

亚硝基血红蛋白合成影响因素的探讨

李翔, 夏杨毅, 侯大军, 尚永彪*

(西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

摘要: 本实验以鸭血和 NaNO_2 为主要原料, 研究了亚硝基血红蛋白的合成工艺, 探讨了几个因素对色素合成的影响, 并选择主要影响因素对其进行优化, 得到了 NaNO_2 添加量、抗坏血酸添加量和 pH 值的最佳值为 0.53ml、275.85mg、4.51, 其对应的响应值吸光度为 0.91。

关键词: 亚硝酸钠; 血红蛋白; 亚硝基血红蛋白; 合成

Discussion on Factors Affecting Synthesis of Nitrosohaemoglobin

LI Xiang, XIA Yang-yi, HOU Da-jun, SHANG Yong-biao*

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Difficult control of reaction parameters and no accurate detection method for products are two main problems in the synthesis of the nitrosohaemoglobin (HbNO). In the present study, using duck blood and NaNO_2 as main material, the synthesis technology of HbNO was studied, the effects of some factors on the synthesis were investigated, and the main factors were optimized. The results showed that the optimum NaNO_2 content, ascorbic acid addition and pH value are 0.53 ml, 275.85 mg and 4.51, respectively, and the corresponding response value, namely the absorbance at 540 nm of wavelength is 0.91.

Key words: NaNO_2 ; hemoglobin; HbNO; synthesis

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0036-06

随着人们对亚硝酸盐的残留对人体的毒害逐渐形成共识, 亚硝酸盐作为肉类发色剂的替代品成为研究人员研究的热点, 其中, 以亚硝基血红蛋白(HbNO)最受人们关注。血红蛋白的亚基结构与肌红蛋白极为相似, 并且也可以与 NO^- 结合生成具有亚硝酸盐腌肉色泽亚硝基血红蛋白。肌红蛋白对 NO^- 的吸引力大于血红蛋白, 采用以血红蛋白合成的 HbNO 添加到肌肉中作为发色剂, 肌肉中的 Mb 会立刻与 HbNO 中的 NO^- 结合形成稳定的 MbNO, 呈现鲜艳的粉红色; 而某些游离的 NO^- 会和失去 NO^- 的 Hb 结合, 生成 HbNO 作为着色剂存在于肌肉中, 降低了肉制品中的 NO^- 含量, 且血红蛋白也增加了肉制品中蛋白质和铁含量^[1-2]。由此可见, 以 HbNO 作为发色剂代替亚硝酸盐发色, 不仅发色效果同亚硝酸盐相同, 而且大大降低了 NO^- 的残留。

然而, 由于该反应本身较为复杂, 反应物与产物较难分离以及反应物本身稳定性不好, 种种原因造成了该研究存在的诸多难题: 反应参数难以控制, 反应产物没有准确的检测及鉴定方法, 反应产物难以提纯等。本实验通过对以往反应产物检测方法加以改进, 并以此方法探讨各种因素对反应的影响, 以期对以后进一步的研

究起到参考作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸭血 北碚区天生桥菜市场。

氯化钠、柠檬酸钠、氢氧化钠、丙酮、抗坏血酸、柠檬酸均为分析纯; 亚硝酸钠为市售食品级添加剂; 聚乙二醇辛基苯基醚(OP, 化学纯) 上海化学试剂一厂; 牛血红蛋白标准品 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

FA2004A 电子天平 上海精天电子仪器厂; 高速离心机 上海安亭科学仪器厂; 7221 可见光分光光度计 上海精密科学仪器厂; sysmex KX-21 血细胞分析仪 上海呈天科技有限公司; UV 紫外扫描分光光度计 北京瑞利公司; FD-5 真空冷冻干燥机 上海离心机械研究所。

1.3 方法

1.3.1 血红蛋白的制备

1.3.1.1 新鲜鸭血的采集

柠檬酸钠饱和溶液, 置于棕色瓶中, 按 0.8g 柠檬

收稿日期: 2008-06-30

作者简介: 李翔(1982-), 男, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: moonfinder1982@sina.com

