



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.06.005

## 从猪血中提纯食品级血红素的研究

蒋永吉<sup>1,2</sup>, 张翠英<sup>1</sup>, 朱显明<sup>2</sup>, 易秋分<sup>1,2</sup>, 唐昭娜<sup>1,2</sup>, 董辉<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457)

**摘要:** 利用冰醋酸法从猪血中提纯食品级血红素. 以血红素的纯度和得率为响应指标, 采用单因素法和响应面法确定冰醋酸法提纯血红素的最佳工艺为: 冰醋酸体积 (mL) 与血球液质量 (g) 比 3.93、氯化钠添加量 2.09%、反应温度 98 °C、反应时间 50 min. 在该条件下, 样品中血红素的纯度和得率分别为 93.29%、60.98%.

**关键词:** 猪血; 血红素; 冰醋酸法; 提取; 纯度; 得率

**中图分类号:** Q81      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-6510(2014)06-0021-06

### Extraction and Purification of Food-grade Heme from Porcine Blood

JIANG Yongji<sup>1,2</sup>, ZHANG Cuiying<sup>1</sup>, ZHU Xianming<sup>2</sup>, YI Qiufen<sup>1,2</sup>, TANG Zhaona<sup>1,2</sup>, DONG Hui<sup>2</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Acetic acid was used to purify food-grade heme from porcine blood. To get high yield of purified heme, single factor and response surface methods were performed to optimize the conditions. 2.09% sodium chloride was added into the mixture of blood and glacial acetic acid with the ratio of 3.93 at 98 °C for 50 min. Under this conditions, the purity and yield of heme are 93.29% and 60.98%, respectively.

**Key words:** porcine blood; heme; glacial acetic acid method; extract; purity; yield

我国是畜牧业大国, 每年肉类产品产量位居世界第一位, 每年屠宰生猪获得的血液副产品约 150 ~ 200 万吨<sup>[1]</sup>. 猪血中氨基酸含量组成均衡, 是一种优质廉价的蛋白质资源, 而且含有大量天然的、理想的补铁剂——血红素. 我国对畜牧血液资源开发利用较晚, 血液加工利用率低, 不仅造成了巨大的资源浪费, 同时也导致了严重的环境污染.

据有关报道<sup>[2]</sup>, 全世界有 1/5 人口患有缺铁性营养不良, 特别是妇女、孩子和老人. 缺铁会导致缺铁性贫血 (iron deficiency anemia, IDA), 伴有体力、脑力工作能力下降等症状, IDA 严重威胁人类健康<sup>[3-4]</sup>. 传统的无机补铁剂吸收利用率低、肠胃刺激大; 随后的有机补铁剂虽然缓解肠胃刺激, 但生物吸收利用率还是不高, 达不到理想防治 IDA 的目的. 血红素铁是人体内铁的主要存在形式, 是目前生物吸收利用率最高、肠胃无刺激的生物补铁剂, 是公认的“理想补铁剂”<sup>[5]</sup>. 目前市场上血红素产品大部分通

过酸性丙酮法制备, 该法提纯血红素具有纯度高、成本低等特点, 但考虑到提纯工艺中丙酮的毒性问题, 亟需寻找一种更为安全可靠制备血红素的方法, 用于食品和医疗保健行业.

冰醋酸法最早由 Schalteief 提出, 至今还被用于工业化生产. 但冰醋酸法提纯血红素存在纯度低等缺点. 我国钟耀广<sup>[6]</sup>对冰醋酸法提取血红素进行研究, 但是提取的血红素纯度仅 50% 左右. 基于前人的研究成果, 本研究以血红素纯度和得率为指标, 全面系统地探究冰醋酸法提纯血红素的最佳工艺, 为充分开发利用我国畜血资源提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

鲜猪血由天津天农康嘉生态养殖有限公司提供; 氯化血红素标准品 (纯度为 98%), 美国 Sigma 公司;

收稿日期: 2014-03-20; 修回日期: 2014-05-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (31300601); 天津市科技型中小企业创新基金资助项目 (13ZXCXSY13500)

作者简介: 蒋永吉 (1988—), 男, 江苏徐州人, 硕士研究生; 通信作者: 董辉, 副研究员, donghui@irm-cams.ac.cn.

