

# 6-羧基壳寡糖螯合钙制备工艺与络合性能研究

胡雪芳<sup>1,2</sup> 田志清<sup>1,2</sup> 梁亮<sup>1,2</sup> 张志民<sup>1,2</sup> 王士奎<sup>1,2</sup>

(1. 农业部规划设计研究院, 北京 100125; 2. 农业部农产品产后处理重点实验室, 北京 100121)

**摘要:** 以壳寡糖(COS)为试验材料,采用TEMPO氧化法将壳寡糖C6位上的羟甲基直接氧化成为羧基,制备6-羧基壳寡糖(CCOS)。以CaCl<sub>2</sub>作为钙源,通过探讨体系pH值、反应温度、反应时间、CCOS与CaCl<sub>2</sub>质量比对CCOS-Ca(II)得率的影响,采用三因素五水平中心旋转组合设计优化了制备工艺。并对产物进行傅里叶变换红外光谱扫描及元素分析。使用Design-Expert软件对响应面试验数据进行回归分析。所得CCOS-Ca(II)制备最佳工艺参数为:反应pH值为8.3,反应时间60 min,反应温度50℃,CCOS与CaCl<sub>2</sub>质量比为34。在此优化工艺条件下,验证试验螯合率为88.86%。通过红外光谱及元素分析,证明了钙螯合物的形成,CCOS-Ca(II)配合物的结构初步认为CCOS与Ca<sup>2+</sup>摩尔比为2:1。CCOS分子除了含有一OH、—NH<sub>2</sub>外,还含有一COOH,能够对钙进行有效螯合,体系pH值、反应温度、配体质量比对螯合结果影响显著,所得CCOS-Ca(II)络合物不仅能发挥壳寡糖本身独特的生物活性,而且有可能起到协同效应,增强各自的生物活性。

**关键词:** 壳寡糖衍生物; 6-羧基壳寡糖螯合钙; 螯合工艺; 元素分析; 红外表征

**中图分类号:** TS202.1; S985 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)04-0381-08

## Preparation Technology and Complexing Properties of 6-Carboxy Chitooligosaccharides Chelate Calcium (CCOS - Ca(II))

HU Xuefang<sup>1,2</sup> TIAN Zhiqing<sup>1,2</sup> LIANG Liang<sup>1,2</sup> ZHANG Zhimin<sup>1,2</sup> WANG Shikui<sup>1,2</sup>

(1. Chinese Academy of Agricultural Engineering, Beijing 100125, China

2. Key Laboratory of Agro-products Postharvest Handling, Ministry of Agriculture, Beijing 100121, China)

**Abstract:** The chelating ability of chitosan derivative 6-carboxy-chitooligosaccharide (CCOS) to calcium ions was studied, and the preparation technology of 6-carboxyl chitosan chelated calcium (CCOS - Ca(II)) was established, to provide new ideas for the development of chitooligosaccharide-based metal complexes and high-performance calcium supplement. Chitooligosaccharides (COS) was used as experimental materials to prepare CCOS by oxidation of hydroxymethyl groups at the C6 position of chitooligosaccharides into carboxyl groups by TEMPO oxidation. Using CaCl<sub>2</sub> as the calcium source, through the discussion of pH value, reaction temperature, reaction time, CCOS and CaCl<sub>2</sub> mass ratio on CCOS - Ca(II) rate were studied, using three factors and five levels central composite rotatable design to optimize the preparation process. The products were analyzed by Fourier transform infrared spectrum scanning (FT-IR) and elemental analysis (EA). Regression analysis of response surface test data was carried out by using Design-Expert software. The optimum process parameters for CCOS - Ca(II) preparation were as follows: the pH value was 8.3, the reaction time was 60 min, the reaction temperature was 50℃, and the mass ratio of CCOS to CaCl<sub>2</sub> was 34. Under the optimized conditions, the chelating rate was 88.86%. The structure of CCOS - Ca(II) complex was confirmed by IR and EA analysis, and the molar ratio of CCOS to Ca<sup>2+</sup> was 2:1. The CCOS molecule contained —OH, —NH<sub>2</sub> and —COOH, which can effectively chelate calcium. The effect of pH value, reaction temperature and ligand mass ratio on the chelation results was significant. CCOS - Ca(II) complex can not only play the unique biological activity of chitooligosaccharides, but also may play a synergistic effect, enhance both the chitooligosaccharides and Ca<sup>2+</sup> biological activity, and it was expected to prepare new calcium supplements.

**Key words:** chitooligosaccharide derivatives; 6-carboxy chitooligosaccharides (CCOS); chelating process; elemental analysis; infrared characterization

收稿日期: 2017-09-18 修回日期: 2017-10-11

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAB01B00)

作者简介: 胡雪芳(1983—),女,工程师,主要从事天然产物提取开发和农业废弃物生物质多糖利用研究,E-mail: xuefang1022@126.com

通信作者: 王士奎(1963—),男,研究员,主要从事海洋及陆地生物质多糖资源综合利用研究,E-mail: wosk1963@sohu.com

## 0 引言

钙是人体必需营养元素之一,参与人体的整个生命过程<sup>[1-2]</sup>,我国以植物性膳食为主,补钙是我国膳食营养研究中的重要课题<sup>[3]</sup>。在实际饮食中钙含量十分充足的情况下,缺钙仍是普遍发生的问题,这是因为仅补充钙量达标是不行的,还需要将钙转化为可吸收的形式。目前常见补钙制剂如碳酸钙等无机钙及柠檬酸钙、葡萄糖酸钙等有机钙,由于其生物效价低、溶解性差,人体对其的吸收利用率有限。另外,人体吸收环境过酸,肠道对  $\text{Ca}^{2+}$  的通透性差等对钙的吸收也有着重要影响。因此开发一种具有多重功能的螯合钙制剂具有重要意义。