* 通讯作者: 尚永彪(1964-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: shangyb@sohu.com

酸三钠抗凝 100ml 全血计算, 接取新杀鸭血, 采血过程中, 不断摇晃棕色瓶, 使血液与抗凝剂充分混合。

1.3.1.2 红细胞的分离

抗凝血尽快以 $3000 \times g$ 离心 15min, 收集下面的红细胞, 加入等体积的生理盐水(0.95% NaCl), 轻轻混匀, $3000 \times g$ 离心 15min, 收集下面的红细胞, 如此反复洗涤两到三次, 至离心上清液清澈无淡黄色, 收集红细胞。

1.3.1.3 红细胞的破碎及血红蛋白的分离

加入 2 倍红细胞的蒸馏水, 磁力搅拌器中搅拌 60min。当溶液由暗红转为鲜红时, 将溶液以 $3000 \times g$ 离心 15min, 弃去沉淀, 得血红蛋白粗提液。

1.3.1.4 血红蛋白的提纯

将粗提的血红蛋白溶液加入适量抗氧化剂抗坏血酸, 真空抽气, 并通入氮气保护, 60°C 水浴加热 30min, 使杂蛋白沉淀, $3000 \times g$ 离心 15min 取上清液。

1.3.2 亚硝基血红蛋白的合成工艺

以提取的血红蛋白溶液为原料, 吸取 20ml 于三角瓶中, 加入亚硝酸钠、抗坏血酸, 以柠檬酸和氢氧化钠调节反应液 pH 值到需要的值, 在一定温度下反应一段时间, 过滤得亚硝基血红蛋白溶液。

1.3.3 试验设计

1.3.3.1 影响亚硝基血红蛋白合成的影响因素

分别讨论几个因素对亚硝基血红蛋白合成的影响, 血红蛋白的浓度设 10、20、30、40、50、60、70、80、90g/L 共 9 个水平; 亚硝酸钠溶液(0.3mol/L)添加量分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7ml 共 7 个水平; 抗坏血酸添加量 50、100、150、200、250、300、350mg 共 7 个水平; pH 值选 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 $^{\circ}\text{C}$ 共 12 个水平; 反应温度设 40、50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$ 共 6 个水平; 反应时间设 20、25、30、35、40、45、50、55、60min 共 9 个水平。

1.3.3.2 亚硝基血红蛋白合成的最佳条件

根据以上单因素试验确定的最佳条件, 进行中心组合试验, 选择因素时主要选择单因素试验中对响应值(A_{540})有显著影响的因素。采用 Design.Expert7.1.2 对试验数据进行回归分析。

1.3.4 检测方法

1.3.4.1 血红蛋白浓度检测方法

氰化高铁法(HiCN)是目前国际上公认的血红蛋白定量测定的标准化参考方法, 但其试剂中含有剧毒物质氰化钾, 且对不同种类血液的血红蛋白反应时间明显不同, 给实验操作带来很大的不便。1984 年 Zan-der 等^[13]报道了

碱性羟基高铁血红素法(ALKALINE HAEMATIND-575, AHD-575)。其原理是将血红蛋白及其衍生物, 在碱性环境下与试剂中的非离子型表面活性剂发生反应, 迅速形成稳定的碱性高铁非离子型表面活性剂复合物, 该复合物在波长 575nm 处有一吸收峰。本法的试剂稳定。无毒, 对各种血红蛋白及其衍生物的转化能力一致。本实验依据该方法建立一套血红蛋白的测定方法。

AHD-575 试剂的配制: 称取聚乙二醇辛基苯基醚 25g, 加 0.1mol/L 的 NaOH 溶液至 1L, 过滤, 室温保存。操作方法: 于洁净的烧杯中, 吸取上述自提血红蛋白样液 0.2ml, 加入 30ml AHD-575 试剂中。静置反应 1~3min, 于 575nm 波长下, 以 AHD-575 试剂为空白, 测定吸光度 A_{575} , 查标准曲线求得血红蛋白浓度。