甲醇、乙腈,分析纯,Merck KGaA 公司;吡啶,分析纯,西陇化工股份有限公司;冰醋酸,分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;氯化钠、柠檬酸钠,分析纯,上海生工生物工程公司。

## 1.2 实验仪器

远红外鼓风干燥箱;DF-101Z 型集热式恒温加热磁力搅拌器;MACH 1.6R 型台式冷冻离心机;XS205 型 Dual Range 电子天平;1260 型 Agilent 高效液相色谱仪;Venusil MP C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 猪血样品预处理

采集新鲜猪血,加入 3.8%柠檬酸钠抗凝剂,不断搅拌,防止凝血。5 000 r/min 离心 20 min,收集血球,分装后运回实验室,冻存于 -20 °C 环境,备用。

### 1.3.2 鲜血球中血红素理论含量计算

将冻存于 -20 °C 的血球置于 4 °C 环境过夜解冻,量取 200 mL 充分混匀的解冻血球,于 4 °C、5 000 r/min 离心 20 min,除去未破碎血球和杂质,收集上清备用。取 3 个洁净干燥的玻璃培养皿,准确称量并记录;准确称取 20 g 处理的血球液 3 份,分别放在标记好的 3 个玻璃培养皿中;将 3 个放有血球的培养皿置于 105 °C 的烘箱中,干燥至质量恒定后,称量并记录;计算干物质含量及血红素理论含量。

### 1.3.3 工艺流程

将冻存于 -20 °C 血球解冻破碎→离心→与氯化钠-冰醋酸溶液共热→冷却至室温→离心收集血红素晶体→洗涤→烘干。

### 1.3.4 单因素及响应面实验设计

影响冰醋酸法提纯血红素的主要因素有冰醋酸体积(mL)与血球液质量(g)比、反应温度、反应时间、氯化钠的添加量。按照以上 4 个因素的不同设置条件进行单因素实验。

根据单因素实验结果分析,采用 Design Expert 8.0.6.1 软件中 Box-Behnken Design (BBD) 法设计 4 因素 3 水平响应面实验,优化冰醋酸法提纯血红素的工艺。

### 1.3.5 样品中血红素的含量和得率的测定

色谱条件<sup>[7]</sup>: Venusil MP C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相为 V(甲醇):V(乙腈):V(水):V(醋酸):V(吡啶) = 40.0:40.0:9.0:1.0:0.6 的混合溶液,流量 1 mL/min;柱温 35 °C;检测波长 399 nm;进样量 20 μL。

称取 50 mg 待测样品(或标准品)于 50 mL 容量

瓶中,用 0.1 mol/L NaOH 定容;取 1.25 mL 定容后溶液于 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容。

样品中血红素纯度  $Y_1$  及得率  $Y_2$  按照式(1)、式(2)计算。

$$Y_1 = \frac{S_{\text{样}}}{S_{\text{标}}} \times 98\% \quad (1)$$

$$Y_2 = \frac{m_{\text{样}} \cdot Y_1}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $S_{\text{样}}$ 是待检测样品的峰面积; $S_{\text{标}}$ 是标准样品的峰面积; $m_{\text{样}}$ 是提取样品的质量; $m$ 是血球中血红素的总质量。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲜血球中血红素理论含量的计算

通过 3 次实验确定的鲜血球中干物质含量的平均值为 26.65%。红细胞干物质主要是血红蛋白,占总蛋白的 95%~97%<sup>[8-9]</sup>,且血红蛋白含有血红素 3.8%。经计算:血红素占鲜血球湿质量的 0.962%~0.982%。

