

猪血抗凝剂的筛选与抗凝条件优化研究

章斌¹, 侯小桢¹, 杨胜远^{2*}, 黄诺恩¹

(1. 韩山师范学院食品工程与生物科技学院, 广东潮州 521041; 2. 岭南师范学院化学化工学院, 广东湛江 524048)

摘要 [目的] 筛选抗凝剂配方并优化抗凝条件。[方法] 以新鲜猪血液为试材, 以血液黏度、血红蛋白 OD_{414nm} 值、血红细胞数量为指标, 研究添加不同抗凝剂后的猪血理化与生化特性。[结果] 抗凝效果最佳的抗凝剂组合与条件为柠檬酸钠 100%, pH 9.19, 添加量 6 g/L, 4 ℃ 冷藏保存; 或六偏磷酸钠 100%, pH 1.76, 添加量 4 g/L, 常温或 4 ℃ 保存。[结论] 对比该试验与他人研究结果, 选用单一或复合型抗凝剂有待进一步探讨。

关键词 猪血; 抗凝剂; 抗凝条件

中图分类号 S879.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)12-0076-03

Study on the Screening of Pig Blood Anticoagulant and Optimization of Anticoagulant Condition

ZHANG Bin¹, HOU Xiao-zhen¹, YANG Sheng-yuan^{2*} et al (1. College of Food engineering and Biotechnology, Hanshan Normal College, Chaozhou, Guangdong 521041; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract [Objective] To screen and optimize the anticoagulant formula and condition. [Method] Taking fresh pig blood as test material and blood viscosity, OD_{414nm} value as well as blood cell count as main indexes, physicochemical and biochemical characteristics of pig blood with addition of different anticoagulants were measured. [Result] Conditions and formula with best anticoagulant effect was 100% of sodium citrate, pH 9.19, adding amount 6 g/L and stored in 4 ℃, or sodium hexametaphosphate 100%, pH 1.76, adding amount 4 g/L and stored at room temperature or in 4 ℃. [Conclusion] Comparing experiments results got in this paper with others, using single or compound anticoagulant needs further study.

Key words Pig blood; Anticoagulant; Anticoagulant conditions

伴随肉类加工业的快速发展,随之产生的畜禽血液数量巨大,仅猪血每月就可采集 12 万 t^[1];而目前猪血的加工利用水平相对较低,除少量用于制备蛋白饲料外^[2],大部分直接排放,浪费资源,污染环境。据有关调查显示,猪全血中蛋白质含量 18.9%,比鸡蛋高 6.2%,比大米高 12.7%。猪全血蛋白质中含 18 种氨基酸,包括 8 种必需氨基酸和 2 种半必需氨基酸;其中赖氨酸含量高达 14.1%,是肉、乳、蛋含量的 2 倍^[3]。另外,猪血浆富含大量功能性蛋白质,如白蛋白、免疫球蛋白、纤维蛋白原及凝血酶等;除此之外,猪血还含有多种生物酶、低分子氮化物、葡萄糖、维生素等多种营养物质。因此,研究并优化猪血抗凝剂,对高值化利用猪血及其产品加工有较强的实际意义。

目前,较常用的抗凝剂有肝素钠、EDTA、草酸盐、氟化钠、柠檬酸钠^[4]。郭晋育等^[5]比较了 4 种猪血抗凝剂的抗凝血效果,其研究结果表明,由 25% 柠檬酸钠、25% 三聚磷酸钠、25% 山梨糖醇、5% 食盐、20% EDTA-2Na 组成的复合抗凝剂在浓度 15%、添加比例 4.5% 条件下效果较好。施刘翠等^[6]在 2 种磷酸钠盐对新鲜猪血抗凝特性影响的试验研究中得出,添加 0.6% 六偏磷酸钠和 0.8% 以上焦磷酸钠,可获得较佳的原血抗凝效果。笔者对比 7 种常用的单一或复合抗凝血剂并进行适宜组合筛选,旨在为畜禽血液抗凝血剂配方与条件优化提供试验参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及主要试剂。新鲜猪血,取自潮州市肉类联合加工厂有限公司;主要试剂有柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸二氢钠、六偏磷酸钠、氯化钠、磷酸二氢钠、柠檬酸钠、三聚磷酸钠、山梨糖醇、食盐、EDTA-2Na。

