

大豆小肽螯合铁的制备工艺及光谱分析研究

林 洋<sup>1</sup>,刘再胜<sup>2</sup>,单春乔<sup>1</sup>,修立颖<sup>1</sup>,刘秋晨<sup>1</sup>,倪天赫<sup>1</sup>,刘 艳<sup>1</sup>,江国托<sup>1</sup>

(1. 大连三仪动物药品有限公司,辽宁 大连 116036; 2. 辽宁省畜产品安全监察所,辽宁 沈阳 110003)

**摘 要:**通过铁源筛选比较得知,氯化亚铁比较适合与大豆小肽进行螯合反应制备大豆小肽螯合铁,利用响应面法优化了大豆小肽螯合铁的制备工艺,优化结果为:小肽与亚铁盐质量比 4:1,反应 pH5.0,反应温度 40℃,得到离子螯合率平均值为 56.81%,经中试车间生产试制得到大豆小肽螯合铁的得率是 78.3%,螯合率为 82.39%,检测大豆小肽螯合铁的主要成分中的蛋白含量为 78.94%,铁的含量为 10.87%。红外和紫外光谱分析检测结果显示:大豆小肽和大豆小肽螯合铁(Fe<sup>2+</sup>)红外吸收峰的强度在不同波长位置上有明显的变化,大豆小肽螯合铁(Fe<sup>2+</sup>)在紫外波长上发生了明显的位移且宽化,表明大豆小肽螯合铁(Fe<sup>2+</sup>)形成了络合物。同时对大豆小肽螯合铁的结构进行了预测。

**关键词:**大豆小肽;螯合反应;小肽螯合铁;有机微量元素;制备工艺

**中图分类号:**TQ914      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.01.0108

Study on the Preparation Process and Spectroscopic Analysis of Soybean Small-peptide Chelate Iron

LIN Yang<sup>1</sup>, LIU Zai-sheng<sup>2</sup>, SHAN Chun-qiao<sup>1</sup>, XIU Li-ying<sup>1</sup>, LIU Qiu-chen<sup>1</sup>, NI Tian-he<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, JIANG Guo-tuo<sup>1</sup>

(1. Dalian Sanyi Animal Pharmaceutical Co., LTD, Dalian 116036, China; 2. Animal Product Safety Monitoring Institute of Liaoning Province, Shenyang 110003, China)

**Abstract:** The results from the comparison of iron source selection were showed that ferrous chloride was more suitable for the preparation of soybean peptide chelate iron. According to the study of the optimal process for soybean ptiptides chelate with different kinds of iron source by using the response surface method. The optimum condition was that mass ratio of small-peptide and ferrous salt was 4:1, reaction pH was 5.0, reaction temperature was 40℃ and ion average chelating rate reached to 56.81%. In the pilot of workshop manufacturing, the soybean small-peptide chelated iron's yield was 78.3%, chelating rate was 82.39%, the soybean protein content of small peptide chelate iron sample was 78.94%, iron content was 10.87%. The analysis test by infrared spectroscopic (IR) and Ultra Violet Spectroscopy (UV), and the comparison for absorption peak between soybean small-peptides and soybean small-peptide chelated iron showed that there was obviously change in absorption in different IR wavelength infrared weak position, and the small soybean peptide chelate iron samples (Fe<sup>2+</sup>) also changed obviously in the UV wavelength displacement, so it was proved that small soybean peptide chelate iron(Fe<sup>2+</sup>) had been in complex compound. And its construction was forecast.

**Keywords:** Soybean small-peptides; Chelate reaction; Small-peptide chelate iron; Organic microelement; Preparation process

我国饲料领域目前仍以添加无机铁制剂为主,尤其添加硫酸亚铁最为常见,其吸收利用率很低,一般不足 10%<sup>[1]</sup>。临床常见的补铁方式是肌肉注射右旋糖酐铁,这种方式耗费大量的劳动力,并且存在动物应激强烈和注射部位组织损伤等缺点<sup>[2]</sup>。虽然无机盐补充剂制备工艺简单,容易获得,价格较低,目前市场占有率较高,但不能满足现代集约化畜禽生产需求,且其长久应用必将受到限制<sup>[3]</sup>。随着新型氨基酸、小肽等营养物质的机制不断完善,已逐步开发出无机盐与有机配位体形成的吸收快、利用率高的有机型微量元素。日本和美国分别从 1985 年和 1970 年就开始将肽金属螯合物作为饲料的微量元素添加剂广泛应用。

本研究以大豆豆粕为蛋白源,通过酶解技术制备大豆小肽,再以无机盐(铁)为金属离子源,制备大豆小肽螯合物(铁),探讨大豆小肽螯合物(铁)的生物活性与功能,以期获得同时具有金属离子和小肽双重功能的新产品,此研究可以解决目前饲料添加剂中微量元素利用率低、稳定性差和污染较高等问题。此外,推广此项技术的应用,可以避免无机矿物质元素的浪费和使用无机微量元素补充剂导致的环境污染与食品安全隐患,目前,活性肽螯合铁被认为是一种较为理想的饲料和食品添加剂,因此开发大豆小肽螯合铁有机微量元素具有现实意义<sup>[4]</sup>。

