

# 正交试验优化胶原多肽螯合钙的制备工艺

彭巧云<sup>1</sup>, 沈菊泉<sup>2</sup>, 魏东芝<sup>1</sup>, 马志英<sup>2,\*</sup>, 沈亚领<sup>1</sup>

(1. 华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 2. 上海市食品研究所, 上海 200235)

**摘要:** 以胶原多肽及氯化钙为原料制备胶原多肽螯合钙并确定其最佳制备工艺, 结果表明: 胶原多肽螯合钙最适的螯合条件为钙元素和胶原多肽的质量比为13:100、pH6.0、时间30min、温度30℃。在该最佳螯合条件下得到的胶原多肽螯合钙的螯合率达到77.7mg/g。傅里叶变换红外光谱分析结果表明胶原多肽螯合钙是一种新的物质, 后期的动物实验也证明了胶原多肽螯合钙具有增加骨密度的功能。

**关键词:** 胶原多肽; 螯合率; 骨钙; 骨密度

## Optimization of Preparation of Collagen Polypeptide Chelated Calcium by Orthogonal Array Design

PENG Qiao-yun<sup>1</sup>, SHEN Ju-quan<sup>2</sup>, WEI Dong-zhi<sup>1</sup>, MA Zhi-ying<sup>2,\*</sup>, SHEN Ya-ling<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Food Research Institute, Shanghai 200235, China)

**Abstract:** This work reports the application of orthogonal array design to explore the optimum chelating conditions of food-grade calcium chloride with collagen polypeptide. The optimal chelating conditions were found to be reaction at 30 °C and an initial pH of 6.0 for 30 min with a calcium-to-collagen polypeptide mass ratio of 13:100. Under the optimized conditions, the calcium-chelating efficiency of collagen polypeptides was 77.7 mg/g. FTIR analysis demonstrated that we successfully obtained collagen polypeptide chelated calcium as a new material. Moreover, the chelated calcium was found to increase bone density in animal studies.

**Key words:** collagen polypeptide; chelating rate; bone calcium; bone mineral density

中图分类号: TS218

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)08-0094-06

钙是人体中含量最多的矿物质元素之一, 在构成人体的所有元素中, 钙仅次于碳、氢、氮、氧位于第5位。钙在人体中的总量为1300g, 约为人体质量的1.5%~2%, 其中99%的钙存在于骨骼中, 0.9%存在于软组织和细胞内, 另外0.1%存在于血液和细胞外液中<sup>[1]</sup>。钙是人体健康不可缺少的重要元素, 在人体内发挥着极其重要的生理作用<sup>[2-8]</sup>。膳食中钙长期摄入不足, 不仅影响儿童的生长发育和骨密度, 也会影响中老年人的骨骼健康。根据“中国居民营养与健康现状”调查报告<sup>[9]</sup>, 中国居民膳食钙摄入量普遍偏低, 平均摄入量仅为0.398g, 为推荐摄入量的50%左右。乳类摄入量低, 且膳食结构以植物性食物为主, 是影响我国居民钙营养状况的主要因素。

骨骼是由骨细胞和骨基质构成的。骨基质由无机质和有机质两部分组成。无机质是指以羟基磷灰石结晶形式(Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>)存在的骨盐, 有机质的主要成分是骨胶原纤维, 即通常所说的骨胶原, 大约占有机质部分的90%, 主要是I型胶原蛋白还有极少量V型胶原蛋白。

胶原纤维具有较强的抗压性和弹性, 而羟基磷灰石结晶脆而易碎, 两者结合在一起形成骨骼组织后就具有坚硬且抗冲击的特性, 从而具有很好的机械性能和生理功能。骨骼中胶原纤维相互交联形成骨网, 骨矿物质便沉积在胶原纤维间的空隙中。骨胶原既为骨基质矿化提供了场所, 也为促进矿化及抑制矿化的物质提供了功能发挥的空间, 为骨基质的矿化奠定了基础<sup>[10]</sup>。另外骨胶原对防止骨质疏松、骨细胞的生长发育、分化及活性调节等方面起着重要作用<sup>[11-17]</sup>。

