

响应面优化羧甲基茯苓多糖铁复合物的制备

舒畅,夏洁,袁帅,赵帅,张西锋,鄢又玉*

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023)

摘要:以羧甲基茯苓多糖(carboxymethyl pachyman, CMP)为研究对象,柠檬酸三钠(trisodium citrate dihydrate, TCD)为催化剂,在碱性条件下与 FeCl_3 反应生成羧甲基茯苓多糖铁复合物(carboxymethyl pachyman- $\text{Fe}(\text{III})$ complex, CMPIC)。考察 pH 值,反应温度以及 TCD 与 CMP 的质量比对合成反应的影响,并在单因素试验的基础上用响应面设计优化 CMPIC 的制备。结果表明最佳反应条件为:pH 8.3,反应温度 72.9 $^{\circ}\text{C}$, TCD 与 CMP 的质量比为 0.69,模型拟合良好,此条件下 CMPIC 中铁含量为 27.55 %。进一步通过紫外和红外光谱分析证明合成 CMPIC 的羟基与 Fe^{3+} 形成了稳定的络合物,通过抗氧化研究表明该 CMPIC 对金属离子和 ABTS $^{\cdot+}$ 自由基具有一定的清除能力。因此 CMPIC 有望作为一种新型的补铁抗氧化剂进一步深入研究。

关键词:羧甲基茯苓多糖;铁复合物;响应面;结构表征;抗氧化

Optimization of Carboxymethyl Pachyman- $\text{Fe}(\text{III})$ Complex by Response Surface Methodology

SHU Chang, XIA Jie, YUAN Shuai, ZHAO Shuai, ZHANG Xi-feng, YAN You-yu*

(College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China)

Abstract: Carboxymethyl pachyman- $\text{Fe}(\text{III})$ complex was synthesized by the reaction of carboxymethyl *Poria cocos* polysaccharide with FeCl_3 under alkaline condition with sodium citrate as catalyst. pH, reaction temperature and the mass ratio of trisodium citrate to carboxymethyl pachyman were taken as factors and the preparation of carboxymethyl pachyman- $\text{Fe}(\text{III})$ complex was optimized by response surface methodology on the basis of single factor experiment. The optimum conditions were as follows: pH was 8.3, reaction temperature was 72.9 $^{\circ}\text{C}$, the mass ratio of trisodium citrate to polysaccharide was 0.69, the model was well fitted and the iron content of CMPIC was 27.55 %. Ultraviolet and infrared spectroscopy showed that the hydroxyl group of CMPIC had a stable complex with Fe^{3+} and further antioxidant studies showed CMPIC had certain clearance ability to metal ions and ABTS $^{\cdot+}$. Therefore, CMPIC is expected to be further studied as a new iron-supplementing antioxidant.

Key words: carboxymethyl pachyman; iron complex; response surface optimization; structural characterization; anti-oxidation

引文格式:

舒畅,夏洁,袁帅,等. 响应面优化羧甲基茯苓多糖铁复合物的制备[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 188-194, 211

SHU Chang, XIA Jie, YUAN shuai, et al. Optimization of Carboxymethyl Pachyman- $\text{Fe}(\text{III})$ Complex by Response Surface Methodology[J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 188-194, 211

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划项目(B2018084);2016年神农架林区科技计划项目

作者简介:舒畅(1994—),男(汉),硕士研究生,研究方向:生药学。

*通信作者

茯苓(*Poria cocos*)是一种东方真菌,几个世纪以来因其利尿、镇静和滋补作用而被广泛用作中草药^[1]。相关研究表明,多糖为茯苓中所含主要功效成分之一^[2]。真菌多糖是一种代谢产物,由十多种单糖组成,通过糖苷键连接形成天然聚合物^[3]。它具有调节细胞衰老、控制细胞分化、抗肿瘤炎症、提高机体抵抗力等多种生物活性^[4-5]。茯苓多糖还具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力等作用^[6-8]。干茯苓中含有80%以上碱溶多糖,该多糖是一种线性 $\beta(1\rightarrow3)$ 糖苷键连接的葡聚糖,由于含有较长的 $\beta(1\rightarrow6)$ 糖苷键连接的支链,该多糖不溶于水且基本上没有抗癌活性^[9-10]。但是,经化学改性后得到可溶于水的羧甲基化茯苓多糖,其抗癌抗肿瘤等生物活性显著提高^[11]。考虑到茯苓中主要成分为不溶于水的碱溶性多糖,而羧甲基茯苓多糖溶于水利于应用,且其合成工艺较成熟,合成成本低,故试验选择羧甲基茯苓多糖为研究对象。

铁是人体必需的微量元素之一,临床上常以 FeSO_4 的形式给机体补充铁。但 Fe^{2+} 易产生内源性自由基,导致细胞膜脂质过氧化而损伤细胞膜,故不宜长期使用^[12]。为了尽可能避免这些副作用,第三代补铁剂,即以多糖等生物大分子与 Fe^{3+} 形成的复合物应运而生。其中 Fe^{3+} 通过氧桥或羟基桥与多糖结合,形成稳定的多糖铁复合物^[13],它具有副作用小、稳定性及溶解性好等优良特性^[14],在进入人体后,一般是以分子形式被机体吸收利用, Fe^{3+} 在人体环境下慢慢溶出,被抗坏血酸还原为 Fe^{2+} 被人体吸收利用^[15]。相对于 FeSO_4 而言对胃肠道刺激及损伤大大降低,并且在释放铁之后,多糖又具备多重生物活性供机体吸收利用,作为补铁剂具有双效作用^[16]。响应面法(response surface methodology, RSM)是一种找到最佳加工参数的有效统计技术,它已被用于优化多糖铁的合成工艺变量以及这些变量之间的相互作用^[17-18]。本研究以Box-Behnken设计(box-behnken design, BBD)来优化CMPIC的合成条件。

