

四角蛤蜊制备复合氨基酸螯合钙的工艺优选

陈涛¹, 刘睿^{1,2}, 吴皓^{1,2*}, 程建明^{1,2}, 王欣之^{1,2}, 王令充^{1,2}, 谢冬云¹, 李娜¹
(1. 南京中医药大学 江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室, 南京 210023;
2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] **目的:**以四角蛤蜊为原料,制备复合氨基酸螯合钙,为天然补钙产品的开发提供参考。**方法:**以螯合率与钙离子质量分数为指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察反应温度、时间、钙离子与氨基酸摩尔比及pH对复合氨基酸与贝壳钙螯合工艺的影响。利用红外光谱分析四角蛤蜊复合氨基酸和螯合产物。**结果:**最佳螯合条件为pH 4.5,反应温度55℃,反应时间2h,钙离子与氨基酸摩尔比1.5:1。钙离子质量分数79.57 mg·g⁻¹。复合氨基酸与钙离子配位后的氨基特征吸收由3 056.49 cm⁻¹红移至3 245.30 cm⁻¹,羰基特征吸收由1 573.53 cm⁻¹蓝移至1 559.65 cm⁻¹。**结论:**优选的制备条件稳定可行,反应产物确认为氨基酸螯合钙,为复合氨基酸螯合钙的工业化生产提供参考。

[关键词] 四角蛤蜊; 氨基酸螯合钙; 钙离子; 螯合率

[中图分类号] R283.6;R284.1;O657.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0025-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080025

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150225.1609.006.html>

[网络出版时间] 2015-02-25 16:09

Optimization of Preparation Process of Compound Amino Acid Chelated Calcium from *Macra veneriformis*

CHEN Tao¹, LIU Rui^{1,2}, WU Hao^{1,2*}, CHENG Jian-ming^{1,2}, WANG Xin-zhi^{1,2}, WANG Ling-chong^{1,2}, XIE Dong-yun¹, LI Na¹ (1. Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-resource Pharmaceutics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare compound amino acid chelated calcium by taking *Macra veneriformis* as raw materials. **Method:** With chelation ratio and calcium content as indexes, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to investigate effects of pH, reaction temperature, reaction time and molar ratio of calcium to amino acid on chelating process. Infrared spectroscopy was employed to analyze compound amino acid chelated calcium. **Result:** Optimum conditions was as following: pH of 4.5, reaction temperature of 55℃, reaction time of 2 h, molar ratio of calcium to amino acids of 1.5:1. The content of calcium was 79.57 mg·g⁻¹. After coordination of compound amino acid and calcium, characteristic absorption of amino shifted from 3 056.49 cm⁻¹ to 3 245.30 cm⁻¹, characteristic absorption of carbonyl moved from 1 573.53 cm⁻¹ to 1 559.65 cm⁻¹. **Conclusion:** This chelating process is stable and feasible, reaction product is recognized as an amino acid chelated calcium, which can provide theoretical basis for industrial production of compound amino acid chelated calcium.

[Key words] *Macra veneriformis*; amino acid chelated calcium; calcium; chelation ratio

钙是人体内含量最高的矿物质元素,是生命必不可少元素,对维持人体正常生理代谢具有重要

[收稿日期] 20140822(015)

[基金项目] 国家公益性行业专项(201305007,201405017);国家高新技术研究发展计划项目(2013AA093003);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

[第一作者] 陈涛,在读硕士,从事中药学研究,Tel:025-85811206,E-mail:langtaopursuing@sina.cn

[通讯作者] *吴皓,博士生导师,从事中药炮制学、海洋药物研究,Tel:025-85811206,E-mail:whao5795@vip.sina.com

作用。研究表明人体 99% 钙以骨盐形式存在于骨骼和牙齿中,其余都分布在软组织中,细胞外液中的钙仅占总钙量的 0.1%^[1]。骨是钙沉积的主要部位,日常生活中如果钙摄入量不足,人体就会出现生理性钙透支,若人体长期处于负钙平衡状态,会导致多种疾病的发生。补钙产品在保健品市场一直占有重要位置,种类层出不穷,但普遍存在吸收率低、价格昂贵等问题^[2]。随着氨基酸螯合钙的研究深入,第三代补钙产品已在保健品市场上崭露头角,具有高吸收率、双重营养、副作用小等优点^[3]。我国东部沿海四角蛤蜊资源丰富,以辽宁、山东及江苏(连云港、南通)沿海地区产量最高^[4]。本实验以四角蛤蜊为原料,综合利用其软体废弃物与废弃蛤壳作为氨基酸来源和钙源,通过单因素试验和正交试验优选复合氨基酸螯合钙的螯合条件,以满足未来保健市场对天然补钙产品的需求。