目前钙螯合制剂作为广大学者的研究热点,其制备原料、制备方法丰富多样,产品也有很多种<sup>[4-8]</sup>,其研究主要是从农渔产品加工副产物综合利用角度出发,开发肽-钙、氨基酸-钙螯合物,有相当一部分都是粗品,其成分和作用机制复杂,且作为动物性蛋白质存在潜在过敏原,产品纯化难度大,产品检测、安全管理等难以形成统一标准,另外人体对氨基酸类的需求是有一定数量和比例要求的,多肽及氨基酸类螯合钙制剂的长期服用对其他代谢途径、生理功能也存在潜在影响<sup>[9]</sup>。

壳寡糖(COS)是壳聚糖经过降解以后得到的聚合度 2~20 的产物,不仅具有与壳聚糖相似的性质,而且水溶性大大提高,且更容易被吸收,一些生理活性也更加显著,具有提高机体免疫、抗肿瘤、调节血脂、促进双歧杆菌的生长、调节肠道内微生物的代谢活动等功能<sup>[10]</sup>,尤其在促进成骨细胞增殖、增加骨密度、促进骨折愈合、提高骨骼重建能力等骨关节疾病领域具有独特应用价值<sup>[11]</sup>。6-羧基壳寡糖(CCOS)是壳寡糖分子第 6 位羟基直接羧基化后生成的一种壳寡糖衍生物,其分子中除了含有一OH 和一 $\text{NH}_2$ 外,还有一COOH,是一种两性电解质,液态下粘度小,除具有与壳寡糖相似生理功能外,还能有效提高壳寡糖络合金属离子的能力。本文通过 TEMPO 催化氧化法制备 6-羧基壳寡糖,利用该分子特性,与  $\text{Ca}^{2+}$  形成稳定络合体系,制备 CCOS-Ca(II) 配合物,使  $\text{Ca}^{2+}$  随之进入机体,同时改善  $\text{Ca}^{2+}$  的人体吸收环境,充分发挥壳寡糖和钙金属离子对人体双重营养功能特性,探究其合成的最佳工艺条件,对其进行红外表征和元素分析,探讨其配位机理,旨在为开发壳寡糖基金属配合物和高效补钙制剂提供新的思路,为进一步研究壳寡糖及金属配合物在医药保健食品以及生物医学领域的应用提供一定的理论依据。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 材料与设备

原材料:壳寡糖(分子量 500~1 500,脱乙酰度 90%以上,山东奥康生物科技有限公司), $\text{CaCl}_2$ (分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);无水乙醇(分析纯,天津市化学试剂有限公司);NaOH(分析纯,天津市百世化工有限公司);TEMPO(Sigma 公司);HCl、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 、NaClO、NaBr(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);EDTA(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);TEOA(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);钙指示剂(分析纯,天津市河东区红岩试剂厂)。

主要设备:FA1204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州科丰仪器设备有限公司);TGL-16C 型离心机(上海安宁科学仪器);冷冻干燥机(北京博医康试验仪器有限公司);GZX-GF-MBS-1 型电热恒温鼓风干燥器(上海跃进医疗器械厂);PHS-25 型 PH 计(上海精密雷磁);Perkin-Elmer 2400 型元素分析仪(美国 PE 公司);AA300 型原子吸收分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司);Nicolet 6700 型傅里叶红外光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 6-羧基壳寡糖的制备

在 500 mL 三口烧瓶中加入 200 mL 蒸馏水和 10 g 壳寡糖,充分溶解,低温浴槽控制体系温度  $10^\circ\text{C}$ ,加入 1 g TEMPO 和 5 g NaBr,通过滴液漏斗以 1~2 滴/s 的速度滴加质量分数为 30% (基于壳寡糖质量)的 NaClO 溶液,并滴加 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液维持反应介质的 pH 值在 10~10.5 之间,反应 2 h。反应结束后,向反应液中加入适量饱和  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  溶液终止反应,静置片刻,将混合液搅拌加入到乙醇中沉淀,过滤,并使用去离子水充分滤洗氧化产物至中性;所得 6-羧基壳寡糖质量分数在 95% 以上。在  $50^\circ\text{C}$  下真空干燥后, $4^\circ\text{C}$  条件下储存备用。

#### 1.2.2 螯合率测定方法

CCOS 和  $\text{CaCl}_2$  在一定条件下反应一定时间后,移取一定量的反应液两份,一份稀释后直接用 0.05 mol/L 的 EDTA 溶液滴定(不需要标定),记录所消耗 EDTA 体积  $V_0$ ,另一份蒸干,加入无水乙醇进行振荡洗涤,分离出乙醇后加水溶解,再 EDTA 滴定,消耗体积记录为  $V_1$ 。

螯合率计算公式为

$$a = V_1/V_0 \times 100\%$$

### 1.2.3 6-羧基壳寡糖螯合钙的工艺流程

工艺流程为:一定质量比的 CCOS 和  $\text{CaCl}_2$  → 溶于 200 mL 去离子水中 → 搅拌 → 调节溶液 pH 值 (pH 值 3 ~ 10) → 一定温度下反应 (40 ~ 80℃) 一定时间 → 乙醇沉淀 (乙醇质量分数 90% 以上, 静置 3 h) → 离心并收集沉淀 (8 000 r/min, 15 min) → 溶解沉淀物并透析 → 冷冻干燥 (-26℃ 预冻, 工作压力 100 ~ 110 Pa, 升华温度 45 ~ 55℃) → CCOS - Ca(II) 成品 → 测定螯合率。