收稿日期:2016-09-19  
第一作者简介:林洋(1984-),男,硕士,工程师,主要从事食品安全与加工研究。E-mail:linyong1984@yeah.net。  
通讯作者:江国托(1966-),男,教授,博导,主要从事动物药品研发。E-mail: jgt600@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用大豆小肽由大连三仪生物工程研究所实验室制备,四水氯化亚铁和硫酸亚铁购自西陇化工股份有限公司,其它化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器

试验所用仪器主要有:BS210S 电子天平,北京泰克仪器有限公司;DL-6M 大容量低速冷冻离心机,塞特湘仪离心机仪器有限公司;K9840 型自动凯氏定氮仪和消化炉,济南海能仪器有限公司;PHS-3C 精密 pH 计,上海虹益仪器仪表有限公司;THZ-25 大容量恒温振荡器,太仓市华美生化仪器厂;YM-015 小型喷雾干燥机,上海豫明仪器有限公司;JL-1800 紫外可见分光光度计,北京科普通用仪器厂;Tensor-27 红外光谱仪,Bruker 公司;日本 JASCO V-550 型紫外可见漫反射光谱仪,华洋科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 无机铁盐种类的筛选 由于机体对铁的吸收受许多因素影响,而铁需被消化成为可溶性低分子二价铁(亚铁)的复合物才可加速吸收,所以在选择无机铁盐种类时以亚铁盐作为铁源。因肽金属螯合物几乎不溶解于乙醇,在大豆小肽与无机铁的螯合过程中选择可溶于有机溶剂的亚铁盐,利用有机溶剂洗脱游离的铁离子和小肽纯化小肽铁螯合物。25℃条件下比较了硫酸亚铁和氯化亚铁在不同浓度的乙醇中溶解情况<sup>[5-7]</sup>。

1.3.2 大豆小肽螯合铁的制备工艺 大豆小肽——溶解(封闭)——使用抗氧化剂——控制 pH——加入 FeCl<sub>2</sub> 恒温反应——喷雾干燥——乙醇洗涤——抽滤——干燥得成品

1.3.3 大豆小肽螯合铁的分离纯化 在分离纯化过程中利用二硫脲试剂和茚三酮试剂定性检测游离金属离子、氨基酸和肽铁螯合物。首先称取一定质量的螯合物样品,加入适量的无水乙醇,洗涤,静置,弃上清液,如此反复直到溶液无色为止,再循环洗涤 2~3 次,取上清液,加入二硫脲试剂,直至上清液不显红色再进行下一步,过滤溶液,将滤渣烘干。其次,取微量的螯合物样品溶解于水,加入 4~7 滴茚三酮试剂,在电炉上加热煮沸,若颜色变为蓝紫色,则再用无水乙醇洗涤,弃去上清液,若颜色不变,则进行下一步。最后,在 65℃条件下将过滤的螯合物样品烘干,得到高纯度的小肽螯合铁,分别用干燥皿装好,备用<sup>[8-10]</sup>。

1.3.4 大豆小肽螯合铁的检测指标

①蛋白含量的测定:按 GB5009.5-2010 中凯氏定氮法进行测定。

②Fe<sup>2+</sup> 含量的测定:采用硫酸亚铁铵 [Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O] 配制 10 μg·mL<sup>-1</sup> 铁离子标准溶液,吸取铁离子标准溶液 0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mL,分别加入 2.0 mL 抗坏血酸溶液(10%),3.0 mL 邻菲罗啉溶液,蒸馏水定容至 50 mL。放置 37℃反应 1 h,空白对照为不加铁离子的试剂溶液,检测吸光度 A<sub>510 nm</sub> 的吸光光度值,以铁的浓度 C(μg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,吸光度 A<sub>510 nm</sub> 为纵坐标,绘制标准曲线。

称取小肽螯合铁 0.05 g,HCl 辅助溶解,配制成 0.1% 小肽螯合铁溶液。准确吸取 1 mL 样品溶液于 50 mL 容量瓶中,按照标准曲线步骤测定其吸光度。

铁离子含量测定(mg·kg<sup>-1</sup>) =  $\frac{C}{m \times V_1/V_0}$   
式中:C 为标准曲线上查得样品试液相应的铁含量,μg;m 为样品的质量,g;V<sub>1</sub> 为测定时所取样品试液的体积,mL;V<sub>0</sub> 为样品处理后的定容体积,mL。

③铁螯合率的测定  
计算公式:螯合率(%) = M<sub>1</sub>/M<sub>0</sub> × 100  
式中:M<sub>1</sub> 为螯合物中铁含量(mg);M<sub>0</sub> 为加入反应物的铁含量(mg)。

④小肽铁得率的测定  
计算公式:小肽铁得率(%) = M<sub>1</sub>/M<sub>0</sub> × 100  
式中:M<sub>1</sub> 为生成螯合物的总量(g);M<sub>0</sub> 为加入反应物的总量(g)。

