

# 酸解法提取牛骨中可溶性钙的研究

刘忠霞, 翁佩芳\*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 采用酸解法提取牛骨粉中的可溶性钙, 以钙的溶出率为指标, 在单因素实验基础上, 采用正交实验优化牛骨粉中可溶性钙提取的工艺条件, 同时研究了牛骨粉酸解过程中磷的溶出率变化。研究表明: 牛骨粉和盐酸的料液比为 1:12, 盐酸浓度  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 反应温度  $70^\circ\text{C}$ , 酸解时间 60 min 时, 酸解液中可溶性钙的溶出率高达 94.39%。

**关键词:** 牛骨; 酸解; 钙溶出率; 磷溶出率

**中图分类号:** TS251.94

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-5132 (2013) 02-0017-05

现代医学研究表明钙是人类生命的最重要元素之一, 具有重要的生理功能。钙能促进体内某些酶的活动, 调节酶的活性; 参与神经肌肉的活动, 并促进神经递质的释放; 钙还具有调节心律、降低心血管的通透性、控制炎症和水肿、维持酸碱平衡等作用<sup>[1-3]</sup>。人体长期缺钙会导致一系列的生理疾病<sup>[4-5]</sup>。因此寻找安全、更有利于人体吸收的钙源已日益受到社会的关注。牛骨是畜牧业加工中一种非常重要的副产品, 营养丰富, 含有大量的钙质, 且钙磷比接近 2:1, 是人体钙吸收的最佳比例<sup>[6]</sup>, 可以作为天然钙源, 易被人体吸收。

目前一些学者仅对酸解法提取牛骨中可溶性钙进行了研究<sup>[7-8]</sup>, 对提取可溶性钙过程中磷的溶出率变化尚未见报道。笔者采用盐酸水解的方法提取牛骨粉中的可溶性钙, 并对牛骨粉酸解过程中磷的溶出率变化进行了分析, 通过正交实验优化了提取牛骨中可溶性钙的工艺条件, 旨在为今后提高牛骨的综合利用率提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**材料:** 牛骨由宁波莱盛农业科技实业有限公司提供; 硝酸、高氯酸、盐酸、浓硫酸、柠檬酸、

乙酸、乳酸、三乙醇胺、硫酸铜、硫酸钾、硼酸、氢氧化钠、钼酸铵、对苯二酚、亚硫酸钠、乙醚均为国产分析纯; 磷酸二氢钾为国产优级纯; 钙标准溶液购于国药集团化学试剂有限公司。

**仪器:** FW177 型粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司); LDZX-40B I 型立式蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); 电热鼓风干燥箱(宁波江南仪器厂); KDN-04 消化炉(上海新嘉电子有限公司); AB204-S 电子天平(上海帅宁仪器有限公司); SZF-06C 脂肪测定仪(上海洪纪仪器设备有限公司); 三和通风柜(浙江三和科教仪器有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 测定方法及计算

牛骨粉中钙元素含量的测定采用 EDTA 滴定法(GB/T 5009.92-2003)。

准确移取酸解液 1 mL 于锥形瓶中, 加 1:4 的三乙醇胺溶液 3 mL,  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 2 mL, 钙红指示剂 3 滴, 用标定后的 EDTA 进行滴定, 溶液由酒红色变为亮蓝色即为滴定终点。

计算公式为:

$$M = \frac{T \times (V - V_0) \times f \times 100}{m},$$

式中:  $M$  为钙含量,  $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ ;  $T$  为 EDTA 滴定量,

$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $V$  为滴定样品时所用 EDTA 的体积,  $\text{mL}$ ;  $V_0$  为滴定空白时所用 EDTA 的体积,  $\text{mL}$ ;  $f$  为稀释倍数;  $m$  为样品的质量,  $\text{g}$ .

酸解液中钙的溶出率=酸解液中可溶性钙的含量/牛骨中的总钙含量 $\times 100\%$ .