标准曲线的制定: 将牛血红蛋白标准品稀释成 7 个不同浓度。以 AHD-575 的方法分别测定吸光度 A_{575} 作为纵坐标, 以牛血红蛋白标准品的浓度(g/L)作为横坐标, 用最小二乘法进行线性回归, 作血红蛋白溶液浓度(X)与吸光度(Y)的关系曲线(图 1)。

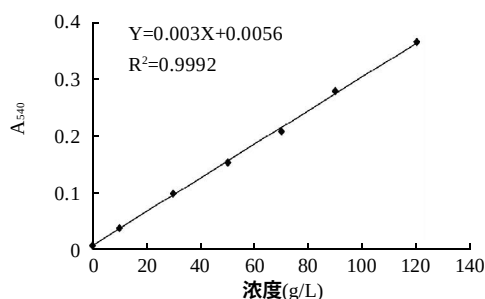


图1 血红蛋白标准曲线

Fig.1 Standard curve for determining concentration of hemoglobin

1.3.4.2 血红蛋白的纯度检测

微量凯氏定氮法测定总蛋白质含量^[4]。

$$\text{血红蛋白纯度}(\%) = \frac{\text{血红蛋白含量(以含氮量计)}}{\text{总蛋白质含量(以含氮量计)}} \times 100$$

1.3.5 亚硝基血红蛋白含量的测定

丙酮法: 反应后的色素溶液过滤, 将滤液冷冻干燥后转移至具塞试管中, 用体积分数 80% 的丙酮溶液溶解, 室温下避光静置一定时间, 至将亚硝基血色原完全提取。取滤液, 以 80% 丙酮为空白, 测定其在波长 540nm 下的吸光度。

直接法: 反应后的色素溶液过滤, 用蒸馏水稀释后测定其在波长 540nm 下的吸光度。

丙酮提取亚硝基血色原时间的确定: 取一个反应后的色素溶液样品, 分成 10 份, 均按丙酮法的方法进行操作, 每 10min 测定一个样, 记录读数。

1.3.6 紫外及可见分光光度计测定色素的吸收曲线

将制得的色素溶液按 1.3.5 的丙酮法操作后,以 80% 丙酮为空白,用紫外及可见分光光度计在波长 450~650nm 制作吸收曲线。

2 结果与分析

2.1 血红蛋白的纯化

表 1 血红蛋白纯化前后的纯度

Table 1 Purities of hemoglobin before and after purification

状态	Hb 浓度(g/L)	总蛋白质含量(g/L)	纯度(%)
纯化前	65.15	76.32	85.36
纯化后	60.32	62.44	96.60

由表 1 可看出,加热纯化后虽然有少量 Hb 的损失,纯度却有很大的提升。由于溶液中存在的杂蛋白在加热反应时会发生褐变,影响色素的颜色,因此纯化处理是必不可少的。

2.2 亚硝基血红蛋白含量的测定

2.2.1 丙酮提取亚硝基血红素时间的确定

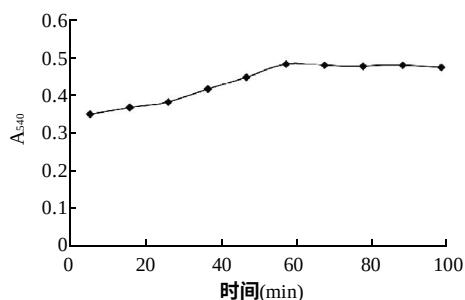


图 2 不同时间下丙酮提取液的吸光度

Fig.2 Absorbance of acetone extract of HbNO at different extraction time

由图 2 可以看出,丙酮对亚硝基血红蛋白中血红素的提取随时间增加吸光度增大,60min 时提取率达到最大,60min 后开始趋于平缓且有下降趋势,可能是由于血红素失去了蛋白质的保护,变得不稳定而部分分解。因此丙酮提取时间选择 60min 为宜。

