

## 血红蛋白在膜分离过程中的氧化规律和抗氧化探索

石晓东<sup>1,2</sup>, 路秀玲<sup>1</sup>, 郑春杨<sup>1</sup>, 于鹏展<sup>1</sup>, 索晓燕<sup>1</sup>, 王永权<sup>1</sup>, 苏志国<sup>1</sup>

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083)

**摘要:** 脱离了红细胞的血红蛋白(Hb)在溶液中易被氧化成高铁血红蛋白(MetHb), 失去载氧活性. 实验发现, 当对红细胞裂解液进行微滤膜分离时, 高铁血红蛋白增加不多; 但在用层析法去除超氧化物歧化酶等其他红细胞蛋白后再进行超滤膜浓缩血红蛋白时, 则出现较多的血红蛋白被氧化成高铁血红蛋白的现象, 其氧化反应随超滤过程膜表面流体切向速度的增加而加快, 随溶液温度的增加而加快. 抗氧化剂的存在能有效地降低高铁血红蛋白的生成, 谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸、亚硫酸钠、抗坏血酸(Vc)在溶液中和超滤过程中都能起到对血红蛋白载氧活性的保护作用. 其中 Vc 的效果最好, 最适加入量(摩尔比)Vc/Hb=8, pH 8. 将抗氧化的优化条件整合到从红细胞裂解液开始到超滤浓缩血红蛋白的整个流程, 在离子交换层析后, 添加 Vc 作为抗氧化剂进行超滤浓缩, Hb 活性得到了很好的保护, MetHb 的含量控制在 2.3%, 成功地制备了低 MetHb 含量的纯化血红蛋白.

**关键词:** 血红蛋白; 膜分离; 载氧活性; 高铁血红蛋白; 抗氧化剂

**中图分类号:** TQ028      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2005)06-0659-06

### 1 前言

以血红蛋白(Hb)为基础的红细胞代用品能够缓解血源紧缺及病毒污染等问题, 已成为国际研究的热点<sup>[1]</sup>. 膜分离是大量制备高纯度血红蛋白的重要步骤. 通常血红蛋白经过微滤(MF)膜去除细胞碎片和超滤(UF)膜去除小分子杂质之后, 需采用层析进一步纯化. 层析后的溶液仍需用超滤浓缩更换缓冲液, 以用于后续的血蛋白修饰<sup>[2]</sup>. 但膜分离过程往往会造成蛋白质的失活, 是一个亟待解决的问题.

血红蛋白是有 4 个亚基和 4 个卟啉环的复杂蛋白质, 在脱离红细胞后容易解聚成为 $\alpha\beta$ 二聚体, 同时卟啉环中的二价铁容易氧化成三价铁, 使血红蛋白变为无载氧活性的高铁血红蛋白(MetHb). 在膜分离过程中, 血红蛋白溶液受到泵送或搅拌, 在膜表面作切向流动, 由此形成的剪切力、局部温升<sup>[3]</sup>和溶液中氧传递速度增加及溶氧量增加、蛋白与膜表面的物理、化学相互作用<sup>[4]</sup>等均不利于其活性的保持. 对溶液以惰性气体保护来达到脱氧目的在膜分离过程中不容易实现, 膜分离过程中蛋白质失活和抗失活的研究目前还处于探索阶段, 迄今为止尚未见到有关的文献.

本工作首先研究了膜分离过程中血红蛋白的氧化规律, 然后考察了不同还原剂对血红蛋白抗氧化的作用, 所选的还原剂包括还原型谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸(Cys)、N-乙酰半胱氨酸(N-A-Cys)、亚硫酸钠和维生素

C(Vc). 对抗氧化的过程进行了优化, 探索了还原剂加入量、溶液 pH 值等的影响, 测量了血红蛋白的载氧曲线和希尔(Hill)系数以及高铁血红蛋白的含量.