众所周知,疾病或某些外源性药物或毒物入侵会导致抗氧化系统紊乱,氧自由基代谢失去平衡,最终可能导致包括DNA、蛋白质等多种生物物质破坏^[19-20],带来各种疾病和病症,如癌症、心血管疾病、类风湿性关节炎和动脉粥样硬化等^[21]。近年来,由于合成抗氧化剂的致癌性,人们越来越关注寻找天然、有效和低细胞毒性的抗氧化剂^[22]。据报道,从植物中分离的多糖对自由基具有一定的强抗氧化能力,因此有必要更加关注探索它们作为新型潜在抗氧化剂的应用^[23-24]。本研究的目的是优化羧甲基茯苓多糖铁复合物(carboxymethyl pachymaran-Iron(III) complex, CMPIC)的合成工艺,为新型口服铁补充剂的开发提供理论依据;

同时,通过抗氧化研究为寻求天然的抗氧化剂提供新的方向;另外,因羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤活性,CMPIC也可以为后续的抗肿瘤应用提供探究材料。

1 材料与方法

1.1 材料试剂与仪器

羧甲基茯苓多糖(99%):泰安市嘉叶生物科技有限公司;ABTS⁺自由基:上海源叶生物科技有限公司;六水合氯化铁、抗坏血酸、柠檬酸三钠、氢氧化钠、邻菲罗啉、氯化亚铁等(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

铁(II)标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$):精密称取 $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 固体0.7025 g,溶解于蒸馏水中并滴加适量盐酸,以蒸馏水定容到1 L的容量瓶中,低温保存;铁(II)标准液(10 $\mu\text{g/mL}$,现配):用移液管准确移取10.0 mL铁(II)标准储备液蒸馏水定容到100 mL。CMPIC样品溶液的配制:分别配制1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 mg/mL的水溶液备用。

紫外-可见分光光度计(Lambda25):美国PerkinElmer公司;数显恒温水浴搅拌锅(SHJ-6):金坛市亿能实验仪器厂;低速大容量离心机(TDL-5):上海安亭科学仪器厂;pH计(STARTER 2100):上海奥豪斯仪器有限公司;真空干燥箱(DZF-6020):上海新苗医疗器材制造有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 CMPIC的制备

参照文献[25-26],取0.2 g羧甲基茯苓多糖和0.2 g柠檬酸三钠置于圆底烧瓶中,加入50 mL蒸馏水溶解,缓慢滴加20%氢氧化钠溶液和2.0 mol/L三氯化铁溶液并不断振摇,直到溶液中出现少量红棕色沉淀且沉淀不再溶解,停止滴加,调pH值至8.0,70℃水浴反应1.5 h。反应结束后,5 000 r/min离心5 min去除沉淀,收集上层液体,分子量3 500 Da截留透析袋常温流水透析24 h,然后用超纯水透析清洗12 h。在透析完的溶液中加入3倍体积95%乙醇,4℃静置过夜,再分别用无水乙醇、乙醚和丙酮洗涤沉淀,CMPIC待用。

1.2.2 CMPIC中铁含量测定及铁标准曲线的建立

采用邻菲罗啉显色法^[25,27],取1.2.1中适量CMPIC溶解并定容到50 mL,取出1 mL稀释至25 mL作为样品溶液。将1 mL多糖铁样品溶液加入50 mL容量瓶,分别加入5 mL 0.1%邻菲罗啉溶液和2.5 mL 10%抗坏血酸溶液并定容,置于烧瓶中于37℃水浴中反应3 h,最后在510 nm测吸光度。然后带入铁标准曲线函数公式中计算铁含量。分别移取1.1中铁(II)标准液0、1、2、3、4、5、6、7 mL到25 mL容量瓶中,配制成浓度分别

为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8 $\mu\text{g/mL}$ 铁(II)的溶液,分别加入 10%的抗坏血酸溶液 1.75 mL 和 0.1%的邻菲罗啉溶液 2.5 mL,定容后转移至烧瓶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min,在 510 nm 测吸光度,绘制铁标准曲线。

1.2.3 CMPIC 合成单因素试验

参考何瑞雪,王峰等^[28-29]多糖铁合成的单因素设计,在 1.2.1 中制备 CMPIC 方法下,设计反应溶液的 pH 值(X_1 : 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0),反应温度(X_2 : 50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$)和柠檬酸钠(trisodium citrate dihydrate, TCD)与羧甲基茯苓多糖(carboxymethyl pachymaran, CMP)质量的比值(X_3 : 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25)3 个单因素试验。力求分别找到最佳 pH 值、反应温度以及 TCD 与 CMP 质量的比值。

1.2.4 响应面优化试验设计

在 1.2.3 单因素试验的基础上,进一步优化 CMPIC 的合成工艺,选取 pH(X_1)、温度(X_2)、TCD 与 CMP 的质量的比值(X_3)3 个要素进行响应面考察,采用三因素三水平的响应面分析方法进行试验设计,并通过 Design-Expert 8.0.6.1 软件进行数据处理。