1 材料

3-16pk 型高速离心机(美国 Sigma 公司),PB-10 型 pH 计(德国赛多利斯集团),FA20004 型分析天平(上海上平仪器公司),Tensor 37 型傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker),Q-500B2 型高速多功能打粉机(上海冰都电器有限公司),SXL-1216 型程控箱式电炉(上海精宏实验设备有限公司)。四角蛤蜊由江苏省海洋水产研究所提供,经江苏省海洋水产研究所万夕和研究员鉴定为蛤蜊科动物四角蛤蜊 *Macra veneriformis*; 复合氨基酸(自制,提取四角蛤蜊总多糖后肉渣酶解所得),活性钙粉(自制,以 CaO 为主,由煅烧后的四角蛤蜊贝壳粉碎后制得),风胃蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司),水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 活性钙粉的制备 将四角蛤蜊贝壳洗净干燥,称取贝壳 1 kg 置于 1 000 °C 马弗炉中煅烧 2 h,冷却后粉碎过 80 目筛,得活性钙粉。

2.2 复合氨基酸的测定^[5] 取经处理后的四角蛤蜊肉渣 50 g,加 3 倍水,用氢氧化钠溶液调节 pH 6.5,调节温度 55 °C,加入 7.5% 风味蛋白酶酶解 2 h,酶解液沸水浴灭活 10 min,于 6 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃沉淀,上清液用水调节浓度待用。复合氨基酸浓度采用甲醛滴定法^[6]测定。吸取复合氨基酸酶解液样品 20 mL,加入水 60 mL,开动磁力搅拌器用 0.05 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 8.2,精密加入中性甲醛溶液 10 mL,用氢氧化钠调 pH 9.2,记下消耗氢氧化钠的体积(V_1)。取水 80 mL,按上述

方法调节 pH,消耗氢氧化钠体积(V_0),作为空白对照。按 $(V_1 - V_0) \times 0.05/0.02$ 计算复合氨基酸浓度。

2.3 复合氨基酸螯合钙的制备 复合氨基酸酶解液加入适量活性钙粉,用盐酸调节 pH,稳定温度,水浴反应后抽滤,滤液加无水乙醇沉淀,过夜,抽滤,沉淀干燥,即得。

2.4 复合氨基酸钙含量、螯合率的测定 利用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 滴定法检测复合氨基酸中钙含量及螯合率^[7-8]。精密称取螯合钙粉末约 0.15 g,加水 30 mL 使溶解,加入甲基红指示剂 2~3 滴,滴加 10% 氢氧化钾至溶液变黄色,再加入 10% 氢氧化钾 10 mL,加入适量钙黄绿色指示剂,用 0.05 mol·L⁻¹ EDTA 标准液滴定至溶液黄绿色消失变为橙色,即为滴定终点。取 EDTA 按上述方法作为空白对照。

$$\text{钙含量} = (V_1 - V_2) \times 0.05 \times 40/m_2;$$

$$\text{螯合率} = [(V_1 - V_2) \times 0.05 m_1 / N \times m_2] \times 100\%$$

式中 N 为反应体系中总钙摩尔数, m_1 为螯合钙产物总量, m_2 称取供检样品质量, V_1 为消耗 EDTA 溶液体积, V_2 为空白试验消耗 EDTA 体积。

2.5 单因素试验考察

2.5.1 pH 量取酶解液 6 份,每份 50 mL,钙离子与氨基酸摩尔比 1:2, pH 分别为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 于 50 °C 螯合反应 2 h。加乙醇沉淀氨基酸螯合钙后,测得钙质量分数分别为 46.4, 63.6, 71.2, 64.0, 60.4, 59.2 mg·g⁻¹, 计算钙离子螯合率分别为 2.92%, 18.08%, 25.72%, 22.40%, 6.28%, 3.20%。说明随 pH 的升高,螯合率和钙含量分别呈现先升高后降低的趋势,当 pH 5.0 时同时达峰值。这是由于随着 pH 升高 H⁺ 浓度减小,使得 Ca²⁺ 与 -NH₂ 和 -COOH 的配位能力增强;当 pH > 5.0 时螯合率与钙含量呈下降趋势,说明溶液中碱性增强,不利于复合氨基酸钙的生成,选择螯合物最佳反应 pH 5.0。原因可能是当反应液中存在大量 H⁺ 时, H⁺ 需要大量供电基团以形成稳定的物质,与 Ca²⁺ 争夺供电基团,会减少 Ca²⁺ 的供电基团,减少螯合物的形成。当 pH 增大时, H⁺ 浓度减小, OH⁻ 与钙离子形成了氢氧化钙沉淀,其稳定系数大于螯合钙,故而大大减少了螯合钙的形成^[9]。

