

# 富血红素多肽螯合铁合成的初探

李华, 刘通讯

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 采用乙醇沉淀, 在抗坏血酸和还原铁粉、50 °C 水浴的条件下, 富血红素多肽酶解液及其超滤分离组分(透过液和截留液)以 2:1 比率 (v/m) 分别与 FeCl<sub>2</sub> 反应 1 h 得总铁含量为 127.34 mg/g, 128.70 mg/g 和 47.83 mg/g 的多肽螯合铁。红外光谱分析表明: 多肽螯合铁形成新的 -C≡N 特征吸收峰, 证明了多肽与铁形成新的化学结构。脂肪储藏实验表明: 在促进脂肪过氧化值升高方面, 富血红素多肽螯合铁比富血红素多肽酶解液和透过液要强, 但比 FeCl<sub>2</sub> 弱。

**关键词:** 富血红素多肽螯合铁; 红外光谱; 过氧化值

中图分类号: TS; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)10-0001-04

## Study on Synthesis of Ferrous Heme-enriched Peptide

LI Hua, LIU Tong-xun

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The enzymatic hydrolysate, which was rich in ferrous peptides, were reacted with FeCl<sub>2</sub> at a ratio of 2:1 in a water bath at 50 °C for 1 h in the presence of antioxidants, then the mixtures were centrifuged at 15000 r/min for 10 min and the supernatant was precipitated by ethanol. The precipitate was washed several times by ethanol, followed by a vacuum dry. Ferrous peptides were obtained with content of total iron being of 127.34 mg/g (heme-enriched peptide), 128.70 mg/g (permeate peptide) and 47.83 mg/g (retentate peptide), respectively. The structure of the new compound was identified by Infrared spectrometry. It was also found that oxidation stability of ferrous heme-enriched peptide was higher than that of FeCl<sub>2</sub> but lower than that of heme-enriched peptide or permeate peptide.

**Key words:** ferrous heme-enriched peptide; Infrared spectrometry; POV

20 世纪 80 年代螯合铁的制备基本使用单氨基酸(如甘氨酸、蛋氨酸等), 90 年代开始使用动植物蛋白酶解液制备复合氨基酸螯合铁。赵征等研究了酪蛋白水解液螯合铁<sup>[1]</sup>; 秦卫东等研究了用脱脂豆粕酶解成复合氨基酸液, 与亚铁盐螯合制备复合氨基酸螯合铁的工艺<sup>[2]</sup>。但使用禽类血红蛋白酶解液作螯合铁基料进一步强化铁至今尚无报道。富血红素多肽酶解液其本身含有血红素铁, 吸收利用比一般的无机铁及有机铁要好, 但铁的比率相对不高, 作为缺铁性贫血的治疗药物还有缺陷。若螯合无机铁可极大提高其铁比率, 临床使用价值更高。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

猪血: 本校菜市场购得; 氯化亚铁、硫代硫酸钠、石油醚(沸程 30~60 °C) 均为分析纯。

收稿日期: 2007-05-08

基金项目: 广东省科技计划项目“粤港关键领域重点突破招标项目”(2005A20303003); 广东省自然科学基金项目(031348)

作者简介: 李华(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质化学与工程

恒温水浴锅(富华420型三用水箱); Himac CR 22 低温冷冻离心机; 超滤设备; 原子吸收光谱仪(Z-5000 型); 傅里叶变换红外谱仪(Vector 33)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酶解

在 Protamex/Alcalase=1:1、E/S=2%、S%=10%、pH=8.0、45 °C、12 h 条件下酶解猪血红蛋白, 离心后上清液为富血红素多肽酶解液, 冷冻干燥。

#### 1.2.2 超滤<sup>[3]</sup>

使用 10000 KDa 透过率的超滤膜把富血红素多肽酶解液分为透过液(主要成分为分子量<10000 KDa 的多肽)和截留液(主要成分为分子量>10000 KDa), 冷冻干燥。