1.2.5 CMPIC 的结构表征

各制备 2.0 mg/mL 的 CMP 和 CMPIC 水溶液,在 200 nm~600 nm 波长范围内,进行全波长紫外扫描。

采用傅立叶变换红外光谱仪,分别取适量 CMP 干粉末和 CMPIC 干粉末与适量 KBr 混合压片,在 4000 cm^{-1} ~500 cm^{-1} 范围内进行红外光谱扫描,测定 CMP 和 CMPIC 红外光谱图。

1.2.6 FRAP 的测定

参考 Que 等^[30]描述的测定金属螯合能力抗氧化活性方法。配制 5 mmol/L FeCl_2 (现配现用):称取 39.762 mg FeCl_2 固体以蒸馏水溶解后定容到 100 mL。配制 5 mmol/L 邻菲罗啉:称取 123 mg 邻菲罗啉固体用蒸馏水充分搅拌待溶解后定容到 50 mL。分别将 0.04 mL FeCl_2 溶液与 0.08 mL 邻菲罗啉溶液及 1.08 mL 蒸馏水与 0.4 mL 不同浓度的 CMPIC 样品溶液混合,于 562 nm 处测量吸光度 A_1 ,将样品改为蒸馏水其他方法同 A_1 测得 A_0 ,将蒸馏水代替氯化亚铁溶液其他方法同 A_1 测得 A_2 。

$$\text{清除率}/\%=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100$$

式中: A_0 为对照组吸光度(蒸馏水代替样品); A_1 为样品吸光度; A_2 为样品的本底吸光度(蒸馏水代替 FeCl_2 溶液)。每个样品重复测定 3 次,结果带入计算清除率后取平均值。

1.2.7 ABTS⁺自由基清除能力测定

参考 Re 等^[31]的方法。配制 7 mmol/L ABTS⁺自由

基:称取 384 mg ABTS⁺自由基固体蒸馏水溶解后定容到 100 mL。配制 15 mmol/L 过硫酸钾:称取 200.5 mg 过硫酸钾固体蒸馏水溶解后定容到 50 mL。将 7 mmol/L 1.6 mL ABTS⁺自由基溶液加入到 0.4 mL 1.1 中不同浓度的 CMPIC 样品溶液中,在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下反应 10 min 后,在 734 nm 处测量吸光度 A_1 ,将样品改为蒸馏水其他方法同 A_1 测得 A_0 ,将蒸馏水代替氯化亚铁溶液其他方法同 A_1 测得 A_2 。清除率计算同 1.2.6。每个样品重复测定 3 次,结果带入计算清除率后取平均值。

2 结果与分析

2.1 铁标准曲线的建立

参照 1.2.2 设计测定结果,以铁离子浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)对吸光度(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y=0.1966X-0.0121$ ($R^2=0.9998$)。

2.2 单因素试验

取 0.2 g CMP 溶于水中,按照 1.2.3 中单因素设计进行试验,结果如图 1 所示。

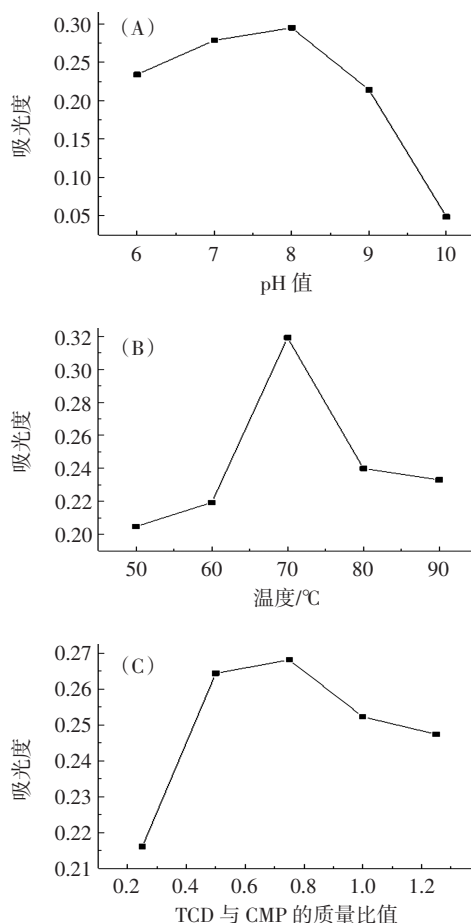


图1 pH 值、温度及 TCD 与 CMP 质量比值对 CMPIC 合成的影响

Fig.1 Effect of pH, reaction temperature and the ratio of TCD to CMP on the synthesis of CMPIC

因 CMPIC 溶液的吸光度与其铁含量呈线性关系,故直接以吸光度值代表铁含量。由图 1(A)可知,pH 值对合成影响较大,随着 pH 值增加,吸光度即含铁量先升高后降低,在 pH 8.0 时最大,在 pH 10.0 时最低,可能是反应体系碱性增加,导致多糖的结构被破坏从而阻碍多糖铁的合成,故最佳 pH 值选择 8.0;由图 1(B)可知,随温度升高,铁含量先上升后下降,在 70 ℃时达最大值,后降低可能是因为温度过高破坏了多糖的结构,部分多糖丧失了活性导致合成多糖铁效率降低,所以最佳温度选为 70 ℃;由图(C)可知,铁含量先上升后下降,在 TCD 与 CMP 质量之比为 0.75 时含铁量最大,所以最佳质量比选 0.75。其中,pH 值对 CMPIC 合成的影响最大,反应温度次之,TCD 与 CMP 质量之比影响相对最小。

