

# 牡蛎壳源 L-天冬氨酸螯合钙的结构表征及特性研究\*

王真, 姜岁岁, 张帆, 王润芳, 冯雪, 汪瑞, 李诗洋, 赵元晖\*\*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 本文以牡蛎壳为钙源, 制备 L-天冬氨酸螯合钙, 第一次较完整地探究其结构和理化特性。通过扫描电镜、红外光谱和质谱等技术表征螯合钙的结构, 并对其物理化学特性进行研究。研究表明, 螯合钙的微观形态整体呈团块状, 结构较为紧密, 表面有白色晶体吸附。红外光谱结果显示, L-天冬氨酸中的氨基和羧基主要以配位结合的形式参与了钙离子的螯合反应。一二级质谱结果证明, 合成的螯合钙主要分子量响应峰值为 342.9, 其结构符合 GB29226-2012 中天门冬氨酸钙的结合方式。X 射线衍射结果表明, 所合成的 L-天冬氨酸螯合钙为非晶态物质。相比于螯合反应前, 螯合后的 L-天冬氨酸螯合钙的热稳定性得到了一定程度的提高。在 pH 为 5~8 范围内的钙保留率均在 90% 以上, 且具有良好的抗消化特性。本研究为牡蛎壳废弃物的高值化利用和开发牡蛎壳源的钙营养补充剂提供了理论基础和科学依据。

**关键词:** 牡蛎壳; L-天冬氨酸螯合钙; 结构表征; 理化特性

**中图分类号:** TS254.9; S986.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-5174(2020)12-050-09

**DOI:** 10.16441/j.cnki.hdx.20190225

**引用格式:** 王真, 姜岁岁, 张帆, 等. 牡蛎壳源 L-天冬氨酸螯合钙的结构表征及特性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(12): 50-58.

WANG Zhen, JIANG Sui-Sui, ZHANG Fan, et al. Structural characterization and physicochemical property analysis of L-aspartate chelated calcium from oyster shell[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(12): 50-58.

牡蛎(*Crassostrea gigas*)作为第一批被卫生部批准的药食同源食品, 不仅其肉质味道鲜美, 营养丰富, 而且其壳也是重要的中药材, 具有重镇安神、软坚散结、潜阳补阴的功效<sup>[1]</sup>。中国的牡蛎产量居世界首位, 2017年牡蛎的海水养殖产量达  $487.94 \times 10^4$  t, 约占贝类养殖总产量的 34%, 较 2016 年幅度增长 4.70%, 伴随而生的是大量的占牡蛎整体质量 60% 以上的牡蛎壳<sup>[2-3]</sup>。除了部分用作药材和土壤改良剂以及用于石灰生产外, 大多数牡蛎壳被填埋、堆肥和向海洋倾倒等, 引起很多环境问题。因此, 如何把废弃牡蛎壳资源化, 备受国内外研究者关注<sup>[4]</sup>。

牡蛎壳中含有大量的碳酸钙, 质量分数占 90% 以上<sup>[5]</sup>。近年来不少学者研究利用废弃牡蛎壳制备各种钙制剂, 为牡蛎壳的高值化利用提供了一些新的途径<sup>[6-8]</sup>。目前, 对于氨基酸螯合钙的结构和理化特性研究不多, 大部分仅局限于螯合物的制备, 红外和紫外分析等<sup>[9]</sup>。本试验基于 L-天冬氨酸(L-Aspartate, L-Asp)是酸性氨基酸, 且作为钙的载体及钙结合蛋白

的重要组成部分, 能被细胞膜识别, 通过特异性载体蛋白钙通道在小肠绒毛膜上皮进行主动转运吸收, 可在加热搅拌条件下直接与牡蛎壳粉反应生成 L-天冬氨酸螯合钙<sup>[8]</sup>, 经过前期的螯合条件优化后, 利用扫描电镜、红外光谱和质谱等对 L-天冬氨酸螯合钙进行结构表征, 并研究其 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)、差示扫描量热(Differential scanning calorimetry, DSC)、热重(Thermogravimetry, TG)等指标及体外稳定性等特点, 以期深入开发和研究 L-天冬氨酸螯合钙提供理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

L-天冬氨酸螯合钙(实验室自制); 胃蛋白酶(3 000 U/g, 索莱宝公司); 胰蛋白酶(50 kU/g, 索莱宝公司), 溴化钾(光谱纯)和无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、二硫腙、茚三酮、硫化钠(均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

\* 基金项目: 国家重点研究发展计划项目(2018YFD0901005); 山东省重点研究发展计划项目(2018GHY115012); 山东省自然科学基金项目(ZR2019MC014)资助

Supported by the National Key Research Program of China(2018YFD0901005); the Key Research Program of Shandong Province, China(2018GHY115012); the Natural Science Foundation of Shandong Province, China(ZR2019MC014)

收稿日期: 2019-07-21; 修订日期: 2019-11-05

作者简介: 王真(1994-), 女, 硕士生。E-mail: 1617837322@qq.com

\*\* 通讯作者: E-mail: zhaoyuanhui@ouc.edu.cn

YK 高速万能粉碎机 山东益康中药器械有限公司; CV-600 恒温水浴锅(上海福马实验设备有限公司); BD-126W 冰箱(青岛海尔电器集团); PHS-3E 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); JD500-2 型电子天平(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司); 傅立叶变换红外光谱仪 FT-IR-4100(佳司科上海贸易有限公司); FW-5A 布鲁克红外用压片机(天津博天胜达科技发展有限公司); HF-2B 红外压片模具(天津拓普仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); Tescan-vega3 扫描电子显微镜(德国 Bruker 公司); IB-3 离子镀膜仪(日本 Eiko 公司); 三重四级杆串联质谱仪 1290 Infinity II UHPLC/6460 QqQ MS(美国 Agilent 科技公司); AA-6300C 石墨炉原子吸收分光光度计(日本岛津公司); DSC250 差示扫描量热仪(美国 TA 仪器公司); TG209F3 热重分析仪(德国耐驰仪器制造有限公司); D8 Advance X 射线衍射仪(德国 Bruker 公司)。