### 2.2 单因素实验

#### 2.2.1 冰醋酸体积与血球液质量比

冰醋酸体积(mL)与血球液质量(g)比分别是 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0,NaCl 添加量为血球液质量的 1.5%,在 105 °C 的冰醋酸溶液中反应 40 min。结果如图 1 所示。

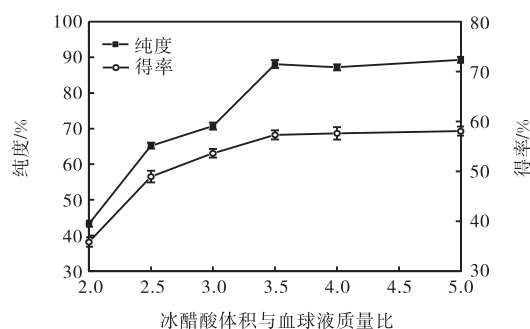


图 1 冰醋酸体积与血球液质量比对提纯血红素的影响  
Fig. 1 Effect of glacial acetic acid to blood liquid ratio on the purification of heme

由图 1 可知:冰醋酸体积与血球液质量比对提取血红素的纯度和得率影响较大。随着冰醋酸体积与血球液质量比增加,样品中血红素纯度和得率迅速增加;当冰醋酸体积与血球液质量比达到 3.5 时,样品中血红素的纯度和得率几乎达到最大,不再随冰醋酸体积与血球液质量比增加而快速增加。考虑到生产过程经济效益,初步选定冰醋酸体积与血球液质量比

为 3.5.

### 2.2.2 反应温度

冰醋酸体积与血球液质量比为 4.5、NaCl 添加量为血球液质量的 1.5%，分别在不同温度的冰醋酸溶液中反应 40 min，实验结果如图 2 所示。

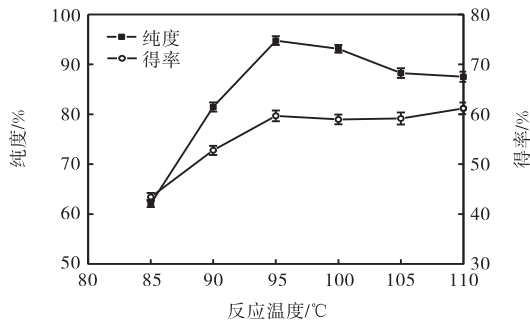


图 2 反应温度对提纯血红素的影响

Fig. 2 Effect of reaction temperature on the purification of heme

由图 2 可知：反应温度对提纯血红素影响也较大。随着温度的升高，样品中血红素纯度和得率迅速增加；当达到 95 °C 时，血红素的纯度达最高，血红素的得率几乎达到最高；当温度继续升高时，血红素纯度反而下降，血红素得率比较稳定。基于生产能耗的考虑，初步选定反应温度 95 °C。

### 2.2.3 反应时间

冰醋酸体积与血球液质量比 4.5、NaCl 添加量为血球液质量的 1.5%，在 105 °C 的冰醋酸溶液中反应不同时间，实验结果如图 3 所示。由图 3 可知：随着反应时间的延长，血红素纯度和得率明显提高；当反应时间为 30 min 时，血红素纯度达到 83.83%，但血红素得率仅 52.07%；继续延长反应时间，血红素纯度增高缓慢，但血红素得率增高较快；当反应 45 min 时，血红素纯度和得率分别达 89.01%、61.32%；继续延长反应时间，血红素纯度和得率趋于稳定。综合考虑提取血红素的纯度和得率、生产周期、生产能耗等，反应时间初步定为 45 min。

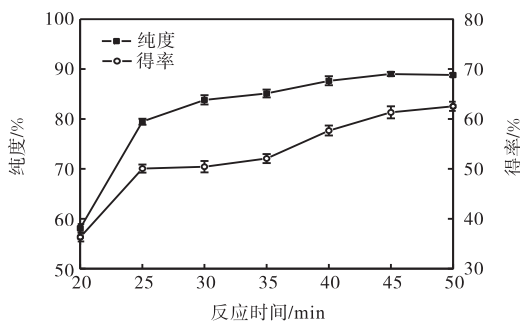


图 3 反应时间对提纯血红素的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on the purification of heme