2.3 响应面优化试验设计

根据 2.2 单因素试验结果,进行三因素三水平的 Box-behnken 试验设计,如表 1 所示。

表 1 Box-behnken 设计因素水平及编码值			
Table 1 Design factor level and code value			
水平	因素		
	X ₁ pH 值	X ₂ 反应温度/℃	X ₃ TCD 与 CMP 质量比值
-1	7.0	60	0.50
0	8.0	70	0.75
+1	9.0	80	1.00

2.4 响应面优化试验

2.4.1 CMPIC 合成工艺响应面试验结果

参照 1.2.4 设计,得到响应面试验结果如表 2 所示。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 2 Design and the results of Box-Behnken experiment

试验 序号	水平			吸光度
	X ₁ pH 值	X ₂ 反应温 度/℃	X ₃ TCD 与 CMP 质量比值	
1	9.0	60	0.75	0.131 2
2	8.0	70	0.75	0.273 5
3	8.0	70	0.75	0.271 2
4	8.0	80	0.50	0.257 4
5	7.0	60	0.75	0.234 2
6	8.0	80	1.00	0.229 6
7	8.0	70	0.75	0.280 3
8	7.0	80	0.75	0.274 4
9	9.0	80	0.75	0.145 5
10	7.0	70	0.50	0.273 2
11	9.0	70	1.00	0.134 9
12	8.0	70	0.75	0.274 6
13	8.0	70	0.75	0.271 4
14	7.0	70	1.00	0.218 7
15	9.0	70	0.50	0.142 5
16	8.0	60	0.50	0.230 0
17	8.0	60	1.00	0.203 2

以羧甲基茯苓多糖铁中铁吸光度为响应值,利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件,将表 2 中试验数据进行统计分析,得到二次多项式回归方程: $Y=-4.316 4+0.879 15X_1+0.034 714X_2+0.151 25X_3-0.000 647 5X_1X_2+0.046 9X_1X_3-0.000 1X_2X_3-0.057 8X_1^2-0.000 200 75X_2^2-0.385 2X_3^2$,并对模型进行方差分析,结果见表 3。

表 3 回归模型的方差分析
Table 3 Analysis of variance for items of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.049	9	5.393×10 ⁻³	378.87	<0.000 1	**
X ₁	0.025	1	0.025	1 749.98	<0.000 1	**
X ₂	1.466×10 ⁻³	1	1.466×10 ⁻³	103.00	<0.000 1	**
X ₃	1.702×10 ⁻³	1	1.702×10 ⁻³	119.60	<0.000 1	**
X ₁ X ₂	1.677×10 ⁻⁴	1	1.677×10 ⁻⁴	11.78	0.010 9	*
X ₁ X ₃	5.499×10 ⁻⁴	1	5.499×10 ⁻⁴	38.63	0.000 4	**
X ₂ X ₃	2.500×10 ⁻⁷	1	2.500×10 ⁻⁷	0.018	0.898 3	
X ₁ ²	0.014	1	0.014	988.25	<0.000 1	**
X ₂ ²	1.697×10 ⁻³	1	1.697×10 ⁻³	119.21	<0.000 1	**
X ₃ ²	2.440×10 ⁻³	1	2.440×10 ⁻³	171.45	<0.000 1	**
残差	9.964×10 ⁻⁵	7	1.423×10 ⁻⁵			
失拟项	4.494×10 ⁻⁵	3	1.498×10 ⁻⁵	1.10	0.447 7	
纯误差	5.470×10 ⁻⁵	4	1.368×10 ⁻⁵			
总和	0.049	16				
R ² =0.998 0	R ² _{Adj} =0.995 3	R ² _{pred} =0.983 5	信噪比=48.720			

注: * 为显著(P<0.05), ** 为极显著(P<0.01)。

根据表3可知,除了 X_2X_3 即温度和TCD与CMP质量的比值的交互作用不显著, X_1X_2 即pH值和温度的交互作用显著外,其余几项均是极显著。试验所建立的模型($P<0.001$)极显著,失拟项($P=0.447\ 7>0.05$)不显著,这些数据表明该试验所建立的响应面模型用于优化制备工艺是可行的。信噪比=48.720比较高,说明该模型可预测试验结果,而模型校正判定系数 $R^2_{Adj}=$

0.995 3,说明该模型能够证明预测99.53%的响应值。判定系数 $R^2=0.998\ 0$,说明该模型拟合程度良好,可以应用该模型分析和预测工艺, $R^2_{Pred}=0.983\ 5$ 与 $R^2=0.998\ 0$ 的值相差不大说明该模型无需做进一步优化。