1.1.2 主要仪器设备。TGL-16gR 型高速台式冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;NDJ 系列数显黏度计,上海方瑞仪器有限公司;PHSJ-3F 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;JY3002 型电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司;B204 型学生数码显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抗凝血剂组合确定。组合 1(A),柠檬酸 10.19%、柠檬酸钠 81.98%、磷酸二氢钠 7.82%;组合 2(B),柠檬酸 26.67%、柠檬酸钠 73.33%;组合 3(C),柠檬酸钠 100%;组合 4(D),柠檬酸 2.63%、柠檬酸钠 19.71%、六偏磷酸钠 12.35%、氯化钠 65.31%;组合 5(E),柠檬酸 2.63%、柠檬酸钠 19.71%、磷酸二氢钠 12.35%、氯化钠 65.31%;组合 6(F),六偏磷酸钠 100%;组合 7(G),柠檬酸钠 25%、三聚磷酸钠 25%、山梨糖醇 25%、食盐 5%、EDTA-2Na 20%。

准确称取上述抗凝血剂组合各 2.50 g,用蒸馏水定容至 25 mL,测定 pH;再分别与 475 mL 新鲜猪血充分混合(即抗凝血剂使用量为 5 g/L),于室温和 4 ℃ 下保存 24 和 48 h 后观察抗凝效果。

1.2.2 指标测定。选取添加“1.2.1”各抗凝血剂组合后不产生凝血的猪血为对象,测定如下指标:①血液黏度测定。采用 NDJ 系列数显黏度计测定。②血红蛋白 OD_{414nm} 值。量

基金项目 广东省省部产学研结合项目(2013B090600001);广东普通高校工程技术创新中心项目(GCZX-A1415)。

作者简介 章斌(1981—),男,湖南益阳人,副教授,硕士,从事食品加工与质量安全研究。* 通讯作者,教授,博士,从事食品微生物安全控制研究。

收稿日期 2017-01-00

取 20 mL 猪血,于 4 000 r/min 离心 10 min 后取血浆液,用生理盐水稀释至 10 倍,于 414 nm 波长下测定吸光度。③红细胞计数。取一定量的新鲜猪血于 4 ℃、4 000 r/min 条件下高速冷冻离心 20 min,然后去血浆收集血红球,加入约 1 倍体积的 A~G 抗凝血剂,搅拌均匀后再于 4 ℃、4 000 r/min 条件下离心 20 min,去上清液取沉淀,即得血红细胞;用计数板对血红细胞进行计数。

2 结果与分析

2.1 抗凝剂配方优选

2.1.1 抗凝剂 pH 测定和抗凝效果描述。不同抗凝剂引起的猪血液混合体系 pH 变化较大,对猪血所含成分的稳定性

会产生不同的影响,如猪血含丰富的血红蛋白等成分,这些蛋白成分易在等电点范围发生沉集凝固而使猪血结块凝固。该试验测得“1.2.1”所配制的 7 种抗凝剂 A~G pH 结果依次为 5.46、4.84、7.69、4.94、4.96、2.48、8.55,其对猪血的相应抗凝效果如表 1 所示。

从表 1 可看出,组合 C、F 在常温和冷藏条件下的抗凝效果均最佳,其次为抗凝剂 B、D、G 在常温下和抗凝剂 D、G 在 4 ℃也表现出较好的抗凝效果;而加入 A、E 组合抗凝剂的猪血凝结现象严重,不列为抗凝剂筛选组合。同时,结合各抗凝剂测定结果,进一步优化抗凝剂 C、F 的 pH 并观察其抗凝效果,结果见表 2。

表 1 不同抗凝剂对猪血的凝固效果
Table 1 Effects of different anticoagulants on blood coagulation