### 1.2.4 单因素试验

据对壳寡糖(氨基酸、多肽)对金属离子(钙、铁、锌等)螯合工艺参数的相关研究,影响合成反应的主要因素有:pH 值、反应时间、反应温度、配体质量比等。

(1) 固定反应温度在 40℃, 反应时间 30 min, CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比为 10, pH 值 2、4、6、8、10、12, 考察 pH 值对螯合率的影响。

(2) 固定反应 pH 值在 8, 反应时间 30 min, CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比为 10, 反应温度分别为 30、40、50、60、70、80℃, 考察反应温度对螯合率的影响。

(3) 固定反应温度在 50℃、pH 值在 8, CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比为 10, 反应时间 20、40、60、80、100、120 min, 考察反应时间对螯合率的影响。

(4) 固定反应温度 50℃, 反应时间 60 min, 反应 pH 值为 8, CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比分别为 5、10、15、20、25、30, 考察质量比对螯合率的影响。

### 1.2.5 响应面法优化螯合工艺

采用三因素五水平的响应面优化试验, 选取体系 pH 值、反应温度、CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比 3 个因素, 设计二次通用回归试验。试验设计如表 1 所示。

表 1 中心组合设计各因素编码

Tab. 1 Range of different factors investigated with CCRD design

编码	因素		
	pH 值 <i>P</i>	反应温度 <i>T</i> /℃	CCOS 与 $\text{CaCl}_2$ 质量比 <i>N</i>
-2	6	30	5
-1	7	40	15
0	8	50	25
1	9	60	35
2	10	70	45

### 1.2.6 6-羧基壳寡糖螯合钙红外光谱分析

取样品 5 mg, 与 500 mg 的 KBr 一起放入干燥的研钵中, 在红外灯下混合研磨均匀, 使其颗粒粒径在 2.5 μm 以下, 装入压片模具, 制得透明的 KBr 样品片。利用傅里叶红外光谱仪进行定性分析, 在 4 000 ~ 500  $\text{cm}^{-1}$  条件下扫描得到光谱图。按同样

方法对 6-羧基壳寡糖进行红外光谱测定。

### 1.2.7 元素分析

用元素分析仪分别检测样品中 C、H、N 的质量分数, 用原子吸收分光光度计测定  $\text{Ca}^{2+}$  的含量。

### 1.3 数据统计分析

试验结果测定 3 次, 用 Sigma Plot 12.5 进行数据处理与制图, Design-Expert (Version 8.0.6, 美国, Stat-Ease 公司) 软件对试验数据进行拟合与统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### (1) pH 值

由图 1 可知, pH 值对于螯合率有较大影响, 在酸性条件下, 螯合率随着 pH 值的升高而迅速升高, 而当体系 pH 值大于 8, 螯合率随着体系 pH 值升高而缓慢下降。究其原因, 在酸性条件下, 溶液中  $\text{H}^+$  大量存在,  $\text{H}^+$  将会与  $\text{Ca}^{2+}$  争夺供电子基团,  $-\text{COOH}$  的离解受到抑制,  $-\text{COO}^-$  减少, 且  $-\text{NH}_2$  容易被质子化, 氨基及羧基配位能力较弱, 不利于螯合物的形成; 随着 pH 值的增加,  $-\text{COOH}$  的离解增加,  $-\text{COO}^-$  对  $\text{Ca}^{2+}$  的络合作用增强, 而在碱性条件下 (pH 值大于 8),  $\text{OH}^-$  与供电子基团争夺  $\text{Ca}^{2+}$  而形成羟桥化物, 生成了氢氧化钙沉淀<sup>[12]</sup>, 且  $\text{H}^+$  对螯合率的影响大于  $\text{OH}^-$  的作用, 在相对中性条件下, 配体受  $\text{H}^+$  和  $\text{OH}^-$  影响较小, 提供了充分的供电子基团, 从而有利于钙通过配位键形成螯合物。本试验在 pH 值为 8 时, 螯合率与螯合物中钙的含量最高。优化试验中, 选取 pH 值 8 作为设计中点。

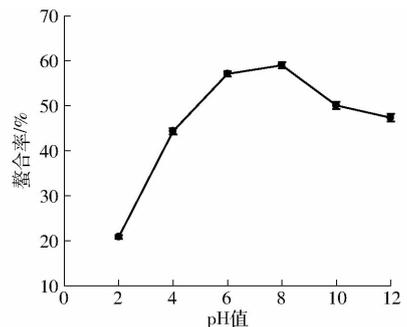


图 1 pH 值对螯合率的影响

Fig. 1 Effect of pH value on rate of chelation rate

#### (2) 体系温度

由图 2 可知, 随着反应温度的增加, 产物螯合率呈现先上升后下降的趋势, 螯合率在 50℃ 达到最大, 此后随着温度的升高, 螯合率和螯合物中钙含量逐渐降低。分析原因, 可能是由于该螯合反应为放热反应, 适当升高温度能够促进反应的进行, 但提高过度会使反应逆向进行, 温度过高, 使聚合物分解或

使螯合物解离<sup>[13]</sup>,在优化试验中,选择 50℃ 为反应体系温度设计中心点。

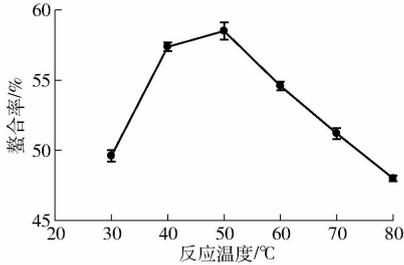


图2 反应温度对螯合率的影响

Fig.2 Effect of reaction temperature on rate of chelation rate

### (3) 反应时间

由图3可知,选取的反应时间范围内,随着反应时间的延长,螯合率变化趋势不明显,采用 SPSS 19.0 进行方差分析结果显示,在 60 ~ 100 min 时间范围内,反应时间对螯合率影响差异不显著 ( $p < 0.01$ ),螯合率虽然随着时间的改变有上下浮动,应属于随机波动,无统计学意义,在 100 min 后螯合率显著下降,这是由于随着反应时间的延长,一部分螯合物不稳定被分解。总体上反应时间对螯合率影响不大,在响应面试验中固定在 60 min。