### 2 材料与方法

#### 2.1 材料

##### 2.1.1 原料及试剂

新鲜牛血采自当地屠宰场, 加入适量的柠檬酸钠抗凝. 还原剂 GSH, Cys, N-A-Cys 为分析纯试剂, Sigma 公司产品; 亚硫酸钠、Vc 为国产分析纯试剂, 其余化学试剂均为分析纯. 实验用水是由美国 Millipore 公司 RiOs 超纯水系统处理得到的超纯水.

##### 2.1.2 仪器

血氧分析仪 Hemox Analyzer, 美国 TCS Scientific Corp 产品. Ultraspec 2000 型 UV/Vis 紫外可见分光光度计, 瑞典 GE Healthcare 公司产品.  $\Phi 72$  型 pH 计, 美国 Beckman 公司产品. 膜分离系统为美国 Millipore 公司产品, 包括 Labscale 错流超滤系统和 Pellicon 2 错流过滤系统. 真空冷冻干燥机为美国 Labconco 公司产品, 容量 8 L. G25 脱盐柱为瑞典 Pharmacia 公司.

##### 2.1.3 膜材料与规格

实验选用的微滤(孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ , 0.1  $\text{m}^2$ )和超滤膜(10 kD, 0.005  $\text{m}^2$ )均为美国 Millipore 公司产品, 膜材料均为聚醚砜.

收稿日期: 2004-12-03, 修回日期: 2005-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20136020)

作者简介: 石晓东(1980-), 男, 河北省内丘县人, 硕士研究生, 生物化工专业; 苏志国, 通讯联系人, Tel: 010-62561817, E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn.

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 牛 Hb 制备

牛 Hb 制备参考文献[5]的方法. 新鲜牛血在 4℃ 离心后, 分别用 2 倍体积的 1.6% 和 0.9% NaCl 洗涤红细胞, 离心得到压积红细胞, 加入 2 倍红细胞体积的 10 mmol/L 磷酸缓冲液(含 0.6% NaCl), 振荡 1 h, 接着滴加 2 倍红细胞体积的 10 mmol/L 磷酸缓冲液, 再振荡 1 h, 红细胞溶胀破裂. 将得到红细胞裂解液经 0.45 μm 微滤和 30 kD 超滤膜粗分离后再经阴离子交换层析纯化, 得到高纯度的 Hb. 再经 30 kD 膜超滤浓缩, 脱盐, 冻干, 最终得 Hb 干粉纯品.

### 2.2.2 抗氧化剂的选择

将 Hb 冻干粉溶于 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液中配制成 20 mg/mL 的 Hb 溶液, 除 pH 值条件实验外, 其他 pH 值均为 6. 其中, 混合加入 Vc 与 Cys 的样品中摩尔比 Vc/Cys/Hb=4:2:1, 其他抗氧化剂与 Hb 的摩尔比均为 4:1. 将抗氧化剂溶解在 1 mL 缓冲液中, 分别按比例加入到 20 mL Hb 溶液中, 轻微摇匀后, 即刻装入灭菌玻璃瓶中, 加橡胶塞密封后置于室温下或冰箱保存, 测定时用注射器抽取.

### 2.2.3 高铁血红蛋白含量的测定

采用 Benesch 三波长法<sup>[6]</sup>, 测定缓冲液为 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.4. 其中脱氧血红蛋白 [DeoxyHb]、氧合血红蛋白 [OxyHb] 和高铁血红蛋白 [MetHb] 的计算公式如下:

$$[\text{DeoxyHb}] = (1.3687A_{560} - 0.7451A_{576} - 0.7091A_{630}) \times 10^{-4}/4,$$

$$[\text{OxyHb}] = (-0.7292A_{560} + 1.0098A_{576} - 0.3722A_{630}) \times 10^{-4}/4,$$

$$[\text{MetHb}] = (-0.3854A_{560} + 0.1856A_{576} + 2.8609A_{630}) \times 10^{-4}/4,$$

被检样品中的 MetHb 含量(%)=

$$[\text{MetHb}] / ([\text{MetHb}] + [\text{OxyHb}] + [\text{DeoxyHb}]).$$

### 2.2.4 还原后 Hb 的载氧活性( $p_{50}$ 和 Hill 系数)测定

用血氧分析仪 Hemox<sup>TM</sup> analyzer 在 37℃ 测定样品的  $p_{50}$ (氧达到半饱和程度所需氧分压)和 Hill 系数.