牛骨粉中磷的测定采用分光光度法(GB/T 5009.87-2003). 计算公式为:

$$M_1 = m_1 V_1 / m V_2 \times 100,$$

式中:  $M_1$  为磷含量,  $\text{mg}\cdot(100\text{g}^{-1})$ ;  $m_1$  为回归方程算得测定样品中磷的质量,  $\text{mg}$ ;  $V_1$  为样品定容的体积,  $\text{mL}$ ;  $m$  为样品的质量,  $\text{g}$ ;  $V_2$  为测定样品的体积,  $\text{mL}$ .

酸解液中磷的溶出率=酸解液中可溶性磷的含量/牛骨中总磷含量 $\times 100\%$ .

牛骨粉中蛋白质的测定及计算采用凯氏定氮法(GB 5009.5-2010).

牛骨粉中灰分的测定及计算采用灼烧重量法(GB 5009.4-2010).

牛骨粉中水分的测定及计算采用直接干燥法(GB 5009.3-2010).

牛骨粉中脂肪的测定及计算采用索氏提取法(GB/T 5009.6-2003).

### 1.2.2 工艺流程

牛骨 $\rightarrow$ 清洗 $\rightarrow$ 粗粉碎 $\rightarrow$ 蒸煮 $\rightarrow$ 脱脂 $\rightarrow$ 烘干 $\rightarrow$ 细粉碎 $\rightarrow$ 过筛 $\rightarrow$ 酸解 $\rightarrow$ 抽滤 $\rightarrow$ 定容 $\rightarrow$ 分别测定钙和磷的溶出率.

### 1.2.3 操作要点

(1) 蒸煮. 采用高压蒸煮法对牛骨进行脱脂, 蒸煮时新鲜牛骨与蒸馏水的体积比控制在 1:5, 温度为  $121^\circ\text{C}$ , 时间为 1.5 h.

(2) 烘干. 将蒸煮后的牛骨沥去油水, 然后均匀平铺在平盘上, 放入  $80^\circ\text{C}$  的烘箱中, 烘干 10 h.

(3) 粉碎. 烘干后的牛骨经多级粉碎后, 过 80 目筛得到牛骨粉.

### 1.2.4 单因素实验

(1) 酸试剂酸解效果的比较. 准确称取 2 g 牛骨粉 4 份, 分别放入锥形瓶中, 再分别加入 20 mL, 浓度为  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的柠檬酸、乳酸、乙酸、盐酸溶液,  $60^\circ\text{C}$  水浴 1 h, 酸解液抽滤后测定滤液中可溶性钙的含量. 以钙的溶出率为指标, 确定酸解牛骨粉的适宜酸试剂.

(2) 酸解法提取牛骨粉中可溶性钙的单因素

实验以钙的溶出率为指标, 分别选取不同的盐酸浓度、酸解时间、料液比、温度进行单因素实验, 考察不同因素对钙和磷溶出率的影响, 选择适宜的反应条件.

### 1.2.5 正交实验

综合以上单因素实验结果, 为确定各因素的影响水平, 以钙的溶出率为指标, 采用正交实验对提取工艺进行优化. 其因素与水平见表 1, 按  $L_9(3^4)$  正交表进行正交实验.

表 1 正交试验因素水平

| 水平 | 因素                                             |                 |            |                             |
|----|------------------------------------------------|-----------------|------------|-----------------------------|
|    | 盐酸浓度(A)/<br>( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 酸解时间<br>(B)/min | 料液<br>比(C) | 温度<br>(D)/ $^\circ\text{C}$ |
| 1  | 1.5                                            | 60              | 1:10       | 60                          |
| 2  | 2.0                                            | 80              | 1:12       | 65                          |
| 3  | 2.5                                            | 100             | 1:14       | 70                          |

## 2 结果与分析

### 2.1 牛骨粉基本成分的测定

对牛骨粉中的灰分、钙、磷、蛋白质、脂肪、水分含量进行了测定, 结果见表 2.