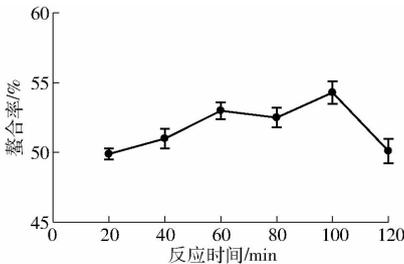


图3 反应时间对螯合率的影响

Fig.3 Effect of reaction time on chelation rate

### (4) CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比

配体质量比是指配位体与金属离子的质量之比,是影响螯合反应的一个重要因素。配位比过高,会使 6-羧基壳寡糖的利用率下降,配位体过低,螯合物不稳定。由图4可以看出,CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比对螯合率有非常显著的影响,随着质量比的不断增加螯合率不断升高,当质量比为 25 时,产物螯合率在 85% 左右,且此时钙源和 6-羧基壳寡糖的利用率都比较高,当质量比进一步增加,螯合率升高的趋势并不明显。说明增大配位比可以推动螯合反应向有利的方向进行,但过大的配位比显然会造成配体的浪费。因此,选择 CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比 25 作为优化试验中质量比设计中心点。

## 2.2 试验结果

试验方案设计与结果如表2所示,表中 A、B、C 分别为 pH 值、反应温度、CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比的编码值。

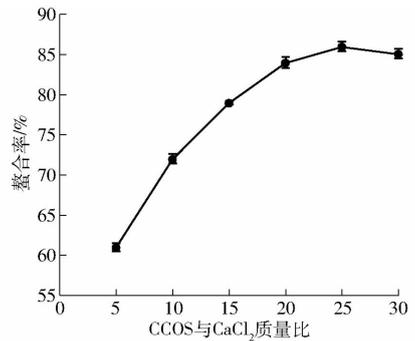


图4 CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比对螯合率的影响

Fig.4 Effect of CCOS and CaCl<sub>2</sub> mass ratio on chelation rate

表2 试验方案与结果

Tab.2 CCRD experiment design and response values

试验序号	A	B	C	螯合率 Y/%
1	-1	-1	-1	66.9
2	-1	-1	-1	63.2
3	1	-1	-1	82.5
4	1	-1	-1	86.4
5	-1	1	-1	54.5
6	-1	1	-1	58.1
7	1	1	-1	57.9
8	1	1	-1	60.1
9	-1	-1	1	69.5
10	-1	-1	1	65.4
11	1	-1	1	84.4
12	1	-1	1	81.4
13	-1	1	1	66.0
14	-1	1	1	78.8
15	1	1	1	82.2
16	1	1	1	77.4
17	-2	0	0	47.9
18	2	0	0	63.2
19	0	-2	0	73.1
20	0	2	0	65.9
21	0	0	-2	69.3
22	0	0	2	91.1
23	0	0	0	88.1
24	0	0	0	90.5
25	0	0	0	91.1
26	0	0	0	89.8
27	0	0	0	92.5
28	0	0	0	87.8
29	0	0	0	89.4
30	0	0	0	86.1

## 2.3 模型的建立与检验

利用 Design-Expert 8.0.6 数据处理系统对试验结果进行方差统计分析,结果如表3所示。

由表3的方差分析可以看出,回归模型高度显著 ( $p < 0.001$ ),模型  $R^2 = 0.9455$ ,矫正  $R^2 = 0.9209$ ,说明模型拟合良好;模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率,表3中模型失拟项的  $p$  值大于 0.05 表明模型失拟项不显著,回归方程能较好地解释响应结果并预测最佳螯合工艺条件,图5~7直观地反映了各因素对 CCOS - Ca(II) 螯合率的影响。

表 3 螯合率回归方程方差分析

Tab.3 Variance analysis of chelating rate

差异源	方差	自由度	均方差	F	p	显著性
模型	4684.713	9	520.523 6	38.519 9	<0.001	**
A	605.010 4	1	605.010 4	44.772 11	<0.001	**
B	260.700 4	1	260.700 4	19.292 41	0.003	**
C	591.033 8	1	591.033 8	43.737 8	<0.001	**
AB	153.140 6	1	153.140 6	11.332 74	0.0031	**
AC	0.140 625	1	0.140 625	0.010 407	0.9198	-
BC	324.900 6	1	324.900 6	24.043 36	<0.001	**
A <sup>2</sup>	2 197.014	1	2197.014	162.583 9	<0.001	**
B <sup>2</sup>	807.594 3	1	807.594 3	59.763 76	<0.001	**
C <sup>2</sup>	203.445 6	1	203.445 6	15.055 42	<0.001	**
残差	270.262 2	20	13.513 11			
失拟检验	111.558 5	5	22.311 69	2.108 806	0.120 8	-
纯差	158.703 8	15	10.580 25			
总和	4 954.975	29				

注: \*\*表示极显著, -表示不显著。

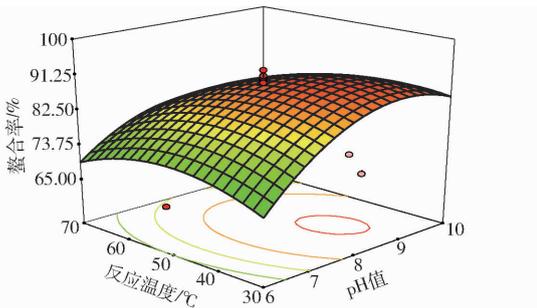


图 5 反应温度和 pH 值对螯合率的影响  
Fig.5 Effect of reaction temperature and pH value on chelation rate