2.5.2 温度 取酶解液 6 份,每份 50 mL,钙离子与氨基酸摩尔比 1:2, pH 5.0, 温度分别为 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C, 螯合时间 2 h, 用乙醇沉淀氨基酸螯合钙,测得钙质量分数分别为 63.6, 65.2, 65.6,

66.0,61.6,59.6 mg·g⁻¹, 螯合率分别为 22.27%, 23.00%, 22.98%, 23.26%, 16.34%, 15.09%。提示随着温度升高,钙离子螯合率与钙含量先增大后减小,并在 50℃ 时达峰值。这是因为螯合反应是放热反应,温度过高不利于反应进行,故选择螯合反应温度 50℃。

2.5.3 时间 取酶解液 50 mL,共 5 份,钙离子与氨基酸摩尔比 1:2,pH 5.0,温度 50℃,反应时间分别为 1,2,3,4,5 h,用乙醇沉淀氨基酸螯合钙,计算钙质量分数分别为 74.4,72.0,71.2,68.0,67.6 mg·g⁻¹,螯合率分别为 23.60%, 25.47%, 24.32%, 24.41%, 18.57%。钙含量随着时间不断增加逐渐降低,但并不明显。这可能是因为通过螯合作用产生的氨基酸螯合钙与钙离子平衡,随着反应时间的增加发生了动态的配合和解离过程。

2.5.4 摩尔比 取酶解液 50 mL,共 9 份,钙离子与氨基酸的摩尔比分别为 1:3,1:2.5,1:2,1:1.5,1:1,1.5:1,2:1,2.5:1,3:1,pH 5.0,温度 50℃,反应时间 2 h,加乙醇沉淀氨基酸螯合钙,计算钙质量分数分别为 51.1, 52.9, 54.0, 55.3, 63.9, 76.1, 74.5,75.7,75.3 mg·g⁻¹,螯合率分别为 29.70%, 25.01%, 21.62%, 19.54%, 14.27%, 9.79%, 7.12%, 5.64%, 4.54%。随着氨基酸比例逐渐增加,钙离子螯合率逐渐升高,这是由于化学平衡使大量钙离子被利用,但会造成氨基酸的浪费,提高生产成本,说明仅以螯合率为考核指标是不合理的。当钙含量达到最高时即表示氨基酸被充分利用,故选择钙与氨基酸摩尔比 1.5:1。

2.6 正交试验 在单因素试验基础上,选择反应温度、时间、钙离子与氨基酸摩尔比及 pH 为考察因素,通过正交试验优选螯合条件,量取酶解液 27 份,每份 50 mL,平行 3 份,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,影响螯合效果各因素顺序为 C>A>D>B。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A,C,D 均无显著性影响,得最佳组合为 A₁B₂C₁D₂,即温度为 45℃,pH 4.5,钙离子和氨基酸摩尔比 1.5:1,反应时间 2 h。量取酶解液 200 mL,共 3 份,按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,计算氨基酸螯合钙中钙质量分数分别为 79.43,80.01,79.27 mg·g⁻¹,说明优选的工艺稳定可行。

2.7 螯合产物红外光谱分析^[10-11] 由于氨基酸的存在形式不同,导致螯合态氨基酸与游离氨基酸红外吸收光谱不同^[12]。这是因为氨基酸的氨基上 N

表 1 复合氨基酸螯合钙制备工艺正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of preparation process of compound amino acid chelated calcium

No.	A pH	B 时间 /h	C 温度 /℃	D 钙离子与氨基酸摩尔比	钙离子 /mg·g ⁻¹
1	4.5	1.5	45	1:1	75.88
2	4.5	2.0	50	1.5:1	77.68
3	4.5	2.5	55	2:1	74.34
4	5.0	1.5	50	2:1	60.13
5	5.0	2.0	55	1:1	67.96
6	5.0	2.5	45	1.5:1	78.23
7	5.5	1.5	55	1.5:1	71.98
8	5.5	2.0	45	2:1	70.57
9	5.5	2.5	50	1:1	53.83

