

从猪血中提取血红素的研究

李盛华, 王成忠, 于功明

(山东轻工业学院食品与生物工程学院, 济南 250353)

摘要:猪血是生猪屠宰加工过程中的主要副产物之一, 我国拥有丰富的猪血资源, 但利用却很少, 造成宝贵资源的浪费。本文选用有机萃取剂丙酮提取猪血中的血红素, 通过正交实验确定了提取纯化血红素的最佳条件: 溶血时添加 1.0 倍蒸馏水、0.25 倍乙醇及 0.2 倍的氯仿, 分离血红素时加入 4 倍丙酮同时调 pH2.0, 结晶血红素时加 1.4 倍的 1mol/L 的 NaAc 并调 pH5.0, 此条件下, 血红素提取率可达 28.6% 以上。

关键词:猪血; 血红素; 提取

Study on Extraction of Heme from Porcine Blood

LI Shenghua, WANG Chengzhong, YU Gongming

(College of Food and Bioengineering, Shan Dong Institute of Light Industry, Jinan 250353)

Abstract: Porcine blood is one of the main by-products in live pig slaughtering process. In our country there is plenty of hog blood resources most of which is discharged, just little is made use of, causing serious waste of precious resources. Extraction of heme by organic extracting agent was studied in this paper and the optimum conditions through orthogonal test is: during hemolysis add aqua destillata 1.0 fold, ethanol 0.25 fold and chloroform 0.2 fold; adding 4 times acetone for separation and adjusting pH3.0; during extracting add 1.4 times NaAc of 1.0mol·L and regulate pH5.0. By this procedure, extraction rate of heme is over 28.6%.

Key words: porcine blood; heme; extraction

中图分类号: Q592.1; TS251.9 文献标识码: B 文章编号: 1001-8123(2008)10-0035-03

血红素是由一个 Fe^{2+} 镶嵌在一个原卟啉环中而构成的称为铁卟啉的化合物, 具有很高的实用价值。在制药行业中, 血红素是半合成法制备胆红素的前体, 而胆红素是配制人工牛黄的重要原料。由于天然牛黄的来源有限, 目前制药业所需的牛黄大多来自人工牛黄, 血红素作为配制人工牛黄的间接原料有较大市场需求。在医疗临床上, 血红素可作为补铁剂, 治疗因缺铁引起的贫血病^[1,2]。临床上常用的非血红素补铁剂, 主要以氢氧化铁络合物的形式存在, 吸收率低, 并有一定毒副作用;

而血红素补铁剂无毒无害、吸收率高, 有望成为新一代补铁剂。在肉类加工中, 血红素也有广阔的应用前景, 传统的肉制品加工采用亚硝酸盐发色, 有一定的致癌作用, 而人工合成色素也有潜在的毒性; 血红素作为发色剂、人工色素的替代品具有很好的效果; 在火腿和红肠制品中添加血红素, 其制品切面色泽均匀、鲜艳, 能保持肌肉固有的天然色彩, 且口感韧性强^[3]。

血红素的提取方法有多种, 传统的冰醋酸加热提取法, 工艺流程长、收率低, 且冰醋酸难回收,

收稿日期: 2008-08-11

作者简介: 李盛华 (1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品资源开发。联系电话: 13280005551 E-mail: shenghuashengjun@163.com

成本高^[4]。本文采用改进的丙酮提取法使血红素的得率提高一倍以上,且丙酮可回收利用,成本低。血红素为有机大分子,依据相似相溶原理,选择丙酮作为有机萃取剂提取血红素,使血红素溶于有机相,再调pH至弱酸性,血红素即可沉淀析出。具体原理为:pH<3.0时,血红素与珠蛋白的结合最为疏松,此时加入有机溶剂丙酮,珠蛋白变性凝固,血红素则溶于丙酮中,再调pH至弱酸性(并在上述丙酮液中加入适量的醋酸钠),可得到较纯净的血红素结晶;或用蒸馏法回收丙酮,亦可使血红素析出。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料

