

超声波酸性丙酮法制备氯化血红素

汪长国^{1,2}, 戴亚¹, 刘少民², 杨文敏¹

(1.川渝中烟工业公司技术研发中心, 四川 成都 610066; 2.中国科学技术大学化学系, 安徽 合肥 230025)

摘要: 研究一种利用猪血制备氯化血红素的新工艺, 将超声波细胞破碎应用于酸性丙酮-乙酸钠法制备氯化血红素。利用红外光谱法和紫外-可见光谱法对氯化血红素产品进行表征, 紫外光谱法进行氯化血红素产品含量测定。结果表明: 超声波细胞破碎的最佳工艺条件为超声波功率 0.8kW、破碎剂(水:乙醇, V/V)比例 15:1、破碎时间 6min, 该法所得产品的含量为 92.67%, 得率为 86.62%。此法可操作性强、成本低、产品纯度高。

关键词: 超声波; 酸性丙酮法; 氯化血红素; 制备; 正交试验

Ultrasonic-assisted Acidic Acetone Extraction of Hemin from Porcine Blood

WANG Chang-guo^{1,2}, DAI Ya¹, LIU Shao-min², YANG Wen-min¹

(1. Technical Research Center, Chuanyu Branch of China Tobacco Corporation, Chengdu 610066, China;

2. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230025, China)

Abstract: To modify the acidified acetone-sodium acetate extraction technique of hemin from porcine blood, ultrasonic was used to disrupt porcine red blood cells for accelerating the release of intracellular hemoglobin. Meanwhile, extracted hemin was structurally characterized by infrared spectroscopy and UV-Visible absorption spectroscopy, and quantitative analysis was carried out by UV-Visible absorption spectroscopy. Results showed that crucial parameters affecting ultrasonic disruption of porcine red blood cells such as ultrasonic power, water/ethanol volume ratio and ultrasonic treatment time were optimized to be 800 kW, 15:1 and 6 min, respectively. Under optimized parameters, 86.62% hemin with 92.67% purity was extracted. This method demonstrates the merits of simplicity, low cost and high purity of final products.

Key words: ultrasonic; acidified acetone method; hemin; extraction; orthogonal array design

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)06-0109-05

血红素是铁卟啉类化合物, 主要存在于动物的血液和肌肉中, 是动物血液中的天然色素, 在医药、食品、化工、保健品、建筑及化妆品行业中有广泛应用^[1-2]。在食品行业中, 血红素可代替熟肉中的发色剂亚硝酸盐及人工合成色素, 避免亚硝酸盐引起的致癌作用^[3]; 是治疗缺铁性贫血(IDA)疗效较好的补铁剂, 具有生物利用度高、无体内铁蓄积中毒及胃肠刺激等不良反应等优点^[4], 同时还是抗贫血和抗肿瘤药物的重要原料^[5-6]以及制备各种新型卟啉化合物的重要前体物^[7-8], 我国于1998年正式批准以血红素为基本原料的血卟啉为抗肿瘤新药。美国FDA已于1983年7月正式批准雅培公司的氯化血红素作为药品使用^[9]。在烟草行业中, 它可作为烟草生物减害降焦剂, 降低焦油和截留NO_x^[10-12]。

血红素存在于红细胞中, 红细胞经过破碎才能提取血红素。目前, 提取过程中红细胞的破碎主要采用机

械搅拌的方法, 细胞破碎的时间较长、血红素的得率不高。为了缩短细胞破碎的时间并提高含量、得率, 将超声波细胞破碎应用于酸性丙酮-乙酸钠法提取血红素中, 并对制备氯化血红素的相关工艺过程进行探讨, 以期为血红素的生产提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜猪血 市售。

血红素标准品(Alfa Aesar, 纯度98%)、丙酮、盐酸、亚硫酸氢钠、乙酸钠、氢氧化钠、无水乙醇、95%乙醇溶液、柠檬酸三钠、氯化钠(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

JY98-3N超声波细胞破碎机(配置DC-1006低温恒温槽) 宁波新芝生物科技公司; HP8453紫外-可见分光

收稿日期: 2009-05-08

作者简介: 汪长国(1977—), 男, 工程师, 硕士研究生, 主要从事烟草化学及生物应用技术研究。

E-mail: wgcx@163.com

光度计 美国 Agilent 公司; 5804R 离心机 德国 Eppendorf 公司; Labconco 6L 冻干机 美国 Labconco 公司; AX504 分析天平 瑞士 Mettler Toledo 公司; TENSOR 27 红外光谱仪 德国 Bruker 公司。