### 2.2.4 氯化钠添加量

冰醋酸体积与血球液质量比为 4.5、添加不同质量的 NaCl，在 105 °C 的冰醋酸溶液中反应 40 min，结果如图 4 所示。

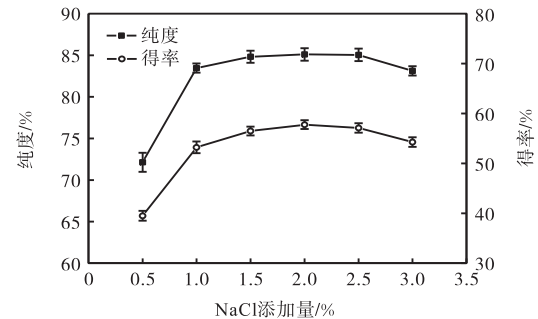


图 4 氯化钠添加量对提纯血红素的影响

Fig. 4 Sodium chloride and the purification of heme

由图 4 可知：氯化钠添加量对提取血红素的得率和纯度影响相对较小。随着氯化钠添加量增加至 1.0%，血红素的纯度和得率增加较快；之后，当氯化钠添加量增加时，血红素的纯度和得率相对稳定；其中氯化钠添加量达到 2.0% 时，血红素纯度和得率达到最大。所以，氯化钠添加量初步确定为 2.0%。

### 2.3 响应面优化

根据单因素实验分析，以血红素纯度和得率为响应，采用 Design Expert 8.0.6.1 软件中 Box-Behnken Design 中心组合实验设计原理，进行 4 因素 3 水平实验，确定冰醋酸法提纯血红素的最佳工艺。令： $x_1$  为冰醋酸体积 (mL) 与血球液质量 (g) 比； $x_2$  为氯化钠添加量； $x_3$  为反应时间； $x_4$  为反应温度。因素水平表见表 1，方案设计及实验结果见表 2。

将所得的实验数据采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行多元回归拟合，得到分别以血红素纯度和得率为响应的二次回归方程为

$$Y_1 = 91.64 + 4.5 X_1 + 0.053 X_2 + 0.55 X_3 + 2.77 X_4 + 1.31 X_1 X_2 + 1.04 X_1 X_3 + 0.53 X_1 X_4 - 0.58 X_2 X_3 - 0.09 X_2 X_4 - 0.067 X_3 X_4 - 3.28 X_1^2 - 2.15 X_2^2 - 0.93 X_3^2 - 3.29 X_4^2 \quad (3)$$

$$Y_2 = 50.17 + 6.61 X_1 + 0.28 X_2 + 6.27 X_3 + 2.29 X_4 + 0.013 X_1 X_2 + 1.30 X_1 X_3 + 0.36 X_1 X_4 - 0.55 X_2 X_3 - 0.34 X_2 X_4 - 0.21 X_3 X_4 - 2.16 X_1^2 - 0.66 X_2^2 - 2.36 X_3^2 - 1.93 X_4^2 \quad (4)$$

式中： $X_1 = (x_1 - 3.5)/0.5$ ， $X_2 = (x_2 - 2.0)/0.5$ ， $X_3 = (x_3 - 45)/5$ ， $X_4 = (x_4 - 95)/5$ ；其中  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_4$  为非

编码值,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  为编码值.

