

패각 칼슘 입자 크기에 따른 흡수율

한정희¹ · 최현선¹ · 나경수² · 정승식³ · 서형주^{1,4*}

¹고려대학교 식품영양학과, ²대구공업대학 식품영양학과
³(주)케이씨피드, ⁴고려대학교 대학원 보건과학과

Intestinal Permeability of Oyster Shell Calcium with Different Particle Sizes

JeungHi Han¹, Hyeon-Son Choi¹, Kyung Soo Ra², Seungsik Chung³, and Hyung Joo Suh^{1,4*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 130-701, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721, Korea

³KC Feed Co. Ltd., Cyongbuk 770-805, Korea

⁴Dept. of Public Health Science, Graduate School, Korea University, Seoul 136-703, Korea

ABSTRACT In this study, we examined the ionization rate and permeability of nanocalcium prepared from oyster shells with various particle sizes. Four particle sizes of the calcium samples were prepared by centrifugation according to their density disparity in alcoholic solution: NC (normal calcium), C-1 (supernatant of 1,000 rpm), C-2 (supernatant of 2,000 rpm), and C-3 (supernatant of 3,000 rpm). Particle sizes of NC, C-1, C-2, and C-3 were 2,280.3±64.3 nm, 521.3±83.3 nm, 313.9±29.5 nm, and 280.0±3.4 nm, respectively. C-3 showed a slight increase in ionization rate compared with the other calcium samples, but their differences were not significant. Dialysis membrane-employed analysis showed that nanocalcium permeability increased as its particle size smaller; 32% of C-3 nanocalcium was transported to the outside of the membrane, whereas C-1 showed a 25% transport rate. We determined the permeability of the nanocalciums by using rat intestinal sacs, in order to provide different intestinal environments depending on pH level. Nanocalcium generally showed a higher permeability at pH 7, which represents an ileum environments compared to the duodenum and jejunum environments at pH 4.2 and pH 6.2, respectively. However, C-3 calcium showed the highest permeability, followed by C-2, C-1 and NS calciums. This result shows that the size of calcium positively affected its permeability in the intestinal sac. Taken together, nano-sized calcium derived from discarded oyster shell shows improved permeability in intestinal environments.

Key words: egg shell calcium, particle size, intestinal sac, permeability

서 론

칼슘은 인체를 구성하는 원소로서 산소, 탄소, 수소, 질소 등으로 만들어진 유기화합물에 이어 5번째로 많이 함유되어 있으며, 특히 인체 내의 무기질 중에서 가장 많은 양으로 존재한다. 보통 성인기준으로 체중의 1.5~2% 정도가 칼슘으로 되어 있다(1). 이 같은 칼슘의 대부분(99%)은 뼈와 치아에서 인산 칼슘염의 형태로 존재하며 나머지는 혈액과 세포 속에 퍼져 있으면서 인체 생리적 기능과 역할을 담당하고 있다. 뼈와 혈액이나 세포 속에 들어있는 칼슘의 함량 비율은 칼슘의 항상성을 유지하기 위해 일정한 비율로 존재한다. 이러한 칼슘의 함량 비율의 균형이 깨지게 되면 건강을 유지하기 어렵기 때문에 칼슘은 신체 내에서의 일정한 비율로 존재해야 한다(2).

산업사회의 발달과 함께 식생활이 변하고 운동부족이 겹치면서 현대인에게는 칼슘의 요구량이 점점 증가하고 있는데 반해 충분한 칼슘섭취에 대한 부족 증상이 많이 나타나고 있다. 또한 칼슘의 섭취량이 충분하다고 해도 칼슘의 형태에 따라 체내에서의 이용률이 다르고 칼슘의 실제 흡수율이 낮아 그 효용성에 문제를 가지고 있다. 이러한 문제를 해결하고자 소뼈 분말(bone meal), 난각 분말(egg shell), 굴피 분말(oyster shell) 등을 비롯한 유기물과 결합된 형태의 칼슘을 원료로 다양한 칼슘 강화식품, 칼슘 보충제 및 체내 칼슘 이용성 증진 물질들이 개발되고 있으며, 이들 칼슘 공급원에 대한 유효성과 영양 효과가 동물 실험을 통하여 다양하게 비교 검토되고 있다(3-6).