1.2 方法

1.2.1 血红素的制备

1.2.1.1 取样及处理

采集新鲜猪血, 加入质量浓度 0.8g/100mL 的柠檬酸三钠溶液作为抗凝剂, 然后将猪血放入冷藏箱中, 迅速运回实验室, 用 100 目筛子过滤后, 将过滤后的抗凝猪血放入 0~4℃ 的冰箱中冷藏备用。取抗凝猪血, 用离心机控温(4℃)以 4000r/min 离心 15min, 去掉上层血浆, 取下层红细胞, 用生理盐水洗涤两次后置于容器中, 存放在 0~4℃ 冰箱中备用。

1.2.1.2 制备过程

取洗涤干净的红细胞, 加入质量浓度 0.2g/100mL 抗氧剂亚硫酸氢钠及等体积的破碎剂(水与乙醇的混合物)用超声波细胞破碎机(间歇: 1min/min)进行细胞破碎, 破碎后加入 5 倍体积的酸性丙酮(pH < 3), 充分搅拌, 抽提 10min, 收集提取液, 用氢氧化钠溶液调 pH5~6 后, 加入质量浓度 1g/100mL 的乙酸钠溶液析出沉淀, 收集沉淀, 分别用去离子水、体积分数 50% 的乙酸溶液、体积分数 95% 乙醇溶液、乙醚洗涤两次, 冷冻干燥, 得血红素。

1.2.2 分析方法

1.2.2.1 定性分析

血红素的定性分析通过红外光谱法和紫外-可见光谱法^[13]进行。取氯化血红素对照样品和制备的样品, 以溴化钾压片, 在 4000~500cm⁻¹ 范围内绘制红外光谱图, 然后进行对照分析; 分别称取氯化血红素对照品和供试品适量, 配成一定质量浓度, 在波长 200~1000nm 范围内扫描吸收光谱图, 然后进行对照分析。

1.2.2.2 定量分析

用分光光度法对血红素进行定量分析^[14]。准确称取质量恒定的标准品, 用 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液配制标准溶液, 用紫外-可见分光光度计在最大吸收波长处测定其吸光度, 绘制成标准曲线, 用最小二乘法进行线性回归得回归方程, 用上述同样的氢氧化钠溶液配制样品测定溶液, 在最大吸收波长处测定其吸光度, 通过回归方程计算样品含量, 通过式(1)计算得率。

$$\text{氯化血红素的得率}/\% = \frac{\text{产品质量} \times \text{氯化血红素含量}}{0.382} \times 100 \quad (1)$$

猪血中红细胞与血浆的体积比约为 1:1, 100mL 血液理论上可得氯化血红素 0.382g, 即 50mL 红细胞理论上可获得 0.382g 氯化血红素^[15], 本实验中投料量均为 50mL 红细胞。

1.2.3 制备条件优化

选定破碎功率、破碎剂比例和破碎时间进行单因素试验, 在单因素试验的基础上确定正交试验的工艺条件, 通过正交试验确定优化的提取工艺条件, 每个试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 破碎功率对氯化血红素含量和得率的影响

表 1 破碎功率对氯化血红素含量和得率的影响

Table 1 Effect of ultrasonic disruption power on hemin purity and yield

破碎功率/kW	氯化血红素含量/%	氯化血红素得率/%
0.6	90.12	78.47
0.7	91.23	81.87
0.8	92.05	86.46
0.9	91.09	83.75

在破碎剂(水:乙醇, V/V)比例为 15:1、破碎时间为 6min 的条件下, 考察了破碎功率对氯化血红素含量和得率的影响, 结果见表 1。由表可知, 得率随功率的增加有上升趋势, 在 0.8kW 时最高, 此时的含量也最高。

2.1.2 破碎时间对氯化血红素含量和得率的影响

表 2 破碎时间对氯化血红素含量和得率的影响

Table 2 Effect of ultrasonic treatment time on hemin purity and yield

破碎时间/min	氯化血红素含量/%	氯化血红素得率/%
4	92.75	85.86
6	92.38	86.65
8	92.32	86.50

在破碎剂比例为 15:1(水:乙醇, V/V)、破碎功率为 0.8kW 的条件下, 考察了破碎时间对氯化血红素含量和得率的影响, 结果见表 2。由表可知, 在 6min 时得率最高, 8min 与 6min 时的得率相差不大。