1.3.5 单因素分析

①螯合质量比的确定:准确称取大豆小肽 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 g,分别装于 5 个锥形瓶中,用蒸馏水配制小肽溶液浓度为 3.0%,加入 1.0% 的抗坏血酸,然后分别加入氯化亚铁 1.0 g,使大豆小肽与氯化亚铁的质量比分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1,用质量分数 20% 的 HCl 溶液调 pH 为 5,充入氮气,在 40℃下混合反应 30 min,待其冷却,在 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清液,经喷雾干燥得粉末,用无水乙醇反复洗涤、抽滤 2~3 次,最后干燥得小肽螯合铁样品,测定 Fe<sup>2+</sup> 含量,计算螯合率,试验重复 3 次,取平均值。

②螯合温度的确定:准确称取 4.0 g 大豆小肽,分别装于 5 个锥形瓶中,用蒸馏水配制小肽溶液浓度为 4.0%,加入 1.0% 的抗坏血酸,再分别加入氯化亚铁 1.0 g,用 20% 的 HCl 溶液调 pH 为 5,充入氮气,分别在 20,30,40,50,60℃下混合反应 30 min,待其冷却,在 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清液,

经喷雾干燥得粉末,用无水乙醇反复洗涤、抽滤 2 ~ 3 次,最后干燥得小肽螯合铁样品,测定  $\text{Fe}^{2+}$  含量,计算螯合率,试验重复 3 次,取平均值。

③螯合 pH 的确定:准确称取 4.0 g 大豆小肽,分别装于 5 个锥形瓶中,用蒸馏水配制小肽溶液浓度为 4.0%,加入 1.0% 的抗坏血酸,再分别加入氯化亚铁 1.0 g,用质量分数 20% 的 HCl 溶液分别将 pH 调至 3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,充入氮气,在 50℃ 下混合反应 30 min,待其冷却,在  $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min,取上清液,经喷雾干燥得粉末,用无水乙醇反复洗涤、抽滤 2 ~ 3 次,最后干燥得小肽螯合铁样品,测定  $\text{Fe}^{2+}$  含量,计算螯合率,试验重复 3 次,取平均值。

④螯合时间的确定:准确称取 4.0 g 大豆小肽,分别装于 5 个锥形瓶中,用蒸馏水配制小肽溶液浓度为 4.0%,加入 1.0% 的抗坏血酸,再分别加入氯化亚铁 1.0 g,用 20% 的 HCl 溶液调 pH 为 4.5,充入氮气,于 50℃ 下混合反应 10,20,30,40,50 min,待其冷却,在  $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min,取上清液,经喷雾干燥得粉末,用无水乙醇反复洗涤、抽滤 2 ~ 3 次,最后干燥得小肽螯合铁样品,测定  $\text{Fe}^{2+}$  含量,计算螯合率,试验重复 3 次,取平均值。

1.3.6 响应面法分析 利用响应面分析法(response surface method,RSM)以回归方程作为函数估算的工具,进行三因素三水平响应曲面设计,确定影响试验指标的各因素及其交互作用,准确表述因素和响应值之间的关系,确定最佳工艺条件。

1.3.7 大豆小肽螯合铁的成分检测 依照 GB/T

6437-2002 中的分光光度法进行磷含量测定;钙含量依照 GB/T 6436-2002 中的乙二醇四乙酸二钠络合滴定法测定;脂肪含量依照 GB/T 6433-2006 粗脂肪含量测定;水分检测按 GB5009.3-2010 中直接干燥法进行。

1.3.8 大豆小肽螯合铁结构特征分析

①红外测试:FT-IR 光谱表征使用 Tensor-27 红外光谱仪(Bruker 公司)检测。将样品与溴化钾按质量分数 1:30 混合,经充分研磨压片,以纯溴化钾片的谱图做参比,室温扫描并记录样品谱图,扫描范围为  $400\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ ,检测精度为  $4\text{ cm}^{-1}$ ,扫描次数 32 次<sup>[11-13]</sup>。

②紫外-可见光谱分析:日本分光 JASCO V-550 型紫外可见漫反射光谱仪检测分析含铁材料中铁的配位状态,完成扫描并记录,扫描范围 190 ~ 800 nm。

根据红外和紫外光谱的结果分析,预测大豆小肽螯合铁中铁的结合位点,初步判定其结构。

2 结果与分析

2.1 无机铁源的确定

常温条件下,氯化亚铁和硫酸亚铁在不同浓度乙醇溶液中的溶解情况(表 1)表明:在 30% ~ 50% 的乙醇中有部分硫酸亚铁溶解,在 60% 以上乙醇中硫酸亚铁完全不溶解。然而氯化亚铁能够完全溶于不同浓度的乙醇,小肽螯合铁却几乎不溶于乙醇,则可采用乙醇处理螯合物,洗脱未螯合的氯化亚铁,进而提高产品纯度。

表 1 两种亚铁盐在乙醇溶液中的溶解情况

Table 1 Dissolution of two ferrous salt in the ethanol solution

乙醇体积百分比 Ethanol volume percent/%	30	40	50	60	70	80	90	100
FeSO <sub>4</sub>	+	+	+	-	-	-	-	-
FeCl <sub>2</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++

- :完全不溶解;+ :部分溶解;++ :完全溶解。  
- :completely insoluble;+ :partial dissolution;++ :complete dissolution.