一直以来补钙是人们关注的焦点, 补钙制剂的发展历经了无机钙盐、传统的有机钙盐和新型的可溶性有机钙3个阶段。近几年来, 氨基酸螯合钙得到广泛应用。虽然氨基酸螯合钙具有易被机体消化吸收, 生物学效率高, 能达到钙与氨基酸同补等优点, 但是与多肽螯合钙相比, 其螯合机制、稳定性以及转运方面还存在一定的缺陷<sup>[18-20]</sup>。因此, 在氨基酸螯合钙的基础上, 出现了多肽螯合钙的研究。实际上, 美国和日本分别从1970年和

收稿日期: 2012-01-11

基金项目: 上海市科学技术委员会应用技术开发专项(08-120)

作者简介: 彭巧云(1985—), 女, 硕士, 研究方向为功能食品。E-mail: pengqiaoyun12@126.com

\*通信作者: 马志英(1949—), 男, 教授, 本科, 研究方向为食品生化、食品加工和食品安全。E-mail: mazhiying@hotmail.com

1985年就开始以肽铁作为微量元素添加剂添加到饲料中。因此对特定组成功能性的多肽螯合钙的开发具有很好的前景。对微量元素氨基酸络合物的研究开始于60年代。70年代后期,首次由美国Albion实验室,以铁元素和动植物蛋白为原料合成了蛋白铁(iron proteinase)的复合物,由此开始了蛋白或多肽螯合物的研究与开发<sup>[21-24]</sup>。

本实验研究了胶原多肽螯合钙的制备工艺,在此基础上对制备的胶原多肽螯合钙增加骨密度进行评价。实验所制备的胶原多肽螯合钙在补充钙的同时,又补充了骨骼基质形成所必需的胶原多肽,更有利于骨骼健康,也为开发补钙产品提供了新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

胶原多肽(分子质量<10kD,纯度92.6%);碳酸钙 天津市化学试剂研究所;无水乙醇 上海振兴化工厂;氢氧化钾、钙羧酸 国药集团化学试剂有限公司;氯化钙柠檬酸钠 上海凌峰化学试剂有限公司;乙二酸四乙酸二钠(EDTA) 上海试剂一厂;SD大鼠 复旦大学医学院动物中心;所有试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

DELTA320型pH计 美国Mettler Toledo公司;85-2型磁力搅拌器 金坛市顺华仪器有限公司;1661A型座式微量滴定管 海门市台联玻璃仪器有限责任公司;H-2050R型高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;Magna-IR 550傅里叶变换红外光谱仪 美国热电电力尼高(Nicolet)公司;101A-1干燥箱 上海实验仪器厂;B-490型旋转蒸发器 瑞士Büchi公司;P-E4000原子吸收分光光度计 美国PerkinElmer公司;Discovery A(S/N84425)双能X线骨密度仪 美国豪洛捷(Hologic)公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 胶原多肽螯合钙的制备及螯合率的测定

取自制胶原多肽溶于水中制备一定浓度的胶原多肽溶液,调节该溶液的pH值为7.0、温度50℃,按照钙元素与胶原多肽的质量比9:100添加氯化钙,恒温搅拌反应30min后冷却,无水乙醇沉淀,真空冷冻干燥后得到的粉末即为胶原多肽螯合钙。固定其他条件,分别考察钙元素的添加比例、温度、时间、以及pH值对螯合率的影响。

利用EDTA法<sup>[25]</sup>,胶原多肽的螯合率计算公式如下:

$$\text{螯合率} = \frac{m_2}{m_1}$$

式中:  $m_1$ 为胶原多肽的质量/g;  $m_2$ 为螯合钙元素的质量/mg。

#### 1.3.2 傅里叶变换红外光谱图的测定

测试条件:光谱分辨率 $2\text{cm}^{-1}$ ,波数范围:4000~400 $\text{cm}^{-1}$ 。

测定方法:采用KBr压片法。取约2mg样品研磨,然后与100~200mg干燥KBr粉末充分混合,并再次用球磨机研磨1~2min,研磨时间将对最终的光谱外观有显著影响。再转入合适的模具中,使之分布均匀,抽空下压成透明薄片。装入压片夹以KBr空白压片作参比扫描红外光谱。