## 3 结果与讨论

### 3.1 Hb 在膜分离过程与自然放置状态下的氧化情况

室温下将血红蛋白浓度为 75 mg/mL 的红细胞裂解液经 0.45 μm 微孔膜过滤, 进料速率为 1.1 L/min, 透膜压差为 0.13 MPa. 另将 15 mg/mL 的 Hb 层析液分别在自然放置和在 Lab-scale 超滤器(切割分子量为 10 kD 的超滤膜)上全回流连续过滤 4 h, 进料流速为 40 mL/min, 透膜压差为 0.13 MPa, 搅拌速率为 60 r/min, 中间检测

溶液 MetHb 含量, 结果如图 1 所示. 图中的 MF 曲线是红细胞刚刚裂解后进行微孔膜过滤去除红细胞碎片时高铁血红蛋白(MetHb)的变化趋势, 可见 MetHb 增加很少, 可能是由于此时细胞裂解液中尚有能使血红蛋白还原的物质存在, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(Cat)及 Vc、谷胱甘肽等. 在随后进行的层析中, MetHb 的含量增加. 图中另 2 条曲线起始的 MetHb 含量已经达到 7.5% 左右. 尽管如此, 若不再进行膜分离而只是在常温下自然放置, 在 4 h 内 MetHb 含量只上升 4%. 与自然放置形成对照的超滤膜分离过程中血红蛋白的氧化速率明显加快, 在 4 h 内 MetHb 上升了 20%, 相当于自然放置下的 5 倍. 说明血红蛋白越纯, 层析过程的氧化越快. 由于失去了 SOD 和 CAT 等还原系统, Hb 不再受到保护, 很快被氧化为 MetHb.

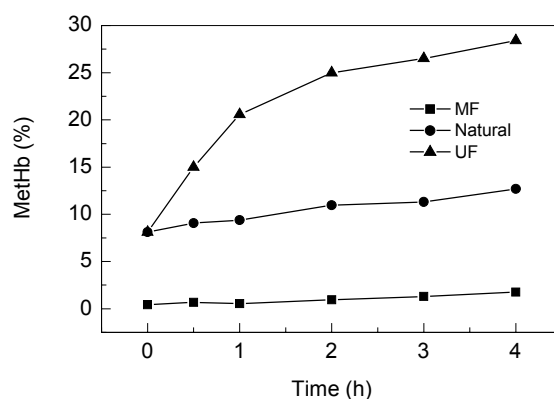


图 1 Hb 在自然放置及微滤和超滤过程中的氧化曲线  
Fig.1 Oxidation curves of Hb in static condition and in the processes of microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF)

### 3.2 超滤过程中 Hb 的氧化

血红蛋白的氧化规律文献<sup>[7-9]</sup>已有报道, 但却没有考察实际膜分离过程中 Hb 的氧化特性. 本实验考察了超滤过程中进料循环流速和温度对 Hb 氧化的影响.

#### 3.2.1 进料循环流速对 Hb 氧化的影响

使用 Pellicon 2 切向流过滤系统, 于室温下分别考察了不同进料循环流速、不同操作时间下超滤时血红蛋白溶液中 MetHb 含量的变化, 所用的起始物料都是同一批经过层析纯化后的血红蛋白溶液, 结果如图 2 所示.

超滤膜分离蛋白质的一个特点是通过不断进行料液的循环来降低膜表面蛋白质的积累, 以保持较高的过滤速度. 进料循环速率大, 则超滤速度快. 然而, 由图 2 可知, 进料循环速率越大, MetHb 的产量越多, 这是由于高流速产生高剪切力, 膜表面的剪切作用会导致蛋白发生形变, 使载氧基团暴露出来, 容易与氧接触发生自

氧化以及与自由基反应形成 MetHb<sup>[10]</sup>; 同时, 流速的增加会增加溶液中的传氧速率, 进一步加快了血红蛋白的氧化. 另外, 流体与膜表面的剪切作用可能会导致局部升温, 也会加速氧化的进行.