表 1 4 因素 3 水平表

Tab. 1 Table of four factors and three levels

水平	因素			
	$x_1$	$x_2/\%$	$x_3/\text{min}$	$x_4/^\circ\text{C}$
1	3.0	1.5	40	90
2	3.5	2.0	45	95
3	4.0	2.5	50	100

表 2 Box-Behnken 设计方案及结果

Tab. 2 Box-Behnken design matrix and the experimental results

序号	$x_1$	$x_2/\%$	$x_3/\text{min}$	$x_4/^\circ\text{C}$	纯度/%	得率/%
1	3.5	1.5	45.0	100.0	90.23	58.06
2	4.0	2.0	50.0	95.0	94.68	62.18
3	3.0	2.0	45.0	100.0	83.31	52.04
4	4.0	1.5	45.0	95.0	87.94	56.14
5	3.0	2.0	45.0	90.0	78.21	47.21
6	3.5	2.0	50.0	100.0	89.23	60.33
7	4.0	2.0	45.0	100.0	93.03	60.52
8	3.0	2.0	50.0	95.0	84.04	54.39
9	3.5	2.0	40.0	90.0	83.84	49.51
10	4.0	2.0	45.0	90.0	85.79	54.27
11	3.5	2.0	45.0	95.0	91.72	58.01
12	3.5	2.0	50.0	90.0	84.21	54.43
13	3.0	2.0	40.0	95.0	83.81	50.23
14	3.5	1.5	50.0	95.0	89.91	59.32
15	3.0	1.5	45.0	95.0	80.79	52.77
16	3.5	1.5	40.0	95.0	87.97	53.32
17	3.5	2.5	50.0	95.0	88.02	58.82
18	3.5	2.5	40.0	95.0	88.39	53.92
19	4.0	2.5	45.0	95.0	92.63	56.71
20	3.5	2.0	45.0	95.0	90.85	58.57
21	3.0	2.5	45.0	95.0	80.23	53.29
22	4.0	2.0	40.0	95.0	89.31	55.42
23	3.5	2.5	45.0	90.0	83.92	54.02
24	3.5	2.0	45.0	95.0	92.34	56.87
25	3.5	1.5	45.0	90.0	84.75	53.81
26	3.5	2.5	45.0	100.0	89.04	56.93
27	3.5	2.0	40.0	100.0	89.13	55.83

2.3.1 回归方程的方差分析

利用 Design Expert 软件分别对拟合的回归方程进行方差分析, 分析结果见表 3、表 4. 表 3、表 4 中两个模型回归的  $P$  都小于 0.000 1, 说明回归模拟建立的模型极其显著; 两模型的失拟  $P$  分别为 0.240 6 和 0.339 5, 均大于 0.05, 说明模型失拟不显著, 即模型与实验数据拟合度良好. 该模型回归高度显著及失拟不显著, 说明拟合模型有效<sup>[10]</sup>.

表 3 纯度响应回归模型的方差分析

Tab. 3 ANOVA of regression model for purity

来源	自由度	平方和	均方	$F$	$P$
模型回归	14	444.84	31.77	18.22	< 0.000 1
$x_1$	1	242.91	242.91	139.32	< 0.000 1
$x_2$	1	0.034	0.034	0.020	0.891 0
$x_3$	1	3.67	3.67	2.11	0.172 2
$x_4$	1	92.13	92.13	52.84	< 0.000 1
$x_1x_2$	1	6.89	6.89	3.95	0.070 1
$x_1x_3$	1	4.28	4.28	2.46	0.142 9
$x_1x_4$	1	1.14	1.14	0.66	0.433 5
$x_2x_3$	1	1.33	1.33	0.77	0.398 9
$x_2x_4$	1	0.032	0.032	0.019	0.893 8
$x_3x_4$	1	0.018	0.018	0.010	0.920 3
$x_1^2$	1	57.41	57.41	32.93	< 0.000 1
$x_2^2$	1	24.64	24.64	14.13	0.002 7
$x_3^2$	1	4.66	4.66	2.67	0.128 1
$x_4^2$	1	57.76	57.76	33.13	< 0.000 1
残差	12	1.74			
失拟	10	19.80	1.98	3.53	0.240 6
纯误差	2	1.12	0.56		
总变异	26	465.76			