#### 1.3.3 胶原多肽螯合钙理化指标分析

按照参考文献[26]进行测定。

#### 1.3.4 增加骨密度功能检验方法<sup>[27]</sup>

出生4周左右的SD雄性断乳大鼠,体质量约60~75g,每组8~12只。

实验设一个剂量组,其剂量为人体推荐量的30倍,同时设一个低钙对照组(150mg/100g饲料)和与相应剂量受试物钙水平相同的碳酸钙对照组。每组每天喂食低钙基础饲料(150mg/100g饲料),除了低钙对照组外每组每天灌胃剂量如下:功能人体每天推荐摄入量400mg,对于大鼠摄入量为20mg  $\text{Ca}^{2+}$ /100g大鼠(根据大鼠体质量每周调整一次灌胃剂量)。受试样品给予时间为3个月。

出生4周的断乳SD雄性大鼠经适应期1周后,禁食12h,称体质量,按体质量随机分组,分笼饲养。饮用去离子水以避免从饮水中获得钙。

#### 1.3.5 指标的测定

##### 1.3.5.1 体质量测定

禁食12h后,测定体质量。每周一次。

##### 1.3.5.2 钙吸收率的测定

大鼠喂养30d后,测定钙的吸收率,连续灌胃3d,记录灌胃量及进食饲料的量,收集粪便,测定粪便中钙的含量。根据下式计算钙吸收率:

$$\text{钙吸收率}/\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

式中:  $m_1$ 为摄入钙总量/mg;  $m_2$ 为粪便中排泄钙的量/mg。

##### 1.3.5.3 股骨质量测定

大鼠喂养3个月处死,剥离出右侧股骨,于105℃烤箱中烤至恒质量,称量骨干质量。

##### 1.3.5.4 股骨骨密度测定

用双能X线骨密度仪测量股骨的骨密度。

##### 1.3.5.5 骨钙含量及饲料含钙量测定

依据原子吸收法测量。饲料样品经均匀混合并过20目筛,在烘箱中烘干,置干燥器中冷却后称质量,磨细。取大鼠一侧股骨在105℃烘箱中烘干至恒质量后置于干燥器中冷却后称量。处理好的饲料及股骨分别置于三角瓶中进行消化。消化好的样品按照原子吸收分光光度计仪器说明书的步骤进行测定。测定样品溶液、标准溶液和空白均用0.5%的氧化镧溶液稀释,定容。

#### 1.3.6 数据处理

实验数据采用方差分析,首先需要按照方差分析的程序进行方差齐性检验,若方差齐,则计算F

值,  $F < F_{0.05}$ , 得出结论: 各组均数间差异无显著性;  $F \geq F_{0.05}$ ,  $P \leq 0.05$ , 则采用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较的方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐的要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

结果判定: 骨钙含量或骨密度显著高于低钙对照组且不低于相应剂量碳酸钙对照组, 钙的吸收率不低于碳酸钙对照组, 可以判定受试物具有增加骨密度功能的作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶原多肽钙螯合工艺单因素试验

#### 2.1.1 无水乙醇用量的选择

因为胶原多肽螯合钙是一种水溶性螯合物, 用无水乙醇进行沉淀时, 无水乙醇的用量会直接影响胶原多肽螯合钙的浓度, 从而影响其得率。无水乙醇加入量少的话, 乙醇被溶液中的水稀释, 就会有一部分胶原多肽螯合钙溶解到水与乙醇的混合相中, 降低了胶原多肽螯合钙的得率; 若无水乙醇的加入量过多的话, 又会造成试剂的浪费。