## 1.2 实验过程

1.2.1 L-天冬氨酸螯合钙的制备<sup>[10]</sup> 根据实验室前期优化的条件, 取清洗干净的烘干牡蛎壳→用榔头敲成碎块状→将牡蛎壳碎块放入高速万能粉碎机中, 调至一档粉碎→粉碎后的壳粉过 300~200 目筛→将 L-天冬氨酸和过筛牡蛎壳粉按摩尔比 2:1 配料→加 5 倍氨基酸和壳粉总质量的蒸馏水→加热至 50 °C→调节 pH 至 5.0→恒温磁力搅拌 90 min→趁热过滤→减压浓缩至粘稠状→乙醇沉淀→离心收集沉淀→冷冻干燥得到 L-天冬氨酸螯合钙。

1.2.2 L-天冬氨酸螯合钙的定性检验<sup>[11]</sup> 取 1~3 g 样品, 加入 50 mL 无水乙醇, 搅拌静置一段时间后过滤, 向滤液中加入二硫脲试剂。若溶液变红, 说明样品中可能存在游离金属离子, 继续用乙醇洗涤, 直至二硫脲检测不变色; 之后再加入 5 滴茚三酮试剂, 电炉加热煮沸 2~3 min。若溶液不变色, 说明样品中无游离氨基酸; 若溶液变为蓝紫色, 需用无水乙醇继续分离纯化, 直至完全去除; 之后加入过量硫化钠, 静置一段时间。若有大量白色沉淀产生, 说明硫离子置换出螯合物中的钙离子, 过滤去掉沉淀, 收集滤液; 向滤液中加入 5 滴茚三酮试剂, 电炉加热煮沸 2~3 min。若溶液变为蓝紫色, 证明硫离子置换出螯合物里的钙后, 螯合态的氨基酸变为游离氨基酸。

1.2.3 L-天冬氨酸螯合钙的表面结构分析 取适量的 L-天冬氨酸螯合钙粉末均匀涂于洁净样盘双面胶上, 在 15 mA 的电流条件下真空喷金镀膜处理。将镀好膜的样品装入电镜观察室, 抽真空, 施加一定电压后, 获取不同放大倍数下扫描图像。扫描条件: 加速电压 20 kV; 束流  $9.2 \times 10^{-2}$  mA; 工作距离 9.7 mm<sup>[12]</sup>。

1.2.4 L-天冬氨酸螯合钙的红外光谱分析 取适量的 L-天冬氨酸和 L-天冬氨酸螯合钙于玛瑙研钵, 在红外烤灯下分别与少量干燥的光谱纯 KBr 充分研磨, 使其粒度在 2.5  $\mu\text{m}$  以下, 将混合粉末装入压片模具, 于红外用压片机上抽气加压, 压力为 900 kg/cm<sup>2</sup>, 维持 1.5 min, 卸掉压力得到透明的 KBr 薄片, 迅速放入样品室, 使用傅里叶变换红外光谱仪在 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 区间扫描, 得到红外光谱图<sup>[5]</sup>。

1.2.5 L-天冬氨酸螯合钙的一二级质谱分析 取少量经过纯化的 L-天冬氨酸螯合钙样品溶于超纯水中, 采用正离子模式进行一级质谱扫描, 设置电压 175.0 V, 扫描范围  $m/z$  为 100~1 000, 水: 甲醇为 7:3, 二级质谱碰撞诱导电离(CID)为碰撞能量值 55%<sup>[13-14]</sup>。

1.2.6 L-天冬氨酸螯合钙的 XRD 分析 采用 X 射线衍射仪测定牡蛎壳粉、L-天冬氨酸和 L-天冬氨酸螯合钙的结晶性能<sup>[15]</sup>。X 衍射条件为: Cu K $\alpha$  辐射源管压 40 kV, 管流 40 mA, 扫描速度 0.2°/s, 步长 0.02°, 接受狭缝 0.2 mm, 用 X 射线在  $2\theta=10^\circ\sim 80^\circ$  范围内测定样品的 X 射线衍射强度。

1.2.7 L-天冬氨酸螯合钙的 DSC 分析 在 NETZSCH STA 409 型热天平上以  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  为参比在空气中进行测定, 升温速率 5 °C/min, N<sub>2</sub> 流速 40 mL/min, 温度范围 25~200 °C<sup>[16]</sup>。

1.2.8 L-天冬氨酸螯合钙的 TG 分析 在氮气氛围中进行测定, 温度范围为 25~800 °C, 升温速率 10 °C/min<sup>[17]</sup>。

1.2.9 L-天冬氨酸螯合钙的稳定性分析<sup>[18-19]</sup>

1.2.9.1 L-天冬氨酸螯合钙的热稳定性分析 将 L-天冬氨酸螯合钙配成 0.5% 的溶液, 分别置于 60、70、80、90 和 100 °C 水浴中加热 1 h, 冷却至室温后用火焰原子吸收分光光度法测定游离钙离子含量, 每组样品平行测定 3 次。螯合物的热稳定性用钙保留率表示, 下同。

钙保留率 = (处理后结合钙量 / 初始总钙量) × 100%。

1.2.9.2 L-天冬氨酸螯合钙的酸碱稳定性分析 将 L-天冬氨酸螯合钙配成 0.5% 的溶液, 然后用浓盐酸和浓氢氧化钠溶液迅速将溶液 pH 调至 2.0~8.0, 静置 2 h 后, 用火焰原子吸收分光光度法测定游离钙离子含量, 每组样品平行测定 3 次。螯合物的酸碱稳定性用钙保留率表示。

1.2.9.3 L-天冬氨酸螯合钙的模拟胃肠消化稳定性分析

将 L-天冬氨酸螯合钙配成 0.5% 的溶液, 先经胃蛋白酶酶解 1 h (pH=2.0, 37 °C, 加酶量为 2 000 U/g), 再经胰蛋白酶酶解 1 h (pH=8.0, 37 °C, 加酶量为 2 000 U/g), 酶解后 100 °C 灭酶 10 min, 冷却至室温后用火焰原子吸收分光光度法测定游离钙含量, 每组样

品平行测定3次。螯合物的模拟消化稳定性用钙保留率表示。

### 1.3 数据处理与分析

实验结果采用 SPSS 进行显著性分析,以  $P < 0.05$  表示差异显著。利用 Origin 2018 软件作图。红外光谱数据采用 OMNIC 处理和分析, XRD 数据采用 MDI Jade 6.0 软件进行处理和分析。所有处理均设置3次重复,以(平均值±标准差)表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 L-天冬氨酸螯合钙的定性检验

