

草鱼胆绿素 IXa 的纯化与光学特性*

丁兆坤 许友卿 黄溢明

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

PURIFICATION AND OPTICAL PROPERTIES OF BILIVERDIN IXa FROM THE BILE OF GRASS CARP *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

Ding Zhaokun, Xu Youqing and Huang Yiming

(College of Life Sciences in Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词 胆绿素 IXa, 牛脾胆绿素还原酶, 胆红素

Key words Biliverdin IXa, Cow splenic biliverdin reductase, Bilirubin

制备胆绿素, 有人根据 Bonnet and McDonagh 方法^[1], 先把吡啶血红素和抗坏血酸偶联氧化为四种胆绿素异构体的二甲酯, 再按 O'Carra and Colleran 方法^[2]用薄层层析进一步纯化各种异构体。也有人根据 Lemberg 法用结晶胆红素氧化; 再分离胆绿素。研究表明, 胆绿素是鱼类、两栖类、爬行类和鸟类动物体内血红素之分解终产物及排泄物^[3,4]。因此, 可以利用这些动物的胆汁和血液等分离提纯胆绿素, 再把胆绿素转变为胆红素。这是广开材料来源, 制备更多名贵药用胆红素的途径之一。本文报告用硅胶柱分离纯化淡水草鱼胆汁中的胆绿素 IXa 及其光学特性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Wakogel C-200 & Wakogel B-10 是瑞典产品, 余为国产 A.R. 或 C.P. 试剂。

1.2 草鱼胆来源 取自广州市场, 清洗后即用于或贮于 4℃ 冰箱中待用。

1.3 胆绿素 IXa 之分离提纯 淡水草鱼鲜胆汁 100ml, 上 Wakogel C-200 柱 (2.5 × 15cm), 用 CHCl₃: CH₃COOH (v/v 97:3) 洗柱, 以便洗去未知的色素等。洗毕, 改用稍具极性的洗脱液 CHCl₃: CH₃OH: CH₃COOH (V/V 92:5:3) 洗脱黑绿色的胆绿素 IXa, 收集其中在薄层层析上只有一个点的胆绿素 IXa 洗脱液。

于 30—40℃ 减压蒸发胆绿素 IXa 洗脱液中之溶剂, 另加 1% NaOH 溶解其中之色素, 再加 1% CH₃COOH 沉淀之。用离心收集沉淀, 并用蒸馏水洗涤数次除去盐类, 冷冻干燥。所得胆绿素 IXa 粉末贮存于 4℃ 的黑暗环境中。

1.4 胆绿素 IXa 之薄层层析 薄层层析分析在 20 × 5cm 板上进行, 此板先用于 50℃ 活化 3h 的

* 中山大学科学基金资助项目。

1992 年 4 月 3 日收到。

Wakogel B-10 涂数层至 0.25mm 厚,再点上纯胆绿素 IXa 样品,用 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (v/v 94.5:1) 展开时,只有一个点, R_f 值是 0.25—0.27。

1.5 胆绿素 IXa 之浓度测定 把 2—3mg 纯胆绿素 IXa 溶于约 0.3ml 0.1mol/L KOH 中,并用 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.4) 稀释至约 0.2mol/L。溶液中胆绿素 IXa 的精确浓度以 670nm 波长吸收峰测定。

2 结果与讨论

2.1 胆绿素 IXa 之光学特性

用本法制备的纯胆绿素 IXa 经过薄层层析分析和光谱吸收测定,结果与标准胆绿素相同。如果在总体积为 1.9ml 的反应混合物中,含 200 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸钾缓冲液 (pH7.4),2mg 牛血清白蛋白,14 μg 纯牛脾胆绿素还原酶和 10 $\mu\text{mol/L}$ 胆绿素 IXa,于 37℃ 保温 5min 后,再加入 100 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 启动还原反应,则胆绿素 IXa 在还原反应中,于 384nm 和 670nm 波长表现两个吸收峰 (图 1)。如果还原反应完成后,用丁醇抽提其中之反应产物,其光谱吸收如图 2 所示。

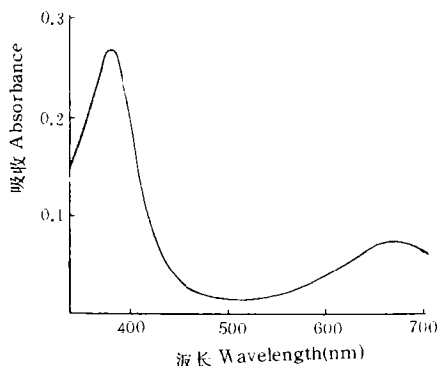


图 1 胆绿素 IXa 的吸收光谱

Fig.1 The absorption spectrum of the biliverdin IXa

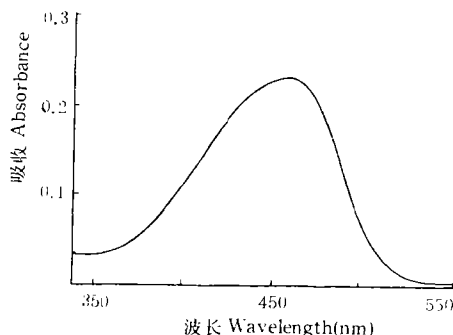


图 2 在丁醇中的胆绿素 IXa 还原产物之吸收光谱

Fig.2 The absorption spectrum of the biliverdin IXa reaction product extracted from the reaction mixtures with butanol after completion of the reduction in NADPH.