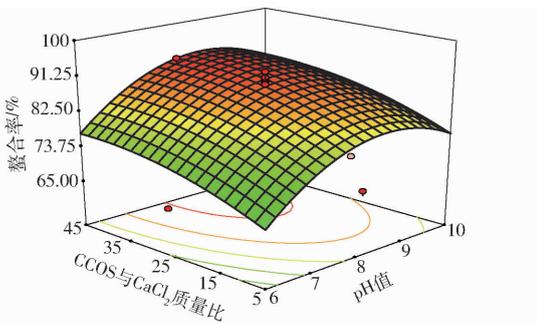


图 6 CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比和 pH 值对螯合率的影响  
Fig.6 Effect of pH value and mass ratio on chelation rate

从表 3 回归方程系数显著性检验可知,该模型 A、B、C、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、AB、BC 对产品螯合率的影响均达到了极显著的水平 (p < 0.01), 而 AC (p = 0.919 8) 对螯合率的影响作用不显著。在试验的范围内,对 CCOS - Ca(II) 螯合率的影响从大到小依次为: pH 值、质量比、反应温度。根据方差分析和回归方程系数显著性检验结果,将差异不显著因子剔除后的回归方程为

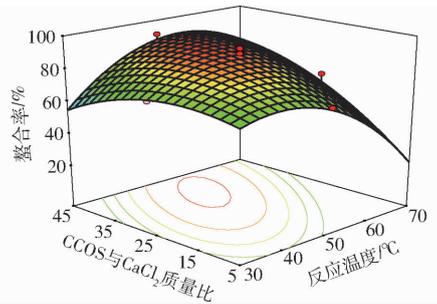


图 7 CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比和反应温度对螯合率的影响  
Fig.7 Effect of reaction temperature and mass ratio on chelation rate

$$Y = 88.89 + 5.02A - 3.30B + 4.96C - 3.09AB + 4.51BC - 8.86A^2 - 5.37B^2 - 2.70C^2$$

得到 CCOS - Ca(II) 螯合率与真实值之间关系的回归方程为

$$Y = -730.77 + 161.98P + 6.39T - 0.48NP + 0.05TN - 8.85P^2 - 0.05T^2 - 0.03N^2$$

模型预测最高螯合率为 91.91%, 对应 pH 值为 8.29, 温度为 49.97℃, CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比为 34.24, 考虑到实际操作的简便性, 将参数修正为: pH 值 8.3, 反应温度 50℃, CCOS 与 CaCl<sub>2</sub> 质量比 34。在此优化后工艺条件下, 验证试验螯合率为 88.86%, 验证试验值与预测值误差较小, 不存在显著性差异 (p > 0.05), 说明优化试验较为成功。验证试验值与预测值误差较小, 说明模型拟合较好。

### 2.4 CCOS - Ca(II) 红外光谱分析

红外光谱整个范围可分为 4 000 ~ 1 300 cm<sup>-1</sup> 官能区与 1 300 ~ 600 cm<sup>-1</sup> 指纹区两个区<sup>[14]</sup>。4 000 ~ 1 300 cm<sup>-1</sup> 区域的峰是由伸缩振动产生的吸收带。由于基团的特征吸收峰一般位于此高频范围, 是基团鉴定工作最有价值的区域。在 1 300 ~ 600 cm<sup>-1</sup> 区域中, 除单键的伸缩振动外, 还有因变形振动产生的复杂光谱, 当分子结构稍有不同时, 该区的吸收就有细微的差异<sup>[15]</sup>。本试验结果表明羧酸与羧酸盐的红外光谱存在明显差别。由图 8a 可以看出, 6-羧基壳寡糖的 O-H 与 N-H 的伸缩振动重叠而成的 3 394 cm<sup>-1</sup> 的峰<sup>[16]</sup>, 在 CCOS - Ca(II) 螯合物光谱图中此波段发生红移, 变为 3 418 cm<sup>-1</sup>, 说明 -NH<sub>2</sub>、-OH 与 Ca<sup>2+</sup> 发生螯合生成了铵盐, 液体或固体羧酸在 1 725 cm<sup>-1</sup> 区域出现一强吸收峰, 这是二聚体 C=O 伸缩振动产生的<sup>[17]</sup>, 而螯合反应后, 这一吸收峰几乎消失, 而原本位于 1 604 cm<sup>-1</sup> 和 1 384 cm<sup>-1</sup> 的两个吸收峰(图 8a) 红移到 1 631 cm<sup>-1</sup> 处和 1 406 cm<sup>-1</sup> 处(图 8b)。这是由于金属离子取代氢后, 氧上带有一个负电荷, 就更容易供给电子和原来羰基的 P 电子发生共轭作用, 在这样体系中氧

上负电荷不是集在一个氧原子上,而是分散在两个氧原子和一个碳原子上,出现平均化结构,发生强烈的振动偶合作用,结果出现了两个吸收峰,其中对称伸缩振动位于  $1400\text{ cm}^{-1}$  附近,不对称伸缩振动在  $1650\text{ cm}^{-1}$  附近,吸收都比较强<sup>[18]</sup>。这一变化也说明了  $\text{Ca}^{2+}$  与  $-\text{COOH}$  形成配位 ( $p-\pi$ ) 螯合物,证明了螯合钙的生成。红外吸收峰的偏移或变化表明在 6-羧基壳寡糖与钙之间发生的不是简单的物理吸附,其相互的联系是通过 6-羧基壳寡糖骨架上的氨基和羧基与  $\text{Ca}^{2+}$  之间发生了结合反应。