환경부 발표에 따르면 굴 양식 산업에 있어서 현재 남해안에서 수확식으로 양식한 패각의 일부는 종패로 재사용이 되고 나머지는 폐기되는데 그 양이 1년에 30만 톤에 이른다고 보고하고 있다(7). 사용된 후 폐기되는 굴 패각에 대해서는 일반폐기물로서 양식 어민이 처리할 수 있어야 하지만 패각을 매립할 수 있는 매립지 확보가 여의치 않으며 굴 패각을

Received 21 November 2013; Accepted 11 December 2013

*Corresponding author.

E-mail: suh1960@korea.ac.kr, Phone: +82-2-940-2853

수거하고 운반하는데 소요되는 비용의 증대 등 효과적인 처리가 어려운 실정이다. 또한 처리되지 않은 굴 패각 유기물의 부식으로 위생상의 문제를 일으킬 수 있어 이에 대한 효과적인 처리가 시급한 현실이라 하겠다. 따라서 이렇게 폐기되는 굴 패각의 천연 칼슘소재를 효율적으로 적절히 활용하는 방안을 강구한다면 굴 패각이 안고 있는 지역적, 환경적 문제를 해결하면서 양질의 천연칼슘의 공급원 확보뿐만 아니라 식품산업분야의 활성화를 이끌 수 있을 것으로 생각된다(7).

칼슘이 생체 내에서 효율적으로 이용되기 위해서는 음식물이나 제재로 섭취한 칼슘이 체내의 장관들을 거치면서 순조롭게 투과되어 흡수되어야 한다. 이를 위해서는 칼슘이 위장에서 쉽게 붕괴되고 용해되어 칼슘이온으로 전리되어야 하므로 붕괴속도가 빠르고 용해도가 높은 상태의 칼슘 제조와 보급이 필요하다(8). 이를 위해서는 칼슘의 입자 크기, 이온화되는 정도가 크게 좌우할 것이다. 따라서 본 연구에서는 섭취하는 칼슘의 체내 이용률의 증대와 패각 칼슘의 재활용을 목적으로 천연소재인 패각 칼슘을 원료로 하여 입자 크기별로 나노칼슘을 제조한 후 장의 투과율과 이온화율을 평가하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 패각 칼슘은 IONIC CAL-2200(Kaiho Products Co., Ltd., Tokyo, Japan) 제품을 이용하였다.

칼슘 분획법

패각 칼슘을 100% 에탄올(Duksan, Ansan, Korea)에 5% 농도로 용해 후 초음파분산기(VCX750, Sonic & Materials Inc., Newtown, CT, USA)로 균질화 시켜 주었다. 또한 원심분리기(J2-MC, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)를 이용하여 1,000, 2,000, 3,000 rpm에서의 상등액을 분획하였다. 이를 채취하여 증발기(Vacuum rotary evaporator N-Nseries, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 에탄올을 기화시킨 후 칼슘을 획득하였다.

칼슘 입자 크기 분포 분석

입자크기분석기(Delsa Nano C, Beckman Coulter, Inc.)를 이용하여 칼슘 나노 및 마이크로분말의 크기를 분석하였다(9). 시료 제조를 위하여 칼슘분말의 농도가 각각 0.5 및 1 mg/mL가 되도록 첨가하였고 분산매로는 증류수를 사용하였다. 첨가된 칼슘분말은 교반 후 초음파분산기(VCX 750, Sonic & Materials Inc.)로 3분간 분산시킨 후 사용하였다. 각 시료별 3회 반복 측정하였다.

칼슘 이온화율 측정

0.1 N-HCl에 240 ppm 농도의 칼슘용액을 calcium

probe를 연결한 ion meter(Dual star pH/ISE betchtop, Thermo Fisher Scientific Inc., Beverly, MA, USA)를 사용하여 칼슘이온의 농도를 측정하였다(10).

칼슘 막 투과율 측정

실험에 사용된 시료는 10 mg의 칼슘시료를 80 mL의 0.1 N HCl(pH 2.0)에 넣고 15분 정도 교반 후 0.1 M NaOH를 넣어 150 mL로 mass up하여 사용하였다. 준비된 칼슘용액 20 mL를 dialysis tubing cellulose membrane(12000 MW cut off, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 넣고 집개(Spectra closures, Spectrum Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)를 이용하여 봉해준 후 100 mL의 3차 증류수가 담긴 듀란병에 넣어 2시간 동안 shaking incubator에서 incubation 시킨 후 ICP(OPTIMA 2X00, Spectrum Inc.)로 dialysis tube 안과 밖의 칼슘 함량을 분석하였다.

