

Study on the technology of ultrasonic-assisted extraction of heme from the blood of Tibetan pigs

Guoqing Li¹ Hui Ma¹ Xiangyan Zhao¹ Zhen Zhang¹ Mengjie Liu²

1. School of Food and Bioengineering, Henan Institute of Animal Husbandry Economics, Zhengzhou, Henan, 450046, China

2. School of Life Sciences, Henan University, Zhengzhou, Henan, 450046, China

Abstract

Using Tibetan pig blood as the raw material, heme was extracted with the assistance of ultrasound. The extraction rate of heme was used as the evaluation index to investigate the effects of ultrasonic temperature, ultrasonic time, ultrasonic power, ultrasonic pulse ratio, and the volume ratio of red blood cells to water. Based on the results of single-factor experiments, a four-factor, three-level orthogonal experiment was conducted to optimize the extraction process. The optimal conditions were determined as follows: ultrasonic temperature of 30°C, red blood cell to water volume ratio of 1:5, ultrasonic time of 6 min, ultrasonic power of 400 W/100 mL, and ultrasonic pulse ratio of 4:3. Under these conditions, the heme yield reached (0.621 ± 0.021) g/100 mL, significantly higher than that obtained by conventional methods (0.320 ± 0.017) g/100 mL. The ultrasound-assisted extraction method effectively increased the extraction rate of heme from Tibetan pig blood.

Keywords

Tibetan pig; Hemoglobin; Ultrasonic method; Extraction process

超声波辅助提取藏香猪血液中血红素工艺研究

李国庆¹ 马辉¹ 赵相艳¹ 张震¹ 刘梦杰²

1. 河南牧业经济学院食品与生物工程学院, 中国·河南 郑州 450046

2. 河南大学生命科学学院, 中国·河南 郑州 450046

摘要

以藏香猪血液为原料, 采用超声波辅助提取血红素, 以血红素提取率为考察指标, 研究超声温度、超声时间、超声功率、超声间歇比以及红细胞与水体积比的影响, 通过单因素实验结果进行四因素三水平正交试验优化, 确定最佳工艺条件。研究表明超声温度30°C, 红细胞与水体积比1:5, 超声时间6 min, 超声功率400 W/100mL, 超声间歇比4:3, 在此条件下血红素的得率为 (0.621 ± 0.021) g/100mL, 远优于常规方法得率 (0.320 ± 0.017) g/100mL。采用超声波辅助提取法能有效增加藏香猪血液中血红素的提取率。

关键词

藏香猪; 血红素; 超声波辅助; 提取工艺

1 引言

西藏小型猪因肉质细腻, 香味浓郁, 被当地民间习惯称为藏香猪^[1]。但屠宰之后猪血液往往由于口感、技术等原因被当作废物而丢弃, 致使大量优质血液资源浪费, 并且造成当地环境严重污染。猪血中含有大量天然且理想补铁物质——血红素^[2-3], 它在生物制药、功能性食品和保健品等

多个领域有广泛应用, 如何利用现代生物技术从废弃的猪血液中提取该活性物质, 已然成为重要研究课题。

有多种技术用于血红素提取, 但各有利弊^[3-6]。钟耀广等^[4]研究了冰醋酸法提取猪血液中血红素, 发现冰醋酸不仅有酸化作用, 同时还具有溶解红细胞的作用。该方法目前在实验室和工业上应用较多, 制备血红素结晶体耗时少, 容易操作, 但提取率较低。酸性丙酮法^[7]花费成本较低, 但是得到的血红素产品为浓度较低的晶体, 导致血红素在接下来的应用中受到限制。采用直接晶化法^[8]设备投资少, 整个过程容易操作, 但是得到的血红素纯度较低。

超声波辅助提取^[9-13]具有操作简单, 产生污染少, 提取率高的特点, 该技术应用于藏香猪血液中血红素的提取鲜有报道。因此本文以新鲜藏香猪血液作为研究对象, 通过超声波处理进行单因素实验, 再正交优化得到藏香猪血液血红

【课题项目】河南省科技攻关项目(项目编号: 222102310 229, 212102110337, 232102311088); 河南省高等学校重点科研项目计划(项目编号: 21B180006)。

【作者简介】李国庆(1979-), 男, 中国河南开封人, 博士, 从事生物活性物分离。

素超声波辅助提取最佳工艺。此方法对今后大规模提取血红素提供理论依据以及技术参考,对藏香猪血资源的深加具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 试剂和设备