表 4 得率响应回归模型的方差分析

Tab. 4 ANOVA of regression model for yield

来源	自由度	平方和	均方	$F$	$P$
模型回归	14	300.88	21.49	13.68	< 0.000 1
$x_1$	1	103.90	103.90	66.12	< 0.000 1
$x_2$	1	0.006 08	0.006 08	0.003 87	0.951 4
$x_3$	1	81.33	81.33	51.76	< 0.000 1
$x_4$	1	77.32	77.32	49.20	< 0.000 1
$x_1x_2$	1	0.000 63	0.000 63	0.000 40	0.984 4
$x_1x_3$	1	1.69	1.69	1.08	0.320 1
$x_1x_4$	1	0.50	0.50	0.32	0.581 6
$x_2x_3$	1	0.30	0.30	0.19	0.668 6
$x_2x_4$	1	0.45	0.45	0.29	0.602 8
$x_3x_4$	1	0.044	0.044	0.028	0.869 7
$x_1^2$	1	24.81	24.81	15.79	0.001 8
$x_2^2$	1	2.35	2.35	1.5	0.244 6
$x_3^2$	1	1.86	1.86	1.18	0.298 1
$x_4^2$	1	19.93	19.93	12.68	0.003 9
残差	12	1.57			
失拟	10	17.35	1.74	2.31	0.339 5
纯误差	2	1.50	0.75		
总变异	26	319.73			

2.3.2 响应曲面图分析及最佳工艺预测

根据回归方程, 利用 Design Expert 分别绘制以血红素纯度和得率为响应的响应曲面图(图 5、图 6). 分析各影响因素对提取血红素纯度和得率的影响及各因素间的交互作用. 采用 Design Expert 中 Numerical Optimization 对提取血红素的纯度和得率进行最优化设计. 得到提取血红素的得率及纯度最佳的提取工艺条件: 冰醋酸体积与血球液质量比

3.93、氯化钠添加量为 2.09%、反应温度 97.66 °C、反应时间 50 min, 预测提取样品中血红素的纯度和得率分别约为 94.26%和 62.11%。