Intestinal sac을 이용한 장 흡수율

실험에 사용된 시료는 10 g의 칼슘시료를 100 mL의 0.1 N HCl(pH 2.0)에 넣고 15분 정도 교반 후 37°C shaking water bath(CTR-420, Iwaki Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용해 incubation한 후 사용하였다.

칼슘의 장 흡수율은 Mahomoodally의 방법(11)을 이용하였다. 8주령의 수컷 Sprague Dawley rat(Dehan Biolink Co., Ltd., Eumseong-gun, Korea)를 사용하여 24시간 공복시킨 후 에테르로 마취하여 희생하고 소장을 재빨리 취해서 세척한 후 공장 시작 부분의 10 cm를 취하였다. 위산과정을 처리한 칼슘 1 mL를 넣은 후 다른 한 쪽을 묶어 장 주머니를 만들었다. 장 주머니를 장내 환경으로 만들기 위해 buffer(20 mL)를 넣어 pH를 맞추어 주었다[pH 4.2(십이지장) citrate buffer, pH 6.2(공장) phosphate buffer, pH 7.5(회장) phosphate buffer](12,13). 실험하는 동안 shaking water bath(CTR-420, Iwaki Co., Ltd.)를 이용해 37°C를 유지하도록 하고 5% CO₂와 95% O₂를 계속적으로 공급하였다. 주머니 밖으로 빠져 나온 칼슘 시료는 10, 20, 30분, 1시간 그리고 2시간에 각각 채취하여 240 nm의 흡광도(Nano Quant M200, Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)에서 측정해 보았다(14).

통계 분석

실험 결과는 SPSS program(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며, 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 실험군 간의 유의성은 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

Table 1. Average particle size of calcium

Sample ¹⁾	Particle size (nm)
NC	2,280.3±64.3
C-1	521.3±83.3
C-2	313.9±29.5
C-3	280.9±3.4

¹⁾NC: normal calcium, C-1: supernatant of 1,000 rpm, C-2: supernatant of 2,000 rpm, C-3: supernatant of 3,000 rpm. Each value are mean±SD (three replicates).

결 과

나노칼슘의 입자 크기

폐각 칼슘으로부터 비중 차이를 이용하여 분획한 나노칼슘의 입자 크기를 측정된 결과 분획 전 일반 폐각 칼슘(Normal)이 2.3 μm 의 크기를 보인 반면, 나노 공정을 거친 1,000 rpm 상등액(C-1), 2,000 rpm 상등액(C-2), 3,000 rpm 상등액(C-3)은 각각 521 nm, 313 nm, 280 nm의 크기를 보였다(Table 1). 3,000 rpm에서 채취한 나노칼슘(C-3)의 입자가 가장 작았고 1,000 rpm으로부터 취한 나노칼슘 입자 크기 C-1은 C-3에 비해 2배의 크기를 보였다. 대체적으로 나노 공정을 거치지 않은 일반 폐각 칼슘에 비하면 나노 공정을 거친 칼슘의 입자 크기가 크게 차이가 남을 확인할 수 있었다. 이후의 실험들에서는 이들 4 샘플군들에 대해서 이온화율과 장 흡수율을 비교 분석하였다.

나노칼슘의 이온화율

각 분획 별 나노칼슘과 일반 폐각 칼슘을 대상으로 ion meter를 사용하여 이온화 정도를 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 현탁 20분 후 이온화율을 측정된 결과 입자 크기가 가장 작은 C-3 칼슘의 이온화 정도가 다른 실험군에 비해 약간 증가하는 경향을 나타냈다 하지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이 결과는 본 연구에서 분획한 나노칼슘의 입자 크기의 차이로는 이온화율에 크게 영향을 미치지 않는 것을 보여주는 것으로 생각된다.