2.4.2 CMPIC 合成工艺响应面图分析与对比

根据2.4.1所得回归方程,考察拟合响应面的形状,绘制响应面及等高线图,结果见图2所示。

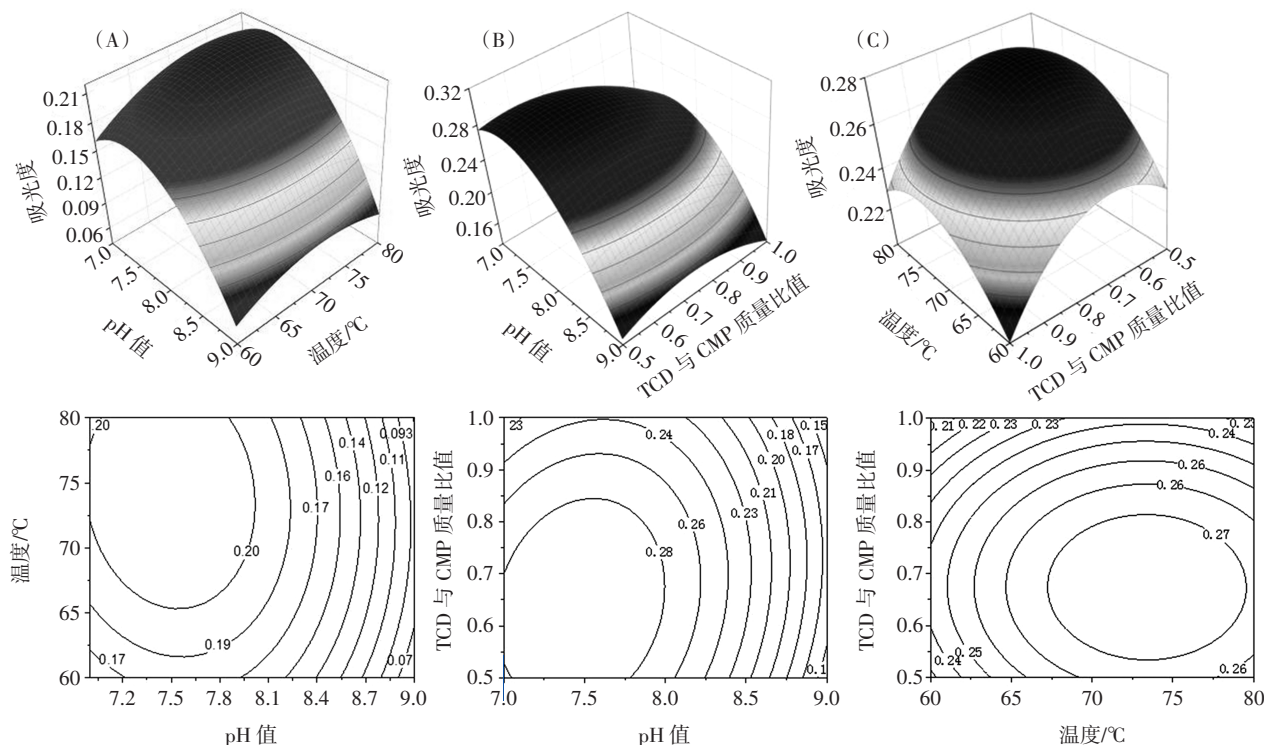


图2 CMPIC 溶液的响应面及等高线图

Fig.2 Response surface and contour plot of CMPIC

响应面中各因素之间(A:pH-温度;B:pH-TCD与CMP质量比值;C:温度-TCD与CMP质量比值)的相互作用以及影响可以通过图2中响应面图中的曲线趋势的陡峭程度以及等高线图中等高线密集程度直观地反应出来。由图2(A)可知,反应pH值的效应面相对更陡峭,等高线相对更密集,而反应温度的效应面相对更平滑,等高线相对更稀疏,所以反应pH值对合成CMPIC的影响更为显著些,反应温度对合成CMPIC的影响次之;同理,由图2(B)可知,反应pH值的效应面相对更陡峭,等高线相对更密集,而反应的TCD与CMP质量比值效应面相对更平滑,等高线相对更稀疏,所以反应pH值对合成CMPIC的影响更为显著些,TCD与CMP质量比值对合成CMPIC的影响次之;由图2(C)可知,反应温度的效应面相对更陡峭,等高线相对更密集,而反应的TCD与CMP质量比值的效应面相对更平滑,等高线相对更稀疏,所以反应温度对合成CMPIC的影响更为显著些,反应TCD与CMP

质量比值对合成CMPIC的影响次之。上述结论与2.2中单因素显著性分析结论完全吻合。由图2(A~C)可以看出,响应面和等高线存在极值,响应面的最高点也就是等高线中的最小椭圆的中心点^[32]。通过观察等高线图中中心椭圆的情况可以了解两两交互作用的影响强弱:中心椭圆越接近圆形,两两交互作用相对越弱,越偏离圆形,交互作用越强。根据结论由图2(A~C)等高线图判断可知:温度和TCD与CMP质量比值即 X_2X_3 的交互作用最弱,pH值和TCD与CMP质量比值即 X_1X_3 的交互作用最强,pH值和温度即 X_1X_2 的交互作用适中,这一结论也与表3方差分析结果完全吻合。

2.4.3 最佳提取工艺验证

通过响应面软件优化所得到的最佳合成工艺条件为:反应pH值为8.3,反应温度为72.9℃,TCD与CMP质量比为0.69,此时理想的吸光度值为0.255 0。为检验该模型的可靠性,按照上述最佳方案进行5组平行试验。实际合成条件取反应pH 8.3,反应温度