2.2.2 亚硝基血红蛋白含量测定方法的选择

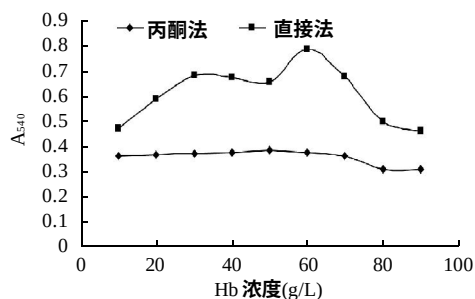


图 3 不同底物浓度下合成的亚硝基血红蛋白含量测定

Fig.3 Contents of synthesized HbNO at different Hb concentrations determined by direct method and acetone method

以丙酮法测定浓度为 10、20、30、40、50、60、70、80、90 g/L 的血红蛋白样品反应后溶液的吸光度,以直接测定反应液吸光度的值为对照, A_{540} 为按反应前亚硝基血红蛋白的浓度,将各样品稀释到相同倍数后的吸光度结果见图 3。

由图 3 可以看出,丙酮法测定的结果规律性要远大于直接测定水溶液的方法,其原因是由于该反应过程较为复杂,中间产物生成繁多,540nm 的波长又是可见光范围,反应中产生的其他有色物质影响了测定结果;而丙酮法将产物中的亚硝基血红素用丙酮提取出来,以检测亚硝基血红素的含量来指示亚硝基血红蛋白的量,排除了大部分影响测定结果的杂质干扰,呈现出较为规律的趋势。因此,本实验采用丙酮法作为检测亚硝基血红蛋白含量的方法。

2.3 亚硝基血红蛋白合成的影响因素

2.3.1 血红蛋白浓度的影响

血红蛋白浓度的确定对其他参数的确定及量化有着重要的影响,选择一个适合反应进行的浓度对工业化生产亚硝基血红蛋白色素有着重要的意义。 A_{540} 为按反应前亚硝基血红蛋白的浓度,将各样品稀释到相同倍数后的吸光度。

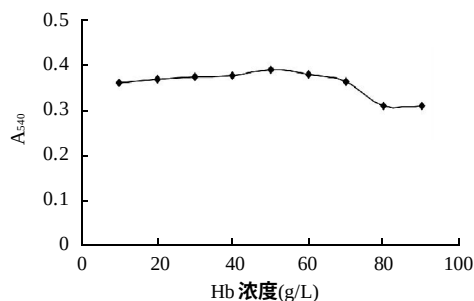


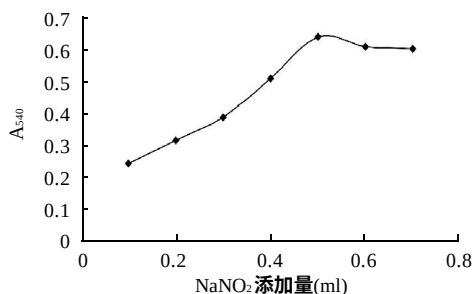
图 4 血红蛋白浓度对亚硝基血红蛋白合成的影响

Fig.4 Effects of Hb concentration on synthesis of HbNO

由图 4 可以看出,血红蛋白的浓度在 70g/L 前对亚硝基血红蛋白的合成基本上影响不大,在 50g/L 以后开始出现下降现象。这可能是由于随着浓度增大加热反应后沉淀开始大量增多,过多的沉淀在过滤时对色素的吸附量增大,造成了色素的损失。因此选择 50g/L 的血红蛋白浓度较为适宜。

2.3.2 NaNO_2 添加量的影响

NaNO_2 添加量在该反应中至关重要,添加过多的 NaNO_2 不但会引起 NaNO_2 残留过多,失去了本实验的意义,过多的 NaNO_2 还可以引起血红素中铁离子的氧化。此外,亚硝酸根的大量存在还可以使血红素物质中的叶琳环的 α - 甲炔键硝基化,生成绿色的衍生物,影响产品的色泽。