2.1.3 破碎剂比例对氯化血红素含量和得率的影响

表 3 破碎剂比例对氯化血红素含量和得率的影响

Table 3 Effect of water/ethanol volume ratio on hemin purity and yield

破碎剂比例(水:乙醇, V/V)	氯化血红素含量/%	氯化血红素得率/%
20:1	91.75	81.45
15:1	92.78	86.54
10:1	92.25	84.02

在破碎功率为 0.8kW、破碎时间为 6min 的条件下, 考察了破碎剂比例(水:乙醇, V/V)对氯化血红素含量和

得率的影响, 结果见表3。由表可知, 在15:1时得率最高, 20:1和10:1时均与15:1时的得率相差较大。

2.2 正交试验

在单因素试验的基础上, 选取破碎功率、破碎剂比例及破碎时间3因素, 采用正交设计表 $L_9(3^4)$ 进行三因素三水平的正交试验^[16], 结果见表4~6, 在分析过程中, 考虑到得率是通过式(1)计算而来, 与氯化血红素得率、含量相关且呈正比关系, 故相关分析只考虑考察指标——得率。

表4 正交试验的因素与水平

Table 4 Factors and levels in orthogonal array design for optimizing ultrasonic disruption of porcine red blood cells

水平	因素		
	A 破碎功率/kW	B 破碎剂比例	C 破碎时间/min
1	0.7	20:1	4
2	0.8	15:1	6
3	0.9	10:1	8

表5 超声波细胞破碎工艺优化正交试验结果

Table 5 Arrangement and experimental results of orthogonal array design for optimizing ultrasonic disruption of porcine red blood cells

试验号	因素				含量/%	得率/%
	A	B	C	D(空列)		
1	1	1	1	1	81.13	70.34
2	1	2	2	2	87.58	74.88
3	1	3	3	3	87.87	74.12
4	2	1	3	2	89.10	77.43
5	2	2	1	3	92.68	86.63
6	2	3	2	1	91.23	85.28
7	3	1	2	3	86.70	71.82
8	3	2	3	1	85.52	76.82
9	3	3	1	2	83.21	74.39
K_1	219.34	219.59	231.36			
K_2	249.34	238.33	231.98			
K_3	223.03	233.79	228.37			
R	30.00	18.74	3.61			

表6 方差分析结果

Table 6 Analysis of variance for hemin yield with different ultrasonic disruption conditions

变异来源	平方和	自由度	均方	F比	显著性
A	178.43	2	89.21	23.82	显著($P < 0.05$)
B	63.72	2	31.86	8.51	
C	2.48	2	1.24	0.33	
误差	7.49	2	3.75		
总和	252.12	8		$F_{0.90(2,2)}=9.0, F_{0.95(2,2)}=19.00$	

由表5可以看出, 破碎功率、破碎剂比例、破碎时间对氯化血红素的制备均有影响。就极差分析结果来看, 影响的大小顺序为破碎功率>破碎剂比例>破碎时

间; 从表6可以看出, 破碎功率对制备结果的影响显著; 总的来说, 破碎功率的影响最为关键, 其次是破碎剂比例, 破碎时间的影响最小; 综合来看, 优化的工艺条件为 $A_2B_2C_2$, 即破碎功率0.8kW、破碎剂比例15:1、破碎时间6min。

2.3 验证实验

表7 两种破碎方法制备氯化血红素的比较结果

Table 7 Comparisons of hemin purity and yield obtained using two cell disruption methods

破碎方法	样品号	氯化血红素含量/%	含量均值/%	氯化血红素得率/%	得率均值/%
超声波法	1	92.67		86.63	
	2	92.69	92.67	86.61	86.62
	3	92.65		86.63	
机械搅拌法	1	92.53		75.42	
	2	92.57	92.55	75.44	75.43
	3	92.56		75.43	

对优化后的工艺条件进行了验证实验, 同时与机械搅拌法细胞破碎^[17]的效果进行了比较。机械搅拌时间为30min, 而超声波破碎的时间仅为6min, 破碎的时间缩短了4/5。从表7可以得出, 验证实验的结果与正交试验的结果一致, 两种破碎方法所得氯化血红素产品的含量相差不多, 但超声波破碎法制备的氯化血红素的得率要比机械搅拌法高11%左右。