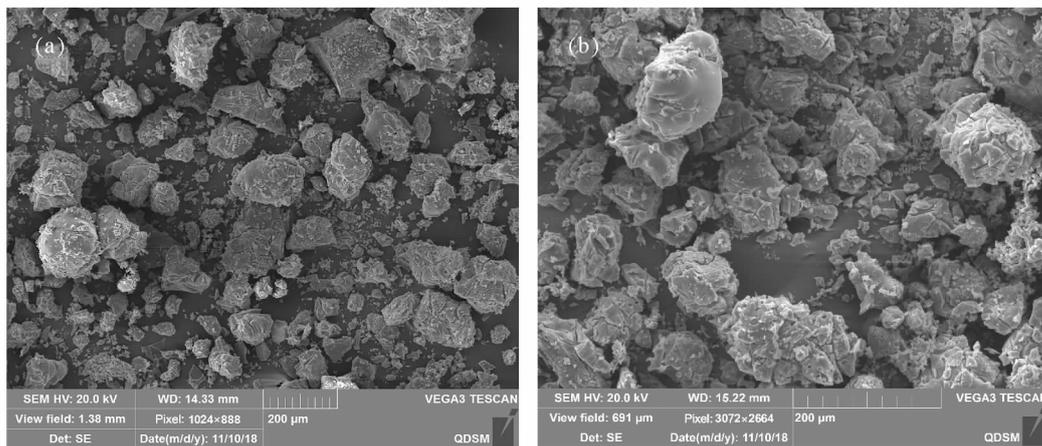
采用试验中的检测方法,未检测到螯合物中游离的钙离子和氨基酸。之后加入过量硫化钠后有大量白色沉淀产生,表明样品中有大量的钙元素;再加入茚三酮,将其置于电炉上加热一段时间后发现,溶液由黄绿色变为蓝紫色,证明螯合钙样品中氨基酸的存在。这

一结果与刘闪等<sup>[9]</sup>的研究结果一致。

### 2.2 L-天冬氨酸螯合钙的表面结构分析

采用扫描电子显微镜对 L-天冬氨酸螯合钙进行表面结构表征,分别将样品放大 200 和 1 200 倍,扫描结果见图 1。

从图 1(a)中可以看出,螯合物在放大 200 倍视野下,颗粒整体分布较为均匀,呈现团块聚集状,有细小颗粒附着其上。这种聚集状可能是牡蛎壳中的钙与 L-天冬氨酸中的氨基氮原子和羧基氧原子相互作用,多个氨基酸之间通过钙离子交联相接,形成较大的颗粒,且颗粒间可能相互吸引从而形成聚集<sup>[20]</sup>。图 1(b)中显示,螯合钙的表面粗糙,而且有较多白色晶体吸附,这可能是一些钙结晶。付文雯<sup>[21]</sup>观察了牛骨胶原多肽螯合钙的扫描电镜图片,也发现了表面“镶嵌”的白色晶体,因而推测在 L-天冬氨酸和壳粉中钙的螯合反应过程中,还可能存在一定的吸附作用。



(a)螯合钙,放大200×; (b)螯合钙,放大1200×。(a)Chelated calcium, 200×; (b) Chelated calcium, 1200×.)

图1 L-天冬氨酸螯合钙的扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron micrographs of L-Asp chelated calcium

### 2.3 L-天冬氨酸螯合钙的红外光谱分析

L-天冬氨酸和 L-天冬氨酸螯合钙的傅里叶红外光谱测定结果见图 2。对比 L-天冬氨酸的红外光谱图,可以发现 L-天冬氨酸与牡蛎壳粉经水浴螯合后,整体光谱波形出现了明显的移动。在特征区,氨基的不对称伸缩振动引起的  $3\ 031.07\ \text{cm}^{-1}$  处的宽吸收峰蓝移至  $3\ 142.92\ \text{cm}^{-1}$ ,说明 L-天冬氨酸中的 N-H 键发生化学变化;同样地,在指纹区,羰基的不对称伸缩振动引起的吸收峰  $1\ 515.29\ \text{cm}^{-1}$  红移至  $1\ 397.66\ \text{cm}^{-1}$ ,这可能是由于 L-天冬氨酸的氨基氮和羧基氧参与了配位反应,形成螯合物的结果<sup>[22]</sup>。另外, L-天冬氨酸在  $2\ 085.64\ \text{cm}^{-1}$  左右有一个吸收峰,但是螯合之后,在 L-天冬氨酸螯合钙的红外光谱图中该峰消失了,这一结果与王青等<sup>[23]</sup>报道相符,也与日本特许公报中介绍

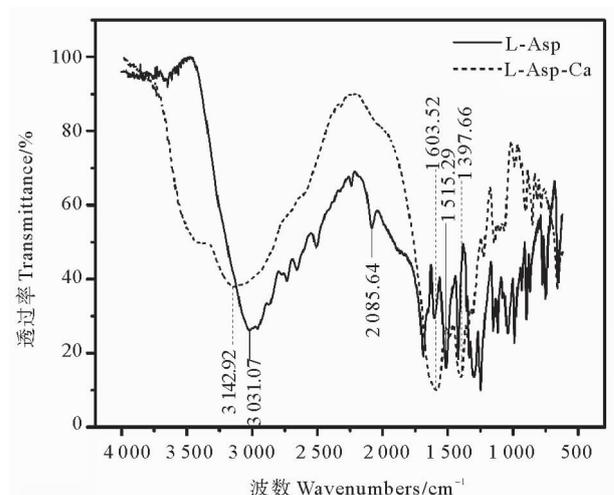


图2 L-天冬氨酸和 L-天冬氨酸螯合钙的红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of L-Asp and L-Asp chelated calcium

的  $\alpha$ -氨基酸在  $2\ 100\ \text{cm}^{-1}$  处有一特征峰, 络合后该峰就消失的研究结果相一致<sup>[24]</sup>, 进一步表明了螯合钙的生成。而且, 螯合钙谱图在  $1\ 603.52\ \text{cm}^{-1}$  处有一明显的强吸收峰, 说明 L-天冬氨酸的氨基与壳粉中的钙发生了较强的螯合作用, 有力地证明了氨基酸螯合钙的存在。这一结果与 Nara 等<sup>[25]</sup>的研究结果相似。