放置温度 Stored temperature	抗凝剂 Anticoagulant	猪血放置状态描述 Description of pig blood status	
		放置 24 h Stored for 24 h	放置 48 h Stored for 48 h
常温 Ordinary temperature	A	大部分凝结成块	完全凝结
	B	少量凝结,大部分为胶体溶液状	少量凝结,大部分为胶体溶液状
	C	大部分为胶体溶液状	大部分为胶体溶液状
	D	少量凝结,大部分为胶体溶液状	完全凝结
	E	部分凝结	完全凝结
	F	大部分为胶体溶液状	大部分为胶体溶液状
	G	大部分为胶体溶液状	大部分为胶体溶液状
冷藏(4 ℃) Cold storage	A	大部分凝结成块	完全凝结
	B	大部分凝结成块	大部分凝结成块
	C	大部分为胶体溶液状	大部分为胶体溶液状
	D	少量凝结,大部分为胶体溶液状	部分凝结
	E	少量凝结	大部分凝结成块
	F	少量凝结,大部分为胶体溶液状	少量凝结,大部分为胶体溶液状
	G	少量凝结,大部分为胶体溶液状	部分凝结

表 2 抗凝剂 C、F 对猪血的抗凝效果
Table 2 Effects of anticoagulants C, F on pig blood

抗凝剂 Anticoagulant	抗凝剂 pH pH value	放置温度 Stored temperature//℃	猪血放置状态描述 Description of pig blood status	
			放置 24 h Stored for 24 h	放置 48 h Stored for 48 h
C	7.19	常温	部分凝结	大部分凝结
		4	几乎完全凝结	完全凝结
	7.69	常温	几乎完全凝结	完全凝结
		4	几乎完全凝结	完全凝结
	8.19	常温	部分凝结	大部分凝结
		4	大部分凝结	几乎完全凝结
	8.69	常温	几乎完全凝结	大部分凝结
		4	少量凝结	少部分凝结
	9.19	常温	基本无凝结块	少部分凝结
		4	部分凝结	部分凝结
	9.69	常温	几乎完全凝结	完全凝结
		4	大部分凝结	几乎完全凝结
F	1.26	常温	少量凝结	少部分凝结
		4	基本无凝结块	基本无凝结块
	1.76	常温	基本无凝结块	少量凝结
		4	少量凝结	少量凝结
	2.26	常温	部分凝结	大部分凝结
		4	部分凝结	部分凝结
	2.76	常温	基本无凝结块	少量凝结
		4	部分凝结	大部分凝结
	3.26	常温	部分凝结	大部分凝结
		4	部分凝结	大部分凝结
	3.76	常温	极少量凝结	少部分凝结
		4	少量凝结	部分凝结

从表 2 可看出,对于添加抗凝剂并于常温条件贮放的猪血而言,抗凝剂 F 在 pH 1.76~3.76 范围内表现出较好的抗凝效果,且 pH 1.76 时的效果最佳;抗凝剂 C 在 pH 9.19 时表现出较好的抗凝效果。另一方面,对于添加抗凝剂并于 4℃ 贮放的猪血而言,抗凝剂 F 和抗凝剂 C 分别在 pH 1.26、8.69 时有较好的抗凝效果。因此,该试验确定抗凝剂 C 的最佳 pH 为 9.19,抗凝剂 F 的最佳 pH 为 1.26。

2.1.2 抗凝剂对血液黏度的影响。黏度是流体黏滞性的一种量度和流体流动力对其内部摩擦现象的直观反映。在“2.1.1”试验结果基础上,对常温和冷藏条件抗凝效果较好的猪血进行黏度测定,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,在常温和 4℃ 条件下,添加抗凝剂 C 的猪血黏度最低,抗凝效果最佳;抗凝剂 F 对 4℃ 贮放的猪血同样也表现出较好的抗凝效果。

表 3 不同抗凝剂对猪血液黏度的影响
Table 3 Effects of different anticoagulants on pig blood viscosity

放置温度 Stored temperature	抗凝剂 Anticoagulant	黏度均值 Mean of viscosity mPa·s
常温 Ordinary temperature	B	25.3
	C	23.0
	D	36.7
	F	29.7
	G	28.3
冷藏(4℃) Cold storage	C	22.0
	D	26.7
	F	27.0
	G	26.7

2.1.3 抗凝剂对血红蛋白 OD_{414 nm} 值的影响。对“2.1.1”中常温和冷藏条件下抗凝效果较好的猪血进行血红蛋白的吸光度值测定,结果如表 4 所示。