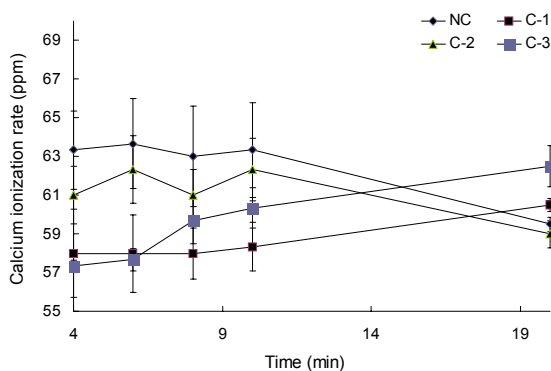


Fig. 1. Calcium ionization rate. NC, normal calcium; C-1, supernatant of 1,000 rpm; C-2, supernatant of 2,000 rpm; C-3, supernatant of 3,000 rpm. Each value are mean±SD (three replicates).

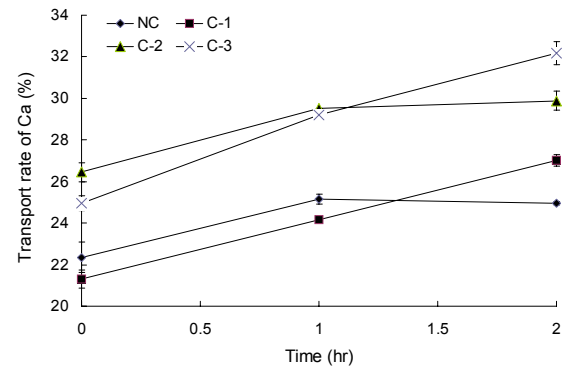


Fig. 2. Calcium transport rate through dialysis tube. Calcium transport rate was expressed at a ratio of outside calcium to total calcium level. NC, normal calcium; C-1, supernatant of 1,000 rpm; C-2, supernatant of 2,000 rpm; C-3, supernatant of 3,000 rpm. Each value are mean±SD (three replicates).

Dialysis membrane tube를 이용한 나노칼슘의 투과율

나노칼슘에 대한 막 투과성을 보기 위해 *in vitro* 상에서 dialysis membrane tube를 이용하여 각 크기별 나노칼슘의 membrane 밖으로의 이동속도를 측정하였다. 막을 통과하여 밖으로 이동된 나노칼슘의 이동률은 입자 크기가 가장 작은 C-3군이 가장 높아 32%의 이동율을 보였으며 이와 반대로 C-1군은 25%의 이동율을 보여 입자 크기에 따라 막 투과성이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이는 유의적인 차이를 보이지 않은 위의 이온화율 결과를 볼 때 비슷한 이온화율의 조건이라면 칼슘의 입자 크기가 체내 이용성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 이온화율이 체내에서 칼슘의 이용성에 있어서 중요한 요소이기는 하나 칼슘의 입자 크기도 부수적으로 칼슘의 이온화율과 더불어 고려되어야 하며 칼슘의 이용성에 중요하게 작용할 수 있음을 보여준다고 할 수 있다.

Intestinal sac을 이용한 장 흡수율

실제 체내의 나노칼슘의 투과율 모델로서 rat의 intestinal sac을 이용하여 나노칼슘의 투과율 실험을 실시하였다. 장내 환경에 따른 흡수율을 보기 위하여 장내 환경별로 buffer를 달리하여 측정하였으며, 각 장내 환경을 고려하여 citrate buffer(pH 4.2, 십이지장), phosphate buffer(pH 6.2, 공장), phosphate buffer(pH 7.5, 회장)가 각각 이용되었다. Rat의 장막을 투과한 시료의 흡광도를 A230 nm에서 측정하여 나노칼슘의 투과율을 계산하였다. 장내 환경별 장의 투과율을 비교하면 C-3 칼슘을 제외한 모든 실험군에서 다른 환경보다는 회장(pH 7.5)에서의 장 투과율이 가장 높았지만 입자 크기와 투과율의 상관관계는 관찰되지 않았다(Fig. 3). C-3 칼슘 투과율은 회장 환경보다 오히려 십이지장 환경에서 약간 더 높았다(Fig. 3). 특히 십이지장 환경에서 각 칼슘군의 장 투과율을 비교하면(Fig. 3 A) 입자 크기가 작은 C-2와 C-3군의 투과율이 상대적으로 높았으며 C-1, NS의 순으로 투과율의 증가를 보였다. 이는 십이지장에서는 비교적