取螯合(反应条件: pH6.5、温度50℃、时间20min)结束后的溶液1mL, 分别加入3、4、5、6、7、8、9、10、11倍于溶液体积的无水乙醇, 离心、真空冷冻干燥, 测定螯合钙的量。

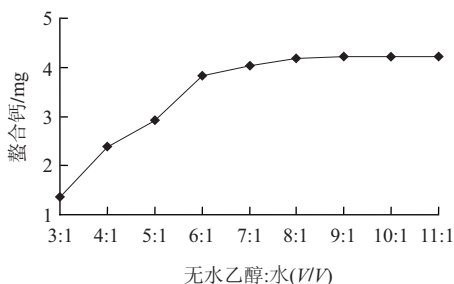


图1 无水乙醇对产品得率的影响

Fig.1 Effect of the amount of absolute ethanol added to the final reaction solution on the yield of chelated calcium

从图1可知, 开始随着无水乙醇用量的增加, 产品中胶原多肽螯合钙的含量也随之增加。当无水乙醇与水的体积比达到8:1时, 再提高无水乙醇的用量, 胶原多肽螯合钙的含量基本不会变化, 因此综合考虑胶原多肽螯合钙的得率以及经济效益最后确定无水乙醇与水的体积比为8:1。

#### 2.1.2 钙元素添加比例对螯合率的影响

由图2可知, 钙元素的添加比例从1:100增加到9:100时, 螯合率一直增加, 而再提高钙元素的添加比例时, 螯合率变化很小, 说明钙元素的添加比例大于9:100后, 胶原

多肽已处于饱和状态, 再增加钙的量螯合率也不会增加。所以添加比例选择9:100、11:100、13:100进行正交试验。

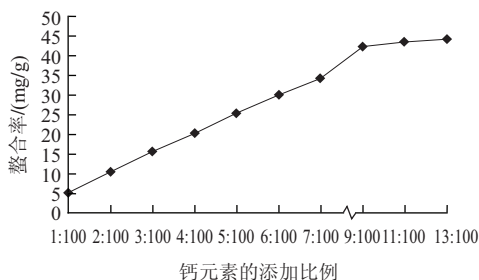


图2 钙元素添加比例对螯合率的影响

Fig.2 Effect of calcium-to-collagen polypeptide mass ratio on the chelating rate of calcium

#### 2.1.3 pH值对螯合率的影响

pH值条件是影响胶原多肽螯合钙元素形成螯合物的重要因素。在pH值较低的酸性条件下,  $H^+$ 将与金属离子竞争供电子基团, 不利于胶原多肽螯合钙元素形成螯合物; 在pH值较高的碱性条件下, 羟基与供电子基团争夺金属离子而形成氢氧化物沉淀。因此选取pH4~8之间, 研究其对螯合率的影响程度。

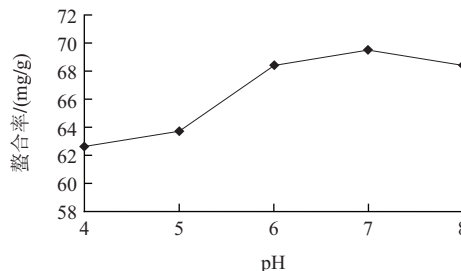


图3 pH值对螯合率的影响

Fig.3 Effect of pH on the chelating rate of calcium

由图3可知, 在一定pH值范围内, 随pH值升高螯合率提高, 这是由于随着pH值升高,  $-NH_2$ 和 $-COOH$ 配位能力增强。当pH>7时螯合率降低, 说明溶液中开始有沉淀生成, 不利于胶原多肽螯合物的生成, 所以选择pH值为6.0、6.5、7.0进行正交试验。