藏香猪血液(西藏天益牲畜屠宰有限公司提供);氢氧化钠,无水乙醇,丙酮,柠檬酸,柠檬酸钠(分析纯,国药试剂公司);碱性蛋白酶(20万U/g,岳阳杰沐生物科技有限公司);血红素标准品(纯度98%,湖北双盟联合药品有限公司);所有试剂均使用超纯水进行配制。可见分光光度计(UV759,青岛聚创华业分析仪器有限公司);液相色谱仪(LC-210,杭州市柏乐科学器材有限公司)。

2.2 原料预处理

将新鲜的藏香猪血液加入0.8%(W/V)柠檬酸钠以防止血液凝固,抗凝剂与血液比为7:1,过滤后放入0~4℃冰柜,待用。

2.3 离心处理

将抗凝处理后的血液置于离心机内,以4000 r/min的速度离心10 min,弃去上清液,收集下层红细胞。将收集到的红细胞用0.9%的生理盐水洗涤3次,洗去杂质。

2.4 超声波破碎

洗涤后的红细胞加入相应去离子水,再加入亚硫酸氢钠,放入超声波细胞粉碎机中超声破碎3分钟。

2.5 旋转蒸发

将超声处理的血红素溶液进行冷冻干燥,称重,待用。得到血红素粗品。

2.6 血红素鉴定

通过紫外光谱法进行血红素鉴定。

2.7 血红素标准曲线

准确称取血红素标品0.0140g,用0.1mol/L NaOH定溶至100 mL。取上述溶液1、3、5、7、9mL,再分别用0.1 mol/L NaOH定溶至100 mL,并以0.1 mol/L NaOH溶液为空白对照组,在波长(386±0.5) nm处测定其吸光度,重复测定3次^[14]。以吸光度为Y纵坐标,质量X为横坐标,绘制标准曲线为 $Y=0.0845X+0.0088$,相关系数 $R^2=0.9986$ 。

提取到的血红素经干燥后,用0.1 mol/L NaOH溶解并配制成一定质量浓度的溶解,在波长(385±0.5) nm处测其吸光度,根据上述标准曲线计算其质量浓度。并根据质量浓度计算其纯度和提取总含量,进而计算出其得率。计算公式如下:

$$\text{血红素纯度}(\%) = \frac{C \times V \times \text{稀释倍数}}{M(\text{g})} \times 100$$

血红素总含量(g) = 提取样品总质量 × 样品中血红素纯度

血红素得率(g/100 mL) = 血红素总含量 / 100 mL 血液

式中: C为样品质量浓度; M为样品质量; V为样品液体体积。

2.8 常规方法提取藏香猪血液中血红素

参照钟耀广^[4]等研究内容,检测并计算得率为(0.320±0.017) g/100mL。

2.9 单因素实验设计

研究超声处理时间,超声功率,超声间歇时间比,红细胞与水体积比4个因素对血红素得率的影响。

2.9.1 超声处理时间对血红素提取率的影响

取20 mL藏香猪红细胞,加入80 mL的水,平均放入五个烧杯中,超声功率设定在400 W,超声处理温度30℃,超声间歇时间为超声时间40 s,停顿时间30 s,超声处理时间分别为3 min、6 min、9 min、12 min、15 min,检测并计算血红素提取率。

2.9.2 超声处理功率对血红素提取率的影响

取20 mL藏香猪红细胞,加入80 mL的水,平均放入五个烧杯中,超声处理温度30℃,超声处理时间10 min,超声间歇时间为超声时间40 s,停顿时间30 s,超声处理功率分别为250 W、300 W、350 W、400 W、450 W,检测并计算血红素提取率。

2.9.3 超声处理间歇时间比对血红素提取率的影响

取20 mL藏香猪红细胞,加入80 mL的水,平均放入五个烧杯中,超声处理温度30℃,超声处理时间10 min,超声处理功率400 W,超声间歇时间比分别为1:6、2:5、3:4、4:3、5:2,检测并计算血红素提取率。

2.9.4 红细胞与水体积比对血红素提取率的影响

取20 mL藏香猪红细胞,红细胞与水的体积比为1:1、1:3、1:5、1:7、1:9,混合均匀,放入五个烧杯中,超声处理温度30℃,超声处理时间10 min,超声处理功率400 W,超声间歇时间为超声时间40 s,停顿时间为30 s,检测并计算血红素提取率。

2.10 正交分析法的优化

分析单因素实验结果,选取超声处理时间、超声功率、超声间歇时间比、红细胞与水的体积比四个因素三水平对血红素得率的影响,见表1。利用正交实验,对超声辅助提取藏香猪血红素的工艺进行优化试验。

表1 正交试验水平表

	A 超声时间 (min)	B 超声功率 (W)	C 超声 间歇比	D 红细胞与水 体积比
1	6	350	2:5	1:3
2	9	400	4:3	1:5
3	12	450	5:2	1:7