表 2 牛骨粉的基本成分

| 骨粉   | 灰分    | 钙     | 磷     | 蛋白质   | 脂肪   | 水分   |
|------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| 含量/% | 63.37 | 26.21 | 11.47 | 25.52 | 5.79 | 1.79 |

### 2.2 单因素实验

#### 2.2.1 酸试剂酸解效果比较

以钙的溶出率为指标, 选用盐酸、乳酸、乙酸、柠檬酸提取牛骨粉中可溶性钙, 结果见表 3.

表 3 酸试剂选择

| 酸试剂    | 盐酸    | 乳酸    | 乙酸    | 柠檬酸   |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| 钙溶出率/% | 68.05 | 48.78 | 35.77 | 32.52 |

由表 3 可知, 4 种酸在相同条件下对钙溶出率的影响为: 盐酸 $>$ 乳酸 $>$ 乙酸 $>$ 柠檬酸. 盐酸的酸性最强, 能把骨中的  $\text{PO}_4^{3-}$  置换出来, 乳酸钙的溶解度比乙酸钙大, 所以乳酸的酸解效果比乙酸强, 而柠檬酸同牛骨粉反应时形成溶解度更低的柠檬酸钙, 故柠檬酸的提取效果最弱. 所以选择盐酸提取牛骨粉中的可溶性钙<sup>[9]</sup>.

### 2.2.2 盐酸浓度对钙、磷溶出率的影响

准确称取 2 g 牛骨粉 8 份, 分别放入锥形瓶中, 再分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸 20 mL, 50 °C 水浴 60 min, 酸解液抽滤后测定滤液中可溶性钙含量. 以钙的溶出率为指标, 确定提取牛骨中钙的适宜盐酸浓度, 同时测定酸解液中磷的溶出率, 结果如图 1 所示.

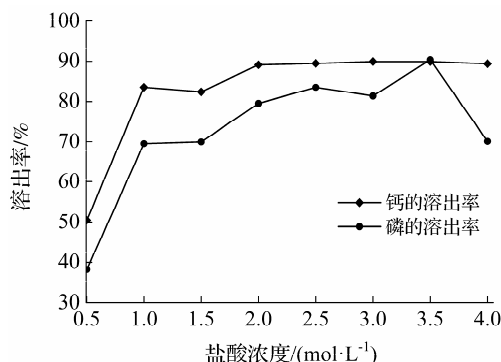


图1 盐酸浓度对牛骨粉中钙和磷溶出率的影响

由图 1 可知, 盐酸浓度在 0.5~1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 对钙和磷的溶出率影响较大; 当盐酸浓度大于 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 钙的溶出率变化不大; 当浓度达到 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 钙的溶出率达到最大, 所以选择盐酸浓度为 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . 而磷的溶出率在一定范围内与钙的溶出率呈正相关, 相关系数为 0.9329, 即当钙的溶出率增大, 磷的溶出率也随之增大, 当盐酸浓度为 3.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时磷的溶出率达到最大. 故盐酸浓度越大, 对牛骨粉中由磷酸钙构成的羟磷灰石晶体的作用越强烈, 离子化效果越好, 钙和磷的溶出率也随之增大<sup>[8]</sup>.

### 2.2.3 酸解时间对钙、磷溶出率的影响

准确称取 2 g 牛骨粉 8 份, 分别放入锥形瓶中, 再分别加入 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸 20 mL, 在 50 °C 下水浴酸解 20、40、60、80、100、120、140、160 min, 酸解液抽滤后测定滤液中可溶性钙的含量. 以钙的溶出率为指标, 确定提取牛骨中钙的适宜酸解时间, 同时测定酸解液中磷的溶出率, 结果如图 2 所示.