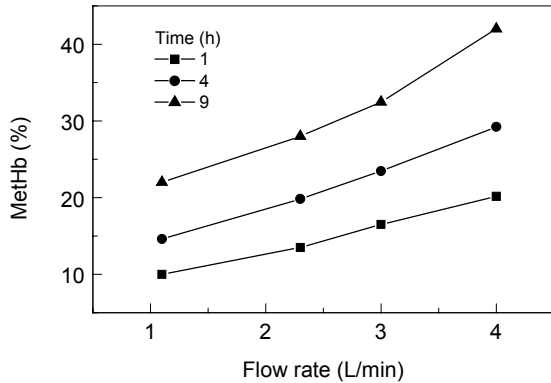


图 2 进料循环流速对 MetHb 生成的影响  
Fig.2 Effect of flow rate on the formation of MetHb

### 3.2.2 温度对超滤过程中 Hb 氧化的影响

考察了不同温度下超滤过程中 MetHb 的生成规律. 室温和低温下将 Hb 溶液在 Lab-scale 超滤器上全回流连续超滤 9 h, 进料流速为 40 mL/min, 压差为 0.13 MPa, 中间检测溶液 MetHb 含量, 结果如图 3 所示. 由图可知, 室温下超滤时 MetHb 生成速率比低温下快. 这是因为温度高有利于反应进行, 使 Hb 自氧化以及与自由基反应速率较快. 但低温下 Hb 氧化速率仍然很快, Hb 失去了还原酶系后, 剪切作用导致的局部温度升高及 Hb 容易发生形变, 使其自氧化以及与自由基反应速率增加. 因此, 单纯降低温度并不能控制氧化的发生, 有必要进行抗氧化研究.

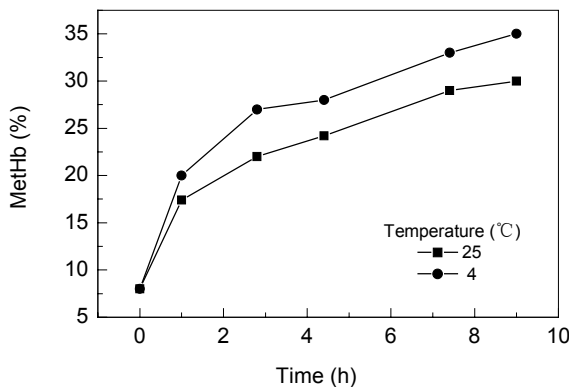


图 3 不同温度超滤过程中 Hb 的氧化曲线  
Fig.3 Oxidation curves of Hb in UF process at different temperatures

### 3.3 Hb 抗氧化剂的选择

红细胞裂解液中由于存在各种还原剂, 高铁血红蛋

白的生成量很低. 经过层析纯化后, 除去了 SOD 和 CAT 这类大分子, 血红蛋白得到了纯化, 但同时失去了应有的保护. 设想通过人为添加保护剂的办法解决 Hb 的氧化问题. 所添加的保护剂必须安全可靠, 而且容易在后续工艺中去除. 为此, 选择了一系列生物系统中小分子物质及其衍生物, 包括 GSH, Cys, N-A-Cys, Vc, 同时也考察了常用的还原剂亚硫酸钠, 它们都具有很强的还原能力. GSH, Cys, N-A-Cys 所带的巯基具有很强的还原能力, Vc 为烯醇式己糖内酯, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 位上的 H 原子极易失去而具有很强的还原能力, 亚硫酸钠分子中的元素硫可以由四价氧化为六价因而具有还原能力.