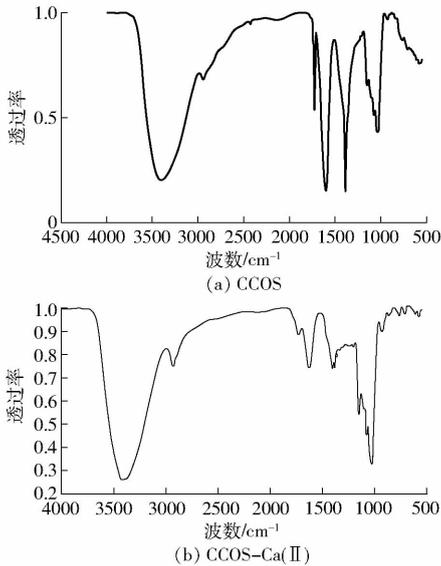


图8 CCOS 和 CCOS - Ca(II) 红外光谱图

Fig.8 Infrared spectra of CCOS and CCOS - Ca(II)

## 2.5 螯合物元素分析

表4列出了6-羧基壳寡糖、6-羧基壳寡糖合钙的元素分析数据。可计算出6-羧基壳寡糖分子中各个元素的原子个数比为  $5.95:9.16:1:8.16$ , 单元残基的分子组成接近于  $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_5\text{N}$ , 6-羧基壳寡糖螯合钙各个原子数比为  $11.75:18.41:1.97:1$ , 由此可推算出配合物中6-羧基壳寡糖与  $\text{Ca}^{2+}$  的大致配位比为  $2:1$ , 即相当于6-羧基壳寡糖分子中的2个氨基葡萄糖单元残基与1个  $\text{Ca}^{2+}$  配位。

表4 螯合物的元素分析

Tab.4 Elements analysis of 6-carboxy-chitooligosaccharide chelated calcium %

样品	质量分数			
	C	H	N	Ca
CCOS	40.14	5.13	7.95	
CCOS - Ca(II)	33.86	4.42	6.62	9.51

## 3 讨论

壳寡糖/壳聚糖及其衍生物中因存在着有良好配位能力的氨基和羟基以及羧基,对金属具有良好

的配位作用。以壳寡糖或者改性壳寡糖为基体络合金属离子所得金属配合物材料具有许多独特的物理、化学性质,比如抗氧化<sup>[19-20]</sup>、抗菌<sup>[21]</sup>、脱除动物体内重金属<sup>[22-23]</sup>等功能,另外壳寡糖及其衍生物良好的生物相容性和可降解性使其有望成为人体微量元素钙、铁、锌等的补剂<sup>[24-26]</sup>。为了提高壳寡糖对金属离子的吸附、螯合能力,近年来有学者通过引入羧基对其改性,杨华<sup>[24]</sup>研究发现,壳寡糖改性后所得的羧甲基壳寡糖对锌的吸附能力明显提高,许聪等<sup>[25]</sup>、许才利等<sup>[26]</sup>研究发现,羧甲基壳寡糖对稀土元素钆和金属元素铁的络合能力强于壳寡糖且热稳定性更好。

本研究通过直接对壳寡糖 C6 位羟甲基氧化生成羧基,较引入乙酸对其进行羧基化改性工艺更具经济性,经过螯合工艺优化后,通过元素分析初步推断 CCOS 与  $\text{Ca}^{2+}$  摩尔比为  $2:1$ , 即 2 个 CCOS 分子螯合 1 个  $\text{Ca}^{2+}$ , 高于田金花等<sup>[27]</sup>、王金明等<sup>[28]</sup> 研究中壳寡糖对同样价态的锌离子的络合能力。本文研究发现 CCOS 对金属的配位能力受体系 pH 值影响最为显著,在 pH 值相对中性条件下螯合率较高,体系过酸,  $\text{H}^+$  过多,影响  $-\text{NH}_2$  和  $-\text{COOH}$  在体系中的存在状态,进而影响螯合产物的形成,而体系过碱,  $\text{OH}^-$  过多而与钙形成沉淀,而降低螯合率,刘艳如等<sup>[29]</sup> 也研究发现壳寡糖与金属钙离子发生配位反应时,当溶液的 pH 值呈酸性时,溶液中的  $-\text{NH}_3^+$  浓度增大,  $-\text{NH}_2$  浓度减小,平衡朝络合物解离方向移动;螯合率受体系温度的影响也较为明显,反应温度  $50^\circ\text{C}$  附近,螯合产物最为稳定,温度过高会使得已经形成的螯合物发生解离;受反应时间影响不显著,螯合过程迅速,这与赵丽娜等<sup>[30]</sup>、桑亚新等<sup>[31]</sup> 研究结果一致,本文研究所得最高螯合率为  $88.86\%$ , 高于骨胶原、多肽、氨基酸等<sup>[4-5,14-15,32]</sup> 对钙离子的螯合能力。

## 4 结论

(1) 利用壳寡糖 (COS) 制备 6-羧基壳寡糖 (CCOS), 将壳寡糖 C6 位上的羟甲基直接氧化成为羧基, 研究了 CCOS 对钙离子的络合性能, 考察了体系 pH 值、反应温度、反应时间、CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比对螯合率的影响规律, 研究结果表明, 体系 pH 值、反应温度对螯合率影响显著, 反应时间对螯合率影响不显著。