新鲜猪血、蒸馏水、柠檬酸钠、无水乙醇、氯仿、盐酸、氢氧化钠、丙酮、醋酸钠、亚硫酸氢钠等,均为分析纯化学试剂。

1.1.2 仪器

离心机,电子天平,真空干燥箱,真空泵,旋转蒸发器

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程

新鲜猪血抗凝、离心→血球→加蒸馏水、乙醇、氯仿,过滤→溶解沉淀,调pH2.0,加丙酮抽提→过滤→滤液调pH5.0,加入醋酸钠(或鞣酸)→离心,收集沉淀。

1.2.2 操作步骤

(1)分离血球 新鲜猪血中加入0.6%柠檬酸钠(即每100kg猪血中加0.8kg柠檬酸钠),搅拌均匀,3000rpm离心15min,弃上清液(血清),用生理盐水洗涤细胞2~3次,收集红血球并记录体积 V_1 。

(2)溶血 加入 V_1 体积蒸馏水、0.25 V_1 乙醇,搅拌30min,红血球吸水胀裂,血红蛋白游离出来,再加入0.2 V_1 氯仿(CHCl_3),搅拌15min,离心,得含血红蛋白的沉淀物。

(3)抽提 用 V_1 体积0.15%的 NaHSO_3 溶解沉淀,然后加入4~5 V_1 的丙酮,用1mol/L盐酸调pH2.0,搅拌均匀,使珠蛋白与血红素充分分离,浸提20min,离心,即得血红素的丙酮溶液,记录体积 V_2 、备用。

(4)分离 上述滤液用标准NaOH调pH5.0,然后加入1.2 V_2 体积的1mol/L醋酸钠,搅拌均匀后静置24h,血红素呈针状结晶析出,离心分离出血

红素沉淀,并用蒸馏水冲洗3~4次。(也可将上述滤液直接装入蒸馏瓶中,于30℃水浴中蒸馏回收丙酮,血红素呈无定形粉末状沉淀析出。)

(5)干燥 把血红素沉淀置于真空干燥箱内(包好放入石灰缸中),室温干燥1~2天,即得血红素精制品,装瓶保存。

1.2.3 血红素中铁含量的测定^[5]

将干燥后的血红素称重,先在电炉上炭化,炭化完毕后放入箱式电阻炉内消化大约4h,加入混酸,放在电热板上继续消化,消化完全后,加水洗涤,洗涤液转入50mL容量瓶中,摇匀,备用。

用吸量管分别吸取质量浓度为0.01mg/mL的铁标准溶液0、0.5、1.0、1.5、2.0mL于5只50mL容量瓶中,吸取1mL试样于一只50mL容量瓶中,依次各加入2.0mL盐酸羟胺、2.5mL HAc-NaAc缓冲溶液,2.0mL邻二氮菲溶液,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。放置10min。用标准系列中铁质量浓度最大的溶液测量最大吸收波长,并绘制标准曲线,以不加铁的试剂空白溶液为参比溶液,在所测最大吸收波长下,分别测量各溶液的吸光度,同理,测量样品的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

根据上述工艺,采用丙酮提取法,可得到咖啡色血红素粉末,提取率较高,1L红血球可得血红素2.6g多,新鲜猪血含红血球约40%左右,1L猪血中平均含血红素3.82g,本研究血红素提取率可达27.2%;同时,还可得到300g左右的蛋白质;丙酮可回收利用,成本低,得率高。

实验证明血红素为深红色粉状,不溶于水,易溶于有机溶剂和碱性溶液,微具血液气味。

2.2 正交试验

血红素的提取受蒸馏水、氯仿、丙酮、醋酸钠的添加量影响较大,因此本试验针对这四因素每个因素三水平展开正交实验 $L_3(3^4)$,以确定一组最佳提取参数。

表1 正交试验因素水平表

Table1 factors and levels scheme for orthogonal experiment

水平	A加水量/倍 V_1	B氯仿/倍 V_1	C丙酮/倍 V_1	D醋酸钠/倍 V_2
1	1	0.15	4	1
2	2	0.20	5	1.2
3	3	0.25	6	1.4

表2 正交试验结果
Table2 Results of orthogonal experiment

序号	A	B	C	D	血红素/g (以1L猪血计)
1	1	1	1	1	2.42
2	1	2	2	2	2.84
3	1	3	3	3	2.61
4	2	1	2	3	2.13
5	2	2	3	1	2.33
6	2	3	1	2	2.17
7	3	1	3	2	2.36
8	3	2	1	3	2.87
9	3	3	2	1	2.44
K ₁	7.87	6.91	7.46	7.19	
K ₂	6.63	8.04	7.21	7.37	
K ₃	7.67	7.22	7.30	7.61	
k ₁	2.623	2.303	2.487	2.397	
k ₂	2.210	2.680	2.403	2.457	
k ₃	2.557	2.407	2.433	2.537	
R	0.413	0.377	0.084	0.140	