图 4 为室温下加入不同还原剂后 MetHb 含量随时间的变化曲线. 不加还原剂的 Hb 溶液存放 34 h 后 MetHb 含量升高了 23.7%; 加 GSH 的样品 MetHb 含量基本不变, 说明 GSH 作为自由基抑制剂可以抑制 MetHb 生成; Cys 及 N-A-Cys 和 Vc 可直接还原 MetHb, 加入后 MetHb 含量很快下降, Cys 和 Vc 在 8 h 内即可将 MetHb 从 47.0% 还原到 13% 以下, 当 Cys 和 N-A-Cys 的巯基逐渐被溶液中的氧或 MetHb 氧化形成二硫键后, 其还原作用随之丧失, MetHb 含量又开始上升. 由图可知, 在加入的还原剂中, Vc 的还原效果最佳, 既可还原 70% 以上的 MetHb, 又可保持 Hb 较长时间不受氧化, 这与文献中报道的 Vc 不仅可以直接还原 MetHb<sup>[11]</sup>, 还具有去除自由基的作用<sup>[9]</sup>相一致.

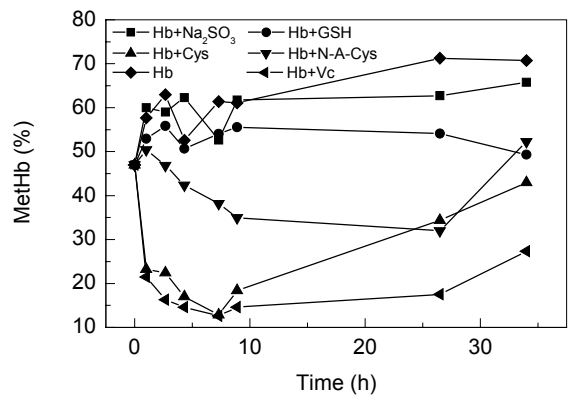


图 4 室温下加入不同还原剂 MetHb 含量随时间的变化曲线  
Fig.4 Reduction of MetHb with different reducing agents at room temperature

图 5 为 4°C 下加入不同还原剂后 MetHb 含量随时间的变化曲线. 不加还原剂的 Hb 溶液在 4°C 存放 58 h 后 MetHb 含量从 47.0% 上升到 57.2%; 加入 GSH 的 Hb 溶液 58 h 内 MetHb 含量没有明显变化; 加入 Vc, Cys 和混合加入 Cys 与 Vc 的 Hb 溶液中 MetHb 含量都很快下降, 但 Vc 长时间还原和抑制 MetHb 的作用效果最佳.

对比图4,5可知,不加还原剂的Hb溶液在室温下MetHb含量上升速率明显快于低温.GSH作为自由基抑制剂可以长时间抑制MetHb形成,低温作用效果优于室温;室温下Cys和Vc还原MetHb速率明显快于低温,但MetHb含量回升速率也快.这是由于低温下其被氧化的速率很慢,因此可在较长时间抑制MetHb含量上升.结合两图可知,长时间还原和抑制MetHb,Vc效果最佳,宜保存在低温条件下.

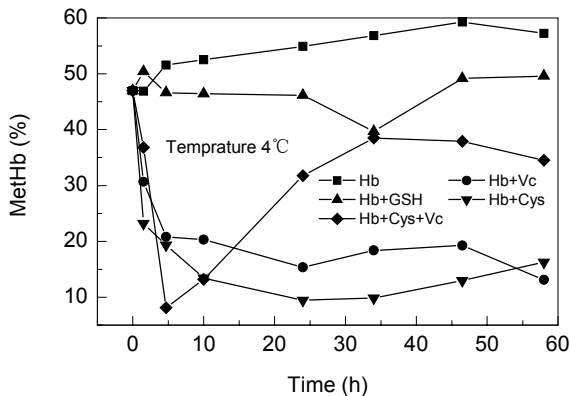


图5 加入还原剂后MetHb含量随时间的变化曲线  
Fig.5 Reduction of MetHb with different reducing agents

### 3.4 抗氧化剂的添加量

将Vc按比例加入到血红蛋白溶液中,4°C条件下放置,分别于不同时间取样,经G25脱盐柱处理后,检测MetHb含量,结果如图6所示.由图可知,Vc的加入量过小不能起到抗氧化作用,只有当Vc的加入量(摩尔比)达到Vc/Hb>8时,才能观测到明显的抗氧化效果.但如果Vc的加入量过大,虽然能起到很强的还原作用,却增加了过程的成本,而且实验发现,加入量过高时,氧化后的Vc呈现一定的颜色,干扰用比色法测定高铁血红蛋白,必须先用凝胶过滤去除氧化后的Vc才能进行MetHb的测定.因此,在选用Vc为抗氧化剂时,存