由表 4 可知,常温和 4℃ 条件贮放的猪血,添加抗凝剂 C 所分离的血红蛋白 OD 值最低,其次为添加抗凝剂 F。

2.1.4 抗凝剂对血红细胞数量的影响。由表 5 可见,常温和 4℃ 条件贮放的猪血,添加抗凝剂 C、F、G 的猪血血红细胞数量最多,其他几种抗凝剂影响差异不大。综合上述不同抗凝剂对猪血贮放状态、猪血液的黏度值、血红蛋白 OD_{414 nm}

值、血红细胞数量分析,该试验选择 C、F 为适宜抗凝剂。

表 4 不同抗凝剂对猪血血浆 OD_{414 nm} 值的影响
Table 4 Effects of different anticoagulants on pig blood OD_{414 nm}

放置温度 Stored temperature	抗凝剂 Anticoagulant	OD _{414nm} 均值 Mean of OD _{414 nm}
常温 Ordinary temperature	B	0.053
	C	0.034
	D	0.054
	F	0.045
	G	0.055
冷藏(4℃) Cold storage	C	0.028
	D	0.047
	F	0.035
	G	0.039

表 5 抗凝剂对猪血血红细胞数量的影响
Table5 Effects of anticoagulant on the number of red blood cells in pig blood

放置温度 Stored temperature	抗凝剂 Anticoagulant	细胞数 Cell number//个/μL
常温 Ordinary temperature	B	1.375×10 ⁶
	C	1.025×10 ⁷
	D	1.95×10 ⁶
	F	5.725×10 ⁶
	G	6.075×10 ⁶
冷藏(4℃) Cold storage	C	1.115×10 ⁷
	D	1.95×10 ⁶
	F	1.08×10 ⁷
	G	9.575×10 ⁶

2.2 抗凝剂添加量对抗凝效果的影响 在“2.1”试验结果的基础上,进一步考察抗凝剂 C、F 的添加量对猪血常温和 4℃ 的抗凝效果,结果见表 6。

从表 6 可看出,添加 6 g/L 的抗凝剂 C 对贮放于常温和 4℃ 的猪血总体表现出较好的抗凝效果;而添加 4 和 6 g/L 的抗凝剂 F 对贮放于常温和 4℃ 的猪血总体表现出较好的抗凝效果。

表 6 抗凝剂添加量对猪血的影响
Table 6 Effects of anticoagulant dosage on pig blood

抗凝剂 Anticoagulant	添加量 Dosage g/L	放置温度 Stored temperature//℃	现象 Phenomenon	
			放置 24 h Stored for 24 h	放置 48 h Stored for 48 h
C	2	常温	大部分凝结	完全凝结
		4	完全凝结	完全凝结
	3	常温	大部分凝结	完全凝结
		4	大部分凝结	几乎完全凝结
	4	常温	大部分凝结	完全凝结
		4	大部分凝结	几乎完全凝结
	5	常温	大部分凝结	几乎完全凝结
		4	极少量凝结	少部分凝结
	6	常温	部分凝结	部分凝结
		4	基本无凝结块	基本无凝结块

参考文献

[1] 刘文玉,刘德灿,魏长庆,等. 番茄籽油脱臭馏出物中天然维生素 E 提取工艺的研究[J]. 粮食与油脂,2016,29(9):52-55.

[2] 唐智亮,王红. 分子蒸馏的应用及发展[J]. 现代化工,2014,34(10):44-48.

[3] 时洪亮,张庆,徐世艾. 分子蒸馏分离莪术油中 β -榄香烯[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版),2012,25(1):74-78.

[4] 杨艳芹,袁凯龙,夏琛,等. 分子蒸馏分离废次烟末致香成分及在烟草中的应用[J]. 应用化学,2015,32(12):1448-1454.

[5] 林文,史益强,黄德春,等. 分子蒸馏分离米糠毛油中游离脂肪酸的工艺研究[J]. 中国粮油学报,2015,30(2):68-73.

[6] 郭剑霞,王昌禄,吴志建,等. 分子蒸馏富集华山松籽油中亚油酸的研究[J]. 中国油脂,2011,36(4):40-43.