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果及分析

3.1.1 超声时间对血红素提取率的影响

如图2所示,当超声时间为3~9 min时藏香猪血红素的得率逐渐升高,前期超声时间越长对红细胞的破碎越充分,

有利于提取溶剂的作用，血红素提取率相对较高。随着时间延长，热效应的影响会导致蛋白结构发生变化，不利于血红素提取^[14]。因此选取超声时间 6 min、9 min、12 min 为三水平进行正交实验的优化。

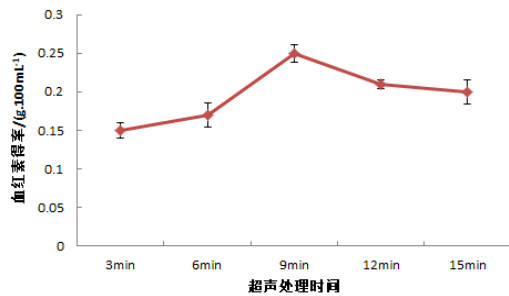


图 2 超声时间对血红素提取率影响曲线

3.1.2 超声功率对血红素提取率的影响

如图 3 所示，随着超声功率的升高血红素提取率增加，超声产生的空化作用剧烈，细胞破碎效果好，超声功率超过 300 W/100 mL 时得率增加明显。但超声功率过大，产生的热作用会引起蛋白质变性以及化学结构的破坏，导致得率下降^[15]。因此选取 350 W、400 W、450 W 为三水平条件进行正交实验的优化。

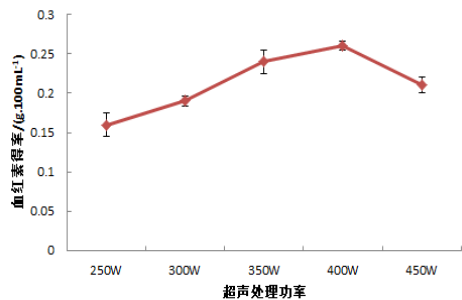


图 3 超声功率对血红素提取率影响曲线

3.1.3 超声间歇比对血红素提取率的影响

如图 4 所示，随着超声间歇比增加，藏香猪的血红素得率逐渐增加，当间歇比超过 2:5 时血红素得率呈下降趋势，血红素先增加后减少的原因可能是超声波工作产生的热量导致蛋白质变形。因此选取超声间歇比为 2:5、4:3、5:2 时为三水平条件比值进行正交实验的优化。

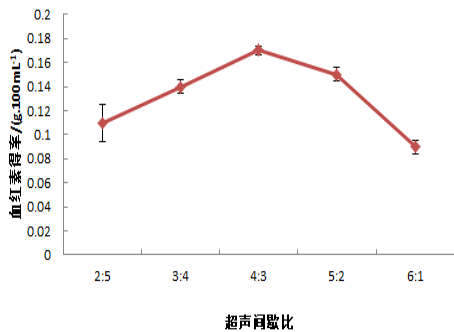


图 4 超声间歇比对血红素提取率影响曲线

3.1.4 红细胞与水体积比对血红素提取率的影响

血红素提取率随着水的增加而升高，同时血液中的红细胞与水混合后，降低了细胞外渗透压^[16]。在 1:3，1:5，1:7 时得率较高（图略），因此选取红细胞与水的体积比为 1:3，1:5，1:7 时进行三水平条件的正交实验优化。

3.2 正交优化试验结果及分析

表 2 正交试验结果及极差分析表

试验编号	A 超声时间	B 超声功率	C 超声间歇比	D 红细胞与水体积比	提取率 %
1	1	1	1	1	58.06
2	1	2	2	2	62.18
3	1	3	3	3	47.21
4	2	1	2	3	49.51
5	2	2	3	1	50.32
6	2	3	1	2	51.01
7	3	1	3	2	58.82
8	3	2	1	3	54.39
9	3	3	2	1	53.32
K1	167.45	166.39	163.43	161.07	
K2	150.48	166.89	165.01	172.01	
K3	166.53	151.54	156.35	151.11	
k1	55.81	55.46	54.48	53.90	
k2	50.28	55.63	55.01	57.33	
k3	55.51	50.51	52.11	50.37	
极差 R	5.53	5.11	2.88	6.96	
因素主次				D > A > B > C	
最优方案				D ₂ A ₁ B ₂ C ₂	