通过极差分析可以看出，以上四因素对血红素提取率的影响程度为：A>B>D>C，即加水量对结果影响最大，其次是氯仿，醋酸钠和丙酮的用量对提取率的影响相对小一些。最佳提取参数为A1B2C1D3，即加蒸馏水1倍V₁，氯仿0.2倍V₁，丙酮4倍V₁，醋酸钠1.4倍V₂。

2.3 铁的质量分数的测定

经测定铁的质量分数为1.04%，略高于张志峰等人^[6]研究得到的血红素铁的质量分数；提取率27.2%，亦高于前人研究结果，说明本实验的提取参数确使血红素的提取方法得到改进。

2.4 血红素的红外吸收光谱

图1是提取样品红外吸收光谱，图2是标准血红素样品的红外吸收光谱^[7]，对比可以看出，二者的波形相似，从吸收峰的强度看，两种物质4个标准特征峰的峰值基本一致，因此，可以得出：两种物质的结构相同，即提取所得样品为血红素。

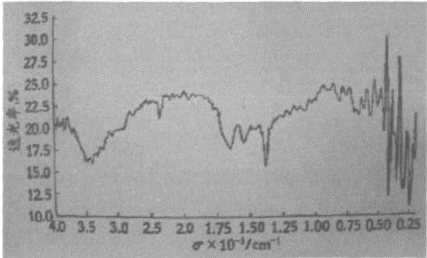


图1 实验提取血红素样品的红外吸收光谱
Figure1 the infrared absorption spectrum
of heme obtained from this experiment

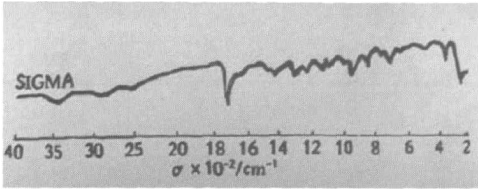


图2 标准血红素样品的红外吸收光谱
Figure 2 the infrared absorption spectrum of standard heme sample

3 讨论

3.1 抗凝

新鲜猪血中含有大量的凝血因子和凝血酶原，在Ca²⁺存在时易使血液凝结，由于柠檬酸能使Ca²⁺沉淀，且柠檬酸与Ca²⁺的结合物可直接进入代谢，对人体无任何副作用，故用柠檬酸及其可溶性盐作抗凝剂，添加量为0.6%。

3.2 溶血

本研究发现，仅用蒸馏水溶血，血细胞破裂很慢，用玻璃棒搅拌10min也几乎无溶血现象，但加入适量乙醇，可加速溶血过程，几分钟的搅拌便可使红细胞完全破裂。其原因可能是乙醇与水互溶，进一步降低了细胞外渗透压，使细胞更易破裂。再者，由于细胞膜中含有脂蛋白，所以凡是能使脂类溶解或改变脂类物理性状的物质（如氯仿，乙醚等）都能引起膜的脂质双分子层的破坏而溶血。因此，本实验在加水、乙醇搅拌的同时添加一定量氯仿来加速溶血。

3.3 抽提

抽提时，珠蛋白水化层被破坏，蛋白质分子相互吸引聚粘结成团，随抽提时间的延长，团块越来越大，因重力作用而使蛋白质沉淀析出，所以，抽提时间应在15min以上。

3.4 分离

分离提取过程中，使用的丙酮、氯仿等有机溶剂易挥发、易燃、有毒，同时血红素在高温下不稳定、易分解，因此，实验应在通风橱内操作且温度控制在25℃以下。

根据正交试验结论，控制最佳条件做两次平行实验，产物的率均在28.6%以上，说明以上实验结论具有可靠性。如此看来，只要本技术得当，就能付诸工业化生产，不仅可降低血红素的生产成本，而且能大大减少因猪血排放而造成的污染、资源浪费等问题，并带来良好的经济效益。

(下转第76页)