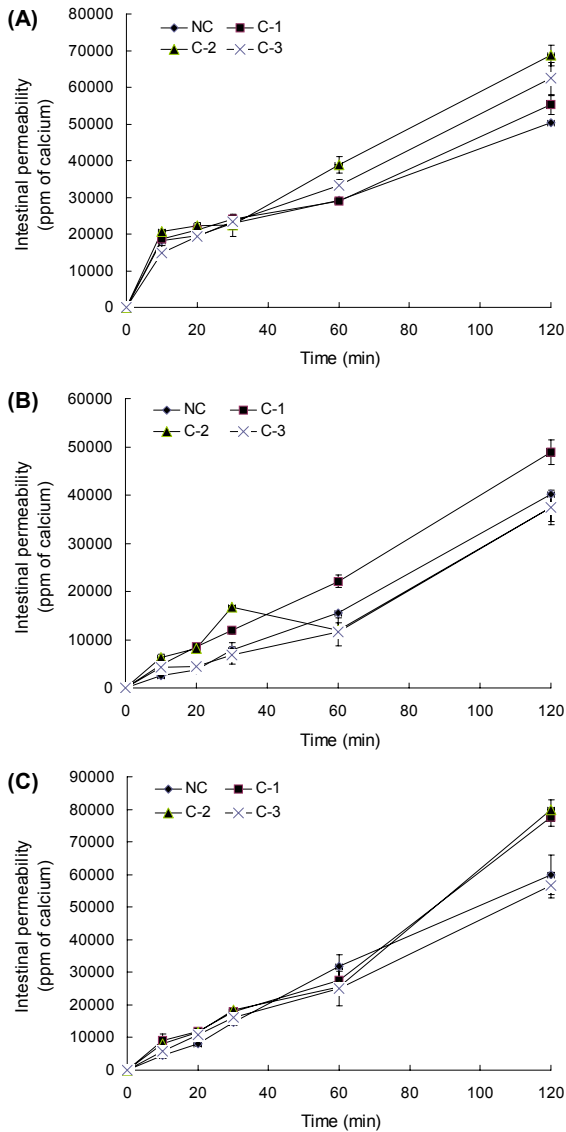


Fig. 3. Intestinal permeability of calcium in the intestinal sac model under duodenal (A, pH 4.2), jejunal (B, pH 6.2), and ileal (C, pH 7.5) environments. NC, normal calcium; C-1, supernatant of 1,000 rpm; C-2, supernatant of 2,000 rpm; C-3, supernatant of 3,000 rpm. Each value is mean±SD (three replicates).

입자 크기가 작을수록 장의 투과율이 비례한다는 것을 보여 준다. 하지만 그 밖의 장내 환경인 공장과 회장에서는 입자 크기에 따라 투과율이 별다른 영향을 받지 않았다. 이는 주로 산성 환경일 때는 나노칼슘의 입자 크기가 작을수록 투과율이 증가하는 경향을 보이는 반면, 중성 장내환경에 대해서 나노칼슘의 투과율 및 이용성이 간섭을 받는 것으로 생각되어지며 좀 더 자세한 상관관계가 연구되어야 할 것으로 생각된다.

고찰

이번 연구는 식용으로 사용 후 버려지는 패각들로부터 유래

하는 패각 칼슘을 재료로 나노칼슘을 제조하여 이온화율과 장 흡수율을 관찰하였다. 이 연구에서 우리는 rat의 장기를 대상으로 한 실험을 통해 패각유래 칼슘의 나노칼슘화가 특정 환경의 장에서 투과율을 높인다는 사실을 보여주었다. 특히 산성 환경(pH 4.2)에서는 나노칼슘의 입자 크기에 따라 투과율이 비례적으로 감소됨이 확인되어 십이지장과 같은 장기에서의 칼슘 투과율은 칼슘의 입자 크기가 중요함을 확인하였다. 하지만 공장, 회장과 같은 다른 장 환경에서는 이런 칼슘입자의 크기와 투과율상의 상관관계는 관찰되지 않았다. 최근 한 연구에서는 나노칼슘의 섭취가 골다공증 증상을 가지고 있는 쥐의 뼈 손실을 개선시킨다고 보고하고 있어 나노사이즈의 칼슘이 생체이용률을 높이는데 중요함을 보여주고 있다(15). 칼슘의 이온화되는 정도를 측정하는 실험에서는 나노사이즈 입자가 가장 작은 군(C-3)에서 약간 증가되는 것을 확인하였지만 칼슘의 입자 크기별로 유의적인 변화는 없는 것으로 관찰되었다. 칼슘의 이온화는 생체 내 칼슘의 흡수율을 증가시키는 중요한 요소로 알려져 있다. 특히 Moor(16)와 McLean과 Hastings(17)는 이온화된 칼슘이 활성화된 형태의 혈장칼슘으로써 건강한 성인이나 갑상선질환 환자들의 칼슘항상성에 결정적인 역할을 한다는 것을 보여주었다. 하지만 본 연구에서는 나노칼슘 제조 중의 입자 크기의 변화가 이온화에 별다른 영향을 미치지 못했다. 이는 이온화에 영향을 미칠 만큼 입자 크기가 충분히 감소되지 않은 것으로 생각되며 추후 보다 작은 입자로의 나노칼슘 제조를 통해 이온화에 미치는 영향을 관찰할 필요가 있을 것으로 사료된다(16-18).