#### 1.2.3 富血红素多肽对亚铁离子的稳定作用

分别量取混合溶液(m 氯化亚铁:m 富血红素多肽=1:3)与氯化亚铁溶液(亚铁离子浓度均为 0.0001 mol/L)各 50 mL, 以 0.0062 mol/L NaOH 溶液滴定, 记录滴定体积及相应 pH, 作图。

#### 1.2.4 富血红素多肽螯合铁的制备<sup>[4]</sup>

分别称取一定量富血红素多肽酶解液、透过液及

截留液于三颈烧瓶中，加入抗坏血酸及还原铁粉作抗氧化剂，再加入一定量的氯化亚铁，于 50 °C 水浴反应 1 h，反应液离心去除还原铁粉等沉淀后，上清液用 95%乙醇 (V<sub>上清液</sub>:V<sub>乙醇</sub>=1:7) 沉淀，15000 r/min 离心 10 min 得沉淀为多肽螯合铁，沉淀经乙醇数次洗涤后，放置干燥器中干燥 24 h，样品袋中保藏。

### 1.2.5 红外光谱<sup>[5]</sup>

将多肽及其螯合铁分别与溴化钾按 1:100 的质量百分比在玛瑙研钵中混匀，然后在 10 MPa 压强下保持 5 min，制成固体样品，在 500~4000 cm<sup>-1</sup> 范围内进行红外光谱扫描。

### 1.2.6 酶解液、螯合铁及普通铁剂对脂肪的过氧化值的影响

肥猪肉制作：新鲜的肥肉，绞碎，100 °C，10 min 处理灭活过氧化酶。

称取经上述处理的肥猪油四份（每份各 40 g）于 100 mL 烧杯中，以 2% 的添加量分别添加 FeCl<sub>2</sub>、透过液、富血红素多肽螯合铁及富血红素多肽酶解液，在 30 °C、强光照的环境中储藏 3 d，用石油醚反复抽提（直至抽提后的石油醚滴在白纸上待石油醚完全挥发后不留油渍），并用 95% 的乙醇沉淀蛋白<sup>[6]</sup>后采用碘量法测定过氧化值。

### 1.3 测定方法

总铁含量测定：原子吸收分光光度法

过氧化值：碘量法（GB/T5538-1995）

## 2 结果与讨论

### 2.1 富血红素多肽对亚铁离子的稳定作用

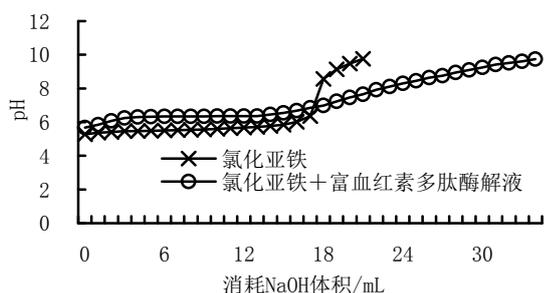


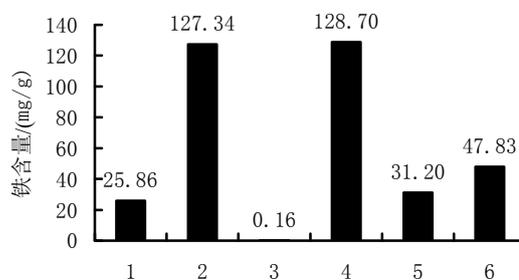
图 1 添加多肽前后氯化亚铁溶液的 NaOH 滴定曲线

Fig.1 The NaOH titration curve of ferrous solution before and after adding peptide

从图 1 可看出：在滴定 NaOH 溶液体积为 18 mL 时，氯化亚铁组的 pH 值由 6.32 突然升至 8.67，这是由于溶液中的亚铁离子只能在极酸性条件下稳定存