#### 2.4 L-天冬氨酸螯合钙的一二级质谱分析

电喷雾质谱(ESI-MS)技术具有样品用量少, 检测时间短, 灵敏度和精确度高等优点, 是目前研究金属离子结合位点的有效手段之一<sup>[14]</sup>。图 3 为以牡蛎壳为钙源的 L-天冬氨酸螯合钙一级质谱图, 从图 3 中得到  $m/z$  为 100~1 000 的离子分布情况。从图 3 中可

以看出, 其他离子峰的响应信号都较弱, 信号较强的母离子  $m/z$  为 342.9, 为单一化合物, 这与王晓萍研究报道的小麦胚芽蛋白源锌螯合肽的电喷雾质谱结果类似<sup>[26]</sup>。所合成的螯合钙主要分子量可能为 342.9, 结合 GB29226—2012 可知, 天门冬氨酸钙的  $m/z$  理论值为 304.2, 样品螯合钙中最高响应峰为 342.9, 这可能是由于在正离子模式下, 螯合钙与系统中的 K 离子结合形成  $[M+K]^+$  为 343.2 ( $342.9 \pm 0.5$ ) 的响应峰, 且该峰响应值较高, 表明所制备的 L-天冬氨酸螯合钙较纯, 符合 GB29226—2012 中天门冬氨酸钙的结合方式, 即两个天冬氨酸与一个钙配位。

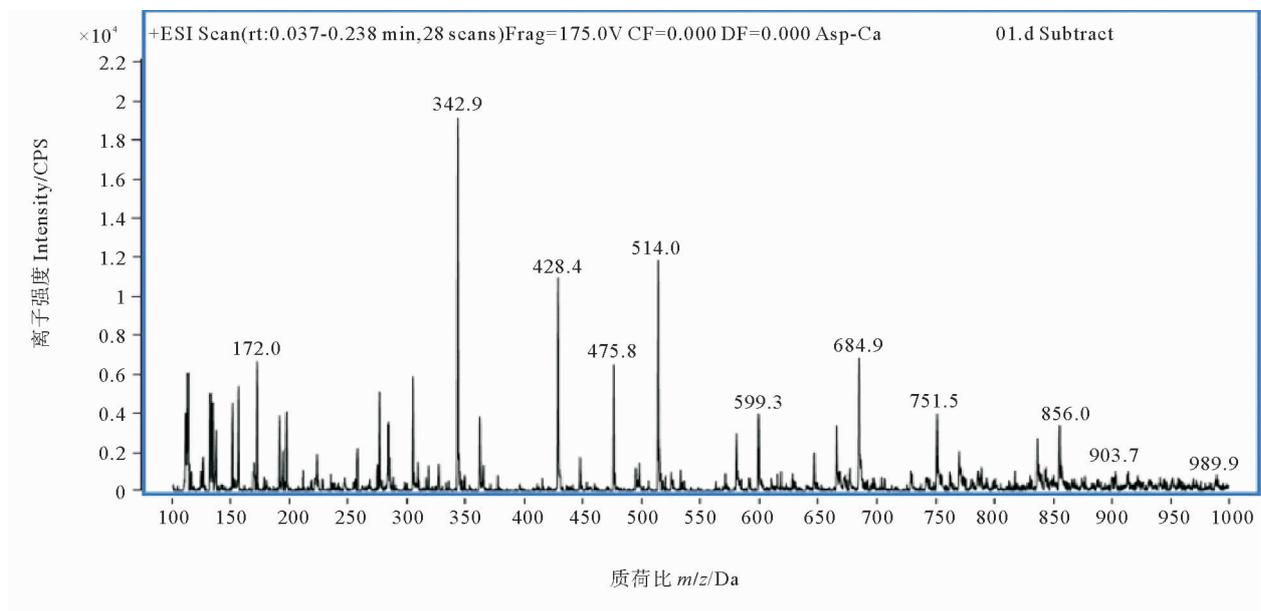


图 3 L-天冬氨酸螯合钙的一级质谱图

Fig.3 Mass spectrum of L-Asp chelated calcium

以牡蛎壳为钙源的 L-天冬氨酸螯合钙二级质谱如图 4 所示, 图 4 是选择图 3 中  $m/z$  为 342.9 (误差  $\pm 0.5$ ) 的母离子进行归一化能量 19% 的碎片结果。其中蓝色标记处的 342.8 为碎片后所选母离子峰的低丰度质荷比, 而图 4 中  $m/z$  为 276.4 的子离子峰响应值最高, 相比于母离子其相对分子量丢失了 66.5, 推测可能是螯合物结构中一些侧链基团被破碎的结果。Zhao 等<sup>[27]</sup> 研究报道了纯化肽(Phe-Asp)中的氨基和羧基可以与钙螯合形成共用电子对的情况。

#### 2.5 L-天冬氨酸螯合钙的 XRD 分析

L-天冬氨酸、牡蛎壳粉和 L-天冬氨酸螯合钙的 X-射线衍射谱图如图 5 所示。从谱图中可以看出, L-天冬氨酸与牡蛎壳粉形成螯合钙后, 原料中主要吸收峰发生了显著变化, 晶面间距( $d$ )和相对强度( $I/I_0$ )改变。螯合前, L-天冬氨酸的结晶度非常高, 主强峰  $2\theta =$

$23.72^\circ$ ,  $I/I_0 = 100\%$ , 晶面间距  $d = 3.74$ , 两个次强峰  $2\theta$  分别为  $11.80^\circ$  和  $35.92^\circ$ ,  $I/I_0$  分别是 34.1% 和 25.9%, 晶面间距  $d = 7.49$  和 5.86。牡蛎壳粉在  $2\theta$  为  $29.58^\circ$  和  $47.70^\circ$  也显示出其特有的方解石特征峰,  $I/I_0$  分别为 100% 和 22.2%。然而, 在生成的螯合钙中却未发现特征衍射峰, 只是在  $2\theta = 33.90^\circ$  处有一个较宽的弥散区域, 无结晶特性, 即该螯合钙为非晶态物质。何昇鸿等<sup>[28]</sup> 研究发现壳寡糖与铜离子生成的铜螯合物也呈非晶态, 其反应物谱图中的强峰在螯合物中完全消失, 表明了螯合物的形成。

#### 2.6 L-天冬氨酸螯合钙的 DSC 分析

通过比较螯合反应前后的 DSC 曲线图, 观察熔融峰或其他热转变峰形、峰面积等的变化, 可定性判断有无化学反应或其他相互作用的发生<sup>[29-30]</sup>。图 6 所示 L-天冬氨酸和 L-天冬氨酸螯合钙的 DSC 图。从图中可