表 2 钙离子质量分数方差分析

Table 2 Variance analysis of calcium content

方差来源	SS	F	P
A	173.11	9.37	>0.05
B(误差)	18.48	1.00	
C	190.26	10.30	>0.05
D	165.52	8.96	>0.05

注:F_{0.05}(2,2)=19。

原子和羧基上参与配位形成螯合物产生了 p-π 共轭。精密称取复合氨基酸螯合钙 0.1 g,置于 Tensor 37 型傅里叶变换红外光谱仪中进行检测,利用红外光谱分析四角蛤蜊复合氨基酸和螯合产物,见图 1。结果显示复合氨基酸与钙离子配位后的氨基特征吸收由 3 056.49 cm⁻¹ 红移至 3 245.30 cm⁻¹,羰基特征吸收由 1 573.53 cm⁻¹ 蓝移至 1 559.65 cm⁻¹。说明氨基和羧基的吸收峰都发生了明显位移,氨基上的氮原子和羧基上的氧原子均参与了螯合反应,证明了反应产物确实为氨基酸螯合钙。

3 讨论

四角蛤蜊作为中国沿海重要的低值贝类资源,主要栖息于潮间带中下区及浅海的泥沙滩中,在我国沿海分布极广、产量大,将其综合利用变废为宝,满足市场对海洋活性钙的需求具有重要意义。本文经过大量研究利用单步酶解技术将蛤蜊肉渣充分酶解得到相应复合氨基酸,与煅烧后的活性钙通过化学反应相结合,现将四角蛤蜊一分为二,再将其合二为一,得到较为天然的补钙产品,同时兼有补充氨基酸的功效,更具保健意义。优化的复合氨基酸螯合钙制备工艺钙含量较高,更适于工业化生产。

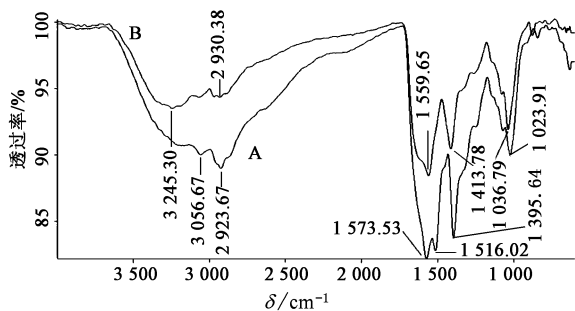


图1 四角蛤蜊复合氨基酸(A)和螯合产物(B)IR
Fig.1 Infrared spectrum of compound amino acid (A) and chelated products (B)

[参考文献]

[1] 王雄清,陈封政. 人体钙的生理作用与合理补钙[J]. 绵阳师范学院学报,2004,23(5):62-66.
[2] 李翠芹,何腊平,仇保全. 氨基酸螯合钙的研究进展[J]. 食品研究与开发,2011,32(10):162-164.
[3] 甘林火,翁连进,邓爱华. 制备氨基酸螯合钙的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2008,30(1):44-46.
[4] 常念,吴皓,陈蕾. 四角蛤蜊药用研究进展[J]. 中华

中医药学刊,2009,27(2):291-293.
[5] 蒋金来,王令充,吴皓,等. 双酶水解四角蛤蜊工艺优化研究[J]. 食品工业科技,2013,34(2):214-217.
[6] 赵新淮,冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学,1994(11):65-67.
[7] 杜冰,蔡巽楷,谢伊澄,等. 蛋壳粉制备氨基酸螯合钙工艺优化[J]. 食品工业科技,2011,32(4):287-289,292.
[8] 桑亚新,王昌禄,王苏,等. 利用扇贝壳制备胶原螯合钙的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(5):49-55.
[9] 王家明,魏玉西,殷邦忠,等. 以牡蛎壳为钙源的谷氨酸螯合钙制备工艺研究[J]. 中国海洋药物杂志,2010,29(2):22-26.
[10] 许良忠,文丽荣. 过渡金属-甘氨酸配合物的IR光谱[J]. 光谱实验室,2002,19(5):641-643.
[11] 胡振珠,杨贤庆,马海霞,等. 罗非鱼骨粉制备氨基酸螯合钙及其抗氧化性研究[J]. 食品科学,2010,31(20):141-145.
[12] 王俊,程薇,曾汉庭,等. L-天门冬氨酸钙螯合物的合成研究[J]. 湖北农业科学,2007,46(4):634-636.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,收取高额审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

②http://www.syfjxzz.com 为本刊唯一域名。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。