2.2 大豆小肽螯合铁制备的工艺

分别以小肽铁螯合率和铁含量为检测指标,测定大豆小肽和亚铁盐的质量比、反应温度、反应时间和 pH 对螯合反应效果的影响。

2.2.1 大豆小肽和亚铁盐的质量比 大豆小肽与亚铁盐的质量比是螯合反应中的一个重要影响因素,从图 1 可看出,随着质量比的增大,小肽铁螯合率和铁的含量均先增加后降低。质量比太小,螯合物不稳定,质量比过大,小肽原料浪费,会增加成

本。本试验初步确定大豆小肽与亚铁盐的质量比为 4:1 时螯合率最高,可达 41.83%。

2.2.2 反应温度和时间 从图 2 可以看出,反应温度对小肽铁螯合率和铁含量影响均先升高后降低,当反应温度在 50℃ 条件时效果最佳,螯合率可达 46.70%。由图 3 可知,随着反应时间的延长,小肽铁螯合率和铁含量先增加后降低,结果表明小肽与铁盐的螯合反应是一个快速反应,因此,初步确定反应时间为 40 min,螯合率可达到 50.14%。

2.2.3 pH 对螯合反应的影响 由图 4 可知,随着 pH 的升高,小肽铁螯合率和铁含量先增加后降低,当 pH 为 4.5 时,二者均达到最大值。因此,可初步确定螯合反应的较适 pH 为 4.5,螯合率可达到 48.81%。

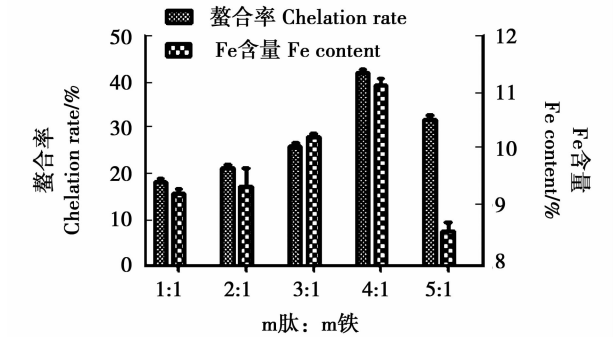


图 1 大豆小肽螯合铁反应质量比的筛选  
Fig.1 Selection of the mass-ratio in soybean peptide chelate iron reaction

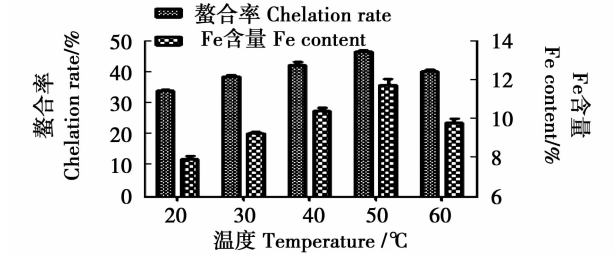


图 2 大豆小肽螯合铁反应温度的筛选  
Fig.2 Selection of the temperature in soybean peptide chelate iron reaction

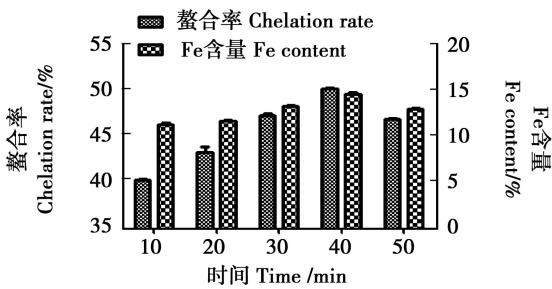


图 3 大豆小肽螯合铁反应时间的筛选  
Fig.3 Selection of the time in soybean peptide chelate iron reaction

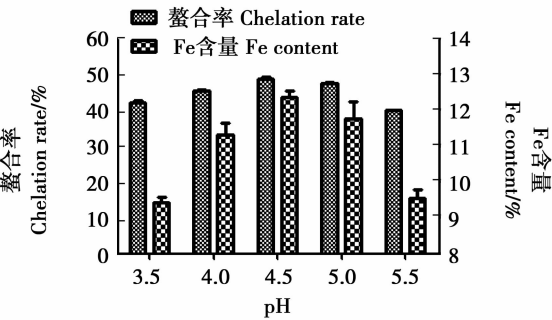


图 4 大豆小肽螯合铁反应 pH 的筛选  
Fig.4 Selection of the pH in soybean peptide chelate iron reaction