以看出,L-天冬氨酸和它的螯合钙在 27.5 °C 有一个强放热峰。随着温度的升高,L-天冬氨酸在约 31 °C 处出现拐点,吸热速率趋向平缓,在图中所示的温度范围内尚未达到其变性温度,这与其熔点为 230 °C 相符合。

同样地,其螯合钙在 31 °C 左右也出现拐点,吸热速率减慢,但在约 135 °C 时出现了一个宽的吸热峰,这个温度点可能即 L-天冬氨酸螯合钙的变性温度。

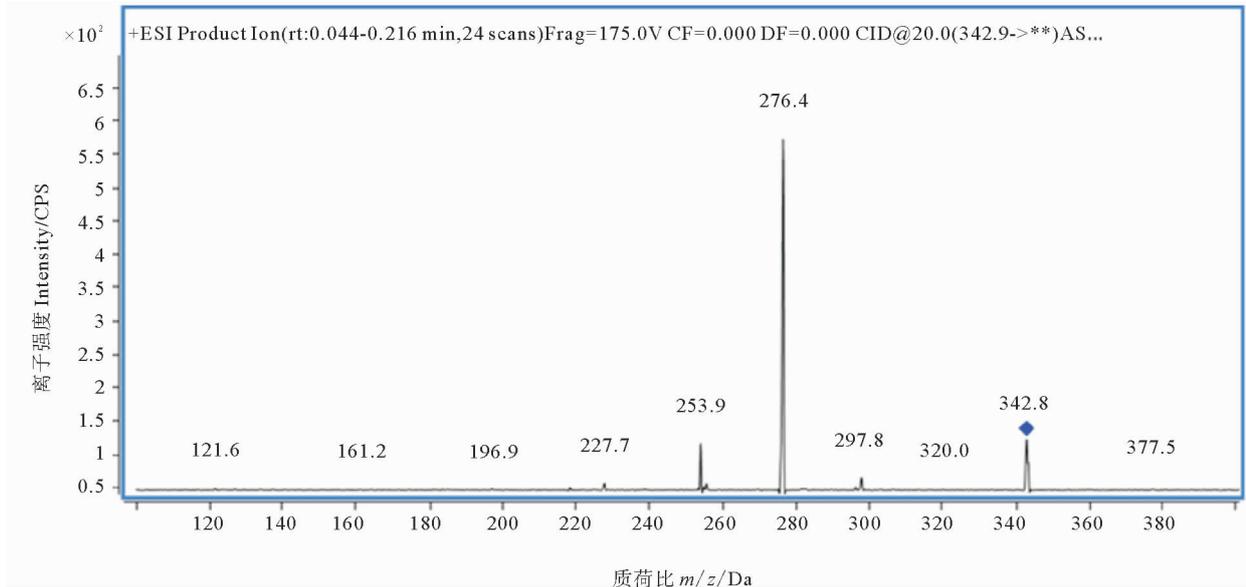


图 4 L-天冬氨酸螯合钙的二级质谱图

Fig.4 MS/MS spectrum of L-Asp chelated calcium

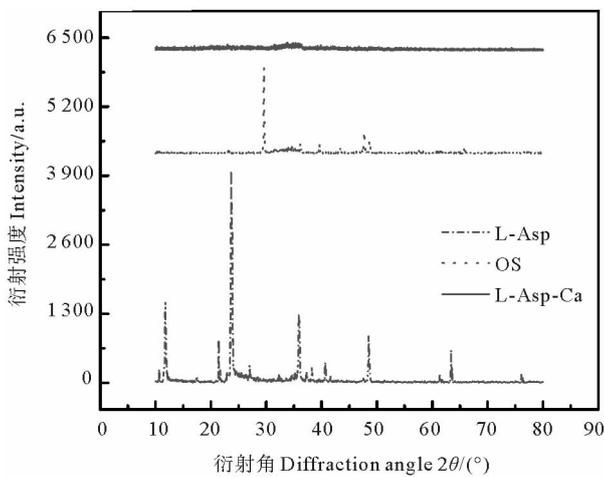


图 5 L-天冬氨酸、牡蛎壳粉和 L-天冬氨酸螯合钙的 X 射线衍射图

Fig.5 X-ray diffractograms of L-Asp, oyster shell powder and L-Asp chelated calcium

## 2.7 L-天冬氨酸螯合钙的 TG 分析

热重分析是通过程序控制一定温度条件,测量物质的质量随温度变化关系的技术,失重速率最大值与 TG 曲线的失重拐点相对应<sup>[31]</sup>。L-天冬氨酸和 L-天冬氨酸螯合钙的热重曲线如图 7 所示。随着温度的不断上升,L-天冬氨酸在温度约 260 °C 时出现拐点,质量开始迅速下降,L-天冬氨酸开始熔化,热重百分比

77.7%,当温度达到 390 °C 左右时,出现第二次峰形拐点,此时热重百分比为 49.8%,在约 790 °C 时,其质量分数降至最低,趋于定值,失重 78.1%,即灰分 21.9%。

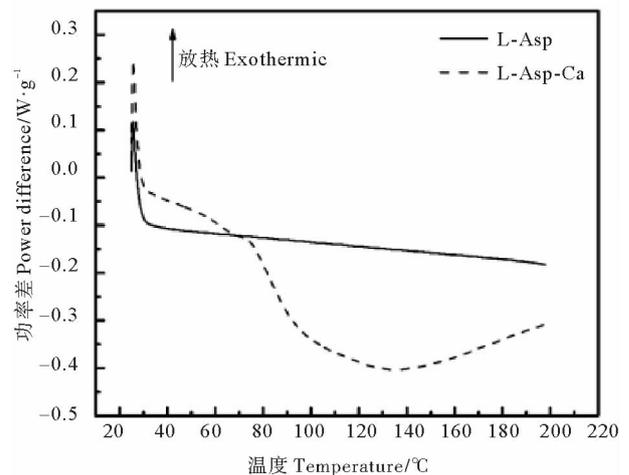


图 6 L-天冬氨酸及其螯合钙的差示扫描量热曲线

Fig.6 Differential thermal curves of L-Asp and its chelated calcium

对于 L-天冬氨酸螯合钙来说,在温度约 135 °C 时开始出现质量损失,失重 3.2%,这一结果与图 6 中的螯合钙在 135 °C 附近开始变性的结果相对应。此外,与 L-天冬氨酸的热重曲线相一致的是,螯合钙在 260 °C 附