和地区发展较快。可用于肉类工业的微波杀菌技术工艺主要有连续微波杀菌技术、多次快速加热和冷却微波杀菌技术、微波加热与常规加热杀菌技术相结合的杀菌工艺等。微波杀菌技术在肉品的贮藏和保鲜中起着重要的作用,但也存在缺陷,其中最大问题是成本问题,低温微波杀菌技术在包装肉制品中难以达到预期的杀菌效果,单独采用微波干燥物料,若温度控制不当易使物料内部产生过快的温升和很高的温度,从而导致物料内部产生干裂,甚至烧焦现象^[16]。此外,微波杀菌基本建设费用较高,耗电量也大;同时,微波照射对人体有一定的伤害。

4 小结

除上述保藏技术外,还有其它的一些肉类保藏技术,如臭氧技术、脉冲强光技术等,都有各自的优缺点。随着研究的深入,众多学者一致认为没有任何一种单一的保藏措施是完美无缺的,因此必须采用综合保藏技术,既将各种保藏技术进行优化组合,从而达到肉品的最佳保藏效果。

参考文献

- [1] 郭月红,李洪军,廖洪波,等.肉类食品防腐保鲜技术的研究进展[J].肉品工业,2005,(2):30-32.
- [2] W Van Moeseke, S De Smet, E Claeys. Very fast chilling of beef: effects on meat quality[J]. Meat Science, 2001, 159(1): 31-37.
- [3] M Hugas. Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation Meat and Meat Products[J]. Meat Science, 1998, 49(Suppl. 1): 139-150.
- [4] M Carriga, M T Aymerich, S Costa, et al. Bactericidal synergism through bacteriocina and high pressure in a

meat model system during storage[J]. Food Microbiology, 2002, 219(5): 509-518.

- [5] 罗欣,朱燕.乳酸钠在牛肉冷却肉保鲜中的应用研究[J].食品与发酵工业,2000,26(3):1-5.
- [6] 张凤宽,王力哲,王兆保.不同包装材料对羊肉贮藏期的影响[J].吉林农业大学学报,1997,19(2):90-94.
- [7] 陈椒,张青,徐世琼,等.鲜肉真空冷却工艺的研究[J].保鲜与加工,2001,(5):9-11.
- [8] 邱伟芬.食品的活性包装[J].食品科学,1998,19(8):11-14.
- [9] 赵利,王素雅,谢俊杰.食品包装技术研究进展[J].食品工业科技,2001,22(5):78-80.
- [10] Gennadios, A., Hanna, M. A., Kurth, L. B. Application of edible coatings on meat, poultry and seafoods: a review[J]. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 1997, 30, 337-350.
- [11] 周万龙,任赛玉,高大维.脉冲强光杀菌对食品成分影响及保鲜研究[J].深圳大学学报,1997,14(4):81-84.
- [12] 涂顺明,邓丹雯,余小林,等.食品杀菌新技术[M].北京:中国轻工业出版社,2004,276-277.
- [13] 郭新竹,宁正祥.紫外技术在食品工业中的应用[J].粮油加工与食品机械,1997,14(4):9-11.
- [14] 内山贞.照射食品的检知法に关する国际的动向[J]. Radioisotopes, 1991, 40: 302-311.
- [15] 黄建蓉,郭杞远,蔡妙颜,等.食品微波杀菌新技术的研究进展[J].保食品与发酵工业,1999,(4):44-46.
- [16] 牟群英,李贤军.微波加热技术的应用与研究进展[J].物理学与高新技术,2004,(6):438-442.

.....
(上接第37页)

参考文献

- [1] 王君,陈红亮,张向东.氯化血红素提取新工艺的研究[J].当代化工,2001,20(3):125-127.
- [2] 刁治民,杜军华,马寿福.动物血液的开发利用[J].青海科技,2000,9(3):7-11.
- [3] 车振明等.猪血的综合开发和利用.农牧产品开发[J],2000(3).
- [4] 冯咏梅,王文华,陈小平.猪血制品的研究与开发.食品研究与开发[J],2002(6),71-73.

- [5] 宋照军,张延生,刘玺等.猪血中血红素提取纯化新技术研究[J].肉类工业,2004(8),23-25.
- [6] 张志峰,牛映斗,曹晖,等.血红素提取及补血冲剂的研制[J].西安医科大学学报,1998,6(1):173-174.
- [7] 白燕,周艳晖,郑文杰,等.血红素提取物的光谱分析及电化学活性研究[J].暨南大学学报:自然科学与医学版,1997,18(5):2-4.