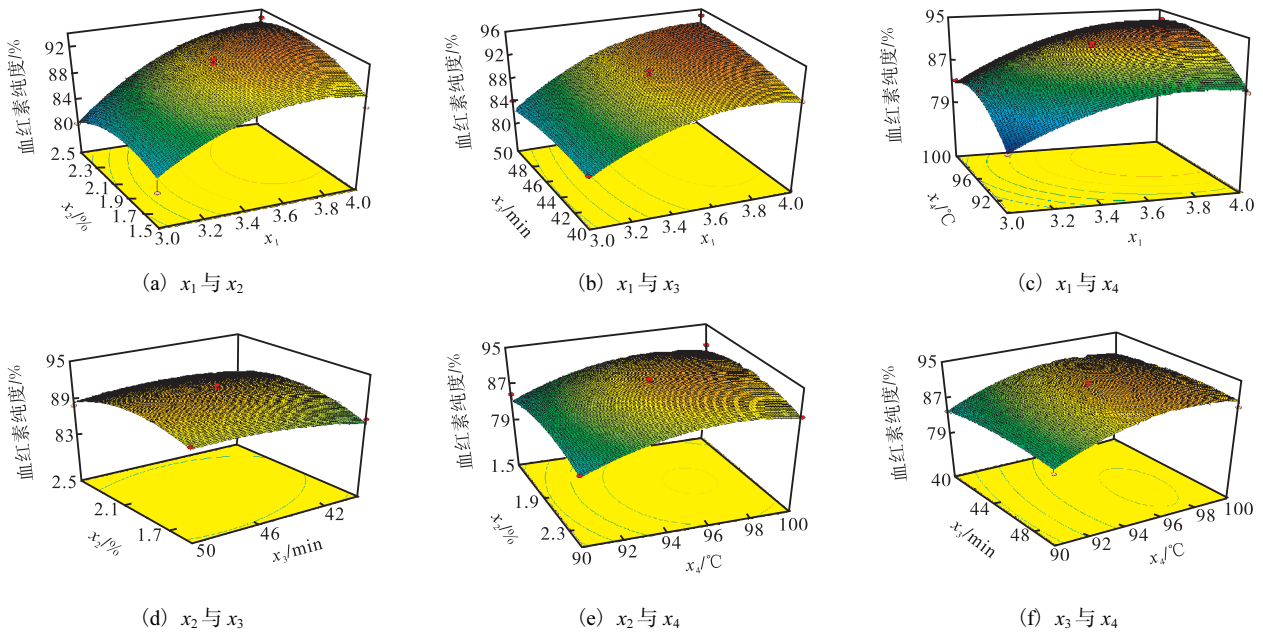


图 5 各因素间交互作用对提取血红素纯度的影响

Fig. 5 Effect of the interaction among experimental factors on the purification of heme

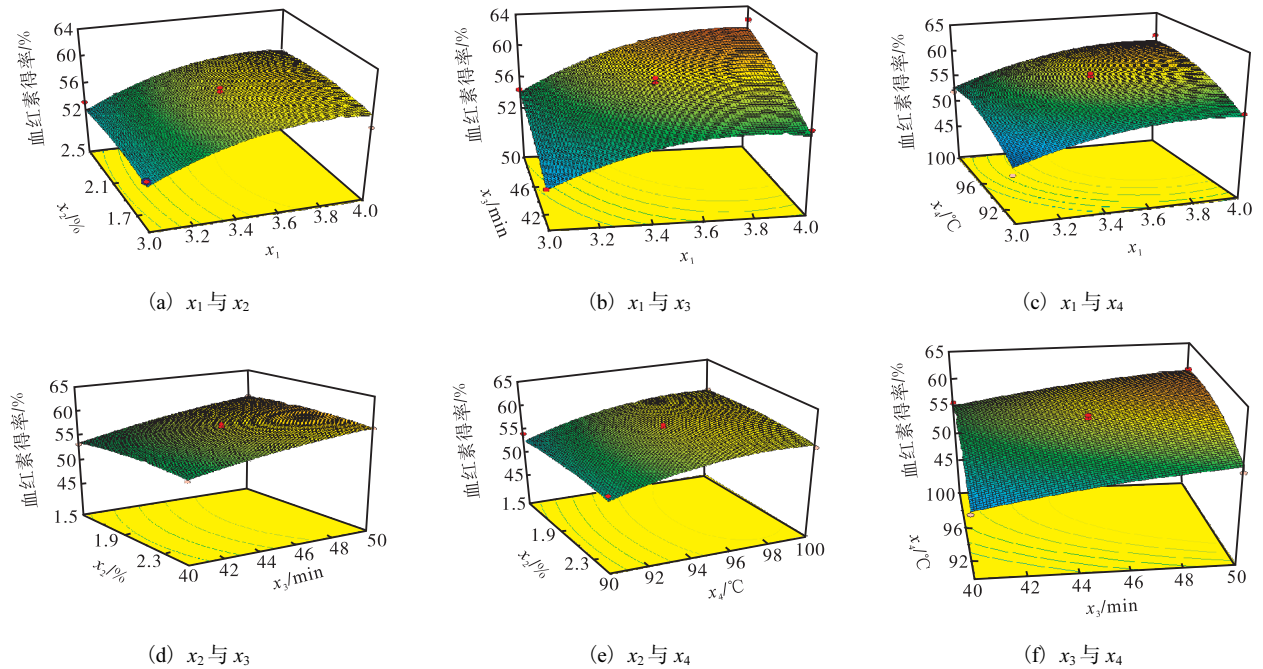


图 6 各因素间交互作用对提取血红素得率的影响

Fig. 6 Effect of the interaction among experimental factors on the yield of heme

2.3.3 最佳工艺验证实验

在优化的最佳实验条件下, 即反应温度 98 °C (与最优值最近的整数值)、冰醋酸体积与血球液质量比 3.93、NaCl 添加量为 2.09%、反应时间 50 min, 提纯血红素, 实验重复 5 次. 在上述条件下, 提纯样品中