近也有强烈的质量损失,样品开始熔化,此时的热重百分比 84.2%,随后在约 412 和 770 °C 处有较快的分解现象。这与管海跃所报道的甘氨酸锌螯合物在温度约 295 °C 时开始熔化,随后发生分解相似<sup>[16]</sup>。但 L-天冬氨酸螯合钙在 800 °C 左右尚未完全分解,其热重百分比为 37.1%,表明整合后的热稳定性得到了一定程度的提高。

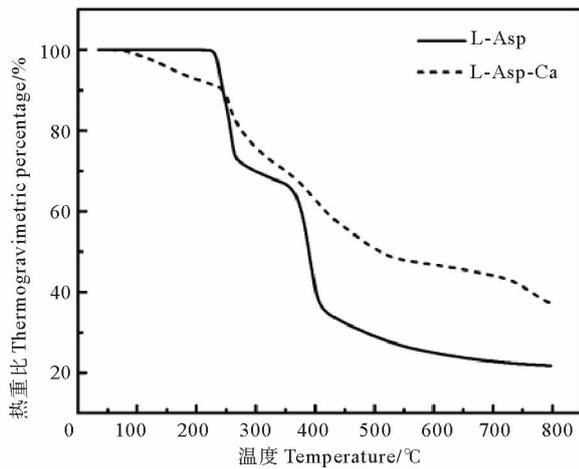


图 7 L-天冬氨酸及其螯合钙的热重曲线

Fig.7 TG curves of L-Asp and its chelated calcium

## 2.8 L-天冬氨酸螯合钙的稳定性分析

### 2.8.1 L-天冬氨酸螯合钙的热稳定性分析

热处理是一种常用于食品的加工方式,研究 L-天冬氨酸螯合钙在热处理过程中的稳定性对其在食品工业中的应用具有重要意义。由图 8 可知,随着加热温度的提高,不同温度下的钙保留率变化不大,与对照组 (Control check, CK) 相比无显著性差异 ( $p > 0.05$ ),这表明所制备的 L-天冬氨酸螯合钙具有良好的热稳定性,持钙能力不随温度的改变而发生显著变化。

### 2.8.2 L-天冬氨酸螯合钙的酸碱稳定性分析

L-天冬氨酸螯合钙的酸碱稳定性见图 9。从图中可以看出,随着 pH 的增加,钙保留率先增加后降低,在 pH=6 左右达到最大值,钙保留率接近对照组,且与对照组无显著性差异。之后钙保留率显著降低,在 pH=10 时出现了絮状沉淀,可能是强碱性条件下氢氧根离子和钙离子形成了氢氧化钙沉淀,稳定系数大于螯合钙。而在酸性较强条件下,氢离子的大量存在与钙离子竞争性抢夺供电基团-NH<sub>2</sub> 和-COOH,亦加速螯合钙的解离,这与单因素优化实验的结果相对应。而大多数食品的 pH 在 5~8 范围内,且螯合钙在该范围内的钙保留率均在 90% 以上,因此 L-天冬氨酸螯合钙可考虑作为钙营养强化剂添加到大多数食品中。

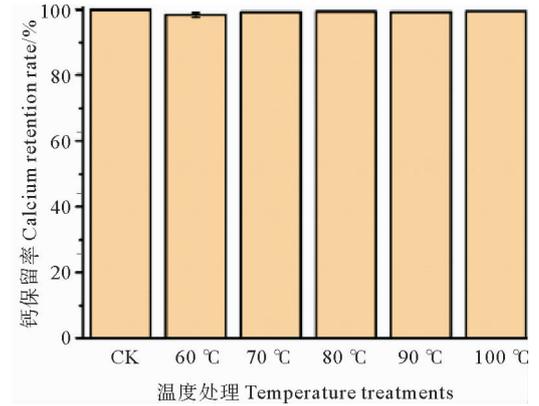
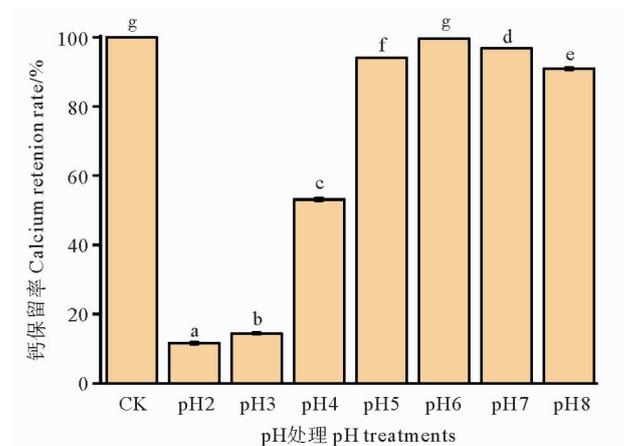


图 8 温度对 L-天冬氨酸螯合钙钙保留率的影响

Fig.8 The influence of temperature on L-Asp chelated calcium retention rate



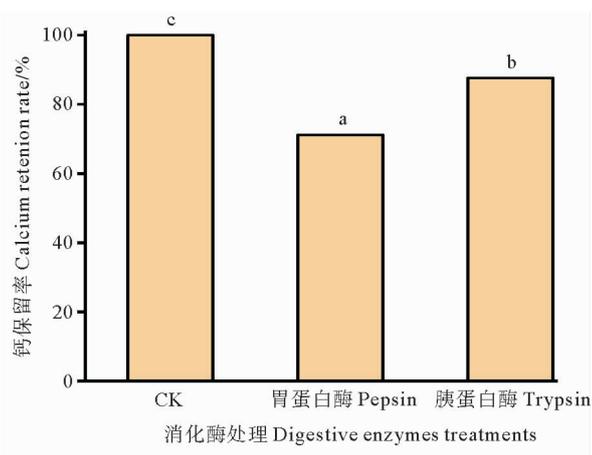
(数据以均值±标准差表示,不同小写字母表示差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ , 单因素方差分析结合 HSD 进行事后检验)。Data were expressed as means ± standard deviations, with different lowercase letters marking significant differences ( $p < 0.05$ , one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Turkey's Honest Significant Difference (HSD) test.)