图5 NaNO₂添加量对亚硝基血红蛋白合成的影响Fig.5 Effects of NaNO₂ amount on synthesis of HbNO

由图5可见,吸光度随着NaNO₂添加量的增加而增大,在0.5ml时达到最大值,由此确定NaNO₂溶液(0.3mol/L)在0.5ml时最为适宜。

2.3.3 抗坏血酸添加量的影响

抗坏血酸添加量与NaNO₂含量密切相关,在反应中,NaNO₂与血红蛋白之间的反应是在还原条件下进行的,若抗坏血酸不足,则会产生高铁状态的血蛋白衍生物;若抗坏血酸过量,NaNO₂被过度还原成低价态的N₂O或N₂,从而反应无法进行。确定0.3mol/L NaNO₂溶液添加量为0.5ml,抗坏血酸添加量的影响见图6。

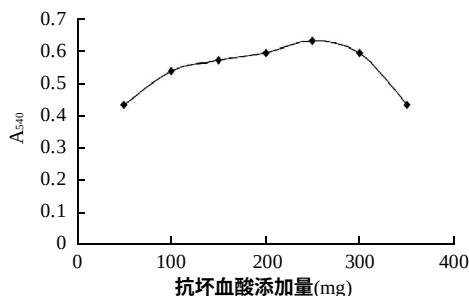


图6 抗坏血酸添加量对亚硝基血红蛋白合成的影响

Fig.6 Effects of of ascorbic acid amount on synthesis of HbNO

从图6可以看出,抗坏血酸添加量在250mg时吸光度最高,此时丙酮提取液呈鲜艳的玫瑰红色。

2.3.4 pH值的影响

加入亚硝酸钠及抗坏血酸后,以NaOH和柠檬酸调节反应液的pH值,观察在不同pH值环境下吸光度的变化。

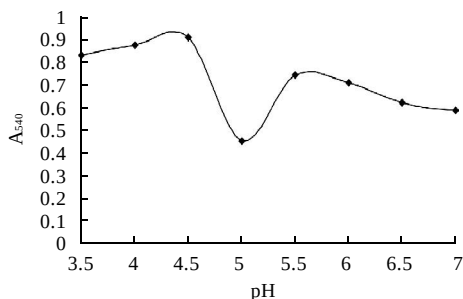


图7 pH值对亚硝基血红蛋白合成的影响

Fig.7 Effects of pH value on synthesis of HbNO

由图7可以看出,在pH4.5时吸光度最大,说明pH4.5有利于反应的进行。酸性条件下有利于NaNO₂中NO⁻的释放,有利于亚硝基血红蛋白合成。吸光度在pH5时急剧下降,达到最低值,这可能是由于pH5接近鸭血红蛋白的等电点,引起血红蛋白沉淀。在pH5以后,吸光度陡然上升之后又逐渐下降,这是由于一方面高pH值的条件下不利于反应的进行,另一方面在调节pH值时加入的NaOH与抗坏血酸形成盐造成了蛋白质的沉淀,导致色素的损失。

2.3.5 温度的影响

调节反应液pH值为4.5,反应时间为30min,考察温度对亚硝基血红蛋白合成的影响,结果见图8。

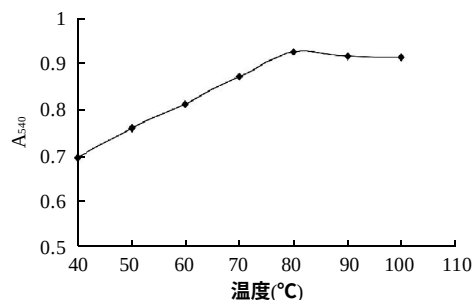


图8 温度对亚硝基血红蛋白合成的影响

Fig.8 Effects of temperature on synthesis of HbNO

由图8可见,温度对亚硝基血红蛋白的合成也有较大的影响,随着温度的升高,吸光度逐渐增大,80°C后趋于平缓并有下降趋势,这可能是由于高温下加热时间过长,部分血红蛋白变性沉淀。反应温度与反应时间是相关的,反应温度越低,反应时间就越长;反之,就越短。本实验反应时间为30min的条件下,产物在80°C时达到最大。

