

氯化血红素的吡啶血色原光吸收测定

张 楚 富

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

关键词 氯化血红素, 吡啶血色原

测定含铁的原卟啉类物质的常用方法主要有两种: 一种是邻菲罗啉 (O-phenanthroline) 光度法^[1], 另一种是吡啶血色原光吸收测定法^[2]。前者是测定铁卟啉的铁含量, 后者是先将含铁的原卟啉转变成吡啶血色原后测定还原性铁卟啉的量。这两种方法都是测定铁卟啉蛋白类物质的重要方法。我们在研究提取氯化血红素工艺时, 采用吡啶血色原光吸收测定法测定样品中氯化血红素的含量。该法操作简便、快速, 结果可靠, 是一种很理想的测定方法。

一、材料与方法

1. 材料 标准氯化血红素系上海生化所产品, 采用原子吸收光谱测定其铁含量为 8.5%, 换算成氯化血红素的含量为 99.18%。

氯化血红素样品是我们从新鲜猪血中提取, 未经重结晶。

碱性吡啶溶液 [0.1 mol/L NaOH-30%(V/V)吡啶溶液]。

连二亚硫酸钠。

2. 测定方法 准确称取标准氯化血红素和样品各 10mg, 分别用 0.1 mol/L NaOH-30% 吡啶溶液溶解, 定容至 50ml 后各取 1ml 加到比色管中, 分别用碱性吡啶溶液稀释到 12.5ml, 再加入少许 (保证过量) 连二亚硫酸钠, 摇匀, 立即于 557nm 处测定其吸光度。在此条件下测定的标准品的吸光度即相当于标准氯化血红素的含量 (99.18%)。因此在同样条件下样品的氯化血红素的含量即可从样品与标准品的吸光度比值求得。

二、结果与讨论

1. NaOH 和吡啶浓度对测定结果的影响 吡啶血色原光吸收法测定样品氯化血红素含量所依据的原理是, 在碱性条件下, 氯化血红素转变成吡啶血色原。为此, 在吡啶浓度固定 (30%) 的条件下, NaOH 在 0.02—0.5 mol/L 之间变化, 以及在 NaOH 浓度固定

(0.1 mol/L) 的条件下, 吡啶浓度在 10—40% (V/V) 之间变化, 加入定量的标准品和样品, 分别测定它们的吸光度, 检测 NaOH 和吡啶浓度对测定结果的影响, 获得表 1 的结果。

表 1 NaOH 和吡啶浓度变化对氯化血红素测定结果的影响

NaOH 浓度 (mol/L)	标准品吸光度 (A_{557})	样品吸光度 (A_{557})	吡啶浓度 (% V/V)	标准品吸光度 (A_{557})	样品吸光度 (A_{557})
0.02	0.465	0.432	10	0.435	0.405
0.05	0.470	0.432	15	0.442	0.415
0.1	0.471	0.437	20	0.472	0.435
0.2	0.472	0.425	30	0.470	0.432
0.5	0.472	0.430	40	0.472	0.430

从表 1 的结果可以看出, NaOH 浓度的变化对氯化血红素的测定结果没有明显影响, 表明 NaOH 主要是提供一种碱性环境, 使氯化血红素转变成羟化高铁原卟啉而处于溶解状态。高铁原卟啉很容易与吡啶形成一种可溶性络合物——吡啶血色原。从表 1 还可以看出, 当吡啶浓度低于 20% 时, 其吸光度偏低; 但当吡啶浓度高于 20% 时, 其吸光度变化很小。这些结果表明本法对该试剂的浓度范围要求较宽, 与文献报道的结果基本一致^[3]。

在后面的测试中, 我们均采用浓度为 0.1 mol/L NaOH-30% 吡啶溶液。

2. 标准曲线 将标准氯化血红素配制成 6.1、12.2、18.3、24.4、30.5、36.6 和 42.7 μ mol/L 的不同浓度的标准液, 于 557nm 处测定它们的吸光度, 结果分别为 0.182、0.265、0.41、0.525、0.61、0.72 和 0.83。以标准液的浓度为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制出标准曲线 (图 1), 其直线回归方程 $\hat{y} = 0.00178x \pm 0.0697$, 相关系数 $r = 0.9983$ 。结果表明, 标准液的浓度与其吸光度呈良好的线性关系, 亦表明本实验条件是可行的。