(2) 通过中心复合旋转设计优化确定了 CCOS - Ca(II) 制备的最终工艺参数为: 反应 pH 值为 8.3, 反应时间 60 min, 反应温度  $50^\circ\text{C}$ , CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比为 34。在此优化工艺条件下, 验证试验螯合率为  $88.86\%$ 。方差分析与检验结果表明, pH 值、反应温

度、CCOS 与  $\text{CaCl}_2$  质量比以及 3 个因素的平方项, pH 值和反应温度、pH 值和质量比的交互作用对产品螯合率的影响均达到了极显著的水平 ( $p < 0.01$ )。

(3) 对产物进行傅里叶变换红外光谱扫描及元

素分析, 结果表明, 螯合前后两者在化学结构上存在一定的变化, 较好地证明了钙螯合物的形成, CCOS-Ca(II) 配合物的结构初步认为 CCOS 与  $\text{Ca}^{2+}$  摩尔比为 2:1。

#### 参 考 文 献

- 1 朱晓霞, 汪国英, 朱贤英. 钙的作用机理及如何安全补钙的研究现状[J]. 保健医学研究与实践, 2014, 11(1): 91-94.  
ZHU Xiaoxia, WANG Guoying, ZHU Xianying. The research reality on the functioning mechanism of calcium and the safe supplementation of calcium[J]. Health Medicine Research and Practice, 2014, 11(1): 91-94. (in Chinese)
- 2 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.
- 3 宋俊梅, 曲静然. 促进骨钙生物可利用性的研究[J]. 食品科技, 2002(2): 60-62.  
SONG Junmei, QU Jingran. Study on the enhancement of bone calcium [J]. Food Science and Technology, 2002(2): 60-62. (in Chinese)
- 4 赵妍娟, 胡林林, 姜绍通. 猪骨粉制备胶原多肽螯合钙工艺优化[J]. 农业工程学报, 2011, 27(增刊2): 277-281.  
ZHAO Yanyan, HU Linlin, JIANG Shaotong. Optimum conditions of producing collagen polypeptide chelated Ca using pig bone [J]. Transactions of the CSAE, 2011, 27(Supp. 2): 277-281. (in Chinese)
- 5 陆剑锋, 孟昌伟, 李进, 等. 斑点叉尾鱼骨胶原多肽螯合钙的制备及其特征[J]. 水产学报, 2012, 36(2): 314-320.  
LU Jianfeng, MENG Changwei, LI Jin, et al. Preparation and characterization of collagen polypeptide chelated calcium from fish bone powder of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 314-320. (in Chinese)
- 6 张凯, 侯虎, 彭喆, 等. 鲑鱼骨明胶多肽螯合钙制备工艺及其在体外模拟消化液中的稳定性[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 1-7.  
ZHANG Kai, HOU Hu, PENG Zhe, et al. Optimization of preparation of calcium-chelated cod bone gelatin peptide and its stability in simulated gastrointestinal system[J]. Food Science, 2016, 37(24): 1-7. (in Chinese)
- 7 NARIN C, BENJAMAS C, NUALPUN S, et al. Calcium-peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236: 57-63.
- 8 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.  
HU Zhenzhu, YANG Xianqing, MA Haixia, et al. Preparation, identification and antioxidant activity of Tilapia fish skin collagen polypeptide chelated calcium[J]. Food Science, 2010, 31(20): 141-145. (in Chinese)
- 9 薛荣涛, 李翠芹, 何腊平. 复合氨基酸螯合钙的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 390-394.  
XUE Rongtao, LI Cuiqin, HE Laping. Research progress in compound amino acid chelated calcium[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(21): 390-394. (in Chinese)
- 10 张新娜, 孙君社, 王淑豪, 等. 羧甲基壳聚糖亚铁配合物的表征及其对 CO 的吸附研究[J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(1): 91-95.  
ZHANG Xinna, SUN Junshe, WANG Shuhao, et al. Study on the N-O-Carboxymethyl Chitosan- $\text{Fe}^{2+}$  complex and its adsorption of CO[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2011, 25(1): 91-95. (in Chinese)
- 11 乔莹, 恽小婧, 白雪芳, 等. 壳寡糖与骨关节病相关性研究进展[C]//全国第八届中国中西医结合风湿病学术会议论文汇编, 2010.
- 12 杨文炳, 姚芬英. 复合氨基酸铁合成及其螯合反应研究[J]. 化学通报, 1991(1): 46-47.
- 13 窦丽娜. 低聚谷氨酸钙的制备条件及功能特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2010.  
DOU Li'na. The study on preparation and functional properties of oligomeric glutamate calcium[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2010. (in Chinese)
- 14 韩克光, 甄守艳, 范华, 等. 钙螯合羊骨胶原多肽的制备及表征分析[J]. 农业工程学报, 2015, 31(21): 301-307.  
HAN Keguang, ZHEN Shouyan, FAN Hua, et al. Preparation and characteristic analysis of calcium-chelated ossein peptide[J]. Transactions of the CSAE, 2015, 31(21): 301-307. (in Chinese)
- 15 张妹, 过世东. 氨基酸多肽螯合钙的制备及其工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(4): 422-425.  
ZHANG Shu, GUO Shidong. Study on preparation and optimization of amino acid chelated calcium[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(4): 422-425. (in Chinese)
- 16 王伟. 固相法制备壳聚糖羧酸盐及其结构、性质和应用研究[D]. 南宁: 广西大学, 2008.  
WANG Wei. The chitosan carboxylic acid salts: preparation by solid-phase way, structure, properties and application[D]. Nanning: Guangxi University, 2008. (in Chinese)
- 17 回瑞华, 关崇新, 侯冬岩. 羧酸及其盐红外光谱特性的研究[J]. 鞍山师范学院学报, 2001, 3(1): 95-98.  
HUI Ruihua, GUAN Chongxin, HOU Dongyan. Study on IR characteristics of carboxylic acid and their salts[J]. Journal of Anshan Normal University, 2001, 3(1): 95-98. (in Chinese)
- 18 于世林, 李寅蔚, 夏心泉, 等. 波谱分析[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1991