在，当 pH 上升到偏中性时，亚铁离子容易被氧化为三价铁离子并与 OH<sup>-</sup> 反应生成氢氧化铁沉淀，而过量的 OH<sup>-</sup> 使得 pH 值快速上升。氯化亚铁+富血红素多肽酶解液组在滴定体积 1~14 mL 之间 pH 稳定在 6.36，滴定体积达 15 ml 后随着滴加体积的增加 pH 升高但是非常缓慢（滴定体积从 15 到 34 mL，pH 从 6.55 变化到 9.75）。从实验可以看出：当 pH=6.32 氯化亚铁组出现红色絮状沉淀，而氯化亚铁+富血红素多肽酶解液组在整个滴定范围（5.60~9.75）都保持澄清透明。这可能是多肽本身具有的缓冲能力使得 pH 变化平缓，而亚铁离子与多肽有一定的相互作用，使得滴加的氢氧化钠无法沉淀溶液中的铁离子。

### 2.2 富血红素多肽、透过液、截留液及其螯合铁含量的比较



1. 富血红素多肽；2. 富血红素多肽螯合铁；3. 透过液；4. 透过液螯合铁；5. 截留液；6. 截留液螯合铁

图 2 螯合前后铁含量的变化

Fig.2 The change of iron content before and after chelate reaction

由图 2 知，经螯合反应后的多肽螯合铁铁含量明显较螯合前高。螯合前富血红素多肽、透过液及截留液的铁含量分别为 25.86 mg/g、0.16 mg/g、31.20 mg/g，而螯合后的多肽螯合铁含量则分别达到 127.34 mg/g、128.70 mg/g 和 47.83 mg/g。其中透过液的螯合能力最强，铁含量增加到 128.54 mg/g；截留液的螯合铁能力最弱，铁含量仅增加了 16.63 mg/g。

### 2.3 多肽及其螯合铁的红外光谱比较

比较图 3 中富血红素多肽与富血红素多肽螯合铁的红外光谱可知，前者在 3065 和 2874 cm<sup>-1</sup> 处的强吸收峰在后者的红外光谱中消失了，这是一-CH<sub>3</sub> 的特征吸收峰；而后者在 2338 cm<sup>-1</sup> 处出现了一-C≡N 的特征吸收峰；且两者在指纹区（1330~667 cm<sup>-1</sup>）吸收峰的位置、形状及强度差别都很大。说明螯合反应前后物质有不同的化学结构。

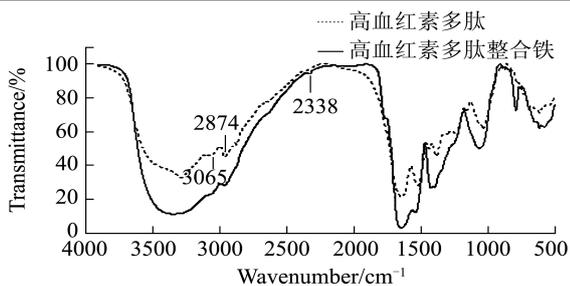


图3 富血红素多肽与富血红素多肽整合铁的红外光谱

Fig.3 Infrared spectrum of Heme-enriched peptide and ferrous

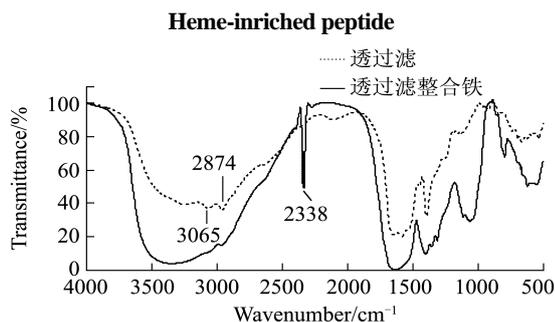


图4 透过液多肽与透过液多肽整合铁的红外光谱

Fig.4 Infrared spectrum of permeate peptide and ferrous

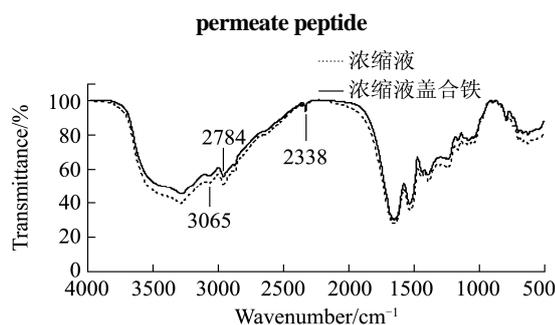


图5 截留液多肽与截留液多肽整合铁的红外光谱

Fig.5 Infrared spectrum of concentrate peptide and ferrous

retentate peptide

再比较图4中透过液与透过液多肽整合铁的红外光谱可知：二者红外光谱差别很大，同富血红素多肽与富血红素多肽整合铁的红外光谱一样，前者在3065和2874 cm<sup>-1</sup>处的-CH<sub>3</sub>特征吸收峰在后者的红外光谱中消失了，而后者在2338 cm<sup>-1</sup>出现了新的-C≡N特征吸收峰。