由图 2 可知, 酸解时间对钙的溶出率影响不大, 100 min 时钙的溶出率达到最大, 考虑到 100 min 时钙的溶出率与 80 min 时钙的溶出率相比无明显变化, 所以选择酸解时间为 80 min. 随着时间的增加钙的溶出率呈现减少趋势, 这与文献<sup>[10-11]</sup>的实

验结果相一致. 王迪等<sup>[11]</sup>认为钙的溶出速度是不一样的, 刚开始速度快, 随后速度有所减慢. 可溶性钙的溶出速度越快, 测得单位时间内钙的溶出率越高. 与可溶性钙的溶出率相比, 磷的溶出速度受时间影响较大, 导致磷的溶出率变化较大, 80 min 磷的溶出率最大.

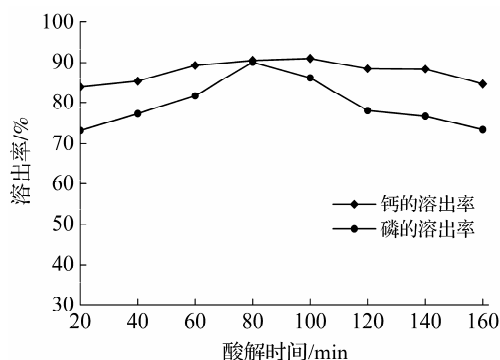


图2 酸解时间对牛骨粉中钙和磷溶出率的影响

### 2.2.4 牛骨粉与盐酸的料液比对钙、磷溶出率的影响

准确称取 2 g 牛骨粉 8 份, 分别放入锥形瓶中, 再分别按 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14、1:16、1:18、1:20、1:25、1:30 的比例加入 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸, 在 50 °C 下水浴酸解 80 min, 酸解液抽滤后测定滤液中可溶性钙的含量. 以钙的溶出率为指标, 确定提取牛骨中钙的适宜料液比, 同时测定酸解液中磷的溶出率, 结果如图 3 所示.

由图 3 可知, 料液比对钙和磷的溶出率影响较大, 在一定范围内, 随着盐酸量的增加, 钙和磷的溶出率也随之增加, 当料液比为 1:12 时, 钙和磷的溶出率都达到了最大值, 所以选择料液比为 1:12. 继续增加盐酸的量, 钙和磷的溶出率都呈递减趋势. 故增加盐酸的量在一定范围内能够促进酸解反应的进行.

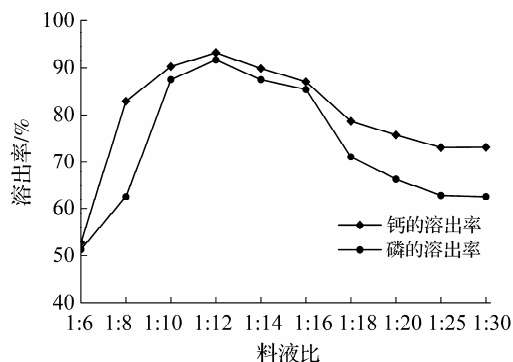


图3 料液比对牛骨粉中钙和磷溶出率的影响

### 2.2.5 温度对钙、磷溶出率的影响

准确称取 2 g 牛骨粉 8 份, 分别放入锥形瓶中, 再分别加入  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸 24 mL, 在 40、45、50、55、60、65、70、75  $^{\circ}\text{C}$  下水浴酸解 80 min, 酸解液抽滤后测定滤液中可溶性钙的含量. 以钙的溶出率为指标, 确定提取牛骨中钙的适宜温度, 同时测定酸解液中磷的溶出率, 结果如图 4 所示.