칼슘은 생체 내에서 뼈의 생성뿐만 아니라 근육수축과 효소활성 등과 같은 중요한 생리적 역할을 담당한다(19,20). 대부분은 뼈의 형태로 저장이 되지만 신경전달이나 신호전달에 중요한 요소로서 작용하기도 한다(21). 충분한 칼슘의 섭취는 건강한 뼈와 신체의 유지를 위해 필요하지만 현대인들은 주로 앉아서 일을 하는 생활패턴과 서구식의 식습관 등으로 칼슘의 충분한 섭취가 어려워질 뿐 아니라 칼슘의 섭취 후 뼈 생산으로의 체내 이용률이 떨어지고 있다. 체내 칼슘의 부족은 골다공증과 같은 뼈의 건강에 심각한 사태를 초래할 수도 있어서 칼슘 섭취의 중요성이 증대되고 있다. 하지만 칼슘은 섭취가 되어도 체내에서 흡수되는 양은 제한되어있으며 섭취되는 칼슘의 형태에 따라 흡수율 등 신체 이용률이 다양한 것으로 알려져 있다(22). 예로 calcium citrate malate(CCM)와 casein phosphopeptide(CPP)와 같은 유기화된 칼슘은 신체이용률의 증가와 함께 뼈 무기질화가 증가하는 등 뼈 건강에 유익한 것으로 보이며(23,24), 특히 나노사이즈의 칼슘은 흡수율을 비롯한 체내 이용률을 극대화하는 것으로 알려져 있다(24). 칼슘은 carbonate와 citrate 등이 결합되어 있는 유기화합물 형태로 존재한다. 패각(oyster shell)은 탄산화(carbonated) 된 칼슘의 풍부한 원료가 된다. 따라서 유기물과 결합된 칼슘의 풍부한 원료가 되는 패각으로부터 나노칼슘을 얻고 활용한다면 패각