上述胆绿素 IXa 之光学特性与 Blanckeart 等^[8]报告的很相似。

2.2 鱼胆之处理

从理论上说,只有进行体外氧化时,血红素才氧化分解为胆绿素 IXa、 β 、 γ 及 δ 四种异构体。而酶促血红素分解或用血红蛋白或用肌红蛋白作底物进行偶联氧化时,则只生成胆绿素 IXa。天然存在的胆绿素,除了某种蝶之一绿色色素 (胆绿素 IXr) 为唯一例外,其余动物之天然胆绿素皆是 IXa 型^[5]。虽然均是从鱼胆汁中提取天然胆绿素 IXa,实验发现其提取率和纯度与鱼胆之处理相关。以下是放在 4℃ 冰箱冰冻贮存一段时间后解冻的鱼胆和鲜鱼胆 Wakogel 提取的比较试验结果 (表 1)。

结果表明,用鲜鱼胆提取胆绿素 IXa 最好,其产率及纯度都最高,分别为 0.0495% 和 88.3%。冰冻鱼胆之产量及质量都降低,尤以冰冻 20d 的降低较明显 (产率下降 7.1%,纯度降低 0.5%),其后趋缓。对冰冻鱼胆来说,由于胆绿素 IXa 之水溶性^[6],及其仍在胆汁中而贮存于有氧和不时亮灯的冰箱内,所以它不可能被还原为胆绿素而影响胆绿素 IXa 之量与质。不过,胆绿素 IXa 可能会被氧化分解或逆行生成胆绿素-铁络盐和未知的 688nm 物质,从而影响胆绿素 IXa 之提取率与纯度。

可见,从理论和实践分析,均是用鲜鱼胆提取胆绿素 IXa 为最佳。

表 1 冰冻胆汁对制备胆绿素 IXa 的影响

Tab.1 Comparisons on biliverdin IXa extracts from fresh and cooling biles

处理方法 Treating means of bile	胆汁 Bile (ml)	胆绿素 IXa Biliverdin IXa (g)	胆绿素 IXa / 胆汁 Biliverdin IXa / Bile (%)	纯度 Purity (%)	下降率 Decline rate (%)	
					产 率 Productivity	纯 度 Purity
鲜 胆 Fresh bile	100	0.0495	0.0495	88.3	0	0
4℃ 10d	100	0.0490	0.0490	88.1	1.0	0.2
4℃ 20d	100	0.0460	0.0460	87.9	7.1	0.5
4℃ 30d	100	0.0461	0.0461	87.9	6.8	0.5
4℃ 40d	100	0.0459	0.0459	87.8	7.3	0.6

2.3 胆绿素 IXa 之提取方法

实验表明,自鱼胆汁中分离提纯胆绿素 IXa 之产率和纯度与提取方法紧密相关。本文除了用上述的 Wakogel 法和薄层层析法直接从鱼胆汁中提取胆绿素 IXa 外,又根据胆绿素 IXa 之结构与性质,设计了沉淀-Wakogel 法,即先用乙醇、丙酮等从鱼胆汁中沉淀胆绿素,洗抽滤后用少量吡啶悬浮,溶于 CHCl₃:CH₃COOH (v / v 97:3) 中,再通过 Wakogel 法纯化。实验结果如表 2 所示。

表 2 不同纯化方法对制备胆绿素 IXa 的影响

Tab.2 Comparisons on biliverdin IXa extracts obtained with different purification methods

提纯方法 Purification methods	同批胆汁 (ml) Bile of same source	胆绿素 IXa(g) Biliverdin IXa	胆绿素 IXa / 胆汁 (%) Biliverdin IXa / Bile	纯度 (%) Purity	相当于 100%胆绿素 IXa(g) Equal to 100% biliverdin IXa
Wakogel 法	100	0.0495	0.0495	88.3	0.044
沉淀-Wakogel 法 Deposition-Wakogel	100	0.0460	0.0460	89.1	0.041
薄层层析法 Thin-Layer chromatography	100	0.0480	0.0480	87.7	0.042

实验结果表明,就产率而言,Wakogel 法>薄层层析法>沉淀-Wakogel 法,Wakogel 法之提取率最高,达 0.0495%。就纯度而言,沉淀-Wakogel 法>Wakogel 法>薄层层析法,沉淀-Wakogel 法之产物纯度最高,为 89.1%。由此可见,Wakogel 法提取胆绿素 IXa,不但产量高,而且产品质量较好。还应该指出的是,该法所需设备简单,操作方便,易于批量自动化分离提纯胆绿素 IXa,是目前较好之方法。

参 考 文 献

[1] Bonnet R, McDonagh A F. The meso-reactivity of porphyrings and related compounds part VI. Oxidative cleavage of the haem system. The four isomeric biliverdins of the IX series. *J.C.S. Perkin I*, 1973: 881—888.
[2] O'Carra P, Colleran E. Isolation and purification of biliverdin isomers. *J. Chromatogr.*, 1970, **50**: 458—468.
[3] 丁兆坤, 许友卿, 黄溢明. 胆红素制备的回顾与前瞻. *生化药物杂志*, 1989, (3): 6—9.
[4] ————. 用离心-醋酸盐酸法制备胆红素. *中山大学学报(自然科学版)*, 1990, **9**(2): 134—137.
[5] Schmid R. Bilirubin metabolism: state of the art. *Gastroenterol.*, 1978, **74**: 1307—1312.
[6] Bonnet R, et al. Structure of bilirubin. *Nature*, 1976, **262**: 326—328.