2.3 大豆小肽螯合铁的制备条件的优化结果

以离子螯合率为响应指标,利用 Design-Expert 软件进行 Box-Behnken 设计<sup>[14-15]</sup>,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,结合反应条件中各单因素试验结果,选取质量比、反应 pH 和反应温度为响应面分析的试验因素,分别以 A、B、C 表示,试验因素和水平设计见表 2。

表 2 响应面分析因素及水平  
Table 2 Variables and levels in response surface design

影响因素 Influencing factor	因素 Factor	水平 Level		
		-1.0	0	+1.0
螯合温度 Chelating temperature/℃	A	40	50	60
pH	B	4.0	4.5	5.0
质量比 Mass-ratio	C	3:1	4:1	5:1

试验具体设计组合、试验值和软件预测值见表 3,得到螯合率 Y 对编码自变量螯合温度(A)、pH(B)、质量比(C)的二次多项回归方程:  
$$Y = 53.26 - 2.87A + 0.25B + 2.99C - 4.50AB - 1.58AC - 2.42BC - 2.93A^2 - 2.61B^2 - 10.98C^2$$
  
回归分析结果显示决定系数  $R^2 = 0.9136$  (表 4),表明拟合程度良好,误差较小。回归模型  $P = 0.0055 < 0.01$ ,表明不同条件下螯合率的差异有显著性。信噪比(adeq precision)为有效信号与噪音的

比值,大于 4.0 视为合理,此模型为 8.155,具有较好的预测作用。失拟项  $P = 0.1656 > 0.1000$ ,说明此方程可较好地描述不同条件和螯合率的关系。  
当各项  $P < 0.05$  时,说明其对模型作用是显著的。由表 4 中 P 值大小可知,在所选各因素水平范围内,各因素对结果影响的大小为:质量比 > 螯合温度 > pH。一次项 A 和 C 显著,  $C^2$  极显著,交叉项 AB 显著。

表 3 响应面分析设计及结果

Table 3 Design program and experimental results of RSM

试验编号 Test number	螯合温度 Chelating temperature/℃	pH	质量比 Mass-ratio	螯合率 Chelation rate /%
1	0	0	0	49.12
2	-1	1	0	56.03
3	-1	0	1	47.68
4	0	1	1	38.89
5	0	0	0	55.33
6	1	0	-1	34.17
7	1	-1	0	48.41
8	0	0	0	53.89
9	0	-1	1	42.01
10	0	1	-1	42.17
11	0	0	0	52.81
12	-1	-1	0	47.77
13	0	-1	-1	35.60
14	1	1	0	38.67
15	-1	0	-1	34.14
16	1	0	1	41.41
17	0	0	0	55.17

表 4 回归模型方差分析

Table 4 ANOVA of RSM

方差来源 Soruces of variation	偏差平方和 Devsq	自由度 DF	均方差 MS	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	959.12	9	95.65	8.23	0.0055**
A	65.90	1	65.90	5.67	0.0488*
B	0.49	1	0.49	0.04	0.8440
C	71.46	1	71.46	6.15	0.0423*
AB	81.00	1	81.00	6.97	0.0334*
AC	9.92	1	9.92	0.85	0.3863
BC	23.47	1	23.47	2.02	0.1983
A <sup>2</sup>	36.17	1	36.17	3.11	0.1211
B <sup>2</sup>	28.75	1	28.75	2.47	0.1598
C <sup>2</sup>	507.92	1	507.92	43.70	0.0003**
残差 Residual	81.38	7	11.63		
失拟项 Lack of fit	55.71	3	18.57	2.89	0.1656
纯误差 Pure error	25.67	4	6.42		
总和 Sum	942.09	16			

决定系数 Coefficient of determination     R<sup>2</sup> =0.9136

Adeq precision =8.155

CV(%) =7.5

\*\*\* 为极显著( $P<0.0001$ ); \*\* 为较显著( $P<0.01$ ); \* 为显著( $P<0.05$ )。

\*\*\* means extremely significant ( $P<0.0001$ ); \*\* means more significant ( $P<0.01$ ); \* means significant ( $P<0.05$ ).

通过得到的回归方程作三维响应曲面图,考察拟合情况,分析质量比、pH 和温度对螯合率的影响(图 5 ~ 图 7)。等高线形状反映出交互效应的强弱,等高线越趋向椭圆表示交互作用越强,越趋向

圆表示交互作用越不明显。两个因素的相互作用对螯合率影响结果分析,由图 5 可知螯合温度和 pH 的交互作用显著( $P = 0.033\ 4 < 0.05$ ),其它因素的交互作用相对较小,这与方差分析结果一致。