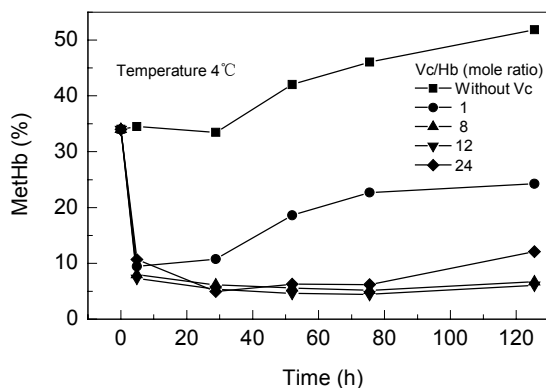


图6 不同Vc加入量下溶液中MetHb含量随时间的变化  
Fig.6 Reduction of MetHb with different Vc concentrations

在着添加量如何优化的问题.在本实验条件下,最佳的添加量为Vc/Hb=8.在此条件下,MetHb含量为40%的溶液在不到1d之内就可以降低到10%以下.

### 3.5 pH值对抗氧化作用的影响

在确定Vc为抗氧化剂及其加入量后,考察了静态条件下pH值对MetHb还原的影响,结果见图7.由图可知,在pH值6~8的范围内,血红蛋白较稳定,较高的pH能够起到较好的还原效果,可以把MetHb含量降到最低且保持较长时间.Faivre等<sup>[9]</sup>曾报道,血红蛋白在氢离子存在下容易发生自氧化反应,生成高铁血红蛋白.此外,Vc在偏碱条件下还原电势较高,也具有较好的还原能力.因此,使用Vc作为血红蛋白抗氧化剂的最佳的pH应在8附近.

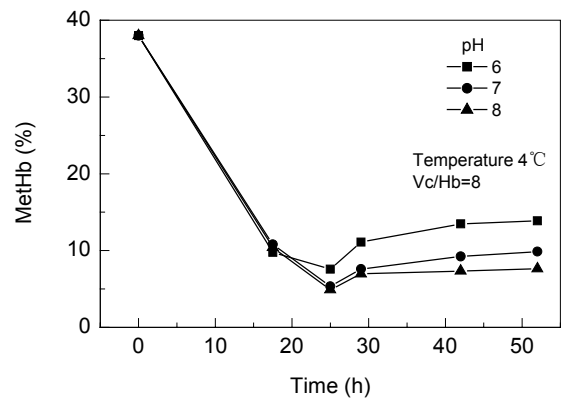


图7 不同pH值下Vc还原MetHb随时间的变化  
Fig.7 Reduction of MetHb with Vc at different pH

### 3.6 膜分离过程抗氧化作用效果

超滤膜分离是Hb纯化的重要环节之一.经过层析纯化后,溶液需要进行浓缩,以便进行血红蛋白修饰,制备血液代用品.膜分离不可避免产生剪切力,长时间的机械搅拌和溶液扰动容易造成溶液中传氧速度加快.尽管血红蛋白的氧化反应消除了一部分氧,但气泡中的氧不断溶进溶液中,使氧化反应持续不断,MetHb含量不断增加.静态模拟条件下获得的抗氧化规律能否适用于膜分离,必须用实验来验证.为此,考察了层析纯化后血红蛋白超滤过程中载氧活性保护的实际情况.实验分别将15 mg/mL的Hb溶液及加入GSH和Vc的Hb溶液在Labscale超滤器(切割分子量为10 kD的超滤膜)上全回流连续过滤,进料流速为40 mL/min,透膜压差为0.13 MPa,搅拌速率为60 r/min,中间检测溶液MetHb含量,结果如图8所示.由图可知,未加入还原剂的Hb溶液超滤9 h后,MetHb由28%上升到54.2%,而加入GSH的Hb溶液超滤9 h内MetHb含量基本不上升,与静止加GSH效果相差不大,加入Vc的Hb溶液超滤2 h