#### 2.1.4 时间对螯合率的影响

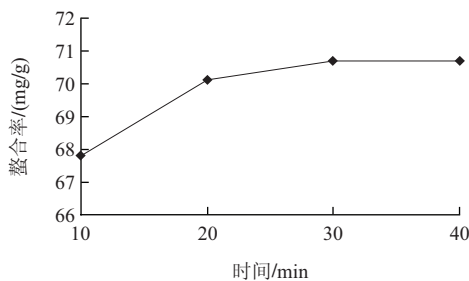


图4 时间对螯合率的影响

Fig.4 Effect of time on the chelating rate of calcium

胶原多肽与钙元素的络合反应属于快速反应,理论上时间对螯合率的影响不是很大。从图4可知,随着螯合时间的延长,螯合率逐渐增加,20min时螯合已基本完成,所以选择20、30、40min进行正交试验。

### 2.1.5 温度对螯合率的影响

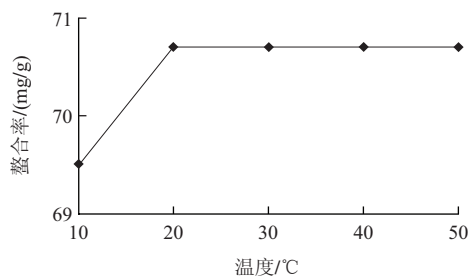


图5 温度对螯合率的影响

Fig.5 Effect of temperature on the chelating rate of calcium

理论上温度对螯合反应的影响不是很大,由图5可知,随着温度提高,螯合率逐渐增加,温度高于20℃时螯合率增加很少。所以选择10、20、30℃进行正交试验。

## 2.2 胶原多肽螯合钙的制备工艺优化

### 2.2.1 胶原多肽螯合钙制备的正交试验

为了优化胶原多肽螯合钙制备的工艺条件,在以上单因素试验的基础上进行四因素(pH值、钙元素添加比例、时间、温度)三水平正交试验,以确定最佳螯合工艺条件。试验结果采用均值和极差分析各因素影响程度高低(表1),生成效应曲线图来直观地得到各水平的最佳值(图6)。

表1 螯合正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal array design and results

试验号	pH	钙元素的添加比例	时间/min	温度/°C	螯合率/(mg/g)
1	1(6.0)	1(9:100)	1(20)	1(10)	71.3
2	1	2(11:100)	2(30)	2(20)	75.3
3	1	3(13:100)	3(40)	3(30)	77.7
4	2(6.5)	1	2	3	68.4
5	2	2	3	1	69
6	2	3	1	2	71.9
7	3(7.0)	1	3	2	69.5
8	3	2	1	3	70.7
9	3	3	2	1	74.2
$k_1$	74.767	69.733	71.300	71.500	
$k_2$	69.767	71.667	72.633	72.233	
$k_3$	71.467	74.600	72.067	72.267	
极差	5.000	4.867	1.333	0.767	

通过表1螯合正交试验结果可知,各因素对螯合率的影响大小顺序为pH值>钙元素的添加比例>时间>温度。从螯合正交试验的效应曲线图中可以看出,最佳螯合工艺条件为pH6.0、钙元素的添加比例13:100、时间30min、温度30℃。

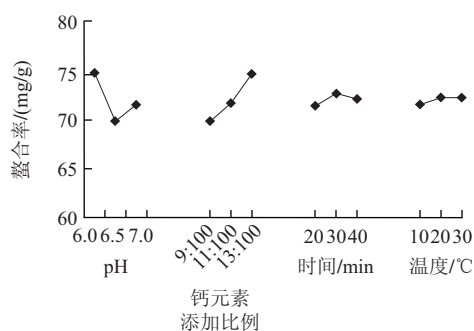


图6 螯合正交试验效应曲线图

Fig.6 Effect of four reaction conditions on the chelating rate of calcium

### 2.2.2 优化结果验证

根据正交试验优化结果,将胶原多肽和氯化钙最优条件下进行螯合反应,正交试验优化条件为:钙元素添加比例为13:100、pH6.0、温度30℃、恒温反应30min,此条件下,螯合率77.7mg/g。