2.4 血红素产品的定性鉴定

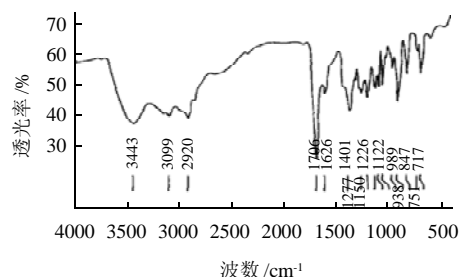
2.4.1 产品性状

在显微镜下观察为红紫色针状晶体, 反射光下为钢蓝色粉末状晶体, 与参考文献[13]报道的氯化血红素性状一致; 易溶于碱性溶液, 如氨水和碳酸钠及氢氧化钠溶液, 不溶于盐酸、体积分数的70%~80%乙醇溶液、乙醚和水, 在水中稳定, 与参考文献[2]的报道一致。

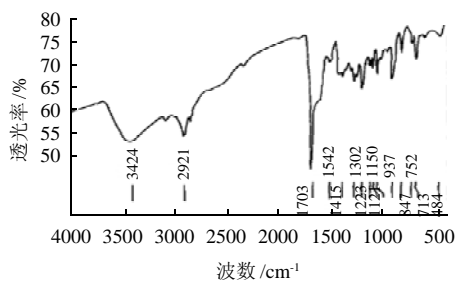
2.4.2 红外和紫外光谱鉴定

由图1可知, 对照样品和制备的样品红外图谱基本一致, 与参考文献[18]报道的红外光谱图一致。

从图2可以看出, 对照品和供试品紫外可见光谱基本一致, 在(382 ± 1)nm波长处均有最大吸收, 这也是定量分析的测定波长。



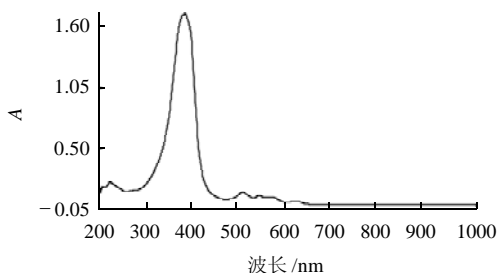
a.氯化血红素标准品



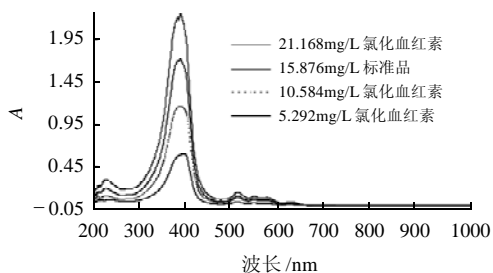
b. 氯化血红素样品

图1 氯化血红素红外光谱图(KBr)

Fig.1 IR spectra of hemin standard and sample



a. 氯化血红素标准品



b. 不同质量浓度的氯化血红素样品及标准品

图2 氯化血红素紫外-可见光谱图

Fig.2 UV-Visible spectra of hemin standard and samples at different concentrations

2.5 制备工艺过程分析

氯化血红素的制备过程是破坏红血球(红细胞)膜结构,释放出血红蛋白,将血红蛋白拆分成珠蛋白与亚铁血红素,亚铁血红素脱离珠蛋白后,转化成氯化血红素,再把氯化血红素提取出来。此过程存在3个工艺步骤:红血球溶碎破膜释放血红蛋白、血红蛋白中珠蛋白与血红素分离、提取氯化血红素^[19]。

当红血球膜破裂或溶解时,血红蛋白就会被释放,通过红血球与适量破碎剂混合,同时配以适当的机械作用如搅拌、超声等,尤其是超声波的空化作用,降低细胞外渗透压、加速膜的破裂速度^[20];另外通过利用能使脂类溶解或改变脂类物理性状的物质或物理因素如氯仿、乙醚等脂肪溶剂、胆盐、肥皂等乳化剂或紫外线照射、交替冰冻与融化均可破坏细胞膜结构,从而释

放血红蛋白。

在正常条件下,血红蛋白中的亚铁血红素与珠蛋白结合紧密,很难拆分,通过如加热、等电位法(pH值变化)^[21-22],脲、胍等变性因素或酶解的方法^[23-24],可导致血红蛋白空间结构发生变化,致使血红素与珠蛋白的结合最为疏松,此时很容易将血红素和珠蛋白分开,使血红素脱离珠蛋白。