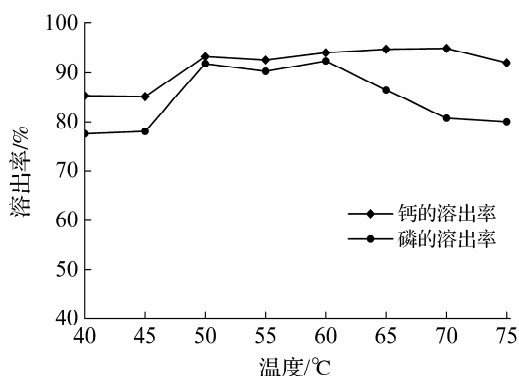


图 4 温度对牛骨粉中钙和磷溶出率的影响

由图 4 可以知道, 温度升高会加速酸解反应的进行<sup>[12]</sup>. 钙的溶出率在 40~50  $^{\circ}\text{C}$  范围内有一定的增加, 温度高于 50  $^{\circ}\text{C}$  时, 钙的溶出率趋于平缓; 70  $^{\circ}\text{C}$  时钙的溶出率达到最大值. 但由于盐酸属于挥发性酸, 随着温度的继续升高, 盐酸一定程度的挥发会导致溶液中盐酸浓度减小, 故钙的溶出率在温度为 75  $^{\circ}\text{C}$  时有所降低. 而温度对磷的溶出率影响较为显著, 磷的溶出率在 40~60  $^{\circ}\text{C}$  范围与钙的溶出率出现相同的趋势, 60  $^{\circ}\text{C}$  时达到最大溶出率, 大于 60  $^{\circ}\text{C}$  时溶出率下降较为明显. 分析原因可能是高温使盐酸一定程度的挥发导致盐酸浓度降低, 影响磷的溶出.

### 2.3 正交实验结果与分析

以钙的溶出率为指标, 正交实验结果见表 4. 由表 4 正交实验结果的极差分析可知, 4 个影响因素中对牛骨中钙的提取率影响的顺序为  $C>A>B>D$ , 即料液比>盐酸浓度>时间>温度, 其中牛骨粉与盐酸的料液比和盐酸浓度是提取牛骨中钙的关键因素. 考虑实际生产过程中因时间延长带来的能量消耗, 以及盐酸的用量, 故选取最优组合为  $A_2B_1C_2D_3$ , 即盐酸浓度为  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 反应时间为 60 min, 料液比为 1:12, 反应温度为 70  $^{\circ}\text{C}$ , 此时牛骨粉中钙的溶出率为 94.27%.

表 4 正交结果与分析

| 水平    | 因素水平   |        |        |        | 溶出率/% |
|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
|       | A      | B      | C      | D      |       |
| 1     | 1      | 1      | 1      | 1      | 88.72 |
| 2     | 1      | 2      | 2      | 2      | 92.07 |
| 3     | 1      | 3      | 3      | 3      | 92.88 |
| 4     | 2      | 1      | 2      | 3      | 94.27 |
| 5     | 2      | 2      | 3      | 1      | 94.56 |
| 6     | 2      | 3      | 1      | 2      | 92.94 |
| 7     | 3      | 1      | 3      | 2      | 93.75 |
| 8     | 3      | 2      | 1      | 3      | 90.10 |
| 9     | 3      | 3      | 2      | 1      | 93.81 |
| $K_1$ | 273.67 | 276.74 | 271.76 | 277.09 |       |
| $K_2$ | 281.77 | 276.73 | 280.15 | 278.76 |       |
| $K_3$ | 277.66 | 279.63 | 281.19 | 277.25 |       |
| $k_1$ | 91.22  | 92.25  | 90.59  | 92.36  |       |
| $k_2$ | 93.92  | 92.24  | 93.38  | 92.92  |       |
| $k_3$ | 92.55  | 93.21  | 93.73  | 92.42  |       |
| R     | 2.70   | 0.97   | 3.14   | 0.56   |       |
| Q     | $A_2$  | $B_1$  | $C_2$  | $D_3$  |       |

### 2.4 牛骨粉酸解条件的验证

在正交实验确定的酸解法提取牛骨粉中可溶性钙的优化工艺条件下进行验证实验, 即准确称取 2 g 牛骨粉放入锥形瓶中, 按料液比 1:12 加入浓度为  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸, 控制水浴温度为 70  $^{\circ}\text{C}$ , 酸解时间为 60 min, 酸解液抽滤后测定滤液中各含量, 测得可溶性钙的溶出率为 94.39%, 与正交实验结果吻合, 所以该酸解法提取牛骨粉中可溶性钙的优化工艺条件具有合理性和适用性.