- 19 吕新刚,刘兴华,蔡露阳.壳聚糖涂膜对苹果虎皮病防治效果与机理研究[J].农业机械学报,2011,42(3):131-135.  
LÜ Xin'gang, LIU Xinghua, CAI Luyang. Effects and mechanism of chitosan coatings in the control of superficial scald in apples [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011,42(3):131-135. (in Chinese)
- 20 罗自生,徐晓玲,徐庭巧,等.壳聚糖添加纳米碳酸钙助剂对鲜切山药品质的影响[J].农业机械学报,2009,40(4):125-128.  
LUO Zisheng, XU Xiaoling, XU Tingqiao, et al. Effect of chitosan coating with nano-CaCO<sub>3</sub> appendix on quality of fresh cut yam [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009,40(4):125-128. (in Chinese)
- 21 杨楠,徐翠莲,杨国玉,等.壳寡糖希夫碱金属配合物的合成及其对烟草花叶病毒的抑制活性[J].农药学报,2010,12(1):31-36.  
YANG Nan, XU Cuilian, YANG Guoyu, et al. Synthesis and biological activity of chitooligosaccharides Schiff base metal complexes[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2010,12(1):31-36. (in Chinese)
- 22 孙继鹏,汪东风,李国云,等.壳寡糖钙、镁配合物对栉孔扇贝体内镉的脱除[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2010,40(2):33-37.  
SUN Jipeng, WANG Dongfeng, LI Guoyun, et al. The removal of cadmium from chlamys ferrari by chitosan oligosaccharide complexes with Ca and Mg[J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition, 2010,40(2):33-37. (in Chinese)
- 23 黄国清,李志茹,朱常龙,等.壳寡糖-金属配合物对太平洋牡蛎体内中Cd脱除效果的研究[J].中国食品学报,2012,12(4):121-126.  
HUANG Guoqing, LI Zhiru, ZHU Changlong, et al. Effect of chitosan oligosaccharide-metal complex on cadmium removal from oyster crassostrea gigas[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012,12(4):121-126. (in Chinese)
- 24 杨华.壳寡糖和羧甲基壳寡糖对Zn(II)的络合性能研究[C]//2012年中国药学会大会暨第十二届中国药师周论文集,2012.  
YANG Hua. Chitosan and carboxymethyl chitosan complexing performance of Zn(II) [C]//2012 China Pharmaceutical Society Conference and the 12th China Pharmacist Forum Proceedings, 2012.
- 25 许聪,杨华,黄杨.羧甲基壳寡糖与钆配合物的制备[J].功能高分子学报,2013,26(1):104-108.  
XU Cong, YANG Hua, HUANG Yang. Preparation of coordination compound of carboxymethyl chitooligosaccharides and gadolinium nitroxide[J]. Journal of Functional Polymers, 2013,26(1):104-108. (in Chinese)
- 26 许才利,唐星华.新型补铁剂羧甲基壳寡糖-亚铁的制备研究[J].南昌航空工业学院学报:自然科学版,2006,20(1):43-45.  
XU Caili, TANG Xinghua. Study on the preparation of the ferrous carboxymethyl chitooligosaccharides for a new ferruginous[J]. Journal of Nanchang Institute of Aeronautical Technology: Natural Science Edition, 2006,20(1):43-45. (in Chinese)
- 27 田金花,杨华,迟光伟,等.壳寡糖锌(II)配合物的合成与结构表征[J].高分子通报,2011(1):71-74.  
TIAN Jinhua, YANG Hua, CHI Guangwei, et al. Synthesis and characterization of chitooligosaccharides-zinc complex[J]. Chinese Polymer Bulletin, 2011(1):71-74. (in Chinese)
- 28 王金明,黄卫红,闫永胜,等.壳寡糖锌配合物的合成、表征及动力学研究[J].食品科技,2010,35(5):244-247.  
WANG Jinming, HUANG Weihong, YAN Yongsheng, et al. Synthesis, characterization and adsorptive kinetics of the chitooligosaccharide-Zn coordination[J]. Food Science and Technology, 2010,35(5):244-247. (in Chinese)
- 29 刘艳如,陈盛,余萍.水溶性壳聚糖的制备及其钙离子的络合[J].福建师范大学:自然科学版,1997,13(3):67-70.  
LIU Yanru, CHEN Sheng, YU Ping. The preparation of water-soluble low-molecular weight chitosan and the complex with calcium ions[J]. Fujian Normal University: Natural Science Edition, 1997,13(3):67-70. (in Chinese)
- 30 赵立娜,汪少芸,张亚娇,等.响应面法优化乳清蛋白肽螯合钙离子的研究[J].中国食品学报,2014,14(4):64-71.  
ZHAO Li'na, WANG Shaoyun, ZHANG Yajiao, et al. Optimization of chelation of whey protein peptides with calcium using response surface method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014,14(4):64-71. (in Chinese)
- 31 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.  
SANG Yaxin, WANG Changlu, WANG Su, et al. Study on the preparation of collagen chelating calcium using shellfish[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012,12(5):49-55. (in Chinese)
- 32 高菲,王维有,鲁军,等.海洋鱼骨胶原肽螯合物的制备及红外光谱表征[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2015,45(1):47-54.  
GAO Fei, WANG Weiyou, LU Jun, et al. Preparation and infrared spectrum identification for marine fish ossein peptide chelated calcium[J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition, 2015,45(1):47-54. (in Chinese)