2.3.6 反应时间的影响

反应温度确定为80°C的条件下,选择最佳反应时间,结果见图9。

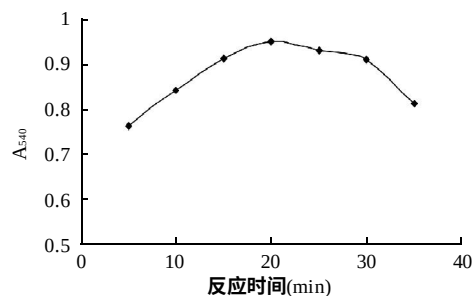


图9 反应时间对亚硝基血红蛋白合成的影响

Fig.9 Effects of reaction time on synthesis of HbNO

由图9可知,在80°C时加热20min效果最好,20min

前反应不完全,继续加热则有蛋白质开始沉淀。

2.4 响应面法分析亚硝基血红蛋白合成的最佳条件

2.4.1 响应面分析方案

选择各影响因素中起主要作用的三个因素:亚硝酸盐添加量,抗坏血酸添加量和 pH 值,按照 Box-Behnken 中心组合设计原理设计,每一自变量的低、中、高试验水平分别以 1、0、-1 进行编码,如表 2 所示。

表 2 响应面因素水平及编码
Table 2 Factors and levels of response surface test

水平	亚硝酸钠(ml)	抗坏血酸(mg)	pH
-1	0.4	200	4.3
0	0.5	250	4.5
1	0.6	300	4.7

2.4.2 响应面分析结果

表 3 Box-Behnken 设计方案及结果
Table 3 Box-Behnken design and results

水平	试验设计			实施方案			
	X ₁	X ₂	X ₃	亚硝酸钠	抗坏血酸	pH	A ₅₄₀
1	-1	-1	0	0.4	200	4.5	0.489
2	1	-1	0	0.6	200	4.5	0.548
3	-1	1	0	0.4	300	4.5	0.682
4	1	1	0	0.6	300	4.5	0.859
5	-1	0	-1	0.4	250	4.3	0.464
6	1	0	-1	0.6	250	4.3	0.585
7	-1	0	1	0.4	250	4.7	0.582
8	1	0	1	0.6	250	4.7	0.618
9	0	-1	-1	0.5	200	4.3	0.393
10	0	1	-1	0.5	300	4.3	0.624
11	0	-1	1	0.5	200	4.7	0.461
12	0	1	1	0.5	300	4.7	0.672
13	0	0	0	0.5	250	4.5	0.865
14	0	0	0	0.5	250	4.5	0.852
15	0	0	0	0.5	250	4.5	0.875
16	0	0	0	0.5	250	4.5	0.876
17	0	0	0	0.5	250	4.5	0.863

表 4 方差分析表
Table 4 Analysis of variance table

因素	自由度	标准差	平方和	均方	F 值	p 值
交互作用	9	4.150124	0.46	0.051	197.33	< 0.0001
X ₁	1	2.007570	0.019	0.019	75.06	< 0.0001
X ₂	1	0.004015	0.11	0.11	434.90	< 0.0001
X ₃	1	1.781536	8.911 × 10 ⁻³	8.911 × 10 ⁻³	34.64	0.0006
X ₁ X ₂	1	0.001604	3.481 × 10 ⁻³	3.481 × 10 ⁻³	13.53	0.0079
X ₁ X ₃	1	0.400953	1.806 × 10 ⁻³	1.806 × 10 ⁻³	7.02	0.0329
X ₂ X ₃	1	0.000802	1.000 × 10 ⁻⁴	1.000 × 10 ⁻⁴	0.39	0.5527
X ₁ ²	1	0.781601	0.041	0.041	158.74	< 0.0001
X ₂ ²	1	3.126 × 10 ⁻¹⁰	0.064	0.064	248.56	< 0.0001
X ₃ ²	1	0.195400	0.18	0.18	691.11	< 0.0001