### 2.2.3 胶原多肽螯合钙的结构分析

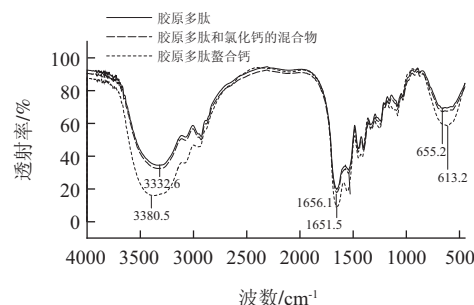


图7 3种不同物质傅里叶变换红外光谱图

Fig.7 FTIR spectra of collagen polypeptide and its physical mixture and chelate complex with calcium

胶原多肽、胶原多肽和氯化钙的混合物及胶原多肽螯合钙的傅里叶变换红外光谱图见图7。3332.6cm<sup>-1</sup>属于胶原多肽的酰胺A带,是由N-H的伸缩振动引起的;1651cm<sup>-1</sup>属于酰胺I带,由C=O的伸缩振动引起;655.2cm<sup>-1</sup>是由C=O得面外弯曲引起。通过比较胶原多肽、胶原多肽和氯化钙的混合物和胶原多肽螯合钙的傅里叶变换红外光谱图可知,胶原多肽螯合后,其酰胺A带向高波数方向移动,其峰宽和吸收强度也明显增强;酰胺I带向低波数方向移动,其吸收强度增加;655.2cm<sup>-1</sup>处的吸收峰向低波数方向移动,其吸收强度变强。这些变化说明胶原多肽中的N-H和C=O与Ca<sup>2+</sup>发生配位作用,生成新的物质胶原多肽螯合钙。

### 2.2.4 胶原多肽螯合钙理化指标分析

由表2可知,本实验制备的胶原多肽螯合钙样品的技术指标均已达到中华人民共和国轻工行业标准<sup>[26]</sup>。



表 2 胶原多肽螯合钙样品技术指标

Table 2 Quality indicators of collagen polypeptide chelating calcium g		
项目	指标要求	样品检测结果
蛋白质含量/(以干基计算)	≥50	57.6
砷含量/(以AS计, mg/kg)	≤0.3	0.19
重金属含量/(以Pb计, mg/kg)	≤0.5	0.114
菌落总数/(CFU/g)	≤30000	420
大肠菌群数/(MPN/100g)	≤90	<30
致病菌/(沙门氏菌、金黄色葡萄球菌)	不得检出	未检出

2.3 功能性动物评价试验

2.3.1 胶原多肽螯合钙对大鼠体质量的影响

表 3 胶原多肽螯合钙对大鼠体质量的影响(n=10)

Table 3 Effect of collagen peptide chelated calcium on body weight of rats (n=10) g					
组别	饲养时间/周				
	0	3	6	9	12
胶原多肽螯合钙组	96.5±4.99	226.2±12.26	324.2±27.55	396.60±31.65	426.40±31.02
碳酸钙组	96.8±10.55	217.7±10.3	320.00±22.19	381.20±41.93	422.70±30.38
低钙对照组	98.8±8.57	221.2±12.6	326.4±16.89	414.40±27.03	454.40±33.71

由表3可知, 各组大鼠的体质量均有不同程度的增长, 但各组大鼠体质量间无显著差异性。

2.3.2 胶原多肽螯合钙对大鼠钙吸收率的影响

表 4 胶原多肽螯合钙对大鼠钙吸收率的影响(n=8)

Table 4 Effect of collagen peptide chelate calcium on the absorptivity of calcium in rats (n=8)			
组别	摄入的钙/g	排泄的钙/g	钙的吸收率/%
胶原多肽螯合钙组	2.73	0.193	92.93** $\Delta$
碳酸钙组	3.45	0.905	73.77**
低钙对照组	1.05	0.030	97.14

注: \*, \*\*与低钙对照组比较,  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ . 与相同剂量的碳酸钙对照组比较,  $P < 0.01$ 。

由表4可知, 低钙对照组钙吸收率明显高于胶原多肽螯合钙组( $P < 0.05$ )和碳酸钙对照组( $P < 0.01$ ), 这与机体钙缺乏时钙吸收率增加有关。胶原多肽螯合钙组的钙吸收率明显高于碳酸钙对照组( $P < 0.01$ )。