73 ℃,TCD 与 CMP 质量比 0.7,对 5 组结果取平均值,平均吸光度值为 0.245 0,实际值与理论值相近,相对误差仅为 4.29 %。可见此模型可靠,可以用来作为合成的模型,并用来优化的合成工艺在此最优条件下得到含铁量为 27.55 %。

2.5 CMPIC 结构表征

2.5.1 紫外光谱分析

为了表征合成的 CMPIC 的结构,对 CMP 和 CMPIC 分别进行了紫外扫描,其扫描图谱见图 3。

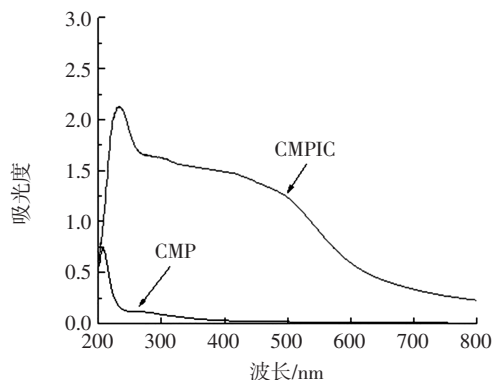


图 3 CMP 和 CMPIC 紫外扫描光谱

Fig.3 Ultraviolet scanning spectrum of CMP and CMPIC

由图 3 中 CMP 与 CMPIC 的紫外扫描光谱曲线对比可以看出,在同样浓度下,与 CMP 相比,CMPIC 在紫外区的吸收强度明显增加,说明 CMP 与铁反应生成了复合物,无游离物质存在。CMP 中的生色基团有羧基、羰基和酯基,助色基团是-OH,CMPIC 紫外吸收增强,表明 CMP 中助色团-OH 与铁发生了络合反应使助色团发生变化^[29,33]。

2.5.2 红外光谱分析

为进一步表征合成的 CMPIC 的结构,对 CMP 和 CMPIC 分别进行了红外分析,其红外图谱见图 4。

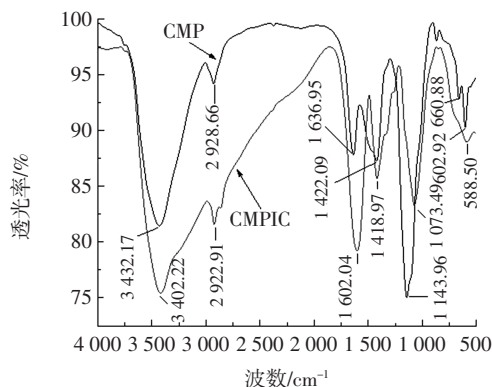


图 4 CMP 和 CMPIC 红外光谱

Fig.4 IR spectroscopy of CMP and CMPIC

由图对比可知,两者具有相似的特征吸收峰,说明与铁螯合后多糖结构基本未发生变化。CMPIC 和

CMP 中出现在 3402.22 cm^{-1} 及 3432.17 cm^{-1} 峰为-OH 的伸缩振动峰,相对而言,CMPIC 中-OH 的伸缩振动峰的峰型变窄,说明螯合反应导致-OH 振动变弱。与 CMP 相比(其 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰为 1636.95 cm^{-1}),CMPIC 的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰(1602.04 cm^{-1})向低波数偏移,说明羧基也参与了螯合^[18]。

2.6 CMPIC 的抗氧化分析

2.6.1 FRAP 的测定

金属离子(如铁和铜)在机体的氧化中起催化作用。金属离子的螯合可以大大降低金属离子的催化作用,避免机体氧化产生自由基。因此,测定样品的金属螯合能力大小是测定其抗氧化性能的常用评价方法之一。各浓度 CMPIC 金属螯合能力如图 5 所示(带标准偏差)。

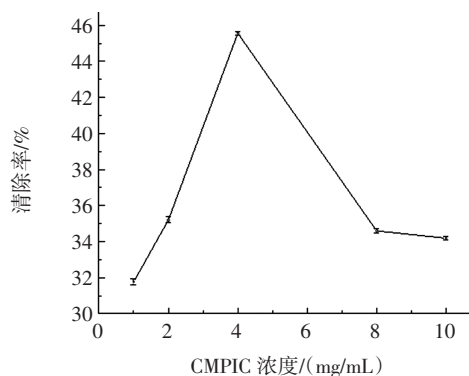


图 5 CMPIC 对 Fe^{2+} 的清除能力

Fig.5 Scavenging effects of CMPIC on Fe^{2+} chelating capacity

随着浓度增加,CMPIC 对 Fe^{2+} 清除能力逐步增加,当浓度为 10 mg/mL 时最大清除率达到 45.53 %,但随着浓度继续增加,清除率反而降低,可能是由于 CMPIC 样品浓度过高,黏度增加抑制了其与 Fe^{2+} 的螯合。