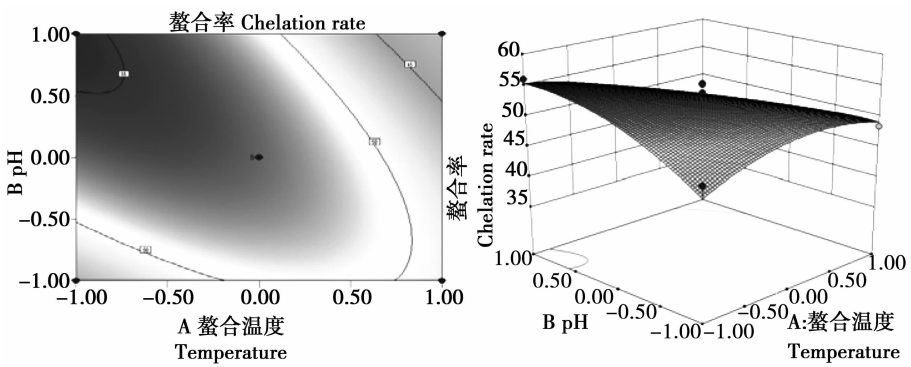


图 5 反应 pH (B) 与温度 (A) 间关系的等高线和响应曲面  
Fig. 5 Contour plot and response surface plot of the effects of B and A

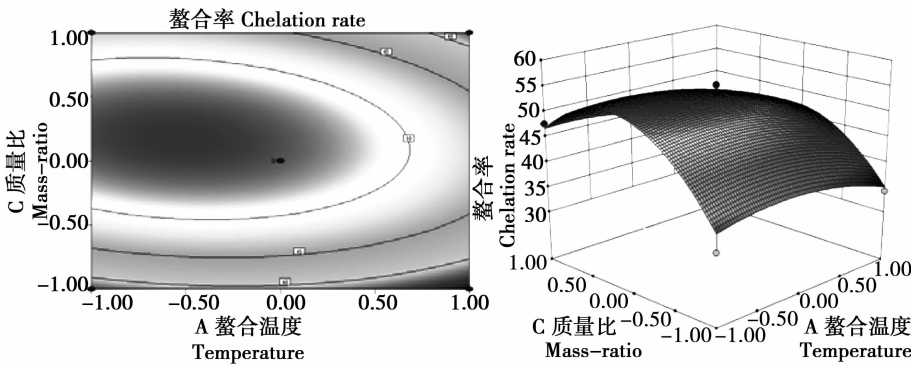


图 6 质量比 (C) 与温度 (A) 间关系的等高线和响应曲面  
Fig. 6 Contour plot and response surface plot of the effects of C and A

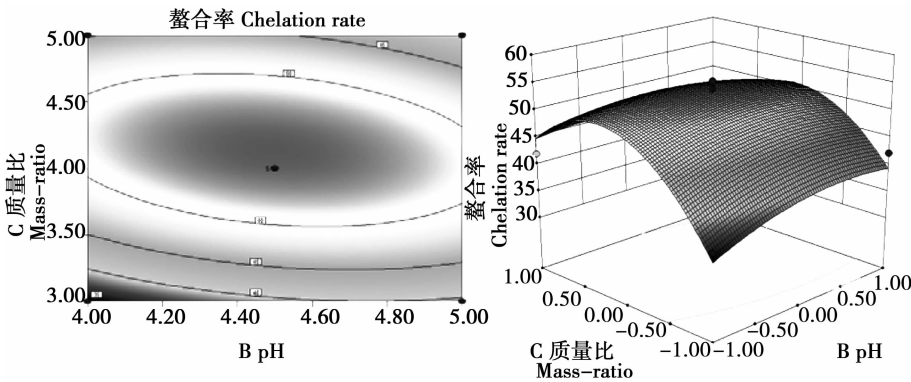


图 7 质量比 (C) 与 pH (B) 间关系的等高线和响应曲面  
Fig. 7 Contour plot and response surface plot of the effects of C and B

根据所建立的数学模型进行参数最优化分析,得到最优水解条件为:反应温度 40℃、反应 pH 4.95、质量比 4.11:1,在此工艺条件下,离子螯合率可达 55.49%。在验证试验中,考虑到实际操作方

便,取初始条件:反应温度 40℃、反应 pH 5.0、质量比 4:1,同时完成 3 组平行试验,离子螯合率均值为 56.81%,与预测值相比,相对误差小于 5 %,可行性符合要求。

2.4 大豆小肽螯合铁的成分检测

根据上述试验确定的最佳制备条件,经中试车间生产试制的大豆小肽螯合铁的得率是78.3%,螯合率为82.39%,并进行了成分分析,结果如下表5。

表5 大豆小肽螯合铁的成分分析

成分 Composition	质量分数 Mass fraction/%
蛋白含量 Protein content	78.94
铁(Fe <sup>2+</sup> )含量 Ferrite content	10.87
钙含量 Calcium content	0.16
磷含量 Phosphorus content	0.39
脂肪含量 Fat content	0.84
水分 Moisture	6.14
其它 Others	2.66

从表5中可以看出,大豆小肽螯合铁的主要成分是小肽和铁,其中蛋白含量为78.94%,铁的含量为10.87%。其它的成分中会有一部分钠盐,是强酸调节pH过程中生成的。