血红素纯度和得率的实验值分别为 93.29% 和 60.98%. 与预测的理论值相接近, 说明模型有效且能够较好地反映出血红素的提取条件, 同时也说明了用响应面法优化冰醋酸法提取血红素的提取工艺是可行的。



提取样品和标准品的 HPLC 色谱图如图 7 所示. 由图 7 可知: 提取样品和标准品在该条件下主峰的保留时间和峰面积一致, 说明实验提取样品的主要成分为血红素.

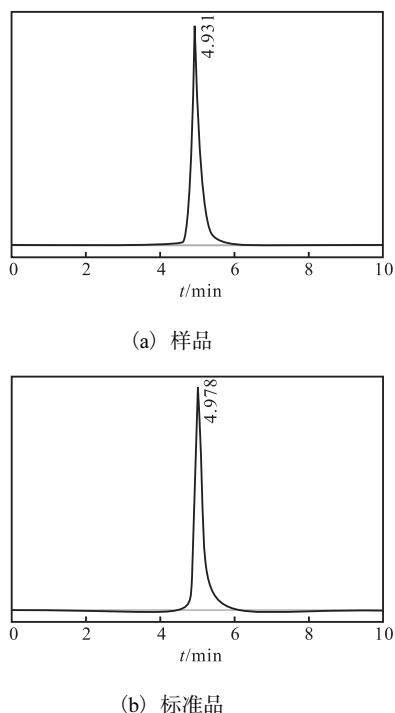


图 7 高效液相色谱分析图

Fig. 7 High performance liquid chromatography analysis

### 3 结 语

在单因素实验设计的基础上, 对冰醋酸法从猪血中提取血红素的提取工艺进行了 4 因素 3 水平的响应面设计, 建立了响应值和各个因素之间的数学模型, 依据此数学模型确定的最佳提取工艺为: 冰醋酸体积与血球液质量比 3.93、NaCl 添加量为血球液质量的 2.09%、反应温度 98 °C、反应时间 50 min. 在该条件下, 提纯样品中血红素纯度和得率的实验值分别

为 93.29%和 60.98%, 与预测值吻合.

### 参考文献:

- [1] 刘振荣, 王君, 张向东, 等. 超声波法提取氯化血红素的初步研究[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2003, 30(4): 373-377.
- [2] Lee S H, Song K B. Purification of an iron-binding nonapeptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3): 378-381.
- [3] Schumann K, Ettl T, Szegner B, et al. On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2007, 21(3): 147-168.
- [4] Chipkonkar S A, Tarwadi K V, Kavedia R B, et al. Fortification of vegetarian diets for increasing bioavailable iron density using green leafy vegetables[J]. Food Research International, 1999, 32(3): 169-174.
- [5] Miquel E, Farré R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability[J]. Trends in Food Science & Technology, 2007, 18(3): 139-143.
- [6] 钟耀广. 利用冰醋酸提取血红素的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 90-95.
- [7] 霍仕霞, 闫明, 黄毅, 等. HPLC 法测定氯化血红素片剂的含量[J]. 分析实验室, 2008, 27(S1): 227-229.
- [8] 黄群, 马美湖, 杨抚林, 等. 畜禽血的开发利用[J]. 肉类研究, 2003(3): 37-40.
- [9] Toldrà M, Dàvila E, Sagué E, et al. Functional and quality characteristics of the red blood cell fraction from bio-preserved porcine blood as influenced by high pressure processing[J]. Meat Science, 2008, 80(2): 380-388.
- [10] Zhu C P, Liu X L. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peel by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1197-1202.

责任编辑: 周建军