后 MetHb 含量从 28.0%还原到 12.5%，但 4 h 后又开始回升，到 7 h 时达 27.5%，接近起始值。可知加入 GSH 可以较长时间抑制 MetHb 生成，保护 Hb 生物活性的效果比较理想，但对已经生成的 MetHb 没有作用。4 h 内 Vc 还原效果更好，时间增长 Vc 逐渐被氧化，但是 7 h 后才升高到起始水平，可知 Vc 可以用于超滤过程中 MetHb 的还原和保护 Hb 活性。

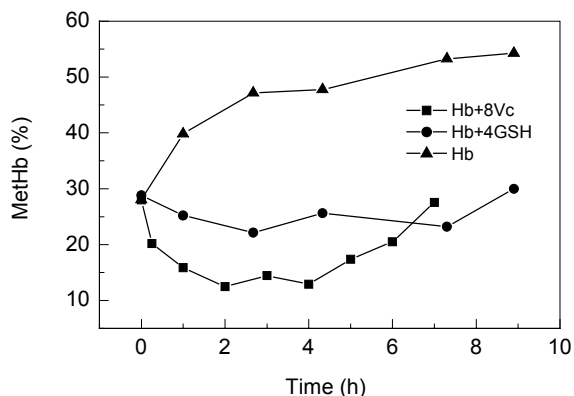


图 8 加入还原剂超滤 MetHb 含量随时间的变化曲线  
Fig.8 Reduction of MetHb with reducing agents in UF

将上述优化条件整合到从红细胞裂解液开始到超滤浓缩血红蛋白的整个流程，所有实验在 4℃下进行。表 1 给出了实际制备过程中 Hb 的活性，包括三步膜分离过程，前两步(微滤、超滤)由于溶液中未去除各种还原蛋白，高铁血红蛋白生成量很低；经过离子交换层析后，添加 Vc(Vc/Hb=8)作为抗氧化剂进行超滤浓缩，Hb 活性得到了很好的保护，MetHb 的含量控制在 2.3%，成功地制备了低 MetHb 含量的纯化血红蛋白。本实验不仅可以作为 Hb 纯化单元载氧活性保护的方法，还对基于 Hb 的红细胞代用品制备和保存过程中载氧活性的保护具有一定借鉴意义。

表 1 4℃下从红细胞裂解液中分离纯化血红蛋白过程中 Hb 的活性和 MetHb 含量

Table 1 Bioactivity of hemoglobin in different preparation processes at 4℃

Operation units	$p_{50}$ (Pa)	Hill coefficient	MetHb (%)
Hypotonic release of Hb	$3.48 \times 10^3$	2.59	0.43
Microfiltration (MF)	$3.37 \times 10^3$	2.56	0.67
Ultrafiltration (UF)	$3.30 \times 10^3$	2.49	1.37
Ionexchange chromatography	$3.28 \times 10^3$	2.46	2.1
Concentration with UF <sup>1)</sup>	$3.27 \times 10^3$	2.42	2.3

Note: 1) Vc/Hb=8.

## 4 结论

由红细胞裂解得到的血红蛋白(Hb)很容易氧化成

高铁血红蛋白(MetHb)，失去载氧活性。在红细胞裂解液未纯化前，由于超氧化物歧化酶(SOD)等还原蛋白的存在，MetHb 的生成量不高。层析去除 SOD 等非血红蛋白后，纯化的 Hb 很容易氧化成为 MetHb，此时进行膜分离会加速氧化过程。采用人工加入抗氧化剂的方法能够有效地防止 MetHb 的大量生成。谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸、亚硫酸钠、抗坏血酸(Vc)在溶液中和超滤过程中都能保护血红蛋白载氧活性，其中 Vc 的效果最好，最适加入量 Vc/Hb(摩尔比)为 8，pH 8。将抗氧化的优化条件整合到从红细胞裂解液开始到超滤浓缩血红蛋白的整个流程，在离子交换层析后，添加 Vc 作为抗氧化剂进行超滤浓缩，Hb 活性得到了很好的保护，MetHb 的含量控制在 2.3%，成功地制备了低 MetHb 含量的纯化血红蛋白。