[7] 朱振雷,操丽丽,姜绍通,等. 分子蒸馏技术纯化甘油二酯工艺优化及产品分析[J]. 食品科学,2014,35(20):43-47.

[8] 曹建兰,卢俏,张煜. 分子蒸馏技术纯化辣椒碱类物质的工艺条件优化[J]. 食品科学,2014,35(12):60-64.

[9] 董宏祯,夏金梅,汤培平,等. 分子蒸馏技术富集微生物油脂中花生四烯酸[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2012,51(4):802-806.

[10] 张新新,李进伟,刘元法,等. 分子蒸馏精制灵芝孢子油的工艺研究[J]. 中国油脂,2013,38(7):12-15.

[11] 王倩倩,傅忠君,孙红翠. 化工分子蒸馏设备及应用技术[J]. 现代化工,2011,31(S1):385-388.

[12] 林文,田龙,王志祥,等. 尿素包合法联合分子蒸馏技术提纯乙酯化鱼油中 EPA 及 DHA 的工艺研究[J]. 中国粮油学报,2012,27(12):84-88.

[13] 陈焱,方学智,费学谦. 油茶籽油脱臭馏出物维生素 E 的分子蒸馏工艺研究[J]. 江西农业大学学报,2012,34(1):175-178.

(上接第 78 页)

续表 1

抗凝剂 Anticoagulant	添加量 Dosage	放置温度 Stored	现象 Phenomenon	
	g/L	temperature//℃	放置 24 h Stored for 24 h	放置 48 h Stored for 48 h
F	7	常温	大部分凝结	大部分凝结
		4	部分凝结	大部分凝结
	2	常温	几乎完全凝结	完全凝结
		4	部分凝结	大部分凝结
	3	常温	大部分凝结	几乎完全凝结
		4	几乎完全凝结	完全凝结
	4	常温	基本无凝结块	基本无凝结块
		4	基本无凝结块	基本无凝结块
	5	常温	大部分凝结	几乎完全凝结
		4	基本无凝结块	基本无凝结块
	6	常温	基本无凝结块	基本无凝结块
		4	基本无凝结块	基本无凝结块
	7	常温	少量凝结	部分凝结
		4	部分凝结	基本无凝结块

3 结论

根据抗凝剂加入猪血后的现象,以及猪血黏度值、OD 值和血红细胞数量的综合分析,抗凝剂 C 在 pH 9.19、添加量 6 g/L、4℃保存条件下,表现出较好的抗凝效果;抗凝剂 F 在 pH 1.76、添加量 4 g/L、常温和 4℃保存条件下,对猪血有较好的抗凝效果。郭晋育等^[5]的研究表明,复合型抗凝剂较单一化合物有更好的抗凝血效果,该试验研究与其结论存在较明显差异,可能受到猪血本身的新鲜程度、贮放环境条件等客观因素所限,还有待进一步探讨。

猪血与抗凝剂混合体系的 pH 对猪血中血红蛋白等蛋白成分的存在状态有较大影响,从而对猪血凝结与否有较直接的作用。该研究仅在特定的几组抗凝剂范围内开展了抗凝

效果和条件研究,适于猪血抗凝的配方与条件需做进一步筛选。

参考文献

[1] 张丽萍,李开雄. 畜禽副产物综合利用技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2009:10-11.

[2] 唐精,方怀义,梁广尧,等. 草鱼对血球蛋白粉离体消化的研究[J]. 饲料工业,2006,27(1):50-51.

[3] 车振明,高平. 猪血的综合开发和利用[J]. 农牧产品开发,2000(3):29-30.

[4] 凌云霄,王雅静. 正交实验优化新型血液抗凝剂的使用条件[J]. 肉类工业,2015(1):35-38.

[5] 郭晋育,吴明文,张立娟,等. 四种猪血抗凝剂抗溶血效果比较及新复合型抗凝剂最佳使用条件研究[J]. 畜牧与饲料科学,2011,32(8):5-6.

[6] 施刘翠,陈从贵,蔡克周,等. 两种磷酸钠盐对新鲜猪血抗凝特性影响的实验研究[J]. 食品工业科技,2012,33(3):95-98.