2.6.2 ABTS⁺自由基清除能力测定

ABTS⁺自由基测定常用于测量潜在抗氧化剂的总抗氧化能力,也可用作反映测试样品抗氧化活性的指标^[32]。浓度依赖性自由基清除活性如图 6 所示(带标准

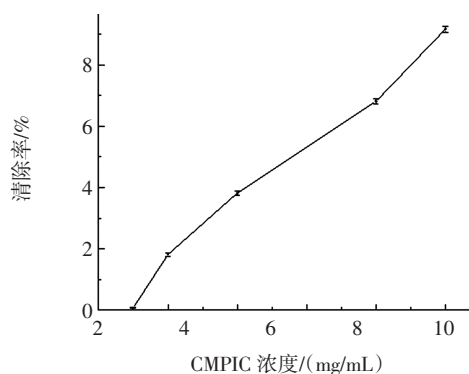


图 6 CMPIC 对 ABTS⁺自由基的清除能力

Fig.6 Scavenging effects of CMPIC on ABTS⁺ radical cation

偏差)。与清除金属离子相比,在相同梯度浓度 CMPIC 下,ABTS⁺自由基清除能力随着样品浓度的增加而增加,因 CMPIC 溶解性的问题后续没法继续增加 CMPIC 浓度,故在此浓度范围下,对 ABTS⁺自由基具有一定的清除作用,可作为潜在的抗氧化剂进行后期探索。

3 结论

选用羧甲基茯苓多糖为材料,通过单因素考察,得出合成羧甲基茯苓多糖铁的最佳单因素条件为:pH8.0,温度 80℃,柠檬酸三钠:羧甲基茯苓多糖质量比为 0.75。进一步运用响应面软件 Design-Expert 优化合成工艺,得出羧甲基茯苓多糖铁合成最佳的条件为:pH 值为 8.3,温度为 72.9℃,柠檬酸三钠:羧甲基茯苓多糖质量比为 0.69。经过对羧甲基茯苓多糖铁的紫外及红外结构表征,表明多糖铁合成成功。同时对羧甲基茯苓多糖铁进行了抗氧化研究,结果表明羧甲基茯苓多糖铁对金属离子以及 ABTS⁺自由基具有一定的清除能力。

参考文献:

- [1] Giner Larza E M, Múñez S, Giner Pons R M, et al. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A (2) activity of extracts from lanostane-rich species [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2000, 73 (1): 61-69
- [2] Esteban, C I. Interés medicinal de *Poria cocos* (= *Wolfiporia extensa*) [J]. Revista Iberoamericana De Micología, 2009, 26 (2): 103-107
- [3] 牛爽,郝利民,赵树欣,等. 茯苓多糖的研究进展[J]. 食品科学, 2012(13): 348-353
- [4] Xiao S, Guo S. Recent studies on the structures of fungal polysaccharides in China[J]. Natural Product Research & Development, 2000, 12(2): 81-86
- [5] Lavi I, Friesem D, Geresh S, et al. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells [J]. Cancer Letters, 2006, 244(1): 61-70
- [6] Giner E M, Múñez S, Recio M C, et al. *In vivo* studies on the anti-inflammatory activity of pachymic and dehydrotumulosic acids[J]. Planta Medica, 2000, 66(3): 221-227
- [7] Spelman K, Burns J, Nichols D, et al. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators(Cytokines/Herbs) [J]. Alternative Medicine Review A Journal of Clinical Therapeutic, 2006, 11(2): 128-150
- [8] Mizushima Y, Akihisa T M, Murakami C, et al. A novel DNA topoisomerase inhibitor: dehydroeburonic acid, one of the lanostane-type triterpene acids from *Poria cocos* [J]. Cancer Science, 2010, 95(4): 354-360
- [9] 张俐娜,冯汉桥. 茯苓菌核多糖的分离和结构分析[J]. 高等学校化学学报, 1997, 18(6): 990-993
- [10] 丁琼,张俐娜,张志强. 茯苓菌丝体多糖的分离及结构分析[J]. 高分子学报, 2000(2): 224-227
- [11] 纪芳,李鹏飞,徐胜元,等. 羧甲基茯苓多糖的制备及体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(6): 333-334
- [12] Floyd R A, Lewis C A. Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes[J]. Biochemistry, 1983, 22(11):2645-2649
- [13] Eichbaum Q, Foran S, Dzik S. Is iron gluconate really safer than iron dextran [J]. Blood, 2003, 101(9): 3756-3757
- [14] Maxton D G, Thompson R P, Hider R C. Absorption of iron from ferric hydroxypyranone complexes[J]. British Journal of Nutrition, 1994, 71(2):203-207
- [15] 董亚茹,陈贵堂. 多糖铁复合物研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(8):2890-2895
- [16] London E. The molecular formula and proposed structure of the iron-dextran complex, imferon[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, 93(7):1838-1846
- [17] 赵鹏,张婷婷,张丽华,等. 响应面法优化倒卵叶五加多糖铁(Ⅲ)合成工艺条件研究[J]. 中成药, 2014, 36(11):2418-2420
- [18] 崔洁芬,杜春影,迟永洲,等. 浒苔多糖铁的制备工艺优化及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2018,39(5):161-165
- [19] Cuzzocrea S, Riley D P, Caputi A P, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury[J]. Pharmacological Reviews, 2001, 53(1):135-159
- [20] Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, et al. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats[J]. Science, 1999, 286(5438): 304-306
- [21] Ma A, Qi S, Chen H. Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection[J]. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2008, 6(1):20-43
- [22] Guyton K Z, Bhan P, Kuppusamy P, et al. Free Radical-Derived Quinone Methide Mediates Skin Tumor Promotion by Butylated Hydroxytoluene Hydroperoxide: Expanded Role for Electrophiles in Multistage Carcinogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88 (3): 946-950
- [23] Jiang Y, Wang L, Li Z, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza*, Bunge residue[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79:533-541
- [24] Yuan Q, Xie Y, Wang W, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves [J]. Carbohydr Polym, 2015, 128 (complete):52-62
- [25] Lu Q, Xu L, Meng Y, et al. Preparation and characterization of a novel *Astragalus membranaceus* polysaccharide-iron(III) complex[J]. (下转第 211 页)