2.5 大豆小肽螯合铁红外光谱分析

由图8所示,红外结果可以看出,大豆小肽在3385 cm<sup>-1</sup>附近出现宽吸收峰,表明有-COOH存在,3058和2968归属为氨基的振动,络合Fe<sup>2+</sup>之后,略有降低,结合1662 cm<sup>-1</sup>和1546 cm<sup>-1</sup>两处的峰型变化,羰基和N-H弯曲振动,有可能存在部分络合现象。

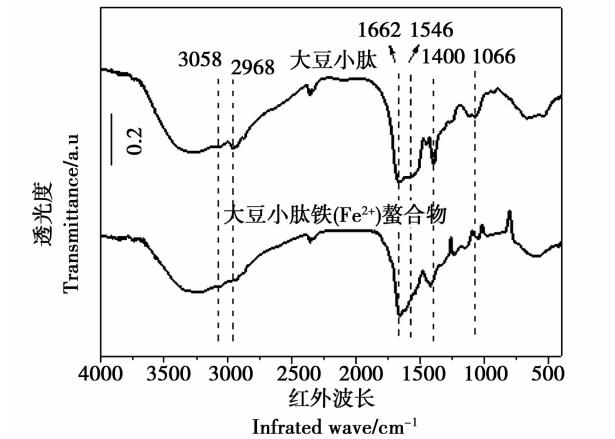


图8 大豆小肽螯合铁红外光谱分析  
Fig.8 IR analysis in soybean peptide chelate iron reaction

2.6 大豆小肽螯合铁紫外光谱分析

从图9可以看出,大豆小肽没有明显的位移,说明该样品没有成功络合铁。大豆小肽螯合铁样品发生了明显的位移且宽化,由于分子中含有芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸等)的肽,276和340 nm处表现出特征吸收峰消失,证明该样品与铁形成络合物。

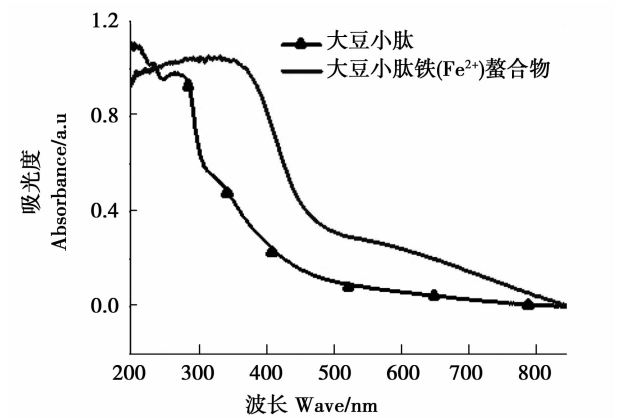


图9 大豆小肽螯合铁紫外光谱分析  
Fig.9 UV analysis in soybean peptide chelate iron reaction

2.7 大豆小肽螯合铁结构预测

通过红外和紫外光谱的分析,在1662 cm<sup>-1</sup>处羰基和N-H弯曲振动,此处最有可能形成大豆小肽与铁的络合物,下面对大豆小肽螯合铁的结构预测如图10所示。

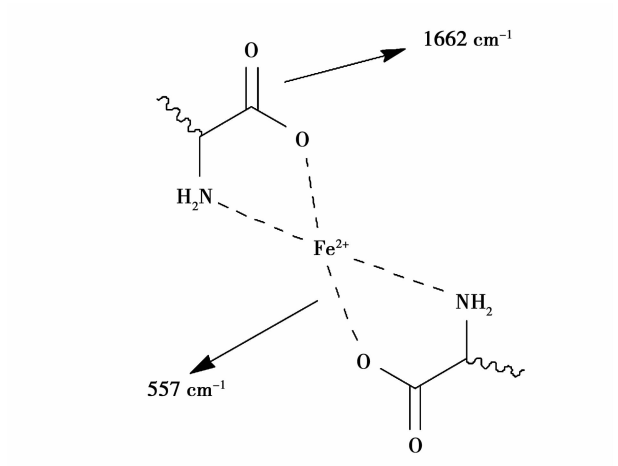


图10 大豆小肽螯合铁结构预测  
Fig.10 Prediction of construction in soybean small peptide chelate iron

3 讨论

本文通过铁源筛选比较得知,氯化亚铁比较适合与大豆小肽进行螯合反应进行大豆小肽螯合铁制备,在小肽螯合铁的纯化过程中可以利用乙醇来洗脱未螯合的氯化亚铁,进而提升产品纯度。

利用响应面法优化了大豆小肽螯合铁的制备工艺,优化结果为小肽与亚铁盐质量比 4:1,反应 pH 5.0,反应温度 40℃,得到离子螯合率平均值约为 56.81%,由于投料量小在喷雾干燥机上又会出现原料的损失,使干燥后的样品得率和螯合率计算过程中数值均有下降,但经中试车间生产试制得到大豆小肽螯合铁的得率是 78.3%,螯合率为 82.39%,并检测大豆小肽螯合铁的主要成分中的蛋白含量为 78.94%,铁的含量为 10.87%,包括微量的钙、磷等微量元素,另有其它的成分中会产生一部分钠盐,是由于螯合反应中使用强酸调节 pH 过程生成的。

为了进一步确定大豆小肽螯合铁是否螯合成功,进行了红外和紫外光谱分析检测,结果表明大豆小肽螯合铁( $\text{Fe}^{2+}$ )形成了络合物,并对其结构进行预测,可为小肽与金属离子螯合物的深入研究提供参考。

参考文献

[1] Parkes J G, Randell E W, Olivieri N F, et al. Modulation by iron loading and chelation of the uptake of non-transferrin-bound iron by human liver cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1995, 1243(3):373-380.