图 9 pH 对 L-天冬氨酸螯合钙钙保留率的影响

Fig.9 The influence of pH on L-Asp chelated calcium retention rate

### 2.8.3 L-天冬氨酸螯合钙的模拟胃肠消化稳定性分析

L-天冬氨酸螯合钙受消化酶作用的影响见图 10。实验结果表明,螯合钙由胃蛋白酶模拟消化 1 h 后,钙保留率显著下降了近 29%。之后,再经过胰蛋白酶处理 1 h 的钙保留率恢复至 87.6%,表明 L-天冬氨酸螯合钙具有一定的抗消化性。在模拟消化过程中,虽然钙保留率有显著下降,但是总体都高于 70%,显示其抗消化特性良好,且经过胃蛋白酶、胰蛋白酶共同作用后,仍保留了消化酶作用前的 87.6% 的持钙能力。



(数据以均值±标准差表示,不同小写字母表示差异有统计学意义( $p < 0.05$ ,单因素方差分析结合HSD进行事后检验)。Data were expressed as means ± standard deviations, with different lowercase letters marking significant differences ( $p < 0.05$ , one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Turkey's Honest Significant Difference (HSD) test).)

图10 模拟胃肠消化对L-天冬氨酸螯合钙保留率的影响

Fig.10 The influence of simulative gastro-intestinal digestion on L-Asp chelated calcium retention rate

### 3 结语

本文通过扫描电镜、红外光谱和质谱等技术对L-天冬氨酸螯合钙进行了结构表征,并研究了其物理化学特性。研究表明,螯合钙的微观形态整体呈团块状,结构较紧密。L-天冬氨酸中的氨基和羧基主要以配位结合形式参与了螯合反应。所制备的螯合钙主要分子量响应峰值342.9,其结构符合GB29226—2012中天门冬氨酸钙的结合方式。此外,理化特性研究表明,该螯合钙为非晶态物质,具有良好的热稳定性、酸碱稳定性,且在模拟胃肠消化过程后仍能保留87.6%的持钙能力。

本文的研究结果完善了目前对牡蛎壳源L-天冬氨酸螯合钙的结构及理化特性的研究,为牡蛎壳废弃物的高值化利用及新型钙营养强化剂L-天冬氨酸螯合钙的生产、应用研究提供了理论依据,今后将进一步研究牡蛎壳源L-天冬氨酸螯合钙对缺钙大鼠骨密度和生物可利用性等方面的影响。

#### 参考文献:

[1] 赵玉英,魏凤华,王颖莉. 牡蛎壳与煅制牡蛎壳化学成分的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 110-114.  
Zhao Y Y, Wei F H, Wang Y L. Compare differences in chemical constituents between oyster shell and calcined oyster shell[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(12): 110-114.

[2] Ministry of Agriculture Fisheries Bureau. China Fisheries Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2018: 145-

146.

[3] 赵娟,杨耐德,周亮. 牡蛎壳资源开发利用综述[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(21): 79-80.  
Zhao J, Yang N D, Zhou L. Review on exploitation and utilization of oyster shell resources[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2015, 21(21): 79-80.

[4] Yao Z T, Xia M S, Li H Y, et al. Bivalve shell: Not an abundant useless waste but a functional and versatile biomaterial[J]. Critical Reviews in Environmental Science & Technology, 2014, 44(22): 2502-2530.

[5] 邓勤,赖家凤,梁兴唐,等. 牡蛎壳制备柠檬酸钙的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(11): 251-254.  
Deng Q, Lai J F, Liang X T, et al. Study on the technology of preparation of the calcium citrate from oyster shells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(11): 251-254.

[6] 范峥,杨栩,关嘉庆,等. 以废弃牡蛎壳为原料制备食品级醋酸钙[J]. 食品工业科技, 2015, 36(10): 254-258.  
Fan Z, Yang X, Guan J Q, et al. Preparation of food grade calcium acetate using wasted oysters shells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(10): 254-258.

[7] 李峰. 以牡蛎壳为原料制备食品级添加剂丙酸钙的工艺研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.  
LI Feng. Research on Production of Food Grade Additive Calcium Propionate from Oyster-shells[D]. Xian: Northwest University, 2008.

[8] 邵江娟,王唯,陈斌寅,等. 以牡蛎壳为钙源的L-天冬氨酸螯合钙的合成及其生物利用度研究[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(4): 371-37.  
Shao J J, Wang W, Chen T, et al. Synthesis of L-aspartate chelating calcium with oysters as calcium source and Investigation of its Bioavailability[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 28(4): 371-37.

[9] 刘闪,刘良忠,陈阳明,等. 白鲢鱼骨胶原低聚肽螯合钙的结构表征及其促细胞增殖作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(9): 185-191.  
Liu S, Liu L Z, Chen Y M, et al. Structural characterization and promoting cell proliferation of collagen oligopeptide chelated calcium from silver carp fish bone[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(9): 185-191.

[10] 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, 2010, 29(2): 22-26.  
Wang J M, Wei Y X, Yin Z B, et al. Study on the technology of glutamic acid chelated calcium prepared with oyster shell as calcium source[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2010, 29(2): 22-26.

[11] 郭艳. 水解米渣蛋白及制备氨基酸螯合钙的工艺研究[D]. 成都: 四川大学, 2006.  
GUO Yan. Hydrolysis of Rice Residue Protein and Synthesis of Complex Amino Acid with Calcium[D]. Chengdu: Sichuan University, 2006.