- sional graphene nanosheet doped with gold nanoparticles as electrochemical DNA biosensor for bacterial detection[J]. *Sensors & Actuators: B. Chemical*,2018,262:860–868
- [14] 朱丹,李强强,逢秀梅,等. 阻抗光谱在电化学生物传感器中的应用[J]. *化学传感器*,2016,36(1):42–47
- [15] 张爱萍,唐佳妮,孟瑞峰,等. 电化学法快速检测微生物的发展现状及趋势[J]. *生物技术进展*,2011,1(5):342–346
- [16] Marta Sánchez-Paniagua López, Beatriz López-Ruiz. Electrochemical biosensor based on ionic liquid polymeric microparticles. An analytical platform for catechol[J]. *Microchemical Journal*,2018,138: 173–179
- [17] Materon EM, Huang JPJ, Wong A, et al. Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs[J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2014,58:232–236
- [18] Wu D, Guo AP, Guo ZK, et al. Simultaneous electrochemical detection of cervical cancer markers using reduced graphene oxide-tetraethylene pentamine as electrode materials and distinguishable redox probes as labels[J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2014,54: 634–639
- [19] Kara P, Meric B, Ozsoz M. Application of Impedimetric and Voltammetric Genosensor for Detection of a Biological Warfare: Anthrax[J]. *Electroanalysis*,2010,20(24):2629–2634
- [20] Shabani A, Zourob M, Allain B, et al. Bacteriophage-modified microarrays for the direct impedimetric detection of bacteria[J]. *Analytical Chemistry*,2008,80(24):9475–9482
- [21] Gamella M, Campuzano S, Parrado C, et al. Microorganisms recognition and quantification by lectin adsorptive affinity impedance[J]. *Talanta*,2009,78(4):1303–1309
- [22] Umer Farooq, Qiaoli Yang, Muhammad Wajid Ullah, et al. Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2018,118: 204–216
- [23] Hoda Ilkhani, Siamak Farhad. A novel electrochemical DNA biosensor for Ebola virus detection[J]. *Analytical Biochemistry*,2018,557: 151–155
- [24] C Day, S Sørstad, H Ma, et al. Impedance-based sensor for potassium ions[J]. *Analytica Chimica Acta*,2018,1034(30):39–45
- [25] E Fazio, S G Leonardi, M Santoro, et al. Synthesis, characterization and hydrogen sensing properties of nanosized colloidal rhodium oxides prepared by Pulsed Laser Ablation in water[J]. *Sensors & Actuators: B. Chemical*,2018,262:79–85
- [26] Jia XL, Liu ZM, Liu N, et al. A label-free immunosensor based on graphene nanocomposites for simultaneous multiplexed electrochemical determination of tumor markers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2014,53:160–166
- [27] O O Soldatkin, O S Burdak, T A Sergeyeva, et al. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1[J]. *Sensors & Actuators: B. Chemical*,2013,188:999–1003
- [28] 周从燕,李丽蓉,刘入源. 纳米基电分析生物传感器在食品兽药残留检测中的研究与应用进展[J]. *食品安全质量检测学报*,2017, 8(1):150–155
- [29] Steffen Rameil, Peter Schubert, Peter Grundmann, et al. Use of 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid as electron donating compound in a potentiometric aflatoxin M1-immunosensor[J]. *Analytica Chimica Acta*,2009,661(1):122–127
- [30] Evangelia Larou, Iakovos Yiakoumettis, Grigoris Kaltsas, et al. High throughput cellular biosensor for the ultra-sensitive, ultra-rapid detection of aflatoxin M1[J]. *Food Control*,2013, 29(1):208–212

收稿日期:2018–09–30

(上接第 194 页)

- International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93(Pt A): 208–216
- [26] Li M J, Yang J, Wang N, et al. Composition and property characterization of Rhizoma Dioscoreae polysaccharide-Fe (III) complex [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(16):2002–2005
- [27] Dong Y R, Chen G T. Research progress of polysaccharide-iron compound [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2015 (8):2890–2895
- [28] 何瑞雪,高文宏,曾新安,等. 响应面法优化水溶性大豆多糖-铁(II)配合的合成工艺[J]. *食品科学*, 2012, 33(10):98–102
- [29] 王峰,马万良,胡振兴,等. 响应面优化绞股蓝多糖铁复合物制备工艺[J]. *食品工业*, 2014(5):81–86
- [30] Que F, Mao L, Zhu C, et al. Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2006, 39(2):111–117
- [31] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9/10): 1231–1237
- [32] 方敏,王耀峰,宫智勇. 15 种水果和 33 种蔬菜的抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(10): 97–100
- [33] 刘梁,余熙前,陈彬,等. 米糠多糖铁的制备及其与 ctDNA 的相互作用[J]. *食品研究与开发*, 2016,37(14): 149–153
- [34] Lee M H, Lee Y C, Kim S S, et al. Quality and antioxidant activity of ginseng seed processed by fermentation strains [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2015, 39(2):178–182

收稿日期:2018–12–06