의 산업적 이용뿐만 아니라 건강증진을 위한 기능성 식품의 개발에도 유용한 자료가 될 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 폐각에서 유래하는 칼슘의 이용가치를 높이 고자 분쇄한 폐각 칼슘을 입자 크기별로 제조하여 이온화율과 흡수율을 조사하였다. 폐각 칼슘분말 현탁액을 알코올 중에서 비중차이별로 분리하고 입자 크기를 측정하여 4개의 시료군으로 나누었다; NC(일반 폐각 칼슘), C-1(1,000 rpm 상등액), C-2(2,000 rpm 상등액), C-3(3,000 rpm 상등액). 이들의 입자 크기는 각각 $2,280.3 \pm 64$ nm, 521.3 ± 83.3 nm, 313.9 ± 29.5 nm, 280 ± 3.4 nm를 보였다. 각 칼슘군들을 대상으로 이온화 정도를 측정된 결과 C-3군이 오차범위 내에서 다른 군들에 비해 이온화율이 다소 증가했다. *In vitro* 상에서 dialysis 막을 이용한 나노칼슘의 투과율을 측정된 결과 나노칼슘의 입자 크기가 작을수록 막 투과성이 증대됨을 확인할 수 있었다. 한편 rat의 내장주머니 막(intestinal sac)을 이용하여 장내 환경별 나노칼슘의 투과율을 측정된 결과 C-3군을 제외한 모든 군에서 십이지장(pH 4.2)과 공장(pH 6.2) 환경보다는 회장(pH 7.2)에서의 나노칼슘의 장 투과율이 비교적 높게 나타난 반면 C-3군에서는 십이지장 환경에서의 투과율이 다소 높았다. 특히 십이지장 환경에서의 샘플 간 투과율을 비교할 때 C-2와 C-3군이 가장 높은 투과율을 보였고 NC 칼슘이 가장 낮은 투과율을 나타내어 입자 크기가 작을수록 장 투과율이 증가함을 확인할 수 있었다. 위의 결과를 종합해볼 때, 폐각에서 유래하는 칼슘을 적절한 가공처리를 거쳐 나노칼슘으로 만들면 칼슘의 이온화율과 장내흡수율을 향상시킬 수 있는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Smith K. 1988. Calcium and trace mineral interactions. *Cereal Foods World* 33: 776-782.
- Prince RL, Smith M, Dick IM, Price RI, Webb PG, Henderson NK, Harris MM. 1991. Prevention of postmenopausal osteoporosis: a comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone-replacement therapy. *N Engl J Med* 325: 1189-1195.
- Lee S, Chang SO. 1994. Comparison of the bioavailability of calcium from anchovy, tofu and nonfat dry milk (NFD) in growing male rats. *Korean J Nutr* 27: 473-482.
- Lee SH, Hwangbo YS, Kim JY, Lee YS. 1997. A study on the bioavailability of dietary calcium sources. *Korean J Nutr* 30: 499-505.
- Kim JS, Choi JD, Kim DS. 1998. Preparation of calcium-based powder from fish bone and its characteristics. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 42: 147-152.
- Kang JH, Kim JH, Lee HC. 1996. A study on the development of manufacturing process of high grade precipitated calcium carbonate from oyster shell. *J Korean Solid Wastes Eng Soc* 13: 320-327.
- Park SS. 1997. A study on the manufacture, control of from and crystal size of precipitated calcium carbonate from oyster shells. *J Korean Solid Wastes Eng Soc* 14: 871-882.
- Reykdal O, Lee K. 1991. Soluble, dialyzable and ionic calcium in raw and processed skim milk, whole milk and spinach. *J Food Sci* 56: 864-866.
- Nair AB, Kaushik A, Attimarad M, Al-Dhubiab BE. 2012. Enhanced oral bioavailability of calcium using bovine serum albumin microspheres. *Drug Deliv* 19: 277-285.
- Yang T, Kim C, Jho J, Kim IW. 2012. Regulating fluoride uptake by calcium phosphate minerals with polymeric additives. *Colloids Surf A* 401: 126-136.
- Mahomoodally MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. 2005. Experimental evidence for in vitro fluid transport in the presence of a traditional medicinal fruit extract across rat everted intestinal sacs. *Fundam Clin Pharmacol* 19: 87-92.
- Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. 1998. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 15: 11-22.
- Dolinska B, Mikulska A, Caban A, Ostrozka-Cieslik A, Ryszka F. 2011. A model for calcium permeation into small intestine. *Biol Trace Elem Res* 142: 456-464.
- Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 61: 928-931.
- Choi HS, Han JH, Chung S, Hong YH, Suh HJ. 2013. Nano-calcium ameliorates ovariectomy-induced bone loss in female rats. *Korean J Food Sci An* 33: 515-521.
- Moore EW. 1970. Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchange electrodes. *J Clin Invest* 49: 318-334.
- McLean FC, Hastings AB. 1934. A biological method for the estimation of calcium ion concentration. *J Biol Chem* 107: 337-350.
- McLean FC, Hastings AB. 1935. The state of calcium in the fluids of the body: I. The conditions affecting the ionization of calcium. *J Biol Chem* 108: 285-321.
- Kerrick W, Hoar PE, Cassidy PS. 1980. Calcium-activated tension: the role of myosin light chain phosphorylation. *Fed Proc* 39: 1558-1563.
- Brewbaker JL, Kwack BH. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am J Bot* 50: 859-865.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses SA. 2011. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 53-58.
- Guéhen L, Pointillart A. 2000. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 19: 119S-136S.
- Dawson-Hughes B, Dallal GE, Krall EA, Sadowski L, Sahyoun N, Tannenbaum S. 1990. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *N Engl J Med* 323: 878-883.
- Nakashima S, Yoshie M, Sano H, Bahar A. 2009. Effect of a test dentifrice containing nano-sized calcium carbonate on remineralization of enamel lesions *in vitro*. *J Oral Sci* 51: 69-77.