相关系数 0.9980

决定系数 0.9961

利用 Design Expert 7.1.2, 通过表 3 中响应值实验数据进行多元回归拟合, 获得响应值对编码自变量二次多项回归方程:

$$Y = 0.87 + 0.049X_1 + 0.12X_2 + 0.033X_3 + 0.029X_1X_2 - 0.021X_1X_3 - 0.098X_1^2 - 0.12X_2^2 - 0.21X_3^2$$

表 4 回归方差分析表明, 总回归方程达到了极显著水平(p<0.0001), 失拟项不显著(p=0.0801), 且回归模型的相关系数为 0.9980, 决定系数为 0.9961, 说明该模型与实际实验拟合较好。

回归方程各项的方差分析结果还表明方程的一次项、二次项的影响都是极显著的, 且方程交互项 X₁X₂ 和 X₁X₃ 都达到显著水平, 由此可见, 各试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。由回归方程所作的响应曲面及其等高线图如图 10~12 所示。

从图 10~12 可以看出, 各因素及其交互作用对响应值的影响。由相应面分析立体图和响应面的等高线可以看出, NaNO₂ 添加量(X₁)、抗坏血酸添加量(X₂)和 pH 值(X₃)对吸光度的影响均比较显著, 且各因素间仍存在着一定的交互作用。根据响应值典型分析求得了 NaNO₂ 添加量(X₁)、抗坏血酸添加量(X₂)和 pH 值(X₃)的最佳组合分别为 0.53ml、275.85mg、4.51, 其对应的响应值吸光度为 0.91。

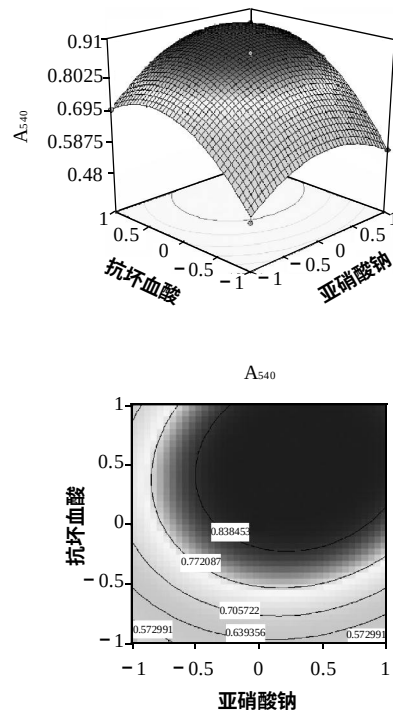


图 10 NaNO₂ 添加量与抗坏血酸添加量对吸光度影响的响应面及等高线图

Fig.10 Response surface plot and contour plot for effects of NaNO₂ amount and ascorbic acid amount on synthesis of HbNO

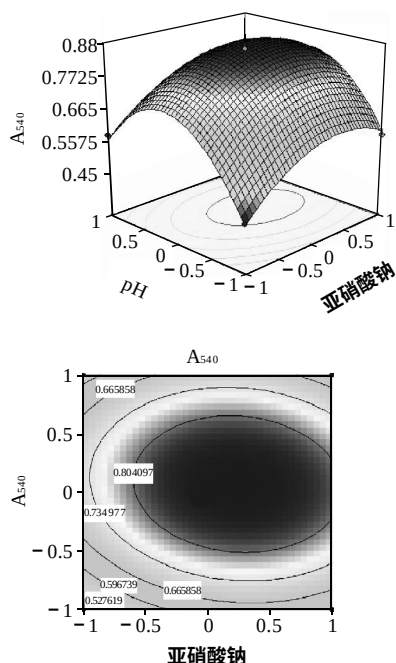


图 11 NaNO_2 添加量与 pH 值对吸光度影响的响应面及等高线图
Fig.11 Response surface plot and contour plot for effects of NaNO_2 amount and pH value on synthesis of HbNO

