溶液超声溶解并稀释至刻度, 作为对照品溶液。

2.4.3 样品溶液的制备 同对照品溶液制备方法。

2.4.4 样品测定 准确吸取样品溶液和对照品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱进行分离, 以其标准溶液峰的保留时间进行定性, 利用峰面积求出样液中待测物质的含量。

2.4.5 计算

$$X = \frac{S_1 \times C \times V}{S_2 \times m \times 1000} \times 100$$

式中: X 为样品中血红素的含量 (%); S_1 为样品峰面积; C 为标准溶液浓度 (mg/mL); S_2 为标准溶液峰面积; V 为样品定容体积 (mL); m 为称取固体样品的质量 (g)。

3 放大试验

以 100 g 粗品血红素为原料用上述确定的纯化条件即 1: 35 的固液比、1.5% 的氨溶液、提取 10 min 进行了三批样品的试验。经浙江省方圆检测股份有限公司 (原浙江省标准计量局) 测试表明含铁量分别为 8.5%、8.49%、8.49%, (血红素理论含铁量为 8.6%), 折合血红素实际含量为大于 98%, 完全符合本技术要求。

4 讨论

4.1 该纯化方法采用稀碱、酸处理, 具有流程简单、生产周期短、成本低、无污染等优点, 为血红素纯化提供了一条新的工艺思路。

4.2 本工艺已从 10 g 血红素为底物的实验室小试扩大到了 100 g 血红素为底物的中试, 因此可进一步扩试, 为工业化生产所用。

参考文献

- [1] 王厚艺. 从猪血中提取血红素技术 [J]. 技术开发与引进, 1989, 1: 19.
- [2] 赵绪妙. 从猪血中提取血红素 [J]. 广州化工, 1994, 22(4): 33.
- [3] 赵杰, 许心瑜. 氯化血红素的盐酸丙酮法提取工艺及含量测定的方法 [J]. 生化药物杂志, 1990, 2: 53.
- [4] 余雪梅. 血红素快速提取法 [J]. 中国牦牛, 1991, 1: 54.
- [5] 陆导仁, 杨文清, 曹立环, 等. 血红素及原卟啉 IX 的制备 [J]. 浙江医科大学学报, 1992, 21(3): 114.
- [6] 张爱华. 高纯度血红素的制备 [J]. 中国医药工业杂志, 1993, 24(1): 4.
- [7] 丁建平, 蒋长苗. 猪血红细胞中超氧化物歧化酶和血红素同步提取纯化的研究 [J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18(2): 65.

- [8] 王君,陈红亮,张向东,等.氯化血红素提取新工艺的研究 [J].当代化工,2001,30(3):125.
- [9] 刘亚丽,郭莉莉,罗贵民,等.亚血红素的合成和纯化方法的改进 [J].吉林大学自然科学学报,2001,26(1):91.
- [10] 宋后昆.从猪血中提取血红素新法 [J].中小企业科技,2003,

1:25.

- [11] Wolf HU, Link H, Lang W, *et al*. Preparation, purification and characterization of chlorohaem in [J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1992, 373(6):305.

收稿日期:2003-11-20