正交试验优化超声波辅助提取藏香猪血红素提取率分布见表 2，由不同组合进行血红素提取可知，不同因素对藏香猪血红素提取率的影响大小为超声温度>超声时间>超声功率>超声间歇比，即 D > A > B > C，通过对 K 值和极差分析得出藏香猪血红素提取率的最佳组合是 D₂A₁B₂C₂，即红细胞与水体积比为 1:5，超声时间 6 min，超声功率 400 W/100mL，超声间歇比 4:3，在此条件下得出的藏香猪血红素提取率为 62.18%，相较于优化前的方案提高了 13.39%。与常规提取方法比较，提取率提升近一倍，说明超声辅助提取效果显著。

3.3 产物的鉴定

3.3.1 直观对比

试验得到的血红素粗品和血红素的标准品进行对比，外观形态及颗粒结晶状态相似，颜色较标准品偏浅，为褐色，初步可以确定该产物为血红素。

3.3.2 可见光谱鉴定

称取得到的血红素样品 20.0 mg，用提前配备好的 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液标准品进行稀释，配制到 100 mL 的容量瓶。吸取取备好的血红素标准试液 1 mL，用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液定容到 100 mL，摇匀后静置一段时间，然后将两份样

品放置在液相色谱仪中,进行色谱分析。由图7可知:提取样品和标准品的色谱图基本一致,说明实验提取到的样品主要成分为血红素。

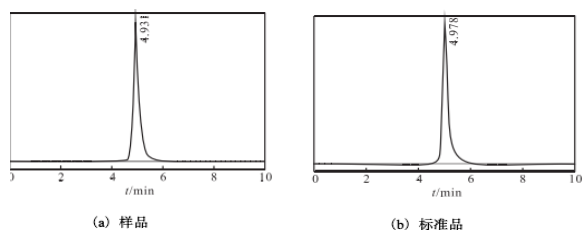


图6 高效液相色谱图分析图

4 结论

本文研究超声波方法提取藏香猪血液中血红素,考察了超声温度、超声时间、超声比功率、超声间歇比及红细胞与水体积比对血红素提取率的影响。结果显示,因素影响大小为红细胞与水体积比>超声比功率>超声时间>超声间歇比,提取血红素的最佳提取工艺条件是:红细胞与水体积比 1:5,超声时间 6 min,超声功率 400 W/100mL,超声间歇比 4:3,在此条件下血红素的得率为 (0.621 ± 0.021) g/100mL,明显优于常规冰醋酸提取方法的得率 (0.320 ± 0.017) g/100mL。该实验结果说明采用超声波辅助方法对提取藏香猪血液中血红素的优越性能。

参考文献

- [1] 徐雪萍,张云峰。藏香猪养殖技术及现状[J]。新疆农垦科技,2015,05(6):33~34。
- [2] 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。
- [3] 韩晴,王维婷,杜鹏飞等。畜禽血液中血红素的提取、检测及应用[J]。黑龙江畜牧兽医,2023,23(16):28~34。
- [4] 钟耀广。利用冰醋酸提取血素的研究[J]。食品科学,2004,

25(4):90~95。

- [5] 张远红,张伟嘉,李滢等。酶解提取肉鸽血液中血红素铁的工艺优化[J]。肉类研究,2024,38(4):17~22。
- [6] 刘晓妮,崔伟,张超等。血红素肽铁的絮凝分离工艺优化及其抗氧化活性[J]。食品研究与开发,2025,46(3):107~115。
- [7] Michael D S. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations a review of current status[J]. Chemical Engineering and Processing, 2012, 53(4):10~23。
- [8] 王君,陈红亮,张向东等。氯化血红素提取新工艺的研究[J]。当代化工,2017,30(3):125~127。
- [9] 董贝贝。血红素结合蛋白生化特性及应用进展[J]。中国实验血液学杂志,2013,21(2):513~516。
- [10] 代文婷,陶永霞,海燕等。超声波结合CMC-Na对马血中血红素提取工效果影响[J]。食品工业科技,2014,35(13):257~261。
- [11] 闫忠心,张振琪,成晓瑜等。超声辅助酶解制备猪血色素及紫外—可见吸收光谱分[J]。肉类研究,2016,30(3):1~4。
- [12] Zhang A H. Study on preparation of pure hemin[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2013, 24(5):4~5。
- [13] 张晋,吴晓丽,田雨薇等。超声波辅助酶解牦牛血粉提取氯化血红素的响应面工艺优化及品质表征[J]。浙江农业学报,2024,36(6):1357~1367。
- [14] 刘文营,张振琪,成晓瑜等。超声辅助酶解制备猪血色素及紫外—可见吸收光谱分[J]。肉类研究,2016,30(3):1~4。
- [15] Chemat F A, Khan K M. Applications of ultrasound in food technology processing preservation and extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011,18(4):813~835。
- [16] Carrer C A, Palma K M. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes[J]. Analytica Chimica Acta, 2012,12(4):100~104。