### 参考文献:

- [1] 刘谦, 苏志国, 林锦湖. 人血代用品 [A]. 马大龙. 生物技术药物 [C]. 北京: 科学出版社, 2001. 44-64.
- [2] Shorr R G L, Nho K, Cho M P, et al. Process for Hemoglobin Extraction and Purification [P]. US Pat.: 5264555, 1993-11-23.
- [3] 温涛, 刘玉振. 超滤技术在人血白蛋白浓缩中的应用 [J]. 膜科学与技术, 2000, 20(3): 57-58.
- [4] 卞晓锴, 陆晓峰, 施柳青. 蛋白质超滤过程及超滤膜的表面改性研究现状 [J]. 膜科学与技术, 2001, 21(4): 46-51.
- [5] Lu X L, Zhao D X, Su Z G. Purification of Hemoglobin by Ion Exchange Chromatography in Flow-through Mode with PEG as an Escort [J]. Artif. Cells, Blood Substitute Immobilization Biotechnol., 2004, 32(2): 209-227.
- [6] Benesch R E, Benesch R, Yung S. Equations for the Spectrophotometric Analysis of Hemoglobin Mixtures [J]. Anal. Biochem., 1973, 55: 245-248.
- [7] Mal A, Chatterjee I B. Mechanism of Autoxidation of Oxyhaemoglobin [J]. J. Biosci., 1991, 16: 55-70.
- [8] Shikama K. A Controversy on the Mechanism of Autoxidation of Oxyhaemoglobin and Oxyhaemoglobin: Oxidation, Dissociation, or Displacement? [J]. Biochem. J., 1984, 223: 279-280.
- [9] Faivre B, Menu P, Labrude P, et al. Hemoglobin Autoxidation/Oxidation Mechanisms and Methemoglobin Prevention or Reduction Processes in the Bloodstream [J]. Artif. Cells, Blood Substitute Immobilization Biotechnol., 1998, 26: 17-26.
- [10] Zhang L, Levy A, Rifkind J M. Autoxidation of Hemoglobin Enhanced by Dissociation into Dimers [J]. J. Biol. Chem., 1991, 266: 24696-24701.
- [11] Hong S Y, Hwang K Y, Lee E Y, et al. Effect of Vitamin C on Plasma Total Antioxidant Status in Patients with Paraquat Intoxication [J]. Toxicol. Lett., 2002, 126: 51-59.

## Oxidation and Antioxidation of Hemoglobin in the Process of Membrane Separation

SHI Xiao-dong<sup>1,2</sup>, LU Xiu-ling<sup>1</sup>, ZHENG Chun-yang<sup>1</sup>, YU Peng-zhan<sup>1</sup>, SUO Xiao-yan<sup>1</sup>, WANG Yong-quan<sup>1</sup>, SU Zhi-guo<sup>1</sup>

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. College Civil & Environ. Eng., University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The effect of different antioxidation agents on the reduction of methemoglobin (MetHb) was investigated. Five antioxidation agents, i.e. vitamin C (Vc), reduced glutathione (GSH), cysteine, *n*-acetyl-cysteine and sodium sulfite were used and compared according to different changes of MetHb content. The experimental results showed that all the antioxidation agents could protect the bioactivity of Hb from oxidation, while Vc had strong ability to reduce MetHb. The optimal conditions [Vc/Hb=8 (mole ratio), pH=8] obtained were applied to the membrane filtration process following the ion-exchange chromatography step. Bioactivity of the hemoglobin was well maintained when Vc was added as antioxidation agent, and the content of MetHb was successfully controlled to 2.3% in the final purified hemoglobin product.

**Key words:** hemoglobin; membrane separation; bioactivity; methemoglobin; antioxidation agent