[12] 汪争光,胡朵,吴东蔚,等. 结冷胶与聚乙二醇丙烯酸酯双网络凝胶的制备及生物相容性评价[J]. 高等学校化学学报, 2017, 38(2): 275-283.  
Wang Z G, Hu D, Wu D W, et al. Preparation and properties of double network hydrogels based on gellan gum and polyethylene

- glycol acrylate[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2017, 38(2): 275-283.
- [13] Zhao Y, Wang L, Guo Z, et al. Enhanced multi-phosphopeptide enrichment and nano LC-ESI-qTOF-MS detection strategy using click OEG-CD matrix[J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2015, 31(1): 44-52.
- [14] 曹玉惠, 张娟娟, 王再扬, 等. 牡蛎源类蛋白反应修饰肽的分离纯化及肽-锌螯合物的结构表征[J]. *高等学校化学学报*, 2018, 39(3): 470-475.
- Cao Y H, Zhang J J, Wang Z Y, et al. Separation and identification of oyster peptide modified by plastein reaction and characterization of peptide-zinc complexes[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2018, 39(3): 470-475.
- [15] Jivan M J, Madadlou A, Yarmand M. An attempt to cast light into starch nanocrystals preparation and cross-linking[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 1661-1666.
- [16] 管海跃. 甘氨酸微量元素螯合物的合成与表征研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- GUAN Hai-yue. Study on Synthesis and Characterization of Chelate of Glycine with Trace Element[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007.
- [17] 汪旭. 黄瓜籽蛋白提取及发酵制备多肽的性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- WANG Xu. Studies on Extraction of Protein from Cucumber Seed and Properties of Peptide Produced by Fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017.
- [18] 黄海. 鲤鱼卵钙离子结合活性肽的制备及钙结合机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- HUANG Hai. Study on the Preparation of Peptide with Calcium-binding Activity from Carp Egg and Its Mechanism of Binding Calcium[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [19] 王波, 杨继国, 任杰, 等. 酪蛋白肽电荷性质对其肽-锌螯合物的胃肠稳定性及吸收的影响[J]. *中国食品添加剂*, 2019(3): 59-66.
- Wang B, Yang J G, Ren J, et al. Effect of charge properties of casein-derived peptides on in vitro gastrointestinal stability and absorption of zinc-peptide complexes[J]. *China Food Additives*, 2019(3): 59-66.
- [20] 丁媛媛, 王莉, 张新霞, 等. 麦胚多肽-钙螯合物制备工艺优化及其结构表征[J]. *食品科学*, 2017, 38(10): 215-221.
- Ding Y Y, Wang L, Zhang X X, et al. Optimized preparation and structural characterization of calcium-chelating polypeptides from wheat germ protein hydrolysate[J]. *Food Science*, 2017, 38(10): 215-221.
- [21] 付文雯. 牛骨胶原多肽螯合钙的制备及其结构表征[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- FU Wen-wen. Preparation and Structure Characterization of Cattle Bone Collagen Peptide Chelating Calcium[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [22] 金斗满, 朱文祥. 配位化学研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- Jin D M, Zhu W X. *Coordination Chemistry Research Method* [M]. Beijing: Science Press, 1996.
- [23] 王青, 刘睿, 程建明, 等. 四角蛤蜊壳制备 L-天门冬氨酸螯合钙工艺及表征研究[J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(4): 87-94.
- Wang Q, Liu R, Cheng J M, et al. Synthesis and characterization of amino acid chelated calcium with shells as primary calcium source[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2017, 36(4): 87-94.
- [24] 吴玥霖, 王俊. 鱼骨粉制备复合氨基酸螯合钙工艺研究[J]. *食品与发酵科技*, 2009, 45(1): 51-54.
- Wu Y L, Wang J. Research on preparation technology of compound amino acid chelated calcium from fishbone powder[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2009, 45(1): 51-54.
- [25] NaRa M, Morii H, Tanokura M. Coordination to divalent cations by calcium-binding proteins studied by FTIR spectroscopy[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, 1828(10): 2319-2327.
- [26] 王晓萍. 小麦胚芽蛋白源锌螯合肽的分离纯化、表征及生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- WANG Xiao-ping. Isolation, Purification and Characterization of Zinc-Chelating Peptides from Wheat Germ Protein Hydrolysates and Its Biological Activity[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [27] Zhao L, Huang S, Cai X, et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014(10): 46-53.
- [28] 何昇鸿, 王一安, 曾令智, 等. 营养强化剂壳寡糖铜、锰螯合物的合成与表征及抗氧化活性[J]. *中国食品添加剂*, 2018(4): 148-153.
- He S H, Wang Y A, Zeng L Z, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of nutrition fortifiers chitooligosaccharide copper and manganese chelates[J]. *China Food Additives*, 2018(4): 148-153.
- [29] 闫红彦, 姜丽莎, 佟华, 等. 天冬氨酸分子在水环境下手性转变机理的理论研究[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 2016, 55(3): 369-380.
- Yan H Y, Jiang L S, Tong H, et al. The theoretical research of optical isomerism mechanism of aspartic acid molecules in water environment[J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2016, 55(3): 369-380.
- [30] 王杰晶, 李银峰, 李佩, 等. 差示扫描量热法在药物定性分析中的应用[J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(5): 815-818.
- Wang J J, Li Y F, Li P, et al. Application of differential scanning calorimetry in pharmaceutical qualitative analysis[J]. *Drugs&Clinic*, 2013, 28(5): 815-818.
- [31] 王琪, 李建涛, 于雪妮, 等. 差热/热重分析法鉴别不同的海参[J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(6): 54-58.
- Wang Q, Li J T, Yu X N, et al. Differential thermal analysis method/thermogravimetric identification of different species of sea cucumbers[J]. *Chinese Journal of Marine Drug*, 2018, 37(6): 54-58.

## Structural Characterization and Physicochemical Property Analysis of L-aspartate Chelated Calcium from Oyster Shell

WANG Zhen, JIANG Sui-Sui, ZHANG Fan, WANG Run-Fang,

FENG Xue, WANG Rui, LI Shi-Yang, ZHAO Yuan-Hui

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** In this study, the oyster shell was used as the calcium source to prepare L-aspartate chelated calcium with its structure characterized and physicochemical property analyzed more completely for the first time. The structure of chelated calcium was characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and mass spectrometry, and its physical and chemical properties were analyzed in many aspects. The results showed that the microscopic morphology of the chelated calcium was agglomerate. Its structure was firmer and its surface was adsorbed by white crystal. FT-IR result proved that the amino group and carboxyl group in L-aspartate were mainly participated in the chelation reaction of calcium ions in the form of coordination binding. The primary and secondary mass spectrometry results of the chelate indicated that the synthesized chelated calcium had a main molecular weight response peak of 342.9, and its structure conformed to the binding mode of calcium aspartate in GB29226—2012. In addition, in this study, we comprehensively studied the physicochemical characteristics of the chelated calcium crystal state, denaturation temperature, thermogravimetric mass loss and various stabilities and provided theoretical and scientific bases for the high value utilization of oyster shell waste and the development of calcium nutritional supplements for oyster shell.

**Key words:** oyster shell; L-aspartate chelated calcium; structural characterization; physicochemical property

责任编辑 朱宝象