## 3 结论

(1) 分析了牛骨粉的主要成分, 其中钙含量为 26.21%, 是优良天然钙源.

(2) 比较了利用盐酸、乳酸、乙酸、柠檬酸为酸试剂酸解牛骨粉, 以钙的溶出率为指标, 结果表明盐酸酸解能力最强.

(3) 研究了单因素实验条件下钙和磷的溶出率变化, 研究结果表明: 钙和磷的溶出率在一定范围内呈正相关, 相关系数为 0.9329, 即钙的溶出率越大, 磷的溶出率越大.

(4) 在单因素实验基础上, 采用正交实验优化

牛骨粉中可溶性钙提取的工艺条件,即盐酸浓度为  $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,反应时间为 60 min,料液比为 1:12,反应温度为  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。经验证实验,其中可溶性钙的溶出率为 94.39%。

(5) 人体胃液的主要成分为盐酸,其 pH 值接近 1,所以用盐酸提取牛骨粉中可溶性钙的酸解液具有安全性。牛骨粉经酸解可析出大量的可溶性钙,天然离子型钙更有利于人体的消化吸收,在减少环境污染的同时增加了牛骨的附加值,符合国家提倡建设环保节约型社会的发展模式,具有广阔的发展前景。

#### 参考文献:

- [1] 鲍建民. 钙的生理功能及吸收利用[J]. 元素与健康研究, 2006, 23(4):65-66.
- [2] 李云飞, 祝传宝, 何文, 等. 钙体内研究进展[J]. 中南药学, 2006, 4(1):46-50.
- [3] 贾正根. 重要营养元素——钙[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(1):53-55.
- [4] 汪学荣, 彭顺清, 吴峰钙. 钙代谢及生理功能研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005(2):42-44.
- [5] Percival M. Bone health & osteoporosis[J]. Applied Nutritional Science Reports, 1995, 5(4):1-6.
- [6] 吴立芳, 马美湖. 我国畜禽骨骼综合利用的研究进展[J]. 现代食品科技, 2005(12):21-24.
- [7] 杨巍, 陈文华, 成晓瑜, 等. 牛骨中钙离子化的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22):217-220.
- [8] 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.
- [9] 朱迎春, 黄素珍, 白建, 等. 从骨渣中提取可溶性钙的研究[J]. 肉类研究, 2005(2):23-25.
- [10] 白艳, 刘青酶, 杨性民. 响应面法优化鳗鱼骨可溶性钙提取的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4):613-618.
- [11] 王迪, 罗永康, 崔建云. 响应面法优化武昌鱼鳞脱钙工艺的研究[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3):61-66.
- [12] 石红旗, 林学政, 缪锦来, 等. 溶剂体系酶催化酸解反应合成富含共轭亚油酸油脂的研究[J]. 中国食品学报, 2002, 2(1):1-7.

## Extraction of Soluble Calcium from Bovine Bone by Acidolysis

LIU Zhong-xia, WENG Pei-fang\*

( School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China )

**Abstract:** Based on the single factor experiments, extraction conditions of soluble calcium from the bovine bone are optimized by conducting an orthogonal test, in which the acidolysis and the calcium extraction rate are employed as indicators. In the process, the dissolved rate of phosphorus is also investigated. The results show that the optimum conditions are as follows: the ratio of bovine bones to hydrochloric acid solution is set to be 1:12; the concentration of hydrochloric acid is regulated with  $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; reaction time duration at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  lasts for 60 min. Under these conditions, the dissolved rate of calcium can reach as high as 94.39%.

**Key words:** bovine bone; acidolysis; dissolved rates of calcium; dissolved rates of phosphorus

(责任编辑 史小丽)