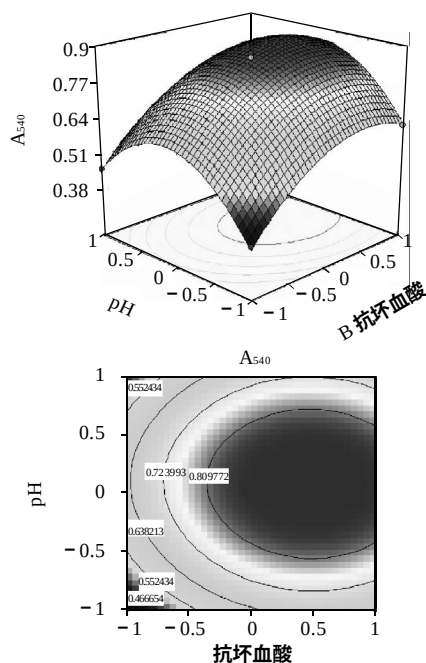


图 12 抗坏血酸添加量与 pH 值对吸光度影响的响应面及等高线图
Fig.12 Response surface plot and contour plot for effects of ascorbic acid amount and pH value on synthesis of HbNO

2.5 合成产物的鉴定

将反应产物的丙酮提取液在波长 450~650nm 做吸收曲线, 吸收光谱在 478、541、573.5nm 处有较强的吸收峰, 与 Shahidi^[5]、张坤生等^[6-7]的文献报道基本一致。

3 结 论

3.1 选择性加热提纯血红蛋白的方法能够有效的将粗提血红蛋白溶液纯化。

3.2 亚硝基血红蛋白的合成受血红蛋白浓度影响不大, 但是过高的浓度会造成色素的损失; pH 值酸性条件下适合产物的合成, 且受 pH 值变化影响较大; 亚硝酸盐添加量和抗坏血酸添加量对产物合成的影响较为显著, 都是随着添加量增加产物合成量先增大后降低, 且二者之间关系较为密切; 温度和时间也是互为影响的两个因素, 温度高则需要反应时间短, 反之则反应时间长, 本实验认为 80℃ 时加热 20min 较适宜。

3.3 利用响应面分析法确定了影响吸光度的三个主要因素: NaNO_2 添加量、抗坏血酸添加量和 pH 值的最佳水平组合, 按照 Box-Behnken 中心组合设计原理进行设计, 得到三个因素对吸光度影响的回归方程为: $Y = 1.07 + 0.049x_1 + 0.12x_2 + 0.033x_3 + 0.029x_1x_2 - 0.021x_1x_3 - 0.098x_1^2 - 0.12x_2^2 - 0.21x_3^2$, 并根据响应面值典型分析求得了 NaNO_2 添加量、抗坏血酸添加量和 pH 值的最佳值为 0.53ml、275.85mg、4.51, 其对应响应值的吸光度(A_{540})为 0.91。

参考文献:

- [1] 马美湖. 亚硝基血红蛋白的合成制取及其应用于香肠中降低 NO⁻残留量的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(8): 67-70.
- [2] 黄群, 马美湖, 于美娟, 等. 亚硝基血红蛋白研究进展[J]. 肉类工业, 2004(11): 27-30.
- [3] ZANDER R, LANG W, WOLF H U. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method[J]. Clin Chim Acta, 1984, 136: 83-93.
- [4] 胡明方. 食品分析[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 1992.
- [5] SHAHIDI F, RUBIN L. Preparation of the cooked cured meat pigment, dinitrosyl ferrohaemochrome from hemin and nitric oxide[J]. Journal of Food Science, 1985, 50: 272-273.
- [6] 张坤生. 亚硝基血红蛋白色素的合成及其性质研究[D]. 天津: 天津轻工业学院, 2000.
- [7] 张坤生. 亚硝酸盐与血红蛋白合成亚硝基亚铁血色原的研究[J]. 商业科技开发, 1995(3): 34-35.