[2] 周建群,蒋荣成,覃国喜,等.新一代补铁剂-妈蜜铁完全替代仔猪肌注补铁制剂的对比试验[J]. *养猪*,2009, 33(5):14-16. (Zhou J Q, Jiang R C, Qin G X, et al. New generation of iron agent-Mama honey entirely replace piglet intramuscular injection iron preparation of contrast test[J]. *Swine Production*,2009, 33(5):14-16. )

[3] Wu H H, Liu Z Y, Zhao Y H, et al. Enzymatic preparation and characterization of iron chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein [J]. *Food Research International*, 2012,48:435-441.

[4] Alexandra K, Konstantina A, Michael K, et al. Sensory characteristics and iron dialyzability of gluten-free bread fortified with iron[J]. *Food Chemistry*, 2007,102(1):309-316.

[5] 汪学荣,郑炯,阚建全.猪血多肽螯合盐的制备工艺[J]. *食品与发酵工业*,2010(6):89-93. (Wang X R, Zheng J, Kan J Q. The preparation methods of pig blood peptide chelate salt [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010(6):89-93. )

[6] 郑炯,汪学荣,阚建全.猪血多肽螯合铁的制备工艺研究[J]. *食品工业科技*,2010,32(2):261-265. (Zheng J, Wang X R, Kan J Q. Study on preparation of porcine blood polypeptide-iron [J]. *Science and Technology of Food Industry*,2010,32(2):261-265. )

[7] 陈升军.米蛋白肽及米蛋白肽铁螯合物生产工艺研究[D].南昌:南昌大学,2008. (Chen S J. Research on production technology of Rice protein peptide and rice protein peptide iron rock compound[D]. Nanchang:Nanchang University,2008. )

[8] 吴茹怡,曾里,曾凡骏.复合氨基酸螯合物鉴定方法的研究[J]. *食品科学*,2006(3):104-107. (Wu R Y, Zeng L, Zeng F J. Study on identification of compound amino acid chelates[J]. *Food Science and Technology*, 2006(3):104-107. )

[9] 贾玉珠,石邱毅,赵瑛.二硫腈试剂对二硫腈比色法测铅的干扰分析[J]. *内蒙古预防医学*,1997,24(1):23. (Jia Y Z, Shi Q Y, Zhao Y. Disulfide hydrazone reagent of disulfide hydrazone colorimetric method measuring interference analysis of lead [J]. *Neimenggu Preventive Medicine*, 1997,24(1):23. )

[10] 周建群,罗玉芳,谢梅东.蛋氨酸螯合锌测定方法的研究[J]. *新饲料*,2007(10):38-39. (Zhou J Q, Luo Y F, Xie M D. Study of determination method of zinc methionine chelate[J]. *Feed Research*,2007(10):38-39. )

[11] 李公斌,王振宇.黑木耳多糖与 Fe(Ⅱ)螯合物的制备工艺及红外光谱研究[J]. *食品工业科技*,2006(5):136-137. (Li G B, Wang Z Y. Preparing technology of Chelate of Auricularia polysaccharides with Fe(Ⅱ)and study on their IR Spectrum[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006(5):136-137. )

[12] 李群,刘飞飞,于岚.L-赖氨酸锌螯合物的研究[J]. *应用化工*, 2010,39(3):441-446. ( Li Q,Liu F F, Yu L. Progress in study of zinc L-lysinate chelate[J]. *Applied Chemical Industry*, 2010, 39(3):441-446. )

[13] 黄汉良,凌灵.蛋氨酸锌合成研究[J]. *化工技术与开发*,2007, 36(10):15-17. ( Huang H L, Ling L. Synthesis of zinc methionine complex[J] *Technology & Development of Chemical Industry*, 2007, 36(10):15-17. )

[14] 吴有炜.试验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社,2002:135-142. ( Wu Y W. Experimental design and data processing[M]. Suzhou: Suzhou University Press,2002:135-142. )

[15] 崔凤杰,许涨瑜,舒畅,等.响应曲面法优化灰树花水溶性多糖提取工艺的研究[J]. *食品科学*,2006,27(4):142-151. ( Cui F J, Xu Z Y, Shu C, et al. Optmization of processing parameters for extraction of soluble grifola frondosa polysaccharides by response surface methodology[J]. *Food Science*,2006,27(4):142-151. )