2.3.3 胶原多肽螯合钙对大鼠股骨长度及骨干质量的影响

表 5 胶原多肽钙对大鼠股骨长度及骨干质量的影响(n=8)

Table 5 Effect of collagen peptide chelated calcium on bone length and femur weight in rats (n=8)		
组别	骨长度/cm	骨干质量/g
胶原多肽螯合钙组	3.317±0.649	0.718±0.0408
碳酸钙组	3.251±0.104	0.686±0.793
低钙对照组	3.259±0.545	0.697±0.703

由表5可知, 各组大鼠之间的股骨长度、股骨干质量均无显著差异性。

2.3.4 胶原多肽螯合钙对大鼠骨钙含量的影响

由表6可知, 胶原多肽螯合钙组股骨钙含量明显高于低钙对照组, 差异极具显著性( $P < 0.01$ ), 与相同剂量的碳酸钙比较, 差异也极具显著性( $P < 0.01$ )。以上结果表明, 胶原多肽螯合钙具有增加大鼠股骨钙含量的作用。

表 6 胶原多肽钙对大鼠骨钙含量的影响(n=8)

Table 6 Effect of collagen peptide chelated calcium on bone calcium content of femur in rats (n=8)	
组别	骨钙含量/%
胶原多肽螯合钙组	20.91±0.951**
碳酸钙组	19.32±0.857
低钙对照组	18.83±0.778

注: \*\*. 与低钙对照组和相同剂量的碳酸钙对照组比较,  $P < 0.01$ 。

2.3.5 胶原多肽螯合钙对大鼠股骨骨密度的影响

表 7 胶原多肽螯合钙对大鼠股骨骨密度的影响(n=8)

Table 7 Effect of collagen peptide chelated calcium on bone mineral density of femur in rats (n=8)	
组别	骨密度/(g/cm <sup>3</sup> )
胶原多肽螯合钙组	0.2191±0.00538** $\Delta$
碳酸钙组	0.2074±0.01162
低钙对照组	0.2031±0.01083

注: \*\*. 与低钙对照组比较  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ . 和相同剂量的碳酸钙对照组比较,  $P < 0.05$ 。

由表7可知, 胶原多肽螯合钙组股骨(整骨Gobal)骨密度与低钙对照组比较, 差异极具显著性( $P < 0.01$ ); 和相同剂量的碳酸钙对照组比较, 差异具有显著性( $P < 0.05$ )。

根据保健食品增加骨密度功能的结果判定方法, 骨钙含量或骨密度显著高于低钙对照组, 且不低于相同剂量碳酸钙对照组, 钙的吸收率不低于碳酸钙对照组, 即可判定受试物具有增加骨密度功能的作用。本次功能实验结果表明, 胶原多肽螯合钙具有增加骨密度的功能。表现为: 胶原多肽螯合钙组大鼠的钙吸收率, 骨钙含量以及骨密度与低钙对照组和相同剂量的碳酸钙对照组比较, 都具有显著差异性( $P < 0.05$ )。

3 结 论

将胶原多肽和氯化钙进行螯合反应, 通过正交试验, 确定了最佳螯合工艺条件为: pH6.0、钙元素的添加比例13:100、时间30min、温度30℃。在该最佳螯合条件下得到的胶原多肽螯合钙的螯合率达到77.7mg/g。从胶原多肽、胶原多肽和氯化钙的混合物和胶原多肽螯合钙的傅里叶变换红外光谱图可知, 胶原多肽螯合钙是不同于胶原多肽和氯化钙的物质, 是一种新的物质。

后期的动物实验结果也说明了胶原多肽螯合钙具有增加骨密度的功能。该研究开辟了补钙产品的新方向, 补钙的同时也补充了胶原多肽, 满足了人口老龄化中骨质疏松人群日益增加对低抗原、安全性高的保健食品的需求。因此, 本实验研究成果具有良好的经济效益和社