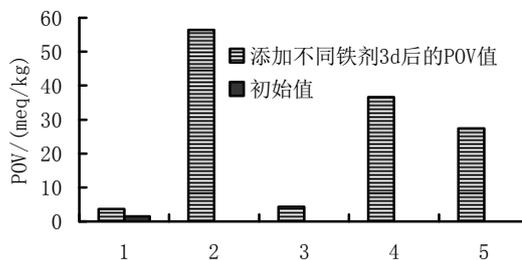
由图5知：截留液与截留液多肽整合铁的红外光谱图基本一样，无论在4000~2500 cm<sup>-1</sup>的特征吸收谱带还是在1330~667 cm<sup>-1</sup>的指纹区它们的吸收峰在位置、强度与形状等方面都有很好的重合，但在2338 cm<sup>-1</sup>处截留液多肽整合铁也出现新的-C≡N的特征吸收峰。

综合比较图3~5中螯合前的物质(富血红素多肽、透过液与截留液)和螯合反应后的物质(富血红素多

肽螯合铁、透过液螯合铁、截留液螯合铁)的红外光谱可知，富血红素多肽、透过液与截留液在4000~2500 cm<sup>-1</sup>的特征吸收光谱带并无区别，主要的特征吸收峰为3065 cm<sup>-1</sup>和2874 cm<sup>-1</sup>；在指纹区富血红素多肽与截留液的红外光谱有很好的吻合，但富血红素多肽和透过液有一定的差别，究其原因可能是由于该红外光谱实验所指富血红素多肽实为其V<sub>富血红素多肽溶液</sub>:V<sub>乙醇</sub>=1:7的醇沉物，而乙醇主要沉淀大分子多肽，所以造成富血红素多肽和透过液红外吸收光谱的细微差别。螯合后的富血红素多肽螯合铁与透过液螯合铁的红外光谱图基本相同：4000~2500 cm<sup>-1</sup>的特征吸收谱带一样，指纹区的吸收峰吻合，并在2338 cm<sup>-1</sup>处有出现了同样的新的-C≡N吸收峰(虽然在此吸收峰位，后者的吸收峰更强)；而富血红素多肽螯合铁与截留液螯合铁的红外光谱图差别很大。由此可推断富血红素多肽与铁螯合形成新的化合物，并螯合主要发生在分子量小于10000 KDa的组分(也则为透过液)。截留液螯合铁在2338 cm<sup>-1</sup>处出现的吸收峰可能是由于截留液中不可避免存在的分子量小于10000 KDa的小分子肽与铁形成的螯合铁的吸收峰。

2.4 多肽、多肽螯合铁与普通铁剂对脂肪过氧化值的影响

如图6可知：添加透过液、酶解液及富血红素多肽螯合铁的样品POV值都明显比添加氯化亚铁的要小，它们分别为4.3、27.4、36.0和56.4，其中添加透过液组的POV值变化与空白样相差不大(空白为3.7)。脂肪中存在铁离子时会导致羟基自由基(目前已知的最强的氧化剂)的产生并可与脂质过氧化氢反应产生脂氧自由基RO·和脂过氧自由基ROO·，羟基自由基和脂氧自由基共同作用能使油脂自动氧化加剧，短时间内急速升高脂肪的POV值。



1. 空白; 2. 氯化亚铁; 3. 透过液; 4. 富血红素多肽整合铁; 5. 酶解液

图6 添加不同铁剂3d后POV值的变化

Fig.6 The change of POV after 3d storage with different form of iron

(下转第6页)