3. 重复性试验和回收率 取 24.4 μ mol/L (即 16

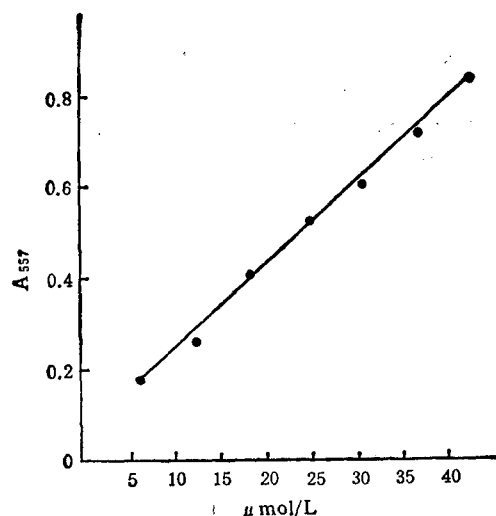


图1 标准氯化血红素的标准曲线

μg/ml) 的标准品溶液重复试验 8 次, 吸光度分别为 0.51、0.5、0.505、0.52、0.527、0.524、0.505、0.51, 均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 为 0.51 ± 0.0099 , 批内变异系数 (CV) 为 1.94%。

取三份样品, 各重复试验 6 次, 结果示于表 2。

表2 氯化血红素样品重复试验结果

样 品	吸光度 ($\bar{x} \pm SD$) (A_{557})	CV (%)
I	0.472 ± 0.0066	1.39
II	0.445 ± 0.0068	1.53
III	0.465 ± 0.01	2.1

另取样品 I 和 II 各半份, 混合后测定吸光度(重复试验 5 次), 其 $\bar{x} \pm SD$ 为 0.452 ± 0.0057 , 批间变异系数 $CV = 1.26\%$ 。

取样品 I 准确测定含量后加入定量的标准品, 测定其回收率。重复试验 5 次, 吸光度分别为 0.475、

0.482、0.475、0.485 和 0.49, $\bar{x} \pm SD$ 为 0.481 ± 0.0065 , $CV = 1.35\%$, 回收率平均为 96.1%。

上述结果表明, 本方法具有很好的重复性, 回收率较高, 能够作为一种有效的方法用于氯化血红素样品含量测定。

4. 样品含量测定 取三份样品和一份标准品, 均配制成 $24.4 \mu\text{mol/L}$ 的浓度, 按本法测定它们的吸光度, 并取同样的三份样品和一份标准品进行原子吸收光谱测定, 结果如表 3 所示。两种方法测定的结果非常接近, 前者只比后者低 0.28%—0.93%, 差别很小。由此可见, 吡啶血色原光吸收法可以替代原子吸收光谱法测定样品氯化血红素含量。

表3 氯化血红素的吡啶血色原法和原子吸收光谱法比较

氯化血红素	吡啶血色原测定法		原子吸收光谱法	
	A_{557}	相应含量 (%) ¹⁾	Fe (%)	换算值 (%) ²⁾
标准品	0.51	—	8.5	99.18
样品 I	0.472	91.79	7.9	92.18
样品 II	0.445	86.54	7.5	87.51
样品 III	0.467	90.82	7.81	91.1

1) 根据样品与标准品吸光度比值乘以 99.18% 求得。

2) 根据标准品和样品的 Fe 含量与氯化血红素的理论 Fe 含量的比值求得。氯化血红素的理论 Fe 含量为 8.57%。

吡啶血色原光吸收测定法比较专一^[4], 该法可以排除样品因铁离子污染而影响测定结果的可能。这一点比原子吸收光谱法和邻菲罗啉光度法优越。

参 考 文 献

- 1 Adler A D, George P. *Anal Biochem*, 1965; 11:159
- 2 de Duve. *Acta Chem Scand*, 1948; 2:264
- 3 Paul K G *et al. Acta Chem Scand*, 1953; 7:1234
- 4 Riggs A. *Methods in Enzymology*, 1981; 76:19

【本文于 1989 年 10 月 12 日收到,

1990 年 3 月 14 日修回】