会效益, 有着较好的产业化前景。

#### 参考文献:

- [1] ROBERT P H, BESS D H, GALLAGHER J C, et al. The role of calcium in peri- and postmenopausal women: consensus opinion of The North American Menopause Society[J]. The Journal of the North American Menopause Society, 2001, 8(2): 84-95.
- [2] 王陇德. 中国居民营养与健康状况调查报告之一: 2002综合报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 11-12.
- [3] HENDERSON R C, MADSEN C D, DARIS C, et al. Longitudinal evaluation of bone mineral density in children receiving chemotherapy[J]. Pediatric Hematol Oncol, 1998, 20(4): 322-326.
- [4] 闻芝梅, 陈君石, 译. 现代营养学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 238-247.
- [5] LOURIS R. Potassium and calcium channels in lymphocytes[J]. Ann Rev Immunol, 1995, 13: 623-653.
- [6] 陈跃先. 钙的生理作用[J]. 福建医药杂志, 2000, 22(2): 140-141.
- [7] SCHMIDT H H, LOHMANN S M, WALTER U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action[J]. Bio Chem Biophys Acta, 1993, 1178(2): 153-175.
- [8] 程锦轩, 张一彬, 王振纲, 等. 甲状旁腺素对心肌细胞 $Ca^{2+}$ 跨膜转运的影响[J]. 中国药理学通报, 1994(1): 420-424.
- [9] 中国营养学会妇幼分会. 妇女营养学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [10] MILLER A. Collagen: the organic matrix of bone[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1984, 304: 455-477.
- [11] FLEDELINS C, RIIS B J, OVERGAARD K, et al. The diagnostic validity of urinary free pyridinolines to identify women at risk of osteoporosis[J]. Calcif Tissue Int, 1994, 54(5): 381-384.
- [12] TAKEUCHI Y, NAKAYAMA K, MATSUMOTO T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(7): 3938-3944.
- [13] TAKEUCHI Y, SUZAWA M, KIKUCHI T, et al. Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells[J]. J Biol Chem, 1997, 272(46): 29309-29316.
- [14] MIZUNO M, FUJISAWA R, KUBOKI Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cell mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction[J]. J Cell Physiol, 2000, 184(2): 207-213.
- [15] MAUREEN P L, JANET L S, GARY S S, et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblast: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization[J]. Experimental Cell Research, 1995, 216(1): 35-45.
- [16] KNOTT L, WHITEHEAD C C, FLEMING R H, BAILEY A J. Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone[J]. Biochem J, 1995, 310(Pt 3): 1045-1051.
- [17] ZIOUPOS P, CURREY J D, HAMER A J. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45(2): 108-116.
- [18] 曾敏莉. 钙制剂的现状与发展趋势[J]. 儿科药科学杂志, 2004, 10(3): 16-18.
- [19] 乔伟, 周安国, 王之盛, 等. 小肽促进微量元素吸收的研究进展[J]. 饲料工业, 2006(17): 12-14.
- [20] 付文雯, 马美湖, 蔡朝霞. 牛骨蛋白酶解制取肽钙的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(1): 1-5.
- [21] 杨燊, 邓尚贵, 秦小明. 低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的制备和抗氧化、抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2008, 28(1): 202-206.
- [22] 祝德义, 李彦春, 靳丽强, 等. 胶原多肽与钙结合性能的研究[J]. 中国皮革, 2005, 34(3): 26-29.
- [23] JUNG W K, KIM S K. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belangerii*) frame[J]. Eur Food Res Technol, 2007, 224(6): 763-767.
- [24] BAO X L, LV Y, YANG B C et al. A Study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates[J]. Food Science, 2008, 73(3): C117-121.
- [25] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.92—2003 食品中钙的测定[S].
- [26] 中国轻工业联合会. QB 2732—2005 水解胶原蛋白[S].
- [27] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范实施手册[M]. 北京: 清华同方电子出版社, 2003.