当亚铁血红素脱离珠蛋白后,很容易氧化成高铁血红素,高铁血红素与溶液中Cl⁻结合成氯化血红素,可通过使用沉淀剂或沉淀反应,降低氯化血红素在丙酮中的溶解度,过饱和的氯化血红素以沉淀方式析出,或沉淀反应生成溶解度很小的沉淀而析出;利用色素吸附剂将氯化血红素吸附后用离心技术分离出来;以及酶解法中的疏水作用使氯化血红素聚集成沉淀而得以分出。

3 结论

通过正交试验可以确定超声波细胞破碎的最佳条件:破碎功率0.8kW、破碎剂(水:乙醇, V/V)比例15:1、破碎时间6min。在超声波破碎时采用了低温恒温槽,且间歇式超声破碎,有效控制了破碎过程中产生热量对产品制备的影响,时间短、操作简便,适用于大规模的生产,具有一定的应用前景。本法对氯化血红素进行了精制、纯化,产品含量高。本实验对制备工艺过程进行了分析探讨,为制备老工艺的优化及新工艺的研究提供理论参考。

参考文献:

- [1] KAPPAS A, DRUMMOND G S. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins[J]. J Chin Invest, 1986, 77(2): 335-339.
- [2] 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(3): 125-127.
- [3] 陈来同, 唐运. 生物化学产品制备技术(1)[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2003: 374.
- [4] 袁曦, 洪清, 吕方生, 等. 氯化血红素胶囊的研制及临床疗效[J]. 中国药房, 1996, 7(1): 17-21.
- [5] 黎星树. 动物血液的利用[J]. 西南民族学院学报, 1989, 15(1): 73-79.
- [6] 郁知费. 贫血及红细胞系疾病[M]. 杭州: 浙江人民卫生出版社, 1979: 32-48.
- [7] 蒋旭亮. 新型卟啉的合成及其性能研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2006.
- [8] SAKTHITHARAN S, CHRISTINE E, ROSS W B. Advances in modern synthetic porphyrin chemistry[J]. Tetrahedron, 2000, 56(8): 1025-1046.
- [9] 唐明龙, 金游杨. 血红素的应用研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 1985, 16(8): 37-40.
- [10] 郭灿成. 烟草生物降焦剂: 中国, 99115651.X[P]. 2000-05-24.
- [11] 张爱华. 血红素降低卷烟焦油量的正交分析[J]. 烟草科技, 1992(2): 27-28.
- [12] 刘少民, 许萍, 阎向阳, 等. 卷烟主流烟气中NO_x截留的研究[J]. 环境与健康杂志, 2002, 19(3): 186-187.

- [13] 袁曦, 洪清. 氯化血红素提取工艺及质量标准研究[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(6): 42-44.
- [14] 鲁云凤, 田龙. 高纯度牛血红素制备工艺研究[J]. 食品科技, 2007, 32(6): 247-249.
- [15] 丁建平, 蒋长苗, 刘旭光, 等. 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): 65-68.
- [16] 郑少华, 姜奉华. 试验设计与数据处理[M]. 北京: 中国建材工业出版社, 2004: 67-125.
- [17] 杨淑琴, 赫启昌, 王志松, 等. 用盐酸丙酮法从猪血中分离血红素[J]. 辽宁大学学报, 1992, 19(3): 65-67.
- [18] 李敏康, 钱冬明, 李红心. 提取氯化血红素新工艺的研究[J]. 食品科技, 2005(12): 51-53.
- [19] 吴立芳. 利用猪血制备氯化血红素技术的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
- [20] 李晨光, 庄红, 吕学举, 等. 动物血液血红素铁提取方法研究[J]. 食品工业科技, 2008(1): 308-310.
- [21] 刘娅. 天然补铁剂 - 血红素铁的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005(4): 5-8.
- [22] 陈合, 许牡丹. 新型食品原料制备技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [23] 杨伟, 彭珍容. 高温蛋白酶制备酶解猪血蛋白的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(2): 1-4.
- [24] CHAE H J, IN M J, KIM D H, et al. Rapid determination of degree of hydrolysis for hemoglobin by osmometry[J]. J Korean SOC Agric Chem Biotechnol, 2001, 44(3): 143-147.